AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

PREPARAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA DE MARCAÇÃO “*IN VITRO*” E ESTUDO DE BIODISTRIBUIÇÃO DO OCTREOTÍDEO-[Tyr³]-
HYNIC/EDDA/TRICINA- [^{99m}Tc]

LAURA TERUMI UEDA HERNANDES MELERO

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

Orientadora:
Dra. Elaine Bortoleti de Araújo

SÃO PAULO
2008

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

PREPARAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA DE MARCAÇÃO “*IN VITRO*” E ESTUDO DE BIODISTRIBUIÇÃO DO OCTREOTÍDEO-[Tyr³]-
HYNIC/EDDA/TRICINA- [^{99m}Tc]

LAURA TERUMI UEDA HERNANDES MELERO

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

Orientadora:
Dra. Elaine Bortoleti de Araújo

SÃO PAULO
2008

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Sussumu e Tereza pela educação, amizade, carinho, conselhos, confiança, por terem me ensinado a lutar pela vida e pelos meus anseios, enfim, por serem pais. Ao meu irmão Diego por ser meu amigo, pelo companheirismo, pela ajuda e por dividir a sabedoria. Ao meu marido Milton e meu filho Kevin por me proporcionarem uma nova família com novos ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

Àquele que está sempre ao nosso lado, nos guiando, nos protegendo, nos ajudando, nos encorajando, nos ensinando a viver: Deus.

Aos familiares, amigos e colegas pelo apoio, conselhos, companhia, enfim pela amizade.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN/CNEN/SP, Dr. Nilson Dias Vieira Junior, Superintendente e Dr. José Carlos Bressiani, Diretor de Pesquisa e Desenvolvimento.

Ao MSc. Jair Mengatti, diretor da Radiofarmácia, pela oportunidade da realização deste trabalho.

À MSc. Neuza Taeko Okasaki Fukumori, Gerente de Controle de Qualidade da Diretoria de Radiofarmácia, DIRF.

À minha orientadora Dra. Elaine Bortoleti de Araújo pelos ensinamentos, pelo apoio e ajuda, por confiar em mim para a realização deste trabalho.

Aos funcionários e bolsistas da DIRF, do Biotério e do Centro de Biotecnologia do IPEN pelo auxílio no desenvolvimento da parte experimental e execução deste trabalho.

Aos professores da pós-graduação pelos ensinamentos e funcionários da pós-graduação.

À Comissão Nacional de Energia Nuclear, CNEN, pelo fornecimento da bolsa de mestrado.

A todas as pessoas que de uma forma direta ou indireta me auxiliaram nessa jornada de 28 anos.

**PREPARAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA DE MARCAÇÃO “*IN VITRO*”
E ESTUDO DE BIODISTRIBUIÇÃO DO OCTREOTÍDEO-[Tyr³]-
HYNIC/EDDA/TRICINA[^{99m}Tc]**

Laura Terumi Ueda Hernandez Melero

RESUMO

Receptores para somatostatina são amplamente expressos por vários tumores, especialmente os de origem neuroendócrina. Imagens *in vivo* destes tumores usando análogos da somatostatina radiomarcados tornaram-se uma ferramenta clínica útil em oncologia. O radiofármaco de uso consagrado para este método diagnóstico é o octreotídeo-[D-Phe¹-DTPA-¹¹¹In]. Entretanto, o uso do índio-111 (¹¹¹In) sofre limitações devido à produção no ciclotron ser limitada, a meia-vida física longa e alta energia gama, resultando em alta dose de radiação ao paciente e características de imagem subótimas. O tecnécio-99m (^{99m}Tc), produzido por um gerador de radioisótopo e viabilidade diária, com meia-vida de seis horas e emissão de raios gama de 140 keV, possui características ideais para procedimentos de imagens em medicina nuclear. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um radiofármaco de tecnécio-99m baseado em peptídeo derivado da somatostatina, o octreotídeo, destinado ao diagnóstico de tumores neuroendócrinos em medicina nuclear. A marcação pelo método indireto envolveu a adição de 20 µg do peptídeo OCT-HYNIC (octreotídeo-[Tyr³]-HYNIC), 10 mg do coligante EDDA, 20 mg do coligante tricina, aproximadamente 1110 MBq (30 mCi) de pertecnetato de sódio e 15 µg do agente redutor SnCl₂.2H₂O em pH final 6,5, incubando-se em banho de água em ebulição por 10 minutos. O controle de qualidade radioquímico para determinar a pureza radioquímica da marcação foi realizado 30 minutos e 5 horas após marcação pelo método de cromatografia em camada delgada ascendente, utilizando como fases móveis

metanol:acetato de amônio (1:1), metiletilcetona e tampão citrato de sódio 0,1 N pH 5,0, e como fases estacionárias as fitas de sílica gel (TLC-SG e ITLC-SG). Esta marcação tida como padrão, resultou numa pureza radioquímica de marcação de $89,91 \pm 4,82$ % aos 30 minutos e $91,37 \pm 6,14$ % em 5 horas. Estudando-se os parâmetros de marcação: massa dos coligantes, agente redutor e peptídeo, tempo e temperatura de reação, pH final de marcação e atividade, o melhor resultado obtido foi de $92,14 \pm 0,30$ % aos 30 minutos e $90,60 \pm 0,35$ % em 5 horas para uma massa de 80 µg de octreotídeo-HYNIC, 10 mg de EDDA, 20 mg de tricina, 150 µg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em pH final de marcação 8,0, numa atividade de até 3700 MBq (100 mCi). Essa formulação seria uma alternativa para a administração de mais de um paciente por marcação a partir da elaboração de um reagente liofilizado. A biodistribuição realizada por método invasivo nos intervalos de 1,5 e 4 horas após administração intravenosa do radiofármaco em camundongos *Swiss* avaliou a porcentagem da atividade administrada presente no sangue e nos diversos órgãos. Os dados de biodistribuição em camundongos *Swiss* e *Nude* com tumor de células AR42J (adenocarcinoma de pâncreas de rato) foram compatíveis com a distribuição do peptídeo marcado: rápido clareamento sangüíneo, alta captação nos rins devido à eliminação do peptídeo pelo trato urinário e alta captação em órgãos com alta densidade de receptores para somatostatina como pulmão, estômago, pâncreas e tumor no caso dos camundongos *Nude*. A captação do peptídeo radiomarcado na região abdominal não foi significativa, o que representa uma vantagem relativa ao diagnóstico de tumores neuroendócrinos, comuns nesta região. Os resultados de marcação e biodistribuição descritos neste estudo determinaram o potencial do peptídeo marcado com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ para uso em diagnóstico em medicina nuclear.

PREPARATION AND STANDARDIZATION OF AN “*IN VITRO*” LABELING METHODOLOGY AND STUDY OF [^{99m}Tc]-EDDA/TRICINE/HYNIC-[Tyr³]-OCTREOTIDE BIODISTRIBUTION

Laura Terumi Ueda Hernandes Melero

ABSTRACT

Somatostatine receptors are widely expressed by several tumors, especially of the neuroendocrine origin. *In vivo* images of these tumors using radiolabeled somatostatine analogues became a useful clinical tool in oncology. The radiopharmaceutical currently applied is [¹¹¹In-DTPA-Phe¹-D]-octreotide. However, the use of indium-111 (¹¹¹In) is limited by the production in cyclotron as well as the long physical half-life and high gamma energy, resulting in high dose of radiation to the patient and suboptimal characteristics of image. The technetium-99m (^{99m}Tc), produced by a radioisotope generator and daily viability, with half-life of six hours and gamma rays emission of 140 keV, is ideal for imaging procedures in nuclear medicine. The objective of this work was the development of a technetium-99m radiopharmaceutical based on a peptide somatostatine derivatived, the octreotide, to be applied in the diagnosis of neuroendocrine tumors in nuclear medicine. The labeling by indirect method was based in the addition of 20 µg of the peptide TOC-HYNIC (octreotide-[Tyr³]-HYNIC), 10 mg of EDDA and 20 mg of tricine coligands, approximately 1110 MBq (30 mCi) of sodium pertechnetate and 15 µg of the reducing agent SnCl₂·2H₂O in final pH 6.5, followed by the incubation for 10 minutes in water boiling bath. The radiochemical purity was determined 30 minutes and 5 hours after labeling by thin layer chromatography, using as mobile phase methanol:ammonium acetate (1:1), methylethilketone and sodium citrate buffer 0.1 N pH 5.0, and as stationary phases the silica gel plates (TLC-SG and ITLC-SG). This labeling

referred as standard condition resulted in radiochemical purity of $89.91 \pm 4.82 \%$ at 30 minutes and $91.37 \pm 6.14 \%$ at 5 hours. Studying the labeling parameters: mass of the coligands, reducing agent and peptide, time and temperature of reaction, pH and activity, the best results obtained were $92.14 \pm 0.30 \%$ at 30 minutes and $90.60 \pm 0.35 \%$ at 5 hours using 80 μg octreotide-HYNIC, 10 mg of EDDA, 20 mg of tricine, 150 μg of $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in a final pH 8.0, and activity up to 3700 MBq (100 mCi). This formulation can be an alternative for the administration of more than one patient per labeling procedure, using a lyophilized reagent. The biodistribution performed by invasive method in the intervals of 1.5 and 4 hours after intravenous administration of the radiopharmaceutical in *Swiss* mice determined the percentage of the activity administered in the blood and the various organs. The biodistribution data in *Swiss* and *Nude* mice bearing AR42J tumor (rat pancreatic adenocarcinoma) were compatible with the distribution of the labeled peptide: fast blood clearance, high uptake in the kidneys due to the elimination by the urinary tract, and high uptake in organs with high density of somatostatine receptors like lung, stomach, pancreas and tumor in the case of *Nude* mice. The uptake of the radiolabeled peptide in the abdominal region was not significant and represents an advantage related to the diagnosis of neuroendocrine tumors, frequently found in this region. The labeling and biodistribution results described in this study showed the potential of the $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled peptide to be applied in diagnostic procedures in nuclear medicine.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	22
2 OBJETIVOS	24
3 REVISÃO DA LITERATURA	25
3.1 Radiofarmácia e radiofármacos	25
3.2 Medicina Nuclear	26
3.2.1 O processo de aquisição e formação de imagens em medicina nuclear	29
3.2.2 Aplicações diagnósticas de radiofármacos em medicina nuclear	31
3.2.3 Aplicações terapêuticas de radiofármacos em medicina nuclear .	33
3.3 Radiofármacos de ^{99m}Tc	35
3.3.1 Os conjuntos de reativos para marcação com ^{99m}Tc e seus componentes básicos	37
3.3.2 A evolução dos radiofármacos de ^{99m}Tc	39
3.4 Radiofármacos baseados em peptídeos e proteínas	41
3.4.1 Características gerais de aplicação	41
3.4.2 Aplicação de peptídeos tumor relacionados	45
3.4.3 Somatostatina e seus análogos	48
3.4.4 Tumores neuroendócrinos	56
3.4.4.1 Diagnóstico e tratamento de tumores neuroendócrinos	58
3.4.5 Métodos de marcação de proteínas com ^{99m}Tc	61
3.5 Controle de qualidade das moléculas marcadas	68
3.5.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)	69
3.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)	70
4 MATERIAIS E MÉTODOS	73
4.1 Materiais	73

4.1.1	Equipamentos e sistemas	73
4.1.2	Reagentes e solventes	73
4.1.3	Misturas e soluções	74
4.1.4	Outros	74
4.1.5	Animais	75
4.2	Métodos	75
4.2.1	Estudo dos parâmetros de marcação do octreotídeo-HYNIC com ^{99m}Tc	75
4.2.2	Avaliação da estabilidade do produto marcado	76
4.2.3	Controle de qualidade	77
4.2.3.1	Controle de qualidade de pureza radioquímica pelo método cromatográfico em camada delgada	77
4.2.3.2	Controle de qualidade de pureza radioquímica pelo método da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)	79
4.2.4	Avaliação da biodistribuição do octreotídeo-HYNIC com ^{99m}Tc ...	80
4.2.4.1	Estudo de biodistribuição do OCT-HYNIC por método invasivo ..	80
4.2.4.2	Estudo de biodistribuição do OCT-HYNIC por método não invasivo	83
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
5.1	Estudo dos parâmetros de marcação do octreotídeo-HYNIC com ^{99m}Tc	85
5.2	Avaliação de pureza radioquímica por HPLC	117
5.3	Avaliação da biodistribuição do octreotídeo-HYNIC com ^{99m}Tc ...	119
5.3.1	Estudo de biodistribuição do OCT-HYNIC por método invasivo ..	119
5.3.2	Estudo de biodistribuição do OCT-HYNIC por método não invasivo	124
6	CONCLUSÕES	126
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Peptídeos endógenos com potencial para aplicação em diagnóstico ou terapia receptor-específico	46
2 Relação de frente (Rf) das espécies radioquímicas nos respectivos sistemas cromatográficos (Rf= distância de migração da espécie radioquímica/distância de migração do solvente)	77
3 Gradiente ACN/TFA 0,1 % utilizado no ensaio de HPLC	80
4 Pureza radioquímica da marcação do OCT-HYNIC com ^{99m} Tc na condição padrão de estudo	87
5 Pureza radioquímica dos estudos de variação da temperatura e do tempo de aquecimento na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio-99m	87
6 Pureza radioquímica do estudo da variação da massa de OCT-HYNIC na marcação com tecnécio-99m	90
7 Pureza radioquímica dos estudos de variação de atividade na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio-99m	91
8 Pureza radioquímica dos estudos de variação do pH na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio-99m	93
9 Pureza radioquímica dos estudos de variação da massa de SnCl ₂ .2H ₂ O na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio-99m	95
10 Pureza radioquímica dos estudos de variação da massa de SnCl ₂ .2H ₂ O na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio-99m para pH 7,5	97
11 Pureza radioquímica dos estudos de variação da massa de SnCl ₂ .2H ₂ O na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio-99m para pH 8,0	99
12 Resumo das purezas radioquímicas dos estudos de variação da massa de SnCl ₂ .2H ₂ O em diferentes pH	100

13	Pureza radioquímica dos estudos de variação da massa de OCT-HYNIC na marcação com tecnécio-99m para pH 8,0 e 150 μg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	101
14	Pureza radioquímica dos estudos de variação da atividade na marcação com tecnécio-99m para pH 8,0, 80 μg OCT-HYNIC e 150 μg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	103
15	Pureza radioquímica dos estudos de variação da massa do OCT-HYNIC e dos coligantes na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio-99m para pH 6,5 e 150 μg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	104
16	Pureza radioquímica dos estudos de variação da massa dos coligantes na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio-99m para pH 6,5	107
17	Pureza radioquímica dos estudos de estabilidade na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio-99m obtidos na condição padrão de marcação, para uma mesma marcação	115
18	Pureza radioquímica dos estudos de estabilidade na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio-99m obtidos após variação de diversos parâmetros de marcação em relação à condição padrão, para uma mesma marcação	116
19	Biodistribuição do radiofármaco OCT-HYNIC- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ em camundongos <i>Swiss</i> normais após administração intravenosa (porcentagem da média e desvio padrão da atividade injetada/órgão e atividade injetada/grama de órgão - N= 3 animais para cada intervalo de tempo)	119
20	Biodistribuição do radiofármaco OCT-HYNIC- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ em camundongos <i>Nude</i> após administração intravenosa (porcentagem da média e desvio padrão da atividade injetada/órgão e atividade injetada/grama de órgão - N= 4 animais para cada intervalo de tempo)	120
21	Razão de atividade/grama para tumor:músculo e tumor:sangue (mL) em camundongos <i>Nude</i>	122

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Esquema do processo de aquisição de imagens em medicina nuclear, com ampliação do sistema de detecção incluindo o colimador (A), o cristal de iodeto de sódio (B) e o tubo fotomultiplicador (C)	30
2 Esquema de obtenção dos radiofármacos de ^{99m}Tc por processo de marcação direta ou por transquelação	36
3 Esquema das reações de hidrólise e de oxidação de íons Sn^{2+}	38
4 Princípio da interação peptídeo-receptor-específico na célula tumoral	42
5 Seqüência de aminoácidos: A) somatostatina, B) octreotídeo (Sandostatin ®), C) octreotídeo-Tyr ³ - ^{123}I e D) octreotídeo-DTPA- ^{111}In (Pentetreotídeo - OctreoScan ®). Os aminoácidos em negrito estão envolvidos na ligação com o receptor	49
6 Estrutura do octreotídeo-D-Phe ¹ -Tyr ³ -HYNIC (OCT-HYNIC)	55
7 Alguns análogos do octreotídeo usados para radiomarkação com vários radioisótopos	56
8 Marcação direta de proteína reduzida com ^{99m}Tc	61
9 Marcação indireta de proteína com ^{99m}Tc utilizando quelante pré-formado	62
10 Marcação indireta de proteína com ^{99m}Tc pelo método de pós-marcação	62
11 Núcleos de tecnécio usados para marcar biomoléculas com ^{99m}Tc ..	63
12 BFCA contendo tiol e seus complexos de tecnécio	64
13 Seqüência tripeptídica como BFCA	65
14 Exemplos de núcleo nitrído- ^{99m}Tc para marcação de biomoléculas ..	65
15 Exemplos de BFCA bidentado e tridentado para marcação de	

	biomoléculas com ^{99m}Tc . O grupo R pode ser uma biomolécula ou um ligante que se liga à biomolécula	66
16	Estrutura química do HYNIC	67
17	Estruturas químicas de peptídeo-HYNIC- ^{99m}Tc usando tricina ou EDDA como coligante: A) peptídeo-(tricina) ₂ /HYNIC- ^{99m}Tc e B) peptídeo-EDDA/HYNIC- ^{99m}Tc	68
18	Equipamento de HPLC (Waters, EUA, dotado de detector UV visível, modelo 486 e detector de radiação beta e gama, modelo Radiomatic, Packard, EUA) utilizado na determinação do radiofármaco e suas espécies radioquímicas	70
19	Sistema de aquecimento em banho de água em ebulição utilizado na marcação de octreotídeo-HYNIC com ^{99m}Tc	76
20	Sistema de cromatografia em camada delgada utilizado na determinação da pureza radioquímica da marcação de octreotídeo-HYNIC com ^{99m}Tc	79
21	Contador gama (Packard-Camberra, E5002 (Cobra II), EUA) utilizado na determinação da contagem radioativa nos estudos cromatográficos e de biodistribuição	79
22	Camundongos <i>Swiss</i> utilizados no estudo de biodistribuição do radiofármaco OCT-HYNIC- ^{99m}Tc	81
23	Obtenção dos camundongos <i>Nude</i> com tumor: A) implantação das células pancreáticas AR42J, B) 1 semana de implantação, C) 2 semanas de implantação, D) 3 semanas de implantação e E) 4 semanas de implantação	83
24	Gama câmara (Mediso, Nucline TH22, Hungria) utilizada nas imagens de camundongos <i>Nude</i> com tumor AR42J com o radiofármaco OCT-HYNIC- ^{99m}Tc : A) sistema de detecção (detector e colimador) e B) sistema de aquisição e processamento das imagens.....	84
25	Representação da fita cromatográfica utilizada no controle de pureza radioquímica com as marcas de corte	85

26	Gráfico representativo da TAB. 5 da pureza radioquímica dos estudos de variação da temperatura e do tempo de aquecimento na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio-99m	89
27	Gráfico representativo da TAB. 7 da pureza radioquímica dos estudos de variação de atividade na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio-99m	92
28	Gráfico representativo da TAB. 8 da pureza radioquímica dos estudos de variação do pH na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio-99m	94
29	Gráfico representativo da TAB. 9 da pureza radioquímica dos estudos de variação da massa de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio-99m	97
30	Gráfico representativo da TAB. 10 da pureza radioquímica dos estudos de variação da massa de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio-99m para pH 7,5	98
31	Gráfico representativo da TAB. 11 da pureza radioquímica dos estudos de variação da massa de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio-99m para pH 8,0	100
32	Gráfico representativo da TAB. 13 da pureza radioquímica dos estudos de variação da massa de OCT-HYNIC na marcação com tecnécio-99m para pH 8,0 e 150 μg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	102
33	Gráfico representativo da TAB. 14 da pureza radioquímica dos estudos de variação da atividade na marcação com tecnécio-99m para pH 8,0, 80 μg OCT-HYNIC e 150 μg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	104
34	Gráfico representativo da TAB. 15 da pureza radioquímica dos estudos de variação da massa do OCT-HYNIC e dos coligantes na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio-99m para pH 6,5 e 150 μg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	106
35	Gráfico representativo da TAB. 16 da pureza radioquímica dos estudos de variação da massa dos coligantes na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio-99m para pH 6,5	108

36	Cromatograma de HPLC do A) $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e coligante- ^{99m}Tc (RT do $^{99m}\text{TcO}_4^-$ de $3,25 \pm 0,04$ minutos e RT do coligante- ^{99m}Tc de $4,57 \pm 0,18$ minutos) e B) OCT-HYNIC- ^{99m}Tc (RT do OCT-HYNIC- ^{99m}Tc de 13,17 minutos)	118
37	Gráfico comparativo da porcentagem da atividade injetada/grama de órgão da biodistribuição do radiofármaco OCT-HYNIC- ^{99m}Tc em camundongos <i>Swiss</i> e <i>Nude</i>	121
38	Análise histológica de amostra de tumor de células AR42J: A) lâmina com aumento de 50 x e B) lâmina com aumento de 400 x. Lâminas e fotos elaboradas no Laboratório de Patologia do HC-FMUSP	123
39	Imagens planares de camundongos <i>Nude</i> com tumor (AR42J) 2,5 horas após administração de OCT-HYNIC- ^{99m}Tc , adquiridas em estudo estático utilizando colimador LEHR, matriz 256 x 256 x 16, com 300 mil contagens. O círculo vermelho mostra a delimitação do tumor em camundongos <i>Nude</i>	124
40	Imagens planares de camundongos <i>Nude</i> com tumor (AR42J) 3 horas após administração de OCT-HYNIC- ^{99m}Tc , adquiridas em estudo estático utilizando colimador LEHR, matriz 256 x 256 x 16, com 300 mil contagens. O círculo vermelho mostra a delimitação do tumor em camundongos <i>Nude</i> com captação de 22,77 %	125

LISTA DE ABREVIATURAS

^{18}F	Flúor-18
^{24}Na	Sódio-24
^{32}P	Fósforo-32
^{64}Cu	Cobre-64
^{67}Ga	Gálio-67
^{68}Ga	Gálio-68
^{86}Y	Ítrio-86
^{89}Sr	Estrôncio-89
^{90}Y	Ítrio-90
^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$	Molibdênio-99-tecnécio-99m
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	Tecnécio-99m
$^{99\text{m}}\text{TcO}_2$	Colóide (óxido de tecnécio)
$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$	Tecnécio livre (pertecnetato de sódio)
^{109}Pd	Paládio-108
^{111}Cd	Cádmio-111
^{111}In	Índio-111
^{123}I	Iodo-123
^{131}I	Iodo-131
^{133}Xe	Xenônio-133
^{153}Sm	Samário-153
^{161}Tb	Térbio-161
^{165}Dy	Disprósio-165
^{166}Ho	Hólmio-166
^{169}Eu	Európio-169
^{177}Lu	Lutécio-177
^{186}Re	Rênio-186
^{188}Re	Rênio-188
^{198}Au	Ouro-198
^{201}Tl	Tálio-201

α	Alfa
α -MSH	Hormônio estimulante α -melanócito
ACN	Acetonitrila
ACTH	Hormônio adenocorticotrófico
Al_2O_3	Óxido de alumínio
APUD	Captar e decarboxilar precursores amínicos
AR42J	Adenocarcinoma de pâncreas de rato
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
β	Beta
BBN	Bombesina
BFCA	Quelante bifuncional
Bq	Bequerel
Ca^{2+}	Íon de cálcio
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCK	Colecistoquinina
Ci	Curie
Cl^-	Cloreto
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CO_2	Dióxido de carbono
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
cpm	Contagem por minuto
CT	Tomografia computadorizada
Da	Dalton
DADS	N_2S_2 diamidaditióis
DADT	N_2S_2 diaminaditióis
DAG	Diacil glicerol
DIRF	Diretoria de Radiofarmácia
DMSA	Ácido dimercaptossuccínico
DNA	Ácido desoxirribonucléico

DOTA	Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético
DOTALAN	Lanreotídeo
DTPA	Ácido dietilenotriaminopentaacético
DX 180	Peptídeo com 12 aminoácidos
ECD	N,N'-etilenodicisteinato de dietila
EDDA	Ácido etilenodiamino-N,N'-diacético
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EDTMP- ¹⁵³ Sm	Ácido etileno diamino tetrametileno fosfônico de samário-153
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal
eV	Elétron-volt
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDG- ¹⁸ F	Flúor deoxiglicose flúor-18
FG	Pré-filtro de fibra de vidro
GI	Gastrointestinal
GIP	Peptídeo inibitório gástrico
GRP	Peptídeo relacionado à gastrina
GRPR	Receptor peptídico relacionado à gastrina
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCl	Ácido clorídrico
HMPAO	Hexametilpropilenoaminoxima
H ₂ O	Água
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HYNIC	Ácido 6-hidrazinonicotínico
NATE-HYNIC	Octreotídeo-[1-Na ¹³ ,Thr ⁸ , ácido 6-hidrazinopiridina-3-carboxílico(HYNIC ⁰)]
IgG	Imunoglobulina
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e

	Nucleares
ITLC-SG	<i>Instant thin layer chromatography-silica gel</i>
K ⁺	Íon de potássio
K _d	Afinidade do receptor para o fármaco
kgf	Quilograma-força
LEHR	<i>Low Energy High Resolution</i>
MAG ₃	Ácido mercaptoacetilglicilglicilglicina
MAMA	N ₂ S ₂ monoamidamonoaminaditióis
MDP	Metilenodifosfonato
MIBG	Metaiodobenzilguanidina
MR	Ressonância magnética
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
Nal	Iodeto de sódio
Nal(Tl)	Iodeto de sódio tálio
NaOH	Hidróxido de sódio
Na ^{99m} Tc ⁷⁺ O ₄	Pertecnetato de sódio
NET	Tumor neuroendócrino
N ₂ S ₂	Diaminoditiol
nSCLC	Não SCLC
O ₂	Oxigênio
OC-HYNIC	Ácido 3-carboxílico octreotídeo-HYNIC
OCT	Octreotídeo-D-Phe ¹ -Tyr ³
OctreoScan ® ou Pentetreotídeo	Octreotídeo-DTPA- ¹¹¹ In
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
PET	Tomografia de emissão de pósitron
pH	Potencial hidrogeniônico
PnAO	Propileno amino oxima
PR	Pureza radioquímica
PRL	Prolactina
PRRT	<i>Peptide receptor radionuclide therapy</i>

	(Terapia radioisotópica com peptídeo-receptor-específico)
PTFE	Politetrafluoroetileno
RC-160	Vapreotídeo
Rf	Relação de frente
RGD	Arg-Gly-Asp
ROI	<i>Region Of Interest</i>
RPMI	Instituto Roswell Park Memorial
RT	Tempo de retenção
Sandostatin®	Octreotídeo
SCLC	Câncer de pequena célula do pulmão
-SH	Tiol livre
SiO ₂	Sílica gel
Sn ²⁺	Íon estanoso
Sn ⁴⁺	Íon estânico
SNC	Sistema nervoso central
SnCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto estanoso
SOM230	Pasireotídeo
SPECT	Tomografia computadorizada de emissão de fóton único
S-S	Ligação dissulfídica
SST-SSTR	Sistema somatostatina-receptor para somatostatina
SSTR	Receptor para somatostatina
t _{1/2}	Tempo de meia-vida
TATE-HYNIC	Octreotídeo[Thr ⁸ ,Tyr ³ ,HYNIC ⁰]
Tc ¹⁺	Tecnécio 1+
Tc ³⁺	Tecnécio 3+
Tc ⁴⁺	Tecnécio 4+
Tc ⁵⁺	Tecnécio 5+
TEAP	Solução trietilamônio fosfato

TFA	Ácido trifluoroacético
TLC-SG	<i>Thin layer chromatography-silica gel</i>
TSH	Hormônio estimulante da tireóide
UBI	Ubiquidina
UV	Ultravioleta
V	Volt
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo

1 INTRODUÇÃO

Peptídeos têm se tornado o assunto crescente na oncologia nuclear no diagnóstico e terapia do alvo tumoral. Dentre vários peptídeos relevantes, os derivados da somatostatina radiomarcados se estabeleceram como radiofármacos de sucesso^{1, 2}. Na última década, a cintilografia de receptor radiopeptídico usando o análogo da somatostatina octreotídeo acoplado com ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) e marcado com índio-111 (¹¹¹In) tem sido usado rotineiramente em medicina nuclear para localização e estadiamento de tumores somatostatina-receptor-positivos incluindo os tumores neuroendócrinos^{2, 3}.

Entretanto, o radioisótopo índio-111 apresenta características subótimas para aplicação diagnóstica, incluindo meia-vida física relativamente longa (2,83 dias) e fótons gama (171,3 e 245,4 keV) que contribuem para aumento da dosimetria do paciente⁴. Além disto, o peptídeo OCT-DTPA-¹¹¹In apresenta significativa e persistente captação na região abdominal que prejudica a visualização de tumores nesta região. A respeito do sucesso dos análogos de octreotídeo marcados com ¹¹¹In como agente de imagem, análogos da somatostatina incorporados ao radioisótopo tecnécio-99m (^{99m}Tc) (tempo de meia-vida de 6,02 horas e radiação gama de 140 keV) seriam mais desejáveis. O rápido clareamento sangüíneo e o rápido acúmulo tumoral de pequenos peptídeos permitem o uso de radioisótopos de meia-vida curta como o ^{99m}Tc. Além disso, ^{99m}Tc é o radioisótopo amplamente disponível, comumente usado na medicina nuclear com um custo benefício maior². As vantagens do ^{99m}Tc em comparação ao ¹¹¹In para marcação de peptídeo são: fácil disponibilidade, baixo custo, propriedades de imagem melhores, menor dose de radiação e um período mais curto de exame (4 horas), em contraste a peptídeos marcados com ¹¹¹In que requerem 24 a 48 horas para uma imagem adequada³.

Uma variedade de quelantes bifuncionais tem sido avaliada para conjugação a peptídeos para marcação com tecnécio-99m. Entre eles, HYNIC é o

mais atrativo porque sua monodenticidade permite o uso de uma variedade de coligantes, levando a distribuições biológicas completamente diferentes².

Octreotídeo-Tyr³-HYNIC-^{99m}Tc (OCT-HYNIC-^{99m}Tc) foi obtido utilizando-se ácido etilenodiamino-N,N'-diacético (EDDA) ou tricina como coligantes e a eficácia de ligação do peptídeo radiomarcado foi estudada com sucesso em modelos animais e em humanos².

Foi comparada a eficácia clínica do OCT-HYNIC-^{99m}Tc com octreotídeo-DTPA-¹¹¹In (OctreoScan®), comercialmente disponível, em pacientes com vários tumores neuroendócrinos e o OCT-HYNIC marcado com ^{99m}Tc apresentou uma maior razão tumor:radiação de fundo, fornecendo cintilografias com qualidade superior para identificação tumoral³.

