INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DO ANÁLOGO DA NEUROTENSINA(8-13)
RADIOMARCADO COM ^{99m}Tc : CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO***

RODRIGO TEODORO

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

ORIENTADOR:

BLUMA LINKOWSKI FAINTUCH

SÃO PAULO

2010

Ao meu avô, José Serafim
(*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço, inicialmente aos meus pais, por terem gerado a minha vida, por despenderem esforços substanciais para que eu obtivesse a melhor educação, e por terem me apoiado emocionalmente nos períodos mais críticos na condução deste trabalho.

À minha irmã Daniele e ao meu cunhado Glauber, por estarem sempre presentes em todos os momentos, por proporcionarem momentos de alegria e descontração, e por, principalmente, me possibilitarem a inigualável sensação de ser tio, através do nascimento do “pequeno” Lucca.

À minha avó Marina de Assis Serafim, por indiretamente ter me ensinado a encarar as situações com força, garra e objetividade, apesar de todas as dificuldades e surpresas que a vida nos reserva.

À minha família por toda a torcida e apoio durante a execução do trabalho.

À minha orientadora Dra. Bluma L. Faintuch, por ter me ensinado muitos dos conhecimentos sobre radiofarmácia, por ter conduzido o trabalho de uma forma ímpar, e pela amizade, atenção e transferência de conhecimento e cultura durante este período.

Ao superintendente do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN-SP e ao M.Sc. Jair Mengatti, gerente da Diretoria de Radiofarmácia, pela oportunidade de desenvolver este estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – Brasil, por ter concedido o apoio financeiro (bolsa de doutorado) para realização do presente trabalho.

A todos os colegas, funcionários, técnicos e, em especial, à Dra. Emiko e ao técnico Natanael, que direta ou indiretamente, auxiliaram em algumas das etapas experimentais.

À Dra. Lígia Morganti, do Centro de Biotecnologia (IPEN), por ter disponibilizado a sala de cultivo celular em grande parte do desenvolvimento do trabalho.

À Dra. Ana Maria Mouro, do Instituto Butantã, por ter disponibilizado as células tumorais para os estudos *in vitro* e para aquisição de imagens cintilográficas.

À minha primeira orientadora Silvana Guilardi, por ter confiado no meu trabalho durante a iniciação científica, sempre me incentivando no campo profissional, por ter me estimulado a “cruzar a ponte”, motivando a minha mudança para São Paulo e por fim, pela imenso carinho, amizade e atenção despendida desde o início da minha graduação.

Aos meus amigos Alexandre Vieira Silva, Vinícius Curcino de Carvalho, Dayane Tada, Christiane Pavani, Patrícia Santos, Gracielle Vieira Silva, pelos bons momentos proporcionados na república, pelas madrugadas discutindo experimentos, e finalmente, por representarem minha família em São Paulo.

Aos amigos de Bauru, Tatiana Verdiani Campana, Marcelo de Souza Zanin, Gustavo Luís Silva, Graziela Rocha Reghini Ramos e Eduardo de Oliveira Lima, por sempre estarem ao meu lado, me apoiando em todas as decisões, e por sempre proporcionarem momentos únicos de muita felicidade.

Ao amigo Eutímio Gustavo Fernádes Núñez, pela grande amizade, por ter sido cúmplice em partes fundamentais na execução deste trabalho, bem como, pelo auxílio no tratamento dos dados.

Aos amigos Danielle Pereira Wiecek, Rodrigo Guimarães Queiróz e Rodrigo Luís Silva Ribeiro Santos, pela amizade e por terem direta ou indiretamente, me auxiliado na execução dos procedimentos experimentais.

À Margarete Lopes Bustos, por ter facilitado a comunicação com os orientadores da Instituição, permitindo assim, meu ingresso na pós-graduação.

À Maria Neide Ferreira Mascarenhas, pela amizade, pelo auxílio, pelos ensinamentos, e por ter disponibilizado os camundongos em momentos cruciais no desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. João Osso Júnior e às suas bolsistas, pela grande amizade, conselhos e momentos de lazer proporcionados.

A todos os amigos da Universidade Federal de Uberlândia, em especial à Sirlane Gomes da Silva e ao Douglas Queiróz Santos, por representarem peças fundamentais e essenciais na execução do trabalho.

“O objetivo da ciência não é atemorizar ou consolar. Mas, de minha parte, estou pronto a admitir que conclusões importantes, como as que inferi, deveriam apoiar-se em fundamentos mais amplos, e que, talvez, desenvolvimentos em outras direções possam permitir à humanidade corrigir os resultados dos desenvolvimentos que aqui venho considerando isoladamente.”

SIGMUND FREUD

AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DO ANÁLOGO DA NEUROTENSINA(8-13) RADIOMARCADO COM ^{99m}Tc: CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO*

Rodrigo Teodoro

RESUMO

A radiomarcagem de biomoléculas específicas com o tecnécio-^{99m}Tc utilizando agentes quelantes bifuncionais é um campo em crescimento na Medicina Nuclear. Em especial, a classe de peptídeos regulatórios, como a Neurotensina, participa de processos fisiológicos essenciais no organismo, como o crescimento tumoral. O objetivo do presente trabalho foi o estudo comparativo da influência dos agentes quelantes bifuncionais 6-hidrazinonicotinamida (HYNIC) e S-acetil-mercaptoacetiltriglicina (MAG₃), no comportamento *in vitro* e *in vivo* do análogo duplamente estabilizado da Neurotensina(8-13) radiomarcado com ^{99m}Tc, em células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231. Um elevado rendimento radioquímico (> 97%) e estabilidade frente aos agentes transquelantes foi observado para ambos análogos radiomarcados. Foram também obtidos comportamentos similares *in vitro*, no que diz respeito à porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas (aproximadamente 22%), estabilidade metabólica, ligação aos receptores celulares (intervalo nM) e taxas de internalização/externalização para ambos radiocomplexos. A maior lipofilicidade encontrada para o análogo radiomarcado via MAG₃ refletiu nas principais diferenças nos estudos de biodistribuição. A degradação do análogo radiomarcado via HYNIC nos estudos de estabilidade metabólica *in vivo* aos 90 min levou a menor retenção tumoral (0,44±0,02% DI/g), e consequentemente, às menores razões tumor/órgãos não-alvos (< 5%). Embora a superioridade do traçador marcado via MAG₃ tenha sido comprovada no presente estudo, um redesenho estrutural objetivando contornar a alta captação no trato gastrointestinal deve ser realizada a fim de que sua potencial aplicabilidade não seja comprometida.

PRECLINICAL EVALUATION OF NEUROTENSIN(8-13) ANALOG RADIOLABELED WITH ^{99m}Tc : *IN VITRO* AND *IN VIVO* CHARACTERIZATION

Rodrigo Teodoro

ABSTRACT

The radiolabeling of receptor specific biomolecules with ^{99m}Tc using bifunctional chelator agents represents a growing field in Nuclear Medicine, specially, regarding regulatory peptides, such as Neurotensin, which are important in several essential physiological functions, particularly in tumor growth. The aim of the study was the comparative radiolabeling evaluation of the double-stabilized NT(8-13) analog with ^{99m}Tc , via the bifunctional chelating agents 6-hydrazinonicotinamide (HYNIC) and S-acetyl-mercaptoacetyltriglycine (MAG_3) in MDA-MB-231 breast cancer cell line. High radiochemical yields ($> 97\%$) and stability toward transchelant agents was observed for both radiolabeled analogs. Also, comparable *in vitro* behaviour regarding the percentage of plasma protein binding (nearby 22%), metabolic stability, receptor binding affinity (nM range), and internalization/externalization rates were obtained. The greater lipophilicity found for the analog radiolabeled via MAG_3 , reflected in the major differences in biodistribution studies. The *in vivo* metabolic stability studies suggested that the degradation observed in the later time point (90 min) for the conjugate radiolabeled via HYNIC, leads not only to lower tumor uptake accumulation ($0,44 \pm 0,02\%$ ID/g), but also to lower tumor-to-non-tumor ratios ($< 5\%$). Although the superiority of the tracer radiolabeled via MAG_3 had been confirmed in the present study, a structural re-design aiming the reduction of the high gastrointestinal uptake must be done in order to guarantee the potential applicability of MAG_3 -radiocomplex.

Sumário

	Páginas
1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Medicina Nuclear	16
1.2. Radiofármacos	17
1.3. Radioisótopo tecnécio-99m	18
1.3.1. Histórico	18
1.3.2. Propriedades químicas, físicas e nucleares do ^{99m}Tc	19
1.3.3. Radiofármacos de ^{99m}Tc : primeira, segunda e terceira gerações	21
1.3.4. Marcação de biomoléculas com ^{99m}Tc	23
1.4. Agentes quelantes bifuncionais	25
1.4.1. Mercaptoacetiltriglicina (MAG_3) como agente quelante bifuncional	27
1.4.2. 6-hidrazinonicotinamida (HYNIC) como agente quelante bifuncional	28
1.5. Peptídeos	30
1.6. Neurotensina: descoberta e isolamento.....	32
1.6.1. Funções fisiológicas da Neurotensina e seu papel hormonal em neoplasias	33
1.6.2. Receptores da Neurotensina.....	35
1.6.3. Modificação estrutural e radiomarcção da neurotensina	37
1.7. Câncer de Mama	39
1.7.1. Estatísticas e fatores de risco associados ao câncer de mama	39
1.7.2. Modalidades de imagem utilizadas no diagnostico de câncer de mama	41
1.7.3. Radiofármacos utilizados na detecção de câncer de mama	42
2. JUSTIFICATIVA	44
3. OBJETIVOS	45
4. MATERIAIS	46
4.1. Equipamentos	46
4.2. Materiais	47

4.3. Reagentes.....	47
4.4. Animais.....	49
5. MÉTODOS	50
5.1. Eluição do radioisótopo ^{99m} Tc	50
5.2. Diluição das biomoléculas.....	50
5.3. Marcação dos análogos da NT(8-13).....	50
5.3.1. Marcação do conjugado HYNIC-βAla-NT(8-13) (HYNIC-NT).....	50
5.3.2. Marcação do conjugado S-acetil-MAG ₃ -βAla-NT(8-13) (MAG ₃ -NT).....	51
5.4. Avaliação radioquímica dos conjugados radiomarcados	52
5.5. Estabilidade radioquímica dos análogos radiomarcados.....	53
5.6. Estabilidade radioquímica dos análogos radiomarcados em função da cisteína e glutatona	53
5.7. Determinação da lipofilicidade dos análogos radiomarcados	53
5.8. Estudo <i>in vitro</i> de ligação às proteínas plasmáticas (LPP)	54
5.9. Avaliação <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> da estabilidade metabólica	55
A) Avaliação <i>in vitro</i> frente a albumina de soro humano	55
B) Avaliação <i>in vivo</i> nas proteínas plasmáticas	55
5.10. Estudos <i>in vitro</i> : ensaios com células.....	56
5.10.1. Cultivo celular.....	56
5.10.2. Ensaio de saturação.....	56
5.10.3. Internalização e externalização.....	57
5.10.4. Inoculação das células tumorais em camundongos <i>Nude</i>	58
5.11. Análise <i>in vivo</i> dos análogos radiomarcados	59
5.11.1. Biodistribuição em camundongos saudáveis.....	59
5.11.2. Biodistribuição em camundongos portadores de tumor	60
5.12. Aquisição de imagens cintilográficas	60
5.13. Análise estatística.....	60

6. RESULTADOS	63
6.1. Eluição do radionuclídeo	63
6.2. Radiomarcção e avaliação radioquímica dos análogos radiomarcados HYNIC- β Ala-NT(8-13) e S-acetil-MAG ₃ - β Ala-NT(8-13)	63
6.3. Estabilidade radioquímica dos análogos radiomarcados	64
6.4. Estabilidade radioquímica dos análogos radiomarcados em função da cisteína e glutatona	65
6.5. Determinação da lipofilicidade dos análogos radiomarcados	65
6.6. Estudo <i>in vitro</i> de ligação às proteínas plasmáticas	65
6.7. Avaliação <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> da estabilidade metabólica	65
6.8. Saturação	69
6.9. Internalização e externalização	70
6.10. Biodistribuição dos análogos radiomarcados em camundongos sadios	72
6.11. Biodistribuição em camundongos portadores de tumor	79
6.12. Aquisição de imagens cintilográficas	84
7. DISCUSSÃO	86
7.1. Eluição do radionuclídeo	87
7.2. Radiomarcção e avaliação radioquímica dos análogos radiomarcados HYNIC- β Ala-NT(8-13) e S-acetil-MAG ₃ - β Ala-NT(8-13)	88
7.3. Estabilidade radioquímica dos análogos radiomarcados	90
7.4. Estabilidade radioquímica dos análogos radiomarcados em função da cisteína e glutatona	90
7.5. Determinação da lipofilicidade dos análogos radiomarcados	91
7.6. Estudo <i>in vitro</i> de ligação às proteínas plasmáticas	92
7.7. Avaliação <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> da estabilidade metabólica	94
7.8. Saturação	97
7.9. Internalização e externalização	99
7.10. Biodistribuição dos análogos radiomarcados em camundongos sadios	102

7.11. Biodistribuição em camundongos portadores de tumor.....	105
7.12. Aquisição de imagem cintilográfica	109
7.13. Considerações finais.....	110
8. CONCLUSÃO	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização dos complexos de tecnécio-99m segundo os parâmetros N, EO e Z.....	24
Tabela 2. Sumário das estabilizações, radiomarcção e aplicação dos análogos da NT mais promissores.	38
Tabela 3. Fase móvel e respectivos fatores de retenção das diferentes espécies radioquímicas.....	52
Tabela 4. Estabilidade radioquímica dos conjugados radiomarcados.	64
Tabela 5. Biodistribuição (% DI/órgão) dos análogos radiomarcados ^{99m}Tc -HYNIC-NT(8-13) e ^{99m}Tc -MAG ₃ -NT(8-13) em Camundongos <i>Swiss</i> sadios em função do tempo.....	78
Tabela 6. Biodistribuição do análogo radiomarcado ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-NT(8-13) e ^{99m}Tc -MAG ₃ - β Ala-NT(8-13) em camundongos portadores de tumor aos 30 min e 90 min pi. Os resultados estão expressos em %DI/g (média $\pm$ DP, n=6).	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de decaimentos radioativos a partir do ^{99}Mo incluindo a transição isomérica e os $t_{1/2}$ dos radionuclídeos ⁽²⁸⁾	20
Figura 2 - Núcleos de ^{99m}Tc (A) ^{99m}Tc -tricarbonil, (B) ^{99m}Tc -HYNIC-(tricina)(L) e (C) ^{99m}Tc -nitrido.....	23
Figura 3 - Esquema de um radiofármaco alvo-específico: a molécula carregadora e o radionuclídeo metálico conectados através de um AQB e um espaçador.	26
Figura 4 - Agente quelante bifuncional S-acetil-MAG ₃	28
Figura 5 - Agente quelante bifuncional HYNIC.....	28
Figura 6 – Exemplo de formas isoméricas onde HYNIC atua como (A) ligante monodentado e (B) ligante bidentado. Nota: Estrutura contendo [^{99m}Tc -HYNIC-(tricina) ₂].	29
Figura 7 - Fórmula estrutural da molécula do peptídeo Neurotensina nativo.....	32
Figura 8 - Seqüência de aminoácidos da molécula da NT(8-13). Setas: indicam os sítios de clivagem enzimática.	33
Figura 9 - Fatores de risco associados à incidência de câncer de mama.	40
Figura 10 - Radiocromatogramas de (A) ^{99m}Tc -HYNIC-βAla-NT(8-13) e (B) ^{99m}Tc -S-acetil-MAG ₃ -βAla-NT(8-13).	64
Figura 11 - Perfis cromatográficos das espécies radiomarcadas (A) albumina, (B) HYNIC-NT(8-13) e (C) MAG ₃ -NT(8-13) em colunas PD-10.....	66
Figura 12 - Perfil cromatográfico da análise in vitro dos radioconjugados (A) ^{99m}Tc -HYNIC-βAla-NT(8-13) e (B) ^{99m}Tc -MAG ₃ -βAla-NT(8-13) aos 90 min de incubação com albumina a 37 °C.	67
Figura 13 - Perfil de eluição in vivo do radioconjugado ^{99m}Tc -HYNIC-βAla-NT(8-13) aos 5, 30, 60 e 90 min pi em colunas PD-10.....	67
Figura 14 - Perfil de eluição in vivo do radioconjugado ^{99m}Tc -MAG ₃ -βAla-NT(8-13) aos 5, 30, 60 e 90 min pi em colunas PD-10.....	68

