INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**DESENVOLVIMENTO DE CONJUGADOS DE DEXTRAN MANOSE
RADIOMARCADOS PARA DETECÇÃO DE LINFONODO SENTINELA**

EUTIMIO GUSTAVO FERNÁNDEZ NÚÑEZ

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau
de Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Aplicações.**

Orientador:

Dra. Bluma Linkowski Faintuch

SÃO PAULO

2011

DEDICATÓRIA

À minha amada esposa, Relma

Aos meus avôs

Aos meus pais e irmã

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, à minha orientadora Dra. Bluma Linkowski Faintuch por ter me aberto as portas da radiofarmácia e ter acreditado em mim sem eu merecer essa grande oportunidade pessoal e profissional.

À Comissão Nacional da Energia Nuclear e ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento por ter concedido apoio financeiro (bolsa de doutorado), permitindo dedicar-me plenamente às atividades de pesquisa.

À Agência Internacional de Energia Atômica, através de projeto coordenado ter fornecido as moléculas deste trabalho experimental.

Aos colegas de laboratório, Dr. Rodrigo Teodoro, Danielle Pereira Wiecek e Erica Aparecida de Oliveira pela grande ajuda recebida durante as diferentes etapas do meu trabalho de tese.

A todos os profissionais, técnicos e bolsistas das áreas de pesquisa e controle da qualidade da Diretoria de Radiofarmácia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, pela ajuda oferecida durante todo o transcurso das atividades experimentais. Menção especial merece o Licenciado em Farmácia, Natanael Gomes da Silva, pela valiosa ajuda na aquisição e processamento das imagens cintilográficas.

Aos membros do departamento de ensino do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Fernando Moreira, Gislene Madeira, Magali Barbieri Silva, Calil Mohamed Farra Filho, Maria do Rosário T. Ferreira e Romério Lourenço Barbosa pelo apoio e amizade ao longo de todas as atividades docentes.

Aos meus antigos orientadores Dr. Rodolfo Valdés Véliz e MSc. Oscar Pérez Fernández por terem me preparado profissionalmente para esta etapa da minha formação acadêmica.

À minha sogra, Francisca Maria Sarmiento de Oliveira e aos meus cunhados: Alda, Álvaro e Ângela por ter propiciado o ambiente necessário para a redação deste documento.

EPÍGRAFE

"A raça humana não pode prosperar enquanto não aprender que há tanta dignidade em cultivar campos quanto em escrever um poema. "

(Booker T. Washington)

DESENVOLVIMENTO DE CONJUGADOS DE DEXTRAN MANOSE RADIOMARCADOS PARA DETECÇÃO DE LINFONODO SENTINELA

Eutimio Gustavo Fernández Núñez

RESUMO

O diagnóstico precoce de tumores e metástase constitui atualmente o elemento de maior impacto dentro das políticas de saúde públicas contra o câncer. No câncer de mama e melanoma, a técnica de biópsia de linfonodo sentinela, para o diagnóstico de metástase, tem sido muito utilizada evitando a dissecação total dos nodos da região anatômica afetada, e permitindo definir com precisão o procedimento terapêutico a utilizar. O objetivo principal deste trabalho centrou-se no desenvolvimento de conjugados radiomarcados de dextran-manose para diagnóstico, utilizando o núcleo de tecnécio altamente estável, $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$. A cisteína, ligante tridentado, foi incorporada na estrutura dos conjugados, como agente quelante do Tecnécio-99m. As condições de marcação definidas para os produtos avaliados garantiram altos valores de pureza radioquímica (>90%) e atividade específica (>59,9 MBq/nmol) assim como uma alta estabilidade “*in vitro*”. Os conjugados de dextran-cisteína-manose demonstraram uma captação superior (4 vezes maior) nos nodos linfáticos em relação aos homólogos que não possuíam manose na estrutura. O conjugado de dextran-cisteína-manose de 30 kDa radiomarcado (^{99m}Tc -DCM2) foi o traçador com melhor desempenho biológico entre os avaliados à diferentes atividades injetadas. Demonstrou-se que concentrações superiores a 1 μM favorecem a retenção do produto nos nodos linfáticos. As comparações com radiofármacos já utilizados no Brasil (Dextran-500 e Fitato) para detecção de linfonodo sentinela evidenciaram a superioridade do ^{99m}Tc -DCM2.

DEVELOPMENT OF RADIOLABLED MANNOSE-DEXTRAN CONJUGATES FOR SENTINEL LYMPH NODE DETECTION

Eutimio Gustavo Fernández Núñez

ABSTRACT

Early diagnosis of tumors and metastasis is the current cornerstone in public health policies directed towards the fights against cancer. In breast cancer and melanoma, the sentinel lymph node biopsy has been widely used for diagnoses of metastasis. The minor impact in patient of this technique compared with total nodes dissection and the accurate definition of therapeutic strategies have powered its spreading. The aim of this work was the development of radiolabeled dextran-mannose conjugates for diagnosis using the stable technetium core $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$. Cysteine, a trident ligand, was attached to the conjugates backbone, as a chelate for ^{99m}Tc labeling. Radiolabeling conditions established for all products considered in this study showed high radiochemical purities ($> 90\%$) and specific activities ($>59,9 \text{ MBq/nmol}$) as well and high stability obtained through “*in vitro*” tests. The lymphatic node uptake increased significantly (4-folds) when mannose units were added to the conjugates compared with those without this monosaccharide. The radiolabeled cysteine-mannose-dextran conjugate with 30 kDa (^{99m}Tc -DCM2) showed the best performance at different injected activities among the studied tracers. Concentrations of this radiocomplex higher than $1 \mu\text{M}$ demonstrated an improvement of lymph node uptakes. Comparisons of ^{99m}Tc -DCM2 performance with commercial radiopharmaceuticals in Brazil market for lymph node detection showed its upper profile.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 Câncer	19
3.1.1 Definição, classificação e estatísticas	19
3.1.2 Desenvolvimento de tumores epiteliais	21
3.2 Metástases	22
3.3 Aspectos fisiológicos e anatômicos do sistema linfático	25
3.3.1 Funções e componentes principais	25
3.3.2 Nodos linfáticos	26
3.4 Linfonodo sentinela	27
3.5 Estratégias estabelecidas para o estadiamento do LNS	29
3.6 Colóides de ^{99m}Tc para a detecção de LNS	30
3.7 Novos radiotraçadores para a detecção de LNS	32
3.7.1 Lipossomas	33
3.7.2 Nanopartículas com unidades de manose	34
3.7.2.1 Receptor de manose	34
3.7.2.2 Radiotraçadores	35
3.8 Técnicas de marcação de biomoléculas com ^{99m}Tc	38
3.8.1 Classificação dos radiofármacos	38
3.8.2 Sistema de marcação $[\text{TcO}(\text{N}_x\text{S}_{4-x})]$	40
3.8.3 Sistema de marcação $[\text{TcN}]^{2+}$	41
3.8.4 Sistema de marcação HYNIC	41
3.8.5 Sistema de marcação $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{O}_2\text{H})_3(\text{CO})_3]^+$	42
3.9 Considerações finais	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 Equipamentos	44
4.2 Materiais	45
4.3 Reagentes	45
4.4 Animais	47
4.5 Métodos	47
4.5.1 Preparação do precursor $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$	47
4.5.2 Estratégia de otimização para a marcação do DC-1 a partir do $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$	48

4.5.2.1 Estudo preliminar da razão massa do DC-1 e a atividade do $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$	48
4.5.2.2 Otimização do tempo e temperatura da radiomarcagem do conjugado DC-1	49
4.5.2.3 Otimização da atividade específica. Estudo da razão quantidade do DC-1 e a atividade do $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$	49
4.5.3 Radiomarcagem dos conjugados DC-2, DCM-1, DCM-2	49
4.5.4 Avaliação radioquímica dos conjugados de dextran marcados com ^{99m}Tc	50
4.5.4.1 Pureza radioquímica por combinação das cromatografias em camada delgada e papel	50
4.5.4.2 Pureza radioquímica através da cromatografia de exclusão por tamanho	51
4.5.4.3 Pureza radioquímica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	51
4.5.5 Cálculo da atividade específica	51
4.5.6 Estabilidade radioquímica dos radioconjugados de dextran	52
4.5.7 Estudos <i>in vitro</i> de transquelatação frente à cisteína e à histidina	52
4.5.8 Determinação do coeficiente de partição dos radioconjugados	52
4.5.9 Estudos biológicos	53
4.5.9.1 Avaliação do efeito da massa molecular e a presença de manose no desempenho biológico dos radioconjugados de dextran-cisteína	54
4.5.9.2 Biodistribuição dos radioconjugados ^{99m}Tc -DCM-1 e ^{99m}Tc -DCM-2 utilizando uma dose menor	54
4.5.9.3 Impacto da pureza radioquímica do produto ^{99m}Tc -DCM-2 na biodistribuição	54
4.5.9.4 Determinação do efeito da dose e volume de injeção no desempenho do ^{99m}Tc -DCM-2	55
4.5.10 Desempenho dos radiotraçadores para LNS estabelecidos na medicina nuclear brasileira para efeitos de comparação	55
4.5.10.1 Radiomarcagem e controle radioquímico do produto Dextran-500	55
4.5.10.2 Radiomarcagem e controle radioquímico do produto Fitato coloidal	55
4.5.10.3 Avaliação biológica	56
4.5.11 Estudos de imagem	56
4.5.12 Análises Estatísticas	56
5 RESULTADOS	58
5.1 Preparação do precursor $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$	58
5.2 Estudo preliminar do efeito da razão massa do DC-1 e a atividade do $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$	59
5.3 Otimização do tempo e a temperatura da radiomarcagem do conjugado DC-1	59
5.4 Otimização da atividade específica. Estudo do efeito da razão quantidade do DC-1 e a atividade do $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$	62
5.5 Radiomarcagem dos conjugados DC-2, DCM-1, DCM-2	64
5.6 Estabilidade radioquímica dos radioconjugados de dextran	66

5.7 Estudos <i>in vitro</i> de transquelação frente à cisteína e à histidina	67
5.8 Determinação do coeficiente de partição dos radioconjugados	67
5.9 Avaliação do efeito da massa molecular e a presença de manose no desempenho biológico dos radioconjugados de dextran-cisteína	68
5.10 Biodistribuição dos radioconjugados ^{99m}Tc -DCM-1 e ^{99m}Tc - DCM-2 utilizando uma dose menor	71
5.11 Impacto da pureza radioquímica do produto ^{99m}Tc - DCM-2 na biodistribuição.....	74
5.12 Determinação do efeito da dose e volume de injeção no desempenho do ^{99m}Tc -DCM-2.....	75
5.13 Desempenho dos radiotraçadores para LNS estabelecidos na medicina nuclear brasileira	79
6 DISCUSSÃO	81
6.1 Preparação do precursor $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$	83
6.2 Estratégia de otimização para a marcação do DC-1 a partir do $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$.	84
6.2.1 Estudo preliminar do efeito da razão massa do DC-1 e a atividade do $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$	85
6.2.2 Otimização do tempo e da temperatura da radiomarcagem do conjugado DC-1	85
6.2.3 Otimização da atividade específica. Estudo da razão quantidade do DC-1 e a atividade do $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$	86
6.3 Radiomarcagem dos conjugados DC-2, DCM-1, DCM-2	88
6.4 Estabilidade radioquímica dos radioconjugados de dextran	90
6.5 Estudos <i>in vitro</i> de transquelação frente à cisteína e à histidina.....	90
6.6 Determinação do coeficiente de partição dos radioconjugados	91
6.7 Avaliação do efeito da massa molecular e a presença de manose no desempenho biológico dos radioconjugados de dextran-cisteína	92
6.8 Biodistribuição dos radioconjugados ^{99m}Tc -DCM-1 e ^{99m}Tc - DCM-2 a uma dose menor	94
6.9 Impacto da pureza radioquímica do produto ^{99m}Tc - DCM-2 na biodistribuição.....	96
6.10 Determinação do efeito da dose e volume de injeção no desempenho do ^{99m}Tc -DCM-2.....	97
6.11 Desempenho dos radiotraçadores para LNS estabelecidos na medicina nuclear brasileira	99
7 CONCLUSÕES	101
ANEXO 1– Aprovação do comitê de ética IPEN	102
ANEXO 2– Número de ratos da espécie <i>Rattus norvegicus</i>, linhagem Wistar (fêmeas, 150-200 g) usados no trabalho experimental	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Neoplasias humanas mais freqüentes na população adulta mundial. As informações foram tomadas de fontes bibliográficas entre os anos 2001 e 2010.	21
TABELA 2- Detalhes estruturais dos conjugados de dextran considerados neste estudo.	47
TABELA 3- Fator de retenção (R_f) das diferentes espécies radioquímicas nos sistemas cromatográficos de camada delgada e papel.	51
TABELA 4 Matriz experimental e pureza radioquímica, determinada por ITLC-SG/ metanol: HCl (99:1) e Whatman#1/ acetona, para cada ponto incluído no planejamento fatorial 3^2	60
TABELA 5 Pureza radioquímica e atividade específica dos radioconjugados de dextran (média $\pm$ desvio padrão; n=3).	65
TABELA 6 Estudo de estabilidade radioquímica dos produtos $^{99m}\text{Tc-DC-1}$, $^{99m}\text{Tc-DC-2}$, $^{99m}\text{Tc-DCM-1}$, $^{99m}\text{Tc-DCM-2}$	67
TABELA 7 Estudos de transquelação frente à cisteína e histidina dos radioconjugados de dextran. Razão molar aminoácido/conjugado: 1000:1.	67
TABELA 8 Estudo de biodistribuição ex-vivo dos radiotraçadores 90 min após sua administração. Volume de injeção: 100 μL e dose de 0,167 nmol.	68
TABELA 9. Captação dos radiotraçadores ($^{99m}\text{Tc-DCM-1}$, $^{99m}\text{Tc-DCM-2}$) nos linfonodos popliteal e inguinal e valores de extração popliteal. Dose injetada: 0,05 nmol; volume de injeção: 50 μL	71
TABELA 10. Captação hepática e renal dos radiotraçadores com unidades de manose. Dose injetada: 0,05 nmol; volume de injeção: 50 μL	72
TABELA 11. Retenção após 30 min de injeção do $^{99m}\text{Tc-DCM-2}$ purificado (99,5 %) em alguns órgãos e regiões anatômicas. Volume injetado: 50 μL , quantidade administrada: 0,05 nmol (n=5).	74
TABELA 12. Biodistribuição do $^{99m}\text{Tc-DMC-2}$ a diferentes combinações de dose e volume injetado, 30 min a.i. (média $\pm$ desvio padrão, n=3).	77
TABELA 13. Biodistribuição dos radiofármacos $^{99m}\text{Tc-Dextran-500}$, $^{99m}\text{Tc-Fitado coloidal}$ e $^{99m}\text{Tc-DCM-2}$, 30 min a.i.. Atividade injetada, 37 MBq em 100 μL (média $\pm$ desvio padrão, n=3).	79

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Organização das camadas celulares em um tecido. Modificada da referência 36.....	22
FIGURA 2- Rotas de migração das células neoplásicas desde o tumor primário até um órgão distante. Figura modificada da referência 42.....	25
FIGURA 3- Vasos coletores de entrada e saída e subdivisões anatômicas internas do linfonodo. Modificada de referência 48.....	27
FIGURA 4- Reação de formação do complexo proteína-corante na técnica de detecção de linfonodo sentinela.	30
FIGURA 5- Diagrama da estrutura de domínios no receptor de manose. FNII: domínio do tipo fibronectina II, DLTC: domínio de lectina tipo-C, C: domínio citoplasmático. Modificada da referência 90.	34
FIGURA 6- Estrutura molecular do Lymphoseek. Modificada da referência 93.	36
FIGURA 7- Estrutura do conjugado ASH-HYNIC-manose. Modificada da referência 104.	37
FIGURA 8- Esquema do procedimento de síntese do MAS. Modificada da referência 103.	38
FIGURA 9- Estrutura do radiofármaco ^{99m}Tc -Sestamibi	39
FIGURA 10- A: Estrutura do $[\text{TcO}(\text{MAG}_3\text{H})]^-$. B: Isômeros syn e anti da classe de compostos $[\text{TcO}(\text{N}_x\text{S}_{4-x})]$. Modificada da referência 111.	41
FIGURA 11- $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{HYNIC})(\text{tricina})_2]$. Modificada da referência 112.	42
FIGURA 12- Vias de obtenção do precursor $[\text{Tc}(\text{O}_2\text{H})_3(\text{CO})_3]^+$. (1) utilizando fluxo de monóxido de carbono (método inicial), (2) empregando boranocarbamato (Isolink, kit comercial). Modificada da referência 114.	42
FIGURA 13- Estrutura química dos conjugados 2-propileno-S-cisteína-dextrans (A) e 2-propileno-S-di-cisteína-manose-dextrans (B).	47
FIGURA 14. Representação gráfica da metodologia empregada na otimização da marcação do DC-1.	48
FIGURA 15- Perfis cromatográficos do precursor e do íon pertechnetato (CLAE-RP), coluna C-18 (4,6 x 250 mm), fluxo: 1 mL/min, volume de injeção: 10 μL . (A) $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$, (B). $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$	58
FIGURA 16-Radiocromatogramas do preparado de ^{99m}Tc -DC-1. A: sistema Whatman1/Acetona. B: sistema ITLC-SG/Metanol:HCl (99:1). Condições da marcação: 50 μg de DC-1, 80 $^\circ\text{C}$, 30 min, 100 μL de $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ (37 MBq).	59
FIGURA 17-Gráfico de perturbações (influência de cada fator). A: Temperatura (70; 85; 100 $^\circ\text{C}$); B: Tempo (10; 20; 30 min). Os valores das duas variáveis foram codificados -1; 0; 1.	60
FIGURA 18-Gráficos de influência da temperatura a diferentes tempos sobre a pureza radioquímica do ^{99m}Tc -DC-1. A: 10 min; B: 20 min; C: 30 min.	61

FIGURA 19- Influência da quantidade do polímero na pureza radioquímica e na atividade específica do $^{99m}\text{Tc-DC-1}$. Marcações realizadas a 100 °C, 30 min, 100 μL do $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ (74 MBq).....	62
FIGURA 20-Perfis cromatográficos (exclusão por tamanho) do DC-1 radiomarcado (A) e as impurezas radioquímicas (B), obtidos através de coluna PD-10, fase móvel: H_2O , fluxo: por gravidade.....	63
FIGURA 21-Perfil do $^{99m}\text{Tc-DC-1}$ em CLAE - fase reversa. coluna C-18 (4,6 x 250 mm), fluxo: 1mL/min, volume de injeção: 10 μL	64
FIGURA 22-Perfis dos radioconjugados (A) $^{99m}\text{Tc-DC-2}$, (B) $^{99m}\text{Tc-DCM-1}$, (C) $^{99m}\text{Tc-DCM-2}$ em CLAE. Coluna C-18 (4,6 x 250 mm), fluxo: 1mL/min, volume de injeção: 10 μL	66
FIGURA 23- Gráfico das médias para a captação do linfonodo popliteal considerando ou não a presença de manose na estrutura.	69
FIGURA 24- Gráfico das médias para a captação hepática considerando ou não a presença de manose na estrutura.	69
FIGURA 25- Linfocintilografias em ratos realizadas em gama-câmara Mediso (Hungria) após 90 minutos da injeção das radiomoléculas. A: $^{99m}\text{Tc-DC-1}$, B: $^{99m}\text{Tc-DCM-1}$, C: $^{99m}\text{Tc-DC-2}$, D: $^{99m}\text{Tc-DCM-2}$, I.p.: linfonodo popliteal, I.i.: linfonodo inguinal.	70
FIGURA 26- Retenção dos radioconjugados no ponto de injeção e em diferentes tecidos (média $\pm$ desvio padrão, n=5). A: Ponto de injeção (pata). B: Tecido muscular. C: Sangue. D: Tecido ósseo. Dose injetada: 0,05 nmol; volume de injeção: 50 μL	73
FIGURA 27-Linfocintilografias em ratos realizadas em gama-câmara Mediso (Hungria) após 30 minutos da injeção das radiomoléculas. A: $^{99m}\text{Tc-DCM-1}$, B: $^{99m}\text{Tc-DCM-2}$, I.p.: linfonodo popliteal, I.i.: linfonodo inguinal. Dose injetada 0,05 nmol, volume de injeção 50 μL	74
FIGURA 28-Retenção do $^{99m}\text{Tc-DCM-2}$ purificado (99,5 %) no sangue e nos tecidos muscular e ósseo de ratos. Os valores são expressos como %DI/g exceto para o sangue (%DI/mL).	75
FIGURA 29- Influência do volume de injeção do $^{99m}\text{Tc-DMC-2}$ a diferentes doses na captação no linfonodo popliteal, 30 min a.i. (média $\pm$ desvio padrão, n=3).	76
FIGURA 30-Gráfico dos intervalos de confiança para quantidade retida do $^{99m}\text{Tc-DMC-2}$ segundo o teste de Tukey, 30 min a.i.. Representaram-se as combinações volume-dose injetada com maior captação no linfonodo popliteal para cada dose (n=3).	76
FIGURA 31- Influência do volume de injeção a diferentes doses na extração popliteal do $^{99m}\text{Tc-DMC-2}$, 30 min a.i. (média $\pm$ desvio padrão, n=3).	77
FIGURA 32- Imagens cintilográficas estáticas em ratos do $^{99m}\text{Tc-DMC-2}$, obtidas em gama-câmara Mediso (Hungria) para as 6 combinações de volume e dose injetada, 30 min a.i.. A e B representam doses de 0,05 nmol em volumes de 50 e 100 μL respectivamente. C e D representam doses de 0,135 nmol e similares volumes crescentes. Doses de 0,22 nmol em volumes de 50 e 100 μL se correspondem às imagens E e F respectivamente. I.i.: linfonodo inguinal. I.p.: linfonodo popliteal.	78
FIGURA 33-Linfocintilografias em ratos dos produtos (A) $^{99m}\text{Tc-Dextran-500}$ e (B) $^{99m}\text{Tc-Fitato}$ coloidal realizadas em gama-câmara Medido (Hungria), 30 min a.i.. Atividade injetada, 37 MBq em 100 μL	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% m/m	Concentração expressa como porcentagem massa-massa
%DI	Porcentagem de dose injetada
%DI/g	Porcentagem de dose injetada por grama
%DI/mL	Porcentagem de dose injetada por mililitro
a.i.	Após injeção
ANOVA	Análise de variância simples
ASH	Albumina sérica humana
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DC-1	2-propileno-S-cisteína-dextran (16,6 kDa)
DC-2	2-propileno-S-cisteína-dextran (30 kDa)
DCM-1	2-propileno-S-di-cisteína-manose-dextran (20 kDa)
DCM-2	2-propileno-S-di-cisteína-manose-dextran (30 kDa)
DTPA	Ácido dietilenotriaminopentacético
FDG	¹⁸ Fluor-deoxi-glicose
HYNIC	6-hidrazinonicotinamida
LNS	Linfonodo sentinela
MAG ₃	S-acetil-mercaptotriglicina
MSA	Albumina de soro humana neomanosilada
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
R _f	Fator de retenção
ROI	Captação em região de interesse
SPECT	Tomografia computadorizada por emissão de fóton único
TC	Tomografia computadorizada
Teste de Tukey-HSD	Teste da diferença significativa honesta de Tukey
v/v	Porcentagem volumétrica (volume/volume)

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença caracterizada por um crescimento descontrolado de células de certo órgão ou tecido e pelo desenvolvimento destas além dos seus limites naturais (invasão e metástase). Apesar dos esforços globais para diminuir a incidência desta enfermidade, o câncer tornou-se uma das principais causas de óbito nas diferentes regiões geográficas do mundo^{1,2}.

Estima-se que mundialmente, um terço de todos os cânceres poderiam ser detectados nas etapas iniciais da sua formação e potencialmente curados com tratamentos adequados³. Igualmente é conhecido que o decréscimo da mortalidade por câncer observado nas últimas quatro décadas atribui-se fundamentalmente ao resultado da detecção precoce e prevenção, não como consequência de terapias efetivas⁴. A literatura refere-se também que o diagnóstico precoce do câncer é crucial para um prognóstico bem sucedido da doença e a sobrevivência do paciente. Por exemplo, para o câncer de mama, de maior incidência na população feminina, a taxa de sobrevivência por cinco anos é de 98% quando a detecção é feita na fase inicial, e decresce para 39% no estágio final da doença⁵. Por esses motivos é necessário estabelecer técnicas de alta especificidade e sensibilidade para garantir um diagnóstico precoce do câncer⁶. Entre as técnicas utilizadas para o diagnóstico com esta finalidade encontram-se: o reconhecimento de sintomas³, a identificação e quantificação de bio-marcadores presentes nos fluídos biológicos^{7,8} e estudos mediante imagens⁹.

O diagnóstico por imagens na oncologia moderna oferece um conjunto de vantagens com relação às outras técnicas. A imagenologia diagnóstica do câncer é utilizada na caracterização de tumores, distinguindo-se entre benignos e malignos; permitindo a definição do sítio anatômico para a realização da biópsia e a avaliação patológica. Ao mesmo tempo, com esta técnica é possível determinar o tamanho e a extensão da lesão e caracterizá-la como local, invasiva ou metastática, orientando assim com uma maior precisão a terapia¹⁰.

As técnicas por imagens são divididas em duas categorias: as que fornecem detalhes anatômicos e as que provêem informações sobre processos biológicos que acontecem na escala celular e molecular mediante a utilização de agentes farmacêuticos, também definidas estas últimas como imagenologia molecular¹¹. Contudo, na atualidade observa-se que as fronteiras entre ambas as categorias estão desaparecendo devido ao desenvolvimento de agentes para imagens que possibilitam avaliar processos fisiológicos em técnicas comumente usadas com fins anatômicos, tais como, o ultra-som e a ressonância magnética¹².

As quatro modalidades de maior aplicabilidade dentro da imagenologia molecular nas quais são usados agentes de contraste com especificidade biológica encontram-se: as técnicas de medicina nuclear, a ressonância magnética, o ultra-som e a imagenologia óptica. Dentre estas, a medicina nuclear tem sido amplamente utilizada no diagnóstico do câncer como consequência da sua alta sensibilidade intrínseca, penetração a profundidades ilimitadas e relativa facilidade na radiomarcagem de moléculas¹³.

A tomografia por emissão de pósitrons (PET) e a tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) são técnicas de imagenologia nuclear utilizadas em pacientes com suspeita de câncer. Embora proporcionem uma alta sensibilidade, demonstram uma baixa resolução espacial. Este problema tem sido resolvido com a fusão das imagens moleculares e anatômicas obtidas nos sistemas integrados de PET/ tomografia computadorizada (PET/TC) e de SPECT/TC, por elas permitirem uma precisa localização anatômica das lesões com alta captação do radiotraçador.¹⁴

O sucesso da medicina nuclear no diagnóstico de patologias (câncer), e, também, na terapia, está baseado, em grande parte, no desenvolvimento de novos radiofármacos. Eles são radionuclídeos ou moléculas radiomarcadas sintetizadas para aplicações *in-vivo*, as quais estão compostas de dois elementos, isto é, uma estrutura molecular que define o desempenho do radiotraçador dentro do organismo (farmacocinética e farmacodinâmica) e um elemento radioativo que é responsável pela detecção fora do organismo para uma posterior visualização através de instrumentos adequados para a composição de imagens¹⁵. Especificamente a PET detecta um par de raios gamas coincidentes gerados na

colisão pósitron/elétron após a emissão de um pósitron. Os isótopos mais empregados nesta técnica são Flúor-18 (^{18}F), Carbono-11 (^{11}C), Nitrogênio-13 (^{13}N), Oxigênio-15 (^{15}O), e Iodo-124 (^{124}I). A SPECT pelo contrário, detecta raios gama diretamente de isótopos emissores de radiações gama tais como Tecnécio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), Galio-67 (^{67}Ga), Índio-111 (^{111}In), Iodo-123 (^{123}I), e Iodo-131 (^{131}I) ¹⁶.

Atualmente, mais de 75% dos radiofármacos disponíveis para aplicações clínicas em medicina nuclear diagnóstica são compostos de Tecnécio-99m. Isto se deve, principalmente, às suas propriedades nucleares. Este radionuclídeo possui tempo de meia-vida de 6 horas, suficiente para realizar radiossínteses e fazer os estudos por imagem. As emissões de fótons monocromáticos de 140 keV permitem uma fácil colimação dando como resultado imagens com alta resolução espacial. Além das adequadas características nucleares, existe uma grande disponibilidade deste isótopo a um custo relativamente baixo. O $^{99\text{m}}\text{Tc}$, nos radiofármacos, liga-se a uma parte da estrutura molecular que garanta a quelação deste elemento metálico ¹⁷.

Na detecção de metástase, associada ao câncer de mama e melanoma, a biópsia do linfonodo sentinela (o primeiro nodo que recebe a drenagem linfática desde o sítio do tumor primário) tem sido a estratégia de escolha. Diferentes radiocolóides de $^{99\text{m}}\text{Tc}$, como o enxofre coloidal ou a albumina humana coloidal têm sido mais utilizados na detecção do linfonodo sentinela. A velocidade de transporte e o movimento através dos condutos linfáticos são definidos pelo tamanho das partículas coloidais ¹⁸. Contudo, um novo conceito de radiofármaco de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tem surgido com o Lymphoseek (Neoprobe Corp., Dublin, OH, USA). Este radiotraçador é um conjugado de dextran com unidades de manose e ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA), o qual possui afinidade pelos receptores de manose dos macrófagos e das células dendríticas, presentes nos nodos linfáticos ¹⁹.

O DTPA neste conjugado é o responsável pela quelação com o $^{99\text{m}}\text{Tc}$, mesmo sendo um agente quelante pouco eficiente para este elemento. Este radiofármaco apresenta vantagens como rápida depuração do sítio de injeção, assim como rápido acúmulo e prolongada retenção no linfonodo sentinela. Em outros nodos

da cadeia linfática foi observada apenas uma baixa captação, demonstrando que o radiotraçador possui propriedades ideais para a finalidade proposta²⁰.