A Diretoria de Radiofarmácia do IPEN produz e distribui atualmente, o radiofármaco OCT-DTPA-¹¹¹In para aplicação no diagnóstico de tumores neuroendócrinos. Apesar do custo alto do radiofármaco, que depende da importação do radioisótopo índio-111, sua distribuição cresce anualmente. O aumento da aplicação do OCT-DTPA-¹¹¹In no diagnóstico e acompanhamento de pacientes com tumores neuroendócrinos pode ser atribuído em parte, ao uso também crescente do radiofármaco octreotato-DOTA-¹⁷⁷Lu, também distribuído pela DIRF-IPEN, para terapia de tumores somatostatina-receptor-positivos.

Desta forma, tornou-se interessante fornecer uma nova alternativa para diagnóstico de tumores neuroendócrinos, que apresente melhor relação de custo e com potencial clínico similar.

OCT-HYNIC-^{99m}Tc parece ser uma opção viável, tendo em vista os resultados clínicos já apresentados. Estudos de marcação de OCT-HYNIC com ^{99m}Tc, para definir as melhores condições para formulação de um reagente liofilizado são pré-requisitos no desenvolvimento de um produto com potencial para comercialização.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo estudar as condições de marcação com tecnécio-99m do peptídeo octreotídeo-Tyr³-HYNIC, avaliar a viabilidade de metodologias de controle de qualidade a serem aplicadas na determinação de pureza radioquímica da marcação, bem como avaliar a afinidade do peptídeo marcado por receptores tumorais específicos. Os resultados deste estudo auxiliarão concluir sobre a viabilidade de aplicação do mesmo no diagnóstico de tumores em medicina nuclear.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Radiofarmácia e radiofármacos

A radiofarmácia é um ramo da ciência que estuda os aspectos químicos, físicos, físico-químicos, farmacológicos, bioquímicos, biológicos, fisiológicos e disciplinas similares que se relacionam com o desenvolvimento de moléculas marcadas com elementos radioativos denominadas radiofármacos, e utilizadas em medicina nuclear como traçadores radioativos. A radiofarmácia pode ser classificada em industrial (responsável pelos insumos como radiofármacos, reagentes liofilizados, geradores e radioisótopos em geral), hospitalar (responsável pela preparação das doses individuais e marcação com radioisótopos de gerador) e centralizada (responsável pela etapa final da preparação do radiofármaco ou doses e envio aos centros de medicina nuclear)⁵.

Radiofármacos são, portanto, medicamentos que, baseados na lei de cada país, e quando preparados para uso, contêm um radioisótopo incorporado e são usados rotineiramente em seres humanos para o diagnóstico e terapia de várias doenças em medicina nuclear^{6, 7, 8}. São geralmente compostos orgânicos pequenos ou inorgânicos com composição definida. Podem ser também macromoléculas como anticorpos monoclonais e fragmentos de anticorpos que não são estequiometricamente marcados com um radioisótopo⁶.

Os radiofármacos podem ser divididos em duas classes: aqueles cuja biodistribuição é determinada exclusivamente pelas propriedades química e física, e aqueles cuja distribuição final é determinada por sua ligação a um receptor ou outras interações biológicas. Essa última classe é freqüentemente chamada de radiofármacos alvo específicos⁶.

Para uso diagnóstico, estes radioisótopos, após localizarem um alvo dentro do corpo, devem emitir radiação eletromagnética que pode penetrar o tecido para ser detectado externamente e promover a aquisição de imagens. Raios gama ou raios X distribuem suas energias uniformemente através do tecido, podendo atravessar muitos tecidos espessos⁸.

Em contraste, para uso terapêutico, é desejado que o radioisótopo deposite uma dose altamente localizada no tecido específico e cause destruição celular local. Esta função pode ser realizada por radioisótopos que emitam partículas beta (β) ou alfa (α). Partículas beta percorrem apenas poucos milímetros (aproximadamente 100 diâmetros de células) e partículas alfa menos de 100 μm em tecido mole, diminuindo a chance de destruição do tecido normal por ser uma terapia localizada⁸.

Os radioisótopos usados em medicina nuclear para propósitos diagnósticos são essencialmente os emissores de radiação gama, havendo outras radiações que também podem contribuir. Dentre esses está o radioisótopo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e as dezenas de complexos organometálicos obtidos com esse metal⁸.

Para minimizar a dose radioativa absorvida (a energia depositada pela radiação) pelo paciente enquanto se obtém a informação desejada no diagnóstico, utilizam-se quantidades reduzidas de radioisótopo, preferencialmente os de meia-vida física ($t_{1/2}$) curta. Isótopos com meia-vida física curta, de 10 segundos a 80 horas, são os preferidos em aplicações diagnósticas. Uma maior atividade em um alvo gera melhor imagem e, conseqüentemente, melhora a informação diagnóstica. A situação ideal seria usar isótopos que produzam somente raios gama e não partículas, eliminando a irradiação de órgãos não-alvo⁸.

A toxicidade do isótopo ou radiofármaco torna-se menos importante, pois, somente quantidades mínimas são administradas nos pacientes, quantidade traço que não satura o sistema fisiológico⁸.

Com o descobrimento do primeiro radioelemento há cento e treze anos, a preparação de mais de 1800 radioisótopos foi facilitada. Embora apenas poucos destes radioelementos possuem características para aplicação no diagnóstico e terapia, eles têm contribuído no cuidado da saúde de milhões de pacientes através do mundo e direcionam investigações para a formação de uma modalidade médica bem estabelecida⁸.

3.2 Medicina Nuclear

A medicina nuclear é um dos muitos campos da medicina, definida como uma especialidade médica clínica e laboratorial que usa traçadores radioativos (radiofármacos) estáveis para estudo fisiológico e na localização não-

invasiva de lesões ocultas (diagnóstico por meio de aquisição de imagem), estudo bioquímico, em processos celulares, e promove terapia (α ou β) com fontes não-seladas^{10, 11}.

A medicina nuclear teve seu pioneirismo em 1935 com o trabalho de George Hevesy que usou o fósforo-32 (^{32}P) (originalmente produzido por F. Joliot e J. Curie em 1934) em estudos de biodistribuição em animais, e com Joseph Hamilton que fez tentativas para tratar pacientes com leucemia com sódio-24 (^{24}Na) em 1936⁸.

Somente após o fim da Segunda Guerra Mundial, quando os reatores nucleares foram colocados à disposição para uso com fins pacíficos, é que a utilização dos radioisótopos se intensificou, principalmente em função das aplicações do ^{131}I (iodo-131), tanto na forma de NaI (iodeto de sódio) quanto de moléculas orgânicas marcadas, para tratamento e diagnóstico de várias doenças. Nesta fase do desenvolvimento, já se conheciam alguns dos efeitos colaterais e deletérios das radiações, tornando-se imperativo garantir a segurança dos produtos que seriam utilizados em seres humanos¹².

O início oficial da medicina nuclear foi em 1971 e os estudos mais comuns realizados nessa década foram os exames cerebrais com ácido-dietilenotriaminopentaacético (DTPA) ou glucoheptonato marcados com tecnécio- $^{99\text{m}}\text{Tc}$, exames hepáticos com o enxofre coloidal- $^{99\text{m}}\text{Tc}$, exames ósseos com pirofosfato- $^{99\text{m}}\text{Tc}$, exames renais com ortiodohipurato- ^{131}I , exames pulmonares com macroagregado de albumina- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e ^{133}Xe (xenônio) gasoso¹⁰.

Dentre os novos procedimentos e materiais incorporados à medicina nuclear na década de 70 incluem-se a imagem de perfusão miocárdica, estudos de fluxo sanguíneo, imagem hepatobiliar, estudos de ventilação com aerossol, utilização de células brancas sanguíneas marcadas e imagem de paratireóide¹⁰.

Alguns dos mais usados e importantes radiofármacos da década de 80 são microesferas de albumina- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ para perfusão pulmonar, microcolóide de albumina- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ para imagem hepática e imagem de linfonodo sentinela, e teboroxima- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (um composto lipofílico neutro, derivado do ácido borônico) para perfusão miocárdica¹⁰.

Com a introdução dos aceleradores de partículas (ciclotron), o número de radioisótopos disponíveis para pesquisas biomédicas rapidamente cresceu e esta disponibilidade estimulou intensamente as investigações médicas⁸.

Como a medicina nuclear é baseada na teoria de traçadores, que tem bases moleculares, o desenvolvimento apropriado de uma nova geração de radiofármacos como os peptídeos radiomarcados e reconhecimento molecular têm sido pesquisados⁸.

Embora as informações anatômicas fornecidas pelos métodos de imagem de tomografia computadorizada (CT) e imagem por ressonância magnética (MR) tenham superados os históricos exames nucleares como o exame hepático com enxofre coloidal e o exame cerebral, técnicas mais novas de medicina nuclear com novos radiotraçadores, novos e melhores dispositivos de imagem, e novos processos algoritmos de imagem baseados em computador, levaram a um aumento de métodos funcionais na medicina nuclear¹³.

O princípio básico da imagem na medicina nuclear, por exemplo, no diagnóstico de câncer, é identificar uma alteração fisiológica qualitativamente e quantitativamente entre os cânceres e tecidos normais (alterações diferentes). Com caracteres radioisotópicos apropriados da molécula traçadora pode ser possível detectar alterações fisiológicas examinando o paciente com uma câmara muito sensível a raios gama¹³.

Radioisótopos que emitem um ou mais raios gama por decaimento radioativo são chamados emissores de fóton único, enquanto radioisótopos que emitem pósitrons durante o decaimento são chamados emissores de pósitron. As câmaras usadas para detectar os dois tipos diferentes de decaimento são a gama câmara de tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT) e a câmara de tomografia de emissão de pósitron (PET). Sem levar em consideração a câmara, os exames de medicina nuclear são geralmente mais sensíveis para alterações fisiológicas precoces em câncer e geralmente mais sensíveis que métodos anatômicos. Embora os métodos de medicina nuclear tenham fornecido menos informação anatômica do que imagens por CT ou MR, estes métodos têm fornecido uma anatomia mais precisa, junto com a informação fisiológica¹³.

Nos últimos anos, a aquisição de imagens metabólicas com tomografia por emissão de pósitron se tornou uma técnica consolidada no estadiamento de pacientes com câncer. PET utilizando FDG-¹⁸F (flúor deoxiglicose flúor-18) se baseia na detecção de alterações metabólicas observadas em células cancerosas. Este exame proporciona informações independentemente das características estruturais associadas, permitindo não somente a detecção do câncer, mas

também fornecendo um discernimento do comportamento biológico do tumor (quando associado à tomografia computadorizada, fornecendo imagens funcionais). Além disso, a habilidade de executar a imagem de corpo inteiro com um exame sem aumento da sobrecarga radioativa faz deste, uma técnica ideal para classificar pacientes com câncer^{10, 14}.

3.2.1 O processo de aquisição e formação de imagens em medicina nuclear

Uma vez que os radiofármacos tenham sido preparados e a pureza dos mesmos tenha sido determinada, o material injetado no paciente fornece informações sobre sua localização através da emissão dos raios gama, os quais são detectados em equipamento denominado câmara de cintilação ou gama câmara¹⁵.

A gama câmara foi patenteada em 1958 e comercializada pela primeira vez em 1961, onde todas as imagens usavam técnicas analógicas. As imagens apareciam em tubos de raios catódicos e eram registradas por fotografia. Quando a fotografia instantânea da Polaroid (Polaroid Corp) tornou-se disponível, foi usada extensivamente, freqüentemente com três sistemas de lentes capturando imagens de três diferentes quadros. Computadores foram introduzidos pela primeira vez em meados de 1970 e foram usados predominantemente para estudos dinâmicos como a imagem renal e estudos de fluxo sanguíneo¹⁰.

O processo de aquisição e formação de imagens em gama câmara é baseado na interação de raios gama ou fótons, com detectores existentes em uma câmara de cintilação. Primeiramente os raios são classificados por um dispositivo denominado colimador, o qual é uma blindagem de chumbo que pode apresentar diferentes espessuras, e furos com diferentes diâmetros e ângulos de inclinação, que permite apenas a passagem dos raios com direção paralela aos orifícios; dependendo do tipo de foco, os colimadores são classificados em paralelo, *pinhole*, convergente e divergente. Uma vez que tenham atravessado o colimador, os raios interagem com o detector de iodeto de sódio impregnado com cloreto de tálio (NaI(Tl)) e fótons de luz são emitidos; esses fótons chocam-se com o fotocátodo de tubos fotomultiplicadores que, submetidos à diferença de potencial de aproximadamente 1000 V, aceleram os elétrons gerados no fotocátodo através de uma série de eletrodos metálicos, conhecidos como

dinodos, até o anodo na outra extremidade dos tubos. A corrente elétrica gerada nesse processo é então amplificada, a altura dos pulsos é delimitada e, juntamente com as coordenadas X e Y da sua origem, o sinal é transferido a um sistema de registro, armazenamento e análise (FIG. 1)¹⁵.

FIGURA 1 – Esquema do processo de aquisição de imagens em medicina nuclear, com ampliação do sistema de detecção incluindo o colimador (A), o cristal de iodeto de sódio (B) e o tubo fotomultiplicador (C) (adaptado de Cabrejas, 1999)¹⁵

Tendo sido os dados registrados é possível determinar a quantidade de radiação em um órgão específico. Para isso é necessário delimitar regiões de interesse (ROI= *region of interest*) sobre o órgão e, utilizando-se um programa de processamento, as contagens ou atividades radioativas são fornecidas.

O SPECT é uma técnica tomográfica de imagem da medicina nuclear que utiliza raios gama, sendo muito semelhante à imagem planar da medicina nuclear convencional pelo fato que usa uma gama câmara. Contudo, é capaz de fornecer verdadeiro dado biotopológico em 3D. Esta informação é tipicamente apresentada como cortes transversais do paciente, mas a potente elaboração da imagem computadorizada pode facilmente ser reformatada em cortes sagitais ou manipulada quando necessário. A gama câmara gira ao redor do paciente e gera imagens a partir de vários ângulos diferentes¹⁶.

3.2.2 Aplicações diagnósticas de radiofármacos em medicina nuclear

Alguns isótopos metálicos extensivamente presentes no diagnóstico na medicina nuclear são o ^{111}In (índio-111), ^{67}Ga (gálio-67) e ^{201}Tl (tálio-201), usados em um amplo espectro de aplicações, incluindo detecção de tumores malignos, processos inflamatórios, monitoramento da viabilidade cardíaca e inflamação do músculo cardíaco. Estes isótopos podem ser usados como elementos monoatômicos, como no caso do ^{201}Tl que é administrado ao paciente na forma de cloreto de tálio ($^{201}\text{TlCl}$) ou ligado a outras moléculas, as quais quelam ^{111}In e ^{67}Ga ⁸.

Uma variedade de fatores contribui para a utilização destes isótopos. O primeiro e melhor, é a capacidade do isótopo ou radiofármaco (combinação do isótopo e molécula que direciona o isótopo ao alvo) identificar algum parâmetro clínico significativo. Nos anos 60, o citrato de gálio- ^{67}Ga foi usado para localizar certos tecidos moles e processos inflamatórios. Mais tarde, o cloreto de tálio- ^{201}Tl foi usado para se concentrar no coração e promover uma indicação de fluxo sangüíneo em vários segmentos miocárdicos, bem como a ausência de fluxo indicando a extensão e posição de tecido não-viável. Por último, Thakur e McAfee inventaram uma técnica para marcar células brancas do sangue com ^{111}In , podendo ser usado como agente de detecção de infecção⁸.

Enquanto o uso clínico e disponibilidade destes isótopos são importantes, o custo e a fácil distribuição são componentes essenciais para seu amplo uso. Segundo Weiner e Thakur, o ^{111}In tem um custo quatro a cinco vezes maior que o ^{67}Ga . A meia-vida física destes isótopos é relativamente longa (aproximadamente 3 dias), possibilitando a distribuição para uso em

radiofarmácias ou hospitais⁸. Já no Brasil, o custo do ^{111}In é cerca de oito vezes maior que o do ^{67}Ga .

A escolha do radioisótopo depende ainda de suas propriedades físicas e nucleares (meia-vida física, tipo de energia e tipo de emissão radioativa). Aproximadamente 80 % dos radiofármacos usados em medicina nuclear são compostos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$, disponível no mercado através de geradores de ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (molibdênio-99-tecnécio-99m) com baixo custo. A meia-vida de aproximadamente 6 horas é longa o suficiente para permitir o preparo do radiofármaco e para a realização das imagens. Ao mesmo tempo, é curta o suficiente para permitir a administração de uma quantidade de atividade de $^{99\text{m}}\text{Tc}$, sem promover uma dose significativa de radiação ao paciente⁶. Os fótons de cerca de 140 keV são colimados para obtenção de imagens de resolução espacial superior nos procedimentos de imagens cintilográficas em gama câmara ou em SPECT e a ausência de emissão particulada torna este radioisótopo favorável para utilização diagnóstica^{6, 17}.

As características dos radioisótopos devem ser combinadas às propriedades de biodistribuição e especificidade dos radiofármacos por determinados órgãos e tecidos, de modo a possibilitar a aplicação estrutural, funcional ou até mesmo bioquímica relacionadas à presença de estados patológicos diversos, tais como a presença de tumores.

O uso de biomoléculas marcadas com alta especificidade por um órgão ou receptor em particular, em cintilografia, gera boas imagens dos sítios que expressam os receptores específicos para a biomolécula em questão, minimizando a exposição a outros órgãos¹⁸.

Uma área de interesse para desenvolvimento de radiofármacos específicos que tem sido bastante explorada nos últimos anos é o estudo de peptídeos endógenos e sua correlação com estados patológicos, particularmente a expressão de receptores específicos para interação com estes peptídeos por células tumorais.

Os peptídeos endógenos fornecem inúmeras aplicações potenciais, entretanto, para aplicações usuais em medicina nuclear, deve-se encontrar o melhor traçador e um peptídeo análogo. Provavelmente, o aspecto mais importante para o desenvolvimento de peptídeos como agentes diagnósticos, é preencher lacunas importantes no armamento diagnóstico⁴.

3.2.3 Aplicações terapêuticas de radiofármaco em medicina nuclear

Os determinantes naturais no desenvolvimento de radiofármacos para terapia são a escolha do radioisótopo, condições locais da produção e a molécula carreadora ou substrato. O radioisótopo deve emitir suficiente radiação destrutiva e se manter no sítio alvo, o qual depende principalmente da biocinética da molécula carreadora⁸.

Radioisótopos que decaem por emissão de partícula beta são os mais usados. A seleção de um radioisótopo adequado conta com características físicas (meia-vida, tipo de energia e extensão), especificidade de localização e farmacocinética. O montante de energia depositada nos tecidos alvos deve ser cuidadosamente balanceado. A atividade específica do radiofármaco (atividade do radioisótopo/massa do substrato) é de importância particular na terapia, pois são requeridas altas razões lesão/não-lesão para o produto ser usado clinicamente⁸.

Dessa forma, a atividade específica, pureza radionuclídica e atividade total do radioisótopo são determinantes numa eventual aplicação clínica terapêutica. Muitos radioisótopos emissores beta da época de 1995, tais como ⁶⁴Cu (cobre-64), ⁸⁹Sr (estrôncio-89), ⁹⁰Y (ítrio-90), ¹⁰⁹Pd (paládio-109), ¹⁵³Sm (samário-153), ¹⁶⁵Dy (disprósio-165), ¹⁶⁶Ho (hólmio-166), ¹⁶⁹Er (európio-169), ¹⁷⁷Lu (lutécio-177), ¹⁸⁶Re (rênio-186) e ¹⁹⁸Au (ouro-198), têm sido propostos para a terapia radioisotópica, para serem usados como radiofármacos terapêuticos na palição de dor óssea, terapia tumoral, radiosinovectomia, etc⁸.

Cloreto de estrôncio-89, hidroxietileno difosfonato de rênio-186 e ácido etileno diamino tetrametileno fosfônico de samário-153 (EDTMP-¹⁵³Sm) são utilizados para alívio da dor causada por lesões ósseas metastáticas⁸.

Peptídeos e anticorpos monoclonais radiomarcados também têm sido utilizados na produção de radiofármacos receptor-específicos utilizados em terapia. Quando se utiliza um anticorpo monoclonal como substrato de marcação, a modalidade terapêutica é denominada radioimunoterapia e no caso dos peptídeos radiomarcados, terapia peptídeo-receptor associado. Nestas modalidades terapêuticas, nas quais um número limitado de sítios de ligação está disponível, radioisótopos livres de carreadores são ideais para promover alta afinidade de ligação aos receptores¹⁹.

A terapia radionuclídica com análogos da somatostatina é usualmente proposta a pacientes com doença amplamente disseminada, não acessível à terapia radioativa localizada ou quimioterapia refratária, sendo particularidade da doença neuroendócrina⁴.

A fisiologia do tumor é crítica na escolha de radioisótopos terapêuticos. Se a massa tumoral é bem vascularizada, um peptídeo pequeno pode se difundir dentro dessa massa. Ele pode ser ligado, via receptor, uniformemente às células que estão distribuídas no tumor. Se o complexo peptídeo-radioisótopo está ligado à superfície celular, ele pode ou não ser internalizado. O tumor não precisa ser bem vascularizado neste caso e o complexo peptídeo-receptor não precisa ser internalizado, se o radioisótopo for emissor β^- de alta energia, por exemplo, ^{90}Y (máximo 2,3 MeV). Um isótopo com este comportamento possibilita o chamado efeito “crossfire”. As células podem ser irradiadas próximas à vizinhança ou perto de uma zona central necrótica. Entretanto, a toxicidade pode aumentar pela irradiação de células normais.

O ^{111}In emite elétrons Auger que têm um espectro de penetração menor que um diâmetro celular (0,02 – 10 μm) no tecido. Uma dupla quebra permanente no DNA (quebra elétron Auger) é o mais letal para a célula. Isso significa que o ^{111}In pode ser potencialmente usado para aplicações terapêuticas se o complexo que contém o isótopo puder ser internalizado na célula alvo. Isso permitiria que os elétrons Auger interagissem com componentes celulares críticos, particularmente o DNA, causando mínima toxicidade para células normais⁴.

O ^{177}Lu tem sido o intermediário do ^{90}Y e ^{111}In . Ele tem uma energia β^- máxima de 0,497 MeV (78 %), elétrons de conversão de 0,048 – 0,143 MeV e um fóton gama que pode ser usado na imagem de pacientes (0,208 MeV), embora em pouca abundância (11 %). Seu β^- tem um alcance máximo no tecido de aproximadamente 2 mm (200 células) menor que o ^{90}Y . Dessa forma, o ^{177}Lu poderia participar no “crossfire”, mas esperando que deposite menos radiação no tecido normal⁴.

3.3 Radiofármacos de ^{99m}Tc

Descoberto em 1943, por Pierre e Segré, o ^{99m}Tc somente se tornou disponível para utilização rotineira em 1958, com o desenvolvimento do gerador ^{99}Mo - ^{99m}Tc no *Brookhaven National Laboratory* – EUA.

Nos 15 anos que separam a descoberta do radioisótopo e a disponibilização do gerador do radioisótopo ^{99m}Tc , os estudos foram voltados à caracterização das propriedades químicas e físicas do elemento, tendo sido determinado que o radioisótopo decai por emissão de radiação gama, com energia dos fótons de 140 keV e meia-vida física de 6,02 horas, sendo estas características bastante próprias para utilização nos equipamentos de detecção existentes, além do tempo adequado para preparação, distribuição e uso nos pacientes.

Do ponto de vista químico o metal pode existir em diversos estados de oxidação formando complexos com diferentes ligantes e número de coordenação²⁰.

A obtenção dos radiofármacos de ^{99m}Tc é um processo relativamente simples, que envolve a adição da solução de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$) a um reagente contendo o agente redutor, o agente quelante e outros excipientes, onde deverão ocorrer processos de oxi-redução e de complexação, sendo ainda possível ocorrer processos de substituição de ligantes, denominado transquelação (FIG. 2). Essa relativa simplicidade permitiu o desenvolvimento de um grande número de compostos com potenciais aplicações médicas, inicialmente utilizando moléculas com reconhecida característica quelante, evoluindo para a preparação de compostos específicos para as características químicas do ^{99m}Tc e para observação de fenômenos a níveis moleculares ou de receptores.

de tempo. Para alcançar este objetivo, o novo radiofármaco deve ter um tempo de retenção no sangue relativamente curto. O rápido clareamento sanguíneo é necessário para minimizar a radioatividade não alvo. Por outro lado, o tempo de retenção no sangue deve ser longo o suficiente para permitir ao radiofármaco chegar aos sítios receptores e alcançar a captação adequada no tecido alvo. O tempo do radiofármaco chegar ao alvo também deve ser curto, caso contrário, levaria um longo tempo para conseguir as imagens diagnósticas. A razão da constante de ligação do radiofármaco no receptor deve ser rápida e a razão de dissociação lenta. Desta forma, o acúmulo da radiação no tecido alvo pode ser maximizado. Finalmente, o novo radiofármaco deve ter um clareamento renal rápido e evitar acúmulo de radioatividade no trato gastrointestinal, que pode obscurecer a visualização dos alvos abdominais⁶.

3.3.1 Os conjuntos de reativos para marcação com ^{99m}Tc e seus componentes básicos

Para que os complexos sejam obtidos, inicialmente é necessário reduzir o estado de oxidação do ^{99m}Tc , o qual normalmente é utilizado na forma de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{Tc}^{7+}\text{O}_4$), para estados de oxidação menores, como Tc^{5+} , Tc^{4+} , Tc^{3+} ou Tc^{1+} , a fim de que os pares de elétrons dos grupos ligantes possam interagir com os orbitais do metal²¹.

Na grande maioria dos casos, notadamente nos reagentes para marcação com tecnécio-99m comerciais, o agente redutor utilizado é o íon estanoso (Sn^{2+}) na forma de cloreto (Cl^-), cuja limitação é a utilização em meio ácido ou neutro, uma vez que em pH ligeiramente alcalino o processo de hidrólise do íon é acelerado, dando origem a espécies insolúveis. Além disso, o produto reage prontamente com agentes oxidantes, como o oxigênio presente na solução de diluição da amostra, o que torna importante a eliminação do gás e a manutenção do produto em condições de ausência de espécies oxidantes (FIG. 3)²¹.

FIGURA 3 – Esquema das reações de hidrólise e de oxidação de íons Sn^{2+}

A concentração do agente redutor é crítica no processo de obtenção dos complexos, não podendo ser aumentada indiscriminadamente, uma vez que deve haver um intervalo ótimo da relação agente quelante/agente redutor²².

Do mesmo modo, o controle do pH é fator fundamental para a obtenção dos complexos, uma vez que pequenas variações podem diminuir a pureza radioquímica da marcação, observado para uma série do grupo ligante amino oxima, onde a variação do pH altera a pureza radioquímica da marcação de um determinado ligante e em um mesmo pH, diferentes derivados apresentam diferentes rendimentos de marcação²³.

Também pode ocorrer, em diferentes pH, mudança na estrutura do complexo sem alterar a pureza radioquímica da marcação, dando origem a um radiofármaco com distribuição biológica diferente daquela esperada, como ocorre para o DMSA (ácido dimercaptossuccínico)²⁴.

Para muitos complexos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ é possível uma perfeita adequação entre a característica e concentração do ligante, do agente redutor e do pH, permitindo a obtenção de radiofármacos com alta pureza radioquímica. Entretanto, isso nem sempre é possível. Algumas vezes, a velocidade da formação do complexo é menor que a taxa de redução do pertecnetato, dando origem à espécie coloidal, ou o melhor pH para obtenção do complexo é superior a 7, o que leva à hidrólise do íon Sn^{2+} ; nestes casos é comum o uso de agentes pré-quelantes, cuja cinética de reação ou o pH do meio são adequados à formação do complexo, mas cuja estabilidade deste é menor que a do complexo de interesse, tornando possível o processo de transquelação que pode ocorrer espontaneamente, por mudança de pH do meio ou por aquecimento.

Outras espécies reativas presentes nos conjuntos reativos são os agentes antioxidantes, como os ácidos gentísico e ascórbico, utilizados para estabilização dos complexos por remoção de espécies radicalares formadas por radiólise²⁵. Alguns cuidados devem ser tomados na escolha do agente antioxidante uma vez que no reagente para marcação de MDP (metilenodifosfonato), por exemplo, o uso dos ácidos gentísico ou ascórbico na formulação dá origem a produtos diferentes, detectados por análise cromatográfica²⁶.

3.3.2 A evolução dos radiofármacos de ^{99m}Tc

Os primeiros radiofármacos preparados e utilizados em meados da década de 60 foram baseados em moléculas quelantes já utilizadas para outros fins na indústria farmacêutica e química, como ocorreu para o ácido dimercaptossuccínico (DMSA), o ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e o ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA), utilizados como quelantes *in vivo* para descontaminação de pessoas que ingeriram metais e, como radiofármacos de ^{99m}Tc, são utilizados para avaliação da função renal²⁷.

Em meados de 1970 foram utilizados diversos derivados de ácido difosfônico²⁸, para uso em cintilografia óssea, iniciando o caminho do estudo de séries homólogas de um determinado grupo quelante, na busca do produto com melhor relação órgão de interesse/outros órgãos, estudo que foi prosseguido por outros pesquisadores utilizando diferentes cadeias carbônicas para o mesmo grupo quelante^{29, 30}.

Em meados da década de 70 foi utilizado pela primeira vez o conceito de molécula bifuncional. Pretendeu-se preparar um radiofármaco contendo a estrutura da lidocaína ligada a um núcleo quelante não específico na esperança de que o composto concentrasse no coração; o insucesso do projeto levou ao descobrimento de um novo radiofármaco para estudo da função hepatobiliar³¹, o qual depois foi melhorado com a preparação de novos derivados^{32, 33}. Todos os complexos preparados até aquela data faziam uso dos átomos de oxigênio dos grupos ligantes para a coordenação com o metal.

O desenvolvimento da segunda geração de radiofármacos de ^{99m}Tc, iniciado na década de 80, foi marcado pela introdução de novos grupos quelantes,

por exemplo, os baseados em ligantes dos tipos amino e aminotiol. Um dos primeiros exemplos dessas categorias foi o composto denominado ciclam³⁴, um composto tetraamino cíclico, o qual forma um complexo catiônico com ^{99m}Tc e tem intensa excreção renal. Modificações moleculares levaram à formação de outro ligante tetraamino, composto por dois grupos amino e dois grupos oxima, o qual passou a ser denominado genericamente de propileno amino oxima (PnAO)³⁵. Este composto mostrou-se neutro e lipofílico, capaz de atravessar a barreira hematoencefálica sem ser metabolizado no interior do cérebro³⁶. A preparação de série homóloga ao PnAO³⁷ levou à preparação de um composto cuja introdução de centros quirais na molécula permitiu que a mesma passasse a ser metabolizada e retida no cérebro³⁸, dando origem ao radiofármaco para estudos de perfusão cerebral HMPAO- ^{99m}Tc , onde HMPAO é o ligante hexametilpropilenoaminooxima.