Figura 15 - Curvas de saturação dos análogos radiomarcados (A) ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-NT(8-13) e (B) ^{99m}Tc -MAG ₃ - β Ala-NT(8-13). As curvas foram obtidas utilizando concentrações crescentes (0-90 nM) dos análogos radiomarcados. A porcentagem de ligação específica foi calculada como a diferença entre a porcentagem de ligação total e a ligação inespecífica.....	69
Figura 16 - Internalização e externalização dos análogos radiomarcados ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-NT(8-13) e ^{99m}Tc -MAG ₃ - β Ala-NT(8-13) em células da linhagem tumoral mamária MDA-MB-231 após incubação a 37 °C. Os resultados estão apresentados como porcentagem de ligação específica relacionada à atividade total associada às células. ..	71
Figura 17 - Biodistribuição dos análogos radiomarcados (A) ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-NT(8-13) e (B) ^{99m}Tc -MAG ₃ - β Ala-NT(8-13) em camundongos Swiss em função do tempo. Resultados estão expressos em % DI/g (média±DP, n=6).	73
Figura 18 - Análise da cinética de excreção dos análogos radiomarcados ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-NT(8-13) e ^{99m}Tc -MAG ₃ - β Ala-NT(8-13) em função do tempo para (A) Rins, (B) Fígado, (C) Intestino delgado e (D) Intestino grosso.....	74
Figura 19 - Análise de interação estatística individual da variável AQB.	75
Figura 20 - Depuração sanguínea dos radioconjugados ^{99m}Tc -HYNIC-NT(8-13) e ^{99m}Tc -MAG ₃ -NT(8-13) em função do tempo. Dados apresentados como %DI de sangue total, considerando-se uma volemia de 6,5% do peso corpóreo dos camundongos (n=6).	76
Figura 21 - Histogramas de (A) Músculo total e (B) Osso total para os conjugados via HYNIC e MAG ₃	77
Figura 22 - Análise comparativa da razão tumor/órgãos dos análogos radiomarcados ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-NT(8-13) e ^{99m}Tc -MAG ₃ - β Ala-NT(8-13) em (A) 30 min e (B) 90 min pi. (T=tumor; S=sangue; M=músculo; O=osso; ID= Intestino delgado; IG= Intestino grosso; R=Rins; F= Fígado).....	81
Figura 23 - Análise de mínimos quadrados parciais para o conjunto de camundongos portadores de tumor avaliados. (A) Gráfico de cargas, (B) Gráfico IPV, e (C) Gráfico biplot. Abreviações: CP – componente principal; CB – com bloqueio; SB- sem bloqueio; %DRC - % dose retida na cauda; T- tempo após injeção da droga; P- peso; H- HYNIC; M - MAG ₃	83
Figura 24 - Imagens cintilográficas obtidas de camundongos Nude portando tumor da linhagem tumoral MDA-MB-231. As imagens foram adquiridas aos 30 e 90 min pi de (A) ^{99m}Tc -HYNIC-NT(8-13) e (B) ^{99m}Tc -MAG ₃ -NT(8-13).	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AQB	- Agente quelante bifuncional;
BM	- Biomolécula;
Bq	- unidade de atividade, Becquerel;
Ci	- unidade de atividade Curie;
cpm	- contagem por minuto;
CT	- do inglês <i>Computed Tomography</i> , Tomografia Computadorizada;
DTPA	- ácido dietilenotriaminopentaacético;
EDDA	- ácido N',N'-etilenodiaminodiacético;
FDG	- 2-fluoro-2-desoxi-D-glicose;
GPCRs	- do inglês <i>G-protein coupled receptors</i> , proteínas acopladas à proteína G;
HSA	- do inglês <i>Human serum albumin</i> , albumina de soro humano.
HYNIC	- 6-hidrazinonicotinamida;
IPEN/CNEN-SP	- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/Comissão Nacional de Energia Nuclear – São Paulo;
ITLC-SG	- do inglês <i>Instant Thin Layer Chromatography-Silica Gel</i> , suporte para cromatografia de camada delgada;
LPP	- Ligação às proteínas plasmáticas;
MAG ₃	- Mercaptoacetiltriglicina;
MIBI	- 2-metoxi-isobutil-isonitrila;
NHS	- N-hidróxisuccinamida;
NT	- peptídeo Neurotensina;
NTR-1	- receptor da Neurotensina -1;
P	- coeficiente de partição;
PBS	- do inglês <i>Phosphate Buffer Saline</i> , tampão fosfato salina;
PET	- do inglês <i>Positron Emission Tomography</i> , Tomografia de Emissão de Póstron;
pi	- do inglês <i>post-injection</i> , após injeção;

R_f	- fator de retenção;
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear;
S-bz	- S-benzoil;
SPECT	- do inglês <i>Single Photon Emission Computed Tomography</i> , Tomografia Computatorizada por Emissão de Fóton Único;
$t_{1/2}$	- Tempo de meia-vida;

1. INTRODUÇÃO

1.1. Medicina Nuclear

A Medicina Nuclear é a especialidade que se destina ao diagnóstico, tratamento e investigação médica mediante o uso de radionuclídeos combinados a outros compostos químicos ou fármacos, formando radiofármacos⁽¹⁾.

Como recurso diagnóstico, a Medicina Nuclear é um meio seguro e eficiente, em geral indolor e não invasivo. Os procedimentos são de alta sensibilidade, descrevendo anormalidades na estrutura e na função dos órgãos estudados. Permite também, avaliar recidivas, acompanhar a evolução, a remissão ou a progressão de certas enfermidades em relação a outros métodos diagnósticos.

As imagens cintilográficas obtidas através da administração destes radiofármacos medem exatamente a radiação emitida que atravessa o organismo, ao contrário das técnicas radiológicas convencionais, que medem a absorção da radiação aplicada externamente⁽²⁾. A dose de um radiofármaco necessária a um exame é muito mais baixa do que a dose de agentes de contraste utilizadas em outras técnicas de diagnóstico^(2,3,4), tais como a Radiografia e a Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

Os equipamentos utilizados com esta finalidade são Gama Câmara Cintilográfica, Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único (SPECT) e Tomografia de Emissão de Pósitron (PET).

As imagens obtidas pela Tomografia de Emissão por Pósitron acoplada a Tomografia Computadorizada (PET/CT) são discrepantemente superiores àquelas obtidas por SPECT/CT, porém, os custos envolvidos em ambos os procedimentos aumentam de acordo com a qualidade da imagem obtida por cada técnica. Como resultado dos atuais avanços nas tecnologias dos detectores e na reconstrução de algoritmos, a resolução espacial das imagens obtidas por SPECT/CT tem atingido qualidades similares às imagens obtidas por PET/CT^(5,6).

Aliado a isso, nas últimas décadas, o conhecimento da química de coordenação de radionuclídeos, bem como, na formulação de conjunto de reativos liofilizados cada vez mais estáveis, a fácil disponibilidade e/ou distribuição

dos radionuclídeos às radiofarmácias hospitalares tornaram a Medicina Nuclear um campo em constante expansão e notavelmente promissor.

1.2. Radiofármacos

Por definição, radiofármacos são compostos radioativos utilizados no diagnóstico e terapia de doenças humanas. Eles são em sua maioria, compostos orgânicos ou inorgânicos com composição definida, sendo também classificados de acordo com a sua biodistribuição, propriedades físicas e químicas e ligação aos receptores ou por outras interações biológicas^(1,7).

Um radiofármaco geralmente possui dois componentes principais: o radionuclídeo e o fármaco, os quais regem a base química-molecular para uma determinada função e utilidade de acordo com a participação nos processos fisiológicos do órgão de interesse. Para a preparação e escolha de um radiofármaco ideal, o radionuclídeo deve conter características ideais como fácil disponibilidade, tempo de meia-vida efetivamente curto e propriedades de decaimento favoráveis aos detectores atualmente existentes (isto é, entre 100-250 keV)⁽⁸⁾. Já em relação aos fármacos alvo-específicos, parâmetros como alta razão alvo/não-alvo, compatibilidade ao radioisótopo, estereoquímica, natureza do sistema quelante, carga e tamanho da molécula, ligação às proteínas plasmáticas, solubilidade, estabilidade e biodistribuição, são parâmetros que devem ser considerados como fatores limitantes à sua aplicabilidade^(9,10).

A sua aplicabilidade também está diretamente associada ao tipo de decaimento radioativo do radionuclídeo a ele associado. Radiofármacos associados a nuclídeos emissores de radiação gama (γ) e pósitron emissores (β^+) são exclusivamente utilizados para o diagnóstico, enquanto emissores corpusculares como alfa (α), beta (β^-) e emissores de elétrons Auger são utilizados para terapia. Em Medicina Nuclear aproximadamente 95% dos radiofármacos são utilizados para fins diagnósticos, e usualmente, não possuem efeito farmacológico, já que são administrados em quantidades traçadoras (10^{-6} – 10^{-8} M)^(1,7,10).

Radiofármacos diagnósticos são predominantemente complexos metálicos associados a um quelante orgânico, como no caso de “agentes metálicos essenciais”, ou conjugados à uma biomolécula, como no caso de

radiofármacos alvo-específicos⁽¹¹⁾. Dentre os radionuclídeos mais utilizados para o diagnóstico estão o tecnécio-99m (^{99m}Tc), gálio-68 (^{68}Ga), índio-111 (^{111}In), iodo-123 (^{123}I), tálio-201 (^{201}Tl), flúor-18 (^{18}F) e carbono-11 (^{11}C)^(12,13).

Radiofármacos terapêuticos são complexos desenhados para liberar doses terapêuticas de radiação ionizante a sítios doentes. A radioterapia tem sido utilizada por cerca de quatro décadas, inicialmente com a utilização do iodo-131 (^{131}I) radioativo para o tratamento de anomalias na tireóide⁽¹⁴⁾. Os principais obstáculos na radioterapia considerando a prática clínica são a disponibilidade de radionuclídeos e as técnicas para localização específica dos mesmos em tecidos doentes, como os tumores^(1,11). Outros radionuclídeos em evidência atualmente na radioterapia de diversas malignidades são o ítrio-90 (^{90}Y) e lutécio-177 (^{177}Lu)⁽¹⁵⁾.

Nas últimas décadas, a pesquisa se concentrou no desenvolvimento de rádio-fármacos alvo-específicos baseados na ligação a receptores celulares dos tecidos doentes. Neste caso, a biomolécula radiomarcada, ao alcançar o sítio doente, complexa-se com receptores específicos minimizando a exposição da radiação em outros locais.

1.3. Radioisótopo tecnécio-99m

1.3.1. Histórico

Os radiofármacos de tecnécio-99-metaestável (^{99m}Tc) tornaram-se nos últimos 30 anos, importantes ferramentas para o diagnóstico de várias doenças ou disfunções de órgãos e sistemas que compõem o corpo humano. Existem aproximadamente 30 desses compostos sendo utilizados em Medicina Nuclear, gerando um volume de exames correspondente a 80% da rotina clínica nas radiofarmácias hospitalares^(16,17). A cada ano, aproximadamente 25 milhões de procedimentos utilizam radiofármacos de ^{99m}Tc , sendo esperada uma projeção crescente de 15% ao ano⁽¹⁸⁾.

O elemento químico tecnécio não é encontrado na crosta terrestre em abundância, pois o mesmo não é gerado continuamente pela reação ou decomposição de outros elementos presentes no planeta. Pequenas amostras de

tecnécio foram encontradas em rochas, provavelmente devido aos raios cósmicos que bombardearam a Terra⁽¹⁹⁾.

O tecnécio foi descoberto em 1925 pelos cientistas Noddack, Tacke e Berg, os quais o chamaram, inicialmente, de *massarium*. Eles se basearam nos espectros e emissão de raios X obtidos com concentrados de gangas de vários minerais, como por exemplo, a columbita⁽²⁰⁾. O nome “tecnécio” foi originado do grego *technetos* que significa “artificial” e empregado, primeiramente, por Paneth (1947), justamente por ser o primeiro elemento radioativo produzido pelo homem⁽²¹⁾.

Somente em 1937, na Itália, os cientistas Perrier e Segré isolaram e estudaram este elemento, o qual foi extraído de uma placa defletora de molibdênio usada em ciclotron, e somente a partir de 1970, o radioisótopo ^{99m}Tc começou a ser empregado com frequência na Medicina Nuclear⁽²²⁾.

1.3.2. Propriedades químicas, físicas e nucleares do ^{99m}Tc

O tecnécio é um metal de transição de número atômico 43, situado no Grupo 7 da Tabela Periódica. Possui uma configuração eletrônica $4d^5 5s^2$, fornecendo diversas oportunidades para a formação de complexos com um vasto número de diferentes ligantes^(4,23).

Isto se deve principalmente à sua rica e diversa química redox, que apesar de fornecer múltiplas oportunidades relativas à modificação estrutural e às propriedades dos complexos formados através de uma adequada escolha do sistema quelante, torna difícil o controle dos seus estados de oxidação e a labilidade dos complexos formados^(1,11,22).

Os números do estado de oxidação do tecnécio variam de -1 a +7, e seus complexos de coordenação podem se arranjar de diversas formas^(24,25). A seleção apropriada de técnicas sintéticas para obtenção de compostos de coordenação específicos⁽²⁶⁾, determinam assim, não somente sua estereoquímica⁽²⁴⁾, mas também suas propriedades físicas e químicas⁽¹⁾.