A originalidade do presente trabalho está no desenvolvimento de um novo radiotraçador para a detecção de linfonodo sentinela, com substituição do agente DTPA para outro com maior eficiência na quelação do ^{99m}Tc , mediante a utilização do aminoácido cisteína ligado a conjugados dextran-manose e integração ao núcleo mais estável de ^{99m}Tc -carbonila [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$]⁺.

2 OBJETIVOS

O objetivo fundamental deste trabalho foi otimizar as marcações de conjugados dextran-cisteína e dextran-cisteína-manose com o precursor $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ e avaliar o desempenho dos mesmos na detecção de linfonodo sentinela em ratos.

Os objetivos específicos foram:

1. Definir as técnicas analíticas para o controle radioquímico dos radiotraçadores em estudo.
2. Otimizar as condições de marcação dos conjugados de dextran.
3. Avaliar a estabilidade radioquímica dos complexos de tecnécio por um período de 6 horas.
4. Realizar estudos *in vitro* de transquelação dos radioconjugados frente à cisteína e histidina.
5. Determinar o efeito da manose e da massa molecular na captação dos radiotraçadores no linfonodo popliteal e nos principais órgãos de excreção em ratos.
6. Avaliar os efeitos dos parâmetros tempo, dose, volume de injeção e concentração dos radiotraçadores através de estudos de biodistribuição *ex vivo* em ratos.
7. Adquirir imagens cintilográficas em ratos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Câncer

3.1.1 Definição, classificação e estatísticas

O câncer é uma doença genética, na qual as células tumorais diferenciam-se das células progenitoras normais mediante alterações genéticas que afetam os genes que regulam o crescimento celular. Tem sido demonstrado que as transformações malignas ocorrem através de mutações sucessivas em genes específicos, levando à ativação de oncogênese e à inativação dos genes supressores de tumor²¹.

O tema central na patologia do câncer é a distinção entre as neoplasias malignas e benignas. O termo neoplasia define-se dentro das ciências médicas como o crescimento anormal de células, usando-se também o termo tumor como sinônimo. Os tumores benignos permanecem confinados no sítio de origem, e geralmente estão envolvidos por uma cápsula fibrosa, sem invadirem os tecidos vizinhos normais e nem se espalham até outros sítios do corpo. As neoplasias benignas quase sempre podem ser retiradas completamente mediante técnicas cirúrgicas, e na maioria dos casos não oferecem riscos para a vida do paciente. Em contraste, os tumores malignos têm a capacidade tanto de invadir os tecidos adjacentes quanto de espalhar-se atingindo outros órgãos e tecidos, além de ter uma velocidade de crescimento maior e não ter uma marcada diferenciação celular com relação às células do tecido original normal. Só as neoplasias malignas são consideradas cânceres^{22,23}.

Os cânceres podem ser classificados de várias formas. Uma das mais utilizadas é a que considera o tipo de tecido ou células de origem do tumor. Quatro categorias fundamentais existem segundo esta classificação: carcinomas, sarcomas, tumores hematopoiéticos e neuroectodérmicos. Os carcinomas têm origem no tecido epitelial, o qual se encontra na camada de células que delimitam uma cavidade ou um ducto. Ao mesmo tempo os carcinomas podem ser

subdivididos em carcinomas de células escamosas e adenocarcinomas. Os primeiros tem origem no epitélio que é formado pelas camadas de células protetoras, próprias dos órgãos como a pele, o esôfago, a próstata e o cervix, e os últimos têm origem no epitélio secretor (glândulas). Os sarcomas são originados nas células mesenquimais que surgem nos tecidos conectivos ou de suporte (osso, cartilagem, músculo) e em tecidos moles. Os tumores hematopoiéticos originam-se nos sistemas imune e circulatório. Eles envolvem os tecidos linfáticos e mielóide. Por último, os tumores neuroectodérmicos são encontrados em componentes do sistema nervoso²⁴.

Com fins epidemiológicos costuma-se classificar os diferentes tipos de câncer pelo órgão alvo da neoplasia maligna. Contudo, para identificá-los corretamente observa-se primeiramente a seguinte regra, enquadrando-os a cada tipo e subtipo de tecido afetado especificando o órgão atingido por exemplo, adenocarcinoma de mama, carcinoma de células escamosas de pulmão. No caso dos hematopoiéticos utilizam-se os termos leucemia e linfoma e, por conseguinte, o tipo de célula, por exemplo, leucemia mielóide aguda²⁵.

O Câncer causa 7 milhões de óbitos anualmente, constituindo 12,5 % ao nível mundial. Estima-se que para o ano 2020 haverá 16 milhões de novos casos o que representa um incremento de 50 % da incidência desta doença²⁶.

As estatísticas mundiais com relação ao câncer revelam que os sítios do organismo mais afetados na população feminina são mama, pulmão, estômago, a região cólon-retos e colo do útero. Enquanto para homens os sítios de maior incidência são pulmão, estômago, fígado, cólon-retos, esôfago, próstata²⁷.

As estatísticas mundiais e brasileiras sobre os principais sítios alvos de neoplasias do corpo coincidem, qualitativamente, o que garante que as políticas de saúde com alcance global teriam aplicabilidade no Brasil e vice-versa. Também foi confirmado que estas regiões anatômicas são afetadas fundamentalmente por tumores epiteliais (TAB. 1).

TABELA 1- Neoplasias humanas mais freqüentes na população adulta mundial. As informações foram tomadas de fontes bibliográficas entre os anos 2001 e 2010.

Região anatômica	Tipos de tumores com maior incidência	Fonte bibliográfica
Pulmão	Carcinomas de células não pequenas:	28,29
	• Adenocarcinoma	
	• Carcinoma de células escamosas	
	Carcinomas de células pequenas	
Mama	Carcinoma ductal invasivo	30
	Carcinoma lobular invasivo	
Próstata	Adenocarcinoma	31
Estômago	Adenocarcinoma	32
Colo do útero	Carcinoma de células escamosas	33
	Adenocarcinoma	
Cólon-retos	Adenocarcinoma	34

3.1.2 Desenvolvimento de tumores epiteliais.

Os tumores de origem epitelial constituem aproximadamente 90% de todos os tipos de cânceres³⁵. Por esse motivo, as políticas de saúde poderiam estimular as pesquisas relacionadas com este tipo de neoplasias. Para incidir de forma mais eficaz no diagnóstico e terapia destas, é necessário conhecer como ocorre seu desenvolvimento. O primeiro passo deve ser a identificação das características do tecido epitelial normal e suas interações com os outros tecidos.

Nos tecidos epiteliais normais, as camadas de células estão arranjadas de maneira regular e ordenada, e se replicam a uma velocidade que garante a reposição das células mortas, mantendo a estrutura e funções normais do tecido. Nos diferentes órgãos, as células agrupam-se segundo um padrão estabelecido. O tecido epitelial está separado do mesênquima subjacente por uma membrana basal semipermeável. O mesênquima está composto pelo estroma (fibroblastos e tecido conectivo) o qual pode estar apoiado sobre uma camada de tecido muscular ou ósseo dependendo do órgão. O tecido conectivo do mesênquima encontra-se ligado aos vasos linfáticos, aos vasos sanguíneos, e aos nervos, provendo, principalmente, a estes dois últimos os nutrientes necessários e o controle nervoso para as células específicas de cada tecido (FIG. 1)³⁶.

Com a aparição das neoplasias malignas epiteliais, muito mais células são produzidas do que as necessárias para repor as perdas. Por essa razão a arquitetura dos tecidos epiteliais com neoplasias não se encontra ordenada e muitas camadas de células epiteliais se arranjam formando padrões irregulares. Estes tumores têm a capacidade de invadir e destruir o mesênquima (invasão local). As células tumorais produzem um conjunto de proteínas que estimula a formação de novos vasos sanguíneos para suprir as necessidades de nutrientes. Os novos vasos não são corretamente formados e são facilmente danificados, de modo que as células tumorais podem penetrar dentro deste e dos vasos linfáticos, sendo assim transportados até os linfonodos ou órgãos distantes onde podem produzir tumores secundários (metástases)³⁶.

FIGURA 1- Organização das camadas celulares em um tecido. Modificada da referência ³⁶.

3.2 Metástases

Em termos gerais, a metástase é um processo de múltiplas etapas, que envolve a invasão e disseminação de células de um tumor primário, para um local distante. A metástase é um dos problemas fundamentais da oncologia. As diferentes terapias existentes tais como cirurgia, quimioterapia ou irradiação, podem funcionar no tratamento do tumor primário, principalmente quando este se encontra nas etapas iniciais do seu desenvolvimento. A disseminação das células constitui a principal causa de óbito por câncer^{36,37}.

A metástase, após iniciação e crescimento da massa do tumor primário, envolve cinco etapas principais que, quando são completadas com sucesso, resultará na formação de um tumor secundário. Estas etapas são:

- ◆ Invasão e infiltração das células cancerígenas no tecido normal circundante do hospedeiro com penetração nos capilares sanguíneos e linfáticos.
- ◆ Liberação das células tumorais, bem como, células individuais, ou como em pequenos grupos destas dentro do lúmen dos capilares penetrados.
- ◆ A sobrevivência das células tumorais na circulação sanguínea ou linfática.
- ◆ Retenção das células cancerígenas sobreviventes nas redes capilares de órgãos distantes.
- ◆ Extravasamento (saída do lúmen dos capilares), seguido pelo crescimento das células tumorais disseminadas no novo órgão^{29, 37}.

Em relação à rota de migração das células do tumor primário, na prática clínica, tem se observado que os carcinomas (origem epitelial), geralmente disseminam-se inicialmente pelo sistema linfático³⁸ enquanto os sarcomas (origem mesenquimal) espalham-se pela rota hematogêna³⁶. Ao mesmo tempo, é conhecido que os novos vasos sanguíneos gerados durante o processo de angiogênese têm uma estrutura irregular, com paredes, as quais contêm junções interendoteliais alargadas e uma membrana basal defeituosa que permitem fácil entrada das células tumorais na circulação. Uma vez dentro do lúmen dos vasos, os critérios sobre o sucesso de migração são divergentes na literatura. Existe o critério que o fluxo não laminar característico da circulação sanguínea é favorável para a sobrevivência das células. Deste modo explica-se porque a quantidade de novos vasos adjacentes ou dentro do tumor primário pode servir como um indicador de prognóstico. Quanto maior é o número de novos vasos, maior é a probabilidade de ocorrer metástase³⁶. Entretanto, existe outro critério totalmente oposto, o qual está baseado na agressividade mecânica e química da circulação sanguínea. Neste, considera-se que a velocidade do fluxo sanguíneo provoca um efeito elevado de cisalhamento e deformação mecânica, além das células se encontrarem em um fluido (soro sanguíneo) que contém produtos de excreção celular e outras substâncias que são tóxicas para estas. Baseado nestes argumentos, estima-se que somente 1 % das células neoplásicas que entram na

corrente sanguínea conseguem sobreviver para formar os tumores secundários³⁹. Estas duas posições poderiam se conciliar, se o sucesso da migração sanguínea for explicado pelo aumento considerável de células tumorais que saem do tumor primário devido à angiogênese, garantindo que um número razoável delas consiga sobreviver até atingir o órgão receptor. Outra explicação seria a entrada dos grupos de células em forma de “clusters”, onde as células que se encontram no interior destes são protegidas da hostilidade do ambiente agressivo do sangue, ou pela formação de agregados com linfócitos e plaquetas, os quais exercem também ação protetora^{39,40}.

A penetração nos vasos linfáticos é provavelmente mais fácil porque além de uma falta de membrana basal contínua, fracas junções endoteliais e freqüentes lacunas que eles compartilham com os novos capilares, também não possuem uma camada circundante de pericitos (células mesenquimais associadas às paredes dos capilares sanguíneos). Para a maioria dos carcinomas a disseminação das células neoplásicas segue as rotas de drenagem natural dos vasos linfáticos aferentes até os linfonodos sentinelas (os primeiros a receberem a drenagem), sendo eles, na maioria das vezes, preferencialmente colonizados por células malignas. Atualmente sabe-se que existe o processo de linfoangiogênese, razão pela qual, além da possibilidade de invadir a neoplasia o sistema linfático pré-existente, pode, também, fazê-lo nos novos capilares linfáticos formados. Ao mesmo tempo, o fluxo linfático tem velocidades marcadamente inferiores ao sanguíneo. Conjuntamente, com todos estes elementos mecânicos e fisiológicos favoráveis para a migração linfática, a linfa tem uma composição muito similar com o fluído intersticial, por conseguinte promove a integridade celular⁴¹.

Na FIG. 2 representam-se as rotas de disseminação das células tumorais a partir do tumor primário. Observa-se que na migração linfática pode haver duas rotas devido à anastomose (comunicação direta entre os vasos sanguíneos e linfáticos) ou através dos ductos, principalmente o torácico⁴².

FIGURA 2- Rotas de migração das células neoplásicas desde o tumor primário até um órgão distante. Figura modificada da referência [42](#).

3.3 Aspectos fisiológicos e anatômicos do sistema linfático

3.3.1 Funções e componentes principais

Embora o sistema linfático seja a principal rota de metástase para tumores de grande incidência como carcinomas de mama, cólon, próstata e melanoma⁴³, somente nos últimos anos os mecanismos e parâmetros fisiológicos que o regem estão sendo esclarecidos⁴⁴.

O sistema circulatório linfático tem como função fisiológica principal complementar o sistema circulatório sanguíneo mediante a drenagem de solutos e excesso de fluido (homeostase) do espaço intersticial para serem estes retornados ao sangue. Isto ocorre por meio de um fluxo lento de proteínas e macromoléculas através do espaço entres os vasos sanguíneos e linfáticos, no qual estão contidas as células e a matriz extracelular (interstícios). Ao mesmo tempo o sistema linfático regula o tráfego de células do sistema imunológico e a absorção das gorduras⁴⁵.

O sistema vascular linfático está composto pelos capilares linfáticos, os vasos coletores, os linfonodos, os troncos e os ductos linfáticos⁴⁶.

Os capilares linfáticos variam em tamanho, não têm uma secção transversal circular (lúmen irregular), e apresentam diâmetros em uma faixa de 10 a 80 μm .

Eles estão compostos por células endoteliais sobrepostas, formando uma camada extremamente fina (50-100 nm) que possui uma membrana basal descontínua e junções célula-célula débeis. Estas características fazem com que os capilares sejam altamente permeáveis a fluidos e solutos de alto peso molecular como as proteínas e colóides nanométricos⁴⁴.

Uma vez que é formada a linfa (igual composição ao do fluído intersticial), na drenagem inicial aos capilares linfáticos, esta flui até ductos de calibre ligeiramente maior (100-200 µm), conhecidos como vasos pré-coletores que drenam a vasos coletores linfáticos ainda maiores com estruturas que facilitam o fluxo unidirecional. Estes vasos coletores pré-nodais são referidos como vasos linfáticos aferentes e tem a função de enviar o fluído e células dendríticas (células imunes transportadoras de antígenos) ativadas até os linfonodos, onde as moléculas presentes na linfa são apresentadas às células imunológicas que residem nestas estruturas⁴⁴.

3.3.2 Nodos linfáticos

No organismo humano encontram-se entre 400-600 nodos linfáticos, os quais têm um diâmetro médio de 1-2 cm. Os linfonodos são estruturas em forma de feijão envoltas por uma cápsula. Múltiplos vasos coletores aferentes descarregam a linfa nos linfonodos. Entretanto, o nodo linfático só tem um vaso eferente para a saída do fluído linfático. Os linfonodos apresentam também irrigação sanguínea por derivações capilares de artérias e vênulas endoteliais altas⁴⁴.

Internamente, estão compostos fundamentalmente por seios corticais (periféricos) e medulares (centrais), os quais filtram a linfa. Nas áreas corticais predominam os linfócitos, enquanto os plasmócitos e macrófagos residem nas regiões medulares⁴⁷. Os linfonodos (conjuntamente com outros órgãos linfóides como o baço) são sítios críticos para o intercâmbio de informação com as células do sistema imune.

A linfa nos nodos linfáticos flui pelos vasos aferentes até entrar nos seios corticais e depois dentro dos seios medulares para finalmente sair do linfonodo via vasos eferentes. Também foi demonstrado que os vasos eferentes podem não levar a linfa até os seios corticais e medulares, tomando duas rotas

alternativas: pela superfície da cápsula ou totalmente por fora do linfonodo (FIG. 3)⁴⁸.

FIGURA 3- Vasos coletores de entrada e saída e subdivisões anatômicas internas do linfonodo. Modificada de referência 48.

Na atualidade a função dos linfonodos no processo de metástase não está definida. A comunidade científica se divide entre as seguintes hipóteses:

1. As células tumorais são retidas nos linfonodos, como parte de uma fase de latência na disseminação tumoral.
2. A metástase no linfonodo só serve como evidência de trânsito.
3. O linfonodo promove a disseminação das células neoplásicas, pela amplificação do tumor ou servindo como plataforma de lançamento para posteriores metástases sistêmicas⁴³.

Entretanto, a comunidade médica concorda em que a presença e magnitude da metástase nos linfonodos são um determinante importante para conhecer o estadiamento e realizar prognósticos corretos nestas patologias, definindo-se as decisões terapêuticas a tomar⁴³.

3.4 Linfonodo sentinela

Refere-se que a maioria dos tumores começa se espalhar pela circulação linfática. Inicialmente as células tumorais permanecem retidas em diferentes nodos da cadeia linfática como parte do sistema de defesa do

organismo, a partir destes nodos, as células neoplásicas podem disseminar-se através da circulação sanguínea e da linfática quase simultaneamente⁴⁹.

Aqueles linfonodos que recebem a drenagem linfática inicial do sítio primário do tumor são definidos como linfonodos sentinelas. O termo sentinela se deve por sua função de vigia, sinalizando possíveis migrações de células cancerígenas até outros nodos dentro da cadeia linfática ou o espalhamento regional do tumor. Como a determinação da presença de células neoplásicas nos nodos sentinelas faz parte do estadiamento e prognóstico integral do câncer (ausência de células tumorais, baixa probabilidade de metástases em outros nodos ou órgãos), é comumente realizada a excisão do linfonodo sentinela (LNS) para uma posterior avaliação patológica⁵⁰.

Segundo um estudo publicado por Adib e Barton em 2006, onde é feito um detalhamento dos principais momentos históricos da detecção de LNS, definiu-se que o conceito de LNS foi introduzido por Cabanas em 1977 quando descreveu o uso de linfo-angiogramas para demonstrar o LNS associado ao câncer de pênis. Outro momento importante no estabelecimento desta técnica de diagnóstico foi quando em 1992, Morton fez o primeiro mapeamento de LNS em melanomas, usando um corante, demonstrando assim que a mesma era factível. No ano seguinte, Alex e colaboradores usaram pela primeira vez um traçador radioativo para localizar LNS em melanoma. Depois Giuliano estendeu esta técnica aos cânceres de mama utilizando corante⁵¹.

Grande variedade de experiência tem sido relatada na detecção de LNS nos cânceres de mama⁵² e melanoma⁵³. Especificamente, referente ao primeiro, a biópsia para investigação do LNS, têm resgatado consideravelmente a sobrevida das pacientes se, comparada a técnica de dissecação axilar total. Conduta clínica, normalmente aplicada até o findar do século passado. Este último procedimento, agrega vários efeitos colaterais indesejáveis, formando conjunto de anomalias pós-cirúrgicas como: linfodema, seromas, neuromas, parestesia, problemas com a cicatrização da ferida e a diminuição no movimento do braço adjacente⁵⁴. Além destas irregularidades, a probabilidade da ocorrência da remoção de nodos saudáveis sujeitaria os pacientes ao quadro de fragilidade

potencializado pela existência dos filtros que poderiam atenuar a posterior migração das células tumorais (cancerígenas).

As aplicações do conceito de LNS estendem-se hoje a outros tumores epiteliais como os ginecológicos⁵⁵ (carcinomas da vulva, cervicais, endometriais e do ovário), de próstata⁵⁶, cólon-retal⁵⁷, de cabeça e pescoço⁵⁸ e do estômago⁵⁹.

3.5 Estratégias estabelecidas para o estadiamento do LNS

Como para toda técnica diagnóstica, o estadiamento do LNS deve apresentar uma alta especificidade (fração dos casos que obtiveram resposta positiva no teste entre aqueles que possuem a doença) e sensibilidade (fração dos casos que tiveram resposta negativa no teste entre aqueles que não possuem a doença)⁶⁰. A implicação de uma técnica de baixa especificidade no contexto do estadiamento do LNS é o aumento da realização de técnicas cirúrgicas invasivas desnecessárias, expondo assim ao paciente a riscos intra e pós-operatórios. Por outro lado, uma baixa sensibilidade é devastador, visto que, o paciente não receberá nenhuma terapia, possivelmente terá recaídas e aumentarão as probabilidades de metástases em outros órgãos⁶¹. Portanto, a sensibilidade é considerada o fator preponderante para diagnóstico, no estadiamento do LNS⁶².

As principais estratégias propostas para a detecção de linfonodos sentinelas são:

1. Marcação do nodo sentinela com corantes (ex. Azul patente V), e posterior remoção cirúrgica para análise por técnicas histológicas, imuno-histoquímicas ou por reação em cadeia da polimerase. A técnica de detecção é evidenciada através da coloração das proteínas da linfa mediante ligações do tipo sulfonamida, estabelecidas entre os grupos aminos superficialmente expostos das proteínas e os agrupamentos sulfônicos dos corantes (FIG. 4)⁶³.
2. Identificação com emprego da técnica de imagem cintilográfica na detecção do LNS com utilização de radiofármaco coloidal marcado com ^{99m}Tc⁵⁰.
3. Métodos radiológicos e de medicina nuclear sofisticados. Encontram-se entres estes: a PET com utilização do ¹⁸Fluor-Deoxi-Glicose (FDG), anticorpos e peptídeos radiomarcados específicos para receptores de biomoléculas citoplasmáticas próprias de células tumorais, e agentes de contraste

magnéticos com especificidade pelo sistema reticulo-endotelial para serem utilizados em ressonância magnética⁵⁰.

FIGURA 4- Reação de formação do complexo proteína-corante na técnica de detecção de linfonodo sentinela.

Estudos comparativos por imagens feitos em pacientes portadores de melanoma e câncer de mama com PET-¹⁸FDG têm demonstrado uma menor sensibilidade em relação à técnica de biópsia do LNS, principalmente em presença de micrometástases^{64, 65}.

As técnicas de projeção das imagens anatômicas para a detecção de LNS têm uma baixa sensibilidade devido à falta de alterações anatômicas visíveis como, por exemplo, o não aumento de tamanho do nodo quando este é invadido por células neoplásicas⁴⁹.

3.6 Colóides de ^{99m}Tc para a detecção de LNS

Atualmente a combinação da marcação com corantes, e radiocolóides de ^{99m}Tc é a técnica de detecção associada a uma análise patológica posterior (biópsia), com maior aceitação na prática clínica pelos altos valores de especificidade e sensibilidade observados em estudos comparativos entre ambas técnicas individuais assim como com outras^{66,65, 67}.

Os principais colóides de ^{99m}Tc internacionalmente usados para radioguiar a biópsia de LNS têm sido, o ^{99m}Tc-enxofre coloidal, ^{99m}Tc-albumina humana nanocoloidal, ^{99m}Tc-trissulfeto de antimônio. A utilização preferencial deles responde à disponibilidade e à familiarização com estes colóides nas diferentes áreas geográficas. Por exemplo, o ^{99m}Tc-enxofre coloidal (<5000 nm) é o radiotraçador de escolha para a detecção de LNS, na comunidade médica dos Estados Unidos, enquanto a ^{99m}Tc-albumina humana coloidal (< 80 nm, 95% das partículas) é o mais empregado na Europa e ^{99m}Tc-trissulfeto de antimônio (3-30

nm) na Austrália^{68,69}. Adicionam-se a estes, outros de menor uso como colóides de sulfeto rênio e fluoreto de estanho, macro-colóides de albumina e dextrans. As partículas destes radiotraçadores abrangem tamanhos entre 2,5-5000 nm⁷⁰.

No Brasil o ^{99m}Tc -dextran-500 e o colóide de ^{99m}Tc -ácido fólico são os mais usados para esta finalidade diagnóstica. O tamanho das partículas concentram-se em uma faixa entre 1 e 30 μm ($\geq 90\%$)⁷¹.

Os traçadores, ^{99m}Tc -colóides, difundem-se através dos vasos linfáticos, sem entrar na corrente sanguínea. Posteriormente, são submetidas a uma retenção mecânica e a fagocitoses pelos macrófagos, nos seios dos linfonodos. O desempenho biológico destes colóides é definido principalmente pelo tamanho das partículas. Diferentes trabalhos referem à faixa de 2,5-1000 nm como a faixa ideal de tamanho para estes radiotraçadores⁷², enquanto outros citam uma faixa ótima mais estreita, entre 10 e 150 nm⁷³. Partículas com este tamanho (2,5-1000 nm) são um pré-requisito para uma eficiente captação das partículas radiomarcadas pelos macrófagos presentes nos nodos linfáticos, conjuntamente com uma carga líquida superficial negativa e a opsonização destas partículas através de alguns componentes do sistema complemento: C3, C4B e C5 e algumas globulinas α e β (mecanismo ativo)⁷².

Sabe-se também que a cinética de distribuição passiva dos colóides de ^{99m}Tc nos nodos linfáticos é definida pelo tamanho das partículas. Partículas menores drenam mais rápido pelas cadeias de nodos do que as maiores. Deste modo, a rapidez com a qual o mecanismo de retenção ativo nodal supera o mecanismo de distribuição passiva do radiotraçador dependerá do tamanho das partículas. Preparações radiofarmacêuticas com partículas de grande tamanho marcarão uma proporção de nodos superiores em tempos mais avançados do que os determinados nos momentos iniciais após a injeção. Contrariamente, as partículas muito pequenas transitarão a uma velocidade que supera a velocidade do mecanismo ativo pela qual seriam retidas nos linfonodos, diminuindo assim a captação nos nodos linfáticos. A interação entre ambos os mecanismos, passivo e ativo pode ter implicações na seleção do traçador e no tempo entre a injeção e a detecção⁷⁴.

Entretanto, resultados semelhantes na literatura com radiocolóides de tamanhos diferentes demonstram que os desempenhos biológicos destes radiotraçadores podem ser modulados com outras variáveis envolvidas na farmacocinética como a dose (número de moléculas ou atividade injetada), o intervalo de tempo entre a injeção e a detecção (com um detector portátil de radiação ou a realização de uma técnica por imagem), o volume de injeção e o sítio de injeção^{75,76}.

O número de moléculas injetadas é um parâmetro crítico na radiodetecção de LNS. Ele está relacionado com a saturação da capacidade de depuração do LNS baseado no mecanismo ativo de fagocitose desenvolvido pelos macrófagos. Esta é a razão pela qual é recomendado administrar preparações com um número baixo de partículas⁷⁷.

Os colóides ideais para a detecção de LNS devem mostrar a máxima retenção no nodo sentinela, uma escassa retenção no lugar da administração (local de injeção) e mínima distribuição nos nodos linfáticos secundários⁷⁸. Além destas propriedades específicas para este propósito, os radiotraçadores devem possuir uma alta estabilidade nos fluídos biológicos, fácil técnica de marcação e uma alta atividade específica^{79,80,81}. Esta última propriedade acentua-se ainda mais devido à preferência de administração de doses baixas.

3.7 Novos radiotraçadores para a detecção de LNS

Entre os mais promissores radiotraçadores para a detecção de LNS encontram-se os lipossomas e as nano-partículas com afinidade pelos receptores presentes nos macrófagos. Alguns destes estão na fase de ensaios clínicos. São radiomoléculas que têm sido desenhadas com o intuito de superar as deficiências observadas na utilização dos radiocolóides de ^{99m}Tc e os corantes, tais como a lenta depuração do local de injeção, a não concentração total do agente no LNS e a necessidade de dois fármacos para um diagnóstico preciso. Estas limitações dos agentes convencionais na detecção de LNS devem-se principalmente a falta de especificidade dos mesmos para este propósito⁸².

3.7.1 Lipossomas.

Os lipossomas têm sido uma modalidade muito estudada para a administração nos vasos linfáticos como agentes utilizados em técnicas por imagem. Eles são vesículas, onde o volume aquoso está totalmente envolto por uma membrana de fosfolípidios, dentro das quais podem ser encapsulados ou conjugados diferentes entidades químicas como corantes e radiocolóides. Estes vetores de transporte possuem uma eficiente entrada e retenção na circulação linfática como consequência do seu tamanho (de 30 nm a vários micrometros de diâmetro) e suas características lipofílicas⁸³. Na detecção de LNS, eles têm sido utilizados para encapsular o corante azul ou para incorporar em uma mesma estrutura o corante e o radioisótopo ^{99m}Tc . Como parte desta última estratégia, um sistema lipossomal foi desenvolvido baseado no par protéico de alta afinidade avidina-biotina. Um lipossoma radiomarcado com ^{99m}Tc , com um corante azul encapsulado e com unidades superficiais de biotinas foi injetado na planta da pata de coelhos e imediatamente em um ponto próximo ao local da primeira injeção foi administrada uma dose de avidina. Uma acentuada marcação observou-se no linfonodo popliteal dos coelhos utilizados no estudo com relação ao grupo controle, onde a avidina não foi administrada⁸⁴. Este resultado foi explicado pela união da avidina, carregada positivamente, às células endoteliais nos linfonodos (carregadas negativamente), favorecendo a retenção do lipossoma biotinilado ligado à avidina na superfície endotelial dos nodos⁸⁵.