Paralelamente ao desenvolvimento dos ligantes tetraamino foram preparados ligantes do tipo diaminoditiol (N_2S_2), que também deram origem a importantes radiofármacos. Com a definição da estrutura do grupo quelante foi possível introduzir modificações moleculares na busca de potenciais radiofármacos, levando a obtenção do ligante N,N'-etilenodicisteinato de dietila (ECD), cujo complexo de ^{99m}Tc é utilizado para estudos cintilográficos de perfusão cerebral³⁹. A manutenção da função amida, mas com outras modificações, deu origem ao ligante ácido mercaptoacetilglicilglicilglicina, ou MAG_3 , cujo complexo de ^{99m}Tc é utilizado em estudo de perfusão renal^{40, 41}.

A terceira geração de radiofármacos de ^{99m}Tc segue por duas vertentes principais: uma relacionada à preparação de radiofármacos bifuncionais⁴², utilizando os grupos quelantes preparados nas décadas de 80 e 90, e moléculas com reconhecido tropismo e metabolização por algum sistema específico, como é o caso das modificações do fluoronitroimidazol- ^{18}F , utilizado na detecção de células hipoxiadas, que foi acoplado a um ligante do tipo aminooxima³⁹, e da 2-deoxi-2- ^{18}F -fluoro-D-glicose, utilizada na avaliação do metabolismo celular de glicose, com indicação para detecção de tumores, que foi acoplada a um ligante do tipo diaminoditiol⁴³. A outra vertente está relacionada à marcação de anticorpos monoclonais e peptídeos⁶, em sua maioria direcionados para receptores específicos superexpressos em células tumorais.

3.4 Radiofármacos baseados em peptídeos e proteínas

3.4.1. Características gerais de aplicação

Peptídeos são estruturas muito pequenas, classificadas por conterem pelo menos cinquenta aminoácidos (aproximadamente 5500 Da). A partir de cem aminoácidos a série é considerada uma proteína. As características e propriedades dos peptídeos determinam seu potencial de aplicação no desenvolvimento de radiofármacos receptor-específicos. Peptídeos maiores são mais lentos para se difundirem dentro do tumor e podem ser altamente susceptíveis à proteólise. O baixo peso molecular rende aos peptídeos baixa antigenicidade, rápido clareamento sangüíneo, rápida penetração no tecido e tumor, e podem ser produzidos facilmente sem custos altos⁴.

O interesse por peptídeos e receptores peptídicos no câncer é devido ao fato de receptores peptídicos serem freqüentemente expressos em muitos cânceres humanos primários. Em muitos casos, pode ser demonstrado que estes receptores peptídicos são superexpressados no câncer, em comparação a sua expressão em tecido normal adjacente ao neoplasma e/ou em seu tecido normal de origem^{44, 45}.

Os receptores são usados primariamente como sítios ligantes para um peptídeo análogo e pequenas considerações são dadas à sua função biológica. Conseqüentemente, esta estratégia conta primariamente com a presença de receptores tumorais capazes de ligar com alta afinidade aos peptídeos análogos e não a um receptor mediado por ações fisiológicas ou patofisiológicas do peptídeo. Aplicações clínicas bem sucedidas deste princípio são o diagnóstico e terapia utilizando peptídeos-receptor-específicos radiomarcados^{44, 45}.

Uma característica importante deste processo é que muitos receptores peptídicos são acoplados à proteína G, ou seja, eles podem ser internalizados dentro da célula junto com seu ligante (usualmente agonistas) depois da interação receptor-ligante na membrana celular (FIG. 4)⁴⁵.

FIGURA 4 – Princípio da interação peptídeo-receptor-específico na célula tumoral (adaptado de Reubi, 2008)⁴⁵

Conforme representado na FIG. 4, o peptídeo radiomarcado (P) é injetado intravenosamente no paciente e distribuído pelo corpo todo. Se o paciente tem um tumor com expressão de células cancerosas, o radiopeptídeo se ligará ao receptor peptídico correspondente (P-R) e se internalizará com o receptor dentro da célula onde a radioatividade se acumulará. A detecção do corpo inteiro pela gama câmara detectará a radioatividade acumulada no tumor, enquanto a radioatividade permanecida no corpo será rapidamente clareada através dos rins⁴⁵.

Alternativamente, pode-se ter a vantagem do receptor funcionar como alvo, para obter uma resposta biológica particular. O melhor exemplo de uma resposta biológica mediada por receptor peptídico é a inibição da secreção de hormônio pela somatostatina e seu análogo sintético octreotídeo. Além disso, vários peptídeos mostraram exercer *in vitro* uma função ativa na regulação de muitos tipos de células tumorais, sugerindo que o tratamento em longo prazo com um peptídeo análogo adequado pode ser capaz de reduzir ou parar o crescimento tumoral *in vivo*. Numa ampla variedade de modelos tumorais em animais expressando vários receptores peptídicos, foi demonstrada significativamente a inibição do crescimento tumoral ou mesmo a interrupção do crescimento pelo uso de peptídeos análogos específicos, não radioativos e não tóxicos⁴⁵.

Como moléculas pequenas e hidrofílicas, peptídeos são caracterizados por sua excelente permeabilidade permitindo um acesso fácil e rápido ao sítio tumoral depois da injeção sistêmica. Há uma exceção: peptídeos normalmente não atravessam a barreira hematoencefálica normal e não entram no cérebro em quantidades significativas ($< 0,1\%$ do total de peptídeo injetado) depois da injeção sistêmica. Isto é uma vantagem clara quando órgãos periféricos ou tumores são os alvos pretendidos, pois o cérebro expressa uma alta densidade da maioria de receptores peptídicos. O cérebro, sendo o alvo, poderia ser a origem de muitos efeitos colaterais no sistema nervoso central. Entretanto, peptídeos podem ser capazes de penetrar a barreira hematoencefálica quando esta última está rompida, por exemplo, no caso de tumores gliais indiferenciados como glioblastomas. O peptídeo pode então ser capaz de alcançar os sítios tumorais e permanecer lá^{44, 45}.

Peptídeos são rapidamente excretados do corpo. Isso ocorre por excreção renal ou hepatobiliar ou ambas, dependendo do peptídeo e do tipo de modificação estrutural executada nele⁴⁵.

Peptídeos são compostos fisiológicos e intrinsecamente não tóxicos comparados a drogas quimioterapêuticas atuais. Efeitos colaterais, se ocorrerem, podem ser primeiramente devido a ações fisiológicas dos peptídeos e podem ser esperados após administração de doses farmacológicas dos compostos não radioativos, nesse caso, durante o tratamento em longo prazo de tumores⁴⁵.

Inversamente, esperam-se efeitos colaterais desprezíveis se peptídeos radiomarcados são usados para diagnóstico ou terapia *in vivo*, pois massas de peptídeo muito baixas devem ser aplicadas para este propósito. Além disso, peptídeos normalmente executam uma função modulatória em vários sistemas biológicos e suas ações serão freqüentemente contrabalanceadas e possivelmente aniquiladas por outros hormônios, fatores de crescimento ou neurotransmissores agindo nesses mesmos sistemas. Outra característica importante de peptídeos regulatórios é sua falta de antigenicidade, por seu tamanho pequeno. Seus análogos normalmente também não são antigênicos⁴⁵.

Peptídeos são facilmente sintetizados e modificados, e extremamente sensíveis a peptidases. São rapidamente quebrados devido à clivagem de ligações peptídicas por muitos tipos de peptidases presentes em muitos tecidos. Então, análogos metabolicamente estáveis devem ser desenvolvidos como pré-

requisito para o sucesso de aplicações clínicas, em particular nos tratamentos em longo prazo. O melhor exemplo é o desenvolvimento de análogos da somatostatina como o octreotídeo, lanreotídeo e vapreotídeo, que possuem, comparados à somatostatina natural, uma prolongação no tempo de meia-vida plasmática e tecidual, e uma ação mais longa^{4, 45, 46}. Além de aumentar a estabilidade, o planejamento de análogos sintéticos pode envolver o acoplamento a isótopos radioativos com a inserção de grupamentos quelantes na estrutura protéica⁴⁵.

Pequenos peptídeos (8 a 20 aminoácidos) são suficientemente grandes para ligarem-se a uma molécula quelante, que está suficientemente distante da área de ligação ao receptor, prevenindo a perda da afinidade de ligação do peptídeo ao receptor⁴⁵.

Quelantes como o ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) ou o ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA) são moléculas utilizadas para marcação de peptídeos com radioisótopos metálicos. Entretanto, estas moléculas relativamente grandes podem afetar as propriedades de ligação do peptídeo ao receptor^{44, 45}.

A lipofilicidade e a hidrofiliabilidade contribuem para a farmacocinética e a distribuição tecidual de um dado peptídeo. Peptídeos lipofílicos são seqüestrados pelo fígado e podem ser eliminados por excreção hepatobiliar, enquanto peptídeos hidrofílicos podem ser eliminados pelos rins. A ciclização de peptídeos pode inserir restrita mobilidade conformacional e elevar a ligação ao receptor. Grupamentos quelantes podem ser inseridos no peptídeo não interferindo com a ligação dos peptídeos ao seu alvo biológico. Eles podem estar a certa posição, longe do sítio de ligação ao receptor, ou espaçadores de aminoácidos podem ser introduzidos entre o peptídeo original e o grupamento quelante⁴.

A primeira síntese de peptídeo baseada em resina foi descrita há mais de 46 anos e o interesse de usar peptídeos radiomarcados para diagnóstico e terapia é de aproximadamente uma década, tendo que esperar por novos adventos automatizados para a síntese de peptídeos em larga quantidade, sendo esse, um conjunto de métodos de purificação, caracterização e otimização que resultaram numa explosão de inúmeros peptídeos candidatos⁴.

Essas novas técnicas também aceleraram o desenvolvimento comercial de radiofármacos baseados em peptídeos, ampliando recursos

diagnósticos para a comunidade médica nuclear. Neste curto período, houve um crescimento exponencial no desenvolvimento de peptídeos radiomarcados para aplicações diagnósticas e terapêuticas na oncologia⁴.

O interesse pela aplicação de proteínas radiomarcadas também surgiu pelas inúmeras pesquisas envolvendo anticorpos monoclonais e seus fragmentos como agentes nas aplicações diagnósticas e terapêuticas. Ambos os tipos de moléculas, peptídeos e anticorpos monoclonais, possuem alta afinidade para caracterizar receptores ou antígenos, expressos no tumor ou outros tipos de células⁴.

Apesar da natureza protéica comum, peptídeos e anticorpos monoclonais apresentam propriedades estruturais e de cinética de distribuição distintas, que interferem e direcionam para aplicações específicas em medicina nuclear. Anticorpos e peptídeos são normalmente modificados para introdução de um agente quelante em sua estrutura, para então ser ligado a um radioisótopo desejado, do tipo metálico ou lantanídeo, adequado para a aplicação escolhida⁴.

3.4.2 Aplicação de peptídeos tumor relacionados

Uma grande variedade de peptídeos tem sido identificada, os quais têm grande afinidade por receptores característicos que estão superexpressos em um grande número de tipos de células tumorais. Há pelo menos 850 peptídeos endógenos bem caracterizados a partir de um peptídeo adequado ou seu análogo, podendo ser escolhido para uma aplicação intencional⁴.

A TAB. 1 mostra uma lista selecionada de peptídeos, suas funções e células alvo.

TABELA 1 – Peptídeos endógenos com potencial para aplicação em diagnóstico ou terapia receptor-específico

Peptídeo	Função	Doença alvo/receptor
• Bombesina	SNC e atividade do trato GI	Glioblastomas, SCLC, câncer de próstata, mama, gástrico, cólon e câncer pancreático.
• CCK-B/gastrina	Contração da vesícula biliar/secreção ácida	SCLC, tumores GI, câncer ovariano, tireóide medular, homologia para receptores VIP.
• Fator de crescimento epidermal	Promotor de crescimento	Câncer de mama.
• Peptídeo relacionado à gastrina	Secreção de gastrina	GRP/neuromedina B.
• α -MSH	Regulação de pigmento da pele	Células de melanoma.
• Somatostatina e análogos	Fator inibitório da liberação do hormônio de crescimento	Tumores neuroendócrinos, SCLC, câncer de mama, linfócitos, subtipos 1 – 5.
• VIP	Vasodilatador, promotor de crescimento, imunomodulador	Subtipos 1 e 2, tumores epiteliais, câncer de mama, câncer de cólon, nSCLC, câncer pancreático, bexiga e câncer ovariano.

* SNC= sistema nervoso central, GI= gastrointestinal, SCLC= câncer de pequena célula do pulmão, nSCLC= não SCLC, CCK= colecistoquinina, GRP= peptídeo relacionado à gastrina, VIP= peptídeo intestinal vasoativo, α -MSH= hormônio estimulante α -melanócito (adaptado de Weiner e Thakur, 2002)⁴.

Pequenos peptídeos radiomarcados têm mostrado um grande potencial para imagem e terapia de tumores em medicina nuclear. Sua disponibilidade a partir de fontes sintéticas, alta afinidade por receptores de tecidos alvo e o pequeno tamanho levando à rápida excreção, fez dos peptídeos um dos principais alvos em pesquisas radiofarmacêuticas⁴⁷.

O peptídeo intestinal vasoativo marcado com ¹²³I (iodo-123) foi inicialmente estudado em pacientes com câncer coloretal, pancreático e gástrico, e tumores carcinóides⁴.

Dentre os compostos que estão sob intensa investigação para desenvolvimento de radiofármacos receptor-específicos estão a colecistoquinina-B/gastrina, bombesina, fator de crescimento epidermal, antagonistas $\alpha_v\beta_3$ e hormônio estimulante alfa-melanócito⁴.

Colecistoquinina (CCK) e gastrina estão envolvidas com a regulação de várias funções no trato gastrointestinal. CCK pode agir como fator de crescimento para células normais e malignas. Suas ações são mediadas por dois receptores, CCK-A e CCK-B, os quais têm, respectivamente, baixa e alta afinidade pela gastrina. Há uma alta incidência (90 %) de receptores CCK-B em câncer medular de tireóide, mas não em cânceres de tireóide diferenciados⁴.

Bombesina, um peptídeo de 14 aminoácidos, originalmente isolada da pele de rã, tem uma alta afinidade por receptor peptídico relacionado à gastrina (GRPR). A bombesina pertence a uma família de peptídeos, que inclui peptídeos derivados de pele de porco, peptídeo liberador de gastrina (GRP) com 27 aminoácidos e Neuromedina B com 10 aminoácidos. Receptores para GRP estão superexpressos em uma variedade de cânceres e sua ativação estimula o crescimento celular e sua proliferação⁴.

O fator de crescimento epidermal (EGF), um peptídeo grande (5 kDa), está envolvido no crescimento celular. Em 30 a 60 % de biópsias de câncer de mama, esse receptor (EGFR) está superexpresso 110 vezes comparado às células normais. Este receptor é um alvo atrativo para diagnóstico e terapia, desde que sua pré-regulação seja inversamente correlacionada com a expressão de receptor estrogênico⁴.

Moléculas de adesão representam uma parte crítica no tráfego celular, permitindo que células se liguem em sítios vasculares específicos dentro do corpo. Essas moléculas são particularmente importantes na invasão metastática por

células tumorais e na angiogênese tumor-induzida. Integrinas, subunidades α e β são glicoproteínas transmembrana que participam nesses dois processos. Antagonistas para $\alpha_v\beta_3$ podem se ligar a células tumorais, bloquear a angiogênese tumor-associada e causar regressão tumoral⁴.

Peptídeos análogos ao hormônio alfa melanócito estimulante radiomarcado (α -MSH) têm sido estudados por mais de uma década na detecção de lesão de melanoma. Receptores para esse peptídeo estão presentes em humanos e em linhagens celulares de melanoma murínico⁴.

De todos os sistemas peptídeo-receptor-específico estudados, em associação ao diagnóstico e terapia do câncer, o mais intensamente estudado é o sistema somatostatina-receptor para somatostatina (SST-SSTR)⁴.

3.4.3 Somatostatina e seus análogos

A somatostatina, um hormônio peptídeo endógeno de 14 ou 28 aminoácidos, tem um tempo de meia-vida sanguíneo (biológico) extremamente curto, de dois a quatro minutos⁴⁸ (FIG. 5).

É um peptídeo multifuncional, sintetizado pelo hipotálamo e pâncreas, atuando como neurotransmissor no sistema nervoso central e como hormônio em outros sítios⁴⁹. Foi isolada pela primeira vez a partir de um extrato hipotalâmico e mostrou inibir a liberação de hormônio de crescimento pela glândula hipofisária anterior em 1973. Subseqüentemente mostrou inibir a liberação de outros hormônios da hipófise anterior incluindo hormônio adenocorticotrófico (ACTH), prolactina (PRL) e hormônio estimulante da tireóide (TSH).

FIGURA 5 – Seqüência de aminoácidos: A) somatostatina, B) octreotídeo (Sandostatin®), C) octreotídeo-Tyr^{3-123I} e D) octreotídeo-DTPA-¹¹¹In (Pentetreotídeo - OctreoScan®). Os aminoácidos em negrito estão envolvidos na ligação com o receptor (adaptado de Olsen e colab., 1995)⁵⁰

Entre muitos efeitos da somatostatina se destacam a supressão da liberação de muitos peptídeos intestinais como insulina, glucagon, gastrina, motilina, peptídeo inibitório gástrico (GIP), peptídeo intestinal vasoativo (VIP), secretina, colecistoquinina, peptídeo relacionado à gastrina (GRP); inibição da liberação de outros hormônios a nível hipofisário, pancreático e gastrointestinal; inibição da proliferação de certas células^{18, 49, 50}. O GRP estimula a proliferação do epitélio intestinal normal e maligno, e células do epitélio bronquial normal; está presente também no fator de crescimento autócrino em pequena célula de carcinoma de pulmão⁵⁰.

A superexpressão de receptores de somatostatina em células tumorais é 100 vezes maior do que em células normais¹⁸, principalmente de origem neuroendócrina como carcinóides, tumor de célula da ilha pancreática, pequena célula de câncer de pulmão e alguns carcinomas de tireóide⁴⁹.

A formação e secreção de peptídeos por muitas células neuroendócrinas são inibidas pela somatostatina⁵⁰. Com influência no crescimento, progressão e metástase do tumor, através de mecanismos direto e

indireto na interação com receptores específicos, a somatostatina forma a base para o uso em terapia de tumores com receptor-somatostatina-positivo⁵¹.

A somatostatina e seus congêneres podem potencializar os efeitos antiproliferativos em tumores neuroendócrinos por diferentes mecanismos, incluindo a inibição de peptídeo regulatório liberado pela hipofisária, intestino, pâncreas e outros tecidos endócrinos somatostatina-sensíveis, além do antagonismo direto dos efeitos do fator de crescimento em células tumorais⁵⁰.

A somatostatina parece inibir diferentes caminhos de sinais da transdução, incluindo a formação da adenosina monofosfato cíclica (cAMP), diacil glicerol (DAG), movimento do canal de íon de cálcio (Ca^{2+}) e potássio (K^+), e fosforilação protéica (ativação da tirosina fosfatase)⁵⁰.

Por ser baseado em múltiplos mecanismos de ação, existem muitos subtipos de receptores de somatostatina⁵⁰. Até o presente, cinco tipos de receptores de somatostatina (SSTR 1 a SSTR 5) foram identificados. A somatostatina mostra afinidade por todos os receptores enquanto os análogos sintéticos mostram uma variação substancial⁵².

Teoricamente, a somatostatina pode ser administrada como um medicamento para controle da liberação de peptídeos biologicamente ativos, quando eles são produzidos em excesso por tumores neuroendócrinos relacionados ao receptor. Foi inicialmente estudada como agente anti-tumor quando mostrou efeitos anti-proliferativos em cultura de células tumorais, modelos tumorais em animais e em tumores neuroendócrinos em homens^{4, 49, 50}.

Os efeitos antiproliferativos da somatostatina podem auxiliar também no controle e redução do tamanho do tumor. Porém, a somatostatina deve ser infundida intravenosamente e tem um tempo de meia-vida biológica muito curto permitindo pouca captação tumoral. Na tentativa de aumentar os efeitos terapêuticos da somatostatina, um número de derivados deste peptídeo natural foram produzidos^{4, 49, 50}.

O octreotídeo foi desenvolvido para elevar os efeitos de crescimento anti-tumor com o aumento do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) circulante para 1,5 a 2 horas, sendo o primeiro análogo sintético introduzido em uso clínico. Esse maior $t_{1/2}$ permitiu também a localização no tumor levando à sua detecção cintilográfica^{4, 49, 50}.

A sequência e a estrutura da curvatura de quatro aminoácidos que se ligam ao receptor foram conservadas, enquanto o resto da molécula foi alterada para inibir a quebra na circulação. Com isso, o octreotídeo tem uma meia-vida plasmática consideravelmente longa e é mais potente comparado a somatostatina nativa. O análogo sintético da somatostatina é comercialmente conhecido como Sandostatin^{®50}.

Como os análogos da somatostatina radiomarcados podem ser usados para radioterapia sistêmica e investigações diagnósticas, subseqüentemente, em 1994, o octreotídeo foi modificado com a adição de um quelante de DTPA na porção N-terminal da D-fenilalanina, inserido para marcação com o radioisótopo índio-111, permitindo realizar imagens de tumores com o radiomarcado, tornando-se o primeiro agente baseado em peptídeo aprovado pela FDA^{4, 51}. A proteólise do octreotídeo-DTPA-¹¹¹In (Pentetreotídeo-¹¹¹In ou OctreoScan-¹¹¹In®) é reduzida, devido aos D-aminoácidos inseridos na sequência e os aminoácidos N- e C-terminal serem modificados (FIG. 5)⁴.

As enzimas normalmente têm sua especificidade definida, degradando um peptídeo em C- ou N- terminal (exopeptidases) ou ligando e clivando somente onde ocorre naturalmente L-aminoácidos⁴. A complexação do peptídeo com o radioisótopo é realizada no sítio N-terminal do peptídeo por meio de conjugação de um agente quelante, geralmente hidrofílico⁴⁹.

Derivados da somatostatina também foram radiomarcados com iodo-123 de modo a verificar a possibilidade de imagem nuclear como no caso do octreotídeo marcado com ¹²³I (FIG. 5). Para radioiodar o peptídeo, o terceiro aminoácido, fenilalanina, foi substituído pela tirosina. Octreotídeo-Tyr³-¹²³I é rapidamente clareado pelo fígado, excretado no sistema hepatobiliar e intestinos, interferindo nas imagens de abdômen, obscurecendo lesões abdominais e da pelve. Imagens tardias não são ideais devido ao tempo de meia-vida curto de 13 horas do ¹²³I^{49, 50, 53}.

A marcação realizada exclusivamente em laboratórios especializados limitou seu valor clínico. Essas deficiências foram corrigidas com o desenvolvimento do octreotídeo-DTPA-¹¹¹In aplicado clinicamente há anos, especialmente na oncologia, sendo bem estabelecido no diagnóstico por imagem de tumores neuroendócrinos^{49, 50, 53}.

Esse radiofármaco mostrou com sucesso, localizar uma ampla variedade de tumores receptor-positivo para somatostatina incluindo carcinóide, tumores de célula da ilhota, gastrinoma, motiloma, feocromocitoma, carcinoma medular de tireóide, neuroblastoma, paraganglioma, glucagonoma, adenoma hipofisário, meningioma, vipoma e insulinoma, podendo detectar lesões primárias na pequena célula (SCLC) e não-pequena célula (nSCLC) do câncer de pulmão^{4, 50}.

O ^{111}In é um isótopo rico em prótons que decai por captura eletrônica a cádmio-111 (^{111}Cd) com uma meia-vida física de 2,83 dias. Os principais fótons gama utilizados para detecção em estudos de imagem são os de energia de 171,3 keV, com abundância de 90,4 % e de 245,4 keV com abundância de 94 %⁴.

Após a administração intravenosa, o octreotídeo-DTPA- ^{111}In inicialmente se localiza na tireóide, glândula hipofisária, fígado, baço, rins e bexiga. É rapidamente clareado pelos rins e somente 2 % da dose injetada sofre excreção hepatobiliar. Dentro de 10 minutos após a administração, aproximadamente 33 % da dose permanece na circulação. A atividade acumulada presente na urina é de 25 % após 3 horas, 50 % após 6 horas e 90 % após 48 horas. Disso, aproximadamente 10 % se liga a um componente não-peptídico. Inicialmente há um pequeno metabolismo do octreotídeo-DTPA- ^{111}In . Em 4 horas, o ^{111}In ainda está ligado ao peptídeo intacto no sangue e apenas 10 % da atividade total na urina não é ligada ao peptídeo. O baço é o órgão crítico, seguido pelos rins e medula óssea^{4, 53}.

O rápido clareamento favorece a razão tumor:radiação de fundo e o clareamento hepatobiliar relativamente baixo facilita a imagem abdominal⁵⁰.

O uso bem sucedido de octreotídeo-DTPA- ^{111}In no diagnóstico de tumores somatostatina-receptor-positivos tem intensificado a pesquisa por novos radiofármacos alvo específicos baseados em biomoléculas pequenas⁶.

Estudos preliminares sugerem que o octreotídeo-DTPA também possa ser usado em tumores de origem mesenquimal. A identificação de lesões octreotídeo-DTPA positivas indicam os pacientes que poderiam se beneficiar pela terapia não radioativa de octreotídeo ou terapia com análogos do octreotídeo marcados com elementos emissores β^- ⁴.

Há uma forte correlação entre uma imagem positiva e a presença de receptores de somatostatina (SSTR), sugerindo que octreotídeo-DTPA- ^{111}In seja

um indicador *in vivo* de SSTR. Entretanto, o octreotídeo tem uma alta afinidade ($K_d \sim 1$ nM) apenas para os receptores de subtipos SSTR 2 e 5, dentre os 5 subtipos que foram clonados. Entre esses, SSTR 2 é o subtipo expresso com maior frequência⁴.

A sensibilidade do octreotídeo-DTPA-¹¹¹In em detectar uma série de lesões neuroendócrinas é de 60 a 90 %. É demonstrado que a baixa sensibilidade em algumas lesões é devido à ausência de SSTR. A razão alvo:radiação de fundo em vários tumores neuroendócrinos está correlacionada diretamente com o teste do mRNA para o SSTR 2⁴.

Receptores SST são expressos em câncer de pulmão, câncer de célula renal, tumores de mama, linfoma de Hodgkin e não-Hodgkin e podem ser visualizados com sucesso na imagem usando octreotídeo-DTPA-¹¹¹In⁴.

Demonstrou-se que a meia-vida biológica do OctreoScan-¹¹¹In em tumores foi maior que 700 horas. Também se demonstrou *in vitro* que OctreoScan-¹¹¹In foi internalizado dentro das células tumorais e localizado no citoplasma e ao redor no núcleo. Dados mais recentes também confirmaram a localização nuclear de OctreoScan-¹¹¹In. Utilizando tumores teciduais de pacientes injetados com OctreoScan-¹¹¹In, este mostrou ser localizado primeiro na membrana tumoral, citoplasma e finalmente dentro do núcleo. Em outro estudo de cultura celular, OctreoScan-¹¹¹In foi incubado com células receptor-positivo e receptor-negativo e então, a fração celular nuclear foi isolada. A presença do ¹¹¹In na maior fração nuclear foi somente uma função do tempo de incubação para células receptor-positivo. Mais de 85 pacientes com doença neuroendócrina refratária foram tratados com 62 a 69 % de resposta⁴.

Porém, limitações como propriedades de imagem e custo, atribuídas ao radioisótopo Índio-111 estimularam a procura de novos radioisótopos como o ⁹⁰Y e ¹⁶¹Tb (térbio-161) para aplicações terapêuticas, e ⁶⁸Ga (gálio-68), ⁶⁴Cu, ¹⁸F (flúor-18) e, em particular ^{99m}Tc, para imagem⁸. A desvantagem do octreotídeo-DTPA-¹¹¹In é o alto custo do radioisótopo produzido em ciclotron, disponibilidade restrita, além das propriedades físicas de decaimento subótimas⁷ como energia gama levando a uma baixa resolução de imagem e dosimetria relativamente alta ao paciente^{54, 55}.

Devido às propriedades nucleares ideais do ^{99m}Tc , tais como baixo custo, fácil disponibilidade de sistemas geradores de ^{99}Mo - ^{99m}Tc e características de imagem favoráveis bem reconhecidas, a radiomarcagem com este é desejada⁵¹.

Várias tentativas de desenvolver um análogo da somatostatina marcado com ^{99m}Tc utilizando uma variedade de sistemas quelantes falharam devido a complicações de procedimentos de marcação e/ou biodistribuição *in vivo* desfavoráveis⁵³.

Em estudos mais antigos, a somatostatina foi marcada com ^{99m}Tc por método direto de ligação, pela quebra da ligação S-S (dissulfídica) originando grupos tiol livres. Porém, foi observado acúmulo não específico em tecido rico em receptor, provavelmente devido à baixa afinidade ao receptor e ao curto tempo de meia-vida. Derivados do octreotídeo marcados com ^{99m}Tc têm sido investigados geralmente sem sucesso devido à dificuldade na redução da ponte dissulfídica no método de marcação direta. Recentemente, no desenvolvimento de uma marcação indireta, o octreotídeo foi acoplado a moléculas quelantes constituídas de grupos tiol livres como propileno amino oxima (PnAO) ou 6-hidrazinonicotinato (HYNIC) e usados em aplicações clínicas⁵¹.

Béhé e Maecke *apud* Bangard e colaboradores, desenvolveram um derivado de octreotídeo para marcação com ^{99m}Tc , utilizando como agente quelante o grupamento ácido 6-hidrazinonicotínico (HYNIC). O derivado octreotídeo-D-Phe¹-Tyr³-HYNIC (FIG. 6), marcado com ^{99m}Tc utilizando tricina e EDDA (ácido etilenodiamino-N,N'-diacético) como coligantes, mostrou ligação *in vivo* estável em membranas do córtex cerebral de ratos e padrões de biodistribuição *in vivo* promissores em animais com tumores induzidos. Neste modelo animal, as relações tumor:rins e tumor:fígado foram maiores do que as observadas para o octreotídeo-DTPA- ^{111}In ^{53, 53}.

FIGURA 6 – Estrutura do octreotídeo-D-Phe¹-Tyr³-HYNIC (OCT-HYNIC) (adaptado de Bangard e colab., 2000)⁵³

A baixa dose de radiação recebida com ^{99m}Tc favorece o uso repetido em investigações, como na monitoração terapêutica ou aplicações em crianças, além da farmacocinética favorável e alta resolução espacial⁵⁴.

O desenvolvimento de um análogo de somatostatina baseado em ^{99m}Tc, NeoTect-^{99m}Tc, para detecção de câncer de pulmão, promoveu o método não-invasivo para diferenciar nódulos pulmonares solitários malignos dos benignos ou massas detectadas por CT ou raio-X de tórax⁴.