O tecnécio possui 21 isótopos, os quais apresentam número de massa que varia entre 90 e 110, e tempo de meia vida ($t_{1/2}$) que varia entre 0,86 segundos e $2,6 \times 10^6$ anos. Nenhum destes isótopos é estável e o isótopo ^{99m}Tc é

o que apresenta as melhores propriedades físicas e químicas para a detecção externa⁽¹⁹⁾.

A ampla utilização de radiofármacos com ^{99m}Tc está relacionada a diversos fatores. O mais importante deles é seu favorável modo de decaimento que inclui a emissão- γ , de energia monocromática de 140 KeV, ideal para aquisição de imagens cintilográficas. A esta característica ideal somam-se o curto $t_{1/2}$ de 6,02 horas, acompanhado por um relativamente baixo nível de radiação não-penetrante, bem como, a eficiente separação do radionuclídeo “pai”, molibdênio-99 (^{99}Mo), através do sistema de geradores $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, primeiramente desenvolvido no Laboratório Nacional de Brookhaven em 1958 por Tucker e Green^(1,3,18,23,27).

Este gerador pode ser produzido utilizando três métodos químicos diferentes: cromatográfico, sublimação e extração por solventes. O procedimento mais utilizado é o cromatográfico, baseado em sistema de alumina com ^{99}Mo de produto de fissão, justamente por apresentar um excelente custo-benefício⁽²⁸⁾. No gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, o molibdato ($^{99}\text{MoO}_4^{2-}$) é absorvido em uma coluna de alumina e o ^{99m}Tc é formado pelo decaimento do ^{99}Mo (FIG. 1). O ^{99m}Tc na forma de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$) é eluído, a baixas concentrações (isto é, da ordem de 10 μM)⁽²⁹⁾, por uma coluna de vidro com solução salina⁽⁸⁾.

Figura 1 - Esquema de decaimentos radioativos a partir do ^{99}Mo incluindo a transição isomérica e os $t_{1/2}$ dos radionuclídeos⁽²⁸⁾.

Três parâmetros principais são utilizados como referência na construção e modelagem de complexos de ^{99m}Tc , cada qual, influenciam intimamente na biodistribuição e cinética *in vivo* dos complexos formados. O estado de oxidação é considerado o principal parâmetro na determinação da

natureza química dos complexos. O tecnécio pode formar ligações químicas com ambos elétrons sigma e pi, onde as ligações sigma podem ser do tipo covalentes ou coordenadas. Complexos denominados de oxo- $^{99m}\text{Tc(V)}$, em que o ^{99m}Tc se encontra no estado de oxidação +V, são os mais comuns. Neste tipo de núcleo, o ^{99m}Tc tipicamente se liga a átomos de oxigênio (isto é, núcleos de $[\text{}^{99m}\text{Tc=O}]^{3+}$ ou $[\text{}^{99m}\text{Tc}_2\text{O}_3]^{4+}$) através da redução do $^{99m}\text{TcO}_4^-$ com, por exemplo, o cátion estanoso (Sn^{2+})⁽³⁰⁾. Atualmente, compostos contendo ^{99m}Tc em outros estados de oxidação estão sendo continuamente desenvolvidos^(30,31).

A estrutura dos complexos de tecnécio-99m pode também ser caracterizada pelo número de coordenação (N), que pode variar de 4 a 7, dependendo da natureza do ligante, permitindo assim, a formação de uma geometria tetraédrica (N=4), tetragonal piramidal (N=5), octaédrica (N=6) ou pentagonal bipiramidal (N=7). O terceiro parâmetro para caracterização dos complexos formados é a carga elétrica (Z) da molécula total, fornecendo um caráter aniônico (Z=-1), neutro (Z=0) ou catiônico (Z=+1)^(18,31).

Assumindo que sua ação poderia ser similar àquela já consagrada utilizando o radionuclídeo iodo-131 (^{131}I), ^{99m}Tc primeiramente foi utilizado no radio-diagnóstico de doenças da tireóide, na forma de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ⁽¹⁴⁾. Desde então, diversos complexos de ^{99m}Tc foram sintetizados e estudados como agentes de imagem, levando ao desenvolvimento bem sucedido destes complexos, então denominados “agentes essenciais”⁽¹⁾. Dependendo do nível de complexidade, os radiofármacos de ^{99m}Tc podem ser classificados como de primeira, segunda ou terceira geração.

1.3.3. Radiofármacos de ^{99m}Tc : primeira, segunda e terceira gerações

A primeira geração de radiofármacos de tecnécio foi desenvolvida levando-se em consideração propriedades como a simples absorção, distribuição, metabolismo e excreção de complexos comuns de ^{99m}Tc . Estes estudos iniciais levaram ao desenvolvimento de radiofármacos para a tireóide ($^{99m}\text{TcO}_4^-$), fígado (^{99m}Tc -colóides)⁽³²⁾, osso (^{99m}Tc -fosfonados)⁽³³⁾ e rins [^{99m}Tc -dietilenotriaminopentaacético (^{99m}Tc -DTPA)]⁽³⁴⁾.

A habilidade de determinar o exato peso molecular da estrutura de coordenação dos compostos, utilizando poderosas técnicas analíticas como a

Ressonância Magnética Nuclear, Espectrometria de Massa (EM) e difração de Raios-X, levaram os pesquisadores a um melhor entendimento das relações entre estrutura-atividade biológica dos agentes de ^{99m}Tc .

Como conseqüência, uma cuidadosa modelagem de novos ligantes e seus ^{99m}Tc -complexos levaram à descoberta de agentes de imagem para perfusão cerebral e miocárdica. Os amplamente utilizados agentes de imagem cardíaca, ^{99m}Tc -metoxiisobutilisonitrila [$^{99m}\text{Tc}(\text{MIBI})_6$] $^+$ (^{99m}Tc -sestamibi, Cardiolite[®])⁽³⁵⁾ e ^{99m}Tc -tetrafosmina (Myoview[®])⁽³⁶⁾, bem como os agentes de imagem cerebral ^{99m}Tc -hexametilpropilenoaminooxima (^{99m}Tc -HMPAO, exametazima, Ceretec[®])⁽³⁷⁾ e ^{99m}Tc -etilenodicisteínadietiléster (^{99m}Tc -ECD, biscate, Neurolite[®])⁽³⁸⁾ são o resultado das estratégias no desenvolvimento de complexos de ^{99m}Tc mencionadas acima. Estes produtos, incluindo os agentes renal ^{99m}Tc -mercaptopetilglicina (^{99m}Tc -MAG₃)⁽³⁹⁾ e hepatobiliar ^{99m}Tc -mebrofenina⁽⁴⁰⁾, são geralmente referidos como agentes de ^{99m}Tc de segunda geração, sendo o comportamento biológico destes radiofármacos dirigido pelas suas propriedades moleculares, tais como tamanho, carga e lipofilicidade.

O atual desenho de agentes de imagem são baseados na cuidadosa seleção de moléculas adequadas, que agem como vetores efetivos para a liberação da radioatividade a sítios biológicos alvo como receptores e transportadores. Esta estratégia implica na metodologia de marcação empregada, introduzindo para tal finalidade, um radionuclídeo na biomolécula sem provocar distorção estrutural, nem mesmo alteração nas propriedades biológicas da mesma. No entanto, estes agentes requerem o desenvolvimento de métodos sofisticados de marcação que vão além das tecnologias previamente utilizadas. A introdução do conceito de agentes quelantes bifuncionais (AQB) e novos núcleos de tecnécio-99m (FIG. 2) como o ^{99m}Tc -tricarbonil⁽⁴¹⁾, ^{99m}Tc -Nitrído⁽⁴²⁾, ^{99m}Tc -6-hidrazinonicotinamida (^{99m}Tc -HYNIC)⁽⁴³⁾, bem como os complexos utilizando ligantes mixtos, tem ultimamente permitido o alcance de tal objetivo. Os radiofármacos ^{99m}Tc -HYNIC-N'-N''-etilenodiaminodiacético-Try-octreotide (^{99m}Tc -HYNIC-EDDA-TOC)⁽⁴⁴⁾ desenvolvido a partir do alternativo ^{111}In -octreotide para o mapeamento de tumores neuroendócrinos, bem como, o agente ^{99m}Tc -TRODAT-1⁽⁴⁵⁾, utilizado para estudos de receptores cerebrais, são os melhores exemplos da terceira geração de radiofármacos de ^{99m}Tc .

Figura 2 - Núcleos de ^{99m}Tc (A) ^{99m}Tc -tricarbonil, (B) ^{99m}Tc -HYNIC-(tricina)(L) e (C) ^{99m}Tc -nitrido.

Diversas técnicas de marcação foram empregadas no decorrer dos anos, utilizando conhecimentos das principais propriedades físicas, químicas e radioquímicas deste metal, e também, da sua sistemática química em função do estado de oxidação. Um sumário de diferentes tipos de centros de complexação levando-se em consideração os parâmetros estado de oxidação, número de coordenação e carga elétrica, bem como, aplicabilidade de cada núcleo estão apresentados na [Tabela 1](#).

1.3.4. Marcação de biomoléculas com ^{99m}Tc

Os métodos de marcação de biomoléculas com o radioisótopo ^{99m}Tc podem ser agrupados, basicamente, em três formas: 1) marcação direta; 2) pré-marcação indireta; 3) pós-marcação indireta.

Tabela 1. Caracterização dos complexos de tecnécio-99m segundo os parâmetros N, EO e Z.

N	EO	Z	Núcleos de complexação do Tc por:		Composto	Especificidade por Órgão/Tecido
			Ligação sigma	Ligação Pi		
4	+7	-1	----	(=O) ₄	Pertecnetato	Tireóide
5	+5	-1	O ₄	=O	Gluconato	Marcação de cél. Vermelhas
			N ₃ S	=O	MAG ₃	Rins
			N ₂ S ₂	=O	EC	Rins
			S ₄	=O	DMSA(V)	Tecidos tumorais
5	+5	0	N ₄	=O	HMPAO	Cérebro
			N ₂ S ₂	=O	ECD	Cérebro, células brancas
			S ₄	---N	NOET	Miocárdio
6	+1	+1	C ₆	=O	MIBI	Miocárdio
	+1	+1	C ₃ N ₃ , C ₃ N ₂ O	=O	TRICARBONYL	Diversos
	+3	+1	N ₂ O ₂ P ₂	----	Q 12	Miocárdio
	+5	+1	P ₄	(=O) ₂	Tetrofosmina	Miocárdio
6	+4		N ₃ O ₃	---	DTPA	Rins
	+3	-1	S ₃ O ₃	---	DMSA (III)	Rins
		-1	N ₂ O ₄	---	Derivados HIDA	Sistema hepatobiliar
	+4	-1	O ₆	---	Fosfonados	Osso
7	+3	0	N ₆ Cl	----	Teboroxima	Fluxo miocárdico
7	+5	-1	N ₂ O ₄	=O	EDTA, DTPA	Rins
					Derivados de HIDA	Sistema hepatobiliar

Abreviações: N = número de coordenação; EO = estado de oxidação; Z = carga elétrica.

Fonte – Adaptado⁽¹⁸⁾.

Na marcação direta, utiliza-se um agente redutor para reduzir o ^{99m}Tc ao mesmo tempo em que se reduzem as pontes dissulfetos da biomolécula, formando, assim, dois grupos tióis que se ligam ao radionuclídeo. Esta técnica pode ser utilizada em marcações com proteínas ou peptídeos que apresentam pontes de enxofre. Porém, o método apresenta algumas limitações: a marcação não é específica, ou seja, apresenta baixo controle do sítio de ligação do tecnécio deixando a sua geometria desconhecida; os complexos formados são instáveis *in vivo*; e as quebras das pontes de enxofre podem alterar a estrutura da biomolécula e impedir a sua integridade biológica⁽⁹⁾. Esta técnica foi muito empregada na década

de 90 para a marcação de peptídeos e anticorpos com $^{99m}\text{Tc(V)}$, e apesar de não ser muito adequada para radiomarkação de biomoléculas pequenas, a sua principal vantagem é a fácil execução^(9,26).

Na utilização de métodos de marcação indireta, se faz necessário o uso de ligantes, chamados também de agentes quelantes bifuncionais (AQB), que são moléculas que contêm grupos funcionais capazes de unirem-se ao íon metálico (^{99m}Tc) formando um complexo.

Na pré-marcação indireta, o tecnécio é ligado, inicialmente, ao AQB para somente depois se ligar e complexar a biomolécula. A técnica faz uso dos então denominados precursores, e vem sendo muito empregada devido ao advento dos experimentos de Alberto et al. (1995)⁽⁴⁶⁾, que utilizaram $^{99m}\text{Tc(I)}$ como núcleo de complexo organometálico carbonílico (FIG. 2A). As vantagens do emprego desta técnica são a boa definição do processo químico; o fácil controle reacional; e a garantia que o radionuclídeo é quelado diretamente pelo AQB sem afetar a estrutura da biomolécula, já que a marcação e a etapa de complexação são separadas⁽⁴⁷⁾. No entanto, as múltiplas etapas sintéticas representam um problema à sua aplicação nas radiofarmácias hospitalares.

Por fim, na pós-marcação indireta, a biomolécula é previamente conjugada ao AQB para somente depois realizar a marcação e complexação com o radionuclídeo. Esta é a técnica mais utilizada na produção de radiofármacos, justamente por não utilizar o radioisótopo no primeiro momento da síntese e também por apresentar uma química bem definida e de relativa simplicidade^(1,7,47).

1.4. Agentes quelantes bifuncionais

Especial atenção foi despendida ao desenvolvimento da técnica de marcação indireta, uma vez que o radioisótopo se liga covalentemente à biomolécula, agindo assim, como coordenador do radionuclídeo, mantendo a máxima integridade biomolecular com mínima, ou nenhuma, dissociação *in vivo*^(4,48). Nesta técnica o radiocomplexo é basicamente constituído por quatro partes principais (FIG. 3): o radionuclídeo metálico, que serve como fonte radioativa a ser liberada no sítio do tecido doente; uma unidade quelante, que age como coordenadora do radionuclídeo metálico; um grupo de conjugação, que permite a

adesão covalente à biomolécula carregadora; e o espaçador, que desempenha a função de modificador farmacocinético e/ou com a finalidade de afastar o sítio de ligação do radioisótopo ao sítio de ligação da biomolécula⁽¹¹⁾.

Figura 3 - Esquema de um radiofármaco alvo-específico: a molécula carregadora e o radionuclídeo metálico conectados através de um AQB e um espaçador.

Um agente quelante bifuncional ideal é aquele que forma complexos de ^{99m}Tc com altos rendimentos e a baixas concentrações do conjugado AQB-biomolécula (BM). Com a finalidade de atingir este objetivo, o AQB deve seletivamente estabilizar um intermediário ou reduzir o estado de oxidação do ^{99m}Tc , de uma forma que o mesmo não sofra reações redox. As mudanças de estados de oxidação frequentemente acontecem com subsequente transquelação do complexo ^{99m}Tc -AQB-BM aos quelantes nativos em sistemas biológicos. Os AQBs devem também, formar complexos termodinamicamente estáveis, cineticamente inertes e finalmente, possuir um número reduzido de formas isoméricas^(1,7,13,49).