Uma estratégia similar à anteriormente descrita foi avaliada, visando à eliminação do sistema avidina-biotina. O novo lipossoma azul radiomarcado com ^{99m}Tc possui uma alta carga superficial negativa, o que favorece a união aos macrófagos presentes nos nodos linfáticos. Os estudos pré-clínicos foram realizados em porcos comparando o desempenho deste radiotraçador com o enxofre coloidal- ^{99m}Tc . Observou-se uma maior retenção dos lipossomas no nodo mais próximo do local de injeção. Este lipossoma com agentes de detecção visual e radioativo evita as problemáticas de diferenças cinéticas da depuração dos dois agentes desde o ponto de injeção (corante/rápida e radiocolóide/demorada), além de diminuir o número de injeções por paciente⁸⁶.

Estes resultados pré-clínicos revelam a versatilidade de alternativas dos sistemas lipossomais na detecção de LNS. Entretanto, ainda é necessário

que se realizem ensaios clínicos para demonstrar a sua eficácia. Outras possíveis atenuantes para o uso em humanos e o sucesso comercial destes preparados radiofarmacêuticos são a complexidade do processo de obtenção com relação aos radiocolóides de ^{99m}Tc e a pobre estabilidade em condições de armazenamento.

3.7.2 Nanopartículas com unidades de manose

A utilização de nanopartículas radiomarcadas com tecnécio com especificidade para receptores na superfície dos macrófagos pode ser a alternativa mais promissora para a substituição dos radiocolóides de ^{99m}Tc , como radiofármacos de eleição na detecção de LNS. As propriedades comuns para esta nova classe de radiofármacos são rápida migração do ponto de injeção e acumulação acentuada e preferencial no LNS. A inclusão de manose na estrutura de radiotraçadores tem favorecido o mecanismo ativo de retenção nos nodos linfáticos, razão pela qual as desvantagens do emprego de partículas pequenas são minimizadas.

3.7.2.1 Receptor de manose

O receptor de manose é um receptor transmembranaral de 175 kDa expresso nos macrófagos, nas células dendríticas, nas células do endotélio linfático e hepático, no baço e nas células mesangiais dos rins^{87,88}. A estrutura primária deste receptor é composta por 11 domínios (FIG. 5)^{89,90}.

FIGURA 5- Diagrama da estrutura de domínios no receptor de manose. FNII: domínio do tipo fibronectina II, DLTC: domínio de lectina tipo-C, C: domínio citoplasmático. Modificada da referência 90.

O receptor de manose é uma proteína de membrana tipo-I, possuindo um domínio citoplasmático responsável pela internalização do receptor e seu retorno à superfície celular. O domínio N-terminal deste receptor liga-se a sacarídeos sulfatados, enquanto o domínio de fibronectina II se liga ao colágeno. Os oito domínios de reconhecimento de carboidratos (lectinas tipo-C) mediam a união do receptor de manose com açúcares terminados em manose, fucose ou N-acetilglucosamina. A afinidade deste pela manose e a fucose é maior que pela N-acetilglucosamina, (ligações dependentes do íon Ca^{2+})⁹¹.

O receptor de manose é considerado um receptor endocítico porque em estado estacionário somente 10% a 30% destes encontram-se na superfície celular. Ele pode se ligar a substâncias tanto exógenas como endógenas⁸⁸. Por esta razão os receptores de manose tomam parte em diferentes processos tanto homeostáticos como imunológicos⁹². Existem evidências da inclusão do receptor de manose no processamento e apresentação de antígenos, na fagocitose e endocitose, nas cadeias de sinalizações intracelulares, e na migração celular^{88,90}.

3.7.2.2 Radiotraçadores

O primeiro composto para comercialização desta nova geração de radiofármacos para detecção de LNS é o Lymphoseek® (Neoprobe Corporation) que já se encontra em ensaios clínicos fase III. Ele é composto por um esqueleto de dextran com múltiplas unidades de manose (42) e ligado sinteticamente ao agente quelante DTPA (2) para posterior quelação ao núcleo de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (FIG. 6). A massa molecular do conjugado é aproximadamente igual a 28,2 kDa e com um diâmetro molecular médio de 7 nm que permite uma melhor difusão pelos capilares linfáticos e sanguíneos⁹³.

FIGURA 6- Estrutura molecular do Lymphoseek. Modificada da referência 93.

Os estudos pré-clínicos do Lymphoseek feitos em coelhos e porcos demonstraram que este radiotraçador é depurado mais rapidamente do sítio de injeção que o ^{99m}Tc -enxofre coloidal filtrado (50 -200 nm) e ao mesmo tempo é sugerido seu uso em cânceres gastrointestinais e de próstata^{94,95,96}. Também, foi confirmada uma alta retenção no primeiro linfonodo por um intervalo de 3 horas, assim como uma diminuição na captação dos outros nodos da cadeia linfática com relação ao ^{99m}Tc -enxofre coloidal filtrado. Em síntese, os estudos pré-clínicos evidenciaram que o Lymphoseek pode ser aplicável tanto em cirurgias abertas como laparoscópicas sem interferência da radioatividade do local de injeção⁹⁷.

Os estudos clínicos fases I e II em câncer de mama e melanoma têm sido bem sucedidos, tomando como referência novamente o ^{99m}Tc -enxofre coloidal filtrado^{97,98,99,100,101}.

Em estudos associados ao mesmo projeto de pesquisa, as unidades de DPTA na estrutura do Lymphoseek foram substituídas pelo agente S-acetil-mercaptoptriglicina (MAG_3) com o intuito de aproveitar a maior estabilidade mostrada pelo sistema MAG_3 na quelação do ^{99m}Tc ¹⁰². Os resultados pré-clínicos iniciais foram satisfatórios, mas as pesquisas complementares em animais não continuaram.

As outras moléculas avaliadas com especificidade pelos receptores de manose na identificação de LNS são conjugados de albumina sérica humana (ASH). A ASH possui duas características que a tornam uma molécula apropriada para esta finalidade diagnóstica: seu diâmetro molecular (eixos menores, 6 nm; eixos maiores, 8 nm) e fácil conjugação com outras moléculas através dos grupos

aminos das lisinas desta proteína. A ASH tem o tamanho mínimo que impede a drenagem direta de partículas ao sangue pelos capilares sanguíneos. Deste modo, sua velocidade de drenagem pelo sistema linfático será máxima, possibilitando uma rápida identificação do LNS¹⁰³.

São dois os conjugados de albumina desenvolvidos até a data atual. Um deles foi sintetizado a partir do agente quelante do ^{99m}Tc, 6-hidrazinonicotinamida (HYNIC) e um derivado cianometilado da manose. A massa molecular do conjugado de ASH é de 79,9 kDa, com 44 unidades de manose e menos de uma unidade de HYNIC por molécula de ASH (FIG. 7). Os estudos em ratos evidenciaram uma alta captação no linfonodo popliteal deste novo conjugado radiomarcado com ^{99m}Tc e baixa captação nos outros nodos linfáticos ao comparar com o conjugado de ASH-HYNIC sem manose e outro colóide comercialmente disponível (Nanocis, 100 nm) em tempos de 30 min, 1 hora e 6 horas, para uma dose injetada de $1 \cdot 10^{-12}$ mol¹⁰⁴. Entretanto, não há na literatura relatos de estudos clínicos com este radiotraçador.

FIGURA 7- Estrutura do conjugado ASH-HYNIC-manose. Modificada da referência ¹⁰⁴.

O outro radioconjugado de Tecnécio-99m conhecido como albumina de soro humano neomanosilada (MSA), possuindo 15,9 e 19,4 unidades de manose e grupos tióis por molécula de ASH¹⁰³, encontra-se em estudos clínicos para sua utilização como agente diagnóstico em metástases de câncer de pulmão em fase I de células não pequenas. Uma alta especificidade (95,2%) e taxa de falsos negativos nula (0%) (alta sensibilidade) foram referidas neste ensaio clínico. Ao mesmo tempo o radiotraçador pode ser injetado antes do início da intervenção cirúrgica ou durante a mesma, permitindo reduzir o tempo no procedimento e o incômodo do paciente e dos profissionais¹⁰⁵. Além das boas propriedades deste possível radiofármaco, ele ainda tem como vantagem ser facilmente sintetizado

através de duas etapas. A primeira é a conjugação de um derivado da manose (α -L-manose-piranosil-fenilisotiocianato) à ASH e segunda é uma redução das pontes dissulfeto intramoleculares, estabelecidas entre os grupos tióis de duas cisteínas da ASH, garantindo assim, a coordenação ao ^{99m}Tc (FIG. 8)¹⁰³. Esta técnica de marcação de moléculas com ^{99m}Tc tem sido previamente utilizada com sucesso em anticorpos e outros conjugados de ASH^{106, 107}.

FIGURA 8- Esquema do procedimento de síntese do MAS. Modificada da referência 103.

3.8 Técnicas de marcação de biomoléculas com ^{99m}Tc

Entre os radiofármacos utilizados na medicina nuclear, os mais amplamente usados são os do radioisótopo ^{99m}Tc . O uso preferencial destes radiotraçadores deve-se às ideais propriedades nucleares e à disponibilidade do ^{99m}Tc . Entretanto, a química de marcação constitui um dos principais desafios no desenvolvimento de radiotraçadores com este isótopo, por ser o tecnécio um elemento de transição, que pode existir em 8 estados de oxidação diferentes, de (VII) a (-I). Por essa razão, para a sucedida obtenção destes radioagentes é necessário o conhecimento da química de coordenação do tecnécio e da estrutura dos agentes quelantes¹⁰⁸.

3.8.1 Classificação dos radiofármacos

Os radiofármacos de tecnécio podem ser classificados baseados na função que tem o isótopo na ação biológica do complexo formado. Eles podem

ser radiofármacos tecnécio-essencial ou tecnécio-marcado. No caso dos agentes essenciais, o átomo de tecnécio é um componente crítico do fármaco, sendo um elemento determinante na estrutura e nas propriedades físico-químicas da molécula, definindo portanto, a localização ou destino biológico. Estes radiofármacos são geralmente complexos de baixa massa molecular e a biodistribuição destes é estritamente definida pelo fluxo sanguíneo (perfusão). Eles estão direcionados ao estudo da função cardíaca, à fagocitose, depuração dos hepatócitos, filtração glomerular e a absorção óssea. Um exemplo desta classe de compostos é o ^{99m}Tc -Sestamibi, $[\text{Tc}(\text{CNR})_6]^+$ ($\text{R}=\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OCH}_3$) onde o cátion $^{99m}\text{Tc}^+$ garante a coordenação de unidades de 2-metoxi-2-metilisonitrila para assim lhe atribuir uma alta lipofilicidade superficial à esfera de coordenação (FIG. 9). Este radiofármaco é utilizado em diagnóstico por imagem da função do miocárdio¹⁰⁹.

FIGURA 9- Estrutura do radiofármaco ^{99m}Tc -Sestamibi

Nos radiofármacos ^{99m}Tc -marcados, o átomo do tecnécio é simplesmente utilizado como um elemento rastreador do fármaco possibilitando conhecer o mecanismo farmacocinético e farmacodinâmico do produto em associação. Geralmente o ^{99m}Tc nesta classe de radiotraçadores está ligado a uma molécula com especificidade biológica (peptídeo, anticorpo) de tal maneira que não interfira nas propriedades fisiológicas das espécies biologicamente ativas¹¹⁰.

Uma característica fundamental que devem possuir os radiofármacos de ^{99m}Tc é uma ligação estável do radionuclídeo à biomolécula. A dissociação *in vivo* do radiometal pode conduzir a uma imagem de baixa qualidade, uma

desnecessária exposição à radiação para o paciente e uma imprecisa interpretação da imagem¹¹⁰.

O ^{99m}Tc é produzido a partir de um gerador de ^{99}Mo . Ele é eluído em solução salina na forma de $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ (pertechnetato de sódio). Esta espécie de ^{99m}Tc possui estado de oxidação VII, no qual o ^{99m}Tc é praticamente inerte, razão pela qual tem que ser reduzido. O novo estado de oxidação vai depender do agente redutor, o agente quelante e as condições da reação. A rica e diversa química redox do tecnécio torna difícil o controle do estado de oxidação e a estabilidade dos quelatos de ^{99m}Tc . Ao mesmo tempo, permite oportunidades para modificar a estrutura e as propriedades dos complexos de tecnécio mediante a seleção de agentes quelantes com alta afinidade por um estado de oxidação específico do radioelemento¹⁷.

3.8.2 Sistema de marcação $[\text{TcO}(\text{N}_x\text{S}_{4-x})]$

O pertechnetato é um oxidante débil, em meio ácido ele é reduzido por agentes, como o cloreto estanoso (SnCl_2). O íon $^{99m}\text{TcO}_4^-$ quando é reduzido na presença de ligantes, comumente não cede todos os átomos de oxigênio, formando os núcleos $[\text{TcO}]^{3+}$ ou $[\text{TcO}_2]^+$. Os complexos que contêm o núcleo $[\text{TcO}]^{3+}$ tomam configurações espaciais octaédrica hexa-coordenada ou piramidal quadrada penta-coordenada. Em presença de ligantes adequados, outros núcleos de menor estado de oxidação podem ser obtidos (IV, III, I).

O núcleo $[\text{TcO}]^{3+}$ tem sido um dos mais estudados. Neste o Tc tem estado de oxidação (V), adotando geralmente a geometria piramidal quadrada com uma dupla ligação com o átomo de oxigênio na posição apical. Este núcleo é estabilizado por ligantes doadores de elétrons σ e π dos tipos amino, amido e tiolato. Isto justifica o considerável número de trabalhos relacionados com a estabilização mediante ligantes tetradentados N_xS_{4-x} para ocupar a base plana da estrutura piramidal. Entre os ligante N_xS_{4-x} desenvolvidos encontram-se: os N_3S triamidomonotióis, os N_2S_2 diamidoditióis (DADS), os N_2S_2 monoamino-monoamidotióis (MAMA) assim como o quelante bifuncional MAG_3 (FIG. 10 A). Entretanto, como esta família de compostos $[\text{TcO}(\text{N}_x\text{S}_{4-x})]$ inevitavelmente conduz à obtenção de isômeros *syn* e *anti* (FIG. 10 B), com diferentes propriedades farmacocinéticas, outros tipos de ligantes tem sido desenvolvidos, como o N_4 ,

N_xP_y e S_xP_y . A alternativa de utilizar combinações de ligantes tri e monodentados para estabilizar a conformação geométrica (sistema 3 + 1) tem gerado complexos com reações de substituição *in vivo*, porque o ligante monodentado é fácil de substituir por grupos ligantes competidores, formando desta maneira uma estrutura de concha fechada¹¹¹.

FIGURA 10- A: Estrutura do $[TcO(MAG_3H)]^-$. B: Isômeros syn e anti da classe de compostos $[TcO(N_xS_{4-x})]$. Modificada da referência ¹¹¹.

3.8.3 Sistema de marcação $[TcN]^{2+}$

Outra alternativa avaliada é o núcleo de nitrido $[TcN]^{2+}$. Este núcleo possui uma maior estabilidade redox que o $[TcO]^{3+}$, mas sua utilização não parece ser muito vantajosa, desde que há a necessidade de passos adicionais na preparação do precursor $[TcN]^{2+}$ a partir do íon TcO_4^- ¹¹¹.

3.8.4 Sistema de marcação HYNIC

O agente quelante bifuncional HYNIC tem sido muito utilizado na marcação com ^{99m}Tc devido a fácil conjugação à biomoléculas. Os complexos do HYNIC são quimicamente robustos, devido à dupla ligação estabelecida entre o isótopo e a o nitrogênio (agrupamento hidrazina) disponível no HYNIC (FIG. 11). Esta união ocorre provavelmente por uma reação de condensação entre o $[TcO]^{3+}$ e o HYNIC. O ^{99m}Tc pode-se também coordenar ao nitrogênio do anel piridínico deste agente quelante funcional¹¹².

No entanto, para completar os sítios de coordenação do tecnécio é necessário o uso de coligantes (tricina), fato que confere uma falta de homogeneidade molecular pela possibilidade de formação de múltiplos isômeros. Este constitui o principal desafio para uma maior aplicabilidade clínica deste sistema de quelação do ^{99m}Tc , devido à presença de várias entidades químicas com possíveis comportamentos farmacológicos diversos¹¹².

FIGURA 11- $[^{99m}\text{Tc}(\text{HYNIC})(\text{tricina})_2]$. Modificada da referência 112.

3.8.5 Sistema de marcação $[^{99m}\text{Tc}(\text{O}_2\text{H})_3(\text{CO})_3]^+$

Com o intuito fundamental de se obter um sistema de quelação organometálico de ^{99m}Tc altamente inerte *in vivo*, preparado em meio fisiológico com alta pureza e com um curto tempo de reação, foi desenvolvido um precursor organometálico, denominado de ^{99m}Tc -tricarbonila, $[^{99m}\text{Tc}(\text{O}_2\text{H})_3(\text{CO})_3]^+$ ¹¹³. Ele é obtido por métodos sintéticos simples, a partir do pertecnetato a pressão atmosférica (95°C / 20-30 min), com uma corrente de CO em presença de um agente redutor (NaBH_4), ou através da adição somente do $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ a um kit liofilizado comercial para este propósito composto por 4,5 mg de $\text{Na}_2(\text{H}_3\text{BCO}_2)$, 2,9 mg de $\text{B}_4\text{Na}_2\text{O}_7$, 7,8 mg Na_2CO_3 , 9,0 mg $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ (Isolink, Mallinckrodt-Tyco Med) (FIG. 12). O $[^{99m}\text{Tc}(\text{O}_2\text{H})_3(\text{CO})_3]^+$, é solúvel em água e as três moléculas de água da estrutura podem ser facilmente substituídas. O núcleo $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ é quimicamente forte e possui uma boa estabilidade sob condições agressivas¹¹⁴.

FIGURA 12- Vias de obtenção do precursor $[\text{Tc}(\text{O}_2\text{H})_3(\text{CO})_3]^+$. (1) utilizando fluxo de monóxido de carbono (método inicial), (2) empregando boranocarbamato (Isolink, kit comercial). Modificada da referência 114.

O $[\text{Tc}(\text{O}_2\text{H})_3(\text{CO})_3]^+$ pode se unir a ligantes mono, bi e tridentados, porém os dois últimos conferem uma alta estabilidade termodinâmica. Entretanto, os ligantes tridentados são ainda mais vantajosos pela alta velocidade de quelação do precursor e melhor desempenho biológico (menor ligação às proteínas do plasma, rápida depuração sanguínea e dos órgãos de excreção). Uma grande variedade de ligantes podem ser utilizados para a marcação de radiotraçadores baseados no íon aquoso $[\text{Tc}(\text{O}_2\text{H})_3(\text{CO})_3]^+$, tais como os aminoácidos histidina e cisteína. Este último é funcionalizado pelo enxofre aumentando consideravelmente a velocidade de complexação do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ em relação ao aminoácido nativo. Peptídeos com caudas de histidinas também têm sido utilizados com sucesso na obtenção de radiotraçadores com alta atividade específica¹¹⁵.

Pelas adequadas propriedades deste precursor do $^{99\text{m}}\text{Tc}$, seu uso está ganhando um espaço cada vez maior na marcação de moléculas^{116,117}.

3.9 Considerações finais

No desenho de uma nova radiomolécula de Tecnécio-99m bioespecífica para detecção de LNS deve-se considerar um esqueleto estrutural biocompatível de baixo custo, no qual seja possível ligar as unidades responsáveis pela união ao alvo biológico e as envolvidas na quelação do radioisótopo. O dextran constitui um polímero ideal para esta finalidade, ele está disponível para uso clínico em uma grande variedade de tamanhos moleculares¹¹⁸ o que permite modular a velocidade migração desde o sítio de injeção. Entretanto, para garantir uma forte ligação do tecnécio, e assim evitar a transquelação do isótopo *in-vivo*, usando o núcleo $[\text{Tc}(\text{O}_2\text{H})_3(\text{CO})_3]^+$, é necessário modificar quimicamente este polímero, já que o íon aquoso tri-carbonílico não reage com os grupos hidroxilas dos polissacarídeos¹¹⁹. A utilização de cisteínas-S-modificadas tem demonstrado ser um excelente quelante tridentado para o $[\text{Tc}(\text{O}_2\text{H})_3(\text{CO})_3]^+$ na marcação de biomoléculas¹²⁰. Como elemento de especificidade biológica, sugere-se o monossacarídeo manose, pela comprovada afinidade pelos receptores em células presentes nos linfonodos^{91, 97}. Por essa razão as propostas moleculares avaliadas neste trabalho são conjugados de dextran-S-cisteína-manose radiomarcados com o precursor $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tricarbonila.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Equipamentos

- ◆ Agitador de tubos, modelo AP56 – Phoenix, Brasil;
- ◆ Aquecedor IKA® RH-KT/C – IKA-Werke, Alemanha,
- ◆ Aquecedor Thermomixer comfort R (0-100°C) - Eppendorf®, EUA;
- ◆ Balança analítica, modelo M-220 - Denver Instruments, EUA;
- ◆ Bomba de vácuo, modelo 825 T - Fisaton, Brasil;
- ◆ Calibrador de doses, modelo CRC-15R - Capintec Inc., EUA;
- ◆ Capela com sistema de exaustão - BRASLAB Equipamentos para Laboratório Ltda, Brasil;
- ◆ Contador automático tipo poço com cristal NaI (TI), modelo E5002, cobra II, auto-gamma - Packard, Illinois, EUA;
- ◆ Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência equipado com os seguintes módulos:
 - Bomba, modelo LC-10 AT VP - Shimadzu, Japan,
 - Controlador, modelo SCL-10 AVP - Shimadzu, Japan,
 - Automostrador, modelo SIL-10 AF - Shimadzu, Japan,
 - Estufa para colunas, modelo CTO- 10 AVP - Shimadzu, Japan,
 - Detector de radioatividade, modelo 1000/2000 - Shell Jr., EUA
 - Computador DELL celeron 2,4 GHz com software Shimadzu Class-VP version 6.14 SP2 – Shimadzu, Japan;
- ◆ Gama-câmara equipada com os seguintes módulos:
 - Colimador - Mediso, Hungria.
 - Detector Gama - Mediso, Hungria.
 - Software Console TH22 v.7.02 - Mediso, Hungria.
 - Software InterviewXP® v1.05.014 - Mediso, Hungria.
- ◆ Medidor de pH, modelo DM-31 - Digimed, Brasil;
- ◆ Purificador de água Elix 10 UV - Millipore, EUA;
- ◆ Scanner de radioatividade, modelo AR-2000 - Bioscan, EUA.

4.2 Materiais

- ◆ Coluna de separação de fase reversa para Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), Symetry[®]C18 (RP-C18), 4,6 × 250 mm, 5µm - Waters, EUA;
- ◆ Colunas de exclusão molecular PD-10, Sephadex G-25 (1000 – 5000 Da) - Amershan, Biosciences, Suíça;
- ◆ Fitas cromatográficas de celulose # 1, 58 × 68 cm - Whatman, Reino Unido;
- ◆ Fitas cromatográficas de celulose # 3 MM, 58 × 68 cm - Whatman, Reino Unido;
- ◆ Fitas cromatográficas de camada delgada ITLC-SG (Instant Thin Layer Chromatography - Silica Gel), 5 × 20 cm – Pall Corporation, EUA;
- ◆ Papel indicador de pH, Universalindikator pH 0-14 – Merck, Alemanha;
- ◆ Membranas filtrantes hidrofílicas 0,22 µm, GSWP-04700 - Millipore[®], EUA;
- ◆ Membranas filtrantes hidrofóbicas 0,22 µm, FGLP-04700 - Millipore[®], EUA;
- ◆ Pipetas automáticas de 10, 100, 1000 µL - Eppendorf[®], EUA;
- ◆ Seringas de 1, 3 e 5 mL - B&D, EUA;
- ◆ Seringas de insulina de 0,5 e 1,0 mL - B&D, EUA;
- ◆ Tubos reacionais de polipropileno de 1,5 mL, MCT-150-C - Axygen Scientific[®], EUA;
- ◆ Vidrarias em geral e instrumentos cirúrgicos.

4.3 Reagentes

- ◆ 2-propileno-S-cisteína-dextrans (16,6 kDa e 30 kDa) e 2-propileno-S-di-cisteína-manose-dextrans (20 kDa e 30kDa) liofilizados, pureza >95%-National Center for Scientific Research “Demokritos”, Grécia (TAB. 2 e FIG. 13).
- ◆ Acetona, grau de pureza p. a. - Merck, Alemanha;
- ◆ Acetonitrila, grau de pureza CLAE - Merck, Alemanha;
- ◆ Ácido clorídrico, grau de pureza 37% p.a. - Merck, Alemanha;

- ◆ Ácido trifluoracético, grau de pureza p.a. - Merck, Alemanha;
- ◆ Cisteína, grau de pureza 98% - Sigma Aldrich, Alemanha;
- ◆ Cloreto de sódio, grau de pureza p. a. - Merck, Alemanha;
- ◆ Corante (Azul patente V) - Guerbet Prod. Radiológicos Ltda, Brasil;
- ◆ Éter dietílico, grau de pureza p.a. - Merck, Alemanha;
- ◆ Fosfato de sódio monobásico - Merck, Alemanha;
- ◆ Fosfato disódico anidro - Merck, Alemanha;
- ◆ Gás nitrogênio, grau de pureza 99,99% - White Martins, Brasil;
- ◆ Heparina (Liquemine®), solução 5000 U.I./mL - Roche, Brasil;
- ◆ Histidina, grau de pureza 99% - Sigma Aldrich, Alemanha;
- ◆ Kit liofilizado Ácido Fítico-Fitato (20 mg ácido fítico; 1 mg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) - DIRF/IPEN/CNEN-SP, Brasil;
- ◆ Kit liofilizado Dextran-500 (100 mg dextran 50 kDa; 1,5 mg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) - DIRF/IPEN/CNEN-SP, Brasil;
- ◆ Kit liofilizado Isolink (4,5 mg $\text{Na}_2(\text{H}_3\text{BCO}_2)$; 2,9 mg $\text{B}_4\text{Na}_2\text{O}_7$; 7,8 mg Na_2CO_3 ; 9,0 mg $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_{64}$) - Tyco Healthcare, EUA
- ◆ Metanol, grau de pureza p. a. - Merck, Alemanha;
- ◆ Octanol, grau de pureza p.a. - Merck, Alemanha;
- ◆ Radioisótopo tecnécio-99m em forma de $[\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]$, obtido do gerador molibdênio-99/tecnécio-99m (DIRF/IPEN/CNEN-SP), Brasil;
- ◆ Solução fisiológica estéril (cloreto de sódio 0,9%) – Soreq N.R.C. Radiopharmaceuticals, Israel;
- ◆ Uretana, grau de pureza 99% - Sigma Aldrich, EUA.

TABELA 2- Detalhes estruturais dos conjugados de dextran considerados neste estudo.

Composto	Peso molecular (kDa)	Número de cisteínas	Número de manoses	Abreviações
2-propileno-S-cisteína-dextran	16,6	30	-	DC-1
2-propileno-S-cisteína-dextran	30	45	-	DC-2
2-propileno-S-di-cisteína-manose-dextran	20	6	24	DCM-1
2-propileno-S-di-cisteína-manose-dextran	30	9	36	DCM-2

FIGURA 13- Estrutura química dos conjugados 2-propileno-S-cisteína-dextrans (A) e 2-propileno-S-di-cisteína-manose-dextrans (B).

4.4 Animais

- ♦ Ratos sadios da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar (fêmeas, 150-200 g) - Biotério IPEN/CNEN-SP, Brasil;

4.5 Métodos

4.5.1 Preparação do precursor [^{99m}Tc(OH₂)₃(CO)₃]⁺

O precursor [^{99m}Tc(OH₂)₃(CO)₃]⁺ foi preparado segundo as indicações do fabricante. Ao kit de Isolink foi adicionado 1 mL de Na^{99m}TcO₄ (925 MBq). A mistura foi aquecida a 100 °C durante 20 minutos. A reação foi interrompida em banho de gelo e o pH foi neutralizado com 300 µL de uma solução ácida [tampão fosfato 1M (pH= 7,2) / HCl 1M (1:2)] previamente nitrogenada.

4.5.2 Estratégia de otimização para a marcação do DC-1 a partir do $^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$

Para otimizar a marcação do DC-1 foi utilizada uma estratégia em três etapas:

- ♦ Estudo preliminar da razão massa do DC-1 e atividade do $^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$
- ♦ Otimização do tempo e a temperatura da radiomarcagem do DC-1
- ♦ Otimização da atividade específica. Estudo do efeito da razão quantidade do DC-1 e atividade do $^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$

A representação gráfica da estratégia pode ser observada na [FIG 14](#).

FIGURA 14. Representação gráfica da metodologia empregada na otimização da marcação do DC-1.

4.5.2.1 Estudo preliminar da razão massa do DC-1 e a atividade do $^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$

Cem microlitros do precursor $^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ (37 MBq) foram adicionados a tubos reacionais que continham diferentes volumes da solução aquosa do conjugado de dextran DC-1 ($6,0 \cdot 10^{-5}$ M), na faixa de 10 a 50 μL . As reações de marcação foram realizadas a 80 °C durante 30 minutos, após homogeneização inicial da mistura.

4.5.2.2 Otimização do tempo e temperatura da radiomarcção do conjugado DC-1

Um planejamento experimental fatorial a três níveis (3^2) foi utilizado como ferramenta estatística para pesquisar os efeitos do tempo e a temperatura sobre a pureza radioquímica. Os níveis estudados para o tempo e a temperatura foram 10, 20, 30 minutos e 70, 85, 100 °C respectivamente. Todas as radiomarcções realizaram-se em tubos reacionais contendo uma mistura de 20 µL de solução aquosa de DC-1 ($6,0 \cdot 10^{-5}$ M) e 100 µL do $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ (37 MBq).