Virgolini e colaboradores acoplaram o ácido tetraacético 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N''' (DOTA) ao lanreotídeo (DOTALAN) (FIG. 7), um análogo do octreotídeo. O lanreotídeo tem a vantagem de poder se ligar aos subtipos SSTR 3 e 4, além dos subtipos SSTR 2 e 5, com alta afinidade ($K_d \sim 4 - 10$ nM), podendo ser marcado com ⁹⁰Y e ¹¹¹In⁵⁶.

DOTALAN-¹¹¹In tem sido usado em estudos para detectar nSCLC e SCLC em lesões pulmonares com grande sucesso⁴.

O vapreotídeo (RC-160) (FIG. 7) tem afinidade de ligação ao subtipo 4 do SSTR podendo ser radiomarcado com ¹²³I, ¹¹¹In, ¹⁸⁸Re (rênio-188) e ^{99m}Tc. Tem sido relatado que o RC-160, em contraste ao octreotídeo, atravessa a barreira hematoencefálica e poderá ser usado na imagem de diferentes tumores cerebrais⁵⁵.

Análogos de somatostatina radiomarcados com emissores β^- vêm sendo utilizados em estudos clínicos investigativos que visam verificar o potencial de tais radiofármacos na terapia de tumores neuroendócrinos que expressam receptores para somatostatina.

Os peptídeos usados em terapia são octreotídeo-DTPA- ^{111}In , octreotídeo-DOTA- ^{90}Y , lanreotídeo-DOTA- ^{90}Y , octreotato-DOTA- ^{177}Lu , octreotídeo-TETA- ^{64}Cu e fator de crescimento epidermal- ^{111}In ⁴.

Foi feito um estudo de comparação do octreotídeo-DOTA- ^{111}In (DOTATOC- ^{111}In) e OctreoScan- ^{111}In em 10 pacientes. DOTATOC- ^{111}In mostrou a mesma precisão diagnóstica mas o clareamento foi mais rápido no sangue e em outros tecidos. Muitos pacientes receberam tratamentos múltiplos com DOTATOC- ^{90}Y e todos tiveram alguma resposta. Houve uma mínima toxicidade renal ou da medula óssea, consistente com doses absorvidas relativamente baixas nos órgãos estimados pelas injeções babuínas com DOTATOC- ^{86}Y (ítrio-86). O órgão crítico foi os rins⁴.

Somatostatina-14	Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys
Octreotídeo	D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr(ol)
Lanreotídeo	β -D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH ₂
Tyr3-octreotídeo (OCT)	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr(ol)
RC-160	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Trp-NH ₂
Tyr3-octreotato	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr

FIGURA 7 – Alguns análogos do octreotídeo usados para radiomarcagem com vários radioisótopos (adaptado de Sosabowski e colab., 2003)⁵⁷

3.4.4 Tumores neuroendócrinos

No final de 1960 descobriu-se que algumas células do trato gastrointestinal eram derivadas do tecido da crista neural embrionária e relacionadas ao tecido da crista neural encontrada, bem como, medula adrenal, hipotálamo hipofisário, paratireóides, ilhas endócrinas dentro da tireóide ou pâncreas, e células endócrinas espalhadas nos tratos respiratório e gastrointestinal^{49, 58}.

Essas células têm dois aspectos em comum: a produção de hormônios peptídicos e a habilidade de sintetizar aminas através de precursores,

originalmente conhecida como APUD (captar e decarboxilar precursores amínicos). Células APUD produzem peptídeos e aminas que atuam como hormônio ou neurotransmissor. As aminas características e peptídeos associados às células APUD estão presentes no sistema nervoso central e sistema endócrino, sendo assim, o termo “neuroendócrino” substituiu o termo “APUD” para descrever essas células. A formação e secreção de peptídeos por muitas células neuroendócrinas são inibidas pela somatostatina⁵⁰.

Os tumores neuroendócrinos (NETs) foram descritos pela primeira vez em 1888 por Otto Lubarsch que encontrou múltiplos tumores íleos em dois pacientes na autópsia. Isso foi 15 anos depois de Oberndorfer introduzir o termo carcinóide para tumores íleos que apresentam um curso de doença mais benigna do que os carcinomas de cólon^{46, 58}.

NETs compreendem um grupo heterogêneo de neoplasias originárias de células endócrinas, caracterizadas pela presença de grânulos secretórios e habilidade de produzir aminas biogênicas e hormônios polipeptídicos^{46, 58}.

O comportamento clínico dos NETs é extremamente variável, podendo ser funcional ou não, se estendendo desde tumores de crescimento lento (NETs bem diferenciados) que são a maioria, até tumores muito malignos e altamente agressivos (NETs pouco diferenciados)⁵⁸.

O mecanismo de captação de neuroaminas, assim como a presença de receptores de peptídeo e transportadores na membrana celular de muitos NETs, constituem a base do uso clínico de ligantes radiomarcados específicos, para imagem e terapia⁵⁸.

A classificação tradicional dos NETs inclui tumores originários na medula adrenal e gânglio simpático, células C da glândula tireóide, ilhas do pâncreas, assim como células endócrinas distribuídas pelos tratos digestivo ou respiratório^{46, 58}.

De acordo com a última classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), que é baseada na histologia do tumor, tamanho tumoral e presença ou ausência de metástases local/distante, os NETs deveriam ser estratificados em tumores neuroendócrinos bem diferenciados, carcinomas endócrinos bem diferenciados, carcinomas neuroendócrinos pouco diferenciados e carcinomas misto exócrino-endócrino. Os NETs bem diferenciados tem a importante capacidade de captar neuroaminas e expressar receptores específicos

em suas membranas, assim como receptores de somatostatina (SSTR), embora não em todos os casos, sendo esta característica de grande valor na localização e tratamento destes tumores⁴⁶.

Enquanto uma relativa variedade de opções terapêuticas está disponível para tratamento destes pacientes (por exemplo, cirurgia, terapia com análogo da somatostatina, interferon- α , radioterapia com peptídeo-receptor-específico, quimioterapia, quimio-embolização, etc), poucos são curativos e muitos tratamentos são paliativos⁴⁶.

Não está claro porque certos tumores se mantêm localizados e respondem bem à terapia, enquanto outros apresentam doença metastática e severos sintomas hormonais. Então, o sucesso de tratamento dessas doenças necessita de uma aproximação multidisciplinar para controlar sintomas, estabilizar ou prevenir o crescimento e raramente alcançar a cura⁴⁶.

A resposta do tumor para opções terapêuticas diferentes pode ser definida, de acordo com o critério estabelecido pela OMS resposta completa (completa regressão de toda evidência clínica, radiológica e hormonal do tumor), resposta parcial (redução de 50 % ou mais em todo o tumor mensurável, sintomas clínicos e níveis hormonais, com não aparecimento de novas lesões), doença estável (menos de 50 % de redução ou não mais que 25 % de crescimento no tamanho do tumor, sintomas clínicos e hormonais mensuráveis) e progressão (aparecimento de novas lesões ou um aumento de 25 % ou mais no tamanho do tumor e deterioração clínica/hormonal)⁴⁶.

3.4.4.1 Diagnóstico e tratamento de tumores neuroendócrinos

Metaiodobenzilguanidina radioiodada (MIBG) foi o primeiro radiofármaco aplicado na imagem e terapia de alguns NETs, em particular, tumores secretores de catecolamina (feocromocitomas, paragangliomas e neuroblastomas), carcinomas tireóide medular e tumores carcinóides⁵⁸.

Devido à expressão de receptores de somatostatina pela maioria dos NETs, análogos de somatostatina radiomarcados *in vivo* podem ser utilizados com sucesso⁵⁸.

Depois de mais de uma década de experiência, a cintilografia de receptor de somatostatina (SSTR) com octreotídeo-DTPA-¹¹¹In tem se tornado a

técnica de imagem principal para NETs e é usado rotineiramente. Outros análogos com afinidade por receptores diferentes e outros peptídeos estão sob investigação. Mais recentemente, bons progressos têm sido feitos na imagem funcional de NETs com desenvolvimento de radiofármacos altamente específicos para estudos em PET, que reflete caminhos metabólicos diferentes, como o metabolismo da glicose, a captação de precursores hormonais, a expressão de receptores ou transportadores, assim como sínteses, armazenamento e liberação de hormônios. Entre esses radiofármacos, análogos da somatostatina marcados com gálio-68 são usados progressivamente em centros especializados na Europa⁵⁸.

Novos análogos da somatostatina estão sendo estudados, como o SOM230 (pasireotídeo). Pasireotídeo é um novo análogo da somatostatina, universal ou pan-receptor, que possui uma alta afinidade por receptores subtipos SSTR 1, 2, 3 e 5. O perfil de ligação ao receptor é 30 a 40 vezes maior para SSTR 1 e SSTR 5 do que o octreotídeo⁴⁶.

Um novo análogo da somatostatina desenvolvido para marcar com ^{99m}Tc , octreotídeo-[1-Na¹³,Thr⁸,ácido 6-hidrazinopiridina-3-carboxílico(HYNIC⁰)] (NATE-[HYNIC/tricina/EDDA/ ^{99m}Tc]) com o objetivo de melhorar a afinidade ao receptor SSTR 2 e obter uma alta afinidade pelos receptores SSTR 3 e SSTR 5, mostrou uma pureza radioquímica acima de 95 %, determinada pelo sistema cromatográfico em camada delgada ITLC-SG².

Outro análogo da somatostatina estudado foi o RC-160 ou vapreotídeo (usando diferentes coligantes), que tem afinidade por diferentes subtipos de receptor para somatostatina, podendo aumentar seu uso nos alvos mais comuns como os tumores de mama, ovário, pâncreas exócrino, próstata e cólon. Pode também atravessar a barreira hematoencefálica e ser usado na imagem de tumores cerebrais. A pureza radioquímica obtida através do sistema cromatográfico em camada delgada ITLC-SG para RC-160-HYNIC/tricina- ^{99m}Tc foi de $98,86 \pm 1,21$ %, para RC-160-HYNIC/EDDA- ^{99m}Tc $69,38 \pm 4,58$ %, para RC-160-HYNIC/tricina/ácido nicotínico- ^{99m}Tc $97,70 \pm 1,80$ %, para RC-160-N₃S- ^{99m}Tc $93,93 \pm 4,16$ %, e para RC-160-MAG₃ $96,70 \pm 1,85$ %⁵⁹.

Tyr³-octreotato, outro análogo da somatostatina marcado com ^{99m}Tc , que difere do octreotídeo devido à substituição do terminal treoninol pelo terminal

treonina, detecta mais lesões que OctreoScan- ^{111}In e produz uma alta razão tumor:órgão. O estudo da marcação de octreotato-HYNIC/EDDA/tricina- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ obteve uma pureza radioquímica que variou de 90 % a 95 % utilizando o sistema cromatográfico em camada delgada ITLC-SG⁶⁰.

A biodistribuição do octreotídeo-Tyr³-HYNIC- $^{99\text{m}}\text{Tc}$, utilizando-se EDDA ou tricina como coligante, foi avaliada em tumores somatostatina-receptor-positivos por diferentes autores em modelos animais e em humanos². Decristoforo e colaboradores apresentaram dados de biodistribuição em camundongos *Nude* com tumor AR42J (adenocarcinoma de pâncreas de rato), do octreotídeo-HYNIC marcado com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ usando diferentes coligantes em comparação com octreotídeo-DTPA- ^{111}In , relatando uma alta especificidade, mas também uma captação não específica do tumor para os peptídeos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Tanto para o coligante EDDA como para o coligante tricina estudados, a % atividade/grama no tumor foi maior comparado ao octreotídeo-DTPA- ^{111}In ⁶¹.

Um alto nível de atividade residual em todos os órgãos foi encontrado para o coligante tricina, especialmente no sangue, músculo e fígado. O coligante EDDA mostrou um alto nível de atividade comparado ao octreotídeo-DTPA- ^{111}In no sangue, fígado e intestinos, mas consideravelmente baixo nos rins. As razões mais baixas foram encontradas para o coligante tricina. Octreotídeo-DTPA- ^{111}In mostrou uma alta razão no sangue e músculo; as razões tumor:fígado e tumor:trato gastrointestinal foram similares ao coligante EDDA. A captação renal foi consideravelmente baixa para EDDA comparado ao octreotídeo-DTPA- ^{111}In , com as razões tumor:rins 2,05 e 0,19, respectivamente⁶¹.

Análogos da somatostatina radiomarcados também têm sido utilizados com finalidade terapêutica, numa modalidade conhecida como terapia radioisotópica com peptídeo-receptor-específico (*peptide receptor radionuclide therapy* - PRRT). É baseada na presença de receptores para somatostatina em densidades maiores nestes tumores (comparado com o parênquima normal ao redor) e na sua capacidade em formar um complexo receptor-ligante, permitindo então a internalização e o acúmulo do radiofármaco dentro do tumor.

A PRRT de tumores que expressam receptores para somatostatina foi inicialmente realizada utilizando-se índio-111 como radioisótopo com resposta terapêutica reduzida. O desenvolvimento do quelante bifuncional DOTA (ácido 1,4,7,10-tetrazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético) e sua combinação com

peptídeos derivados de somatostatina, tais como octreotídeo ou octreotato, possibilitou o desenvolvimento de radiofármacos marcados com elementos radioativos emissores de radiação particulada (β^-), tais como ^{67}Ga , ^{90}Y e ^{177}Lu , para aplicação em PRRT de tumores neuroendócrinos. Resultados promissores foram obtidos usando octreotato-DOTA- ^{177}Lu e octreotídeo-DOTA- ^{90}Y ⁴⁶.

3.4.5 Métodos de marcação de proteínas com $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Os métodos de marcação de proteínas com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ podem ser divididos em marcação direta e marcação indireta, incluindo o método do quelante pré-formado ou utilizando quelante bifuncional.

No método direto, o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ previamente reduzido é complexado com grupos $-\text{SH}$ (tióis livres) obtidos por redução parcial das pontes dissulfídicas de resíduos de cisteína da proteína. Este método é simples de ser executado e não necessita de purificação após a marcação, porém, só pode ser aplicado a proteínas com ligações dissulfídicas, as quais são normalmente críticas para manter as propriedades biológicas da proteína (FIG. 8).

FIGURA 8 - Marcação direta de proteína reduzida com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (adaptado de Liu, 2008)⁶²

No método indireto do quelante pré-formado, um complexo de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ previamente reduzido se une a um quelante bifuncional (BFCA). O BFCA é ativado por uma imina-N heterocíclica para ser conjugado a uma proteína. Por se tratar de duas etapas, não é prática para ser aplicada na rotina clínica (FIG. 9).

FIGURA 9 – Marcação indireta de proteína com ^{99m}Tc utilizando quelante pré-formado (adaptado de Liu, 2008)⁶²

No outro método indireto, o quelante bifuncional é previamente ativado por uma imina-N heterocíclica para ser ligado à proteína e depois marcado com ^{99m}Tc (FIG. 10). A vantagem deste método indireto é a aplicabilidade a um grande espectro de biomoléculas como anticorpos mono e policlonais, peptídeos, oligonucleotídeos, além de ter uma química bem definida, possibilidade de armazenagem do peptídeo ligado ao quelante para posterior marcação com o radioisótopo e estabilidade *in vivo* do composto marcado^{18, 63, 64}.

FIGURA 10 – Marcação indireta de proteína com ^{99m}Tc pelo método de pós-marcação (adaptado de Liu, 2008)⁶²

O BFCA ideal deve ser capaz de formar um complexo estável com o radioisótopo em porcentagem alta e em concentração baixa. Para alcançar este objetivo, deve seletivamente estabilizar um intermediário (biomolécula-BFCA) ou estado de oxidação baixo do tecnécio, para que o complexo de ^{99m}Tc não seja sujeito a reações redox. Mudanças do estado de oxidação são freqüentemente acompanhadas pela transquelação de ^{99m}Tc a partir de um complexo biomolécula-BFCA- ^{99m}Tc para os ligantes quelantes nativos em sistemas biológicos^{6, 62}.

O BFCA deve formar um complexo de ^{99m}Tc com estabilidade termodinâmica e cinética com relação à dissociação ou liberação de ^{99m}Tc . O BFCA forma um complexo de ^{99m}Tc com um número mínimo de isômeros, desde formas isoméricas diferentes do quelante ^{99m}Tc , podendo resultar características biológicas e farmacocinéticas significativamente diferentes do complexo biomolécula-BFCA- ^{99m}Tc ^{6, 62}.

Finalmente, o grupo conjugado (BFCA- ^{99m}Tc) pode facilmente atacar a biomolécula^{6, 62}.

Alguns núcleos de tecnécio selecionados, que são usados para marcar biomoléculas como anticorpos, anticorpos fragmentados, pequenos peptídeos e ligantes receptores não peptídicos, são o $[\text{Tc}=\text{O}]^{3+}$, $[\text{Tc}=\text{N}]^{2+}$, $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ e HYNIC $[\text{Tc}]$ (FIG. 11)⁶².

FIGURA 11 - Núcleos de tecnécio usados para marcar biomoléculas com ^{99m}Tc (adaptado de Liu, 2008)⁶²

O núcleo $[Tc=O]^{3+}$ é muito estável na presença de um bom quelante em solução aquosa e é frequentemente usado para marcação com biomoléculas. O núcleo $[Tc=O]^{3+}$ forma complexos pirâmide quadrada Tc(V)-oxo com quelantes tetradentados, como N_2S_2 diamidaditióis (DADS), N_3S triamidatióis, N_2S_2 monoamidamonoaminaditióis (MAMA) e N_2S_2 diaminaditióis (DADT) (FIG. 12)⁶².

FIGURA 12 - BFCA contendo tiol e seus complexos de tecnécio (adaptado de Liu, 2008)⁶²

Núcleos para quelação com ^{99m}Tc também podem se originar de síntese planejada dos peptídeos. Determinadas seqüências de aminoácidos geram núcleos para quelação com ^{99m}Tc . Algumas destas seqüências e os respectivos núcleos de quelação estão representados na FIG. 13.

FIGURA 13 - Seqüência tripeptídica como BFCA (adaptado de Liu, 2008)⁶²

O núcleo $[\text{Tc}\equiv\text{N}]^{2+}$ tem sido usado para marcar pequenos peptídeos e ligantes receptores benzodiazepínicos, com tecnécio. Os ligantes bifosfina PXP (FIG. 14) são usados como coligantes para estabilizar o núcleo $[\text{Tc}\equiv\text{N}]^{2+}$ e os BFCA contendo tiolato-S, amino-N ou carboxilato-O doadores atacam o peptídeo ou ligantes receptores benzodiazepínicos⁶².

FIGURA 14 - Exemplos de núcleo nitrido-^{99m}Tc para marcação de biomoléculas (adaptado de Liu, 2008)⁶²

Com os núcleos de $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$, uma variedade de BFCA pode ser usada para marcar biomoléculas com tecnécio. A FIG. 15 mostra exemplos de quelantes bidentados e tridentados contendo imidazóis, piridinas, pirazóis, amidas,

aminas, ácidos carboxílicos ou combinações desses. Desde que sejam aminoácidos naturais, histidina é alvo particular dos BFCA para marcar anticorpos monoclonais e pequenos peptídeos com tecnécio⁶².

FIGURA 15 - Exemplos de BFCA bidentado e tridentado para marcação de biomoléculas com ^{99m}Tc . O grupo R pode ser uma biomolécula ou um ligante que se liga à biomolécula (adaptado de Liu, 2008)⁶²

O primeiro relato do uso do ácido 6-hidrazinonicotínico (HYNIC) foi a marcação de IgG policlonal com tecnécio. Desde então, HYNIC tem sido usado para marcar fragmentos de anticorpos, peptídeos quimiotáticos, análogos da somatostatina, lipossomas e oligonucleotídeos com tecnécio. Desde que HYNIC pode ocupar um ou dois sítios de coordenação do ^{99m}Tc reduzido, um coligante, como a tricina, é frequentemente necessário para completar a esfera de coordenação do tecnécio (FIG. 16)⁶².

FIGURA 16 – Estrutura química do HYNIC (adaptado de Liu, 2008)⁶²

Outros agentes também podem ser utilizados como coligantes tais como ácido etilenodiamino-N,N'-diacético (EDDA) (FIG. 17), glucoheptonato, análogos da fosfina e piridina. A vantagem de usar HYNIC como BFCA é sua alta pureza radioquímica na marcação com tecnécio e a escolha dos coligantes, que permite fácil modificação da hidrofiliicidade e farmacocinética de biomoléculas marcadas com tecnécio⁶².

Entretanto, o uso de tricina (FIG. 17) como coligante sofre duas grandes desvantagens: instabilidade em solução [(biomolécula-HYNIC)(tricina)₂^{99m}Tc] e presença de múltiplas espécies em solução devido a diferentes modalidades de ligação de HYNIC e coligantes. Para superar estes problemas, diferentes associações de coligantes vêm sendo estudadas como a associação de tricina e EDDA⁶².

FIGURA 17 – Estruturas químicas de peptídeo-HYNIC- ^{99m}Tc usando tricina ou EDDA como coligante: A) peptídeo-(tricina) $_2$ /HYNIC- ^{99m}Tc e B) peptídeo-EDDA/HYNIC- ^{99m}Tc (adaptado de Lahorte e colab., 2004)⁶⁵

3.5 Controle de qualidade das moléculas marcadas

O controle de qualidade de um radiofármaco é definido como a aplicação de procedimentos capazes de garantir a estabilidade de composição, reprodutibilidade de função, conveniência para o objetivo pretendido e segurança para o paciente. Envolve análises em nível físico, físico-químico, químico, biológico e de estabilidade⁶⁶.

Em relação aos controles físicos e físico-químico são considerados o aspecto físico que envolve análises organolépticas tais como cor, limpidez ou turbidez da solução, e ausência ou presença de partículas em suspensão, para soluções ou em dispersões coloidais, respectivamente; e determinação das partículas (filtração através de membranas, filtração em gel, espalhamento da radiação laser ou microscopia eletrônica)⁶⁶.

Em relação ao controle químico são realizadas as determinações de pureza química e radioquímica. A pureza química pode ser definida como a fração do material na forma química desejada. As impurezas químicas originam-se de reagentes impuros ou que tenham sofrido decomposição ou ainda de impurezas introduzidas através do próprio processo de purificação ou impurezas geradas pelo material utilizado na embalagem do produto final. A pureza radioquímica é definida como a fração do radioisótopo presente na forma química determinada do radiofármaco. As impurezas radioquímicas ocorrem devido à decomposição

por ação do solvente, mudanças na temperatura, pH, luz, presença de agentes redutores, oxidantes e radiólise da água por absorção da energia emitida, gerando a decomposição de outras moléculas marcadas⁶⁶.

O controle biológico envolve quatro determinações: a esterilidade, condição fundamental para toda preparação de uso parenteral; pirógenos (polissacarídeos ou proteínas produzidas pelo metabolismo de microorganismos) que devem estar ausentes em preparações injetáveis; avaliação do comportamento *in vivo* de um radiofármaco antes da sua administração a um paciente; e determinação da toxicidade dos radiofármacos antes de sua administração em humanos e estabelecimento da dose de segurança⁶⁶.

3.5.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cromatografia é um sistema de purificação ou análise, em que os componentes de uma amostra são separados em função da interação dessas espécies com a fase estacionária, algumas vezes denominada de suporte, e a fase móvel, também referida como eluente ou solvente, permitindo a análise final dos produtos⁶⁷.

Nos sistemas cromatográficos utilizados para controle de qualidade dos radiofármacos, geralmente são empregados papel, sílica gel (SiO_2) ou óxido de alumínio (Al_2O_3), sendo que estes dois últimos são fixados em suportes como folhas de alumínio, plástico ou fibra de vidro. Além da diferença de custo dos materiais, existem dois mecanismos de separação das substâncias envolvidas nesses sistemas⁶⁷.

Utilizando SiO_2 e Al_2O_3 como fases estacionárias, o mecanismo de separação envolvido está associado ao processo de adsorção/dessorção. Neste caso, a fase móvel tem o papel de dessorver o composto da fase estacionária, solubilizá-lo e carregá-lo pelo sistema. Quando o composto for hidrossolúvel ou não muito lipossolúvel, a dessorção é facilitada quando se usa um eluente polar e dificultada pelo uso daquele de polaridade menor⁶⁷.

Para análise da pureza radioquímica dos radiofármacos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$, normalmente são utilizados sistemas cromatográficos com papel (W1, W3MM, etc) ou ITLS-SG (*Instant Thin Layer Chromatography – Silica-gel*), uma derivação da cromatografia em sílica gel clássica, e fases móveis como acetona e solução

fisiológica, uma vez que nesses sistemas a espécie coloidal, $^{99m}\text{TcO}_2$, sempre permanece retida na origem, o $^{99m}\text{TcO}_4^-$ migra para o fronte do sistema e o comportamento do radiofármaco vai depender da característica dele e da fase móvel⁶⁸. Contudo, também existem outros sistemas cromatográficos (fases estacionária e móvel) que são alternativos⁶⁹ ao sistema geral apresentado acima, ou que são específicos para um dado radiofármaco dependendo da natureza química das espécies formadas no meio de marcação que se deseja separar⁶⁸.

3.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*)

O HPLC (FIG. 18) é um tipo de cromatografia líquida que emprega pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados (fase estacionária), uma bomba que move a fase móvel (que é eluída sob altas pressões) através da coluna e um detector que mostra o tempo de retenção de moléculas. A fase móvel tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade. O tempo de retenção varia dependendo da interação entre a fase estacionária, moléculas sendo analisadas e o solvente usado^{16, 67}.

FIGURA 18 - Equipamento de HPLC (Waters, EUA, dotado de detector UV visível, modelo 486 e detector de radiação beta e gama, modelo Radiomatic, Packard, EUA) utilizado na determinação do radiofármaco e suas espécies radioquímicas

No HPLC emprega-se uma coluna fechada, reaproveitável, podendo ser realizadas até centenas de separações individuais com a mesma coluna. É possível utilizar colunas com recheio de alta resolução, sendo muito eficazes, mas oferecem uma grande resistência à vazão da fase móvel, ou seja, ela sofre uma grande perda de carga. Por esta razão é necessário empregar sistemas de bomba de alta pressão que fazem a fase móvel migrar a uma velocidade razoável através da coluna⁶⁷.

A amostra a ser analisada é introduzida em volume pequeno para um fluxo de fase móvel e é retardada pela química específica com a fase estacionária, assim que atravessa o comprimento da coluna. O montante de retardamento depende da natureza do analito, da fase estacionária e da composição da fase móvel. O tempo de retenção de um composto ou tempo de eluição é considerado característica de identificação única do mesmo. O uso de pressão eleva a velocidade linear (rapidez), dando aos componentes menos tempo para difundir dentro da coluna, levando a uma melhor resolução do cromatograma. Os solventes usados em HPLC incluem qualquer combinação miscível de água ou vários líquidos orgânicos (os mais comuns são metanol e acetonitrila). A água pode conter tampões ou sais para ajudar na separação dos componentes analíticos ou compostos, como ácido trifluoroacético que atua como agente de formação de pares de íons¹⁶.

Outro refinamento para HPLC tem sido variar a composição da fase móvel durante as análises, isto é conhecido como extração por gradiente. O gradiente separa as misturas de analito de acordo com a afinidade dos mesmos pela composição da fase móvel corrente em relação à fase estacionária. Este processo de separação é similar ao que ocorre durante a extração líquido-líquido mas é contínua, não de maneira progressiva. A escolha dos solventes, aditivos e gradiente depende da natureza da fase estacionária e do analito. Frequentemente, uma série de testes é realizada no analito e inúmeras corridas podem ser processadas para encontrar o melhor método de HPLC para este analito, o método que dê a melhor separação de picos¹⁶.

Os tipos de HPLC são: cromatografia de fase normal, cromatografia de fase reversa, cromatografia por exclusão de tamanho, cromatografia por troca iônica, cromatografia de bioafinidade, fluxo isocrático e extração por gradiente¹⁶.