Um dos agentes quelantes usados primeiramente foi o DTPA, porém essencialmente para os radioisótopos índio-111, e ítrio-90⁽⁴⁸⁾. Geralmente, os agentes quelantes de escolha para marcações com $^{99m}\text{Tc}/^{186,188}\text{Re}$ foram do tipo triaminotiol (N_3S)⁽⁵⁰⁾, como ácido mercaptoacetilglicilglicil gama-aminobutírico ($\text{MAG}_2\text{-GABA}$)⁽¹³⁾, diaminoditióis (N_2S_2)⁽⁵¹⁾ e mercaptoacetiltriglicina (MAG_3)⁽⁵²⁾.

Finalmente, o método de pós-marcação indireta parece ser o mais adequado para aplicação clínica, já que combina os fáceis e efetivos atributos da marcação direta combinados à química bem definida da pré-marcação indireta.

1.4.1. Mercaptoacetiltriglicina (MAG₃) como agente quelante bifuncional

Durante as últimas décadas, um grande número de moléculas foram sintetizadas utilizando diversos núcleos de coordenação com os átomos de nitrogênio (N) e enxofre (S) como doadores de elétrons, visando formar complexos de ^{99m}Tc úteis para o diagnóstico em Medicina Nuclear. Desta forma, sistemas de ligantes possuindo núcleos oxo-^{99m}Tc(V) de diaminoditióis (N₂S₂) como o N-N'-bis(mercaptoacetil)etilenodiamina, e triaminotiol (N₃S), como o mercaptoacetiltriglicina, [TcO(MAG₃H)]⁻, foram primeiramente desenvolvidos por Fritzberg et al.⁽⁵³⁾, visando substituir o radiomarcado hippuran® com ¹³¹I (OIH) para fins diagnósticos de disfunções renais. Apesar das vantagens demonstradas pelo ^{99m}Tc comparadas àquelas com o ¹³¹I, o último ainda era mais específico e sensível para tal finalidade⁽⁵⁴⁾.

Diversas modificações foram introduzidas nos núcleos dos membros da família de quelatos N_xS_(4-x) coordenados pelo núcleo [Tc(V)O]⁺³ visando contornar as inúmeras desvantagens frente ao OIH. Inicialmente foram utilizados a classe de diamidotióis, mas ainda assim, foram obtidos complexos com um amplo número de isômeros e propriedades biológicas discrepantes *in vivo*⁽⁴⁾. Mais tarde, a utilização de núcleos N₃S, em substituição aos N₂S₂, foram incorporados na molécula, e somente em 1986 a síntese do benzoil-mercaptoacetiltriglicina (Bz-MAG₃) foi publicada. Pelo fato de possuir centros assimétricos, o composto Bz-MAG₃, apresentou propriedades mais específicas quando comparado ao OIH, além de formas isoméricas não terem sido detectadas⁽⁵⁴⁾.

O desenvolvimento do ^{99m}Tc-MAG₃, envolve não somente cuidado na seleção do ligante coordenador (N₃S), mas também nas estratégias de localização do substituinte carboxilato na sequência peptídica. Para tal finalidade, diferentes grupos protetores foram sintetizados com o MAG₃, tais como o S-benzoil (S-bz)⁽⁵⁵⁾ e o éster N-hidroxisuccinamida (NHS)⁽⁵⁶⁾.

Este amidotiol é protegido contra a formação da ligação dissulfídica por um grupo benzoil, sendo removido por aquecimento durante o procedimento de marcação. A desproteção do tiol e subsequente radiomarcagem, requer altas temperaturas e uma alcalinidade elevada (usualmente pH acima de 9). Por este motivo, a utilização de quelantes protegidos pelo grupo benzoil é inapropriada para

biomoléculas sensíveis a altos valores de pH ou temperatura, como anticorpos, certas proteínas e peptídeos⁽⁵⁷⁾.

Na tentativa de reverter este problema, Winnard et al.⁽⁵⁸⁾ sintetizaram o éster N-hidroxisuccinamida (NHS) com MAG_3 , utilizando o grupo acetil como protetor (FIG.4). Este grupo, é rapidamente removido em pH neutro ou ligeiramente alcalino, à temperatura ambiente. Além disso, o número de etapas sintéticas é reduzido e uma maior estabilidade do complexo *in vivo* foi encontrada.

Figura 4 - Agente quelante bifuncional S-acetil- MAG_3 .

1.4.2. 6-hidrazinonicotinamida (HYNIC) como agente quelante bifuncional

HYNIC (FIG. 5) é um agente quelante bifuncional que tem sido amplamente explorado. Historicamente, desde que Abrams e col.⁽⁵⁹⁾ relataram primeiramente a utilização de núcleos de $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{HYNIC}$ para marcação de imunoglobulinas (IgG), as investigações utilizando este núcleo foram realizadas, primordialmente, para radiomarcagem de proteínas⁽⁶⁰⁾, pequenas biomoléculas, incluindo peptídeos quimiotáticos⁽⁶¹⁾, análogos da somatostatina⁽⁶²⁾ e oligonucleotídeos antisense⁽⁶³⁾.

Figura 5 - Agente quelante bifuncional HYNIC.

Quando associado a moléculas bioativas em meio neutro ou levemente alcalino, a parte reativa da biomolécula reage com os grupos nucleofílicos da

macromolécula, como os ϵ -amina dos resíduos da lisina, formando assim, um conjugado contendo grupos hidrazina/hidrazida livres⁽⁴⁾.

Diversos grupos de pesquisas dispenderam esforços substanciais na caracterização da química de coordenação de hidrazinas orgânicas utilizando 2-hidrazinopiridinas⁽⁶⁴⁾, 2-hidrazinoimidazolina⁽⁶⁵⁾ e 2-hidrazino-4-(trifluorometil) piridimina⁽⁶⁶⁾. Com estas três modalidades básicas de coordenação que incluíam um diazenido monodentado a duas modalidades bidentadas, envolvendo o hidrazino e nitrogênios heterocíclicos, foi possível desenvolver a complexação de peptídeos quimiotáticos conjugados ao HYNIC com núcleos de ^{99m}Tc , utilizando para tal finalidade pirimidinas tioladas⁽⁶⁵⁾.

Como o HYNIC ocupa somente um ou dois sítios de coordenação (FIG. 6), um coligante é necessário para completar a geometria piramidal quadrada ou octaédrica do complexo⁽⁶⁷⁾. Esses coligantes podem ser o EDDA, a tricina, o ácido nicotínico, entre outros^(67,68). A vantagem na utilização de tal sistema são os altos rendimentos de marcação obtidos, além da escolha de coligantes, que permite a fácil modificação da hidrofiliicidade e farmacocinética dos complexos radiomarcados com ^{99m}Tc . No entanto, duas desvantagens foram encontradas utilizando tricina ou glucoheptonato como coligantes: (1) instabilidade da solução do complexo binário $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{HYNIC-BM})(\text{L})_2]$, e (2) presença de múltiplas espécies em solução devido às diferentes modalidades de ligação entre os componentes do complexo.

Figura 6 – Exemplo de formas isoméricas onde HYNIC atua como (A) ligante monodentado e (B) ligante bidentado. Nota: Estrutura contendo $[\text{}^{99m}\text{Tc-HYNIC-(tricina)}_2]$.

Na tentativa de reverter estes problemas, a fim de garantir uma maior estabilidade dos compostos de $^{99m}\text{Tc-HYNIC}$ e conseqüentemente a redução do

número de isômeros, a utilização de coligantes mais fracos (isto é, tricina e gluconato) foi substituída pela utilização de coligantes mais fortes isoladamente, como o caso da EDDA⁽⁶⁹⁾, ou mesmo, através da utilização de sistemas de coligantes, como no caso dos sistemas tricina/fosfina⁽⁷⁰⁾, tricina/EDDA⁽⁷¹⁾, tricina/piridina⁽⁷²⁾ e tricina/acetonitrila⁽⁶⁷⁾.

Liu et al.⁽⁷²⁾ utilizaram um sistema ternário [HYNIC, tricina e trisodiotrifetilfosfina-3,3',3''-trisulfonato (TPPTS)] para a marcação de diversas moléculas pequenas, incluindo peptídeos quimiotáticos⁽⁷³⁾, receptores antagonistas da LBT4⁽⁷⁴⁾, vitronectina⁽⁷⁵⁾ e do GPIIb/IIIa⁽⁷⁰⁾. O grupo obteve elevados rendimentos de marcação, alta estabilidade em solução e reduzido número de formas isoméricas.

Em princípio, o sistema de ligantes ternários [HYNIC-BM, tricina e TPPTS] pode ser utilizado para marcação de biomoléculas desde que não possuam ligações dissulfídicas (S-S), a utilização de fosfina seja reduzida (já que é um composto tóxico), e a biomolécula contenha um ou mais centros quirais⁽⁷²⁾.

Apesar de anos de intensiva investigação por diversos grupos de pesquisa, é evidente que agentes de imagem baseados em núcleos ^{99m}Tc-HYNIC são quimicamente robustos, mas pobremente caracterizados em níveis traçadores^(4,76). Contudo, a escolha de coligantes ideais, bem como os avanços nas técnicas de caracterização estrutural constituem um conjunto de ferramentas valiosas para a aplicação destes promissores núcleos nas radiofarmácias hospitalares.

1.5. Peptídeos

Um grande desafio para médicos, e em particular para oncologistas, tem sido a identificação de ferramentas simples com potencial aplicação e detecção de neoplasias em estado precoce de desenvolvimento. Há cerca de 20 anos, anticorpos monoclonais tornaram-se muito populares como potências “balas mágicas” contra o câncer. No entanto, essa ferramenta fascinante e simples tornou-se muito mais difícil de ser transposta em realidade que o esperado, principalmente, pelo seu excessiva massa molecular (~150 kDa) e subsequente lenta depuração sanguínea^(1,11,12).

Além disso, os métodos radiográficos não-invasivos se tornaram métodos de diagnóstico padrão para uma variedade de doenças. Durante este período, radiocompostos desenvolvidos a partir de moléculas não-específicas à anticorpos antígenos-específicos, e mais recentemente, à peptídeos regulatórios receptores-específicos, tem emergido como uma das mais importantes classes de substâncias para aplicações diagnósticas e terapêuticas^(3,7,13). Esta emergência se deve à sua favorável farmacocinética caracterizada por um curto tempo de retenção no sangue e alta captação nos tecidos alvos⁽¹¹⁻¹³⁾. No entanto, após a descoberta da ampla expressão de receptores neuropeptídicos específicos em células neoplásicas com alta afinidade e densidade, atenções foram dirigidas predominantemente para a marcação de tumores. Embora os mais proeminentes exemplos de radiofármacos utilizados no diagnóstico em Medicina Nuclear sejam os rotineiramente utilizados análogos da somatostatina marcados com ^{111}In ⁽¹²⁾ e peptídeos vasointestinais ativos marcados com ^{123}I ⁽⁷⁷⁾, na década dos anos 90, peptídeos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ emergiram como uma importante classe de radiofármacos no diagnóstico de diversas malignidades⁽¹¹⁾.

Peptídeos são compostos que contêm diversos aminoácidos α -carboxílicos ligados por ligações peptídicas. Desenhados pela natureza para estimular, inibir e regular diversas funções vitais, os peptídeos são considerados agentes ideais para aplicações diagnósticas⁽⁷⁸⁾. Além disso, são elementos essenciais na maioria dos processos biológicos fundamentais, e na maioria dos casos, a afinidade aos seus receptores é significativamente maior que a encontrada por alguns anticorpos e seus fragmentos^(13,79).

Em termos gerais, peptídeos regulatórios representam um grupo de diferentes famílias de moléculas conhecidas por agir em múltiplos alvos no corpo humano em concentrações extremamente baixas⁽⁸⁰⁾. Os alvos destes peptídeos não estão necessariamente restritos ao trato gastrointestinal, mas também ao sistema endócrino, rins, pulmões, bem como, aos sistemas imune, vascular e periférico nervoso⁽⁷⁸⁾. No entanto, esta classe de peptídeos controla e modula as funções de quase todos os órgãos chave e processos metabólicos, sendo sua ação mediada por receptores de membrana específicos. Em sua maioria, estes receptores são pertencentes ao grupo de proteínas acopladas à proteína G, podendo influenciar portanto, em muitos sistemas intracelulares efetores^(78,81).

1.6. Neurotensina: descoberta e isolamento

A existência do peptídeo Neurotensina (NT) foi primeiramente percebida durante o curso de purificação da substância P de extratos do hipotálamo bovino⁽⁸²⁾. Esta vasodilatação estava associada a uma hipotensão transiente e a atividade susceptível durante a digestão proteolítica. Utilizando estas propriedades biológicas para monitorar os procedimentos de purificação, o peptídeo casual foi isolado por Carraway e Leeman em 1973⁽⁸³⁾ (FIG. 7) e sua denominação, baseada na grande incidência no tecido neuronal e habilidade de afetar a pressão sanguínea.

Figura 7 - Fórmula estrutural da molécula do peptídeo Neurotensina nativo.

NT é produzida a partir de um precursor simples, denominado pre-pro-NT, que contém ambos NT(1-13) e o peptídeo correlato, Neuromedina N (NN). O gene codifica um precursor proteico de 170 aminoácidos contendo ambos o peptídeo NT e o hexapeptídeo NN. Os quatro aminoácidos na porção carboxi-terminal da NT e da NN são idênticos, sendo os aminoácidos de 8 a 13 da NT essenciais para atividade biológica^(84,85).

Neurotensina é um membro da família de peptídeos biologicamente ativos que incluem a xenopsina (pGlu-Gly, Lys-Arg-Pro-Trp-Ile-Leu, isolado da pele do *Xenopus laevis*) e NN (Lys-Ile-Pro-Tyr-Ile-Leu, isolado da coluna espinhal de porcos). Ambos peptídeos interagem com receptores da NT e são homólogos ao peptídeo C-terminal NT(8-13)⁽⁸⁶⁾.

Historicamente, a síntese de análogos da NT, incluindo seus fragmentos e protótipos cíclicos congêneres, são resultados de um importante trabalho de vários grupos de pesquisadores como Carraway and Leeman⁽⁸⁷⁾, Folkers et al.⁽⁸⁸⁾, Rivier et al.⁽⁸⁹⁾, St-Pierre et al.⁽⁹⁰⁾, Bayer et al.⁽⁹¹⁾, Quirion et al.⁽⁹²⁾, entre outros. Estes

estudos pioneiros forneceram a primeira análise sistemática da neurotensina no que tange à relação entre estrutura e atividade, bem como das propriedades conformacionais de ambas as moléculas nativa e análogos.

Estudos na literatura indicaram que a parte ativa, e conseqüentemente, a responsável pela ligação da NT aos receptores, está compreendida entre os aminoácidos Arg⁸ ao Leu^{13(93,94)}. No entanto, a ação de peptidases representava uma barreira para a aplicação clínica do análogo, nomeado NT(8-13).