4.5.2.3 Otimização da atividade específica. Estudo da razão quantidade do DC-1 e a atividade do $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$

Em 8 tubos reacionais foram colocados 20 µL de soluções aquosas do conjugado DC-1 com concentrações de $6,0 \cdot 10^{-5}$ (20 µg, 1205 pmol); $4,5 \cdot 10^{-5}$ (15 µg, 904 pmol); $3,0 \cdot 10^{-5}$ (10 µg, 602 pmol); $1,5 \cdot 10^{-5}$ (5 µg, 301 pmol); $3 \cdot 10^{-6}$ (1 µg, 60 pmol); $1,8 \cdot 10^{-6}$ (0,6 µg, 36 pmol); $9,0 \cdot 10^{-7}$ (0,3 µg, 18 pmol) e $3,0 \cdot 10^{-7}$ M. (0,1 µg, 6 pmol). Posteriormente foi adicionado a cada tubo 100 µL do precursor $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ (74 MBq). Após agitação intensa das misturas, a reação de marcação foi realizada a 100 °C durante 30 min.

4.5.3 Radiomarcção dos conjugados DC-2, DCM-1, DCM-2

Para a marcação do derivado de dextran DC-2 foram utilizados 20 µL de uma solução aquosa do conjugado ($3,3 \cdot 10^{-5}$ M) e para os conjugados 2-propileno-S-di-cisteína-manose-dextran, DCM-1 e DCM-2, também foram utilizados 20 µL de soluções com concentrações de $5,0 \cdot 10^{-5}$ e $3,3 \cdot 10^{-5}$ M respectivamente. A massa utilizada para todos os compostos foi de 20 µg.

Para cada marcação foi adicionado 100 µL do $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ (74 MBq). Uma vez homogeneizada as misturas, a radiomarcção ocorreu a 100 °C. O tempo de reação para o DC-2 foi de 30 minutos, e para o DCM-1 e DCM-2 de 60 min.

4.5.4 Avaliação radioquímica dos conjugados de dextran marcados com ^{99m}Tc

4.5.4.1 Pureza radioquímica por combinação das cromatografias em camada delgada e papel

A pureza radioquímica dos conjugados radiomarcados foi determinada usando uma combinação de cromatografias em camada delgada [ITLC-SG - metanol/HCl (99:1)] e papel [Whatman #1 - Acetona]. As cubas para a realização destas cromatografias foram previamente saturadas com os referidos solventes. Depois dos solventes percorrerem por capilaridade 10 cm desde o ponto de aplicação das amostras (a 1 cm a cima do nível do solvente) , as fitas foram retiradas das cubas, secas e analisadas em um radiocromatógrafo.

A quantificação das porcentagens dos radioconjugados ^{99m}Tc -2-propileno-S-cisteína-dextran (^{99m}Tc -DC-1 ou ^{99m}Tc -DC-2) e ^{99m}Tc -2-propileno-S-di-cisteína-manose-dextran (^{99m}Tc -DCM-1 ou ^{99m}Tc -DCM-2) assim como das impurezas $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ e $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ foi realizada a partir da atividade relativa nos correspondentes fatores de retenção para cada espécie (TAB. 3). As equações matemáticas (1; 2; 3) para definir o teor (%) de cada uma das entidades radioativas foram as seguintes:

$$[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^- [\%] = \left\{ \frac{\text{Atividade}_{[\text{Rf}=1]}}{\text{Atividade}_{\text{total}}} \right\}_{\text{Whatman\#1}} \cdot 100 \quad (1)$$

$$[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3] [\%] = \left\{ \frac{\text{Atividade}_{[\text{Rf}=1]}}{\text{Atividade}_{\text{total}}} \right\}_{\text{ITLC-SG}} \cdot 100 - [\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^- [\%] \quad (2)$$

$$[\text{}^{99m}\text{Tc-DC}] \text{ ou } [\text{}^{99m}\text{Tc-DCM}] [\%] = 100 - [\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3] [\%] + [\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^- [\%] \quad (3)$$

Onde:

Atividade $_{[\text{Rf}=1]}$ é a atividade no $\text{Rf}=1$

Atividade_{total} é a atividade total da fita cromatográfica

{ }_{ITLC-SG ou Whatman#1} representa que o cálculo é feito para o sistema ITLC-SG ou Whatman#1

$[\text{}^{99m}\text{Tc-DC}]$ ou $[\text{}^{99m}\text{Tc-DCM}]$ [%] representam as porcentagens dos radioconjugados ^{99m}Tc -DC-1, ^{99m}Tc -DC-2 e ^{99m}Tc -DCM-1, ^{99m}Tc -DCM-2

TABELA 3- Fator de retenção (R_f) das diferentes espécies radioquímicas nos sistemas cromatográficos de camada delgada e papel.

Espécie Radioquímica	R_f	
	ITLC-SG	Whatman #1
	metanol/HCl (99:1)	Acetona
$^{99m}\text{Tc-2-DC-1}$ ou $^{99m}\text{Tc-2-DC-2}$	0	0
$^{99m}\text{Tc-2-DCM-1}$ ou $^{99m}\text{Tc-2-DCM-2}$	0	0
$[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$	1	0
$[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$	1	1

4.5.4.2 Pureza radioquímica através da cromatografia de exclusão por tamanho

A cromatografia de exclusão por tamanho foi realizada em colunas PD-10, previamente equilibradas com água, como controle alternativo para a determinação da pureza radioquímica. Amostras de 0,1 mL dos radiotraçadores (5 μg) foram aplicadas no topo da coluna e a eluição foi feita com água destilada. Frações consecutivas (0,5 mL) foram coletadas e a radioatividade foi determinada em um contador γ tipo poço.

4.5.4.3 Pureza radioquímica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Outro método utilizado para a quantificação da eficiência radioquímica da marcação assim como as impurezas ($[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$, $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$) foi a CLAE em fase reversa. A análise foi realizada em uma coluna C-18 com um fluxo constante de 1 mL/min. O volume de injeção das amostras foi de 10 μL (200 ng). Os solventes utilizados na CLAE foram água com ácido trifluoroacético (0.1% v/v) (Solvente A) e acetonitrila/ ácido trifluoroacético (0,1% v/v) (Solvente B). O gradiente cromatográfico começou com uma composição de 95%A-5%B e de 1 a 25 minutos a composição foi mudando linearmente até 30%A-70%B, para finalmente dos 25 até os 30 minutos atingir uma composição de 5%A-95%B.

4.5.5 Cálculo da atividade específica

As atividades específicas dos radioconjugados de dextran foram calculadas pela equação (4), que descreve matematicamente a definição dada deste parâmetro pela Farmacopéia Britânica¹²¹.

$$AE = \frac{A \cdot PR}{M \cdot 100} \quad (4)$$

Onde: AE é a atividade específica do radioconjugado (MBq/μg ou MBq/nmol); PR é a pureza radioquímica; A é a atividade presente na solução que contém o radiotraçador (MBq) e M é a massa (μg) ou quantidade de substância (nmol) do conjugado de dextran nesta solução.

4.5.6 Estabilidade radioquímica dos radioconjugados de dextran

A estabilidade radioquímica dos radiotraçadores foi observada por um período de 6 horas à temperatura ambiente (25 °C). A pureza radioquímica foi avaliada no tempo zero hora (imediatamente após a marcação dos conjugados de dextran) e novamente depois de 6 horas. A combinação das cromatografias em camada delgada [ITLC-SG - metanol/HCl (99:1)] e papel [Whatman #1 - Acetona] foi utilizada para avaliar as possíveis mudanças radioquímicas.

4.5.7 Estudos *in vitro* de transquelação frente à cisteína e à histidina

A transquelação do ^{99m}Tc ligado aos conjugados de dextran à cisteína e à histidina foi estudada em soluções de tampão fosfato-salina 0,1 M, pH de 7,4 com concentrações dos aminoácidos de 264 μM e 94 μM respectivamente, a 37 °C durante 90 minutos. A razão molar aminoácido/^{99m}Tc- dextran modificado foi de 1000:1. Utilizaram-se amostras em branco para eliminar os possíveis efeitos do tampão na estabilidade dos radiocompostos.

4.5.8 Determinação do coeficiente de partição dos radioconjugados

Para determinar a lipofilicidade, cada um dos radiotraçadores foi previamente purificado (> 99%) através da cromatografia de exclusão molecular em colunas PD-10 (uniram-se as duas frações eluídas com maior atividade dentro do pico correspondente a cada radioconjugado, formando uma amostra de volume 1mL e atividade de 8.1-10 MBq). Amostras de 200 μL (1,6-2,0 MBq) dos radiotraçadores purificados foram adicionadas a frascos contendo uma mistura n-octanol/água (3/3 mL) preparada com 72 horas de antecedência. Após agitação intensa durante 1 min, o sistema foi deixado em repouso por 30 min. Após este período cada frasco foi centrifugado a 5000 x g por 5 min para uma separação quantitativa. Retirou-se amostras de 200 μL de cada fase para medição das atividades em um contador γ tipo poço. Cada determinação foi realizada em

triplicata. O coeficiente de partição foi expresso como $\log_{10} P$ e calculado segundo a equação (5)¹²²:

$$\log_{10} P = \log_{10} \frac{\text{Radioatividade na fase n-octanol}}{\text{Radioatividade na fase aquosa}} \quad (5)$$

4.5.9 Estudos biológicos

Os estudos *in vivo* foram realizados com aprovação do Comitê de Ética do IPEN/CNEN-SP ([Anexo 1](#)).

Em todos os experimentos, os animais foram pesados e anestesiados com 400 μL de uma solução de uretana 16,7 % (m/m). Os radiotraçadores foram administrados na planta da pata direita por via subcutânea. O volume, a atividade, a quantidade injetada, assim como, a realização de uma massagem local após a injeção, variaram dependendo do experimento específico. O número de animais utilizados em cada experimento encontram-se detalhados no [Anexo 2](#).

Foram injetados, 5 min antes do sacrifício, 50 μL do corante Azul Patente V no mesmo sítio de injeção do radiotraçador. Alguns tecidos, fluidos e órgãos foram retirados (linfonodo popliteal, linfonodo inguinal, rins, fígado, amostras de sangue, osso e músculo). Órgãos e tecidos foram pesados e colocados em tubos para medição das atividades em contador do tipo poço. A amostra de sangue foi tirada por punção cardíaca antes do sacrifício do animal, e a sua atividade também foi mensurada.

Para o cálculo das porcentagens de dose captada em tecidos e órgão foi preparado um padrão com a mesma dose injetada nos animais. A porcentagem da dose retida no órgão (%DI/órgão) foi calculada tomando como valor de referência, 100%, a atividade do padrão. Os valores da captação para os tecidos (ósseo, muscular) e o sangue foram expressos como porcentagem da dose injetada por grama (%DI/g) ou mililitro (%DI/mL) respectivamente.

A extração popliteal, medida da retenção preferencial do traçador no primeiro linfonodo da cadeia linfática, foi calculado pela equação 6:

$$\text{Extração poplietal } [\%] = \frac{LP[\%] - LI[\%]}{LP[\%]} \cdot 100 \quad (6)$$

Onde: LP [%] e LI [%] representam as captações do radiotraçador (%DI) no linfonodo popliteal e inguinal respectivamente.

4.5.9.1 Avaliação do efeito da massa molecular e a presença de manose no desempenho biológico dos radioconjugados de dextran-cisteína

Neste estudo de triagem dos radiotraçadores ^{99m}Tc -DC-1, ^{99m}Tc -DC-2, ^{99m}Tc -DCM-1 e ^{99m}Tc -DCM-2 foram injetados na pata do animal 0,167 nmol (100 μL) de cada produto. Não foi realizado massagem no sítio de administração da droga. O tempo de sacrifício dos animais para análise foi 90 min após injeção. Foram somente retirados o linfonodo popliteal, rins e fígado. Os experimentos realizaram-se em triplicata (n=3) segundo um planejamento fatorial a dois níveis 2^2 .

4.5.9.2 Biodistribuição dos radioconjugados ^{99m}Tc -DCM-1 e ^{99m}Tc -DCM-2 utilizando uma dose menor

A biodistribuição dos produtos ^{99m}Tc -DCM-1 e ^{99m}Tc -DCM-2 foi estudada em diferentes tempos (15, 30, 60, 90, 1080 e 1440 min) para os tecidos e órgãos citados no item 4.5.9 e também para o ponto de injeção (pata). O protocolo utilizado para determinar a captação dos radiofármacos encontra-se descrito no item 4.5.9. Os parâmetros avaliados nesta foram: volume de injeção e quantidade de produto, 50 μL e 0,05 nmol respectivamente. O ponto de injeção foi massageado por um minuto, para facilitar o fluxo pelo sistema linfático. Cada experimento foi realizado com tamanho amostral igual a 5 (n=5).

4.5.9.3 Impacto da pureza radioquímica do produto ^{99m}Tc -DCM-2 na biodistribuição

A biodistribuição do produto ^{99m}Tc -DCM-2, previamente purificado utilizando a cromatografia de exclusão molecular em colunas PD-10 (99,5%), foi estudada 30 min após injeção. O volume de injeção e quantidade administrada foram 50 μL e 0,05 nmol respectivamente. Cinco animais foram utilizados para este estudo (n=5).

4.5.9.4 Determinação do efeito da dose e volume de injeção no desempenho do ^{99m}Tc - DCM-2

Diferentes doses do radioconjugado ^{99m}Tc -DCM-2, 0,05; 0,135 e 0,22 nmol foram administradas na pata direita das ratas em dois volumes (0,05 e 0,1 mL) sem massagem após a injeção do traçador. Aos 30 min. depois de injeção realizou-se o estudo de biodistribuição. Cada uma das seis combinações foi avaliada em triplicata (n=3).

4.5.10 Desempenho dos radiotraçadores para LNS estabelecidos na medicina nuclear brasileira para efeitos de comparação

4.5.10.1 Radiomarcção e controle radioquímico do produto Dextran-500

A marcação do Dextran-500 com ^{99m}Tc foi realizada seguindo as instruções do fabricante. Ao frasco contendo o produto liofilizado foi adicionado 2 mL de $\text{Na}[^{99m}\text{TcO}_4]$ (740 MBq) seguido de uma intensa agitação. O tempo da reação de marcação foi de 20 min e a mesma ocorreu à temperatura ambiente (23 – 25 °C).

A pureza radioquímica foi determinada usando o sistema de cromatografia em papel Whatman # 3 MM/ acetona. O solvente nas fitas percorreu uma distância de 10 cm do ponto de aplicação da amostra. Após o solvente chegar ao ponto final (“front”), a fita foi retirada da cuba, seca e cortada em segmentos de 1 cm. No primeiro segmento ($R_f=0$), na origem, a atividade está associada ao ^{99m}Tc -Dextran-500 e ao colóide $^{99m}\text{TcO}_2$ em quanto no $R_f=1$ (“front”), atividade corresponde ao $[\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4]$.

4.5.10.2 Radiomarcção e controle radioquímico do produto Fitato coloidal

A marcação deste produto comercial foi feita de modo idêntico ao descrito no item [4.5.10.1](#) para o Dextran-500, cumprindo com as indicações do fabricante.

O sistema de cromatografia em papel Whatman # 3 MM/ Metanol 85% foi utilizado para a determinação da pureza radioquímica. Os valores de R_f para as respectivas espécies radioquímicas correspondem aos mesmos observados para o produto Dextran-500 (ver item [4.5.10.1](#)).

4.5.10.3 Avaliação biológica

Os desempenhos biológicos do Dextran-500 e o Fitato coloidal foram avaliados seguindo um protocolo semelhante ao descrito no item 4.5.9. O volume injetado foi de 100 μ L (37 MBq) e o número de animais usados para estudar cada produto foi três ($n=3$).

4.5.11 Estudos de imagem

Aquisição de imagem cintilográfica planar de animais foi efetuada em gama-câmara equipada com um colimador de baixa energia e alta resolução, ângulo de 90° e uma matriz de 256 x 256 X 16, durante 180 segundos. O estudo foi realizado em animais previamente anestesiados aos 30 e 90 min após administração dos radiotraçadores. A captação em regiões de interesse (ROI) foi quantificada considerando-se como 100% a atividade total do animal.

4.5.12 Análises Estatísticas

Os resultados de duas ou mais determinações foram mostrados como a média e o desvio padrão, especificando o tamanho amostral (n).

As comparações entre duas amostras independentes foram realizadas através do teste t-student. A hipótese nula sempre foi a igualdade entre as médias das duas amostras ($\mu_1=\mu_2$) enquanto a hipótese alternativa mudou de acordo com o objetivo do experimento, desigual, menor ou maior ($\mu_1\neq\mu_2$, $\mu_1<\mu_2$, $\mu_1>\mu_2$).

A existência de diferenças estatísticas significativas entre três ou mais amostras independentes foi determinada por análise de variância simples (ANOVA). Em caso de existir diferenças significativas entre as médias das amostras comparadas foi utilizado o teste *post hoc* Tukey-HSD (diferença significativa honesta).

Um desenho fatorial a três níveis e duas variáveis (3^2) foi utilizado para otimizar estatisticamente os valores de temperatura e tempo que garantam uma alta pureza radioquímica. Foram acrescentados dois experimentos no ponto central da região experimental (85 °C; 20 min) para ter uma estimativa do erro experimental. Em total, foram incluídos 11 experimentos.

A influência de dois fatores (massa molecular e presença de unidades de manose na estrutura do conjugado) sobre vários parâmetros típicos tanto da

caracterização radioquímica como do desempenho biológico dos radiotraçadores foi determinada através de um planejamento experimental próprio para a triagem de variáveis, desenho fatorial a dois níveis (2^2).

Todas as decisões estatísticas foram tomadas com um nível de significância (α) de 0,05.

Os softwares utilizados para expressar os resultados obtidos em forma de gráficos foram:

- ◆ Microsoft Excel 2007, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA;
- ◆ Origin 8, OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA.

Para as comparações entre amostras assim como o planejamento e análise dos resultados dos desenhos fatoriais (3^2 , 2^2) utilizaram-se os programas:

- ◆ Statgraphics Plus 5.0, Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, USA;
- ◆ Desing-Expert 6.0.1, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA.

5 RESULTADOS

5.1 Preparação do precursor $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$

A pureza radioquímica do íon aquoso tri-carbonílico utilizado nas radiomarcações dos conjugados de dextran sempre foi superior a 99%, determinada por CLAE (FIG. 15 A). O tempo de retenção desta espécie química foi de 17,5 min. Na FIG 15 B observa-se a impureza radioquímica, pertecnetato livre, com tempo de retenção de 4,7 min.

FIGURA 15- Perfis cromatográficos do precursor e do íon pertecnetato (CLAE-RP), coluna C-18 (4,6 x 250 mm), fluxo: 1 mL/min, volume de injeção: 10 μL . (A) $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$, (B). $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$.

5.2 Estudo preliminar do efeito da razão massa do DC-1 e a atividade do $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$

A pureza radioquímica obtida nas radiomarcações do DC-1 para quantidades de 0,6; 1,2; 1,8 e 3 nmol (10, 20, 30, 50 μg) foi de 91,58 %; 91,75 %; 92,89 % e 95,02 % respectivamente. Este parâmetro foi determinado pela combinação de cromatografia em papel (Whatman #1/ Acetona) e cromatografia de camada delgada (ITLC-SG/ metanol:HCL (99:1)) (TAB. 3) (FIG. 16). As atividades específicas variaram de 3,39-0,70 MBq/ μg .

Com a maior amostra do conjugado DC-1 (50 μg) obteve-se o radiotraçador com maior grau de pureza, mesmo que a atividade específica (0,70 MBq/ μg) foi 4,81 vezes menor do que a marcação realizada com 10 μg . O teor das impurezas íon $[^{99m}\text{TcO}_4]$ e $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$, na marcação com a maior massa avaliada do DC-1 (50 μg) neste experimento exploratório foram de 2,44 % e 2,54 % respectivamente.

FIGURA 16-Radiocromatogramas do preparado de ^{99m}Tc -DC-1. A: sistema Whatman1/Acetona. B: sistema ITLC-SG/Metanol:HCl (99:1). Condições da marcação: 50 μg de DC-1, 80 °C, 30 min, 100 μL de $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ (37 MBq).

5.3 Otimização do tempo e a temperatura da radiomarkação do conjugado DC-1

As análises dos resultados do planejamento experimental 3² para otimizar a temperatura e o tempo (TAB. 4) demonstraram que as duas variáveis em estudo têm influência sobre a pureza radioquímica do ^{99m}Tc -DC-1. Especificamente esta afirmação é válida quando na marcação do DC-1 é usada

uma massa de 20 µg de DC-1 e uma atividade [$^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3$] $^+$ de 37 MBq (100µL).

TABELA 4 Matriz experimental e pureza radioquímica, determinada por ITLC-SG/ metanol: HCl (99:1) e Whatman#1/ acetona, para cada ponto incluído no planejamento fatorial 3^2 .

Temperatura (°C)	Tempo (min)	^{99m}Tc -DC-1 (%)
70	10	79,91
85	10	91,62
100	10	93,25
70	20	88,47
85	20	92,97
100	20	95,62
70	30	90,88
85	30	96,14
100	30	94,46
85	20	93,51
85	20	94,20

O efeito mais acentuado sobre a pureza foi exercido pela temperatura, especialmente na faixa de 70 a 85 °C (FIG. 17).

FIGURA 17-Gráfico de perturbações (influência de cada fator). A: Temperatura (70; 85; 100 °C); B: Tempo (10; 20; 30 min). Os valores das duas variáveis foram codificados -1; 0; 1.

A equação matemática (fatores foram codificados), que descreve o comportamento da pureza (^{99m}Tc -DC-1 [%]) em toda a região experimental corroborou que o efeito da temperatura (T) é 1,44 vezes maior do que o efeito do

tempo nos intervalos estudados de cada variável no desenho experimental (7). A inclusão do termo quadrático da temperatura, assim como a interação temperatura-tempo, ambos com efeitos negativos explicam as semelhanças entre os resultados obtidos de pureza, para 85 e 100 °C, especialmente para tempos de 20 e 30 min (FIG. 18).

$$^{99m}\text{Tc-DC-1} [\%] = 93,69 + 4,01 \cdot T + 2,78 \cdot t - 3,26 \cdot T^2 - 2,44 \cdot T \cdot t \quad (7)$$

FIGURA 18-Gráficos de influência da temperatura a diferentes tempos sobre a pureza radioquímica do $^{99m}\text{Tc-DC-1}$. A: 10 min; B: 20 min; C: 30 min.

Segundo os resultados deste planejamento experimental o melhor tempo para a radiomarcagem do DC-1 com o precursor $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ foi 30 min, enquanto a temperatura encontra-se na faixa de 85 a 100 °C, obtendo-se valores de pureza radioquímica e atividade específica próximos a 95% e 1,76 MBq/ μg respectivamente.

5.4 Otimização da atividade específica. Estudo do efeito da razão quantidade do DC-1 e a atividade do $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$

Com a utilização do dobro da atividade (74 MBq) do precursor, em relação aos experimentos anteriores, no mesmo volume de 100 μL , diferentes concentrações do conjugado DC-1 (20 μL) foram radiomarcadas, a 100 °C por um período de 30 min. Observou-se que a partir de 602 pmol (quantidade 10 μg e concentração $1,8 \cdot 10^{-6}$ M) houve um decréscimo da pureza radioquímica para valores inferiores a 90%. Para quantidades de DC-1 de 904-1205 pmol (15-20 μg), os valores de pureza situaram-se entre 93,8 e 94,9%, enquanto a atividade específica foi de 58 a 78 MBq/nmol (3,47 a 4,68 MBq/ μg) (FIG. 19).

FIGURA 19- Influência da quantidade do polímero na pureza radioquímica e na atividade específica do ^{99m}Tc -DC-1. Marcações realizadas a 100 °C, 30 min, 100 μL do $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ (74 MBq).

Uma vez finalizado este experimento definiram-se todos os parâmetros para a marcação do DC-1 com o precursor $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$:

- ◆ Temperatura: 100 °C
- ◆ Tempo de reação: 30 min
- ◆ Concentração e volume da solução do DC-1: $6,0 \cdot 10^{-5}$ M e 20 μL
- ◆ Atividade do $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$: 74 MBq (2 mCi)
- ◆ Volume do precursor: 100 μL
- ◆ Concentração da solução final: $1 \cdot 10^{-5}$ M

Nestas condições a pureza radioquímica do $^{99m}\text{Tc-DC-1}$ foi confirmada por cromatografia de exclusão molecular, em colunas PD-10. A quantificação da pureza do $^{99m}\text{Tc-DC-1}$ (93,83 %) por este método foi baseada na soma da atividade das frações do número 5 ao 10, pico do radioconjugado de dextran, e as do número 12 ao 25, picos das impurezas (FIG 20). Neste método de quantificação não foi possível determinar separadamente as espécies $^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3^+$ e íon $^{99m}\text{TcO}_4^-$.

FIGURA 20-Perfis cromatográficos (exclusão por tamanho) do DC-1 radiomarcado (A) e as impurezas radioquímicas (B), obtidos através de coluna PD-10, fase móvel: H_2O , fluxo: por gravidade.

Também foi possível a quantificação do $^{99m}\text{Tc-DC-1}$ conjuntamente com as impurezas através da CLAE em fase reversa. O tempo de retenção do radioconjugado, 10,7 min (FIG. 21), permitiu uma excelente resolução deste radiocomposto com relação as impurezas de $^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3^+$ e $^{99m}\text{TcO}_4^-$, com tempos de retenção de 17,5 min e 4,0 min respectivamente (FIG. 15).

FIGURA 21-Perfil do ^{99m}Tc -DC-1 em CLAE - fase reversa. coluna C-18 (4,6 x 250 mm), fluxo: 1mL/min, volume de injeção: 10 μL .

5.5 Radiomarcção dos conjugados DC-2, DCM-1, DCM-2

O conjugado DC-2 foi radiomarcado com parâmetros de marcação semelhantes aos utilizados no DC-1, enquanto os conjugados com manose na estrutura precisaram de um aumento do tempo de reação para obter valores de pureza radioquímica superiores a 90 %.

Observou-se que a massa molecular ($p=0,0012$) e a incorporação de unidades de manose na estrutura ($p<0,0001$) tiveram influências significativas na pureza radioquímica dos conjugados; sendo a influência da primeira variável quase duas vezes menor (1,95 vezes) do que a segunda, ambas com relação inversa (Equação 8, variáveis codificadas). Quanto maior era a massa molecular do conjugado menor foi a pureza radioquímica do radiocomplexo e efeito similar foi confirmado quando o dextran possuía unidades de manose (TAB. 5). A atividade específica por unidade de massa dos radioconjugados ficou na faixa de 3,34-3,61 MBq/ μg , mostrando uma dependência com os fatores massa molecular e presença de manose na estrutura similar à observada para a pureza radioquímica, obtido pela relação funcional entre ambas (Equação 4).

$$\text{Pureza}[\%]=94,17-1,25\cdot A-2,44\cdot B \quad (8)$$

Onde: Pureza [%] é a pureza do radioconjugado; A é a massa do dextran modificado e B define se a molécula tem ou não unidades de manose.

TABELA 5 Pureza radioquímica e atividade específica dos radioconjugados de dextran (média $\pm$ desvio padrão; n=3).

Radioconjugado	Pureza radioquímica [%]	Atividade Específica [MBq/nmol]
^{99m}Tc -DC-1	97,57 $\pm$ 0,11	59,93 $\pm$ 0,07
^{99m}Tc -DC-2	95,54 $\pm$ 0,90	106,16 $\pm$ 0,10
^{99m}Tc -DCM-1	93,26 $\pm$ 0,33	69,01 $\pm$ 0,24
^{99m}Tc -DCM-2	90,20 $\pm$ 0,84	100,13 $\pm$ 0,93

Entretanto a atividade específica por quantidade de substância teve uma relação direta com a massa molecular ($p < 0,0001$) e com a incorporação de manose no conjugado ($p = 0,0116$), enquanto um efeito antagônico foi observado na combinação de ambos os fatores ($p < 0,0001$) (Equação 9, variáveis codificadas). Este último efeito evidencia a diminuição da atividade específica (MBq/nmol) do radiocomplexo ^{99m}Tc -DCM-2 com relação ao ^{99m}Tc -DC-2 (TAB. 5).

$$AE \left(\frac{\text{MBq}}{\text{nmol}} \right) = 83,81 + 19,33 \cdot A + 0,76 \cdot B - 3,77 \cdot A \cdot B \quad (9)$$

As purezas radioquímicas dos radiotraçadores ^{99m}Tc -DC-2, ^{99m}Tc -DCM-1 e ^{99m}Tc -DCM-2 foram confirmadas por CLAE, com tempos de retenção de 10,7; 11 e 11 minutos respectivamente (FIG. 22).

FIGURA 22-Perfis dos radioconjugados (A) ^{99m}Tc -DC-2, (B) ^{99m}Tc -DCM-1, (C) ^{99m}Tc -DCM-2 em CLAE. Coluna C-18 (4,6 x 250 mm), fluxo: 1mL/min, volume de injeção: 10 μL .

5.6 Estabilidade radioquímica dos radioconjugados de dextran

Os radioconjugados ^{99m}Tc -DC-1, ^{99m}Tc -DC-2, ^{99m}Tc -DCM-1 e ^{99m}Tc -DCM-2 resultaram complexos estáveis à temperatura ambiente durante o tempo de meia vida do radioisótopo ^{99m}Tc (6 horas) (TAB. 6), possibilitando deste modo a utilização destes radiotraçadores neste intervalo de tempo em procedimentos de medicina nuclear.

TABELA 6 Estudo de estabilidade radioquímica dos produtos ^{99m}Tc -DC-1, ^{99m}Tc -DC-2, ^{99m}Tc -DCM-1, ^{99m}Tc -DCM-2.

Radioconjugado	Pureza radioquímica, (t= 0 horas)	Pureza radioquímica, (t= 6 horas)	Teste t-sudent (n=3), valor de probabilidade.
^{99m}Tc - DC-1	95,04±0,95	93,91±1,06	0,237>0,05
^{99m}Tc -DC-2	94,60±0,10	94,45±0,06	0,088>0,05
^{99m}Tc -DCM-1	93,26±0,33	92,59±0,42	0,094>0,05
^{99m}Tc -DCM-2	90,28±0,27	90,82±0,59	0,223>0,05

5.7 Estudos *in vitro* de transquelação frente à cisteína e à histidina

Os estudos de transquelação *in vitro* frente aos aminoácidos cisteína e histidina demonstraram uma acentuada resistência a este fenômeno radioquímico pelos quatro produtos em estudo. Entretanto, foi evidenciada, de maneira geral, uma maior estabilidade dos radiocomplexos frente à histidina. O aumento da massa molecular e a presença de manose no conjugado constituem fatores que favorecem a resistência à transquelação. Os conjugados com manose mostraram valores de atividade associada superiores a 97 %, após 90 min em contato com as soluções tamponadas de cisteína e histidina (TAB. 7).