A cromatografia de fase normal é um método de separação de analitos baseado na polaridade. Utiliza uma fase estacionária polar, uma fase móvel não polar e trabalha efetivamente para analitos polares. A cromatografia de fase reversa tem uma fase estacionária não polar e uma fase móvel aquosa, moderadamente polar. A cromatografia por exclusão de tamanho separa partículas baseadas no tamanho. Na cromatografia por troca iônica, a retenção é baseada na atração entre íons soluto e ligação aos sítios carregados na fase estacionária; íons de mesma carga são excluídos. A cromatografia por bioafinidade conta com a propriedade de substâncias biologicamente ativas para formar complexos estáveis, específicos e reversíveis. O fluxo isocrático considera a composição da fase móvel que mantém constante o procedimento, enquanto a extração por gradiente é a separação onde a fase móvel muda sua composição durante o processo de separação¹⁶.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Equipamentos e sistemas

- Agitador magnético com aquecimento, Fisatom, 752A, Brasil
- Balança analítica, Ohaus, Explorer, EUA
- Bomba de vácuo, Fisatom, 825T, Brasil
- Contador gama, Packard-Camberra, E5002 (Cobra II), EUA
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*), Waters, EUA, dotado de:
  - detector UV visível, modelo 486
  - detector de radiação beta e gama, modelo Radiomatic, Packard, EUA
- Eletrodo, Digimed, Brasil
- Freezer, LS Logen Scientific, Thermostatic Cabinets, EUA
- Gama câmara, Mediso, Nucline TH22, Hungria
- Geladeira vertical, 253 L, Eletrolab, Brasil
- Medidor de atividade, Capintec Inc., CRM^{TM}-35R, EUA
- pHmetro, Sertin, Brasil
- Refrigerador, Cônsul, 450 L, Brasil
- Sistema de filtração utilizando:
  - membranas GS em éster de celulose 0,22 µm, Millipore, Brasil
  - membranas FG (fluoropore) em PTFE 0,22 µm, Millipore, Brasil
- Torpedo de nitrogênio, White Martins, cilindro tipo T, 9,0 m³, pressão 200 kgf/cm, 5.0 analítico, Brasil

4.1.2 Reagentes e solventes

- Acetato de amônio p.a., CH₃COONH₄, Merck
- Acetonitrila grau HPLC, CH₃CN, Sigma-Aldrich

- Ácido cítrico monohidratado p.a., $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$, Synth
- Ácido clorídrico p.a., HCl, Merck
- Ácido etilenodiamino-N, N'-diacético (EDDA) 98 %, $(CH_2-NHCH_2CO_2H)_2$, Aldrich
- Ácido trifluoroacético grau HPLC, CF_3COOH , Sigma-Aldrich
- Citrato de sódio (cristal) p.a., $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$, J. T. Baker
- Cloreto estanoso p.a., $SnCl_2 \cdot 2H_2O$, Carlo Erba
- Fosfato de sódio dibásico p.a., Na_2HPO_4 , Merck
- Fosfato de sódio monobásico hidratado 99 %, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, Merck
- Hidróxido de sódio p.a., NaOH, Reagen
- Metanol p.a., CH_3OH , Vetec
- Metiletilcetona p.a., $CH_3COCH_2CH_3$, Grupo Química
- Peptídeo octreotídeo-HYNIC grau HPLC,
 $HYNIC-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr(ol)$, Pichem
- Pertecnetato de sódio, $Na^{99m}TcO_4$, gerador de $^{99}Mo-^{99m}Tc$ IPEN-TEC, IPEN-CNEN/SP
- Tricina 99 %, $C_6H_{13}NO_5$, Sigma

4.1.3 Misturas e soluções

- Solução HCl 0,1 N
- Solução NaOH 0,1 N
- Solução metanol:acetato de amônio (1:1)
- Tampão citrato de sódio 0,1 N pH 5,0
- Tampão fosfato de sódio 0,2 N pH 5,0
- Tampão fosfato de sódio 0,2 N pH 6,2
- Tampão fosfato de sódio 0,2 N pH 8,0

4.1.4 Outros

- Cubas de vidro com tampa para fitas cromatográficas
- Fita indicadora de pH, Merck, Alemanha
- Fitas para cromatografia em camada delgada de sílica gel ITLC-SG (*Instant Thin Layer Chromatography – Silica-Gel*), Pall Life Sciences, EUA

- Fitas para cromatografia em camada delgada de sílica gel TLC-SG (*Thin Layer Chromatography – Silica-Gel*), Merck, Alemanha
- Material plástico descartável (ponteiras, seringas e tubos de reação)
- Pipetas automáticas de 100 e 1000 μL
- Vidrarias de laboratório em geral

4.1.5 Animais

- Camundongos *Swiss*, sadios, adultos, machos, pesando entre 29,0 g a 37,0 g, biotério IPEN-CNEN/SP
- Camundongos *Nude*, adultos, fêmeas e machos, pesando entre 19,0 g a 23,50 g, biotério IPEN-CNEN/SP

4.2 Métodos

4.2.1 Estudo dos parâmetros de marcação do octreotídeo-HYNIC com $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Em um frasco de vidro de reação foram adicionados 20 μg de OCT-HYNIC em etanol 10 %, uma mistura de 10 mg de EDDA em NaOH 0,1 N e 20 mg de tricina em tampão fosfato de sódio 0,2 N pH 6,2, 1110 MBq (30 mCi) de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ (pertechnetato) em um volume de 1 mL completado com tampão fosfato de sódio 0,2 N pH 6,2 e 15 μg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em HCl 0,1 N pré-nitrogenado por aproximadamente 30 minutos. O frasco foi tampado, lacrado e a mistura de reação aquecida em banho de água em ebulição por 10 minutos (FIG. 19). O pH final da mistura de reação foi de 6,5, medido após a marcação. O procedimento utilizado baseou-se nos trabalhos descritos por Guggenberg e colaboradores^{1, 16}, Gabriel e colaboradores⁵⁴, e Decristoforo e colaboradores⁷⁰. Este procedimento foi considerado como procedimento padrão de marcação. Objetivando otimizar o rendimento de marcação e conhecer os limites de marcação de forma a viabilizar a produção de um reagente liofilizado, diversos parâmetros foram estudados, a saber:

- massa de agente redutor ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): 15, 30, 50, 60, 100, 150 e 167 μg
- massa dos coligantes EDDA/tricina: 0/0 mg, 10/0 mg, 0/20 mg, 2,5/5 mg, 5/10 mg, 10/20 mg, 20/40 mg e 100/200 mg

- massa do peptídeo (OCT-HYNIC): 0, 20, 40, 60, 80 e 200 µg
- tempo de reação: 5, 10, 15 e 30 minutos
- temperatura: ambiente e banho de água em ebulição
- pH: 5,5, 6,0, 6,5, 7,5 e 8,0
- atividade: 1110, 1850 e 3700 MBq (30, 50 e 100 mCi, respectivamente)

Quando um parâmetro foi variado, os demais permaneceram constantes e de acordo com a condição padrão de marcação.

Na avaliação do pH, o acerto deste foi realizado adicionando-se tampão fosfato de sódio 0,2 N pH 5,0 para os pH obtidos 5,5 e 6,0, tampão fosfato de sódio 0,2 N pH 6,2 para o pH obtido 6,5, e tampão fosfato de sódio 0,2 N pH 8,0 para os pH obtidos 7,5 e 8,0, antes da adição do pertecnetato de sódio.

FIGURA 19 – Sistema de aquecimento em banho de água em ebulição utilizado na marcação de octreotídeo-HYNIC com ^{99m}Tc

4.2.2 Avaliação da estabilidade do produto marcado

A estabilidade do produto marcado foi avaliada por 5 horas mediante armazenamento do produto em temperatura ambiente e realização de controle de qualidade de pureza radioquímica (PR) para os tempos de 30 minutos e 5 horas após a marcação. O tempo de 30 minutos determina a pureza radioquímica logo após a marcação para possível uso imediato, enquanto o tempo de 5 horas determina a pureza radioquímica a longo prazo, objetivando determinar a

estabilidade da marcação. Para uma avaliação mais detalhada da pureza radioquímica, foram introduzidos mais tempos entre 30 minutos e 5 horas para uma mesma marcação.

4.2.3 Controle de qualidade

4.2.3.1 Controle de qualidade de pureza radioquímica pelo método cromatográfico em camada delgada

A pureza radioquímica das preparações foi determinada por cromatografia em camada delgada, utilizando-se placas de sílica gel 60 (TLC-SG) ou fibra de vidro impregnada com sílica gel 60 (ITLC-SG) em diferentes fases móveis (TAB. 2).

TABELA 2 - Relação de frente (Rf) das espécies radioquímicas nos respectivos sistemas cromatográficos (Rf= distância de migração da espécie radioquímica/distância de migração do solvente)¹⁶

Espécie radioquímica	Fase estacionária/ Suporte	Fase móvel/ Solvente	Rf
$^{99m}\text{TcO}_4^-$			1
$^{99m}\text{TcO}_2$	TLC-SG	Tampão citrato de sódio	0
coligante- ^{99m}Tc		0,1 N pH 5,0	1
OCT-HYNIC- ^{99m}Tc			0
$^{99m}\text{TcO}_4^-$			1
$^{99m}\text{TcO}_2$	TLC-SG	Metiletilcetona	0
coligante- ^{99m}Tc			0
OCT-HYNIC- ^{99m}Tc			0

Espécie radioquímica	Fase estacionária/ Suporte	Fase móvel/ Solvente	Rf
$^{99m}\text{TcO}_4^-$			1
$^{99m}\text{TcO}_2$	ITLC-SG	Metanol:acetato de amônio	0
coligante- ^{99m}Tc		(1:1)	1
OCT-HYNIC- ^{99m}Tc			1

Uma alíquota da mistura de marcação foi aplicada com auxílio de capilar a 1,5 cm da margem inferior do suporte cromatográfico (fita cromatográfica), com 13,5 cm de comprimento e 1,5 cm de largura. Este foi colocado em cuba de vidro saturada com a fase móvel apropriada, conforme descrito na TAB. 2 e o solvente percorreu 10,0 cm considerados a partir do ponto de aplicação, até atingir a marca superior, localizada a 2,0 cm da margem superior da fita. A fita foi então removida da cuba, secada e cortada em segmentos de 1,0 cm a partir do ponto de aplicação da amostra perfazendo 10 segmentos (FIG. 20). Cada segmento foi inserido em um tubo plástico e o conjunto de tubos foi submetido à contagem em contador gama (FIG. 21) para determinação da radioatividade correspondente a cada segmento da fita.

A porcentagem de pureza radioquímica foi determinada a partir das contagens para cada fita considerando-se as seguintes fórmulas:

- Para espécie com $R_f = 0$ (Equação 1)

$$\frac{\Sigma \text{ contagem por minuto segmentos origem da fita}}{\text{contagem por minuto total da fita}}$$

- Para espécie com $R_f = 1$ (Equação 2)

$$\frac{\Sigma \text{ contagem por minuto segmentos frente da fita}}{\text{contagem por minuto total da fita}}$$

FIGURA 20 – Sistema de cromatografia em camada delgada utilizado na determinação da pureza radioquímica da marcação de octreotídeo-HYNIC com ^{99m}Tc

FIGURA 21 – Contador gama (Packard-Camberra, E5002 (Cobra II), EUA) utilizado na determinação da contagem radioativa nos estudos cromatográficos e de biodistribuição

4.2.3.2 Controle de qualidade de pureza radioquímica pelo método da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*)

O método de HPLC possibilitou observar a presença das espécies radioquímicas $^{99m}\text{TcO}_4^-$, coligante- ^{99m}Tc e OCT-HYNIC- ^{99m}Tc , exceto $^{99m}\text{TcO}_2$ que fica retido na coluna, comprovando o método de TLC-SG e ITLC-SG na medida

em que identifica as mesmas espécies radioquímicas observadas nos sistemas utilizando cromatografia em camada delgada.

O HPLC foi utilizado para separar as espécies radioquímicas, empregando coluna de fase reversa C-18, 5 μ m, 4,6 mm x 250 mm utilizando detectores de UV (220 nm) e de radioatividade, fluxo de 1 mL/minuto e como fase móvel gradiente de acetonitrila (ACN) e solução de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1 %^{2, 70}.

A TAB. 3 estabelece a condição do gradiente utilizado.

TABELA 3 – Gradiente ACN/TFA 0,1 % utilizado no ensaio de HPLC^{2, 70}

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	% ACN (A)	% TFA 0,1 % (B)
0 - 10	1	0	100
10 - 15	1	66	34
15 - 17	1	100	0
17 - 19	1	0	100

4.2.4 Avaliação da biodistribuição do octreotídeo-HYNIC com ^{99m}Tc

Foram selecionados camundongos da raça *Swiss* sadios e da raça *Nude* com tumor, para estudos de biodistribuição do composto marcado, para determinar a porcentagem de acúmulo em órgãos, tecidos e tumor com relação à atividade injetada.

Os procedimentos de estudo de biodistribuição em animais foram realizados de acordo com as normas do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). A água e a alimentação estiveram disponíveis durante todo o período de experimentação.

4.2.4.1 Estudo de biodistribuição do OCT-HYNIC por método invasivo

O radiofármaco foi administrado com atividade de 1,48 MBq (40 μ Ci)/100 μ L na veia da cauda de camundongos da raça *Swiss* (três camundongos para cada intervalo de tempo), adultos, machos, pesando entre 29,0 g e 37,0 g

(FIG. 22). Após intervalos de tempo pré-fixados de 1,5 horas e 4 horas^{61, 71}, um capilar heparinizado especial foi utilizado para coleta de 50 µL de sangue do plexo ocular. Os animais foram sacrificados, os órgãos de interesse retirados (pulmão, coração, baço, fígado, estômago sem conteúdo, parte do músculo da coxa, rins, intestino delgado com conteúdo, intestino grosso com conteúdo, adrenais, pâncreas e tireóide), pesados, lavados e a radioatividade nos órgãos e no sangue medida em contador gama. A cauda foi retirada para correção da atividade administrada. Padrões foram preparados a partir de amostra da atividade administrada após diluição em balão volumétrico de 10 mL com água destilada. Alíquotas (N= 3) de 1 mL do diluído foram utilizadas para contagem em contador gama.

FIGURA 22 – Camundongos Swiss utilizados no estudo de biodistribuição do radiofármaco OCT-HYNIC-^{99m}Tc

A porcentagem da atividade administrada nos diferentes órgãos e no sangue foi calculada segundo as equações abaixo descritas (equações 3 a 10), onde cpm é a contagem por minuto.

Os cálculos da % músculo total, % atividade no sangue total e volemia foram determinados segundo as respectivas equações, 6, 9 e 10⁷².

$$\bullet \text{ cpm padrão real} = \text{cpm padrão} - \text{cpm cauda} \quad (\text{Equação 3})$$

- % atividade no órgão= $\text{cpm órgão} / \text{cpm padrão real} \times 100$ (Equação 4)

- % atividade/grama de tecido= % atividade no órgão/peso órgão (Equação 5)

- % músculo total= % atividade/
grama músculo x 40 % peso corpóreo (Equação 6)

- % atividade/grama músculo= $\text{cpm músculo} / \text{peso músculo} /$
 cpm padrão real (Equação 7)

- % atividade por mL de sangue= $\text{cpm 1 mL sangue} /$
 $\text{cpm padrão real} \times 100$ (Equação 8)

- % atividade no sangue total= % atividade por mL
no sangue x volemia (Equação 9)

- Volemia (mL)= peso animal x 0,0778 (Equação 10)

O mesmo procedimento foi realizado para camundongos da raça *Nude* (quatro camundongos para cada intervalo de tempo), com tumor de células AR42J (adenocarcinoma de pâncreas de rato), adultos, fêmeas e machos, pesando entre 19,0 g e 23,50 g. Além dos órgãos citados foram retirados também o cérebro e o tumor.

As células pancreáticas AR42J foram obtidas da ATCC (*American Type Culture Collection*) e cultivadas no laboratório do Centro de Biotecnologia do IPEN-CNEN/SP. Estas células foram obtidas de tumor de pâncreas de rato (*Rattus norvegicus*), crescendo aderentes em frascos de cultura e apresentam morfologia epitelial. Foram mantidas em fase exponencial de crescimento em garrafas de cultura (75 cm²) contendo 10 mL de meio RPMI (Instituto Roswell Park Memorial), suplementado com 20 % de soro fetal bovino, 1 % de penicilina e estreptomicina, sob atmosfera de 5 % de CO₂ (dióxido de carbono), a 37 °C. Quando atingiram a confluência foram tripsinizadas e suspensas em solução salina. A concentração de células foi calculada utilizando-se a câmara de Neubauer. Foram injetados um milhão (10⁶) de células suspensas em 0,1 mL de

solução salina na região dorsal de camundongos imunodeficientes (linhagem *Nude*). O tumor atingiu cerca de 0,5 cm de diâmetro após quatro semanas da implantação (FIG. 23).

Os animais com tumor foram selecionados e utilizados a partir do tamanho de tumor, tendo sido utilizados animais com tumores de 0,5 a 1,0 cm de diâmetro e quatro semanas após implantação.

FIGURA 23 – Obtenção dos camundongos *Nude* com tumor: A) implantação das células pancreáticas AR42J, B) 1 semana de implantação, C) 2 semanas de implantação, D) 3 semanas de implantação e E) 4 semanas de implantação

Após duas semanas da implantação das células, o tumor foi retirado de dois animais e submetido à análise histológica com colaboração do Laboratório de Patologia do HC-FMUSP (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).

4.2.4.2 Estudo de biodistribuição do OCT-HYNIC por método não invasivo

O radiofármaco foi administrado com atividade de 18,50 MBq (0,50 mCi)/0,1 mL na veia da cauda de camundongos da raça *Nude* (2 camundongos), adultos, fêmea e macho, pesando entre 19,0 g e 23,50 g, com tumor de células AR42J. Após intervalos de tempo de 2,5 e 3 horas⁷¹, os animais foram anestesiados com quetamina e as imagens adquiridas na gama câmara da DIRF

do IPEN-CNEN/SP, utilizando colimador LEHR (*Low Energy High Resolution*), matriz 256 x 256 x 16 e 300 mil contagens, para avaliação da capacidade deste radiofármaco identificar áreas tumorais (FIG. 24).

FIGURA 24 – Gama câmara (Mediso, Nucline TH22, Hungria) utilizada nas imagens de camundongos *Nude* com tumor AR42J com o radiofármaco OCT-HYNIC-^{99m}Tc: A) sistema de detecção (detector e colimador) e B) sistema de aquisição e processamento das imagens

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo dos parâmetros de marcação do octreotídeo-HYNIC com ^{99m}Tc

O método cromatográfico utilizado (ITLC-SG e TLC-SG) possibilitou determinar os níveis de impurezas radioquímicas nas preparações, conduzindo para a otimização das condições de marcação do peptídeo OCT-HYNIC com tecnécio-99m. Em todas as marcações o experimento foi realizado em duplicata, ou seja, duas fitas cromatográficas para cada fase móvel/solvente (FIG. 25).

FIGURA 25 – Representação da fita cromatográfica utilizada no controle de pureza radioquímica com as marcas de corte

As fitas de ITLC-SG para as fases móveis tampão citrato de sódio 0,1 N pH 5,0 e metiletilcetona foram substituídas para TLC-SG a fim de diminuir o custo. Como foi observado um arraste de aproximadamente quatro segmentos de fita para TLC-SG/tampão citrato de sódio 0,1 N pH 5,0, o cálculo foi realizado considerando a somatória dos quatro primeiros segmentos da fita.

As variáveis estudadas ou parâmetros de marcação foram escolhidos tendo como base a importância dos mesmos na pureza radioquímica do produto marcado, objetivando avaliar limites para estabelecimento de uma formulação liofilizada com estabilidade suficiente para comercialização. Um dos principais parâmetros estudados foi a massa de cloreto estânico.

Nas TAB. 4 a 18 são apresentados os resultados da análise cromatográfica em camada delgada da pureza radioquímica das marcações realizadas em diferentes condições, representativas do estudo dos parâmetros de marcação.

A TAB. 4 representa os resultados dos estudos de marcação do OCT-HYNIC com ^{99m}Tc utilizando-se a condição descrita na literatura (Guggenberg e colaboradores^{1, 16}, Gabriel e colaboradores⁵⁴, e Decristoforo e colaboradores⁷⁰), neste trabalho, considerada como condição padrão de marcação. Os resultados obtidos foram semelhantes aos descritos na literatura, com cerca de 90% da atividade de marcação correspondente à espécie OCT-HYNIC- ^{99m}Tc . Este resultado possibilita a utilização *in vivo* do peptídeo marcado, considerando-se, principalmente, a pequena porcentagem das espécies $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $^{99m}\text{TcO}_2$. Tais espécies radioquímicas quando presentes em porcentagem alta, influenciam na obtenção da imagem cintilográfica por acumularem-se em órgãos como estômago e tireóide ($^{99m}\text{TcO}_4^-$), e fígado ($^{99m}\text{TcO}_2$).

TABELA 4 – Pureza radioquímica da marcação do OCT-HYNIC com ^{99m}Tc na condição padrão de estudo*

Espécie radioquímica	% espécie radioquímica		
	30 min	5 h	Nº ensaios
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$0,62 \pm 0,42$	$3,74 \pm 4,53$	N= 6
$^{99m}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99m}\text{Tc}$	$8,53 \pm 4,66$	$7,75 \pm 6,05$	
coligante- ^{99m}Tc	$7,91 \pm 4,32$	$4,01 \pm 1,57$	
$^{99m}\text{TcO}_2$	$1,55 \pm 1,11$	$0,87 \pm 0,53$	
OCT-HYNIC- ^{99m}Tc	$89,91 \pm 4,82$	$91,37 \pm 6,14$	

* 20 μg OCT-HYNIC, 10 mg EDDA, 20 mg tricina, 15 μg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1110 MBq (30 mCi) de $^{99m}\text{TcO}_4^-$, tempo de reação de 10 minutos em banho de água em ebulição e pH 6,5

A TAB. 5 e a FIG. 26 representam os estudos de variação da temperatura e do tempo de aquecimento na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio-99m. Os resultados demonstram que a reação à temperatura ambiente não promove boa pureza radioquímica, provavelmente por não favorecer a cinética de marcação. Utilizando-se banho de água em ebulição para realizar a marcação, não se observa variação na pureza radioquímica da espécie OCT-HYNIC- ^{99m}Tc para períodos de aquecimento de 5 a 30 minutos. O tempo de 10 minutos descrito para a condição padrão de marcação é suficiente para promover boa pureza radioquímica.

TABELA 5 – Pureza radioquímica dos estudos de variação da temperatura e do tempo de aquecimento na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio-99m*

Temperatura/ tempo	Espécie radioquímica	% espécie radioquímica		
		30 min	5 h	Nº ensaios
Temperatura ambiente/ 10 min	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$10,83 \pm 11,00$	$15,33 \pm 0,60$	N= 2
	$^{99m}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99m}\text{Tc}$	$16,79 \pm 11,08$	$32,95 \pm 21,56$	
	coligante- ^{99m}Tc	$5,96 \pm 0,08$	$17,62 \pm 20,96$	
	$^{99m}\text{TcO}_2$	$6,25 \pm 1,12$	$2,76 \pm 0,94$	

Temperatura/ tempo	Espécie radioquímica	% espécie radioquímica		
		30 min	5 h	Nº ensaios
Banho de água em ebulição/ 5 min	OCT-HYNIC- ^{99m} Tc	76,96 ± 12,20	64,29 ± 22,50	N= 2
	^{99m} TcO ₄ ⁻	1,15 ± 1,45	3,23 ± 2,12	
	^{99m} TcO ₄ ⁻ + coligante- ^{99m} Tc	4,54 ± 0,69	7,11 ± 1,82	
	coligante- ^{99m} Tc	3,39 ± 0,76	3,88 ± 0,29	
	^{99m} TcO ₂	1,77 ± 1,24	1,09 ± 0,25	
Banho de água em ebulição/ 10 min (condição padrão)	OCT-HYNIC- ^{99m} Tc	93,69 ± 1,93	91,80 ± 1,57	N= 6
	^{99m} TcO ₄ ⁻	0,62 ± 0,42	3,74 ± 4,53	
	^{99m} TcO ₄ ⁻ + coligante- ^{99m} Tc	8,53 ± 4,66	7,75 ± 6,05	
	coligante- ^{99m} Tc	7,91 ± 4,32	4,01 ± 1,57	
	^{99m} TcO ₂	1,55 ± 1,11	0,87 ± 0,53	
Banho de água em ebulição/ 15 min	OCT-HYNIC- ^{99m} Tc	89,91 ± 4,82	91,37 ± 6,14	N= 4
	^{99m} TcO ₄ ⁻	2,94 ± 2,68	2,72 ± 1,19	
	^{99m} TcO ₄ ⁻ + coligante- ^{99m} Tc	9,62 ± 6,05	7,87 ± 1,82	
	coligante- ^{99m} Tc	6,69 ± 4,09	5,15 ± 1,19	
	^{99m} TcO ₂	2,31 ± 1,73	1,60 ± 0,90	
Banho de água em ebulição/ 30 min	OCT-HYNIC- ^{99m} Tc	88,07 ± 7,76	90,53 ± 2,57	N= 2
	^{99m} TcO ₄ ⁻	3,16 ± 1,05	3,75 ± 0,33	
	^{99m} TcO ₄ ⁻ + coligante- ^{99m} Tc	9,56 ± 0,53	8,73 ± 0,11	
	coligante- ^{99m} Tc	6,40 ± 0,52	4,98 ± 0,44	
	^{99m} TcO ₂	2,24 ± 0,06	1,95 ± 0,27	
	OCT-HYNIC- ^{99m} Tc	88,21 ± 0,47	89,32 ± 0,38	

* 20 µg OCT-HYNIC, 10 mg EDDA, 20 mg tricina, 15 µg SnCl₂.2H₂O, 1110 MBq (30 mCi) ^{99m}TcO₄⁻ e pH 6,5

FIGURA 26 – Gráfico representativo da TAB. 5 da pureza radioquímica dos estudos de variação da temperatura e do tempo de aquecimento na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio-99m

Foram realizadas duas marcações sem adição do peptídeo OCT-HYNIC (TAB. 6) de forma a gerar, propositadamente, alta porcentagem da espécie coligante- ^{99m}Tc que foi utilizada para confirmação do sistema cromatográfico em camada delgada e do tempo de retenção (RT) da espécie no sistema cromatográfico de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizado na determinação da pureza radioquímica das marcações. Na ausência do peptídeo, aproximadamente metade da radioatividade introduzida na marcação apresenta-se na forma de tecnécio livre e a outra metade na forma de coligante. Cinco horas após a marcação, a porcentagem de tecnécio livre aumenta, caracterizando a instabilidade do complexo coligante- ^{99m}Tc .

TABELA 6 – Pureza radioquímica do estudo da variação da massa de OCT-HYNIC na marcação com tecnécio- ^{99m}Tc *

Massa de OCT-HYNIC	Espécie radioquímica	% espécie radioquímica		
		30 min	5 h	Nº ensaios
0 μg	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$56,89 \pm 18,34$	$69,05 \pm 5,08$	N= 2
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$ + coligante- ^{99m}Tc	$98,32 \pm 0,79$	$99,49 \pm 0,28$	
	coligante- ^{99m}Tc	$41,43 \pm 17,54$	$30,44 \pm 4,80$	
	$^{99m}\text{TcO}_2$	$1,68 \pm 0,08$	$0,51 \pm 0,40$	

* 10 mg EDDA, 20 mg tricina, 15 μg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1110 MBq (30 mCi) $^{99m}\text{TcO}_4^-$, tempo de reação de 10 minutos em banho de água em ebulição e pH 6,5

Partindo-se da condição padrão de marcação, variou-se a atividade de marcação (TAB. 7 e FIG. 27) de forma a avaliar se a composição poderia ser marcada com atividades mais altas e, desta forma, promover melhor relação de custo quando considerado o uso do produto em rotina clínica. Utilizando-se 1850 MBq (50 mCi) a pureza radioquímica diminuiu discretamente, considerando-se principalmente, a estabilidade após 5 horas da marcação. Provavelmente com o aumento da atividade sem alteração da massa de cloreto estanoso para reduzir o estado de oxidação do ^{99m}Tc , a marcação resultou numa pureza radioquímica inferior.

Melo estudou a variação da atividade na marcação de reagente liofilizado de octreotato-HYNIC- ^{99m}Tc (20 μg octreotato-Tyr³-HYNIC, 10 mg EDDA, 20 mg tricina, 15 μg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 50 mg manitol), utilizando formulação semelhante à descrita neste estudo para marcação do OCT-HYNIC com ^{99m}Tc , tendo observado pureza radioquímica e estabilidade satisfatórias ($93,42 \pm 0,93$ % em 1 hora e $92,37 \pm 0,38$ % em 3 horas) para atividade de marcação até 1480 MBq (40 mCi)⁷³.

TABELA 7 – Pureza radioquímica dos estudos de variação de atividade na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio- ^{99m}Tc *

Atividade	Espécie radioquímica	% espécie radioquímica		
		30 min	5 h	Nº ensaios
1110 MBq (30 mCi) (condição padrão)	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$0,62 \pm 0,42$	$3,74 \pm 4,53$	N= 6
	$^{99m}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99m}\text{Tc}$	$8,53 \pm 4,66$	$7,75 \pm 6,05$	
	$\text{coligante-}^{99m}\text{Tc}$	$7,91 \pm 4,32$	$4,01 \pm 1,57$	
	$^{99m}\text{TcO}_2$	$1,55 \pm 1,11$	$0,87 \pm 0,53$	
	OCT-HYNIC- ^{99m}Tc	$89,91 \pm 4,82$	$91,37 \pm 6,14$	
1850 MBq (50 mCi)	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$5,21 \pm 0,08$	$8,46 \pm 0,21$	N= 2
	$^{99m}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99m}\text{Tc}$	$13,58 \pm 0,04$	$15,54 \pm 0,64$	
	$\text{coligante-}^{99m}\text{Tc}$	$8,37 \pm 0,12$	$7,08 \pm 0,43$	
	$^{99m}\text{TcO}_2$	$0,86 \pm 0,03$	$0,83 \pm 0,03$	
	OCT-HYNIC- ^{99m}Tc	$85,57 \pm 0,06$	$83,64 \pm 0,67$	
3700 MBq (100 mCi)	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$47,55 \pm 0,18$	$51,72 \pm 0,82$	N= 2
	$^{99m}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99m}\text{Tc}$	$54,41 \pm 0,08$	$54,92 \pm 0,70$	
	$\text{coligante-}^{99m}\text{Tc}$	$6,87 \pm 0,09$	$3,20 \pm 1,52$	
	$^{99m}\text{TcO}_2$	$0,47 \pm 0,01$	$0,47 \pm 0,03$	
	OCT-HYNIC- ^{99m}Tc	$45,13 \pm 0,09$	$44,62 \pm 0,73$	

* 20 μg OCT-HYNIC, 10 mg EDDA, 20 mg tricina, 15 μg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, tempo de reação de 10 minutos em banho de água em ebulição e pH 6,5

FIGURA 27 – Gráfico representativo da TAB. 7 da pureza radioquímica dos estudos de variação de atividade na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio-99m

Os resultados do estudo de variação de atividade na marcação de OCT-HYNIC com ^{99m}Tc sugerem que a formulação preparada a partir da condição padrão poderá ser utilizada para apenas um paciente por marcação, tendo em vista o limite de atividade determinado para garantir boa pureza radioquímica e estabilidade da marcação.

Os resultados do estudo de variação de atividade sugeriram avaliar a possibilidade de alteração da formulação, particularmente com o aumento da massa dos constituintes, de modo a possibilitar a marcação com atividades maiores.

Outro parâmetro importante de ser avaliado é o pH de marcação, tendo em vista a influência direta do pH na complexação de ligantes com ^{99m}Tc , mais especificamente na disponibilização de elétrons dos átomos doadores que participam da complexação com o metal. A TAB. 8 e a FIG. 28 a seguir, apresentam os resultados do estudo de variação do pH na marcação do OCT-HYNIC com ^{99m}Tc .

TABELA 8 – Pureza radioquímica dos estudos de variação do pH na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio- ^{99m}Tc *

pH	Espécie radioquímica	% espécie radioquímica		
		30 min	5 h	Nº ensaios
5,5	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$1,18 \pm 0,11$	$3,43 \pm 0,54$	N= 2
	$^{99m}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99m}\text{Tc}$	$8,40 \pm 0,78$	$7,53 \pm 0,90$	
	coligante- ^{99m}Tc	$7,22 \pm 0,90$	$4,10 \pm 1,44$	
	$^{99m}\text{TcO}_2$	$1,46 \pm 0,07$	$1,28 \pm 0,21$	
	OCT-HYNIC- ^{99m}Tc	$90,15 \pm 0,86$	$91,20 \pm 1,10$	
6,0	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$4,39 \pm 3,85$	$4,96 \pm 0,57$	N= 2
	$^{99m}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99m}\text{Tc}$	$6,98 \pm 1,44$	$8,16 \pm 0,99$	
	coligante- ^{99m}Tc	$2,60 \pm 2,41$	$3,20 \pm 0,42$	
	$^{99m}\text{TcO}_2$	$1,35 \pm 0,39$	$1,33 \pm 0,38$	
	OCT-HYNIC- ^{99m}Tc	$91,67 \pm 1,05$	$90,51 \pm 0,62$	
6,5 (condição padrão)	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$0,62 \pm 0,42$	$3,74 \pm 4,53$	N= 6
	$^{99m}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99m}\text{Tc}$	$8,53 \pm 4,66$	$7,75 \pm 6,05$	
	coligante- ^{99m}Tc	$7,91 \pm 4,32$	$4,01 \pm 1,57$	
	$^{99m}\text{TcO}_2$	$1,55 \pm 1,11$	$0,87 \pm 0,53$	
	OCT-HYNIC- ^{99m}Tc	$89,91 \pm 4,82$	$91,37 \pm 6,14$	
7,5	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$0,84 \pm 0,42$	$1,36 \pm 0,26$	N= 2
	$^{99m}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99m}\text{Tc}$	$4,34 \pm 0,28$	$4,58 \pm 0,10$	
	coligante- ^{99m}Tc	$3,50 \pm 0,70$	$3,22 \pm 0,36$	
	$^{99m}\text{TcO}_2$	$0,95 \pm 0,70$	$0,88 \pm 0,46$	
	OCT-HYNIC- ^{99m}Tc	$94,72 \pm 0,42$	$94,54 \pm 0,36$	
8,0	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$4,22 \pm 0,26$	$4,30 \pm 0,52$	N= 2
	$^{99m}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99m}\text{Tc}$	$8,07 \pm 0,08$	$8,07 \pm 1,23$	
	coligante- ^{99m}Tc	$3,86 \pm 0,18$	$3,77 \pm 1,75$	
	$^{99m}\text{TcO}_2$	$4,71 \pm 0,55$	$4,20 \pm 0,03$	
	OCT-HYNIC- ^{99m}Tc	$87,22 \pm 0,47$	$87,73 \pm 1,26$	

* 20 μg OCT-HYNIC, 10 mg EDDA, 20 mg tricina, 15 μg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1110 MBq (30 mCi) $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e tempo de reação de 10 minutos em banho de água em ebulição

FIGURA 28 – Gráfico representativo da TAB. 8 da pureza radioquímica dos estudos de variação do pH na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio-99m

Os resultados do estudo de variação do pH demonstraram que na faixa de pH ácido (5,5 a 6,5) não se observou variação na pureza radioquímica da marcação. A pureza radioquímica foi aparentemente maior para as marcações realizadas na faixa de pH alcalino (7,5) que, provavelmente, favoreceu a desprotonação dos coligantes envolvidos na marcação.