A clivagem enzimática ocorre através da ação de diversas peptidases, incluindo a endopeptidase 24.11, pela enzima conversora de angiotensina, metaloendopeptidase 24.15 e finalmente pela metaloendopeptidase 24.16⁽⁹⁴⁾. Especialmente susceptíveis a estas peptidases são as ligações peptídicas Arg⁸-Arg⁹, Pro¹⁰-Tyr¹¹ e Tyr¹¹-Ile¹² na molécula de NT(8-13) (FIG. 8).

Figura 8 - Sequência de aminoácidos da molécula da NT(8-13). Setas: indicam os sítios de clivagem enzimática.

Estas limitações podem ser contornadas através da utilização de métodos sintéticos simples que substituem a sequência de aminoácidos metabolicamente ativos por miméticos, que por sua vez, estabilizam a molécula e conservam uma alta afinidade com o receptor. Aliado a isso, atenções foram direcionadas à estabilização destes sítios biodegradáveis pela redução das ligações peptídicas, pela metilação de um nitrogênio de uma ligação amida ou pela substituição de um aminoácido natural (L, α) por um D-aminoácido não-natural⁽¹²⁾.

1.6.1. Funções fisiológicas da Neurotensina e seu papel hormonal em neoplasias

Neurotensina se localiza principalmente no Sistema Nervoso Central (SNC) e em células endócrinas (células-N) do jejuno e do íleo. É liberada em resposta ao aumento de gorduras intraluminais, possuindo numerosas funções no

trato gastrointestinal (GI), que incluem: efeitos na motilidade do GI; estimulação de secreções pancreáticas e biliares; facilitação da translocação de ácidos gordurosos do lúmen intestinal; e estimulação do crescimento de diversos tecidos do trato GI, bem como, de outros tecidos como a glândula adrenal, hepatócitos e fibroblastos no SNC^(95,96).

Em nível central, a NT desempenha o papel de neurotransmissor ou neuromodulador na transmissão da dopamina e na secreção de hormônios pela glândula pituitária anterior, desempenhando também potentes efeitos analgésicos e hipotérmicos no cérebro^(95,97).

O melhor entendimento dos papéis desempenhados no organismo pela NT no trato GI e no SNC tem sido amplamente facilitado pela clonagem dos genes NT/NN, pela clonagem dos seus receptores e finalmente através do desenvolvimento de receptores antagonistas⁽⁹⁵⁾.

Um dos diversos efeitos biológicos desempenhados pela neurotensina é a habilidade de promover o crescimento de tecidos gastroentereopancreáticos *in vivo*, além da proliferação de células dispersas em cultura. Isto, não somente indica o papel da NT na regulação da reposição de células normais, mas também sugere a possibilidade da sua contribuição no crescimento de cânceres que expressam seus receptores^(95,96,97).

A associação epidemiológica da incidência de câncer com a alta ingestão de gordura, sugere a possibilidade de que a NT, liberada como hormônio durante a digestão da gordura, pode desempenhar algum papel. Embora a resposta à ingestão de uma refeição simples ou à perfusão no intestino tenha sido documentada, os efeitos a longo prazo da dieta na síntese e liberação da NT não é conhecido. Interessantemente, a liberação intestinal da NT é promovida por ácidos gordurosos insaturados (oleicos, linoleicos), o que analogamente, também ocorre como estímulo para o crescimento tumoral⁽⁹⁸⁾.

O controle endócrino de certos tipos de cânceres, mais notavelmente os de mama e próstata, têm sido bem caracterizado, delineando assim, a base para as terapias atuais destas doenças. De uma maneira análoga aos tumores de mama e próstata, diversos estudos na literatura relataram que tumores do trato GI, pâncreas e pulmão possuem receptores para vários hormônios no trato gastrointestinal, incluindo os receptores para NT⁽⁹⁶⁾. Isso nos direciona ao seu potencial efeito no

desenvolvimento destes tumores, seguindo um clássico modelo endócrino, com subsequente secreção endógena, levando assim, ao crescimento tumoral. Além disso, alguns destes cânceres mostraram um possível efeito parácrino e/ou endócrino, por apresentarem não somente receptores da NT, mas também por produzi-la⁽⁹⁵⁾.

1.6.2. Receptores da Neurotensina

Uma das principais razões para o crescente interesse por peptídeos e seus receptores em câncer consiste na possibilidade de atuarem como marcadores, já que seus receptores são expressos em diversos cânceres primários, sendo frequentemente utilizados como sítios ligantes para um determinado análogo peptídico^(11-13,79).

Três subtipos de receptores da neurotensina foram clonados até agora, sendo dois deles receptor da NT-1 e receptor da NT-2 (NTR-1 e NTR-2) pertencentes à família de receptores acoplados à proteína G (GPCR), enquanto o terceiro, receptor da NT-3 (NTR-3), representa um novo tipo de receptor neuropeptídeo idêntico ao gp95/sortilina com um único domínio trans-membranoso. Embora NTR-1 e NTR-2 possuam grande homologia e identidade entre espécies, há também algumas diferenças determinantes, que culminam em diferentes formas de sinalização intracelular^(95,97).

Os GPCR são receptores formados por uma cadeia de aminoácidos com estrutura de α -hélice na qual uma de suas extremidades se inicia no espaço extracelular, entrando e saindo da célula, através de sete inversões transmembrânicas⁽⁹⁹⁾. Os GPCR fazem a intermediação da transmissão do sinal entre os receptores e seus múltiplos efetores, tais como enzimas e canais iônicos. Eles também são a base da maioria dos medicamentos que se encontram atualmente disponíveis no mercado, incluindo cerca de 25% dos medicamentos mais vendidos no mundo⁽¹⁰⁰⁾. Fundamentalmente, isso se deve ao fato destes receptores estarem envolvidos na maioria dos processos básicos do organismo, incluindo a comunicação intracelular, transdução sensorial, transmissão neuronal e sinalização hormonal⁽¹⁰¹⁾.

Para GPCRs, os sinais de transdução são ativados pela ligação de peptídeos regulatórios aos seus respectivos receptores⁽¹⁰¹⁾. Estas proteínas agem como veículos intracelulares, que permitirão a comunicação destes receptores de superfície aos sistemas efetores intracelulares incluindo enzimas (como a adenilato ciclase), canais e transportadores iônicos⁽¹⁰⁰⁾.

Evidências emergentes suportam a ação da NT como um fator trófico e anti-apoptótico, mediante seu controle via NTR-1 em diversos tumores sólidos. Souazé et al.⁽⁹⁸⁾ encontraram uma coexpressão da NT e NTR-1 em uma grande porção (30%) de tumores ductais de mama, sugerindo uma contribuição de uma cascata de sinalização neurotensinergética na progressão de tais tumores. Além disso, a participação em uma série coordenada de funções de transformação, incluindo migração celular, invasão, indução da atividade nas matrizes metaloproteinases e gelatinase foram descritas em células da linhagem celular de câncer de mama altamente maligna MDA-MB-231.

Outros estudos sugerem que o par NT e NTR-1 está envolvido em diversas funções ligadas ao crescimento neoplásico, incluindo a proliferação de células cancerígenas de pâncreas, próstata e pulmão⁽¹⁰²⁾, bem como, na proteção de células de tumor mamário (isto é, MCF-7 e MDA-MB-231) contra a apoptose, e finalmente desempenhando um importante papel na indução do potencial invasivo de células de câncer de cólon⁽¹⁰³⁾.

A ativação do NTR-1 inclui efeitos excitatórios via diversas proteínas G, levando a um aumento na produção de monofosfato de adenosina cíclica (cAMP)⁽¹⁰⁴⁾, monofosfato de guanosina cíclica (cGMP)⁽¹⁰⁵⁾ e inositol trifosfato (IP₃)⁽¹⁰⁶⁾, bem como aumento nas concentrações de Ca²⁺⁽¹⁰⁷⁾ ambos *in vitro* e *in vivo*. Embora, o modo de sinalização intracelular, não seja amplamente conhecido *in vivo*, diversos estudos na literatura sustentam sua participação em vários eventos intracelulares subsequentes à ocupação de receptores de membrana pela NT *in vitro*, como por exemplo o estímulo do GMP, a inibição dos níveis cAMP em células da linhagem celular de neuroblastoma (N1E115)⁽¹⁰⁸⁾ e o estímulo à reposição de IP₃ em pedaços do cérebro em ambas linhagens celulares de tumores de cólon (HT29)⁽¹⁰²⁾ e neuroblastoma (N1E115)⁽¹⁰⁸⁾.

Embora a homologia com o NTR-1, o NTR-2 está expresso em poucas células de linhagens tumorais. Estudos na literatura, apontam para uma coexpressão

dos NTR-2 e NTR-3, convergindo para as diversas cascatas de eventos que acontecem quando o NTR-1 também se encontra no mesmo tecido em estudo⁽¹⁰⁹⁾.

1.6.3. Modificação estrutural e radiomarcagem da neurotensina

Um método alternativo para se decifrar os reais papéis dos NTRs seria através da modelagem e síntese de receptores seletivos agonistas⁽¹⁰⁸⁾. Como já mencionado, o fragmento hexapeptídico C-terminal, NT(8-13), contém os elementos essenciais necessários à alta afinidade pelo receptor da NTR-1^(94,110). Partindo destes preceitos, diversos análogos da NT(8-13) foram sintetizados, a fim de diminuir e/ou evitar o reconhecimento dos sítios de clivagem pelas proteases *in vivo*, consequentemente aumentando o $t_{1/2}$ biológico dos análogos, os tornando assim, fortes candidatos para a aplicação na rotina clínica.

Esforços consideráveis foram dispendidos relativos aos estudos de radiomarcagem da NT, com o objetivo de se entender melhor a sua interação com seus receptores e utilização como potencial agente diagnóstico e terapêutico. Assim, a síntese de diversos análogos utilizando diversos radionuclídeos para variadas aplicações foi realizada nas últimas décadas. O sumário dos análogos radiomarcados mais proeminentes nas últimas décadas está representada na [Tabela 2](#).

Ambos o peptídeo nativo NT e o análogo NT(8-13), não atravessam a barreira hematoencefálica quando administrados intravenosamente ou oralmente, e o relativo curto tempo de meia-vida de ambos promoveu uma busca por análogos cada vez mais metabolicamente estáveis. Análogos com ligação peptídica reduzida ($\Psi[\text{CH}_2\text{-NH}]$) da NT(8-13) mostraram um aumento na estabilidade, especialmente quando a ligação Arg⁸-Arg⁹ foi modificada^(111,112). Aliado a isso, outros estudos demonstraram que a modificação do hexapeptídeo NT(8-13) (1, N^qMeArg⁸-Lys-Pro-Try-Tle-Leu¹³, Tle = terc-leucina) promoveu uma acentuada ligação ao receptor da NT em intervalos nanomolares⁽¹¹⁰⁾.

Tabela 2. Sumário das estabilizações, radiomarcacão e aplicação dos análogos da NT mais promissores.

Análogo da NT ^a	Sequência	Radionuclídeo	t _{1/2} Plasmático ^b	Linhagem tumoral	Referência
NT nativa	pGlu-Leu-Tyr-Gly-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu	---	1,5 min	----	(87)
NT (2530)	DTPA-(Pip)Gly-Pro-(PipAm)Gly-Arg-Pro-Tyr-tBuGly-Leu	¹¹¹ In	N/A	HT-29	(113)
NT(2626)	DOTA-(Pip)Gly-Pro-(PipAm)Gly-Arg-Pro-Tyr-tBuGly-Leu	¹¹¹ In	N/A	HT-29	(113)
NT(8-13) dímero	Leu-Ile-Tyr-Pro-Arg-Arg-Glu-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu	¹⁸ F	N/A	HT-29	(114)
NT(8-13) tetramero	Leu-Ile-Tyr-Pro-Arg-Arg- (Glu-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu) ₃	¹⁸ F	N/A	HT-29	(114)
Demotensina 5	N ₄ -Ala-Arg-Dab-Pro-Tyr-Ile-Leu	^{99m} Tc	15 min	WiDr	(115)
Demotensina 6	N ₄ -Ala-Arg-Dab-Pro-Tyr-Tle-Leu	^{99m} Tc	N/A	WiDr	(115)
NT-II	(N ^o His)Ac-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu	^{99m} Tc	5,6 min	HT-29	(94,112)
NT-VI	(N ^o His)Ac-Lys-(ΨCH ₂ NH)-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu	^{99m} Tc	8 min	HT-29	(111)
NT-VIII	(N ^o His)Ac-(N-CH ₃)-Arg-Lys-Pro-Tyr-Tle-Leu	^{99m} Tc	16 d	HT-29	(111,112)
NT-X	(N ^o His)Ac-Arg-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu	^{99m} Tc	4,2 h	HT-29	(116)
NT-XI	(N ^o His)Ac-Lys-(ΨCH ₂ NH)-Arg-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu	^{99m} Tc	21 d	HT-29	(112)
NT-XII	(N ^o His)Ac-Arg-(N-CH ₃)-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu	^{99m} Tc	21 d	HT-29	(110, 116)
NT-XIII	(N ^o His)Ac-β ³ Arg-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu	^{99m} Tc	28 d	HT-29	(110)
NT-XVIII	(N ^o His)Ac-Lys(shikimic)-Arg-(N-CH ₃)-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu	^{99m} Tc	N/A	HT-29	(110)
NT-XIX	(N ^o His)Ac-Arg-(N-CH ₃)-Arg-Pro-Tyr-Tle-Leu	^{99m} Tc, ¹⁸⁸ Re	28 d	HT-29	(117)

^aDenominação atribuída aos análogos dependente de cada autor.

^bt_{1/2} *in vitro*.

N/A = não –apresentado.

Visando abordar melhor o papel biológico desempenhado pela NT, Garcia-Garayoa et al.⁽⁹⁴⁾ iniciaram os estudos de marcação de análogos da NT(8-13) com o núcleo organometálico de ^{99m}Tc ($[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$). Baseado em estudos prévios de marcação de análogos peptídeos com este núcleo organometálico⁽¹¹⁸⁾, variações do aminoácido histidina foram inseridos no sítio de ligação da biomolécula ao tecnécio. O grupo averiguou que as mudanças propostas não afetaram as propriedades de ligação e internalização da NT(8-13), verificando assim, que o ligante *retro-N^α*-carboxymetil-Histidina $[(\text{N}^\alpha\text{Hist})\text{Ac}]$ é o mais adequado para marcação do peptídeo ao complexo organometálico, conferindo uma maior estabilidade à ligação Arg⁸-Arg⁹.

Mais tarde, Garcia-Garayoa et al.⁽¹¹⁰⁾ propuseram uma estabilização de dois destes sítios (Arg⁸-Arg⁹ e Tyr¹¹-Ile¹²) baseados em estudos anteriores^(94,116), obtendo assim, diversos análogos. A dupla estabilização dos análogos demonstrou ser promissora, já que o grupo obteve uma maior estabilidade no plasma, aumento do tempo de meia-vida biológica e uma rápida depuração sanguínea quando comparados com NT(8-13) não-modificada, com especial relevância ao análogo NT-XII.