TABELA 7 Estudos de transquelação frente à cisteína e histidina dos radioconjugados de dextran. Razão molar aminoácido/conjugado: 1000:1.

Produto	Aminoácido			
	Cisteína (264 µM)		Histidina (94 µM)	
	Transquelação (%)	T-student (p)	Transquelação (%)	T-student(p)
^{99m}Tc - DC-1	5,6*	0,0002	4,3*	0,0117
^{99m}Tc -DC-2	2,2*	0,0024	1,1	0,3853
^{99m}Tc -DCM-1	2,4*	0,0098	0,0	0,4821
^{99m}Tc -DCM-2	1,7	0,1529	0,6	0,3420

* Tranquelações estatisticamente significantes ao comparar com as amostras em branco.

5.8 Determinação do coeficiente de partição dos radioconjugados

Os quatro radioconjugados de dextran possuem coeficientes de partição (log P) negativos, o que demonstra a natureza hidrofílica dos mesmos. Os traçadores ^{99m}Tc -DC-1 (log P= -2,208), ^{99m}Tc -DC-2 (log P= -2,306) resultaram

mais hidrofílicos que os radioconjugados com manose, $^{99m}\text{Tc-DCM-1}$ ($\log P = -2,040$) e $^{99m}\text{Tc-DCM-2}$ ($\log P = -2,144$).

5.9 Avaliação do efeito da massa molecular e a presença de manose no desempenho biológico dos radioconjugados de dextran-cisteína

Os resultados do planejamento experimental (2²) para estudar os efeitos da massa molecular e as unidades de manose nos conjugados de dextran e sua captação no linfonodo popliteal e nos principais órgãos de excreção podem ser observados na [TAB. 8](#).

TABELA 8 Estudo de biodistribuição ex-vivo dos radiotraçadores 90 min após sua administração. Volume de injeção: 100 μL e dose de 0,167 nmol.

Experimento	Radiotraçador	Massa molecular (kDa)	Captação no tecido (% DI)			Dose retida no linfonodo popliteal (pmol)
			Linfonodo popliteal	Rins	Fígado	
1	$^{99m}\text{Tc-DC-1}$	16,6	0,65	2,42	0,57	$1,1 \pm 0,3$
2	$^{99m}\text{Tc-DC-1}$	16,6	0,84	2,09	0,45	
3	$^{99m}\text{Tc-DC-1}$	16,6	0,51	2,84	0,39	
4	$^{99m}\text{Tc-DC-2}$	30	0,72	1,24	0,50	$0,8 \pm 0,4$
5	$^{99m}\text{Tc-DC-2}$	30	0,41	0,91	0,70	
6	$^{99m}\text{Tc-DC-2}$	30	0,24	1,99	1,50	
7	$^{99m}\text{Tc-DCM-1}$	20	2,8	0,76	4,85	$3,4 \pm 1,2$
8	$^{99m}\text{Tc-DCM-1}$	20	1,8	0,47	5,08	
9	$^{99m}\text{Tc-DCM-1}$	20	1,45	0,36	4,93	
10	$^{99m}\text{Tc-DCM-2}$	30	1,85	0,35	3,44	$3,9 \pm 1,7$
11	$^{99m}\text{Tc-DCM-2}$	30	1,72	0,51	3,07	
12	$^{99m}\text{Tc-DCM-2}$	30	3,51	0,46	2,99	

Determinou-se que as variações de captação no linfonodo popliteal é definida pela presença de manose na estrutura do radiotraçador ($p=0,0018$). Tanto a massa molecular ($p=0,8116$), quanto a interação entre estes dois fatores individuais (massa molecular e presença de manose) ($p=0,4235$) não tiveram influência na captação no primeiro linfonodo da cadeia linfática. Nos radiocompostos que tem manose, a captação no linfonodo popliteal foi 4 vezes maior ([FIG. 23](#)).

FIGURA 23- Gráfico das médias para a captação do linfonodo popliteal considerando ou não a presença de manose na estrutura.

A captação nos rins correlacionou-se inversamente com a incorporação da manose no polímero ($p=0,0001$) e com a massa molecular do conjugado ($p=0,0215$). Um acentuado efeito sinérgico ($p=0,0427$) entre estes dois parâmetros provocou uma captação de $2,45 \pm 0,38$ %DI para o radiotraçador ^{99m}Tc -DC-1.

No fígado, o efeito da manose na captação foi significativo ($p=1,5 \cdot 10^{-5}$) e similar ao observado no linfonodo popliteal. Razão pela qual se detectaram captações hepáticas 5,86 vezes maiores nos compostos com manose em relação aos ^{99m}Tc -DC-1 e ^{99m}Tc -DC-2 (FIG. 24).

FIGURA 24- Gráfico das médias para a captação hepática considerando ou não a presença de manose na estrutura.

Entretanto, o efeito exercido pela massa molecular do conjugado na captação neste órgão ($p=0,0044$) foi similar ao obtido para captação renal. Quanto

menor a massa molecular mais favorecida é a retenção hepática do conjugado. A interação entre os dois fatores independentes ($p=0,0002$) gerou um efeito sinérgico significativo, razão pela qual observou-se uma considerável captação hepática no traçador ^{99m}Tc -DCM-1 ($4,95\pm0,12$ % DI) com relação aos outros radioconjugados (TAB. 8).

As imagens linfocintilográficas permitiram a detecção do linfonodo popliteal nos quatro radiotraçadores avaliados. A disseminação até o linfonodo inguinal ocorreu nos radioconjugados com manose, assim como no 2-propileno-S-cisteína-dextran de menor peso molecular (FIG. 25).

FIGURA 25- Linfocintilografias em ratos realizadas em gama-câmara Mediso (Hungria) após 90 minutos da injeção das radiomoléculas. **A:** ^{99m}Tc -DC-1, **B:** ^{99m}Tc -DCM-1, **C:** ^{99m}Tc -DC-2, **D:** ^{99m}Tc -DCM-2, **l.p.:** linfonodo popliteal, **l.i.:** linfonodo inguinal.

A captação no linfonodo inguinal para o ^{99m}Tc -DCM-1 foi de $0,62\pm0,06$ % DI, enquanto que para o ^{99m}Tc -DCM-2 foi 4,77 vezes menor ($0,13\pm0,09$ % DI) em imagens cintilográficas determinadas pelo ROI. Como consequência observou-se uma maior extração popliteal no produto ^{99m}Tc -DCM-2 (94,5%) em comparação com seu homólogo de menor massa molecular (69,3%).

5.10 Biodistribuição dos radioconjugados ^{99m}Tc -DCM-1 e ^{99m}Tc -DCM-2 utilizando uma dose menor

O efeito do tempo sobre a captação no linfonodo popliteal dos radioconjugados ^{99m}Tc -DCM-1 e ^{99m}Tc -DCM-2 demonstrou ser diferente para uma dose de 0,05 nmol e um volume de injeção de 50 μL . Para o radioconjugado ^{99m}Tc -DCM-1 observou-se uma rápida migração do ponto de injeção e uma retenção constante no linfonodo popliteal durante o período de estudo ($p=0,732$, ANOVA) (TAB. 9). Porém, o ^{99m}Tc -DCM-2 teve um perfil de captação no linfonodo popliteal variável com o tempo ($p=0,012$ ANOVA), definido por uma migração mais lenta desde o ponto de injeção, diminuindo nos tempos de 18 (1080 min) e 24 horas (1440 min) após ser obtido um pico aos 30 min (TAB. 9). Não obstante, aos 30 min a máxima retenção dos dois radiotraçadores foi atingida no nodo popliteal, confirmando-se valores similares de captação. Aos 30 min, a quantidade de traçador retido com esta dose administrada no nodo popliteal para o ^{99m}Tc -DCM-1 ($1,92 \pm 0,72$ pmol; $p=0,048$; t-student) e o ^{99m}Tc -DCM-2 ($2,14 \pm 0,32$ pmol; $p=0,040$; t-student) foram menores com relação à dose de 167 pmol previamente avaliadas para estes produtos.

TABELA 9. Captação dos radiotraçadores (^{99m}Tc -DCM-1, ^{99m}Tc -DCM-2) nos linfonodos popliteal e inguinal e valores de extração popliteal. Dose injetada: 0,05 nmol; volume de injeção: 50 μL .

Tempo (min)	Captação (%DI)				Extração popliteal	
	Linfonodo popliteal		Linfonodo Inguinal			
	DCM-1 ^{99m}Tc	DCM-2 ^{99m}Tc	DCM-1 ^{99m}Tc	DCM-2 ^{99m}Tc	DCM-1 ^{99m}Tc	DCM-2 ^{99m}Tc
15	3,08 $\pm$ 1,22	1,80 $\pm$ 0,94 ^a	0,29 $\pm$ 0,31	0,36 $\pm$ 0,26	90,50 $\pm$ 7,18	91,40 $\pm$ 8,19
30	3,84 $\pm$ 1,45	4,29 $\pm$ 0,65 ^b	0,56 $\pm$ 0,47	0,50 $\pm$ 0,37	89,17 $\pm$ 9,21	88,07 $\pm$ 9,63
60	3,41 $\pm$ 1,15	2,60 $\pm$ 1,02 ^{a,b}	1,13 $\pm$ 1,38	0,64 $\pm$ 0,76	85,82 $\pm$ 11,56	91,05 $\pm$ 9,65
90	3,74 $\pm$ 2,13	3,00 $\pm$ 1,63 ^{a,b}	0,75 $\pm$ 0,66	0,20 $\pm$ 0,14	88,64 $\pm$ 10,73	91,10 $\pm$ 6,63
1080	3,55 $\pm$ 1,75	1,72 $\pm$ 0,85 ^a	0,40 $\pm$ 0,42	0,17 $\pm$ 0,17	91,02 $\pm$ 8,94	88,68 $\pm$ 9,56
1440	3,07 $\pm$ 1,04	1,99 $\pm$ 0,79 ^a	0,20 $\pm$ 0,38	0,21 $\pm$ 0,26	95,03 $\pm$ 9,78	87,87 $\pm$ 14,05

^{a,b} grupos homogêneos na prova de Tukey, n=5.

A captação dos radiotraçadores no linfonodo inguinal teve uma alta variabilidade e não foram detectadas diferenças entre as captações em todo o intervalo de tempo estudado, para o ^{99m}Tc -DCM-1 ($p=0,344$, ANOVA), ou para o

^{99m}Tc -DCM-2 ($p=0,498$, ANOVA). A extração popliteal se manteve constante para os dois produtos no intervalo de tempo avaliado, oscilando numa faixa de 80 a 100 % (TAB. 9).

As captações nos rins de ambos os produtos, ^{99m}Tc -DCM-1 ($p=0,616$, ANOVA) e ^{99m}Tc -DCM-2 ($p=0,841$, ANOVA) tiveram comportamentos semelhantes a partir dos 30 min. Contudo, a captação nos rins aos 15 min foi maior no conjugado de menor massa molecular ($p=0,007$, t-student) (TAB. 10).

A captação hepática permaneceu constante a partir dos 30 min para o radioconjugado ^{99m}Tc -DCM-1 ($p=0,005$, ANOVA). Enquanto o ^{99m}Tc -DCM-2 apresentou um pico de captação aos 60 min p.i ($p=4,58 \cdot 10^{-5}$, ANOVA). A captação no fígado foi sempre superior à observada nos rins (TAB. 10).

TABELA 10. Captação hepática e renal dos radiotraçadores com unidades de manose. Dose injetada: 0,05 nmol; volume de injeção: 50 μL .

Tempo (min)	Captação (% DI)			
	Rins		Fígado	
	DCM-1 ^{99m}Tc	DCM-2 ^{99m}Tc	DCM-1 ^{99m}Tc	DCM-2 ^{99m}Tc
15	0,65 $\pm$ 0,26	0,36 $\pm$ 0,06	1,97 $\pm$ 0,79 ^a	1,66 $\pm$ 0,50 ^a
30	0,74 $\pm$ 0,10	0,47 $\pm$ 0,27	3,13 $\pm$ 1,06 ^{a,b}	2,70 $\pm$ 0,19 ^{a,b}
60	0,58 $\pm$ 0,23	0,41 $\pm$ 0,09	3,28 $\pm$ 0,56 ^{a,b}	4,13 $\pm$ 0,89 ^c
90	0,79 $\pm$ 0,49	0,37 $\pm$ 0,11	4,04 $\pm$ 1,13 ^b	2,43 $\pm$ 0,43 ^{a,b}
1080	0,53 $\pm$ 0,14	0,51 $\pm$ 0,13	3,90 $\pm$ 0,43 ^b	2,94 $\pm$ 0,30 ^b
1440	0,60 $\pm$ 0,16	0,51 $\pm$ 0,25	3,12 $\pm$ 0,44 ^{a,b}	2,85 $\pm$ 0,78 ^b

^{a,b,c} grupos homogêneos na prova de Tukey, $n=5$.

A atividade no ponto de injeção dos dois produtos tem uma tendência a diminuir como o tempo. Aos 60 minutos a.i., observaram-se valores de 41,67 $\pm$ 3,68 %DI e 46,35 $\pm$ 3,16 %DI para o produto ^{99m}Tc -DCM-1 e ^{99m}Tc -DCM-2 respectivamente (FIG. 26 A). A captação em tecidos corpóreos de grande abundância como o muscular e o ósseo foi baixa, não ultrapassando 0,07 e 0,18 % DI/g respectivamente (FIG. 26 B-D). O sangue também apresentou uma pequena atividade por unidade de volume de fluido, sendo sempre menor em todos os tempos a 0,5 % DI/mL. Os dois produtos mostraram o mesmo perfil de depuração sangüínea (FIG. 26 C). Estes resultados sugerem que os efeitos de

fundo da imagem cintilográfica serão de pequena magnitude garantindo uma boa definição do linfonodo de interesse (popliteal).

FIGURA 26- Retenção dos radioconjugados no ponto de injeção e em diferentes tecidos (média $\pm$ desvio padrão, $n=5$). **A:** Ponto de injeção (pata). **B:** Tecido muscular. **C:** Sangue. **D:** Tecido ósseo. Dose injetada: 0,05 nmol; volume de injeção: 50 μ L.

As imagens linfocintilográficas a 30 min a.i., para uma dose e volume injetado menores dos radioconjugados e a realização de uma massagem no ponto de injeção (FIG. 27), mostraram com nitidez o linfonodo popliteal, enquanto o linfonodo inguinal praticamente não foi identificado. A diminuição de ambos os parâmetros, assim como a massagem tiveram impacto maior na qualidade da imagem para o radioconjugado com manose de menor massa molecular, o ^{99m}Tc -DCM-1 (FIG. 25 e 27).

FIGURA 27-Linfocintilografias em ratos realizadas em gama-câmara Mediso (Hungria) após 30 minutos da injeção das radiomoléculas. **A:** ^{99m}Tc -DCM-1, **B:** ^{99m}Tc -DCM-2, **l.p.:** linfonodo popliteal, **l.i.:** linfonodo inguinal. Dose injetada 0,05 nmol, volume de injeção 50 μL .

5.11 Impacto da pureza radioquímica do produto ^{99m}Tc - DCM-2 na biodistribuição

A biodistribuição do produto ^{99m}Tc -DCM-2 purificado (99,5%) (TAB. 11 e FIG. 28) resultou semelhante à observada para o produto sem purificar (90,28 %) (TAB. 9, TAB. 10 e FIG. 26).

TABELA 11. Retenção após 30 min de injeção do ^{99m}Tc -DCM-2 purificado (99,5 %) em alguns órgãos e regiões anatómicas. Volume injetado: 50 μL , quantidade administrada: 0,05 nmol (n=5).

Órgão ou região	Captação (% DI)	Probabilidade (t-student)*
Linfonodo popliteal	3,41 $\pm$ 1,77	0,3844
Linfonodo inguinal	1,10 $\pm$ 1,17	0,3602
Rins	0,48 $\pm$ 0,20	0,9605
Fígado	2,58 $\pm$ 1,10	0,8318
Pata	59,89 $\pm$ 7,43	0,0901

* Os valores de probabilidade correspondem aos obtidos na prova de comparação das médias das captações do produto com 99,5 % e 90,28 % de pureza (item 5.10).

Os resultados demonstram que valores de pureza maiores de 90 % garantem uma mesma biodistribuição.

FIGURA 28-Retenção do ^{99m}Tc -DCM-2 purificado (99,5 %) no sangue e nos tecidos muscular e ósseo de ratos. Os valores são expressos como %DI/g exceto para o sangue (%DI/mL).

5.12 Determinação do efeito da dose e volume de injeção no desempenho do ^{99m}Tc - DCM-2

O efeito do volume de injeção sobre a captação do radiotraçador ^{99m}Tc -DCM-2 no linfonodo popliteal variou para as doses estudadas. Com uma dose menor (0,05 nmol), um incremento na retenção neste nodo foi observado com um volume de injeção de 50 μL (2,6 vezes, $p=0,015$, t-student). Ao contrário, para uma dose de 0,135 nmol com volume de 100 μL , um acréscimo de 78% ($p=0,003$, t-student) na captação no nodo popliteal foi atingido, em relação à obtida com 50 μL . Contudo, na maior dose avaliada (0,22 nmol), as mudanças no volume de injeção não influenciaram a retenção do traçador no nodo popliteal ($p=0,352$, t-student) (FIG 29).

Na comparação da quantidade retida do radiotraçador no nodo popliteal para as combinações dose-volume injetado que garantem uma maior captação nesta estrutura linfática, demonstrou-se que existem diferenças significantes entre as doses avaliadas ($p=0,005$, ANOVA). As retenções foram de $2,4 \cdot 10^{-3}$ nmol; $4,4 \cdot 10^{-3}$ nmol e $5,5 \cdot 10^{-3}$ nmol para doses do ^{99m}Tc -DCM-2 de 0,05; 0,135 e 0,22 respectivamente. Não obstante, entre as doses de 0,135 e 0,22 nmol não acharam-se diferenças (FIG. 30), resultado que sugere uma saturação do

linfonodo popliteal com quantidades do radiotraçador dentro da faixa de $4,4 \cdot 10^{-3}$ e $5,5 \cdot 10^{-3}$ nmol.

FIGURA 29- Influência do volume de injeção do ^{99m}Tc -DMC-2 a diferentes doses na captação no linfonodo popliteal, 30 min a.i. (média $\pm$ desvio padrão, n=3).

FIGURA 30-Gráfico dos intervalos de confiança para quantidade retida do ^{99m}Tc -DMC-2 segundo o teste de Tukey, 30 min a.i.. Representaram-se as combinações volume-dose injetada com maior captação no linfonodo popliteal para cada dose (n=3).

A extração popliteal foi também modulada pelo volume de injeção. Para uma dose de 0,05 nmol, a administração em um volume menor (50 µL), melhorou significativamente este parâmetro com relação a uma injeção do radiotraçador ^{99m}Tc -DCM-2 de 100 µL (1,73 vezes, $p=0,009$, t-student). De maneira similar, para a maior dose considerada no experimento (0,22 nmol), um decréscimo de 55 % ($p= 0,003$, t-student) na extração popliteal foi confirmado para uma dose de 100

μL . Entretanto, a extração popliteal não foi alterada com o volume de injeção administrado para uma dose de 0,135 nmol ($p=0,071$, t-student) (FIG. 31).

FIGURA 31- Influência do volume de injeção a diferentes doses na extração popliteal do $^{99m}\text{Tc-DMC-2}$, 30 min a.i. (média $\pm$ desvio padrão, $n=3$).

As captações do traçador $^{99m}\text{Tc-DMC-2}$ em órgãos de excreção como os rins e fígado e para os tecidos muscular e ósseo não foi alterado pelo volume de injeção na faixa de dose avaliada neste estudo. Retenções mínimas foram verificadas nos tecidos (TAB. 12). Entretanto, no sangue só observou-se efeito significativo do volume para uma dose de 0,05 nmol ($p=0,018$, t-student).

TABELA 12. Biodistribuição do $^{99m}\text{Tc-DMC-2}$ a diferentes combinações de dose e volume injetado, 30 min a.i. (média $\pm$ desvio padrão, $n=3$).

Dose (nmol)	Volume (μL)	Captação					
		Sítio de injeção (%DI)	Fígado (%DI)	Rins (%DI)	Sangue (% ID/mL)	Osso (% ID/g)	Músculo (% ID/g)
0.05	50	64,73 $\pm$ 2,24	3,14 $\pm$ 0,42	0,68 $\pm$ 0,18	0,26 $\pm$ 0,03	0,09 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01
	100	66,77 $\pm$ 2,62	2,71 $\pm$ 0,18	0,46 $\pm$ 0,09	0,20 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,01
0.135	50	64,40 $\pm$ 3,19	2,42 $\pm$ 0,48	0,42 $\pm$ 0,04	0,24 $\pm$ 0,04	0,07 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,01
	100	63,42 $\pm$ 10,58	2,93 $\pm$ 0,42	0,40 $\pm$ 0,08	0,13 $\pm$ 0,06	0,12 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,01
0.22	50	62,59 $\pm$ 7,85	2,72 $\pm$ 0,37	0,39 $\pm$ 0,12	0,16 $\pm$ 0,04	0,11 $\pm$ 0,07	0,02 $\pm$ 0,01
	100	64,52 $\pm$ 3,31	3,43 $\pm$ 0,83	0,44 $\pm$ 0,06	0,15 $\pm$ 0,03	0,10 $\pm$ 0,05	0,04 $\pm$ 0,03

A migração do $^{99m}\text{Tc-DMC-2}$ desde o sítio de injeção resultou independente da dose e o volume de injeção ($p=0,968$, ANOVA) (TAB. 12).

As imagens linfocintilográficas correspondentes às seis combinações de dose e volume de injeção permitiram a detecção tanto do linfonodo popliteal quanto do nodo inguinal. Estas imagens confirmaram os resultados de biodistribuição ex-vivo relacionados com a extração e a retenção do traçador no nodo popliteal (FIG. 32).

FIGURA 32- Imagens cintilográficas estáticas em ratos do ^{99m}Tc -DMC-2, obtidas em gama-câmara Mediso (Hungria) para as 6 combinações de volume e dose injetada, 30 min a.i.. A e B representam doses de 0,05 nmol em volumes de 50 e 100 μL respectivamente. C e D representam doses de 0,135 nmol e similares volumes crescentes. Doses de 0,22 nmol em volumes de 50 e 100 μL se correspondem às imagens E e F respectivamente. l.i.: linfonodo inguinal. l.p.: linfonodo popliteal.

A ausência de massagem no local de injeção do radiotraçador não teve influência na captação deste no linfonodo popliteal, 30 a.i, utilizando uma dose de 0,05 nmol e 50 μL de volume de injeção ($p=0,518$, t-student) quando comparado com estudo anterior (TAB. 9 e FIG. 29). Igualmente, nas mesmas condições, a extração popliteal ($p= 0,251$, t-student) não foi afetada pela massagem (TAB. 9 e FIG. 31), assim como órgãos, tecidos e no sangue (TAB. 10, 12 e FIG. 26). Porém a massagem somente favoreceu a diminuição da atividade retida no sítio de injeção, no caso na pata do animal ($p= 0,017$, t-student) (FIG. 26 e TAB. 12).

5.13 Desempenho dos radiotraçadores para LNS estabelecidos na medicina nuclear brasileira

Para os produtos ^{99m}Tc -Dextran-500 e ^{99m}Tc -Fitato coloidal (Purezas radioquímicas > 90%) observou-se uma captação aos 30 min a.i. no nodo popliteal (TAB. 13) 8 vezes menor com relação ao produto ^{99m}Tc -DMC-2 ($2,24 \pm 0,16$ % DI; FIG. 29), havendo injetado uma atividade similar (37 MBq) no mesmo volume (100 μL).

A captação hepática foi maior no ^{99m}Tc -Fitato coloidal, seguida do ^{99m}Tc -DMC-2 e o ^{99m}Tc -Dextran-500 ($p < 0,0001$, ANOVA e teste de Tukey). Entretanto, na captação renal não se acharam diferenças entre os produtos já estabelecidos para a detecção de linfonodo sentinela, porém a retenção destes neste órgão de excreção foi inferior à observada para o ^{99m}Tc -DMC-2 ($p < 0,0004$, ANOVA e teste de Tukey) (TAB. 12 e 13).

TABELA 13. Biodistribuição dos radiofármacos ^{99m}Tc -Dextran-500, ^{99m}Tc -Fitato coloidal e ^{99m}Tc -DCM-2, 30 min a.i.. Atividade injetada, 37 MBq em 100 μL (média $\pm$ desvio padrão, $n=3$)

Produto	Captação (% DI)		
	Lifonodo popliteal	Rins	Fígado
^{99m}Tc -Dextran-500	$0,15 \pm 0,04$	$0,08 \pm 0,06$	$0,04 \pm 0,04$
^{99m}Tc -Fitato coloidal	$0,27 \pm 0,10$	$0,18 \pm 0,04$	$13,09 \pm 1,94$
^{99m}Tc -DCM-2	$2,24 \pm 0,16$	$0,44 \pm 0,06$	$3,43 \pm 0,83$

As imagens linfocintiligráficas dos produtos ^{99m}Tc -Dextran-500 e ^{99m}Tc -Fitato coloidal permitiram reconhecer os linfonodos popliteal e inguinal, observando-se no caso do último radiofármaco um acentuada retenção hepática (FIG 33).

FIGURA 33-Linfocintilografías em ratos dos produtos (A) ^{99m}Tc -Dextran-500 e (B) ^{99m}Tc -Fitato coloidal realizadas em gama-câmara Medido (Hungria), 30 min a.i.. Atividade injetada, 37 MBq em 100 μL .

6 DISCUSSÃO

Os dextrans são considerados biopolímeros lineares, compostos por unidades monoméricas de D-glicopiranoose acopladas por ligações α -1,6-glicosídicas, com poucas ramificações laterais^{123,124}. Eles possuem um conjunto de propriedades que permitem a sua utilização com fins farmacêuticos, como alta solubilidade, biodegradabilidade e ausência de toxicidade. Eles podem ser obtidos em uma grande variedade de massas moleculares (1-2000 kDa por hidrólise enzimática) modulando assim, seu desempenho farmacocinético¹¹⁸. Estes polissacarídeos são usados, também, como reagentes em um grande número de sínteses nas indústrias químicas e biotecnológicas^{125, 126}.

A conjugação de fármacos a polímeros é uma técnica muito utilizada no melhoramento das propriedades farmacológicas de peptídeos, proteínas, moléculas de baixa massa molecular e oligonucleotídeos. Estes conjugados geralmente exibem uma prolongada meia vida biológica, alta estabilidade, solubilidade em água, baixa imunogenicidade e freqüentemente, também, possuem afinidade por tecidos ou células. Para este propósito, o dextran é um dos polissacarídeos com maior aplicabilidade¹²⁷. Ele contém um grande número de grupos hidroxilas através das quais podem se conjugar facilmente entidades com ação farmacológica diretamente ou de maneira indireta por meio de espaçadores¹²⁸. Especificamente, no diagnóstico e terapia com radiofármacos, a conjugação a dextrans tem sido utilizada para aumentar a avidéz da somatostatina pelos receptores celulares do peptídeo associado a processos de crescimento e metástase tumoral¹²⁹. Atualmente, uma das mais promissoras aplicações da técnica de conjugação a dextrans, na medicina nuclear, é a incorporação de unidades de manose nas cadeias laterais do polímero para ser usado como radiotraçador na detecção de LNS¹⁰¹.

Dextrans não conjugados, também, têm sido marcados com o radionuclídeo ^{99m}Tc para serem usados como agentes de diagnóstico em diferentes técnicas, tais como, angiocardiografia,

linfocintilografia, imagens de processos inflamatórios e de enteropatia perdedora de proteínas¹³⁰. Tradicionalmente, o método de marcação do dextrans ocorre através da redução do ^{99m}Tc com cloreto estanoso (SnCl_2) e a ligação deste radioisótopo a dois grupos hidroxila vicinais das unidades de dextrose, estabilizando duas das cinco possibilidades de coordenação do ^{99m}Tc ¹³¹. Contudo, este procedimento de marcação possui duas desvantagens fundamentais: contaminação com colóide de tecnécio e transquelação do isótopo nos fluidos biológicos, devido à débil capacidade quelante dos grupos hidroxila dos dextrans¹³⁰.

Com o intuito de resolver as limitações da marcação com tecnécio, através dos grupos hidroxila deste versátil polissacarídeo, modificações na estrutura base já foram avaliadas. Entre elas encontram-se a incorporação de diferentes estruturas quelantes como: MAG_3 ¹⁰⁶, DTPA ²² e a conjugação de cisteamina aos grupos hidroxila previamente oxidados para gerar uma estrutura quelante tetradentada (N_2S_2)¹³². Todas estas são do tipo ligantes de Werner utilizadas para núcleos de tecnécio (V). As mesmas são compostas por átomos doadores de electrons π e σ que podem ser protonados e são sensíveis a mudanças de pH¹³².

A introdução do íon organometálico de tecnécio (I) $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ permitiu o estabelecimento de uma plataforma acessível para a obtenção de novos radiofármacos baseada no núcleo $^{99m}\text{Tc}(\text{I})(\text{CO})_3$, gerando complexos hexacoordenados estáveis *in vitro* e *in vivo*¹³³. Entre os agentes quelantes tridentados (maior estabilidade) utilizados para a marcação de moléculas encontram-se a histidina e a cisteína funcionalizadas. Este último aminoácido funcionalizado por alquilação através do enxofre foi incorporado à vitamina B_{12} , observando-se favoráveis resultados em termos radioquímicos, assim como, do desempenho biológico. Ao mesmo tempo sugeriu-se a utilização deste agente quelante em outras biomoléculas¹³⁴.