Entretanto, é importante considerar que o pH alcalino não favorece o estado reduzido do cloreto estanoso. Apesar disto, dentro da faixa de pH estudada, a massa de cloreto estanoso empregada possibilitou a obtenção do peptídeo marcado e com estabilidade garantida para o período de 5 horas.

Formulações liofilizadas para marcação com ^{99m}Tc são geralmente preparadas em pH ligeiramente ácido ou neutro, tendo em vista a preservação da massa de cloreto estanoso utilizada e a estabilidade do reagente liofilizado frente ao armazenamento.

Quando o pH de marcação alcalino favorece a formação do complexo, uma alternativa viável é preparar o reagente liofilizado em pH baixo e introduzir um tampão alcalino no momento da marcação. Outra opção seria aumentar a massa de cloreto estanoso da formulação de forma a compensar a oxidação parcial do estanho ocasionada pelo aumento do pH do meio. Neste caso, é importante avaliar a influência da massa de cloreto estanoso na pureza radioquímica da marcação, considerando-se que o excesso de cloreto estanoso

no meio pode ocasionar a formação de espécies radioquímicas coloidais, identificadas nos estudos cromatográficos como $^{99m}\text{TcO}_2$.

A formulação original emprega massa extremamente reduzida de cloreto estanoso (15 μg) por frasco de marcação. O inconveniente de utilização de uma massa tão pequena de cloreto estanoso reside na instabilidade natural deste componente, frente às condições oxidativas do meio e a dificuldade para estabilizá-lo durante seu processo. A oxidação do Sn^{2+} a Sn^{4+} que poderá ocorrer durante o processo de preparo do produto poderá resultar na queda da pureza radioquímica da marcação.

A TAB. 9 e a FIG 29 a seguir apresentam os resultados do estudo de variação da massa de cloreto estanoso na pureza radioquímica da marcação de OCT-HYNIC com ^{99m}Tc , inicialmente para marcações realizadas em pH 6,5. O aumento da massa de cloreto estanoso promoveu um aumento discreto na porcentagem correspondente à espécie coloidal ($^{99m}\text{TcO}_2$), porém ocasionou um aumento significativo na porcentagem de coligante- ^{99m}Tc a partir de 100 μg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

TABELA 9 – Pureza radioquímica dos estudos de variação da massa de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio- ^{99m} *

Massa de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Espécie radioquímica	% espécie radioquímica		
		30 min	5 h	Nº ensaios
15 μg (condição padrão)	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$0,62 \pm 0,42$	$3,74 \pm 4,53$	N= 6
	$^{99m}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99m}\text{Tc}$	$8,53 \pm 4,66$	$7,75 \pm 6,05$	
	coligante- ^{99m}Tc	$7,91 \pm 4,32$	$4,01 \pm 1,57$	
	$^{99m}\text{TcO}_2$	$1,55 \pm 1,11$	$0,87 \pm 0,53$	
	OCT-HYNIC- ^{99m}Tc	$89,91 \pm 4,82$	$91,37 \pm 6,14$	
30 μg	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$7,47 \pm 0,90$	$5,64 \pm 0,59$	N= 2
	$^{99m}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99m}\text{Tc}$	$12,50 \pm 0,44$	$11,27 \pm 0,43$	
	coligante- ^{99m}Tc	$5,04 \pm 0,46$	$5,63 \pm 0,16$	
	$^{99m}\text{TcO}_2$	$1,50 \pm 0,04$	$1,18 \pm 0,14$	
	OCT-HYNIC- ^{99m}Tc	$86,01 \pm 0,40$	$87,56 \pm 0,29$	
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$4,38 \pm 0,28$	$16,95 \pm 0,97$	N= 2

Massa de SnCl ₂ .2H ₂ O	Espécie radioquímica	% espécie radioquímica		
		30 min	5 h	Nº ensaios
50 µg	^{99m} TcO ₄ ⁻ + coligante- ^{99m} Tc	18,16 ± 0,16	25,53 ± 1,30	N= 2
	coligante- ^{99m} Tc	13,78 ± 0,44	8,59 ± 2,27	
	^{99m} TcO ₂	1,28 ± 0,21	0,74 ± 0,03	
	OCT-HYNIC- ^{99m} Tc	80,56 ± 0,06	73,73 ± 1,27	
	^{99m} TcO ₄ ⁻	5,30 ± 0,04	29,78 ± 1,32	
60 µg	^{99m} TcO ₄ ⁻ + coligante- ^{99m} Tc	14,21 ± 1,75	33,83 ± 1,85	
	coligante- ^{99m} Tc	8,91 ± 1,79	4,05 ± 0,53	
	^{99m} TcO ₂	2,43 ± 0,12	1,05 ± 0,16	
	OCT-HYNIC- ^{99m} Tc	83,37 ± 1,87	65,13 ± 1,68	
	^{99m} TcO ₄ ⁻	3,88 ± 1,26	9,17 ± 0,91	
100 µg	^{99m} TcO ₄ ⁻ + coligante- ^{99m} Tc	19,49 ± 0,67	17,39 ± 0,26	
	coligante- ^{99m} Tc	15,61 ± 0,59	8,22 ± 0,64	
	^{99m} TcO ₂	2,61 ± 0,08	1,46 ± 0,09	
	OCT-HYNIC- ^{99m} Tc	77,91 ± 0,76	81,16 ± 0,17	
	^{99m} TcO ₄ ⁻	3,11 ± 0,58	6,92 ± 1,71	
150 µg	^{99m} TcO ₄ ⁻ + coligante- ^{99m} Tc	15,95 ± 2,57	15,95 ± 1,07	
	coligante- ^{99m} Tc	12,84 ± 3,16	9,03 ± 0,65	
	^{99m} TcO ₂	2,43 ± 0,45	1,25 ± 0,24	
	OCT-HYNIC- ^{99m} Tc	81,62 ± 2,12	82,80 ± 0,83	
	^{99m} TcO ₄ ⁻	4,35 ± 3,22	9,76 ± 0,30	
167 µg	^{99m} TcO ₄ ⁻ + coligante- ^{99m} Tc	24,26 ± 2,51	23,60 ± 0,47	
	coligante- ^{99m} Tc	19,91 ± 0,71	13,84 ± 0,17	
	^{99m} TcO ₂	4,81 ± 3,35	1,70 ± 0,77	
	OCT-HYNIC- ^{99m} Tc	70,94 ± 5,86	74,71 ± 0,30	

* 20 µg OCT-HYNIC, 10 mg EDDA, 20 mg tricina, 1110 MBq (30 mCi) ^{99m}TcO₄⁻, tempo de reação de 10 minutos em banho de água em ebulição e pH 6,5

FIGURA 29 – Gráfico representativo da TAB. 9 da pureza radioquímica dos estudos de variação da massa de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio- $^{99\text{m}}$

O mesmo estudo de variação da massa de cloreto estanoso foi realizado para pH 7,5 (TAB. 10 e FIG. 30) e pH 8,0 (TAB. 11 e FIG. 31). Em ambos os casos, a porcentagem de coligante- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ foi menor que a observada nas marcações com pH 6,5, contribuindo para melhores resultados da pureza radioquímica nas marcações, apesar das porcentagens relativamente maiores de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ nos pH alcalinos.

TABELA 10 – Pureza radioquímica dos estudos de variação da massa de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio- $^{99\text{m}}$ para pH 7,5*

Massa de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Espécie radioquímica	% espécie radioquímica		
		30 min	5 h	Nº ensaios
15 µg	$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$	$0,84 \pm 0,42$	$1,36 \pm 0,26$	N= 2
	$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99\text{m}}\text{Tc}$	$4,34 \pm 0,28$	$4,58 \pm 0,10$	
	coligante- $^{99\text{m}}\text{Tc}$	$3,50 \pm 0,70$	$3,22 \pm 0,36$	
	$^{99\text{m}}\text{TcO}_2$	$0,95 \pm 0,70$	$0,88 \pm 0,46$	
	OCT-HYNIC- $^{99\text{m}}\text{Tc}$	$94,72 \pm 0,42$	$94,54 \pm 0,36$	
	$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$	$8,50 \pm 0,46$	$18,09 \pm 4,11$	
	$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99\text{m}}\text{Tc}$	$19,93 \pm 2,58$	$19,81 \pm 0,39$	

Massa de SnCl ₂ .2H ₂ O	Espécie radioquímica	% espécie radioquímica		
		30 min	5 h	Nº ensaios
50 µg	coligante- ^{99m} Tc	11,43 ± 2,12	2,63 ± 2,43	N= 2
	^{99m} TcO ₂	2,32 ± 0,02	2,36 ± 0,18	
	OCT-HYNIC- ^{99m} Tc	77,76 ± 2,56	76,93 ± 1,49	
	^{99m} TcO ₄ ⁻	8,97 ± 0,64	11,48 ± 0,20	
	^{99m} TcO ₄ ⁻ + coligante- ^{99m} Tc	12,38 ± 0,57	19,76 ± 0,79	
100 µg	coligante- ^{99m} Tc	3,41 ± 0,06	8,28 ± 0,59	N= 2
	^{99m} TcO ₂	1,88 ± 0,05	1,30 ± 0,27	
	OCT-HYNIC- ^{99m} Tc	85,75 ± 0,52	78,94 ± 0,52	
	^{99m} TcO ₄ ⁻	7,07 ± 0,55	7,09 ± 1,59	
	^{99m} TcO ₄ ⁻ + coligante- ^{99m} Tc	10,74 ± 0,25	13,45 ± 0,42	
150 µg	coligante- ^{99m} Tc	3,67 ± 0,30	6,36 ± 1,17	N= 2
	^{99m} TcO ₂	2,68 ± 0,12	1,86 ± 0,18	
	OCT-HYNIC- ^{99m} Tc	86,59 ± 0,37	84,70 ± 0,59	

* 20 µg OCT-HYNIC, 10 mg EDDA, 20 mg tricina, 1110 MBq (30 mCi) ^{99m}TcO₄⁻ e tempo de reação de 10 minutos em banho de água em ebulição

FIGURA 30 – Gráfico representativo da TAB. 10 da pureza radioquímica dos estudos de variação da massa de SnCl₂.2H₂O na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio-99m para pH 7,5

TABELA 11 – Pureza radioquímica dos estudos de variação da massa de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio- $^{99\text{m}}$ para pH 8,0*

Massa de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Espécie radioquímica	% espécie radioquímica		
		30 min	5 h	Nº ensaios
15 μg	$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$	$4,22 \pm 0,26$	$4,30 \pm 0,52$	N= 2
	$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99\text{m}}\text{Tc}$	$8,07 \pm 0,08$	$8,07 \pm 1,23$	
	$\text{coligante-}^{99\text{m}}\text{Tc}$	$3,86 \pm 0,18$	$3,77 \pm 1,75$	
	$^{99\text{m}}\text{TcO}_2$	$4,71 \pm 0,55$	$4,20 \pm 0,03$	
	OCT-HYNIC- $^{99\text{m}}\text{Tc}$	$87,22 \pm 0,47$	$87,73 \pm 1,26$	
50 μg	$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$	$3,54 \pm 0,35$	$4,06 \pm 0,86$	N= 2
	$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99\text{m}}\text{Tc}$	$9,70 \pm 0,60$	$7,54 \pm 1,55$	
	$\text{coligante-}^{99\text{m}}\text{Tc}$	$6,16 \pm 0,25$	$3,48 \pm 2,40$	
	$^{99\text{m}}\text{TcO}_2$	$2,87 \pm 0,02$	$1,95 \pm 0,08$	
	OCT-HYNIC- $^{99\text{m}}\text{Tc}$	$87,44 \pm 0,62$	$90,52 \pm 1,63$	
100 μg	$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$	$5,40 \pm 0,56$	$8,31 \pm 5,01$	N= 2
	$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99\text{m}}\text{Tc}$	$9,69 \pm 0,68$	$13,77 \pm 1,07$	
	$\text{coligante-}^{99\text{m}}\text{Tc}$	$4,30 \pm 0,12$	$5,47 \pm 6,09$	
	$^{99\text{m}}\text{TcO}_2$	$2,61 \pm 0,43$	$2,67 \pm 0,03$	
	OCT-HYNIC- $^{99\text{m}}\text{Tc}$	$87,71 \pm 0,25$	$83,56 \pm 1,05$	
150 μg	$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$	$7,79 \pm 5,08$	$8,19 \pm 5,28$	N= 2
	$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99\text{m}}\text{Tc}$	$13,15 \pm 3,53$	$14,67 \pm 7,00$	
	$\text{coligante-}^{99\text{m}}\text{Tc}$	$5,36 \pm 1,55$	$6,49 \pm 1,72$	
	$^{99\text{m}}\text{TcO}_2$	$1,99 \pm 0,03$	$1,78 \pm 0,10$	
	OCT-HYNIC- $^{99\text{m}}\text{Tc}$	$84,86 \pm 3,56$	$83,55 \pm 6,90$	

* 20 μg OCT-HYNIC, 10 mg EDDA, 20 mg tricina, 1110 MBq (30 mCi) $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ e tempo de reação de 10 minutos em banho de água em ebulição

FIGURA 31 – Gráfico representativo da TAB. 11 da pureza radioquímica dos estudos de variação da massa de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio-99m para pH 8,0

A TAB. 12 a seguir resume os resultados dos estudos de marcação variando-se a massa de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ para os diferentes pH. Os estudos sugerem que aumentando-se a massa de cloreto estânico, os melhores resultados de pureza radioquímica são obtidos em pH alcalino.

TABELA 12 – Resumo das purezas radioquímicas dos estudos de variação da massa de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em diferentes pH

Massa de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	% pureza radioquímica OCT-HYNIC- ^{99m} Tc					
	30 min		5 h		30 min	
	pH 6,5		pH 7,5		pH 8,0	
	30 min	5 h	30 min	5 h	30 min	5 h
15 µg	89,91	91,37	94,72	94,54	87,22	87,73
30 µg	86,01	87,56	-	-	-	-
50 µg	80,56	73,73	77,76	76,93	87,44	90,52
60 µg	83,37	65,13	-	-	-	-
100 µg	77,91	81,16	85,75	78,94	87,71	83,56
150 µg	81,62	82,8	86,59	84,7	84,86	83,55
167 µg	70,94	74,71	-	-	-	-

Apesar dos resultados satisfatórios obtidos com o aumento da massa de cloreto estanoso combinado com pH alcalino, a pureza radioquímica obtida ficou abaixo de 90%, valor mínimo desejável para aplicação clínica de peptídeos radiomarcados.

Neste sentido, buscou-se verificar se o aumento da massa do peptídeo, combinado à condição de pH alcalino e massa de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ aumentada poderiam resultar em pureza radioquímica superior a 90 %. A TAB. 13 e a FIG. 32 apresentam os resultados deste estudo.

TABELA 13 – Pureza radioquímica dos estudos de variação da massa de OCT-HYNIC na marcação com tecnécio- $^{99\text{m}}$ para pH 8,0 e 150 μg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ *

Massa de OCT-HYNIC	Espécie radioquímica	% espécie radioquímica		
		30 min	5 h	Nº ensaios
20 μg	$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$	$7,79 \pm 5,08$	$8,19 \pm 5,28$	N= 2
	$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99\text{m}}\text{Tc}$	$13,15 \pm 3,53$	$14,67 \pm 7,00$	
	coligante- $^{99\text{m}}\text{Tc}$	$5,36 \pm 1,55$	$6,49 \pm 1,72$	
	$^{99\text{m}}\text{TcO}_2$	$1,99 \pm 0,03$	$1,78 \pm 0,10$	
	OCT-HYNIC- $^{99\text{m}}\text{Tc}$	$84,86 \pm 3,56$	$83,55 \pm 6,90$	
40 μg	$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$	$18,93 \pm 0,42$	$14,80 \pm 0,40$	N= 2
	$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99\text{m}}\text{Tc}$	$20,22 \pm 3,44$	$19,12 \pm 0,69$	
	coligante- $^{99\text{m}}\text{Tc}$	$2,74 \pm 1,82$	$4,32 \pm 0,29$	
	$^{99\text{m}}\text{TcO}_2$	$6,93 \pm 0,06$	$3,65 \pm 0,45$	
	OCT-HYNIC- $^{99\text{m}}\text{Tc}$	$71,41 \pm 1,46$	$77,24 \pm 0,24$	
60 μg	$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$	$1,21 \pm 0,01$	$1,56 \pm 0,09$	N= 2
	$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99\text{m}}\text{Tc}$	$8,00 \pm 0,28$	$7,88 \pm 0,40$	
	coligante- $^{99\text{m}}\text{Tc}$	$6,79 \pm 0,27$	$6,32 \pm 0,49$	
	$^{99\text{m}}\text{TcO}_2$	$2,31 \pm 0,22$	$1,63 \pm 0,33$	
	OCT-HYNIC- $^{99\text{m}}\text{Tc}$	$89,70 \pm 0,06$	$90,50 \pm 0,73$	
80 μg	$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$	$0,34 \pm 0,11$	$1,06 \pm 0,06$	N= 2
	$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99\text{m}}\text{Tc}$	$6,61 \pm 0,11$	$7,41 \pm 0,28$	
	coligante- $^{99\text{m}}\text{Tc}$	$6,28 \pm 0,01$	$6,35 \pm 0,21$	
	$^{99\text{m}}\text{TcO}_2$	$1,56 \pm 0,35$	$1,40 \pm 0,01$	

Massa de OCT-HYNIC	Espécie radioquímica	% espécie radioquímica		
		30 min	5 h	Nº ensaios
80 µg 15 min	OCT-HYNIC- ^{99m} Tc	91,84 ± 0,46	91,20 ± 0,28	N= 2
	^{99m} TcO ₄ ⁻	0,82 ± 0,16	2,43 ± 0,47	
	^{99m} TcO ₄ ⁻ + coligante- ^{99m} Tc	11,98 ± 0,44	11,64 ± 0,01	
	coligante- ^{99m} Tc	11,16 ± 0,28	9,21 ± 0,45	
	^{99m} TcO ₂	1,73 ± 0,37	1,78 ± 0,18	
	OCT-HYNIC- ^{99m} Tc	86,29 ± 0,07	86,58 ± 0,20	

* 10 mg EDDA, 20 mg tricina, 1110 MBq (30 mCi) ^{99m}TcO₄⁻ e tempo de reação de 10 minutos em banho de água em ebulição

FIGURA 32 – Gráfico representativo da TAB. 13 da pureza radioquímica dos estudos de variação da massa de OCT-HYNIC na marcação com tecnécio-99m para pH 8,0 e 150 µg SnCl₂.2H₂O

Utilizando-se de 60 a 80 µg de peptídeo, obteve-se pureza radioquímica superior a 90 %, conforme desejado. Para a condição de 80 µg de peptídeo, o tempo de reação foi aumentado de 10 para 15 minutos, porém sem incremento na pureza radioquímica. O estudo demonstrou a importância de se manter a estequiometria da reação; o aumento da massa de cloreto estânico em 10 vezes (de 15 µg para 150 µg) teve que ser compensado com o aumento da massa do peptídeo em, no mínimo, 3 vezes.

Esta nova formulação (80 µg OCT-HYNIC e 150 µg SnCl₂.2H₂O em pH 8,0) foi desafiada para atividades crescentes de ^{99m}Tc. Os resultados obtidos (TAB. 14 e FIG. 33) foram excelentes, no geral, com pureza radioquímica superior a 90 % para atividade de até 3700 MBq (100 mCi) e estabilidade atestada de 5 horas.

TABELA 14 – Pureza radioquímica dos estudos de variação da atividade na marcação com tecnécio-99m para pH 8,0, 80 µg OCT-HYNIC e 150 µg SnCl₂.2H₂O*

Atividade	Espécie radioquímica	% espécie radioquímica		
		30 min	5 h	Nº ensaios
1110 MBq (30 mCi)	^{99m} TcO ₄ ⁻	0,34 ± 0,11	1,06 ± 0,06	N= 2
	^{99m} TcO ₄ ⁻ + coligante- ^{99m} Tc	6,61 ± 0,11	7,41 ± 0,28	
	coligante- ^{99m} Tc	6,28 ± 0,01	6,35 ± 0,21	
	^{99m} TcO ₂	1,56 ± 0,35	1,40 ± 0,01	
	OCT-HYNIC- ^{99m} Tc	91,84 ± 0,46	91,20 ± 0,28	
1850 MBq (50 mCi)	^{99m} TcO ₄ ⁻	0,60 ± 0,04	2,46 ± 0,06	N= 2
	^{99m} TcO ₄ ⁻ + coligante- ^{99m} Tc	9,82 ± 0,62	9,64 ± 0,76	
	coligante- ^{99m} Tc	9,23 ± 0,66	7,18 ± 0,69	
	^{99m} TcO ₂	1,82 ± 0,31	1,63 ± 0,04	
	OCT-HYNIC- ^{99m} Tc	88,36 ± 0,31	88,74 ± 0,80	
3700 MBq (100 mCi)	^{99m} TcO ₄ ⁻	1,08 ± 0,04	2,67 ± 0,09	N= 2
	^{99m} TcO ₄ ⁻ + coligante- ^{99m} Tc	6,59 ± 0,31	8,28 ± 0,45	
	coligante- ^{99m} Tc	5,52 ± 0,35	5,61 ± 0,54	
	^{99m} TcO ₂	1,27 ± 0,01	1,13 ± 0,09	
	OCT-HYNIC- ^{99m} Tc	92,14 ± 0,30	90,60 ± 0,35	

* 10 mg EDDA, 20 mg tricina e tempo de reação de 10 minutos em banho de água em ebulição

FIGURA 33 – Gráfico representativo da TAB. 14 da pureza radioquímica dos estudos de variação da atividade na marcação com tecnécio-99m para pH 8,0, 80 μg OCT-HYNIC e 150 μg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Para verificar se os resultados positivos obtidos com a nova condição de marcação foram devidos à combinação dos três fatores (aumento das massas de cloreto estanoso, do peptídeo e pH 8,0), o estudo do aumento das massas foi repetido também para o pH 6,5 (utilizado na condição padrão de marcação). Também se avaliou o efeito da variação da massa dos coligantes na pureza radioquímica da marcação. Os resultados destes estudos estão representados na TAB. 15 e na FIG. 34.

TABELA 15 – Pureza radioquímica dos estudos de variação da massa do OCT-HYNIC e dos coligantes na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio-99m para pH 6,5 e 150 μg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}^*$

Massa dos coligantes	Espécie radioquímica	% espécie radioquímica		
		30 min	5 h	Nº ensaios
20 μg OCT-HYNIC	$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$	0,62 $\pm$ 0,42	3,74 $\pm$ 4,53	N= 6
10 mg EDDA	$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99\text{m}}\text{Tc}$	8,53 $\pm$ 4,66	7,75 $\pm$ 6,05	
20 mg tricina	coligante- $^{99\text{m}}\text{Tc}$	7,91 $\pm$ 4,32	4,01 $\pm$ 1,57	
15 μg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$^{99\text{m}}\text{TcO}_2$	1,55 $\pm$ 1,11	0,87 $\pm$ 0,53	
(condição padrão)	OCT-HYNIC- $^{99\text{m}}\text{Tc}$	89,91 $\pm$ 4,82	91,37 $\pm$ 6,14	

Massa dos coligantes	Espécie radioquímica	% espécie radioquímica		
		30 min	5 h	Nº ensaios
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$2,14 \pm 2,55$	$6,44 \pm 0,13$	
20 μg OCT-HYNIC	$^{99m}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99m}\text{Tc}$	$17,87 \pm 5,13$	$14,06 \pm 0,93$	
20 mg EDDA	$\text{coligante-}^{99m}\text{Tc}$	$15,74 \pm 2,58$	$7,62 \pm 1,06$	N= 2
40 mg tricina	$^{99m}\text{TcO}_2$	$2,59 \pm 0,12$	$0,79 \pm 0,26$	
	OCT-HYNIC- ^{99m}Tc	$79,55 \pm 5,01$	$85,16 \pm 0,67$	
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$10,63 \pm 3,20$	$10,19 \pm 3,84$	
40 μg OCT-HYNIC	$^{99m}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99m}\text{Tc}$	$15,55 \pm 2,04$	$12,89 \pm 6,39$	
10 mg EDDA	$\text{coligante-}^{99m}\text{Tc}$	$4,91 \pm 1,16$	$6,38 \pm 2,64$	N= 2
20 mg tricina	$^{99m}\text{TcO}_2$	$2,90 \pm 0,20$	$2,53 \pm 0,79$	
	OCT-HYNIC- ^{99m}Tc	$81,55 \pm 2,24$	$80,91 \pm 1,98$	
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$2,66 \pm 0,30$	$7,71 \pm 0,03$	
80 μg OCT-HYNIC	$^{99m}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99m}\text{Tc}$	$20,81 \pm 0,33$	$21,41 \pm 0,37$	
10 mg EDDA	$\text{coligante-}^{99m}\text{Tc}$	$18,15 \pm 0,03$	$13,70 \pm 0,40$	N= 2
20 mg tricina	$^{99m}\text{TcO}_2$	$2,51 \pm 0,13$	$1,52 \pm 0,03$	
	OCT-HYNIC- ^{99m}Tc	$76,68 \pm 0,20$	$77,08 \pm 0,35$	
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$0,44 \pm 0,06$	$1,67 \pm 0,10$	
200 μg OCT-HYNIC	$^{99m}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99m}\text{Tc}$	$8,99 \pm 0,13$	$9,58 \pm 0,77$	N= 2
10 mg EDDA	$\text{coligante-}^{99m}\text{Tc}$	$8,56 \pm 0,06$	$7,91 \pm 0,67$	
20 mg tricina	$^{99m}\text{TcO}_2$	$1,93 \pm 0,07$	$1,50 \pm 0,04$	
	OCT-HYNIC- ^{99m}Tc	$89,08 \pm 0,20$	$88,93 \pm 0,81$	
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$0,16 \pm 0,04$	$0,44 \pm 0,03$	
200 μg OCT-HYNIC	$^{99m}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99m}\text{Tc}$	$3,77 \pm 0,06$	$3,46 \pm 0,10$	
100 mg EDDA	$\text{coligante-}^{99m}\text{Tc}$	$3,61 \pm 0,01$	$3,02 \pm 0,07$	N= 2
200 mg tricina	$^{99m}\text{TcO}_2$	$0,40 \pm 0,06$	$0,33 \pm 0,11$	
	OCT-HYNIC- ^{99m}Tc	$95,84 \pm 0,12$	$96,22 \pm 0,01$	

* 1110 MBq (30 mCi) $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e tempo de reação de 10 minutos em banho de água em ebulição

FIGURA 34 – Gráfico representativo da TAB. 15 da pureza radioquímica dos estudos de variação da massa do OCT-HYNIC e dos coligantes na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio-99m para pH 6,5 e 150 µg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Os resultados sugerem que o aumento da massa do peptídeo promoveu o aumento da pureza radioquímica quando se utiliza 150 µg de cloreto estanoso. Porém, mesmo com o aumento da massa de peptídeo até 200 µg obteve-se pureza radioquímica inferior a 90 % em pH 6,5. Somente com o aumento concomitante e proporcional da massa dos coligantes (EDDA e tricina) foi obtida pureza radioquímica superior a 90 %.

Comparativamente, resultados semelhantes foram obtidos para o pH 8,0, utilizando-se massa menor de peptídeo (80 µg) e 150 µg de cloreto estanoso, sem aumento da massa dos coligantes.