Recentemente, Garcia-Garayoa et al.⁽¹¹⁷⁾ relataram a caracterização *in vitro* e *in vivo* do análogo triplamente estabilizado NT-XIX. Apesar dos resultados obtidos terem sido similares àqueles observados ao análogo NT-XII, um maior $t_{1/2}$ *in vivo* foi encontrado.

Os resultados promissores obtidos forneceram a base para que outros grupos buscassem uma maior estabilidade dos análogos através de modificações dos sítios de degradação, e também incentivou a procura por métodos de marcação mais simples, rápidos e viáveis às radiofarmácias hospitalares.

1.7. Câncer de Mama

1.7.1. Estatísticas e fatores de risco associados ao câncer de mama

Segundo recente relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer/ Organização Mundial da Saúde (IARC)/OMS, o impacto global do câncer

dobrou em 30 anos. Estimou-se que no ano de 2008, ocorreriam cerca de 12 milhões de casos novos de câncer e sete milhões de óbitos⁽¹¹⁹⁾. Os cânceres mais incidentes neste período foram o câncer de pulmão (1,52 milhões de casos novos), mama (1,29 milhões) e cólon e reto (1,15 milhões). Em mulheres, o mais frequente foi o câncer de mama, seguido do colo do útero, cólon e reto, estômago e pulmão^(119,120).

No Brasil, as estimativas, para o ano de 2010, serão válidas também para o ano de 2011, e apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer. Dentre os tumores mais incidentes para o sexo feminino, destacam-se os de pele não melanoma (60 mil casos novos), mama (49 mil), colo do útero (18 mil), cólon e reto (15 mil) e pulmão (10 mil)⁽¹²¹⁾. Neste sentido, o câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres, correspondendo a cerca de 22% do total de novos casos⁽¹²¹⁾.

As diferenças globais das taxas de incidência de câncer de mama nos países são mutualmente afetadas pelas mudanças na prevalência do fator de risco e às tendências seculares no diagnóstico⁽¹²²⁾. Além dos fatores de risco associados à vida reprodutiva da mulher (FIG. 9), a idade continua sendo um dos mais agravantes. As taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos, e posteriormente o mesmo se dá de forma mais lenta. Essa mudança no comportamento da taxa é conhecida na literatura como "*Clemmesen's hook*", e tem sido atribuída à menopausa^(123,124).

Figura 9 - Fatores de risco associados à incidência de câncer de mama.

Fatores genéticos estão também associados ao maior risco de desenvolvimento de câncer de mama. Mulheres que apresentam mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2* têm 85% de chance de desenvolver câncer de mama antes dos 70 anos de idade⁽¹²⁵⁾. A presença ou ausência de receptores estrógeno, andrógeno e progesterona são de importância fundamental para o delineamento do regime terapêutico (químico ou hormonal) nos pacientes que apresentam esta malignidade, além da possível utilização destes receptores como marcadores para o diagnóstico em carcinomas mamários, já que estão presentes em cerca de 65% deste tumores. Estudos revelam que a taxa de remissão em pacientes com carcinomas mamários receptores estrógeno/progesterona positivos é de cerca de 50-65%, quando a terapia endócrina é empregada⁽⁷⁸⁾.

1.7.2. Modalidades de imagem utilizadas no diagnóstico de câncer de mama

Câncer de mama é a principal causa de cirurgia, quimioterapia e terapia guiada por raio-X. A avaliação prévia ao tratamento desta malignidade deveria determinar o estágio clínico da doença, incluindo o tamanho dos tumores primários, a presença de invasão da parede torácica, bem como, a ausência de metástase regional ou longínqua⁽¹²⁶⁾.

O diagnóstico de câncer de mama é baseado na exame física aliada à mamografia e à aspiração citológica ou biópsia. Apesar das principais vantagens associadas à utilização da mamografia (MM), esta técnica tem certas limitações na prática clínica. Sensibilidade, especificidade e acurácia são reduzidas neste tipo de exame para populações que apresentam mamas densas, histórico cirúrgico e implantes mamários, necessitando, portanto, de imagens diagnósticas adicionais para detecção de tal malignidade^(127,128).

O Ultrassom (US) é uma técnica de baixo custo e amplamente disponível, útil na diferenciação de cistos de massas sólidas, mas ainda insuficiente na diferenciação de lesões benignas de malignas⁽¹²⁹⁾. Consequentemente, um significativo número de biópsias cirúrgicas baseadas em mamogramas anormais é

realizado em lesões benignas, expondo os pacientes a riscos de morbidade, além dos custos associados aos procedimentos cirúrgicos.

Entre as modalidades adicionais de imagem utilizadas para melhorar a sensibilidade e especificidade da detecção do câncer de mama, a RMN e a mamocintilografia (SMM) têm gerado bons resultados. A RMN é útil em mulheres que apresentam resultados questionáveis em outras modalidades de imagem realizadas previamente, na avaliação pré-operativa de nodos e na invasão da parede torácica⁽¹³⁰⁾.

Embora a mamocintilografia (SMM) seja mais comumente realizada com ^{99m}Tc -sestamibi (^{99m}Tc -MIBI), radiofármacos com diferentes mecanismos de detecção de tumor mamário poderiam ser desenvolvidos, reforçando assim, o seu papel.

1.7.3. Radiofármacos utilizados na detecção de câncer de mama

Entre as técnicas adicionais utilizadas para melhorar a sensibilidade e especificidade na detecção do câncer de mama, a SMM têm sido uma ferramenta útil no mapeamento de lesões malignas. Diversos radiofármacos têm sido estudados com agentes tumorais em câncer de mama, tais como os emissores de fótons simples incluindo ^{99m}Tc -pertechnetato, ^{67}Ga -citrato, ^{201}Tl -cloreto, ^{111}In -pentetreotite, $^{99m}\text{Tc(V)}$ -DMSA ($^{99m}\text{Tc(V)}$ -ácido dimercaptosuccínico), ^{99m}Tc -metilenodifosfato, ^{99m}Tc -MIBI, ^{99m}Tc -tetrofosmina, ^{99m}Tc -exametazina, e outros ^{99m}Tc -anticorpos radiomarcados⁽¹³¹⁾. Dentre os acima mencionados, ^{99m}Tc -sestamibi e ^{99m}Tc -tetrofosmina já foram aprovados pelo órgão regulador “*Food and Drug Administration*” (FDA) na detecção de câncer de mama^(132,133).

Os mecanismos de ação dos radiofármacos ^{99m}Tc -MIBI ou ^{99m}Tc -tetrofosmina na detecção de tumores de mama ainda não é totalmente conhecido. ^{99m}Tc -tetrofosmina é um cátion lipofílico cujo mecanismo de captação celular ainda está sob investigação. Baseado nas analogias estruturais com o MIBI pensava-se que tetrofosmina difundia-se passivamente através das membranas em resposta aos potenciais trans-membrânicos, e, sua acumulação na mitocôndria acontecia provavelmente por um processo de armazenamento ativo, desempenhando uma similar acumulação cardíaca. Higley et al.⁽¹³⁴⁾ reportaram que o ^{99m}Tc -tetrofosmina,

apresentou maior depuração sanguínea, nos pulmões e fígado, quando comparado ao ^{99m}Tc -MIBI, fornecendo assim uma melhor qualidade nas imagens devido as altas razões tumor/órgãos não-específicos encontrada.

Embora os resultados gerais para ambos os radiofármacos MIBI e tetrofosmina tenham sido estimulantes na detecção de tumores de mama palpáveis e não palpáveis, os valores de sensibilidade e especificidade reportados na literatura ainda são discrepantes^(132,135,136). Recentemente, O'Connor et al.⁽¹³⁷⁾ reportaram uma sensibilidade de 82% para o radiofármaco ^{99m}Tc -MIBI na detecção de tumores mamários menores que 10 mm. A SMM também se mostrou mais precisa do que a MM no diagnóstico de tumores mamários recorrentes⁽¹³³⁾.

Nas últimas décadas, o crescente interesse no desenvolvimento de métodos de imageamento de câncer de mama utilizando técnicas de Medicina Nuclear tem sido evidente. Recentemente, a utilização do 2-desoxi-2-D-glucose radiomarcado com flúor-18 (^{18}F -FDG) tem sido amplamente explorada para detecção de câncer de mama. No entanto, desvantagens como o alto custo desta modalidade de mapeamento e as similares taxas de captação tumoral encontrada frente a outras técnicas pré-existentes em Medicina Nuclear (isto é, SPECT e/ou SPECT/CT) são fatores limitantes à sua aplicabilidade na rotina clínica⁽¹³⁸⁾.

Finalmente, o conjunto de técnicas de mapeamento nas atuais clínicas hospitalares utilizadas para o diagnóstico e estadiamento do câncer de mama, tais como a mamografia, US, RMN, CT, mapeamento dos ossos, ^{18}F -FDG - PET/CT, fornecem valiosas informações da extensão da doença e resposta ao tratamento, porém são relativamente não-específicos. Métodos funcionais, bem como o desenvolvimento de moléculas mais específicas têm sido foco dos atuais grupos de pesquisa, almejando obter, informações mais precisas, precoces e sensíveis na detecção do câncer de mama.

2. JUSTIFICATIVA

O câncer de mama é a segunda causa de óbitos por câncer em mulheres, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o que justifica o desenvolvimento de novos fármacos voltados ao diagnóstico precoce destes tipos de tumores malignos de elevada expressão clínica.

Como demonstrado, existem peptídeos com elevada especificidade para receptores tumorais, capazes de gerar importantes agentes diagnósticos caso adequadamente processados para marcação com radionuclídeos. Ao mesmo tempo, intermediários para marcação indireta cada vez mais inteligentes e quimicamente bem formulados são ensaiados, com o propósito de oferecer opções de ligação molecular.

Neste sentido, a classe de peptídeos regulatórios, como a Neurotensina, vem ganhando atenção por representar uma gama de funções fisiológicas, e consequentemente, por participar ativamente de diversos processos no organismo, como o crescimento tumoral.

Em particular, não foram encontradas na literatura investigações do fragmento do peptídeo NT(8-13) modificado que iremos utilizar, conjugados aos agentes quelantes bifuncionais HYNIC e NHS-MAG₃ radiomarcados com ^{99m}Tc. Aliado a isso, estudos bioquímicos na literatura apontam para a relação entre os receptores da neurotensina tipo -1 e a linhagem celular de mama MDA-MB-231. Entretanto, outros estudos deste peptídeo, radiomarcado por técnicas diferentes, demonstraram resultados promissores, motivando a realização do presente protocolo.

3. OBJETIVOS

O objetivo principal do trabalho concentrou-se no estudo comparativo da influência dos agentes quelantes bifuncionais 6-hidrazinonicotinamida (HYNIC) e S-acetil-mercaptoacetiltriglicina (MAG₃), no comportamento *in vitro* e *in vivo* do análogo da Neurotensina(8-13) radiomarcado com ^{99m}Tc, em células tumorais de mama da linhagem MDA-MB-231.

O estudo abrange a realização de todos os procedimentos que definam a obtenção dos radiofármacos sob o ponto de vista radioquímico.

As etapas desenvolvidas para atingir tais objetivos são:

- 1) Radiomarcagem da NT e avaliação radioquímica dos análogos radiomarcados.
- 2) Avaliação da estabilidade radioquímica dos complexos radiomarcados até o período de seis horas relativo ao tempo de meia-vida do radioisótopo.
- 3) Avaliação da estabilidade *in vitro* aplicando ensaios de transquelação frente à cisteína e ao tripeptídeo glutatona, ensaios de internalização/externalização, saturação e estudos de estabilidade metabólica.
- 4) Estudo de biodistribuição em camundongos saudáveis e portadores de tumor para a linhagem tumoral de mama MDA-MB-231.
- 5) Aquisição de imagem cintilográfica dos camundongos portadores de tumor em diferentes tempos.

4. MATERIAIS

4.1. Equipamentos

- Agitador de tubos, AP56 – Phoenix, Brasil;
- Aquecedor Thermomixer comfort R (0-100°C)- Eppendorf®, EUA;
- Balança analítica, M-220 – Denver Instruments, EUA;
- Bomba de vácuo, 825 T – Fisaton, Brasil;
- Calibrador de doses, CRC-15R – Capintec Inc., EUA;
- Capela com sistema de exaustão – BRASLAB Equipamentos para Laboratório Ltda, Brasil.
- Centrífuga, HIMAC-CF 7D2 – HITACHI, EUA;
- Contador de radioatividade automático com cristal NaI(Tl) tipo poço, D5002, cobra II, auto-gamma, A. Packard, Camberra, EUA;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) Waters 600 com detector UV/VIS – Waters, Tunable Absorvance Detector e detector de radiação Radiomatic Flo-one – Packard, EUA;
- Estufa, Orion 515 – Farrem, Brasil;
- Freezer vertical com temperatura de -70 °C – Eletrolab, Brasil;
- Gama-câmara equipada com os seguintes módulos:
 - Colimador – Mediso, Hungria.
 - Detector Gama - Mediso, Hungria.
 - Software Console TH22 v.7.02 – Mediso, Hungria.
- Máquina de gelo em escama, EGE 300M, Everest Refrigeração Ltda., Brasil;
- Medidor de pH, DM-31 – Digimed, Brasil;
- Purificador de água Ellix acoplado a sistema de purificação MilliQ, EUA;
- Refrigerador Biflex 450 L Frostfree, Biflex 450 – Cônsul, Brasil;

- Software InterviewXP® v1.05.014 – Mediso, Hungria.

4.2. Materiais

- Capilares de 1 mL– Microcaps, EUA;
- Coluna de separação de fase reversa para CLAE, Symetry®C18 (RP-C18), 4,6 x 250 mm, 5µm – Waters, EUA.
- Colunas de exclusão molecular PD-10, Sephadex G-25 – Amershan, Biosciences, Suíça.
- Fitas cromatográficas ITLC-SG (*Instant Thin Layer Chromatography - Silica Gel*), 5 x 20 cm – Pall Corporation, EUA;
- Membranas filtrantes 0,22 µm - Millipore®, EUA;
- Pipetas automáticas de 10, 100, 1000 e 5000 µL – Eppendorf®, EUA;
- Placas de 6 e de 12 poços, estéreis- Corning Incorporated®, EUA;
- Repeteador automatico Multipette® plus – Eppendorf®, EUA;
- Seringas de 1, 3 e 5 mL – B&D, EUA;
- Seringas de insulina de 1,0 mL– B&D, EUA;
- Tubos de fundo cônico de 15 mL – Corning Incorporated®, EUA;
- Tubos reacionais de 1,5 mL, transparentes, mono-poliméricos, Scientific® (MCT-150-C)- Axygen, EUA;
- Vidrarias em geral e instrumentos cirúrgicos.