A modificação química de dextrans com unidades de cisteínas pode ser uma alternativa adequada para diferentes radiofármacos de ^{99m}Tc , como os traçadores considerados no presente estudo. As aplicações desta família de radiocompostos podem ir além da detecção de linfonodos sentinelas, dependendo

das unidades de especificidade adicionada ao esqueleto base do dextran-cisteína. Por tal razão a metodologia radioquímica empregada nesta pesquisa poderá ser útil em futuros desenvolvimentos de conjugados de dextran radiomarcados com ^{99m}Tc .

6.1 Preparação do precursor $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$

O método de preparação do precursor $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ a partir do kit comercial Isolink é um procedimento bem estabelecido. A literatura geralmente cita valores de pureza para esta espécie radioquímica superiores a 98% quando as moléculas de CO da estrutura são geradas “*in situ*” (Isolink)¹³⁵. Os métodos de análises utilizados para a determinação da pureza são CLAE em fase reversa ou diferentes combinações de técnicas de cromatografia em papel e camada delgada^{136, 137}. As possíveis impurezas são o pertecnetato não reduzido e o colóide de tecnécio $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH})_n(\text{H}_2\text{O})_y]$. Esta última encontra-se em quantidades extremamente baixas devido ao método de síntese utilizado no kit para a obtenção do íon organometálico¹³⁸, não se quantificando na maioria das publicações relacionadas com este método de marcação de moléculas com tecnécio.

Valores de pureza do $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ superiores a 99 % foram obtidos nesta pesquisa, em concordância com outros autores^{139,140}. Desta maneira não foi necessário uma etapa de purificação, para a sua posterior utilização na marcação dos conjugados de dextran-cisteína.

Na técnica por CLAE em fase reversa são usualmente utilizados dois sistemas de solvente: água/metanol e água/acetonitrila. Contudo, quando o solvente orgânico utilizado é acetonitrila, este pode substituir completamente as moléculas de água do precursor $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ durante a cromatografia, obtendo-se o composto $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{CH}_3\text{CN})_3]^+$ ¹⁴¹. Este fenômeno é justificado pelo fato de que uma espécie hidrofílica como $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ apresenta um tempo de retenção tardio (17,5 min). A substituição das moléculas de água por acetonitrila não tem implicações posteriores quando a CLAE é utilizada com uma finalidade analítica, tanto na quantificação do $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ como de biomoléculas marcadas com este íon organometálico.

6.2 Estratégia de otimização para a marcação do DC-1 a partir do $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$

Um radiotraçador com especificidade por alvos biológicos não somente necessita de adequadas propriedades bioquímicas e físico-químicas, mas também precisa de uma favorável rota de síntese para a incorporação do radionuclídeo. O tempo de marcação ideal deve permitir a incorporação do radioisótopo na última etapa sintética em consonância com o tempo de meia vida do radionuclídeo. Como consequência, o objetivo fundamental na marcação de radiofármacos é prover uma síntese rápida e robusta do radiotraçador, garantindo que a molécula marcada possua uma alta atividade específica (reduzindo assim, a possibilidade de bloqueio de receptores com biomoléculas com atividade biológica não radiomarcadas), alta pureza radioquímica e uma alta concentração do traçador¹⁴².

O rendimento de uma reação de marcação como toda reação química depende de um conjunto de variáveis, tais como razão, molar entre os reagentes, concentração, pH, tempo e temperatura¹⁴³. A definição de cada um destes parâmetros é importante para que o rendimento seja máximo sem deixar de considerar a finalidade do produto e as propriedades físicas do radioisótopo. Isto constitui o verdadeiro desafio nos estudos de radiomarcações de moléculas com aplicação em medicina nuclear.

A técnica de controle radioquímico de rotina para a execução da metodologia de otimização da marcação foi uma combinação de cromatografia em camada delgada (ITLC-SG/metanol:HCl (99:1)), que separa eficientemente os íon pertecnetato e $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ do conjugado de ^{99m}Tc -DC-1, e de cromatografia em papel (Whatman#1/acetona) que consegue separar o pertecnetato do íon $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ e ^{99m}Tc -DC-1^{137, 144}. Estes dois sistemas cromatográficos, utilizados para outros radiocompostos, foram testados em experimentos preliminares com cada uma das impurezas e com todas as espécies presentes no preparado avaliado. Os resultados confirmaram a idoneidade do par de sistemas cromatográficos.

6.2.1 Estudo preliminar do efeito da razão massa do DC-1 e a atividade do $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$

Na primeira etapa da metodologia utilizada foi feito um estudo preliminar com o objetivo de avaliar a pureza radioquímica e atividade específica em função de diferentes razões entre quantidade do DC-1 e atividade do $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$. Outros parâmetros influentes em uma radiomarcagem, como a temperatura, concentração dos reagentes, especialmente do conjugado de DC-1, foram fixadas de acordo com as experiências de nosso grupo de pesquisa, assim como, com trabalhos publicados ¹³⁴. O pH da reação de marcação foi neutro, e o estudo deste fator não foi considerado para otimizar o resto das variáveis em função da obtenção de um produto que possa ser usado diretamente via parenteral.

Os valores de pureza radioquímica, na faixa de razões estudadas (600-3000 pmol/37 MBq) foram superiores a 90 % com diferenças de até 3,44 %. Os índices obtidos são os recomendados para radiofármacos de tecnécio ¹⁴⁵. Estes resultados são devido ao baixo impacto da concentração do DC-1 na mistura final (5,45 – 20,08 μM) sobre a cinética de quelação do ^{99m}Tc . Deve-se considerar que em reações de radiomarcagem os termos pureza radioquímica e rendimento ou eficiência de reação coincidem quando o produto não é purificado ao final da mesma ¹⁴⁶.

Entretanto, para a atividade específica observou-se mudanças consideráveis. A atividade específica é um fator importante em um radiofármaco e as diferenças de pureza radioquímica obtidas na marcação foram pequenas (menores de 4 unidades percentuais, item 5.2), resolveu-se utilizar na próxima etapa 20 μg do DC-1.

6.2.2 Otimização do tempo e da temperatura da radiomarcagem do conjugado DC-1

Com o intuito de aumentar a pureza radioquímica, assim como determinar a influência do tempo e da temperatura na marcação do DC-1 foi realizado um planejamento experimental fatorial 3^2 . Na seleção da faixa de temperatura a ser estudada deve se considerar como limite superior aquela que garante a estabilidade térmica do produto, assim como, o equipamento de

aquecimento disponível nas farmácias hospitalares. No caso dos dextrans, eles são termicamente estáveis a 100 °C¹⁴⁷. O tempo máximo recomendado para marcações com tecnécio é de 30 min¹⁷.

Na marcação do DC-1 o efeito linear do tempo sobre a pureza radioquímica, na faixa de temperaturas estudada, pode ser explicado devido à reação ocorrer no intervalo entre 10 e 30 min, na região final da curva cinética, onde a relação conversão-tempo pode ser ligeiramente linear ou constante. As diferenças no rendimento entre 10 e 30 min foram de 10,97%; 4,52% e 1,21% para as temperaturas de 70; 85 e 100 °C respectivamente. Demonstrou-se que com o aumento da temperatura, o efeito do tempo no rendimento da reação diminui, mas o efeito do tempo individualmente foi estatisticamente significativo; razão pela qual o tempo ótimo da marcação foi de 30 min.

O impacto maior da temperatura com relação ao tempo, especialmente no intervalo de 70 a 85 °C justifica-se pela relação exponencial que tem este fator (temperatura), inserido na constante de velocidade de reação (equação de Arrhenius) (equação 10), nas expressões matemáticas que descrevem a cinética de uma reação química (equação 11)¹⁴⁸.

$$k = k_0 e^{\left(-\frac{E_a}{R \cdot T}\right)} \quad (10)$$

$$\frac{dC_A}{dt} = k \cdot C_A^n \cdot C_B^m \quad (11)$$

Na faixa de 85 a 100 °C, não foram detectadas diferenças significativas na pureza radioquímica devido a saturação das possibilidades de quelação de tecnécio no DC-1. Baseado nestes resultados recomenda-se efetuar a marcação de conjugados de dextran-cisteína à temperaturas superiores a 85 °C. No nosso estudo, a temperatura ótima selecionada foi de 100 °C, por ser de mais fácil controle em condições hospitalares.

6.2.3 Otimização da atividade específica. Estudo da razão quantidade do DC-1 e a atividade do [^{99m}Tc(OH₂)₃(CO)₃]⁺

Definidos os parâmetros pH (≅7), temperatura (100 °C), tempo de reação (30 min), realizou-se nova avaliação entre a atividade do [^{99m}Tc(OH₂)₃(CO)₃]⁺ e a quantidade do DC-1.

Considerando que o kit Isolink possui um limite de 1000 MBq para obter marcações com altos níveis de pureza¹⁴⁹, decidiu-se nesta etapa utilizar a atividade máxima admissível do precursor $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ de 74 MBq/100 μL . Uma vez que a medida da atividade/volume do precursor não pode ser alterada para valores superiores e que poderiam modular a velocidade da reação, então utilizou-se 20 μL de DC-1 em diferentes concentrações. A quantidade mínima estudada, 6 pmol, da solução de concentração $3,0 \cdot 10^{-7}$ M (Concentração na mistura final $5 \cdot 10^{-8}$ M) correspondeu a razão molar DC-1 : $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ de 1:1 considerando a atividade específica nominal do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($520\ 554\ \text{Ci nmol}^{-1}$)¹⁵⁰.

Os resultados demonstraram a influência marcante da concentração do DC-1 nas novas condições de marcação. Os valores de rendimento ou pureza radioquímica superiores a 90% foram somente achados nas concentrações maiores, de $7,53$ e $10,04 \cdot 10^{-6}$ M na mistura final, correspondentes a quantidades de 904 a 1205 pmol respectivamente. Para valores de concentração do conjugado inferiores a $5,02 \cdot 10^{-6}$ M, o rendimento situou-se abaixo de 90 %. Especificamente, no ponto de intersecção das curvas de pureza e atividade específica, onde teoricamente encontra-se a quantidade de DC-1 mais favorável, um valor de pureza observado foi inferior a 60%. Definiu-se assim o intervalo de 904-1205 pmol (15-20 μg) como o melhor para esta reação de marcação. Apesar de possuírem os valores menores de atividade específica (3,47 a 4,68 MBq/ μg) dentro da faixa de quantidades de DC-1 estudada, eles foram superiores aos referidos para outros radiotraçadores de dextran sem conjugação com elementos de especificidade $8,2 \cdot 10^{-3}$ MBq/ μg ¹³⁰ e $3,57 \cdot 10^{-2}$ MBq/ μg (Dextran-500, DIRF/IPEN/CNEC-SP, Brasil).

As bases desta metodologia, assim como, resultados gerados podem ser utilizadas em outros conjugados de dextran-cisteína que tiverem aplicabilidade radiofarmacêutica, considerando as propriedades do elemento com especificidade biológica.

A corroboração da pureza através da cromatografia de exclusão molecular em colunas PD-10 evidenciou que o conjugado de dextran pode ter mantido a integridade molecular durante o processo de marcação. Toda a atividade associada ao produto encontrou-se na fração de eluição correspondente

a moléculas maiores de 5 kDa (< 6 mL)¹⁵¹, com um pico simétrico e distante das impurezas. Resultados similares para dextrans radiomarcados com tecnécio entre 60-90 kDa com este tipo de cromatografia foram relatados na literatura¹³⁰.

A determinação por CLAE da pureza confirmou a presença de um pico simétrico com pequenas alterações laterais, que podem corresponder a conjugados ^{99m}Tc -DC-1 com diferentes números de átomos de tecnécio. Este evento pode ocorrer devido ao número de cisteínas presentes na molécula do DC-1 (30). A eluição, no caso, destes radiocompostos pode ocorrer em tempos de retenção ligeiramente diferentes.

6.3 Radiomarcção dos conjugados DC-2, DCM-1, DCM-2

As condições de marcação definidas para o DC-1 foram utilizadas nas marcações dos outros conjugados, DC-2, DCM-1 e DCM-2. Para a radiomarcção dos conjugados com presença de manose, DCM-1, DCM-2 foi necessário aumentar o tempo reação em 30 min para atingir valores de pureza superiores a 90%. Esta mudança no tempo de reação deve-se ao número de cisteínas nas moléculas destes conjugados, responsáveis pela quelação do tecnécio (TAB. 2.). A concentração de cisteína na mistura reacional deve ser um dos principais fatores que influencia na cinética de reação de conjugados do tipo dextran-cisteína. As concentrações deste aminoácido no volume final (120 μL) foram de 301 e 250 μM para os conjugados DC-1, DC-2 respectivamente e 50 μM para os conjugados DCM-1 e DCM-2. Houve uma redução de 6 vezes para os derivados com manose em relação ao DC-1. Esta variação parece ser sensível para a cinética da reação do DCM-1 e DCM-2 com o precursor $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$.

A outra variável que incidiu negativamente na pureza radioquímica dos radioconjugados em estudo foi a massa molecular. Este parâmetro pode estar relacionado diretamente com os impedimentos estéricos devido à conformação de espiral flexível que apresentam os dextrans em solução. Morfologia esta que aumenta linearmente com a massa molecular¹⁵², razão pela qual as cisteínas na estrutura do conjugado não estariam o suficientemente expostas para quelar o tecnécio na forma de $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$, apesar do pequeno volume deste precursor¹⁵³.

Entretanto a atividade específica por quantidade de substância foi superior nos derivados de dextran de maior massa molecular. Este comportamento ocorre porque nas marcações foi mantida constante a amostra dos conjugados (20 µg), de maneira que os compostos de maiores massas moleculares como DC-2 e DCM-2 possuíam 45% e 33% a menos de moléculas com relação aos homólogos de menor massa molecular. Conjuntamente, os valores de pureza não foram muito discrepantes, deste modo a atividade por número de moléculas aumentou para os radioconjugados ^{99m}Tc -DC-2 e ^{99m}Tc -DCM-2. A influência de menor magnitude sobre a atividade específica (MBq/nmol) observada pela presença ou não de unidades de manose na estrutura guarda relação direta com o efeito deste parâmetro sobre a pureza, previamente analisado. Este impacto não é observado nos conjugados DC-1 e DCM-1, onde o último teve uma maior atividade específica porque o efeito da massa molecular interfere no efeito da presença de manose para estes compostos.

Os radioconjugados DCM-1 (69,01 MBq/nmol) e DCM-2 (100,13 MBq/nmol) apresentaram atividades específicas próximas ou superiores (TAB. 5) ao composto semelhante, Lymphoseek (74 MBq/nmol), já em estudos clínicos^{99,100,154}.

Quando foi confirmada a pureza por CLAE para o ^{99m}Tc -DC-2, ^{99m}Tc -DCM-1 e ^{99m}Tc -DCM-2, controlando rigorosamente os parâmetros cromatográficos, observou-se que os compostos com manose tiveram um tempo de retenção (11 min) ligeiramente superior ao observado para os conjugados de dextran sem este sacarídeo (10,7 min) (FIG. 21 e FIG. 22) o que sugere uma pequena diminuição da hidrofiliabilidade ao introduzir unidades de manose e/ou retirar unidades de cisteína na estrutura dos conjugados DC-1 e DC-2. Ao mesmo tempo detectou-se no ^{99m}Tc -DC-2, um comportamento similar ao observado no ^{99m}Tc -DC-1, um pico simétrico com pequenas alterações laterais. Entretanto, os picos dos radiotraçadores ^{99m}Tc -DCM-1 e ^{99m}Tc -DCM-2 foram perfeitamente simétricos, o que pode ser explicado pelo menor número de cisteínas na estrutura, diminuindo assim a possibilidade de formar radioconjugados com diferentes quantidades de tecnécio associadas.

6.4 Estabilidade radioquímica dos radioconjugados de dextran

Os complexos em estudo mantiveram os níveis de pureza radioquímica durante o tempo de meia vida do radionuclídeo ^{99m}Tc (6 h). Este resultado garante que o radionuclídeo e os conjugados de dextran permanecerão associados durante o período para a sua utilização.

A estabilidade global de um preparado radiofarmacêutico de tecnécio, na qual se considera principalmente o tempo de meia vida do radioisótopo e a estabilidade radioquímica, geralmente resulta ser no máximo 8 horas¹⁵⁵. Como estes radiotraçadores serão utilizados em técnicas linfocintilográficas onde a dose injetada¹⁵⁶ e atividade específica¹⁵⁷ resultam variáveis críticas, a estabilidade radioquímica demonstrada por 6 horas é suficiente em termos práticos.

Contudo, pode-se pressupor que estes radiotraçadores serão estáveis por um tempo maior, segundo as características de inércia química bem documentadas para os núcleos de $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$. Este comportamento justifica-se fundamentalmente pela configuração eletrônica do metal neste núcleo (d^6 de spin baixo) e pela sua natureza organometálica, o que faz a quelação de ^{99m}Tc tenha uma caráter covalente maior¹⁵⁸.

6.5 Estudos *in vitro* de transquelação frente à cisteína e à histidina

Os estudos de transquelação *in vitro* do radioisótopo ^{99m}Tc foram realizados em concentrações de cisteína (264 μM) e histidina (94 μM) típicas do plasma sanguíneo^{159, 160}. Embora os produtos uma vez administrados circulem primeiramente pela linfa, fluído que possui uma concentração protéica quase sempre inferior ao plasma sanguíneo^{41, 161}, finalmente passam ao sangue. Os fenômenos de transquelação *in vivo* em qualquer dos dois fluidos podem provocar efeitos não desejados nas imagens cintilográficas como retenção não específica e efeito de radiação basal. Por essas razões é preciso definir a magnitude deste fenômeno nas etapas preliminares do desenvolvimento de um radiofármaco de tecnécio. Utilizam-se estes dois aminoácidos por eles serem os mais relacionados com o processo de transquelação *in vivo*.

Os resultados obtidos *in vitro* permitem inferir que a transquelação do tecnécio ocorre principalmente através da cisteína, podendo-se explicar pela maior concentração deste aminoácido no plasma sanguíneo.

Entretanto, a menor transquelação observada dos radioconjugados contendo manose em relação aos compostos sem este sacarídeo, independentemente do tipo de aminoácido, pode ser explicada por algum efeito protetor das unidades de manose, como impedimento estérico, que dificulta o seqüestro do isótopo pela cisteína ou histidina. Por outro lado, o aumento da massa molecular teve um impacto similar na transquelação àquele detectado para a pureza, porém desta vez como o objetivo consiste em desfavorecer a reação, o efeito foi positivo. As conformações dos dextrans em solução¹⁵², definidas em grande medida pela massa molecular poderiam deixar menos acessíveis os átomos de tecnécio a agentes quelantes externos, quando estas possuem uma massa molecular maior.

6.6 Determinação do coeficiente de partição dos radioconjugados

Os radiocompostos $^{99m}\text{Tc-DCM-1}$ e $^{99m}\text{Tc-DCM-2}$ têm um caráter ligeiramente menos hidrofílico que os radiotraçadores sem manose. Isto pode ser justificado devido ao aumento do tamanho das cadeias laterais nos conjugados de manose porque a solubilidade em água deste monossacarídeo ($> 300\text{g}/100\text{ mL}$)¹⁶² é maior do que da cisteína ($28\text{ g}/100\text{ mL}$)¹⁶³(FIG. 13, TAB. 2). Em CLAE os conjugados $^{99m}\text{Tc-DC-1}$ e $^{99m}\text{Tc-DC-2}$ tiveram tempos de retenção menores (FIG. 21 e FIG. 22). Entretanto, os quatro radiotraçadores são definidos como hidrofílicos. Por isto, estes conjugados radiomarcados não devem se ligar significativamente nem às proteínas do plasma, nem aos sítios não específicos das células alvo no caso do $^{99m}\text{Tc-DCM-1}$ e $^{99m}\text{Tc-DCM-2}$, características estas associadas a moléculas lipofílicas. Ao mesmo tempo, a hidrofilicidade destes compostos não potencializará sua passagem através das membranas lipídicas das células¹⁴².

Para detecção de linfonodo sentinela a hidrofilicidade nos radiofármacos é desejada, principalmente para uma rápida migração destes desde o ponto de injeção¹⁶⁴.

6.7 Avaliação do efeito da massa molecular e a presença de manose no desempenho biológico dos radioconjugados de dextran-cisteína

Para um estudo comparativo entre diferentes radiotraçadores com um mesmo propósito deve-se manter o maior número de parâmetros constantes para que as variações no desempenho biológico destes possam ser atribuídas às mudanças estruturais. Neste estudo de triagem foram mantidos o tempo de análise (90 min), o volume de injeção (100 µL) e a quantidade administrada dos radiocomplexos (0,167 nmol).

A captação no linfonodo popliteal, a principal variável considerada neste estudo, mostrou dependência somente da presença de manose nos conjugados. Isto demonstra que as unidades de manose estão suficientemente expostas para que sejam reconhecidas pelos receptores deste monossacarídeo presentes nas membranas celulares dos macrófagos, presentes nos linfonodos¹⁶⁵.

A captação neste nodo foi estudada tomando como referência à dose injetada: 0,167 nmol. Sabe-se que a quantidade de moléculas injetadas (mol) na detecção de linfonodo sentinela tem uma influência notória em termos de biodistribuição. Isto se deve a saturação da capacidade de depuração de agentes exógenos nos nodos linfáticos⁷⁰. Confirmou-se que as doses retidas no linfonodo popliteal resultaram sempre maiores nos radiocompostos com manose (TAB. 8), demonstrando a especificidade pelo alvo biológico. A retenção no linfonodo popliteal dos traçadores ^{99m}Tc-DC-1 e ^{99m}Tc-DC-2 ocorre provavelmente pelo mecanismo de fagocitose, porém não mediado por receptores⁷⁹.

Na captação renal e hepática observou-se que a massa molecular influenciou de maneira significativa a retenção dos conjugados de dextran. Este achado pode ser explicado pela relação direta que existe entre a massa molar e o tamanho molecular nos polímeros de dextran¹⁶⁶. Ao diminuir a massa molecular, diminui o tamanho do dextran e assim aumenta a possibilidade de migração através da linfa e do sangue, para posteriormente estes radiotraçadores serem levados até os órgãos de excreção como os rins e o fígado.

As unidades de manose, entretanto, modificaram o mecanismo de excreção. Os traçadores ^{99m}Tc-DCM-1 e ^{99m}Tc-DCM-2 tiveram uma excreção

majoritariamente hepática enquanto para os radioconjugados ^{99m}Tc -DC-1 e ^{99m}Tc -DC-2 foi renal. Esta modulação excretora deve-se a presença de células epiteliais hepáticas que possuem similares receptores de manose aos encontrados na superfície dos macrófagos⁸⁸. Resultados de estudos pré-clínicos em coelhos com um conjugado de dextran-manose de 36 kDa referem uma maior captação renal do que hepática para 1 e 3 h após injeção. Neste trabalho a excreção hepática e os metabólitos degradados neste órgão são levados até os rins onde ocorre o processo de filtração glomerular para em seguida serem excretados pela urina¹⁶⁷. As diferenças entre os resultados da literatura e os obtidos no presente estudo devem-se principalmente às discrepâncias entre as doses injetadas, 100 pmol para o conjugado ^{99m}Tc - DTPA-dextran-manose, e 167 pmol para o ^{99m}Tc -DCM-1 e ^{99m}Tc -DCM-2 respectivamente. Potencializando-se ainda mais o efeito da dose pelas diferenças entre espécies, coelho e rato.

Os estudos linfocintilográficos correspondentes a este estudo de triagem permitiram detectar o linfonodo popliteal com os quatro traçadores. A imagem do linfonodo inguinal somente não foi observada para o produto ^{99m}Tc -DC-2. A não detecção ou baixa captação dos radiotraçadores nos outros nodos que não são o linfonodo sentinela é uma propriedade desejada nos radiofármacos com esta finalidade. Não obstante, a retenção em outros nodos pode ser controlada por outros fatores, como o volume de injeção, a quantidade injetada, tempo de análise⁷⁹, os quais não foram considerados neste estudo preliminar.

Especificamente, para os conjugados de manose detectou-se uma menor captação no linfonodo inguinal para o produto ^{99m}Tc -DCM-2 (maior extração popliteal), demonstrando uma vantagem para este radiotraçador. A extração popliteal do ^{99m}Tc -DCM-2 foi superior a 90 %, como é recomendado pela literatura¹⁶⁸. Não se deve descartar a possibilidade de uma saturação do nodo popliteal no produto ^{99m}Tc -DCM-1 ($3,4 \pm 1,2$ pmol) com relação ao ^{99m}Tc -DCM-2 ($3,9 \pm 1,7$ pmol), devido a uma mais rápida migração até o nodo popliteal do primeiro radiotraçador, por possuir uma menor massa molecular, e um posterior avanço até o nodo inguinal. Contudo, estes resultados são considerados preliminares porque são baseados no ROI realizado nas imagens cintilográficas planares que possuem o erro de considerar outros tecidos como: músculo, osso e sangue, que estão próximos às estruturas anatômicas. Além disto, a modulação

adequada através da dosagem dos produtos com manose, pode alterar favoravelmente o desempenho linfocintilográfico deles.

6.8 Biodistribuição dos radioconjugados ^{99m}Tc -DCM-1 e ^{99m}Tc -DCM-2 a uma dose menor

Uma das opções para melhorar o desempenho biológico de um radiotraçador para a detecção de LNS é injeção de doses mais baixas possíveis. Estas poderão ser ainda menores se o produto não for utilizado com o objetivo de obter imagem cintilográfica^{64, 70, 75}.

Com uma dose de 0,05 nmol (50 pmol) em 50 μL e massagem no ponto de injeção, o impacto da massa molecular do conjugado de manose refletiu-se na rápida migração até o nodo popliteal do ^{99m}Tc -DCM-1 em relação ao ^{99m}Tc -DCM-2 (TAB. 9). Entretanto, aos 30 min observou-se a maior retenção dos dois radiotraçadores. As quantidades máximas acumuladas dos radiotraçadores no nodo popliteal foram inferiores às observadas com uma dose de 167 pmol. Este resultado sugere que pode se estabelecer um equilíbrio entre a concentração do traçador circulante pela linfa e a concentração do produto ligada aos receptores de manose.

Observou-se uma diferença nos perfis de retenção dos radiotraçadores no período de 24 horas após administração da droga (TAB. 9). O ^{99m}Tc -DCM-1 mostrou-se estável enquanto que para o ^{99m}Tc -DCM-2, houve um aumento seguido de declínio, provavelmente devido ao processo de endocitose (fagocitose) mediada por receptores associado com os fármacos derivados de manose utilizados na detecção de LNS⁹⁸. Através deste mecanismo de endocitose estes radiotraçadores são processados pelos macrófagos presentes nos nodos linfáticos. O aumento das atrações não específicas de natureza repulsiva entre os elementos exógenos (radiotraçadores) e as células, neste caso os macrófagos, repercute de forma negativa no mecanismo de endocitose mediado por receptores, retardando o mesmo ou, em algumas ocasiões, até o impedindo totalmente¹⁶⁹. O ^{99m}Tc -DCM-1 possui uma menor massa molecular e, por conseqüência, menor tamanho e maior superfície de contato. Além disto, sendo uma molécula hidrofílica, as forças de repulsão entre este traçador e as células serão maiores do que as esperadas para o ^{99m}Tc -DCM-2. O DCM-1 possui

também menos unidades de manose que o seu homólogo de maior massa molecular. Todos estes elementos justificam a maior retenção do ^{99m}Tc -DCM-1 durante as 24 horas de estudo.

A presença de diferentes tipos de vasos aferentes em diversas proporções pode justificar a alta variabilidade na captação no linfonodo inguinal⁴⁸. Entretanto, a porcentagem de extração popliteal sempre foi próxima ou superior ao valor limite desejável, 90 %. Isto resultou de maior importância para o produto ^{99m}Tc -DCM-1, no qual valores baixos deste importante parâmetro foram detectados para doses de 0,167 nmol (Item 6.7).

A captação hepática do ^{99m}Tc -DCM-1 ($3,28 \pm 0,56$ % DI, 1 h a.i.) e do ^{99m}Tc -DCM-2 ($4,13 \pm 0,89$ % DI, 1 h a.i.) a uma dose de 0,05 nmol foi similar á observada para dose de 0,167 nmol, e superior ao Lymphoseek em coelhos ($1,42 \pm 0,25$ % DI, 1 h a.i.) segundo a literatura¹⁶⁷. Embora, não haja na literatura o coeficiente de partição do Lymphoseek, através da sua maior retenção no sangue ($20,3 \pm 0,12$ % DI/mL, 1 h a.i.)¹⁶⁷ e menor captação hepática pode-se inferir que este radiotraçador possui uma hidrofiliidade menor que os radiocomplexos ^{99m}Tc -DCM-1 e ^{99m}Tc -DCM-2. Esta relativa maior lipofiliidade, aumenta as interações de atração não específicas das células do fígado-Lymphoseek, favorecendo assim a velocidade do processo de metabolização hepática.

Similares perfis de captação hepática e no nodo popliteal foram confirmados, apresentando somente uma defasagem no tempo de 15 e 30 min para o ^{99m}Tc -DCM-1 e ^{99m}Tc -DCM-2, respectivamente. Fenômeno justificável pela distância anatômica do fígado e o nodo popliteal com relação ao ponto de injeção (pata) e pela afinidade similar dos receptores de manose nas células hepáticas e dos macrófagos.

A captações nos rins do ^{99m}Tc -DCM-1 ($0,58 \pm 0,23$ % DI) e ^{99m}Tc -DCM-2 ($0,41 \pm 0,09$ % DI), 60 min a.i. foram inferiores em comparação com a observada para o Lymphoseek ($7,47 \pm 0,38$ % DI)¹⁶⁷. A baixa retenção renal em todos os tempos estudados, está de acordo com uma eficiente filtração neste órgão previamente descrita para dextrans com massas moleculares inferiores a 500 kDa¹⁷⁰. A relativa alta captação renal do Lymphopseek deve-se possivelmente à

eliminação dos produtos do metabolismo hepático por este órgão de excreção segundo foi sugerido por Hoh e col.¹⁶⁷.