Para a condição padrão de marcação, também foi estudada a influência da variação apenas da massa dos coligantes (TAB. 16 e FIG. 35). Utilizando-se um quarto da massa original dos coligantes foi possível obter-se boa pureza radioquímica, superior a 90 % e as preparações mantiveram estáveis por 5 horas. Entretanto, o uso de apenas um dos coligantes promoveu queda na pureza radioquímica, principalmente quando se utilizou apenas EDDA, com formação de alta porcentagem da espécie coligante- $^{99\text{m}}\text{Tc}$. A associação dos coligantes melhora a estabilidade da formulação resultando numa melhor pureza radioquímica da marcação. A ausência dos coligantes demonstra a baixa capacidade de ligação do peptídeo ao $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

TABELA 16 – Pureza radioquímica dos estudos de variação da massa dos coligantes na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio- ^{99m}Tc para pH 6,5*

Massa dos coligantes	Espécie radioquímica	% espécie radioquímica		
		30 min	5 h	Nº ensaios
10 mg EDDA 20 mg tricina (condição padrão)	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$0,62 \pm 0,42$	$3,74 \pm 4,53$	N= 6
	$^{99m}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99m}\text{Tc}$	$8,53 \pm 4,66$	$7,75 \pm 6,05$	
	coligante- ^{99m}Tc	$7,91 \pm 4,32$	$4,01 \pm 1,57$	
	$^{99m}\text{TcO}_2$	$1,55 \pm 1,11$	$0,87 \pm 0,53$	
	OCT-HYNIC- ^{99m}Tc	$89,91 \pm 4,82$	$91,37 \pm 6,14$	
2,5 mg EDDA 5 mg tricina	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$1,35 \pm 0,16$	$2,71 \pm 0,21$	N= 2
	$^{99m}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99m}\text{Tc}$	$8,87 \pm 0,13$	$7,85 \pm 0,46$	
	coligante- ^{99m}Tc	$7,52 \pm 0,02$	$5,15 \pm 0,25$	
	$^{99m}\text{TcO}_2$	$2,73 \pm 0,80$	$2,14 \pm 0,43$	
	OCT-HYNIC- ^{99m}Tc	$88,40 \pm 0,94$	$90,01 \pm 0,90$	
5 mg EDDA 10 mg tricina	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$1,09 \pm 0,45$	$2,62 \pm 0,99$	N= 2
	$^{99m}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99m}\text{Tc}$	$6,38 \pm 0,33$	$9,38 \pm 3,47$	
	coligante- ^{99m}Tc	$5,29 \pm 0,73$	$6,76 \pm 3,33$	
	$^{99m}\text{TcO}_2$	$3,10 \pm 3,36$	$2,36 \pm 1,97$	
	OCT-HYNIC- ^{99m}Tc	$90,53 \pm 3,23$	$88,26 \pm 3,63$	
10 mg EDDA 0 mg tricina	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$21,95 \pm 0,84$	$28,35 \pm 1,64$	N= 2
	$^{99m}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99m}\text{Tc}$	$54,62 \pm 2,15$	$45,78 \pm 6,99$	
	coligante- ^{99m}Tc	$32,68 \pm 2,99$	$17,43 \pm 5,35$	
	$^{99m}\text{TcO}_2$	$4,06 \pm 0,66$	$2,87 \pm 0,28$	
	OCT-HYNIC- ^{99m}Tc	$41,32 \pm 2,81$	$51,36 \pm 7,27$	
0 mg EDDA 20 mg tricina	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$8,75 \pm 0,21$	$24,38 \pm 2,33$	N= 2
	$^{99m}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99m}\text{Tc}$	$10,80 \pm 0,32$	$26,27 \pm 2,14$	
	coligante- ^{99m}Tc	$2,05 \pm 0,53$	$1,89 \pm 0,20$	
	$^{99m}\text{TcO}_2$	$7,31 \pm 1,81$	$4,63 \pm 0,68$	
	OCT-HYNIC- ^{99m}Tc	$81,90 \pm 1,49$	$69,10 \pm 1,46$	
0 mg EDDA 0 mg tricina	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$31,06 \pm 27,03$	$31,64 \pm 2,10$	N= 2
	$^{99m}\text{TcO}_4^- + \text{coligante-}^{99m}\text{Tc}$	-	-	
	coligante- ^{99m}Tc	-	-	

Massa dos coligantes	Espécie radioquímica	% espécie radioquímica		
		30 min	5 h	Nº ensaios
	$^{99m}\text{TcO}_2$	51,22 ± 47,21	51,58 ± 2,18	
	OCT-HYNIC- ^{99m}Tc	17,72 ± 25,76	16,79 ± 4,29	

* 20 µg OCT-HYNIC, 15 µg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1110 MBq (30 mCi) $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e tempo de reação de 10 minutos em banho de água em ebulição

FIGURA 35 – Gráfico representativo da TAB. 16 da pureza radioquímica dos estudos de variação da massa dos coligantes na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio-99m para pH 6,5

A literatura mostra marcações de peptídeos com ^{99m}Tc utilizando EDDA e/ou tricina, obtendo-se pureza radioquímica da marcação acima de 90 % conforme descritos a seguir^{1, 2, 3, 16, 46, 55, 59, 60, 64, 70, 71, 74, 75, 76, 77, 78, 79}.

O peptídeo contendo a sequência Arg-Gly-Asp (RGD) tem como alvo, integrinas $\alpha_v\beta_3$ para imagem de angiogênese. Foram estudados conjugados RGD-HYNIC- ^{99m}Tc que resultaram, através da análise por HPLC de fase reversa e espectroscopia de massa, as seguintes purezas radioquímicas: RGD-HYNIC/EDDA- ^{99m}Tc com 93,9 % e RGD-HYNIC/tricina- ^{99m}Tc com 99,5 %. As massas utilizadas e a sequência de adição para a marcação com EDDA foram: 10 µg de RDG-HYNIC, 20 mg de tricina, 10 mg de EDDA em pH 6,0 – 7,0, 800 MBq (21,65 mCi) de $^{99m}\text{TcO}_4^-$, 20 µg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 10 minutos de reação a 100 °C. As massas utilizadas e a sequência de adição para marcação com tricina foram: 5 µg de RGD-HYNIC, 35 mg de tricina, cerca de 200 MBq (5,40 mCi) de $^{99m}\text{TcO}_4^-$,

20 μg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 20 minutos de incubação a temperatura ambiente. Na análise por HPLC de fase reversa foi utilizada coluna C-18, 250 x 4,6 mm, fluxo de 1 mL/min, detector UV 220 nm nas seguintes condições: ACN e TFA 0,1 %: 0 - 1,5 min, 0 % ACN/1,5 - 18 min, 0 - 30 % ACN/18 - 21 min, 30 - 60 % ACN/21 - 24 min, 60 % ACN⁷⁴.

O peptídeo com 12 aminoácidos, DX 180, já conjugado ao HYNIC foi marcado com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ para demonstrar que a substituição de diferentes coligantes pode influenciar fortemente a biodistribuição. A pureza radioquímica da marcação do DX 180-HYNIC/tricina- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ determinada por HPLC de fase reversa e cromatografia em papel Whatman nº 1 foi de 95 ± 2 %. As massa utilizadas e a seqüência de adição foram: 5 μg de DX 180-HYNIC, 20 μL de tampão acetato de amônio 0,25 M pH 5,2, 10 μL de tricina 0,56 M, aproximadamente 74 MBq (2 mCi) de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$, 3 μg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,11 mM, 1 hora de incubação a temperatura ambiente e um adicional de 3 g de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4,44 mM. Na análise por HPLC de fase reversa foi utilizada coluna C-18, 5 μm , 250 x 4,6 mm, fluxo de 1 mL/min nas seguintes condições: tampão fosfato 0,01 M pH 6,2 e ACN: 5 min, 10 % ACN/5 - 8 min, 30 % ACN/8 - 25 min, 37 % ACN/25 - 30 min, 60 % ACN/30 - 40 min, 10 % ACN. A análise radioquímica foi realizada em papel Whatman nº 1/acetona e Whatman nº 1/acetonitrila 40 %⁷⁵.

A bombesina (BBN) é um neuropeptídeo com 14 aminoácidos com alta afinidade por receptores relacionados à gastrina (GRP) que, marcado com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (BBN-HYNIC/tricina/EDDA- $^{99\text{m}}\text{Tc}$), resultou numa pureza radioquímica igual ou superior a 99 %, determinado por ITLC-SG e também caracterizado por HPLC de fase reversa. As massas utilizadas e a seqüência de adição foram: 20 mg de tricina, 5 mg de EDDA, 10 μg de BBN-HYNIC, 5 μL de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 8,9 mM, 500 μL de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ e 15 minutos de incubação a 100 °C. O pH de mistura da marcação foi 7,0. A análise radioquímica foi realizada por ITLC-SG/MEK e ITLC-SG/ACN 50 %. Na análise por HPLC de fase reversa foi utilizada coluna C-18, 5 μm , 250 x 4,6 mm, fluxo de 0,5 mL/min nas seguintes condições: TFA 0,1 % e ACN/TFA 0,1 %: 0 min, 95 % TFA 0,1 %/0 - 25 min, 30 % TFA 0,1 %/25 - 30 min, 5 % TFA 0,1 %⁷⁶.

Vapreotídeo (RC-160) é um análogo da somatostatina que tem afinidade por diferentes subtipos de receptores para somatostatina, sendo mais

utilizado na localização de tumores comuns como os de mama, ovário, pâncreas exócrino, próstata e cólon. Pode atravessar a barreira hematoencefálica e ser usado em imagens de tumores cerebrais. A marcação com ^{99m}Tc usando HYNIC como quelante bifuncional foi de $98,86 \pm 1,21$ % empregando coligante tricina e $69,38 \pm 4,58$ % empregando coligante EDDA, no sistema de ITLC-SG. As massas utilizadas e a seqüência de adição para marcação com tricina foram: 10 μg de RC-160-HYNIC, 50 mg de tricina, 100 a 1000 MBq (2,70 a 27,02 mCi) de $^{99m}\text{TcO}_4^-$, 25 μL de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, e 30 minutos de incubação a temperatura ambiente. As massas utilizadas e a seqüência de adição para marcação com EDDA foram: 10 μg de RC-160-HYNIC, 5 mg de EDDA, 100 a 1000 MBq (2,70 a 27,02 mCi) de $^{99m}\text{TcO}_4^-$, 5 a 10 μL de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, e 60 minutos de incubação a temperatura ambiente. A análise radioquímica foi realizada em ITLC-SG/MEK, ITLC-SG/tampão PBS (fosfato-salino) e ITLC-SG/ACN 50 %^{46, 55, 59}.

Octreotato é outro análogo da somatostatina usado no diagnóstico de tumores carcinóides. Sua formulação contendo tricina e EDDA, e HYNIC conjugado ao peptídeo, permitiu uma pureza radioquímica entre 90 % e 95 %, determinado por ITLC-SG. As massas utilizadas e a seqüência de adição foram: 40 μg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 50 mg de manitol, 50 mg de tricina, 5 mg de EDDA, 20 μg de TATE-HYNIC, 1 a 1,5 GBq (27,02 a 40,54 mCi) de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e 20 minutos de incubação a 80 °C. A análise radioquímica foi realizada em ITLC-SG/salina 0,9 %⁶⁰.

Também usando EDDA e tricina, um novo análogo da somatostatina, octreotídeo-[1- Na^{13} , Thr⁸, ácido 6-hidrazinopiridina-3-carboxílico(HYNIC⁰)] (NATE-HYNIC), foi desenvolvido para marcar com ^{99m}Tc com o objetivo de melhorar a afinidade ao receptor SSTR 2 e obter uma alta afinidade pelos receptores SSTR 3 e SSTR 5. Mostrou uma pureza radioquímica maior que 95 %, determinada pelo sistema cromatográfico em camada delgada ITLC-SG e análise em HPLC. As massas utilizadas e a seqüência de adição foram: 5 mg de EDDA, 15 mg de tricina, 40 μg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 μg de NATE-HYNIC, pH final 7,0, 1 GBq (27,02 mCi) de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e 10 minutos de incubação a 100 °C. Na análise por HPLC de fase reversa foi utilizada coluna C-18, fluxo de 0,75 mL/min nas seguintes condições: TFA 0,1 % e ACN: 0 min, 95 % TFA 0,1 %/20 - 23 min, 0 % TFA 0,1 %/25 min, 95 % TFA 0,1 %. A análise radioquímica foi realizada em ITLC-

SG/MEK, ITLC-SG/citrato de sódio 0,1 M pH 5,0 e ITLC-SG/metanol:acetato de amônio 1:1².

Octagastrina-D₁Glu-HYNIC foi estudada em pacientes com carcinoma medular de tireóide e outros tumores neuroendócrinos. Usando novamente EDDA e tricina, e HYNIC conjugado ao peptídeo, a porcentagem da marcação com ^{99m}Tc foi de 93,8 % a 97,8 % por ITLC-SG. As massas utilizadas e a seqüência de adição foram: 10 mg de EDDA, 20 mg de tricina em pH 6,0, 20 µg de SnCl₂.2H₂O, 20 µg de Octagastrina-D₁Glu-HYNIC, pH final 7,0, 1000 a 1200 MBq (27,02 a 32,43 mCi) de ^{99m}TcO₄⁻ e 10 minutos de incubação em banho de água em ebulição. Na análise por HPLC de fase reversa foi utilizada coluna C-18 e a análise radioquímica foi realizada em ITLC-SG/citrato de sódio 0,1 M pH 5,0 e ITLC-SG/metanol:acetato de amônio 1:1³.

Ubiquidina (UBI) é um peptídeo antimicrobiano humano catiônico, com 29 a 41 fragmentos, usado em imagens de infecção. Marcado com ^{99m}Tc pelo método indireto com HYNIC, a pureza radioquímica analisada por ITLC-SG e HPLC de fase reversa e exclusão, resultou numa marcação de 88 ± 5 % usando tricina e 98 ± 0,7 % usando tricina com EDDA. Após 1,5 horas a marcação com tricina caiu para 44 ± 7 % e tricina com EDDA permaneceu estável. As massas utilizadas e a seqüência de adição para marcação com tricina foram: 2 mg de tricina, 0,05 mg de UBI-HYNIC em pH 5,2, 111 MBq (3 mCi) de ^{99m}TcO₄⁻, 60 µg de SnCl₂.2H₂O e 30 a 60 minutos de incubação a temperatura ambiente. As massas utilizadas e a seqüência de adição para marcação com EDDA foram: 2 mg de tricina, 1 mg de EDDA, 0,05 mg de UBI-HYNIC em pH 6,0, 148 MBq (4 mCi) de ^{99m}TcO₄⁻, 6 µL de SnCl₂.2H₂O e 30 minutos de incubação a 70 °C. Na análise por HPLC de fase reversa foi utilizada coluna de 5 µm, 250 x 4,6 mm, fluxo de 1 mL/min nas seguintes condições: TFA 0,1 % e ACN/TFA 0,1 %: 3 min, 100 % TFA 0,1 %/10 - 20 min, 50 % TFA 0,1 %/23 min, 30 % TFA 0,1 %/27 min, 100 % TFA 0,1 %. A análise radioquímica foi realizada em ITLC-SG/solução salina⁶⁴.

Utilizando somente tricina, OCT-HYNIC marcado com ^{99m}Tc resultou numa pureza radioquímica acima de 90 % em ambos os processos, HPLC de fase reversa e ITLC-SG, descrito por Bangard e colaboradores, e Decristoforo e colaboradores. Utilizando-se somente EDDA, a pureza radioquímica foi de 63,6 %. A metodologia utilizada por Bangard e colaboradores foi: 17,5 µg de OCT-HYNIC,

50 μg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 15 mg de tricina e 1 a 2 GBq (27,02 a 54,05 mCi) de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$. Na análise por HPLC de fase reversa foi utilizada coluna 250 x 4 mm, 100 % TEAP (solução trietilamônio fosfato) e 100 % metanol por 30 minutos. A análise radioquímica foi realizada em ITLC-SG/solução salina. Já a metodologia utilizada por Decristoforo e Mather para marcação com tricina foi: 10 μg de OCT-HYNIC, 50 mg de tricina, 100 a 1000 MBq (2,70 a 27,02 mCi) de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$, 25 μg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 30 minutos de incubação a temperatura ambiente. Para a marcação realizada com EDDA a metodologia foi: 10 μg de OCT-HYNIC, 5 mg de EDDA, 100 a 1000 MBq (2,70 a 27,02 mCi) de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$, 5 a 10 μg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 60 minutos de incubação a temperatura ambiente. A análise radioquímica foi realizada em ITLC-SG/MEK, ITLC-SG/tampão PBS e ITLC-SG/ACN 50 %^{55, 77}.

A marcação de OCT-HYNIC com $^{99\text{m}}\text{Tc}$, com dois coligantes na mesma marcação, tricina e EDDA, realizada por Decristoforo e colaboradores, Gabriel e colaboradores, Guggenberg e colaboradores, e Plachcińska e colaboradores, resultou numa pureza maior que 95 %, baseada nas técnicas analíticas de ITLC e HPLC. A metodologia de marcação realizada com tricina foi: 20 μg de OCT-HYNIC, 10 mg de EDDA, 20 mg de tricina, 15 μg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1000 MBq (27,02 mCi) de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ em pH 6,0 e incubação de 10 minutos a 100 °C na marcação de Gabriel e colaboradores, e 30 minutos a 70 °C na marcação de Decristoforo e colaboradores. A metodologia de marcação realizada com EDDA foi: 20 μg de OCT-HYNIC, 10 mg de EDDA, 15 μg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1000 MBq (27,02 mCi) de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ em pH 6,0 e 1 hora de incubação a temperatura ambiente na marcação de Decristoforo e colaboradores. A metodologia de marcação realizada por Guggenberg e colaboradores para tricina foi: 20 μg de OCT-HYNIC, 1 a 10 mg de EDDA em pH 2,5 - 8,0, 10 mg de tricina, 1000 MBq (27,02 mCi) de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$, 5 a 200 μg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 5 a 60 minutos de incubação a 100 °C. A marcação realizada com EDDA foi 20 μg de OCT-HYNIC, 10 mg de EDDA em pH 7,0, 1000 MBq (27,02 mCi) de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$, 5 a 10 μg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 60 minutos de incubação a temperatura ambiente. Na análise por HPLC de fase reversa foi utilizada coluna de 5 μm , 250 x 4,6 mm, fluxo de 1 mL/min, detector UV 220 nm nas seguintes condições: ACN/tampão fosfato 0,01 N pH 6,0: 0 - 3 min, 0 % ACN/3 - 5 min, 0 - 25 % ACN/5 - 18 min, 25 % ACN/18 - 22 min, 25 - 70 % ACN/22 - 24 minutos, 70 - 0 % ACN. A análise radioquímica foi

realizada em ITLC-SG/MEK, ITLC-SG/ tampão citrato 0,1 N pH 5,0 e ITLC-SG/ACN 50 %^{16, 70, 78}. Plachcińska e colaboradores obtiveram uma variação de 92 % a 98 % utilizando uma formulação de reagente liofilizado contendo $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, tricina, EDDA, 1500 a 3000 MBq (40,54 a 81,08 mCi) de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ e incubação de 30 minutos a 80 °C. A análise radioquímica foi realizada em ITLC-SG/salina 0,9 %⁷⁹.

A marcação realizada por Guggenberg e colaboradores, do OCT-HYNIC com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ utilizando EDDA e tricina como coligantes resultou em purezas radioquímicas acima de 90 % comprovadas por ITLC-SG e HPLC de fase reversa, e pH final de marcação entre 6,0 e 7,0. Foram realizados três estudos: experimento em via úmida, estudo de pré-formulação e formulação de reagente liofilizado marcados com 500 a 2000 MBq (13,51 a 54,05 mCi) de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ e incubação por 10 minutos em banho de água em ebulição, obtendo-se um pH final de 6,0 a 7,0. O experimento em via úmida foi realizado com 20 µg de OCT-HYNIC, 10 mg de EDDA, 20 mg de tricina e 20 µg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. O estudo de pré-formulação foi realizado com 20 µg de OCT-HYNIC, 10 a 40 µg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 mg de EDDA, 40 mg de tricina, 50 mg de lactose e 50 mg de manitol. A formulação de reagente liofilizado foi realizado com 10 mg de EDDA, 20 mg de tricina, 50 mg de manitol, 10 a 40 µg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 20 µg de OCT-HYNIC. A formulação em pH 2,0 resultou numa pureza radioquímica de 93,73 %, em pH 4,5 de 94,99 %, em pH 6,5 de 93,34 % e em pH 7,0 de 95,28 %. A variação da massa de cloreto estanoso também foi estudada, resultando numa pureza de $94,68 \pm 0,91$ % para 10 µg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $94,48 \pm 0,89$ % para 20 µg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $92,56 \pm 1,65$ % para 30 µg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $90,28 \pm 2,87$ % para 40 µg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ¹.

OCT-HYNIC, OC-HYNIC (ácido 3-carboxílico octreotídeo-HYNIC) e TATE-HYNIC (octreotídeo[Thr⁸,Tyr³,HYNIC⁰]) marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$, utilizando EDDA e tricina, resultaram numa pureza radioquímica de 98,2 %, 93 % e 98,1 %, respectivamente, analisados por ITLC e HPLC. As massa utilizadas e a seqüência de adição para marcação foram: 15 mg de tricina, 20 µg de OCT-HYNIC/OC-HYNIC/TATE-HYNIC, 40 µg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 mg de EDDA em pH 7,0, 1000 a 3000 MBq (27,02 a 81,08 mCi) de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ e incubação de 10 minutos a 95 °C⁷¹.

Um estudo detalhado da estabilidade do complexo OCT-HYNIC-^{99m}Tc foi realizado, tanto para o complexo obtido na condição padrão de marcação como para o complexo obtido na condição de marcação otimizada para o pH 8,0. Resultados semelhantes foram obtidos nos dois casos, conforme expressos nas TAB. 17 e 18, respectivamente. A avaliação de mais tempos para realização do controle de qualidade entre 30 minutos e 5 horas foi executada devido à observação de alguns resultados de pureza radioquímica de 5 horas serem melhores que 30 minutos, podendo caracterizar a necessidade de tempo superior a 30 minutos para completar a reação com rendimento máximo. Observou-se então haver um pico da pureza radioquímica entre 1,5 e 3 horas.

TABELA 17 – Pureza radioquímica dos estudos de estabilidade na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio-99m obtidos na condição padrão de marcação, para uma mesma marcação*

Espécie radioquímica	% espécie radioquímica									Nº ensaios
	30 min	45 min	1 h	1,5 h	2 h	2,5 h	3 h	4 h	5 h	
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	0,43 ± 0,00	0,81 ± 0,02	1,12 ± 0,02	0,98 ± 0,03	0,94 ± 0,06	1,18 ± 0,01	1,33 ± 0,01	1,60 ± 0,10	1,98 ± 0,06	N= 2
$^{99m}\text{TcO}_4^-$ + coligante- ^{99m}Tc	8,63 ± 0,11	9,24 ± 0,20	9,03 ± 0,03	8,48 ± 0,15	8,37 ± 0,01	8,96 ± 0,78	8,50 ± 0,01	8,67 ± 0,09	8,77 ± 0,21	
coligante- ^{99m}Tc	8,20 ± 0,11	8,44 ± 0,22	7,92 ± 0,05	7,50 ± 0,18	7,43 ± 0,06	7,78 ± 0,78	7,17 ± 0,00	7,07 ± 0,19	6,79 ± 0,27	
$^{99m}\text{TcO}_2$	0,70 ± 0,01	1,42 ± 0,15	1,51 ± 0,34	0,52 ± 0,02	0,55 ± 0,08	0,97 ± 0,23	0,65 ± 0,21	0,73 ± 0,00	0,58 ± 0,30	
OCT-HYNIC- ^{99m}Tc	90,68 ± 0,11	89,35 ± 0,05	89,46 ± 0,37	91,01 ± 0,13	91,09 ± 0,07	90,08 ± 0,56	90,86 ± 0,19	90,61 ± 0,09	90,66 ± 0,52	

* 20 µg OCT-HYNIC, 10 mg EDDA, 20 mg tricina, 15 µg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1110 MBq (30 mCi) $^{99m}\text{TcO}_4^-$, tempo de reação de 10 minutos em banho de água em ebulição e pH 6,5,

TABELA 18 – Pureza radioquímica dos estudos de estabilidade na marcação de OCT-HYNIC com tecnécio-99m obtidos após variação de diversos parâmetros de marcação em relação à condição padrão, para uma mesma marcação*

Espécie radioquímica	% espécie radioquímica					Nº ensaios
	30 min	1 h	2 h	3 h	5 h	
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	0,43 ± 0,02	0,94 ± 0,12	0,75 ± 0,01	0,79 ± 0,06	1,38 ± 0,07	N= 2
$^{99m}\text{TcO}_4^-$ + coligante- ^{99m}Tc	9,04 ± 0,30	9,51 ± 0,71	7,90 ± 0,04	7,78 ± 0,10	8,66 ± 0,48	
coligante- ^{99m}Tc	8,62 ± 0,28	8,57 ± 0,83	7,15 ± 0,03	7,00 ± 0,16	7,28 ± 0,55	
$^{99m}\text{TcO}_2$	1,45 ± 0,16	1,55 ± 0,45	1,39 ± 0,13	1,18 ± 0,05	1,65 ± 0,11	
OCT-HYNIC- ^{99m}Tc	89,51 ± 0,14	88,95 ± 0,27	90,71 ± 0,08	91,05 ± 0,05	89,70 ± 0,37	

* 80 µg OCT-HYNIC, 10 mg EDDA, 20 mg tricina, 150 µg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1110 MBq (30 mCi) $^{99m}\text{TcO}_4^-$, tempo de reação de 10 minutos em banho de água em ebulição, pH 8,0

De forma geral, ao se observar os valores de pureza radioquímica de 30 minutos e 5 horas nas diferentes marcações, a porcentagem de coligante- ^{99m}Tc parece diminuir com o tempo e a de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ aumentar. Este fato pode ser explicado pela relativa instabilidade da espécie coligante- ^{99m}Tc , que origina $^{99m}\text{TcO}_4^-$ com o tempo.

5.2 Avaliação de pureza radioquímica HPLC

Nos estudos de variação das condições de marcação utilizou-se o método de cromatografia em camada delgada para avaliação da pureza radioquímica. O método mostrou-se simples e reprodutível e possibilitou a separação das espécies radioquímicas presentes nas preparações, a um custo relativamente baixo.

Entretanto, tornava-se necessário comprovar a capacidade de resolução do método, confrontando com outra técnica cromatográfica de melhor resolução, como a cromatografia líquida de alta eficiência.

A FIG. 36 a seguir mostra os perfis de cromatografia líquida de alta eficiência obtidos, respectivamente, para a mistura de marcação de coligante- ^{99m}Tc e para a mistura de marcação OCT-HYNIC- ^{99m}Tc (na condição padrão de marcação).

FIGURA 36 – Cromatograma de HPLC do A) $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e coligante- ^{99m}Tc (RT do $^{99m}\text{TcO}_4^-$ de $3,25 \pm 0,04$ minutos e RT do coligante- ^{99m}Tc de $4,57 \pm 0,18$ minutos) e B) OCT-HYNIC- ^{99m}Tc (RT do OCT-HYNIC- ^{99m}Tc de 13,17 minutos)

O sistema escolhido possibilitou a separação das espécies radioquímicas presentes na mistura de marcação que apresentaram tempo de retenção distinto correspondendo ao da literatura⁸⁰. Nenhuma outra espécie radioquímica além das já identificadas na CCD foi observada no perfil de HPLC.

5.3 Avaliação da biodistribuição do octreotídeo-HYNIC com ^{99m}Tc

5.3.1 Estudo de biodistribuição do OCT-HYNIC por método invasivo

Nas TAB. 19 e 20 estão, respectivamente, os resultados da biodistribuição pelo método invasivo do radiofármaco OCT-HYNIC- ^{99m}Tc em camundongos *Swiss* normais e *Nude* com tumor AR42J, 1,5 horas e 4 horas após a administração do radiofármaco.

TABELA 19 – Biodistribuição do radiofármaco OCT-HYNIC- ^{99m}Tc em camundongos *Swiss* normais após administração intravenosa (porcentagem da média e desvio padrão da atividade injetada/órgão e atividade injetada/grama de órgão - N= 3 animais para cada intervalo de tempo)

Órgão	Tempo após administração			
	1,5 horas		4 horas	
	% atividade/órgão	% atividade/grama	% atividade/órgão	% atividade/grama
Pulmão	0,89 ± 0,21	3,85 ± 0,75	0,48 ± 0,03	1,76 ± 0,69
Coração	0,03 ± 0,01	0,23 ± 0,05	0,01 ± 0,00	0,07 ± 0,01
Baço	0,03 ± 0,01	0,41 ± 0,08	0,02 ± 0,00	0,21 ± 0,02
Fígado	0,45 ± 0,08	0,32 ± 0,04	0,20 ± 0,01	0,12 ± 0,04
Estômago	1,35 ± 0,14	3,94 ± 0,35	0,76 ± 0,20	2,03 ± 0,61
Músculo	0,23 ± 0,06	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,001 ± 0,00
Rins	3,69 ± 0,75	8,91 ± 1,60	1,11 ± 0,08	2,89 ± 0,04
Int. delg.	2,70 ± 0,44	1,81 ± 0,11	0,87 ± 0,16	0,73 ± 0,03
Int. grosso	0,87 ± 0,02	1,02 ± 0,10	2,10 ± 0,39	2,16 ± 0,88
Adrenal	0,03 ± 0,01	-	0,01 ± 0,00	-
Pâncreas	0,83 ± 0,25	1,46 ± 1,01	0,27 ± 0,06	0,49 ± 0,12
Tireóide	0,01 ± 0,00	-	0,01 ± 0,00	-
Sangue	0,12 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0,70 ± 0,07	0,29 ± 0,03

TABELA 20 – Biodistribuição do radiofármaco OCT-HYNIC-^{99m}Tc em camundongos *Nude* após administração intravenosa (porcentagem da média e desvio padrão da atividade injetada/órgão e atividade injetada/grama de órgão - N= 4 animais para cada intervalo de tempo)

Órgão	Tempo após administração			
	1,5 horas		4 horas	
	% atividade/órgão	% atividade/grama	% atividade/órgão	% atividade/grama
Pulmão	0,40 ± 0,11	2,57 ± 0,37	0,24 ± 0,04	2,37 ± 1,27
Coração	0,03 ± 0,01	0,27 ± 0,05	0,01 ± 0,00	0,12 ± 0,04
Baço	0,09 ± 0,03	1,39 ± 0,82	0,04 ± 0,01	0,35 ± 0,28
Fígado	0,74 ± 0,18	0,78 ± 0,22	0,37 ± 0,04	0,83 ± 0,99
Estômago	0,40 ± 0,08	1,95 ± 0,49	0,24 ± 0,03	1,66 ± 0,80
Músculo	0,14 ± 0,22	0,02 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,001 ± 0,00
Rins	2,20 ± 0,65	5,69 ± 3,13	1,03 ± 0,06	2,58 ± 1,18
Int. delg.	1,06 ± 0,44	0,85 ± 0,35	0,69 ± 0,24	0,82 ± 0,54
Int. grosso	1,84 ± 0,34	3,51 ± 1,46	1,04 ± 0,32	1,15 ± 0,48
Adrenal	0,02 ± 0,01	-	0,01 ± 0,00	-
Pâncreas	0,43 ± 0,13	1,43 ± 0,75	0,13 ± 0,03	0,19 ± 0,10
Tireóide	0,04 ± 0,01	-	0,01 ± 0,01	-
Cérebro	0,01 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Tumor	0,37 ± 0,12	0,59 ± 0,26	0,14 ± 0,05	0,13 ± 0,06
Sangue	0,80 ± 0,15	0,49 ± 0,05	0,32 ± 0,11	0,20 ± 0,08

Os resultados dos estudos de biodistribuição mostraram o rápido clareamento sanguíneo do peptídeo radiomarcado. A captação em todos os órgãos foi baixa, com exceção dos rins, que representa a via preferencial de eliminação de peptídeos pequenos. A tireóide mostrou uma baixa captação, demonstrando estabilidade do composto *in vivo* e baixa concentração de ^{99m}TcO₄⁻. Tanto o pâncreas como o estômago possuem receptores para somatostatina apresentando assim certa afinidade. A baixa captação do composto em órgãos como fígado, estômago (órgão que mostra a estabilidade do composto radiomarcado) e intestinos sugerem uma baixa captação abdominal, favorável

para diagnóstico de tumores neuroendócrinos, comumente expressos na região. O composto radiomarcado não atravessa a barreira hematoencefálica não sendo possível visualizar captação cerebral.

O gráfico a seguir (FIG. 37) mostra que os valores de captação foram semelhantes quando se compara a biodistribuição dos principais órgãos nas espécies *Swiss* e *Nude*.

FIGURA 37 – Gráfico comparativo da porcentagem da atividade injetada/grama de órgão da biodistribuição do radiofármaco OCT-HYNIC-^{99m}Tc em camundongos *Swiss* e *Nude*

A captação tumoral do composto, aparentemente baixa quando considerada em termos percentuais, mostra-se significativa quando avaliada em termos de relação tumor:órgão não específico (TAB. 21). A relação tumor:músculo é extremamente favorável, sugerindo que o tumor poderá ser identificado através da imagem cintilográfica, contrastando sobre o tecido não alvo. A razão tumor:sangue é maior que 1,0 para 1,5 horas após a administração, reflexo do rápido clareamento sanguíneo do composto, sendo também favorável para a aquisição de imagens cintilográficas uma vez que a radiação de fundo atribuída à circulação do composto também deverá ser baixa.