4.3. Reagentes

- Acetato de amônio, grau de pureza 99% – Sigma Aldrich, EUA;
- Acetonitrila, grau de pureza p.a. – Merck, Alemanha;
- Ácido ascórbico, grau de pureza 99% – Sigma Aldrich, EUA;
- Ácido clorídrico, grau de pureza 37% p.a. – Merck, Alemanha;
- Ácido etileno-N',N'-diaminodiacético (EDDA), grau de pureza 99,99% – Sigma Aldrich, EUA;
- Ácido tricloroacético – Sigma Aldrich, EUA;
- Ácido trifluoroacético, grau de pureza p.a. – Merck, Alemanha;

- Análogo da neurotensina conjugado aos agentes quelantes bifuncionais 6-hydrazinonicotinamida (HYNIC) e S-acetilmercaptotriglicina (S-acetil-MAG₃) – piChem, Áustria.
- Bicarbonato de sódio, grau de pureza 99% - Sigma Aldrich, EUA;
- Células da linhagem tumoral de mama MDA-MB-231- American Type Culture Collection – ATCC, EUA.
- Cisteína, grau de pureza 98% – Sigma Aldrich, EUA;
- Cloreto estanoso dihidratado – Merck, Alemanha;
- 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;
- Glicina – Sigma Aldrich, EUA;
- Glutathione, grau de pureza 99% – Sigma Aldrich, EUA;
- Heparina (Liquemine®), solução 5000 U.I./mL – Roche, Brasil;
- Hidróxido de amônio – Sigma Aldrich, EUA;
- Meio de cultura RPMI, estéril, suplementado com L-glutamina - Cultilab®, Brasil.
- Metiletilcetona, grau de pureza p.a – Merck, Alemanha;
- Octanol, grau de pureza p.a. – Merck, Alemanha;
- Peptídeo Neurotensina(8-13) não-modificada – piChem, Áustria.
- Radioisótopo tecnécio-99m, obtido do gerador molibdênio-99/tecnécio-99m produzido na Diretoria de Radiofarmácia (DIRF) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP), Brasil;
- Solução de antibiótico e antimicótico para cultura celular – Gibco®, EUA.
- Solução de Tripsina/EDTA 0,25% - Gibco®, EUA.
- Solução fisiológica estéril (cloreto de sódio) 0,9% – Equiplex, Brasil;
- Soro Fetal Bovino - Gibco®, EUA.
- Tartarato disódico dihidratado – Riedel-de Haen®, Alemanha;
- Tricina, grau de pureza 99,99% – Sigma Aldrich, EUA;
- Uretana, grau de pureza 99% – Sigma Aldrich, EUA

4.4. Animais

- Camundongos sadios da espécie *Swiss* – Biotério IPEN/CNEN-SP, Brasil;
- Camundongos da espécie *Nude* – Biotério IPEN/CNEN-SP, Brasil;

5. MÉTODOS

5.1. Eluição do radioisótopo ^{99m}Tc

O radioisótopo tecnécio-99m foi eluído de um gerador molibdênio-99/tecnécio-99m ($^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$), fornecido pelo IPEN/CNEN-SP, em solução de cloreto de sódio 0,9% na forma de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$). A atividade foi medida em calibrador de dose padronizado para ^{99m}Tc . Diluições do pertecnetato de sódio foram realizadas de acordo com a atividade e o volume utilizado no estudo. As determinações de pureza química, radioquímica e radionuclídica, assim como o rendimento do gerador, foram determinados pela Divisão de Controle de Qualidade da Diretoria de Radiofarmácia (DIRF). Controles de esterilidade e apirogenicidade também foram realizados pela mesma equipe.

5.2. Diluição das biomoléculas

Os sais das biomoléculas HYNIC- β Ala-NT(8-13), S-acetil-MAG₃- β Ala-NT(8-13) e NT(8-13) não-modificada, de peso molecular 1037,2; 1189,3 e 830,7 g/mol, respectivamente, foram dissolvidos na concentração de 1mg/1mL, em água estéril. Após a dissolução, pequenas alíquotas foram distribuídas em tubos Eppendorf® e congeladas em freezer a -20 °C até o momento do seu uso.

5.3. Marcação dos análogos da NT(8-13)

5.3.1. Marcação do conjugado HYNIC- β Ala-NT(8-13) (HYNIC-NT)

O procedimento de radiomarcagem do conjugado HYNIC-NT foi realizado seguindo-se o protocolo de Faintuch et al.⁽¹³⁹⁾. Inicialmente, 20 mg de tricina e 5 mg de EDDA foram pesados em um tubo Eppendorf® e dissolvidos em 500 μL de uma solução tampão fosfato 0,1M (pH= 7,4), previamente nitrogenada. Em seguida, adicionou-se 10 μL (0,96 mM) do análogo HYNIC-NT, 8,9 mM de uma solução de

cloreto estanoso ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) em ácido clorídrico (HCl) (0,1M), previamente nitrogenada e 500 μL de pertecnetato de sódio ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$) com atividade variando entre 74 a 3700 MBq, de acordo com o estudo realizado. Após agitação, a mistura reacional foi aquecida durante 20 minutos a 100 °C. Após resfriamento, o volume foi completado para 1,5 mL com solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9%, previamente nitrogenada.

5.3.2. Marcação do conjugado S-acetil-MAG₃- β Ala-NT(8-13) (MAG₃-NT)

O procedimento de radiomarcção do conjugado MAG₃-NT foi realizado seguindo-se o protocolo de Wang et al.⁽⁵⁷⁾ Previamente foram preparadas as soluções tampão de marcação e a solução de HCl-ácido ascórbico, para que a realização da radiomarcção diária fosse facilitada, sendo as mesmas, estocadas à temperatura de 4-8 °C por no máximo dois meses.

Para o preparo da solução tampão de marcação misturou-se, na mesma proporção, soluções aquosas de 0,5M de bicarbonato de sódio, 0,25M de acetato de amônio e 0,18M de hidróxido de amônio. O pH final foi ajustado entre 8,5-9,0 com adição de uma solução de HCl (1N). Em seguida dissolveu-se tartarato disódico dihidratado a uma concentração de 50 mg/mL, obtendo-se assim o tampão tartarato.

Para o preparo da solução de HCl-ácido ascórbico dissolveu-se o ácido ascórbico em uma solução de HCl (10 mM) à concentração de 1 mg/mL.

Em um tubo Eppendorf® foi adicionado 10 μL (0,84 mM) da biomolécula conjugada a uma solução combinada contendo 45 μL (0,25 M) de acetato de amônio, 15 μL de tampão tartarato, e 5 μL de uma solução de cloreto estanoso em HCl-ácido ascórbico (4 mg/mL), todas previamente nitrogenadas. O pH final da solução estava no intervalo de 8,5 e 9,0. Após agitação, adicionou-se não mais que 300 μL de $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ com atividade variando entre 74 e 3700 MBq. Novamente a solução foi agitada e então aquecida durante 20 minutos a 100 °C. Após resfriamento, o volume foi completado para 1,5 mL com solução de NaCl 0,9%, previamente nitrogenada.

5.4. Avaliação radioquímica dos conjugados radiomarcados

A avaliação radioquímica foi realizada por Cromatografia de Camada Delgada ascendente em fitas de sílica gel (ITLC-SG) e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os experimentos foram realizados em triplicata.

Na primeira técnica, as fitas foram dimensionadas com 14 cm de altura e 1,5 cm de largura, sendo a amostra aplicada a 1,5 cm do ponto de origem com auxílio de uma seringa. Em seguida, as amostras foram suspensas verticalmente com a extremidade inferior imersa nas fases móveis metiletilcetona (MEC) e solução aquosa de acetonitrila (ACN) (50%). Os solventes ascenderam pela fase sólida por capilaridade por 10 cm através da fita. Depois de secas, as fitas foram cortadas em segmentos de 1 cm e colocadas em tubos para contagem da radiação- γ em detectores de NaI (TI) tipo poço.

O cálculo de pureza radioquímica foi determinado em porcentagem da atividade de cada espécie radioquímica em relação à atividade total da fita, sempre de acordo com o fator de retenção (R_f) correspondente (TAB. 3).

Tabela 3. Fase móvel e respectivos fatores de retenção das diferentes espécies radioquímicas.

Fase Móvel	MEC	ACN 50%
R_f		
0	$^{99m}\text{TcO}_2$ + produto	$^{99m}\text{TcO}_2$
1	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$^{99m}\text{TcO}_4^-$ + produto

Na segunda técnica (CLAE), como fase estacionária utilizou-se uma coluna de fase reversa C-18, e como fase móvel uma solução constituída de solução (A) de ácido trifluoracético (TFA) 1% em água bidestilada (v/v) e uma solução (B) de ácido trifluoracético 1% em acetonitrila (v/v). O gradiente inicial utilizado foi de 95% A e 5% B até o tempo de 1 min. No intervalo de 1 a 25 min, a proporção dos solventes foi alterada linearmente para 30% A e 70% B. A partir de 26 min e até o final da corrida (30 min), a proporção foi modificada, linearmente,

para 95% A e 5% B. Foi injetado um volume de 10 μ L da amostra utilizando um fluxo de 1 mL/min.

5.5. Estabilidade radioquímica dos análogos radiomarcados

A estabilidade dos análogos radiomarcados foi avaliada à temperatura ambiente nos tempos zero (controle), seis e 24 horas após seu preparo. Para tal finalidade, a pureza radioquímica foi quantificada por cromatografia de camada delgada (ITLC-SG), seguindo o mesmo procedimento descrito no item 4.4.

5.6. Estabilidade radioquímica dos análogos radiomarcados em função da cisteína e glutathiona

A estabilidade radioquímica, frente ao aminoácido cisteína e ao tripeptídeo glutathiona, foi verificada preparando-se soluções aquosas destes aminoácidos nas razões molares 1000:1, 100:1, 10:1 e 1:1 mM (agente transquelante:peptídeo). Alíquotas de 100 μ L destas soluções foram misturadas a 100 μ L dos análogos radiomarcados em tubos Eppendorf®. Todos os tubos, incluindo o controle contendo apenas o complexo e água bidestilada, foram agitados e colocados sob aquecimento a 37 °C por 4 horas. A avaliação radioquímica foi efetuada por cromatografia de camada delgada, seguindo-se o mesmo procedimento descrito no item 4.4.

5.7. Determinação da lipofilicidade dos análogos radiomarcados

A determinação da lipofilicidade dos análogos radiomarcados foi realizada por meio do teste de coeficiente de partição (P), utilizando n-octanol como solvente orgânico e água como solvente aquoso⁽¹⁴⁰⁾.

Uma alíquota de 100 μ L do complexo radiomarcado foi adicionada em tubos de fundo cônico contendo 1 mL de n-octanol e 1 mL de água. A mistura foi homogeneizada e, com a finalidade de se separar as duas fases (aquosa e orgânica), centrifugado à 1,877xg durante 1 min à temperatura ambiente. Após a centrifugação e repouso, foram pipetados cuidadosamente, em triplicata, 100 μ L de

cada fase e colocados em tubos para a contagem da atividade. O coeficiente de partição (P) foi calculado de acordo com a equação 1 e expresso em log P.

$$\text{Log}P = \frac{\text{cpm}(\text{octanol})}{\text{cpm}(\text{água})} \quad (1)$$

onde: cpm = contagem por minuto

5.8. Estudo *in vitro* de ligação às proteínas plasmáticas (LPP)

Os estudos *in vitro* de ligação às proteínas plasmáticas para os complexos radiomarcados foram realizados pelo método de precipitação⁽¹⁴¹⁾. Amostras de aproximadamente 0,5 mL de sangue foram coletadas de camundongos sadios da linhagem *Swiss* (anestesiados), 5 minutos após a administração do radiocomposto. As alíquotas foram transferidas para tubos de fundo cônico, previamente heparinizados, e o experimento realizado em triplicata. As amostras de sangue foram centrifugadas por 15 minutos (1,877xg) à temperatura ambiente, permitindo assim a coleta do plasma. A 200 µL do plasma adicionou-se 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) e incubou-se por 30 minutos em banho de gelo. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos (2,815xg) à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e o procedimento repetido por mais duas vezes. Após a última centrifugação, o precipitado foi reservado e a radioatividade mensurada no contador de NaI (TI) tipo poço concomitantemente à amostra referência (cpm_{total}), que corresponde ao plasma intacto (200 µL). A porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas de cada conjugado radiomarcado foi calculada de acordo com a equação 2.

$$\% \text{ Ligação às proteínas plasmáticas} = \frac{\text{cpm}_{\text{precipitado}}}{\text{cpm}_{\text{total}}} \times 100 \quad (2)$$

onde: cpm_{total} = cpm_{plasma intacto}

5.9. Avaliação *in vitro* e *in vivo* da estabilidade metabólica

Os estudos *in vitro* e *in vivo* de estabilidade metabólica foram realizados segundo o protocolo de Rehling⁽¹⁴²⁾ com algumas modificações. Primeiramente, as colunas PD-10 foram equilibradas com água destilada seguindo orientações do fabricante. Uma solução de albumina de soro humano (HSA) a 1% foi preparada, para subsequente realização dos experimentos. A HSA foi radiomarcada utilizando 10 µL da solução de HSA, 10 µL de uma solução 8,9 mM de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 100 µL $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ com atividade aproximada de 370 MBq. Perfis cromatográficos nas colunas PD-10 foram traçados para as espécies [HYNIC-NT(8-13), MAG_3 -NT(8-13) e HSA] radiomarcadas. Cada fração (1,0 mL/fração), somando um total de 30 frações, foi coletada em tubos de polipropileno e a atividade de cada tubo mensurada em contador de NaI tipo poço.

A) Avaliação *in vitro* frente a albumina de soro humano

Para realização dos estudos *in vitro*, a HSA foi incubada com os análogos radiomarcados, na proporção de 1:1 (v/v) a 37°C por 90 min, totalizando um volume de 200 µL. Após incubação, 80 µL das misturas reacionais foram eluídas com água destilada nas colunas PD-10 previamente equilibradas. As frações foram coletadas e a atividade mensurada como descrito anteriormente.

B) Avaliação *in vivo* nas proteínas plasmáticas

Já para as análises *in vivo*, a coleta do sangue foi realizada nos tempos de 5, 30, 60 e 90 min pi dos radiocomplexos, e para obtenção do plasma os mesmos procedimentos descritos no item 4.8 foram conduzidos. 80 µL das amostras foram eluídas em colunas PD-10, utilizando água como eluente. As frações foram coletadas e a atividade mensurada como descrito anteriormente.

5.10. Estudos *in vitro*: ensaios com células

5.10.1. Cultivo celular

Células humanas da linhagem tumoral de mama MDA-MB-231 foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. O cultivo foi realizado em garrafas (próprias para o cultivo celular) sob atmosfera de 5% CO₂ a 37°C. Após atingirem a confluência, as células tumorigênicas foram então tripsinizadas, centrifugadas (5 min a 100xg) e ressuspensas em tampão fosfato-salina (PBS, pH=7,4). Para a realização dos ensaios em placas de saturação, internalização e externalização as células foram ressuspensas em meio de cultura contendo 1% de soro fetal bovino (SFB), e então semeadas em placas a uma concentração final de 1x10⁶ células/poço. O volume final para as placas de seis e doze poços foram de 2 e 1 mL, respectivamente. Já, para a inoculação nos animais, após ressuspensão em PBS, alíquotas de 100 µL contendo o número de células desejadas foram preparadas.