As atividades retidas no ponto de injeção depois de 60 min p.i para o ^{99m}Tc -DCM-1 e ^{99m}Tc -DCM-2 (FIG. 26 A) resultaram também inferiores ou similares a radiotraçadores como o Lymphoseek sem massagem ($60,1 \pm 0,09$ %DI)¹⁶⁵, com massagem ($52,03 \pm 8,0$ %DI) e o ^{99m}Tc -MSA sem massagem ($52,02 \pm 8,1$ % DI)¹⁰⁷. Quanto menor a atividade retida no ponto de injeção, melhor o desempenho do radiocomplexo, porque se evita a interferência cintilográfica com LNS próximos ao ponto de injeção. A aceitável migração dos conjugados ^{99m}Tc -DCM-1 e ^{99m}Tc -DCM-2 pode ser atribuída ao tamanho destas moléculas, à hidrofiliabilidade e à flexibilidade do dextran²².

As captações no sangue, nos tecidos muscular e ósseo para os conjugados de dextran considerados nesta avaliação foram sempre menores ou iguais aos previamente definidos para o Lymphoseek¹⁶⁷ e o ^{99m}Tc -MSA¹⁰³. Estes achados sugerem que imagens cintilográficas nítidas pudessem ser obtidas porque os efeitos de radiação basal provocados pela retenção dos radiofármacos nestes tecidos e o sangue serão mínimos. As imagens linfocintilográficas (FIG. 27) confirmaram a inferência feita previamente.

A utilização de doses 3,34 vezes menores para o ^{99m}Tc -DCM-1 e ^{99m}Tc -DCM-2, respectivamente, favoreceu a qualidade do estudo linfocintilográfico. O linfonodo inguinal quase não resultou detectável, enquanto o popliteal foi nitidamente definido. Estes estudos a baixas doses confirmaram a possibilidade de utilizar no modelo animal uma quantidade de 50 pmol tanto para estudos de detecção externa (gama-probe) como por imagens.

6.9 Impacto da pureza radioquímica do produto ^{99m}Tc - DCM-2 na biodistribuição

Entre os radiotraçadores ^{99m}Tc -DCM-1 e ^{99m}Tc -DCM-2 escolheu-se o segundo para efetuar este estudo. A decisão foi baseada no comportamento consistente da extração popliteal observado para as duas atividades injetadas 18,5 MBq (167 pmol) e 5,5 MBq (50 pmol) no ^{99m}Tc -DCM-2.

Tem-se por norma utilizar radiofármacos sempre com o maior índice de pureza radioquímica. Os estudos até agora realizados para o ^{99m}Tc -DCM-2 foram feitos com um valor de pureza radioquímica próxima a 90% ($90,28 \pm 0,27\%$). Sabe-se que quantidades inaceitáveis de impurezas radioquímicas em uma preparação radiofarmacêutica podem alterar a biodistribuição e comprometer a qualidade da imagem¹⁴⁵. Isto justifica os estudos de estabelecimentos de limites de pureza radioquímica a serem utilizados para cada radiotraçador.

Como valores similares de captação biológica foram obtidos para o produto purificado e sem purificação (TAB. 9, TAB. 10, FIG. 25, TAB. 11 e FIG. 27), demonstrou-se que o ^{99m}Tc -DCM-2 pode ser usado sem o passo de purificação, reduzindo-se, deste modo, o tempo total de preparação do radiotraçador e aumentando o tempo útil do mesmo.

6.10 Determinação do efeito da dose e volume de injeção no desempenho do ^{99m}Tc - DCM-2

Nos estudos com o ^{99m}Tc -DCM-2 descritos, os efeitos da dose e volume de injeção nos experimentos realizados não foram definidos, devido à diminuição simultânea de ambos os fatores.

As variações de volume de injeção podem influenciar de maneira positiva ou negativa no desempenho linfático dos traçadores devido ao frágil balanço entre as pressões internas e externas dos capilares linfáticos⁴⁸. Isto sugere que para cada traçador e região anatômica onde ele é administrado tem um volume de injeção ideal. Além do volume de injeção e a dose, é necessário considerar a concentração do produto, devido à mudança que experimenta esta última variável quando são alteradas as primeiras.

A influência do volume de injeção para o produto ^{99m}Tc -DCM-2 variou com a dose administrada. A maior captação observada no linfonodo popliteal para uma dose de 0,05 nmol foi obtida com o menor volume injetado (50 μL) devido à baixa concentração do traçador (0,5 μM) no volume de 100 μL (FIG. 28). Os efeitos da concentração dos radiofármacos utilizados na detecção de LNS constam na literatura para colóides sem especificidade por receptores celulares¹⁷¹. Em radiotraçadores com afinidade biológica, o impacto da

concentração é igualmente importante porque a ligação deste aos receptores celulares, no caso específico em estudo, os receptores de manose nos macrófagos, depende da concentração de radiomolécula livre¹⁴².

À uma dose de 0,135 nmol, o aumento do volume favoreceu a captação no nodo popliteal (FIG. 28). A concentração do ^{99m}Tc-DCM-2 em 100 µL foi de 1,35 µM, próxima á observada para uma dose de 0,05 nmol em 50 µL, 1,0 µM. Baseado neste resultado sugere-se que o preparado do ^{99m}Tc-DCM-2, deve ser administrado a concentrações superiores a 1 µM. O impacto positivo do aumento do volume de injeção na captação do nodo popliteal devido ao aumento da pressão intersticial e o maior fluxo através dos capilares linfáticos¹⁷², somente será observado quando o traçador for injetado a uma concentração superior a um valor critico, 1 µM para o ^{99m}Tc-DCM-2.

A uma dose de 0,22 nmol, observaram-se valores de doses retidas semelhantes no nodo popliteal para os volumes estudados de 50 e 100 µL (FIG. 29), com valores de concentrações de 4,4 e 2,2 µM respectivamente, maiores que a crítica para o ^{99m}Tc-DCM-2. Observa-se portanto uma saturação da capacidade de retenção no linfonodo sentinela com uma alta dose, e concentração elevada. O efeito do aumento do volume de injeção resultou na maior captação no linfonodo inguinal como consequência de uma baixa extração popliteal.

A extração popliteal em uma dose de 0,05 nmol foi melhor com um volume menor (50µL) (FIG. 30). Com um volume de 100 µL favorece-se a migração do produto, mas como a concentração é menor que a critica, isto é 1 µM, o produto foi pouco retido nos nodos popliteal e inguinal, em porcentagens similares, afetando a extração popliteal. Na injeção de 50 µL, a migração mais lenta do ponto de injeção garante uma preferencial retenção do radiotraçador no linfonodo popliteal.

Nos experimentos com uma dose de 0,135 nmol, a extração popliteal permanece invariável com os dois volumes injetados (FIG. 30), provavelmente pela não saturação do linfonodo popliteal, o que impede uma maior retenção do traçador no nodo inguinal, mesmo com um aumento do volume.

A utilização de uma dose de 0,135 nmol em 100 µL resultou ser a combinação idônea porque conseguiu-se saturar o linfonodo popliteal (maior sinal radioativo possível nesta estrutura linfática) (FIG. 30), com a menor atividade injetada. Simultaneamente a captação no nodo inguinal foi mínima e, portanto garantiu-se uma alta extração popliteal (FIG. 31).

Os parâmetros dose e o volume para o produto ^{99m}Tc -DCM-2 não influenciaram na depuração do sitio de injeção, assim como os obtidos em ensaios clínicos para o Lymphoseek⁹⁸. Isto estabelece que a captação no nodo popliteal não é a etapa que limita a velocidade de saída do traçador ^{99m}Tc -DCM-2 desde o ponto de injeção. A diminuição significativa da atividade no sito de administração e a invariabilidade da captação no nodo inguinal entre os procedimentos realizados com e sem massagem (FIG. 26 A) (TAB. 11) para (50 pmol, 50 µL, ^{99m}Tc -DCM-2) também corrobora esta hipótese.

A captação renal (% DI), hepática (% DI), nos tecidos musculares e ósseos (% DI/g), assim como no sangue (% DI/mL) também foi independente da dose e volume injetado (TAB. 12). Assim confirmou-se que a saída do ponto de injeção e posterior biodistribuição variou proporcionalmente com a dose (0,05-0,22 nmol) sem a interferência do volume da injeção (50-100 µL).

As imagens linfocintilográficas corresponderam aos estudos de biodistribuição. A melhor imagem cintilográfica obtida foi para uma dose de 0,135 nmol administrada em 100 µL (FIG. 32 D), com excelente contraste entre a captação do linfonodo popliteal e inguinal.

Todos os ajustes de parâmetros realizados para otimizar o desempenho do ^{99m}Tc -DCM-2 devem ser usados para uma injeção subcutânea. Eles podem mudar ao ser injetado o produto em outros sítios anatômicos, devido às modificações exercidas pela densidade do tecido sobre o fluxo linfático¹⁷⁰.

6.11 Desempenho dos radiotraçadores para LNS estabelecidos na medicina nuclear brasileira

Para demonstrar que o produto ^{99m}Tc -DCM-2 possui atributos que favorecem sua introdução como radiofármaco para a detecção de LNS, foram

realizados estudos comparativos com os radiotraçadores de maior utilização no Brasil para este propósito, o ^{99m}Tc -Dextran-500 e o ^{99m}Tc -Fitato coloidal.

Para um tempo de 30 min a captação no linfonodo popliteal dos dois produtos comercializados no Brasil (TAB. 13), foi notoriamente inferior em comparação com o ^{99m}Tc -DCM-2 (FIG. 29), para uma atividade similar. O tamanho micrométrico das partículas radiocolóidais versus o tamanho nanométrico do ^{99m}Tc -DCM-2 ($\cong 7$ nm, estimativa realizada a partir da relação massa molecular, 28,2 kDa ⁹³), é uma das causas que define as grandes diferenças observadas na retenção no nodo popliteal. A velocidade de migração até o linfonodo mais próximo ao ponto de injeção é inversamente proporcional ao tamanho molecular. A outra causa é a falta de elementos de especificidade biológica nos radiofármacos nacionais para aumentar a retenção nos nodos linfáticos.

No caso do ^{99m}Tc -Dextran-500, as captações renal e hepática extremamente baixas constituem uma evidência de uma alta retenção do produto no ponto de injeção (TAB. 13). Por outro lado, o ^{99m}Tc -Fitato coloidal possui melhor depuração do sítio de injeção, mas concentra-se marcadamente a atividade no fígado (TAB. 13), o qual pode comprometer a utilização do radiofármaco em zonas próximas a este órgão.

Em uma análise geral, os radiofármacos nacionais (^{99m}Tc -Dextran-500 e o ^{99m}Tc -Fitato coloidal) para a detecção de LNS quando comparados com o ^{99m}Tc -DCM-2, precisam de um tempo e doses maiores para migrar ao nodo linfático. Em contrapartida possuem um procedimento simples de marcação, a temperatura ambiente por 15 min. Entretanto as atividades específicas máximas alcançáveis, segundo as instruções do fabricante, para ambos os produtos são baixas, 0,037 MBq/ μg e 0,0185 MBq/ μg quando comparados com o ^{99m}Tc -DCM-2 (100,13 MBq/nmol, equivalente a 3,3 MBq/ μg). O único inconveniente que teria a implementação do ^{99m}Tc -DCM-2, é o seu protocolo de marcação em duas etapas, que aumenta em 65 minutos com relação ao ^{99m}Tc -Dextran-500 e ao ^{99m}Tc -Fitato coloidal. A elaboração de um kit, onde se conjuguem os reagentes das duas etapas, formação do precursor e marcação do DCM-2, atenuaria a principal limitação deste novo traçador.

7 CONCLUSÕES

Desenvolveu-se uma metodologia com aplicabilidade em distintos conjugados de dextran que possuam unidades de cisteína para serem marcados com o precursor $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$. Esta permitiu determinar a temperatura, o tempo e a razão quantidade de produto/atividade de precursor utilizada na radiomarcção para uma máxima pureza e atividade específica.

Os derivados de dextran-cisteína considerados neste trabalho foram radiomarcados com valores de pureza radioquímica superiores a 90 % e atividade específica superior a 59,9 MBq/nmol, próximos ou superiores à atividade específica do produto semelhante, Lymphoseek. Definiram-se para eles três técnicas para quantificar a qualidade das radiomarcções, uma mediante a combinação das cromatografias em camada delgada e em papel, e as outras baseadas na cromatografia de exclusão por tamanho e por CLAE em fase reversa.

Os produtos radiomarcados, ^{99m}Tc -DC-1, ^{99m}Tc -DC-2, ^{99m}Tc -DCM-1 e ^{99m}Tc -DCM-2 resultaram estáveis por seis horas e resistentes a transquelação frente a cisteína e a histidina.

Demonstrou-se que as unidades de manose na estrutura dos conjugados DCM-1 e DCM-2 estão acessíveis aos receptores de manose nos macrófagos, conferindo uma retenção maior nos nodos linfáticos.

Parâmetros como dose (0,05-0,22 nmol), volume (50-100 μL) e concentração nas condições investigadas demonstraram a influência sobre migração do sitio de injeção e extração popliteal.

O ^{99m}Tc -DCM-2 entre os derivados estudados demonstrou melhor desempenho na detecção de LNS com boa qualidade de imagem cintilográfica encorajando o desenvolvimento de um kit para ser colocado no mercado.

ANEXO 1– Aprovação do comitê de ética IPEN

ANEXO 2– Número de ratos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar (fêmeas, 150-200 g) usados no trabalho experimental

Experimento	Número de animais
Avaliação do efeito da massa molecular e a presença de manose no desempenho biológico dos radioconjugados de dextran-cisteína	12
Biodistribuição dos radioconjugados ^{99m}Tc -DCM-1 e ^{99m}Tc -DCM-2 utilizando uma dose menor	60
Impacto da pureza radioquímica do produto ^{99m}Tc -DCM-2 na biodistribuição	5
Determinação do efeito da dose e volume de injeção no desempenho do ^{99m}Tc -DCM-2	18
Avaliação biológica dos radiofármacos ^{99m}Tc -Dextran 500 e ^{99m}Tc -Fitato coloidal	6
Total	101

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ULLAH, M.F.; AATIF, M. The footprints of cancer development: Cancer biomarkers. **Cancer Treat. Rev.**, v. 35, p. 193-200, 2009.
- 2 International Agency for Research on Cancer. **World Cancer Report**, Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008.
- 3 OTT, J.J.; ULLRICH, A.; MILLER, A.B. The importance of early symptom recognition in the context of early detection and cancer survival. **Eur. J. Cancer**, v. 45, p. 2743-2748, 2009.
- 4 CASTELLANOS, A.; VICENTE-DUEÑAS, C.; CAMPOS-SÁNCHEZ, E.; CRUZ, J.J.; GARCÍA-CRIADO, F.J.; GARCÍA-CENADOR, M.B.; LAZO, P.A.; PÉREZ-LOSADA, J.; SÁNCHEZ-GARCÍA, I. Cancer as a reprogramming-like disease: Implications in tumor development and treatment. **Semin. Cancer Biol.**, v. 20, p. 93-97, 2010.
- 5 FAN, Y.; WANG, J.; YANG, Y.; LIU, Q. FAN, Y.; YU, J.; ZHENG, S.; LI, M.; WANG, J. Detection and identification of potential biomarkers of breast cancer. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 136, p. 1243-1254, 2010.
- 6 TOTHILL, I.E. Biosensors for cancer markers diagnosis. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 20, p. 55–62, 2009.
- 7 HELLSTROM, I.; HEAGERTY, P.J.; SWISHER, E.M.; LIU, P.; JAFFAR, J.; AGNEW, K.; HELLSTROM, K.E. Detection of the HE4 protein in urine as a biomarker for ovarian neoplasms. **Cancer Lett.**, v. 296, p. 43-48, 2010.
- 8 TAINSKY, M.A. Genomic and proteomic biomarkers for cancer: A multitude of opportunities. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1796, p. 176–193, 2009.
- 9 FASS, L. Imaging and cancer: A review. **Mol. Oncol.**, v. 2, p. 115–152, 2008.
- 10 REMBIELAK, A.; CULLEN, J.; SALEEM, A.; PRICE, P. Imaging in câncer. **Medicine**, v. 36, p. 5-8, 2008.
- 11 SCHÖDER, H.; ONG S.C. Fundamentals of molecular imaging: rationale and applications with relevance for radiation oncology. **Semin. Nucl. Med.**, v. 38, p. 119-128, 2008.
- 12 MILLER, J.C.; THRALL, J. H. Clinical molecular imaging. **J. Am. Coll. Radiol.**, v. 1, p. 4-23, 2004.
- 13 WANG, D. S.; DAKE, M.D.; PARK, J.M.; KUO, M.D. Molecular imaging: a primer for interventionalists and imagers. **J. Vasc. Interv. Radiol.**, v. 20, p. S505–S522, 2009.
- 14 DELBEKE, D.; SCHÖDER, H.; MARTIN, W.H.; WAHL, R.L. Hybrid imaging (SPECT/CT and PET/CT): improving therapeutic decisions. **Semin. Nucl. Med.**, v. 39, p. 308-340, 2009.

- 15 WADSAKA, W.; MITTERHAUSER, M. Basics and principles of radiopharmaceuticals for PET/CT. **Eur. J. Radiol.**, v. 73, p. 461–469, 2010.
- 16 MASSOUD, T.F.; GAMBHIR, S.S. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. **Genes Dev.**, v. 17, p. 545–580, 2003.
- 17 LIU, S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. **Adv. Drug Deliver. Rev.**, v. 60, p. 1347–1370, 2008.
- 18 SCHUSTER, D.M.; HALKAR, R.K. Molecular imaging in breast câncer. **Radiol. Clin. N. Am.**, v. 42, p. 885 – 908, 2004.
- 19 COUGHLIN, A.; RESTO, V.A. Oral cavity squamous cell carcinoma and the clinically n0 neck: the past, present, and future of sentinel lymph node biopsy. **Curr. Oncol. Rep.**, v. 12, p. 129–135, 2010.
- 20 ELLNER, S.J.; MÉNDEZ, J.; VERA, D.R.; HOH, C.K.; ASHBURN, W.L.; WALLACE, A.M. Sentinel lymph node mapping of the colon and stomach using Lymphoseek in a pig model. **Ann. Surg. Oncol.**, v. 11, p.674–681, 2004.
- 21 KHAN, N.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Lifestyle as risk factor for cancer: Evidence from human studies. **Cancer Lett.**, v. 293, p. 133–143, 2010
- 22 COOPER, G.M. **Elements of human cancer**. Sudbury, M.A.: Jones and Bartlett, 1992.
- 23 CROWLEY, L.V. **An introduction to human diseases: pathology and pathophysiology correlations**. 8 ed. Sudbury, M.A.: Jones and Bartlett, 2010.
- 24 SURESH, S. Biomechanics and biophysics of cancer cells. **Acta Mater.**, v. 55, p. 3989–4014, 2007.
- 25 RUDDON, R.W. **Cancer Biology**. 4 ed. New York, N.Y. Oxford University Press, 2007.
- 26 CATHCART, M.C.; REYNOLDS, J.V.; O'BYRNE, K.J.; PIDGEON, G.P. The role of prostacyclin synthase and thromboxane synthase signaling in the development and progression of cancer. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1805, p. 153–166, 2010.
- 27 CENTRO DE IMPRENSA EM ESPANHOL. Organização Mundial da Saúde. Estatísticas mundiais do câncer. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>>. Acesso em: 4 fev. 2011.
- 28 JANSSEN-HEIJNEN, M.L.G.; COEBERGH, J.W.W. Trends in incidence and prognosis of the histological subtypes of lung cancer in North America, Australia, New Zealand and Europe. **Lung Cancer-J IA. SLC.**, v. 31 ,p. 123–137, 2001.

- 29 BASTIDE, K.; UGOLIN, N.; LEVALOIS, C.; BERNAUDIN, J.F.; CHEVILLARD, S. Are adenosquamous lung carcinomas a simple mix of adenocarcinomas and squamous cell carcinomas, or more complex at the molecular level? **Lung Cancer-J IA. SLC.**, v. 68, p. 1–9, 2010.
- 30 HOLLI, K.; LÄÄPERI, A.L.; HARRISON, L.; LUUKKAALA, T.; TOIVONEN, T.; RYYMIN, P.; DASTIDAR, P.; SOIMAKALLIO, S.; ESKOLA, H. Characterization of Breast Cancer Types by Texture Analysis of Magnetic Resonance Images. **Acad. Radiol.**, v. 17, p. 135–141, 2010.
- 31 AUTORINO, R.; DI LORENZO, G.; DAMIANO, R.; GIANNARINI, G.; DE SIO, M.; CHENG, L.; MONTIRONI, R. Pathology of the prostate in radical cystectomy specimens: A critical review. **Surg. Oncol.**, v. 18, p. 73-84, 2009.
- 32 POLK, D.; PEEK, R.M.JR. Helicobacter pylori: gastric cancer and beyond. **Nat. Rev. Cancer.** V.10, p. 403-414, 2010.
- 33 GIEN, L.T.; BEAUCHEMIN, M.C.; THOMAS, G. Adenocarcinoma: A unique cervical cancer. **Gynecol. Oncol.**, v. 116, p. 140-146, 2010.
- 34 KIM, M.S.; LEE, J.; SIDRANSKY, D. DNA methylation markers in colorectal cancer. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 29, p. 181-206, 2010.
- 35 NASCA, P.C. Basic terminology. In: Nasca, P.C.; Pastides, H. **Fundamentals of cancer epidemiology**. Gaithersburg, M.D.: Aspen Publisher, 2001. p. 23-38.
- 36 FRANKS, L.M.; Knowles, M.A. What is cancer? In : Knowles, M.A.; Selby, P.J. **Introduction to the cellular and molecular biology**. 4 ed. Oxford, Great Britain: Oxford University Press, 2005. p. 1-24.
- 37 GEIGER, T.R.; PEEPER, D.S. Metastasis mechanisms. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1796, p. 293-308, 2009.
- 38 MAREEL, M.; OLIVEIRA, M.J.; MADANI, I. Cancer invasion and metastasis: interacting ecosystems. **Virchows. Arch.**, v. 454, p. 599-622, 2009.
- 39 OPPENHEIMER, STEVEN B. Cellular basis of cancer metastasis: A review of fundamentals and new advances. **Acta histochem.**, v. 108, p. 327-334, 2006.
- 40 NEAL, C.P.; BERRY, D.P. Basic principles of the molecular biology of cancer II: angiogenesis, invasion and metastasis. **Surgery**, v. 24, p. 120-125, 2006.
- 41 SWARTZ, M.A. The physiology of the lymphatic system. **Adv. Drug Deliver. Rev.**, v. 50, p.3-20, 2001.
- 42 TOBLER, N.E.; DETMAR, M. Tumor and lymph node lymphangiogenesis-impact on cancer metastasis. **J. of Leukocyte Biol.**, v. 80, p. 691-696, 2006
- 43 TAMMELA, T.; ALITALO, K. Lymphangiogenesis: Molecular Mechanisms and Future Promise. **Cell**, v. 140. p. 460-476, 2010.

-
- 44 SHIELDS, J.D.; SWARTZ, M.A. Lymphatic physiology and function in healthy tissue and cancer. In: Stacker, S.A.; Achen, M.G. ***Lymphangiogenesis in Cancer Metastasis***. Springer Science, 2009. p. 231-246.
 - 45 SKANDALAKIS, J.E.; SKANDALAKIS, L.J., SKANDALAKIS, P.N. Anatomy of the Lymphatics. ***Surg. Oncol. Clin. N. Am.***, v. 16, p. 1–16, 2007.
 - 46 MUMPRECHT, V.; DETMAR, M. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. ***J. Cell. Mol. Med.*** v. 13, p. 1405–1416, 2009.
 - 47 MOSTAFA, G.; CATHEY, L.; GREENE, F.L. ***Review of Surgery***. New York, NY: Springer Science, 2006. cap 143, the lymphatic system. p. 325-328.
 - 48 TANIS, P.J.; NIEWEG, O.E.; VALDÉS OLMOS, R.A; KROON, B.B.R. Anatomy and Physiology of Lymphatic Drainage of the Breast from the Perspective of Sentinel Node Biopsy. ***J. Am. Coll. Surg.***, v.192, p. 399-409, 2001.
 - 49 KRASNOW, A.Z.; ELGAZZAR, A.H.; KAZEM, N. Lymphoscintigraphy. In: ELGAZZAR, A. H. ***The pathophysiologic basis of nuclear medicine***. 2 ed. Alemanha: Springer-Verlag, 2006, p. 496-508.
 - 50 SCHAUER, A.J.; BECKER, W.; REISER, M.; POSSINGER, K. Würzburg: ***The sentinel lymph node concept***. Springer-Verlag, 2005. Cap. 1, Definition of the sentinel lymph node concept and basic principles of detection. p. 1-2.
 - 51 ADIB, T.; BARTON D.P.J. The sentinel lymph node: Relevance in gynaecological cancers. ***Eur. J. Surg. Oncol.***, v. 32, p. 866-874, 2006.
 - 52 QUAN, M.L.; McCREADY, D. The evolution of lymph node assessment in breast cancer. ***J. Surg. Oncol.***, v. 99. p. 194-198, 2009.
 - 53 STEBBINS, W.G.; GARIBYAN, L.; SOBER, A.J. Sentinel lymph node biopsy and melanoma: 2010 update. Part I. ***J. Am. Acad. Dermatol.***, v. 62, p.723-34, 2010
 - 54 PURDIE, CA. Sentinel lymph node biopsy: Review of the literature and guidelines for pathological handling and reporting. ***Curr. Diagn. Pathol.***, v. 13, p.106-115, 2007.
 - 55 EL-GHOBASHY, A.E.; SAIDI, S.A. Sentinel lymph node sampling in gynaecological cancers: Techniques and clinical applications. ***Eur. J. Surg. Oncol.***, v. 35 p. 675-685, 2009.
 - 56 BASTIDE, C.; BRENOT-ROSSI, I.; GARCIA, S.; ROSSI, D. Radioisotope guided sentinel lymph node dissection in patients with localized prostate cancer: Results of the first 100 cases. ***Eur. J. Surg. Oncol.***, v. 35, p. 751-756, 2009.
 - 57 ZAAG, E.S. VAN DER; BUSKENS, C.J.; KOOIJ, N.; AKOL, H.; PETERS, H.M.; BOUMA, W.H.; BEMELMAN, W.A. Improving staging accuracy in colon and rectal cancer by sentinel lymph node mapping: A comparative study. ***Eur. J. Surg. Oncol.***, v. 35, p. 1065-1070, 2009.

- 58 SLOAN, P. Head and neck sentinel lymph node biopsy: current state of the art. **Head and Neck Pathol.**, v. 3, p. 231-237, 2009.
- 59 BEMBENEK, A.; GRETSCHER, S.; SCHLAG, P.M. Sentinel lymph node biopsy for gastrointestinal cancers. **J. Surg. Oncol.**, v. 96, p. 342-352, 2007.
- 60 WOODS, S.L.; FROELICHER, E.S.S.; MOTZER, S.U. Enfermagem em cardiologia. 4 ed. Brasil: Lippincott Williams and Wilkins, 2000. cap. 17., teste ergométrico. p. 455-478.
- 61 KIM, H.J.; SON, B.H.; PARK, E. W.; LIM, W.S.; SEO, J.Y.; JANG, M.A.; KU, B. K.; AHN, S.H. Axillary recurrence after negative sentinel lymph node biopsy. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 114, p. 301–305, 2009.
- 62 MCMASTERS, K.M.; GIULIANO, A.E.; ROSS, M.I.; REINTGEN, D.S.; HUNT, K.K.; BYRD, D.R.; KLIMBERG, V.S.; WHITWORTH, P.W.; TAFRA, L.C.; EDWARDS, M.J. Sentinel-lymph-node biopsy for breast cancer – not yet the standard of care. **N. Engl. J. Med.**, v. 339, p.990–995, 1998.
- 63 TSOPELAS, C; SUTTON, R. Why Certain Dyes Are Useful for Localizing the Sentinel Lymph Node. **J. Nucl. Med.**, v. 43:p. 1377–1382, 2002.
- 64 AARSVOLD, J.N.; ALAZRAKI, N.P. Update on Detection of Sentinel Lymph Nodes in Patients With Breast Cancer. **Semin. Nucl. Med.**, v. 35:116-128, 2005.
- 65 EL-MARAGHI, R.H.; KIELAR, A.Z. PET vs sentinel lymph node biopsy for staging melanoma: a patient intervention, comparison, outcome analysis. **J. Am. Coll. Radiol.**, v. 5, p.924-931, 2008.
- 66 KARGOZARAN, H.; SHAH, M.; LI, Y.; BECKETT, L.; GANDOUR-EDWARDS, R.; SCHNEIDER, P.D.; KHATRI, V.P. Concordance of peritumoral technetium 99m colloid and subareolar blue dye injection in breast cancer sentinel lymph node biopsy. **J. Surg. Res.**, v. 143, p. 126–129, 2007.
- 67 MATHEW, M.A.; SAHA, A.K.; SALEEM, T.; SADDIOZAI, N.; HUTCHINSON, I.F.; NEJIM, A. Pre-operative lymphoscintigraphy before sentinel lymph node biopsy for breast cancer. **Breast**, v. 19, p. 28–32, 2010.
- 68 GLASS, E.C. Sentinel node identification using radionuclides in melanoma and breast cancer. In: LEONG, S.P.L. (Ed.). **Cancer metastasis and the lymphovascular system: basis for rational therapy**. New York, N.Y.: Springer Science, 2007. p. 85-100.
- 69 ESHIMA, D.; FAUCONNIER, T.; ESHIMA, L.; THORNBAC, J. R. Radiopharmaceuticals for lymphoscintigraphy: including dosimetry and radiation considerations. **Semin. Nucl. Med.**, v. 30, p. 25-32, 2000.
- 70 MARIANI, G.; GIPPONI, M.; MORESCO, L.; VILLA, G.; BARTOLOMEI, M.; MAZZAROL, G.; BAGNARA, M. C.; ROMANINI, A.; CAFIERO, F.; PAGANELLI, G.; STRAUSS, H.W. Radioguided sentinel lymph node biopsy in malignant cutaneous melanoma. **J. Nucl. Med.**, v. 43:p. 811–827, 2002.