TABELA 21 – Razão de atividade/grama para tumor:músculo e tumor:sangue (mL) em camundongos *Nude*

Tumor:órgão	1,5 horas	4 horas
Tumor:músculo	0,59/0,02= 29,50	0,13/0,01= 13,00
Tumor:sangue	0,59/0,49= 1,20	0,13/0,20= 0,65

Os estudos de biodistribuição encontrados na literatura, realizados em ratos *Wistar* machos para OCT-HYNIC/EDDA/tricina-^{99m}Tc nos intervalos entre 5 minutos e 48 horas, mostrou um rápido clareamento sanguíneo após administração intravenosa. A alta atividade nos rins logo após a administração foi seguida pelo declínio gradual na captação renal. A excreção urinária é o principal caminho de eliminação, sendo eliminada em sua maioria dentro de duas horas⁸¹. Os estudos em ratos são semelhantes ao dos camundongos *Swiss* realizados neste trabalho, com rápido clareamento sanguíneo e excreção preferencialmente urinária.

Camundongos *Nude* com célula tumoral pancreática de rato AR42J foram usados nos estudos de captação tumoral *in vivo* do OCT-HYNIC-^{99m}Tc para os coligantes EDDA e tricina. Após 4 horas da administração, os animais foram sacrificados, os órgãos retirados e contados. A captação tumoral foi determinada para ambos os coligantes (9,65 ± 2,16 % atividade/grama para EDDA e 9,58 ± 0,90 % atividade/grama para tricina). Níveis de atividade residual alta em todos os órgãos foram encontrados para o coligante tricina, especialmente no sangue (1,14 ± 0,10 % atividade/grama), músculo (0,92 ± 0,14 % atividade/grama) e fígado (2,08 ± 0,40 % atividade/grama). As razões mais baixas de tumor:órgão foram encontradas para o coligante tricina⁷¹. A atividade captada em todos os órgãos, estudada por Storch e colaboradores, foi maior que a obtida nos ensaios realizados neste trabalho, exceto o tumor (0,13 ± 0,06 % atividade/grama).

Ratos *Lewis* com célula tumoral pancreática de rato AR42J foram usados nos estudos de biodistribuição do OCT-HYNIC-^{99m}Tc na presença dos coligantes EDDA e tricina na mesma formulação. Após 4 horas, os ratos foram sacrificados, os órgãos de interesse retirados, lavados, secos, pesados e a radioatividade medida em contador gama. O radiopeptídeo mostrou um rápido

clareamento sanguíneo ($0,05 \pm 0,03$ % atividade/grama) e também um rápido clareamento por todos os tecidos SSTR negativos, predominantemente via rins e sistema urinário. O composto mostrou alta captação de radioatividade em órgãos receptor-positivo como pâncreas ($5,14 \pm 1,46$ % atividade/grama), adrenais ($3,58 \pm 0,61$ % atividade/grama) e estômago ($1,20 \pm 0,15$ % atividade/grama). Neste caso, Storch e colaboradores obtiveram uma atividade menor em todos os órgãos comparado aos ensaios realizados neste trabalho, exceto o tumor ($3,85 \pm 1$ % atividade/grama)⁷¹.

A FIG. 38 a seguir mostra o resultado do estudo histológico realizado em amostra de tumor obtido em camundongos *Nude* a partir de implantação de células AR42J. A lâmina com aumento de 50 x mostrou uma 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, padrão histológico característico de tumor. A lâmina com aumento de 400 x mostrou uma neoplasia indiferenciada composta por células predominantemente epitelióides, coesas, com núcleos grandes, pleomórficos, com nucléolos evidentes e citoplasma amplo, eosinofílico.

FIGURA 38 – Análise histológica de amostra de tumor de células AR42J: A) lâmina com aumento de 50 x e B) lâmina com aumento de 400 x. Lâminas e fotos elaboradas no Laboratório de Patologia do HC-FMUSP

5.3.2 Estudo de biodistribuição do OCT-HYNIC por método não invasivo

Para confirmar a capacidade de identificação cintilográfica da massa tumoral, foram realizados estudos não invasivos com administração do peptídeo marcado em camundongos *Nude* com tumor de células AR42J.

As FIG. 39 e 40 mostram a biodistribuição do radiofármaco em camundongos *Nude* 2,5 horas e 3 horas após administração, respectivamente.

Para aquisição das imagens foi utilizado o programa Console TH 22 e para o cálculo do ROI (*Region Of Interest*), o programa de processamento de imagens Mediso InterView XP®. Para se calcular o ROI, considerou-se toda a atividade no campo como 100 % e delimitou-se a área de interesse, neste caso, o tumor, obtendo-se assim o cálculo semi-quantitativo da atividade tumoral.

FIGURA 39 – Imagens planares de camundongos *Nude* com tumor (AR42J) 2,5 horas após administração de OCT-HYNIC-^{99m}Tc, adquiridas em estudo estático utilizando colimador LEHR, matriz 256 x 256 x 16, com 300 mil contagens. O círculo vermelho mostra a delimitação do tumor em camundongos *Nude*

A imagem obtida na FIG. 39 representa uma imagem de corpo inteiro com alta captação renal e alta atividade na bexiga devido à excreção do composto marcado. Devido à alta atividade no sistema urinário, o cálculo da captação tumoral foi prejudicado.

Entretanto, quando se bloqueia a radiação proveniente destes órgãos com uma blindagem de chumbo, o tumor pode ser identificado (FIG. 40). A porcentagem de 22,77 % do tumor delimitado pelo ROI e identificado com o círculo foi calculada considerando-se a área total da imagem adquirida como sendo 100 %.

FIGURA 40 – Imagens planares de camundongos *Nude* com tumor (AR42J) 3 horas após administração de OCT-HYNIC-^{99m}Tc, adquiridas em estudo estático utilizando colimador LEHR, matriz 256 x 256 x 16, com 300 mil contagens. O círculo vermelho mostra a delimitação do tumor em camundongos *Nude* com captação de 22,77 %

Os estudos cintilográficos atestaram a capacidade do composto OCT-HYNIC-^{99m}Tc em identificar o tumor, mesmo nos estudos mais tardios.

Imagens cintilográficas em gama câmara de tumor de célula AR42J também foram obtidos em ratos *Lewis*, 1 hora após a administração de OCT-HYNIC-^{99m}Tc utilizando-se EDDA e tricina como coligantes. Também foi observada imagem do pâncreas. Após 4 horas devido ao clareamento, a razão tumor:órgão normal melhorou⁷².

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados deste estudo pode-se concluir que:

1. O composto OCT-HYNIC-^{99m}Tc foi obtido com alta pureza radioquímica (superior a 90 %) e estabilidade de até 5 horas, utilizando-se procedimento descrito na literatura (Guggenberg e colaboradores^{1, 16}, Gabriel e colaboradores⁵⁴, e Decristoforo e colaboradores⁷⁰ - condição padrão);
2. A formulação proposta na condição padrão possibilitou marcação com atividade de até 1110 MBq (30 mCi), podendo ser utilizada apenas para um paciente;
3. Nos estudos de variação dos parâmetros de marcação, obteve-se uma nova condição de marcação (80 µg OCT-HYNIC, 10 mg EDDA, 20 mg tricina, 150 µg SnCl₂.2H₂O, pH 8,0), combinando o aumento da massa do peptídeo e do cloreto estanoso em pH alcalino, que possibilitou a marcação com atividade de até 3700 MBq (100 mCi), com pureza radioquímica e estabilidade similares às obtidas na condição padrão de marcação. Esta nova formulação representa uma alternativa para atendimento de mais de um paciente para a mesma marcação bem como para o melhor aproveitamento da atividade empregada em função do tempo após a marcação. Representa ainda a possibilidade de obtenção de uma formulação para liofilização composta de massa de cloreto estanoso maior. Acredita-se que tal formulação possa resultar em um reagente liofilizado com estabilidade compatível com a comercialização do produto.
4. Os resultados dos estudos de variação dos parâmetros de marcação apresentados neste trabalho serão úteis para elaboração de um reagente liofilizado de OCT-HYNIC para marcação com tecnécio-99m, uma vez que vários limites (massa de agente redutor, massa dos coligantes, massa do peptídeo, tempo de reação, temperatura, pH e atividade) foram reconhecidos.
5. A metodologia utilizada no controle de qualidade por CCD para determinação da pureza radioquímica da marcação condiz com um custo acessível e a facilidade de manipulação, tornando este método viável.
6. Os estudos de biodistribuição demonstraram o potencial do complexo OCT-HYNIC-^{99m}Tc na identificação de tumores que expressam receptores para

somatostatina em substituição do composto octreotídeo-DTPA-¹¹¹In, estimulando trabalhos futuros para desenvolvimento do reagente liofilizado que possibilitará a utilização rotineira do peptídeo marcado com tecnécio-99m.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 GUGGENBERG, E. von; 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. **J. Pharm. Sci.**, v. 93, p. 2497-2506, 2004.
- 2 GANDOMKAR, M.; NAJAFI, R.; SHAFIEI M.; MAZIDI, M.; EBRAHIMI, S.E.S. Preclinical evaluation of [^{99m}Tc /EDDA/tricine/HYNIC⁰,1-Na¹³, Thr⁸]-octreotide as a new analogue in the detection of somatostatin-receptor-positive tumors. **Nucl. Med. Biol.**, v. 34, p. 651-657, 2007.
- 3 KOSOWICZ, J.; MIKOLAJCZAK, R.; CZEPCZYŃSKI, R.; ZIEMNICKA, K.; GRZYCZYŃSKA M.; SOWIŃSKI, J. Two peptide receptor ligands ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-Tyr³-octreotide and ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-D-Glu-octagastrin for scintigraphy of medullary thyroid carcinoma. **Cancer Bioth. Radiopharm.**, v. 22, p. 613-628, 2007.
- 4 WEINER, R.E.; THAKUR, M.L. Radiolabeled peptides in the diagnosis and therapy of oncological diseases. **Appl. Radiat. Isot.**, v. 57, p. 749-763, 2002.
- 5 RHODES, B.A.; HLADIK III, W.B.; NORENBURG, J.P. Clinical radiopharmacy: principles and practices. **Sem. Nucl. Med.**, v. 26, p. 77-84, 1996.
- 6 LIU, S.; EDWARDS, D.S. ^{99m}Tc -labeled small peptides as diagnostic radiopharmaceuticals. **Chem. Rev.**, v. 99, p. 2235-2268, 1999.
- 7 PRESTO, S.V. **Manual de buenas practicas radiofarmaceuticas**. 1.ed. Viena: AIEA, 1998.
- 8 WEINER, R.E.; Thakur, M.L. Metallic radionuclides: applications in diagnostic and therapeutic nuclear medicine. **Radioch. Acta**, v. 70/71, p. 273-287, 1995.
- 9 GRAHAM, M.M.; METTER, D.F. Evolution of nuclear medicine training: past, present, and future. **J. Nucl. Med.**, v. 48, p. 257-268, 2007.
- 10 STÖKLIN, G.; QUAIM, S.M.; RÖSCH, F. The impact of radioactivity on medicine. **Radioch. Acta**, v. 70/71, p. 249-272, 1995.
- 11 ANNOUNCEMENT FROM HEADQUARTERS. MANHATTAN PROJECT, **Availability of radioactive isotopes**. Washington, D.C. Science, v. 103, p. 697-705, 1946.

- 12 WAHL, R.L.; Progress in nuclear medicine imaging of cancers. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 25, p. 341-360, 1998.
- 13 STROOBANTS, S. Imaging: conventional techniques or PET scanning? **Eur. J. Cancer Suppl.**, v. 1, p. 211-220, 2003.
- 14 CABREJAS, M.L. **Tomografía en Medicina Nuclear**. El Comité de Instrumentación y Garantía de Calidad del ALASBIMN. Argentina, p. 177-178, 1999.
- 15 WIKIPÉDIA: banco de dados. Disponível em:
<http://en.wikipedia.org/wiki/High_performance_liquid_chromatography>.
Acesso em: 08 ago. 2008.
- 16 GUGGENBERG, E. von; SARG, B.; LINDNER, H.; ALAFORT, L.M.; MATHER, S.J.; MONCAYO, R.; DECRISTOFORO, C. Preparation via coligand 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.
- 17 OBENAU, E.R.; CRUDO, J.L.; EDREIRA, M.M.; CASTIGLIA, S.G. Analogos de somatostatina marcados con ^{99m}Tc . **Rev. Med. Nucl. Alasbimn J.**, Santiago, Jan. 2003. Disponível em:
<<http://www.alasbimnjournal.cl/19/obenau.html>>. Acesso em: 22 set. 2008.
- 18 NEVES, M.; LAMBRECHT, R.M. Radionuclide production for therapy radiopharmaceuticals. **Appl. Radiat. Isot.**, v. 57, p. 657-664, 2002.
- 19 MOLINSKI, V.J. A review of ^{99m}Tc generator technology. **Int. Appl. Radiat. Isot.**, v. 33, p. 811-819, 1982.
- 20 QUAGLIANO, J.V.; VALLARINO, L.M. **As famílias boro-alumínio e carbono-silício**: elementos dos grupos III-B e IV-B. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1979.
- 21 SAMPSON, C.B. **Textbook of radiopharmacy**: theory and practice. 2. ed., v. 3, Luxemburgo: Jordon and Breach Publishers, 1994.
- 22 LO, J.M.; LIN, K.S. Chemical characteristics of ^{99m}Tc -labeled amine oximes. **Appl. Radiat. Isot.**, v. 44, p. 1139-1146, 1993.
- 23 JOVANOVIĆ, V. Standardization of quality control methods for ^{99m}Tc radiopharmaceuticals. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v. 117, p. 23-34, 1987.

- 24 BERGER, R. Radical scavengers and the stability of ^{99m}Tc -radiopharmaceuticals. **Int. J. Appl. Radiat. Isot.**, v. 33, p. 1341-1344, 1982.
- 25 HANDELAND, A.; LINDEGAARD, M.W.; HEGGLI, D.E. Biodistribution of anionic separated MDP complexes from different MDP preparation. **Eur. J. Nucl. Med.**, v. 15, p. 609-611, 1989.
- 26 BANERJEE, S.; PILLAI, M.R.A.; RAMAMOORTHY, N. Evolution of Tc-99m in diagnostic radiopharmaceuticals. **Sem. Nucl. Med.**, v. 4, p. 260-277, 2001.
- 27 SUBRAMANIAN, G.; MCAFEE, J.G.; BLAIR, R.J.; KALLFELZ, F.A.; THOMAS, F.D. Technetium-99m-methylene diphosphonate – A superior agent for skeletal imaging: comparison with other technetium complexes. **J. Nucl. Med.**, v.16, p. 744-755, 1975.
- 28 JOVANOVIĆ, V.; MAKŠIN, T.; RASTOVAC, M.; BZENIĆ, J. **Comparative** quality control of ^{99m}Tc -pyrophosphate and ^{99m}Tc -diphosphonate radiopharmaceuticals. **Eur. J. Nucl. Med.**, v. 8, p. 179-182, 1983.
- 29 VOLKERT, W.A.; EDWARDS, B.; SIMON, J.; WILSON, D.A.; MCKENZIE, E.H.; OBERLE, P.; HOLMES, R.A. In vivo skeletal localization properties of ^{99m}Tc complexes of large phosphonate ligands. **Nucl. Med. Biol.**, v. 13, p. 31-37, 1986.
- 30 CALLERY, P.S.; FAITH, W.C.; LOBERG, M.D.; FIELDS, A.T.; HARVEY, E.B.; COOPER, M.D. Tissue distribution of technetium-99m and C-14-labeled N-(2, 6-dimethylphenylcarbamoymethyl)iminodiacetic acid. **J. Med. Chem.**, v. 19, p. 962-964, 1976.
- 31 WYK, A.J. van; FOURIE, P.J.; ZYL, W.H. van; LÖTTER, M.G.; MINNAAR, P.C. Synthesis of five new ^{99m}Tc -HIDA isomers and comparison with ^{99m}Tc -HIDA. **Eur. J. Nucl. Med.**, v.4, p. 445-448, 1979.
- 32 ARGUELLES, M.; CANELLAS, C.O. Relación entre la estructura química y el comportamiento biológico de quelatos del ^{99m}Tc . Uso del ácido aminodiacético. **Rev. Esp. Med. Nucl.**, v. 10, p. 101-106, 1991.
- 33 TROUTNER, D.E.; SIMON, J.; KETRING, A.R.; VOLKERT, W.; HOLMES, R.A. Complexing of Tc-99m with cyclam: concise communication. **J. Nucl. Med.**, v. 21, p. 443-448, 1980.
- 34 TROUTNER, D.E.; VOLKERT, W.; HOFFMAN, T.J.; HOLMES, R.A. A neutral lipophilic complex of ^{99m}Tc with a multidentate amine oxime. **Int. Appl. Radiat. Isot.**, v. 35, p. 467-470, 1984.

- 35 VOLKERT, W.; MCKENZIE, E.H.; HOFFMAN, T.J.; TROUTNER, D.E.; HOLMES, R.A. The behavior of neutral amine oxime chelates labeled with Tc at tracer level. **Int. J. Nucl. Med. Biol.**, v.11, p. 246-246, 1984.
- 36 JURISSON, S.; SCHLEMPER, E.O.; TROUTNER, D.E.; CANNING, L.R.; NOWOTNIK, D.P.; NEIRINCKX, R.D. Synthesis, characterization, and X-ray structural determinations of technetium(V)-oxo-tetradentate amine oxime complex. **Inorg. Chem.**, v. 25, p. 543-549, 1986.
- 37 NEIRINCKX, R.D.; CANNING, L.R.; PIPER, I.M.; NOWOTNIK, D.P.; PICKETT, R.D.; HOLMES, R.A.; VOLKERT, W.A.; FORSTERS, A.M.; WEISNER, P.S.; MARRIOTT, J.A.; CHAPLIN, S.B. Technetium-99m d,1-HM-PAO: A new radiopharmaceutical form SPECT imaging of regional cerebral blood perfusion. **J. Nucl. Med.**, v. 28, p. 191-202, 1987.
- 38 WALOVITCH, R.C.; HILL, T.C.; GARRITY, S.T.; CHEESMAN, E.H.; BURGESS, B.A.; O'LEARY, D.H.; WATSON, A.D.; GANEY, M.V.; MORGAN, R.A.; WILLIAMS, S.J. Characterization of technetium-99m-LL-ECD for brain perfusion imaging, part 1: pharmacology of technetium-99m ECD in nonhuman primates. **J. Nucl. Chem.**, v. 30, p. 1892-1901, 1989.
- 39 FRITZBERG, A.R.; KASINA, S.; ESHIMA, D.; JOHNSON, D. Synthesis and biological evaluation of technetium-99m MAG3 as a hippuran replacement. **J. Nucl. Med.**, v. 27, p. 111-116, 1986.
- 40 TAYLOR JÚNIOR, A.; ESHIMA, D.; CHRISTIAN, P.E.; WOOTEN, W.W.; HANSEN, L.; MCELVANY, K. Technetium-99m MAG3 kit formulation: preliminary results in normal volunteers and patients with renal failure. **J. Nucl. Med.**, v. 29, p. 616-622, 1988.
- 41 JURISSON, S.S.; LYDON, J.D. Potential technetium small molecule radiopharmaceuticals. **Chem. Rev.**, v. 99, p. 2205-2218, 1999.
- 42 YANG, D.J.; KIM, C.G.; SCHECHTER, N.R.; AZHDARINIA, A.; YU, D.F. ; OH, C.S. ; BRYANT, J.L. ; WON, J.J. ; KIM, E. E. ; PODOLOFF, D.A. Imaging with Tc-99m ECDG targeted at the multifunctional glucose transport system: Feasibility study with rodents. **Radiology**, v. 226, p. 465-473, 2003.
- 43 REUBI, J.C.; MÄCKE, H.R.; KRENNING, E.P. Candidates for peptide receptor radiotherapy today and in the future. **J. Nucl. Med.**, v.46, p. 67-75, 2005.
- 44 REUBI, J.C. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. **Endocrine Reviews**, v. 24, p. 389-427, 2008-09-26.

- 45 GROZINSKY-GLASBERG, S.; GROSSMAN, A.B.; KORBONITS, M. The role of somatostatin analogues in the treatment of neuroendocrine tumours. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.286, p. 238-250, 2008.
- 46 DECRISTOFORO, C.; MATHER, S.J. 99m-technetium-labelled peptide-HYNIC conjugates: effects of lipophilicity and stability on biodistribution. **Nucl. Med. Biol.**, v. 26, p. 389-396, 1999.
- 47 EVERS, B.M; PAREKH, D.; TOWNSEND JUNIOR, M. Somatostatin and analogues in the treatment of cancer: a review. **Ann. Surg.**, v. 213, n. 3, p. 190-198, 1991.
- 48 WANG, Q.; GRAHAM, K.; SCHAUER, T.; FIETZ, T.; MOHAMED, A.; LIU, X.; HOFFEND, J.; HABERKORN, U.; EISENHUT, M.; MIER, W. Pharmacological properties of hydrophilic and lipophilic derivatives of octreotate. **Nucl. Med. Biol.**, v. 31, p. 21-30, 2004.
- 49 OLSEN, J.O.; POZDERAC, R.V.; HINKLE, G.; HILL, T.; O'DORISIO, T.M.; SCHIRMER, W.J.; ELLISON, E.C.; O'DORISIO, M.S. Somatostatin receptor imaging of neuroendocrine tumors with indium-111 pentetreotide (OctreoScan). **Sem. Nucl. Med.**, v. 25, p. 251-261, 1995.
- 50 DU, J.; HILTUNEN, J.; MARQUEZ, M.; NILSSON, S.; HOLMBERG, A.R. Technetium-99m labelling of glycosylated somatostatin-14. **Appl. Radiat. Isot.**, v. 55, p. 181-187, 2001.
- 51 PLACHCIŃSKA, A.; MIKOLAJCZAK, R.; MAECKE, H.R.; MLODKOWSKA, E.; KUNERT-RADEK, J.; MICHALSKI, A.; RZESZUTEK, K.; KOZAK, J.; KUŚMIEREK, J. Clinical usefulness of ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-TOC scintigraphy in oncological diagnostics: a preliminary communication. **Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging**, v. 30, n. 10, p. 1402-1406, 2003.
- 52 BANGARD, M.; BÉHÉ, M.; GUHLKE, S.; OTTE, R.; BENDER, H.; MAECKE, H.R.; BIERSAK, H.J. Detection of somatostatin receptor-positive tumours using the new ^{99m}Tc-tricine-HYNIC-D-Phe¹-Tyr³-octreotide: first results in patients and comparison with ¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹-octreotide. **Eur. J. Nucl. Med.**, v. 27, n. 6, p. 628-637, 2000.
- 53 BÉHÉ, M.; MAECKE, H.R. **New somatostatin analogues labeled with technetium-99m** [abstract]. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 22, p. 791, 1995 *apud* Bangard, Béhé, Guhlke, Otte, Bender, Maecke e Biersak.

- 54 GABRIEL, M.; DECRISTOFORO, C.; DONNEMILLER, E.; ULMER, H.; RYCHLINSKI, C.W.R.; 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. **J. Nucl. Med.**, v. 44, n. 5, p. 708-716, 2003.
- 55 DECRISTOFORO, C.; MATHER, S.J. Technetium somatostatin analogues: effect of labeling methods and peptide sequence. **Eur. J. Nucl. Med.**, v. 26, p. 869-876, 1999.
- 56 VIRGOLINI, I.; TRAUB-WEIDINGER, T., DECRISTOFORO, C. Nuclear medicine in the detection and management of pancreatic islet-cell tumours. **Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 19, n. 2, p. 213-227.
- 57 SOSABOWSKI, J.; MELENDEZ-ALAFORT, L.; MATHER, S. Radiolabelling of peptides for diagnosis and therapy of non-oncological diseases. **Q. J. Nucl. Med.**, v. 47, p. 223-237, 2003.
- 58 RUFFINI, V.; CALCAGNI, M.L.; BAUM, R.P. Imaging of neuroendocrine tumors. **Sem. Nucl. Med.**, v. 36, p. 228-247, 2006.
- 59 DECRISTOFORO, C.; MATHER, S.J. Preparation, ^{99m}Tc -labeling, and in vitro characterization of HYNIC and N_3S modified RC-160 and $[\text{Tyr}^3]\text{octreotide}$. **Bioconjugate Chem.**, v. 10, p. 431-438, 1999.
- 60 HUBALEWSKA-DYDEJCZYK, A.; FRÖSS-BARON, K.; MIKOLAJCZAK, R.; MAECKE, H.R.; HUSZNO, B.; PACH, D.; SOWA-STASZCZAK, A. ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-octreotate scintigraphy, an efficient method for the detection and staging of carcinoid tumours: results of 3 years' experience. **Eur. J. Nucl. Med.**, v. 33, p. 1123-1133, 2006.
- 61 DECRISTOFORO, C.; MELENDEZ-ALAFORT, L.; SOSABOWSKI, J.K.; MATHER, S.J. ^{99m}Tc -HYNIC- $[\text{Tyr}^3]$ -octreotide for imaging somatostatin-receptor-positive tumors: Preclinical evaluation and comparison with ^{111}In -octreotide. **J. Nucl. Med.**, v. 41, p. 1114-1119, 2000.
- 62 LIU, S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 60, p. 1347-1370, 2008.
- 63 RENNEN, H.J.J.M.; BOERMAN, O.C.; KOENDERS, E.B.; OYEN, W.J.G. Labeling proteins with Tc-99m via hydrazinonicotinamide (HYNIC): optimization of the conjugation reaction. **Nucl. Med. Biol.**, v. 27, n. 6, p. 599-604, 2000.

- 64 MELÉNDEZ-ALAFORT, L.; MARÍA RAMÍREZ, F. de; FERRO-FLORES, G.; MURPHY, C.A. de; PEDRAZA-LÓPEZ, M.; HNATOWICH, D.J. Lys and arg in UBI: a specific site for a stable Tc-99m complex? **Nucl. Med. Biol.**, v. 30, p. 605-615, 2003.
- 65 LAHORTE, C.M.M.; VANDERHEYDEN, J.L.; STEINMETZ, N.; WIELE, C. VAN DE; DIERCKX, R.A.; SLEGERS, G. Apoptosis-detecting radioligands: current state of the art and future perspectives. **Eur. J. Nucl. Med Mol. Imaging**, v. 31, p. 887-919, 2004.
- 66 **ANAIS DA REUNIÃO DA SBPC**, 56., Cuiabá, 2004.
- 67 COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1997.
- 68 SILVA, C.P.G.; PEREIRA, N.S. **Manual de protocolos e calidad de radiofarmacos**. 1. ed. Viena:AIEA, 1999.
- 69 GANSBEKE, B. van; JEGHERS, O.; ERMANS, A.M. Comparative study of quality control procedure for ^{99m}Tc radiopharmaceutical. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, v. 92, p. 323-332, 1985.
- 70 DECRISTOFORO, C.; MATHER, S.J.; WITOLD, C.; DONNEMILLER, E.; RICCABONA, G.; MONCAYO, R. ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-TOC: a new ^{99m}Tc -labelled radiopharmaceutical for imaging somatostatin receptor-positive tumours: first clinical results and intra-patient comparison with ^{111}In -labelled octreotide derivatives. **Eur. J. Nucl. Med.**, v. 27, n. 9, p. 1318-1325, 2000.
- 71 STORCH, D.; BÉHÉ, M.; WALTER, M.A.; CHEN, J.; POWELL, P.; MIKOLAJCZAK, R.; MÄECKE, H.R. Evaluation of [^{99m}Tc /EDDA/HYNIC⁰]octreotide derivatives compared with [^{111}In -DOTA⁰,Tyr³,Thr⁸]octreotide and [^{111}In -DTPA⁰]octreotide: does tumor or pancreas uptake correlate with the rate of internalization? **J. Nucl. Med.**, v. 46, p. 1561-1569, 2005.
- 72 COLTURATO, M. T. **Otimização das condições de marcação do cloridrato de N-isopropil-p-iodoanfetamina (IMP) com radioiodo. Estudos de distribuição biológica**. 2000. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- 73 MELO, I. B. **Preparo do reagente liofilizado HYNIC-[Tyr3]-octreotato e estudo de marcação com tecnécio-99m**. 2008. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

- 74 DECRISTOFORO, C.; FAINTUCH-LINKOWSKI, B.; REY, A.; GUGGENBERG, E. von; RUPPRICH, M.; HERNANDEZ-GONZALES, I.; RODRIGO, T.; HAUBNER, R. [^{99m}Tc]HYNIC-RGD for imaging integrin $\alpha_v\beta_3$ expression. **Nucl. Med. Biol.**, v. 33, p. 945-952, 2006.
- 75 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. **Nucl. Med. Biol.**, v. 29, p. 107-113, 2002.
- 76 FAINTUCH, B.L.; TEODORO, R.; DUATTI, A.; MURAMOTO, E.; FAINTUCH, S.; SMITH, C.J. Radiolabeled bombesin analogs for prostate cancer diagnosis: preclinical studies. **Nucl. Med. Biol.**, v. 35, p. 401-411, 2008.
- 77 BANGARD, M.; BÉHÉ, M.; OTTE, R.; BENDER, H. ; MAECKE, H.R. ; BIRSACK, H.J. Detection of somatostatin receptor-positive tumours using the new ^{99m}Tc -tricine-HYNIC-D-Phe¹-Tyr³-octreotide: first results in patients and comparison with ^{111}In -DTPA-D-Phe¹-octreotide. **Eur. J. Nucl. Med.**, v. 27, p. 628-637, 2000.
- 78 GABRIEL, M.; DECRISTOFORO, C.; DONNEMILLER, E.; ULMER, H.; RYCHLINSKI, 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. **J. Nucl. Med.**, v. 44, p. 708-716, 2003.
- 79 PLACHCIŃSKA, A.; MIKOLAJCZAK, R.; MAECKE, H.R.; MLODKOWSKA, E.; KUNERT-RADEK, J.; MICHALSKI, A.; RZESZUTEK, K.; KOZAK, J.; KUŚMIEREK, J. Clinical usefulness of ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-TOC scintigraphy in oncological diagnosis: a preliminary communication. **Eur. J. Nucl. Med.**, v. 30, 1402-1406, 2003.
- 80 GUGGENBERG, E. Von; PENZ, B.; KEMMLER, G.; VIRGOLINI, I.; DECRISTOFORO, C. Comparison of different methods for radiochemical purity testing of [^{99m}Tc -EDDA-HYNIC-D-Phe¹,Tyr³]-octreotide. **Appl. Radiat. Isot.**, v. 64, p. 194-200, 2006.
- 81 KOPECKY, M.; SEMECKY, V.; TREJTAR, F.; LAZNICEK, M.; LAZNICKOVA, A.; NACHTIGAL, P.; DECRISTOFORO, C.; MATHER, S.J.; MAECKE, H.R. Analysis of accumulation of ^{99m}Tc -octreotide and ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-Tyr³-octreotide in the rat kidneys. **Nucl. Med. Biol.**, v. 31, p. 231-239, 2004.