- 71 PAIVA, G.R.; FILHO, R.S.O.; FERREIRA, L.M.; WAGNER, J.; NOGUEIRA, S.A.; NOVO, N.F.; JULIANO, Y.; ROCHA, J.L.B.S. Phytate technetium-99m versus dextran 500 technetium-99m in the sentinel lymph node biopsy. **Acta Radiol.**, v. 47, p. 65-70, 2006.
- 72 MARIANI, G.; ERBA, P.; MANCA, G.; VILLA, G.; GIPPONI, M.; BONI, G.; BUFFONI, F.; SURIANO, S.; CASTAGNOLA, F.; BARTOLOMEI, M.; STRAUSS, H. W. Radioguided sentinel lymph node biopsy in patients with malignant cutaneous melanoma: the nuclear medicine contribution. **J. Surg. Oncol.**, v. 85, p. 141–151, 2004.
- 73 KACHALA, S.S.; SERVAIS, E.L.; PARK, B.J.; RUSCH, V.W.; ADUSUMILLI, P.S. Therapeutic sentinel lymph node imaging. **Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 21 p. 327-338, 2009.
- 74 ROSES, R.E.; KUMAR, R.; ALAVI, A.; CZERNIECKI, B.J. The Role of Lymphatic Mapping and Sentinel Lymph Node Biopsy in the Staging of Breast Cancer. **PET Clin.**, v. 4, p. 265-276, 2009.
- 75 STYBLO, T.; AARSVOLD, J.N.; GRANT, S.F.; COHEN, C.; LARSEN, T.; WALDROP, S.; ALAZRAKI, N.P. Sentinel lymph nodes: optimizing success. **Semin. Roentgenol.**, v. 36, p. 261-269, 2001.
- 76 PANDIT-TASKAR, N.; GEMIGNANI, M.L.; LYALL, A.; LARSON, S.M., BARAKAT, R.R.; ABU RUSTUM, N.R. Single photon emission computed tomography SPECT-CT improves sentinel node detection and localization in cervical and uterine malignancy. **Gynecol. Oncol.**, v. 117, p. 59-64, 2010.
- 77 BERGQVIST, L.; SUNDBERG, R.; RYDÉN, S.; STRAND, S.E. The "critical colloid dose" in studies of reticuloendothelial function. **J. Nuc. Med.**, v. 28, p. 1424-1429, 1987.
- 78 FERNÁNDEZ, A.; VIDAL-SICART, S. El ganglio centinela. Concepto y aplicaciones clínicas en neoplasias de mama y melanoma. **Rev. Esp. Med. Nuclear**, v. 19, p. 371-387, 2000.
- 79 MARIANI, G.; MORESCO, L.; VIALE, G.; VILLA, G.; BAGNASCO, M.; CANAVESE, G.; BUSCOMBE, J.; STRAUSS, H.W.; PAGANELLI, G. Radioguided Sentinel Lymph Node Biopsy in Breast Cancer Surgery. **J. Nucl. Med.**, v. 42:p. 1198–1215, 2001.
- 80 RUBIO, I.T.; KLIMBERG, V.S. Techniques of sentinel lymph node biopsy. **Semin. Surg.Oncol.**, v. 20, p. 214–223, 2001.
- 81 KRYNYCKYI, B.R.; KIM, C.K.; GOYENECHEA, M.R.; CHAN, P.T.; ZHANG, Z.Y.; MACHAC, J. Clinical breast lymphoscintigraphy: optimal techniques for performing studies, image atlas, and analysis of images. **Radiographics**, v. 24, p. 121–145, 2004.
- 82 SCHÖDER, H.; GLASS, E.C.; PECKING, A.P.; HARNESS, J.K.; WALLACE, A.M.; HIRNLE, P.; ALBERINI, J.L.; VILAIN, D.; LARSON, S.M.; HOH, C.K.; VERA, D.R. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 25, p. 185–201, 2006.

-
- 83 JAIN, R.; DANDEKAR, P.; PATRAVALE, V. Diagnostic nanocarriers for sentinel lymph node imaging. **J. Control. Release**, v. 138, p. 90-102, 2009.
 - 84 PHILLIPS, W.T.; KLIPPER, R.; GOINS, B. Use of ^{99m}Tc-labeled liposomes encapsulating blue dye for identification of the sentinel lymph node. **J. Nucl. Med.**, v. 42, p. 446-451, 2001.
 - 85 PHILLIPS, W.T.; KLIPPER, R.; GOINS, B. Novel Method of Greatly Enhanced Delivery of Liposomes to Lymph Nodes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 295, p.309-313, 2000.
 - 86 PLUT, E.M.; HINKLE, G.H.; GUO, W.; LEE, R.J. Kit Formulation for the Preparation of Radioactive Blue Liposomes for Sentinel Node Lymphoscintigraphy. **J. Pharm. Sci.**, v. 91, p. 1724-1732, 2002.
 - 87 ZHANG, H.; MA, Y.; SUN, X.L. Recent developments in carbohydrate-decorated targeted drug / gene delivery. **Med. Chem. Res.**, v. 30, p. 270-289, 2010.
 - 88 GAZI, U.; MARTINEZ-POMARES, L. Influence of the mannose receptor in host immune responses. **Immunobiology**, v. 214, p. 554–561, 2009.
 - 89 FRASER, L.P.; EZEKOWITZ, R.A.B. Mannose receptor and phagocytosis. **Adv. Cell. Molec. Biol. Membranes Organelles**, v. 5, p. 87-101, 1999.
 - 90 EAST, L.; ISACKE, C.M. The mannose receptor family. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1572, p. 364-386, 2002.
 - 91 TAYLOR, P.R.; GORDON, S.; MARTINEZ-POMARES, L. The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. **Trends Immunol.**, v. 26, p. 104-110, 2005.
 - 92 MARTINEZ-POMARES, L.; LINEHAN, S.A.; TAYLOR, P.R.; GORDON, S. Binding Properties of the Mannose Receptor. **Immunobiol.**, v. 204, p. 527-535, 2001.
 - 93 WALLACE, A.M.; HOH, C.K.; VERA, D.R.; DARRAH, D.D.; SCHULTEIS, G. Lymphoseek: A molecular radiopharmaceutical for sentinel node detection. **Ann. Surg. Oncol.**, v. 10, p. 531–538, 2003.
 - 94 MÉNDEZ, J.; WALLACE, A.M.; HOH, C.K.; VERA, D.R. Detection of Gastric and Colonic Sentinel Nodes Through Endoscopic Administration of ^{99m}Tc-DTPA-Mannosyl-Dextran in Pigs. **J. Nucl. Med.**, v. 44, p. 1677-1681, 2003.
 - 95 ELLNER, S.J.; MÉNDEZ, J.; VERA, D.R.; HOH, C.K.; ASHBURN, W.L.; WALLACE, A.M. Sentinel lymph node mapping of the colon and stomach using Lymphoseek in a pig model. **Ann. Surg. Oncol.**, v. 11, p. 674-681, 2004.
 - 96 SALEM, C.E.; HOH, C.K.; WALLACE, A.M.; VERA, D.R. A Preclinical study of prostate sentinel lymph node mapping with [^{99m}Tc] Diethylenetetramine pentaacetic acid-mannosyl-dextran. **J. Urol.**, v. 175, p. 744-748, 2006.

- 97 WOEHNEL, A.; HOH, C.K.; MÉNDEZ, J.; DARRAH, D.D.; ORAHOOD, R.C.; VERA, D. R.; WALLACE, A.M. Molecular Imaging of the Sentinel Lymph Node via Lymphoseek. In: LEONG, S.P.L. (Ed). ***From local invasion to metastatic cancer. Involvement of distant sites through the lymphovascular system.*** New York, N.Y.:Humana Press, 2009. p.123-133.
- 98 ELLNER, S.J.; HOH, C.K.; VERA, D.R.; DARRAH, D.D.; SCHULTEIS, G., WALLACE, A.M. Dose-dependent biodistribution of [^{99m}Tc]DTPA-mannosyl-dextran for breast cancer sentinel lymph node mapping. ***Nucl. Med. Biol.***, v. 30, p. 805-810, 2003.
- 99 WALLACE, A.M.; HOH, C.K.; ELLNER, S.J.; DARRAH, D.D.; SCHULTEIS, G.; VERA, D.R. Lymphoseek: A molecular imaging agent for melanoma sentinel lymph node mapping. ***Ann. Surg. Oncol.***, v. 14, p. 913-921, 2007.
- 100 WALLACE, A.M.; HOH, C.K.; DARRAH, D.D.; SCHULTEIS, G.; VERA, D.R. Sentinel lymph node mapping of breast cancer via intradermal administration of Lymphoseek. ***Nucl. Med. Biol.***, v. 34, p. 849-853, 2007
- 101 WALLACE, A. M.; HOH, C.K., LIMMER, K.K.; DARRAH, D.D.; SCHULTEIS, G.; VERA, D. R. Sentinel lymph node accumulation of Lymphoseek and Tc-99m-sulfur colloid using a “2-day” protocol. ***Nucl. Med. Biol.***, v. 36, p. 687-692, 2009.
- 102 VERA, D.R.; WALLACE, A.M.; HOH, C.K. [^{99m}Tc]MAG₃-mannosyl-dextran: a receptor-binding radiopharmaceutical for sentinel node detection. ***Nucl. Med. Biol.***, v 28, p. 493-498, 2001.
- 103 JEONG, J.M.; HONG, M.K.; KIM, Y.J.; LEE, J.; KANG, J.H.; LEE, D.S.; CHUNG, J.K.; LEE, M.C. Development of ^{99m}Tc-neomannosyl human serum albumin (^{99m}Tc-MSA) as a novel receptor binding agent for sentinel lymph node imaging. ***Nucl. Med. Commun.***, v. 25, p. 1211-1217, 2004.
- 104 TAKAGI, K.; UEHARA, T.; KANEKO, E.; NAKAYAMA, M.; KOIZUMI, M.; ENDO, K., ARANO, Y. ^{99m}Tc-labeled mannosyl-neoglycoalbumin for sentinel lymph node identification. ***Nucl. Med. Biol.***, v. 31, p. 893-900, 2004.
- 105 KIMA, S.; KIM, H. K.; KANG, D.Y.; JEONG, J.M.; CHOI, Y.H. Intra-operative sentinel lymph node identification using a novel receptor-binding agent (technetium-99m neomannosyl human serum albumin, 99mTc-MSA) in stage I non-small cell lung cancer. ***Eur. J. Cardiothorac. Surg.***, v. 37, p. 1450-1456, 2010.
- 106 MATHER, S.J.; ELLISON, E. Reduction-mediated technetium-99m labeling of monoclonal antibodies. ***J. Nucl. Med.***, v. 31, p. 692-697, 1990.
- 107 JEONG, J.M.; HONG, M.K.; LEE, J.; SON, M.; SO, Y.; LEE, D.S.; CHUNG, J.K.; LEE, M.C. 99mTc-Neolactosylated human serum albumin (LSA) for imaging the hepatic asialoglycoprotein receptor. ***Bioconjugate Chem.***, v. 15, p. 850-855, 2004.
- 108 GUHLKE, S.; VERBRUGGEN, A.M.; VALLABHAJOSULA, S. Radiochemistry and Radiopharmacy. In: Biersack, H.J.; Freeman, L.M. (Ed.). ***Clinical Nuclear Medicine.*** Germany: Springer Berlin Heidelberg, 2007. v.2. p.34-76.

- 109 MEASE, R.C.; LAMBERT, C. Newer methods of labeling diagnostic agents with Tc-99m. **Semin. Nucl. Med.**, v. 31, p. 278-285, 2001.
- 110 BANERJEE, S.R.; MARESCA, K.P.; FRANCESCONI, L.; VALLIANT, J.; BABICH, J.W.; ZUBIETA, J. New directions in the coordination chemistry of 99mTc: a reflection on technetium core structures and a strategy for new chelate design. **Nucl. Med. Biol.**, v. 32, p. 1-20, 2005.
- 111 BARTHOLOMÄ, M.; VALLIANT, J.; MARESCA, K.P.; BABICH, J.; ZUBIETA, J. Single amino acid chelates (SAAC): a strategy for the design of technetium and rhenium radiopharmaceuticals. **Chem. Commun.**, v. 5, p. 493–512, 2009.
- 112 MESZAROS, L.K.; DOSE, A.; BIAGINI, S.C.G.; BLOWER, P.J. Hydrazinonicotinic acid (HYNIC) – Coordination chemistry and applications in radiopharmaceutical chemistry. **Inorg. Chim. Acta.**, v. 363, p. 1059-1069, 2010.
- 113 SCHIBLI, R.; SCHUBIGER, P.A. Current use and future potential of organometallic radiopharmaceuticals. **Eur. J. Nucl. Med.**, v. 29, p. 1529-1542, 2002.
- 114 Alberto, R. The particular role of radiopharmacy within bioorganometallic chemistry. **J. Organomet. Chem.**, v. 692, p.1179–1186, 2007.
- 115 MAZZI, U.; SCHIBLI, R.; PIETZSCH, H.J.; KÜNSTLER, J.U., SPIES, H. Technetium in Medicine. In: Zolle, I. (Ed.). **Technetium-99m Pharmaceuticals: Preparation and quality control in nuclear medicine**. Germany: Springer Berlin Heidelberg, p. 7-58, 2007.
- 116 DE SAINT-HUBERT, M.; MOTTAGHY, F.M.; VUNCKX, K.; NUYTS, J.; FONGE, H.; PRINSEN, K.; STROOBANTS, S.; MORTELMANS, L.; DECKERS, N.; HOFSTRA, L.; REUTELINGSPERGER, C.P.M.; VERBRUGGEN, A.; RATTAT, D. Site-specific labeling of 'second generation' annexin V with ^{99m}Tc(CO)₃ for improved imaging of apoptosis in vivo. **Bioorgan. Med. Chem.**, v. 18, p. 1356-1363, 2010.
- 117 FERREIRA, C.L.; MARQUES, F.L.N.; OKAMOTO, M.R.Y.; OTAKE, A.H.; SUGAI, Y.; MIKATA, Y.; STORR, T.; BOWEN, M.; YANO, S.; ADAM, M.J.; CHAMMAS, R.; ORVIG, C. Cationic technetium and rhenium complexes with pendant carbohydrates. **Appl. Radiat. Isotopes**, v. 68, p. 1087-1093, 2010.
- 118 CASTELLANOS GIL, E.; IRAIZOZ COLARTE, A.; EL GHZAOUI, A.; DURAND, D.; DELARBRE, J.L.; BATAILLE, B. A sugar cane native dextran as an innovative functional excipient for the development of pharmaceutical tablets. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 68, p. 319-329. 2008.
- 119 PETRIG, J.; SCHIBLI, R.; DUMAS, C.; ALBERTO, R.; SCHUBIGER, P.A. Derivatization of Glucose and 2-Deoxyglucose for Transition Metal Complexation: Substitution Reactions with Organometallic 99mTc and Re Precursors and Fundamental NMR Investigations. **Chem. Eur. J.**, v. 7, p. 1868 -1873, 2001.
- 120 HE, H.; LIPOWSKA, M.; XU, X.; TAYLOR, A.T.; CARLONE, M.; MARZILLI, L.G. Re(CO)₃ Complexes Synthesized via an Improved Preparation of Aqueous fac-[Re(CO)₃(H₂O)₃]⁺ As an Aid in Assessing 99mTc Imaging Agents. Structural

Characterization and Solution Behavior of Complexes with Thioether-bearing Amino Acids As Tridentate Ligands. *Inorg. Chem.*, v. 44, p. 5437-5446, 2005.

- 121 ZEEVAART, J.R.; OLSEN, S. Recent trends in the concept of specific activity: Impact on radiochemical and radiopharmaceutical producers. *Appl. Radiat. Isotopes*, v. 64, p. 812-814. 2006.
- 122 OKARVI, S.M.; AL JAMMAZ, I. Synthesis and evaluation of a technetium-99m labeled cytotoxic bombesin peptide conjugate for targeting bombesin receptor-expressing tumors. *Nucl. Med. Biol.*, v. 37, p. 277-288, 2010.
- 123 ŠEVIĆ, S.S.; PANTELIĆ, D. Biopolymer holographic diffraction gratings. *Opt. Mater.*, v. 30, p. 1205-1207. 2008.
- 124 SUN, G.; CHU, C.C. Synthesis, characterization of biodegradable dextran-allyl isocyanate-ethylamine/polyethylene glycol-diacrylate hydrogels and their in vitro release of albumin. *Carbohydr. Polym.*, v. 65, p. 273-287. 2006.
- 125 KRISHNAMOORTHY, S.; MAL, D.; SINGH, R.P. Characterization of graft copolymer based on polyacrylamide and dextran. *Carbohydr. Polym.*, v. 69, p. 371-377, 2007.
- 126 KHALIKOVA, E.; SUSI, P.; KORPELA, T. Microbial Dextran-Hydrolyzing Enzymes: Fundamentals and Applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 69, p. 306-325, 2005.
- 127 PASUT, G.; VERONESE, F.M. Polymer-drug conjugation, recent achievements and general strategies. *Prog. Polym. Sci.*, v. 32, p. 933-961, 2007.
- 128 MEHVAR, R. Dextran for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents. *J Control Release*, v. 69, p. 1-25, 2000.
- 129 DU, J.; HILTUNEN, J.; MARQUEZ, M.; NILSSON, S.; HOLMBERG, A.R. Technetium-99m labelling of glycosylated somatostatin-14. *Appl. Radiat. Isotopes*, v. 55, p. 181-187, 2001.
- 130 MATSUNAGA, K.; HARA, K.; IMAMURA, T.; FUJIOKA, T.; TAKATA, J.; KARUBE, Y. Technetium labeling of dextran incorporating cysteamine as a ligand. *Nucl. Med. Biol.*, v. 32, p. 279-285, 2005.
- 131 HENZE, E.; ROBINSON, G.D.; KUHI, D.E.; SCHELBERT, H.R. Tc-99m Dextran: A new blood-pool-labeling agent for radionuclide angiocardiology. *J. Nucl. Med.*, v. 23, p. 348-353, 1982.
- 132 ALBERTO, R. New Organometallic Technetium Complexes for Radiopharmaceutical Imaging. *Top Curr. Chem.*, v. 252, p. 1-44, 2005.
- 133 KYPRIANIDOU, P.; TSOUKALAS, C.; PATSIS, G.; PAPAGIANNOPOULOU, D.; NIKOLIĆ, N.; JANKOVIĆ, D.; DJOKIĆ, D.; RAPTOPOULOU, C.P.; PELECANOU, M.; PAPADOPOULOS, M.; PIRMETTIS, I. Rhenium(I) and technetium-99m(I) fac-tricarbonyl complexes with 4-(imidazolin-2-yl)-3-thiabutanoic acid derivatives as tridentate ligands: Synthesis and structural characterization. *Polyhedron*, v. 28, p. 3171-3176, 2009.

- 134 STAVEREN, D. VAN; BENNY, P.; WAIBEL, R.; KURZ, P.; PAK J.K.; ALBERTO, R. S-functionalized cysteine: powerful ligands for the labelling of bioactive molecules with triaquatricarbonyltechnetium-99m(1+) ($[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$). *Helv. Chim. Acta.*, v. 88, p. 447-460, 2005.
- 135 ALBERTO, R.; N'DONGO, H.P.; CLERICUZIO, M.; BONETTI, S.; GABANO, E.; CASSINO, C.; RAVERA, M.; OSELLA, D. Functionalized thymidine derivatives as carriers for the c-emitter technetium tricarbonyl moiety. *Inorg. Chim. Acta*, v.362, p. 4785-4790, 2009.
- 136 ALBERTO, R.; ORTNER, K.; WHEATLEY, N.; SCHIBLI, R.; SCHUBIGER, A.P. Synthesis and properties of boranocarbonate: A convenient in situ CO source for the aqueous preparation of $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 123, p. 3135-3136, 2001.
- 137 TOURNIER, N.; ANDRÉ, P.; BLONDEEL, S.; RIZZO-PADOIN, N.; D'HARDEMARRE, A.D.M.; DECLÈVES, X.; SCHERRMANN, J.M.; CISTERNINO, S. Ibogaine labeling with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Tricarbonyl: synthesis and transport at the mouse blood–brain barrier. *J. Pharm. Sci.*, v. 98, p. 4650-4660, 2009.
- 138 ALBERTO, R.; SCHIBLI, R.; EGLI, A.; SCHUBIGER, A.P. A novel organometallic aqua complex of technetium for the labeling of biomolecules: Synthesis of $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ from $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$ in aqueous solution and its reaction with a bifunctional ligand. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 120, p. 7987-7988, 1998.
- 139 GIGLIO, J.; PATSIS, G.; PIRMETTIS, I.; PAPADOPOULOS, M.; RAPTOPOULOU, C.; PELECANOU, M.; LEÓN, E.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H.; REY, A. Preparation and characterization of technetium and rhenium tricarbonyl complexes bearing the 4-nitrobenzyl moiety as potential bioreductive diagnostic radiopharmaceuticals. In vitro and in vivo studies. *Eur. J. Med. Chem.* v. 43, p. 741-748, 2008.
- 140 BOURKOULA, A.; PARAVATOU-PETSOTAS, M.; PAPADOPOULOS, A.; SANTOS, I.; PIETZSCH, H.J.; LIVANIOU, E.; PELECANOU, M.; PAPADOPOULOS, M.; PIRMETTIS, I. Synthesis and characterization of rhenium and technetium-99m tricarbonyl complexes bearing the 4-[3-bromophenyl]quinazoline moiety as a biomarker for EGFR-TK imaging. *Eur. J. Med. Chem.*, v. 44, p. 4021-4027, 2009.
- 141 CHEN, X.; GUO, Y.; LIU, B. Caution to HPLC analysis of tricarbonyl technetium radiopharmaceuticals: An example of changing constitution of complexes in column. *J. Pharmaceut. Biomed.*, v. 43, p. 1576-1579, 2007.
- 142 PATEL, S.; GIBSON, R. In vivo site-directed radiotracers: a mini-review. *Nucl. Med. Biol.*, v. 35, p. 805–815, 2008.
- 143 UPADHAYAY, S.K. *Kinetics and reaction dynamics*. New York, N.Y: Springer, 2006.
- 144 BIECHLIN, M.L.; BONMARTIN, A.; GILLY, F.N.; FRAYSSE, M.; D'HARDEMARRE, A.D.M. Radiolabeling of annexin A5 with $^{99\text{m}}\text{Tc}$: comparison of HYNIC-Tc vs. iminothiolane-Tc-tricarbonyl conjugates. *Nucl. Med. Biol.*, v. 35, p. 679-687, 2008.

- 145 VALLABHAJOSULA, S.; KILLEEN, R.P.; OSBORNE, J.R. Altered biodistribution of radiopharmaceuticals: role of radiochemical/pharmaceutical purity, physiological, and pharmacologic factors. **Semin. Nucl. Med.**, v. 40, p. 220-241, 2010.
- 146 LI, Y.C.; TAN, T.Z.; ZHENG, J.G.; ZHANG, C. Anti-sense oligonucleotide labeled with technetium-99m using hydrazinonictinamide derivative and N-hydroxysuccinimidyl S-acetylmercaptoacetyltriglycine: A comparison of radiochemical behaviors and biological properties. **World J. Gastroenterol.**, v. 14, p. 2235-2240, 2008.
- 147 SCANDOLA, M.; CECCORULLI, G.; PIZZOLI, M. Molecular motions of polysaccharides in the solid state: dextran, pullulan and amylose. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.13, p. 254-60, 1991.
- 148 CARBERRY, J.J. **Chemical and catalytic reaction engineering**. Mineola, N.Y.: Dover Publication, 2001.
- 149 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.
- 150 ECKELMAN, W.C.; VOLKERT, W.A.; BONARDI, M. True radiotracers: are we approaching theoretical specific activity with Tc-99m and I-123? **Nucl. Med. Biol.**, v. 35, p. 523-527, 2008.
- 151 AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH. **Gel filtration: Principles and Methods**. Lund, 1998.
- 152 RABANEL, J.M.; HILDGEN P. Preparation of hydrogel hollow particles for cell encapsulation by a method of polyester core degradation. **J. Microencapsulation**, v. 21, p. 413-431, 2004.
- 153 HUANG, L.; ZHU, H.; XU, X.; ZHANG, C.; SHEN, Y.M. Synthesis and characterization of organometallic rhenium(I) and technetium(I) bile acid complexes. **J. Organomet. Chem.**, v. 694, p. 3247-3253, 2009.
- 154 VERA, D.R.; WALLACE, A.M.; HOH, C.K.; MATTREY, R.F. A synthetic macromolecule for sentinel node detection: ^{99m}Tc-DTPA-Mannosyl-Dextran. **J. Nucl. Med.**, v. 42, p. 951–959, 2001.
- 155 HAMILTON, D. Diagnostic nuclear medicine: a physics perspective. Heidelberg, D.E.-B.W: Springer, 2004.
- 156 EMERY, R. E.; STEVENS, J.S.; NANCE, R.W.; CORLESS, C. L.; VETTO, J.T. Sentinel node staging of primary melanoma by the “10% rule”: pathology and clinical outcomes. **Am. J. Surg.**, v. 193, p. 618–622, 2007.
- 157 GOMMANS, G.M.M.; ZANT, F.M.VAN DER; SCHORS, T.G. VAN DER; DONGEN, A. VAN; TEULE, G.J.J.; CLARIJS, W.W.J.; LANGENHORST, B.L.A.M.; DE WAARD, J.W.D. Effect of increased ^{99m}Tc/⁹⁹Tc ratios on count rates in sentinel node

-
- procedures: a randomised study. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, v. 30, p. 1231–1235, 2003.
- 158 BARTHOLOMÄ, M.D.; LOUIE, A.S.; VALLIANT, J.F.; ZUBIETA, JON. Technetium and Gallium derived radiopharmaceuticals: comparing and contrasting the chemistry of two important radiometals for the molecular imaging era. *Chem. Rev.*, v. 110, p. 2903–2920, 2010.
 - 159 OBLED, C.; PAPET, I.; BREUILLÉ, D. Sulfur-containing amino acids and glutathione in diseases. In: LUC A. CYNOSBE (Ed). *Metabolic and therapeutic aspects of amino acids in clinical nutrition*. 2nd Edition. Boca Raton, F.L., CRC Press, 2004. p. 667-688.
 - 160 BRODY, T. *Nutritional Biochemistry*. 2nd Edition. San Diego, CA: Academic Press, 1999. cap. 8, protein, p. 415-490.
 - 161 RISTEVSKI, B.; BECKER, H.; CYBULSKY, M.; SEABROOK, T.; BAK, S.; CHAN, E.; JONHSTON, M.; HAY, J.B. Lymph, Lymphocytes and Lymphatics. *Immunol. Res.*, v. 35, p. 55-63. 2006.
 - 162 GABAS, N.; CARILLON, T.; HIQUIY, N. Solubilities of o-Xylose and o-Mannose in Water-Ethanol Mixtures at 25 °C. *J. Chem. Eng. Data*, v. 33, p. 128-130, 1988.
 - 163 WACKER CHEMIE AG. Hoja de datos Material de Seguridad. Material: 60058053: L-Cysteine Freie Base. Jun. 24, 2010.
 - 164 PORTER, C.J. Drug delivery to the lymphatic system. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.*, v. 14, 333-393, 1997.
 - 165 MASSI, D.; GÖKÖZ, Ö. The biological significance of lymphangiogenesis in human tumours. *Diagn. Histopathol.*, v. 16, p. 295-305, 2010.
 - 166 VENTUROLI, D.; RIPPE, B. Ficoll and dextran vs. globular proteins as probes for testing glomerular permselectivity: effects of molecular size, shape, charge, and deformability. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, v. 288, p. F605–F613, 2005.
 - 167 HOH, C.K.; WALLACE, A.M.; VERA, D. R. Preclinical Studies of [^{99m}Tc]DTPA-Mannosyl-Dextran. *Nucl. Med. Biol.*, v 30, p. 457-464, 2003.
 - 168 SOMASUNDARAM, S.K.; CHICKEN, D.W.; KESHTGAR, M.R.S. Detection of the sentinel lymph node in breast cancer. *Brit. Med. Bull.*, v. 84, p. 1-15, 2007.
 - 169 DECUZZIA, P.; FERRARI, M. The role of specific and non-specific interactions in receptor-mediated endocytosis of nanoparticles. *Biomaterials*, v. 28, p. 2915–2922, 2007.
 - 170 BEHE, M.; DU, J.; BECKER, W.; BEHR, T.; ANGERSTEIN, C.; MÁRQUEZ, M.; HILTUNEN, J.; NILSSON, S.; HOLMBERG, A.R. Biodistribution, blood half-life, and receptor binding of a somatostatin-dextran conjugate. *Med. Oncol.*, v. 18, p. 59-64, 2001.

-
- 171 VERMEEREN, L.; MULLER, S.H.; MEINHARDT, W.; VALDÉS-OLMOS, R.A. Optimizing the colloid particle concentration for improved preoperative and intraoperative image-guided detection of sentinel nodes in prostate cancer. ***Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging***, v. 37, p. 1328-1334, 2010.
- 172 WAWROSCHEK F, WENGENMAIR H, SENEKOWITSCH-SCHMIDTKE R, HAMM M, HENKE J, SCHÖNBERGER, T.; HAUSER, A.; ERHARDT, W.; HARZMANN, R. Prostate lymphoscintigraphy for sentinel lymph node identification in canines: reproducibility, uptake, and biokinetics depending on different injection strategies. ***Urol. Res.***, v. 31, p. 152-158, 2003.