5.10.2. Ensaios de saturação

Os ensaios de saturação medem a captação específica medida através da interação do receptor com o radioligante. Os experimentos foram conduzidos segundo o protocolo de Bigott-Hennkens et al.⁽¹⁴³⁾. Células da linhagem MDA-MB-231 foram semeadas em placas de 12 poços a uma concentração de 1 x 10⁶ células/poço conforme procedimento descrito no item 4.10.1. No dia do experimento, os poços foram lavados duas vezes com meio de cultura gelado, e concentrações crescentes do respectivo análogo modificado não-radiomarcado foram adicionados nos poços em análise até que a concentração final do peptídeo ([frio] + [radiomarcado]/poço) atingisse um intervalo entre 0-90 nM. Sete diferentes concentrações foram utilizadas, e adicionalmente, poços-controle também foram avaliados através da adição do análogo frio não modificado (1µM). Após uma hora de incubação a 37 °C, o meio de cultura foi descartado, e então os poços foram lavados por uma vez com PBS gelado, uma vez com tampão glicina (50 mM glicina-

100 mM HCl/100 mM NaCl, pH= 2,8) por cinco minutos e a radioatividade associada à célula recuperada através da adição de NaOH (1N). Os cálculos foram realizados através da plotagem (Equação 3) das concentrações das soluções preparadas dos análogos ([frio] + [radiomarcado]/poço) (pM) adicionadas para cada triplicata vs. concentração da ligação específica (pM). Os gráficos foram obtidos utilizando o software CurveExpert® versão 1.4 e os valores de B_{máx} e K_d representados na faixa nM por convenção.

$$\text{Ligação específica} = B_{\text{máx}} \times \left(\frac{[L]}{[L] + K_d} \right) \quad (3)$$

onde: B_{máx} representa o número total de receptores expressos nas células; [L] representa a concentração ([frio] + [radiomarcado]/poço) adicionada em cada poço e K_d representa a constante de dissociação no equilíbrio.

5.10.3. Internalização e externalização

Os ensaios de internalização e externalização dos análogos ^{99m}Tc-AQB-NT(8-13) foram realizados utilizando-se o protocolo de Garcia-Garayoa et al.⁽¹¹¹⁾ com algumas modificações. Para ambos os experimentos, no dia anterior ao ensaio, as células MDA-MD-231 (em confluência) foram colocadas em placas de seis poços com meio de cultura (1% de SFB), permitindo assim, a fixação celular nos poços. No dia do experimento, foram realizadas duas lavagens com meio de cultura gelado, e em seguida, uma pré-incubação (2 horas a 4°C) contendo excesso do análogo NT(8-13) (1 µM) não-radiomarcado nos poços controle, a fim de avaliar a ligação não-específica. Após a pré-incubação, os poços foram lavados novamente com meio de cultura e os radioconjugados adicionados (aproximadamente 4kBq/poço).

Nos ensaios de internalização, após a adição dos radiocomplexos, as placas foram incubadas em meio de cultura por 5, 30, 60, 90 e 120 minutos a 37 °C. Em seguida, as placas foram retiradas da incubação, o meio de cultura descartado e as células lavadas duas vezes com PBS gelado, a fim de descartar o peptídeo não ligado. A atividade associada à superfície celular foi recuperada por uma lavagem

ácida de 5 minutos com tampão glicina (50 mM glicina- 100 mM HCl/100 mM NaCl, pH= 2,8) à temperatura ambiente, e a atividade foi recolhida em tubos de polipropileno. Finalmente, a quantidade do peptídeo internalizada foi recuperada pela solubilização das células com NaOH (1N), e as radioatividades associadas a superfície celular e internalizada mensuradas em contador de NaI(Tl) tipo poço. Os resultados foram expressos como a porcentagem da máxima atividade associada à célula (superfície celular + internalizada).

Os ensaios de externalização foram realizados utilizando-se como referência a máxima internalização dos radiocomplexos (30 minutos). Logo, após adição dos conjugados radiomarcados e posterior incubação durante 30 minutos, as células foram lavadas por duas vezes com meio de cultura e re-incubadas pelo período de 30, 60 e 90 minutos a 37 °C. Posterior à incubação, o meio de cultura foi coletado nos diferentes tempos da análise, as células lavadas uma vez com PBS gelado, a radioatividade associada à superfície recuperada através de uma lavagem ácida com tampão glicina (5 minutos) e a radioatividade internalizada coletada através da lavagem com NaOH (1N). As atividades, liberada e associadas à célula (superfície + internalizada), foram mensuradas em contador gama tipo poço. Os resultados foram expressos como porcentagem da atividade retida na célula em cada tempo estudado.

5.10.4. Inoculação das células tumorais em camundongos *Nude*

As células de tumor de mama da linhagem MDA-MB-231 foram inoculadas em camundongos *Nude*, subcutaneamente no dorso superior direito, com uma suspensão de células contendo 5×10^6 células/0,1 mL. Após uma semana, o acompanhamento do crescimento tumoral foi realizado a cada três dias e os estudos realizados quando os tumores sólidos apresentarem-se visíveis, palpáveis e atingirem um tamanho de aproximadamente 1 cm de diâmetro. O tempo estimado de desenvolvimento do tumor nos camundongos ficou compreendido entre duas a três semanas.

5.11. Análise *in vivo* dos análogos radiomarcados

Os estudos de biodistribuição *in vivo* dos conjugados radiomarcados foram realizados com aprovação do Comitê de Ética (24/CEPA-IPEN-SP).

Em todos os estudos os camundongos foram pesados, a droga injetada pela veia caudal e sacrificados após um tempo determinado. Para ambos os estudos, a radioatividade da droga administrada variou entre 37-74 MBq/0,1mL.

Após a eutanásia, os tecidos e órgãos (sangue, coração, pulmão, rins, baço, estômago, pâncreas, fígado, intestino grosso e delgado, músculo, osso e tumor) de todos os camundongos foram retirados, pesados e colocados em tubos para que a sua atividade radioativa fosse mensurada em contador do tipo poço de NaI(Tl).

O padrão foi preparado com o mesmo volume de droga administrada nos camundongos, e colocado para a contagem da atividade no mesmo momento em que a atividade dos órgãos foi mensurada. As porcentagens de dose injetada por órgão (%DI/órgão) e por grama (%DI/g) de todos os órgãos avaliados foram calculadas considerando o padrão como 100% da dose administrada aos camundongos e os experimentos conduzidos considerando um número amostral de seis animais por tempo estudado.

5.11.1. Biodistribuição em camundongos sadios

Os estudos de biodistribuição *in vivo* foram realizados em camundongos da raça *Swiss*, com massa corpórea entre 20 e 30 gramas, nos tempos de 5, 30, 60, 90, 120, 360 e 1440 minutos após administração das drogas. A porcentagem de dose injetada no sangue total foi calculada para uma volemia de 6,5% do peso corpóreo do animal multiplicado pela %DI/mL de cada tempo estudado. A porcentagem de dose injetada (%DI) do músculo e do osso total foi calculada assumindo, respectivamente, um volume de 40% e 10% do peso corpóreo. Os valores de corpo inteiro foram obtidos através da soma das %DI/órgão de todos os órgãos retirados (considerando os valores obtidos através dos cálculos de sangue, músculo e osso totais) e a atividade excretada estimada indiretamente através da

diferença entre a dose injetada e os valores obtidos de dose retida em todos os órgãos/tecidos para cada tempo.

5.11.2. Biodistribuição em camundongos portadores de tumor

Os estudos em modelo tumoral foram realizados em camundongos *Nude*, fêmeas e com massa corpórea entre 15 e 20 gramas e idade aproximada de oito semanas. Após o desenvolvimento tumoral, os camundongos foram submetidos ao estudo invasivo nos tempos de 30 e 90 minutos pós-injeção (pi) das drogas.

Os estudos de bloqueio foram realizados com a finalidade de avaliar a especificidade dos análogos radiomarcados em camundongos portadores de tumor mamário da linhagem MDA-MB-231. Para esta avaliação, os camundongos receberam a mesma quantidade dos conjugados radiomarcados com concomitante injeção de 115 nmol/0,1 mL do análogo peptídico NT(8-13) frio e não-modificado.

5.12. Aquisição de imagens cintilográficas

Imagens planares de γ -câmara foram obtidas com uma câmara móvel de cintilação (LEM Siemens) equipada com um colimador de 4.0-mm. Uma seringa, contendo a mesma dose administrada aos camundongos, foi escaneada concomitantemente ao procedimento de aquisição das imagens, permitindo assim, a semi-quantificação dos resultados através da criação de regiões de interesse (ROI). As aquisições das imagens foram realizadas nos tempos de 30 e 90 minutos pi, em animais não-bloqueados, previamente anestesiados com solução de uretana. Um total de 500.000 contagens foram obtidas por projeção sob uma matrix 64X64.

5.13. Análise estatística

Para análise dos resultados de biodistribuição em animais sadios, um planejamento fatorial multi-níveis foi utilizado como ferramenta estatística para determinar a influência das três variáveis sob análise: AQB (HYNIC e MAG₃), órgãos de interesse e tempos de sacrifício nos estudos de biodistribuição em animais sadios, bem como suas interações na captação do radiocomposto. Seis

animais foram utilizados nas dezesseis combinações avaliadas (dois AQB e oito tempos de sacrifício).

Diferenças entre os níveis considerados para cada variável foram detectadas utilizando o teste de Tukey. O nível de significância (α) para todos os testes estatísticos foi de 0,05. O planejamento experimental e a análise estatística foram realizados com o programa computacional Statgraphics Plus (Statistical Graphics Co., Rockville, MD, EUA).

Nos estudos de biodistribuição em animais portadores de tumor, os resultados foram expressos como a média da %DI/g $\pm$ desvio padrão (DP), analisados pelo teste-*t* de “Student” não-pareado, assumindo um valor de nível de significância (valor de *p*) menor que 0,05. A hipótese do teste foi formulada assumindo iguais variâncias:

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 \text{ (hipótese nula)}$$

$$H_i : \mu_1 > \mu_2 \text{ (hipótese alternativa)}$$

onde, μ_1 corresponde a média das variáveis dos camundongos não-bloqueados, μ_2 corresponde a média das variáveis de camundongos bloqueados.

Para análise da variabilidade obtida na captação tumoral foi utilizada a metodologia estatística de mínimos quadrados parciais. Para tal finalidade, foi utilizado o programa computacional SIMCA-P (UMETRICS, versão demo 11.0 – Suécia). O conjunto de dados que foi analisado com esta técnica estatística, corresponde a um número amostral de 52 animais formando uma tabela subdividida em duas matrizes (matrizes das variáveis independentes e dependentes). A avaliação consistiu na redução do número de dimensões para posterior avaliação dos dados amostrais, buscando vetores (também denominados de componentes principais), que consequentemente, explicam a variabilidade dos resultados através da posição e magnitude dos fatores em análise. A análise dos dados baseados nessa técnica multivariada considerou:

1. Gráfico de cargas: para estimar a relação das variáveis [peso do tumor, tempo pi do radiocomposto, porcentagem da dose retida na cauda, análogo radiomarcado (via agente quelante bifuncional HYNIC ou MAG₃) e presença ou ausência do bloqueio] sobre as variáveis resposta %DI e %DI/g tumoral, bem como sua magnitude. Para análise do gráfico bidimensional obtido foram traçadas uma

linha principal ou referência passando pela origem, dividindo dois quadrantes opostos pela metade. Em seguida, projeções das variáveis sobre a linha de referência foram traçadas. Considerou-se variáveis de importância estatística aquelas distantes da linha de projeção. Também foi estimada a relação de cada variável independente através da influência direta ou inversa com as captações tumorais, ou seja, projeções dos fatores no mesmo quadrante significam relação direta, e em quadrantes diferentes, significam relação inversa.

2. Análise da importância das projeções nas variáveis (IPV) nos componentes principais: foi utilizada para mensurar a influência isolada de cada fator sobre as variáveis resposta (%DI e %DI/g tumoral). A análise foi realizada considerando que a soma dos quadrados de todas as variáveis é igual ao número de termos no modelo da projeção, logo, a média dos IPV foi considerada como sendo 1. Assim, variáveis com importância significativa no modelo, correspondem àquelas em que os intervalos de confiança não cortam o eixo das abcissas.

3. Gráfico biplot: através da junção dos gráficos de cargas e de marcas (isto é, representação das amostras nos componentes principais), a diferença entre os conjuntos das amostras em análise foi inter-relacionada com as variáveis sob estudo, obtendo-se a causa das diferenças amostrais individualmente. Esta análise foi realizada considerando-se a proximidade ou distância das amostras em relação às variáveis utilizadas no modelo. Assim, a proximidade da amostra em relação à variável significa que ambas estão diretamente correlacionadas, e a distância significa que estão indiretamente correlacionadas. A análise do gráfico bidimensional foi conduzida da mesma forma que àquela realizada no gráfico de cargas.

6. RESULTADOS

6.1. Eluição do radionuclídeo

As atividades dos geradores de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ utilizados variaram entre 18,5 GBq (500 mCi) e 37 GBq (1000 mCi). O rendimento médio dos geradores utilizados foi superior a 97%, a pureza radioquímica na forma de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^- \geq 98\%$, a concentração de alumínio inferior a 10 ppm, e a atividade de $^{99}\text{Mo} < 0,15 \text{ kBq/MBq } ^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Os resultados das análises de esterilidade e pirogenicidade foram sempre negativos quanto à presença de contaminantes. Estes dados foram determinados pelo controle de qualidade da Diretoria de Radiofarmácia (IPEN/CNEN-SP).

6.2. Radiomarcção e avaliação radioquímica dos análogos radiomarcados HYNIC- $\beta\text{Ala-NT(8-13)}$ e S-acetil-MAG₃- $\beta\text{Ala-NT(8-13)}$

A máxima atividade específica alcançada foi de 383 e 439 MBq/nmol, e a eficiência de marcação dos análogos radiomarcados obtida através da cromatografia de camada delgada foram $98,8 \pm 0,62\%$ e $99,5 \pm 0,36\%$, respectivamente, para os radiocomplexos $^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC-NT(8-13)}$ e $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-NT(8-13)}$. O controle de qualidade também foi realizado por CLAE (FIG. 10). Os tempos de retenção obtidos foram 12,5 e 14,7 minutos, para os análogos HYNIC-NT e MAG₃-NT, respectivamente. Os resultados obtidos por CLAE confirmaram os encontrados através da cromatografia de camada delgada, resultando em uma única espécie radioquímica principal para cada análogo da NT(8-13) radiomarcado.

Figura 10 - Radiocromatogramas de (A) ^{99m}Tc -HYNIC- βAla -NT(8-13) e (B) ^{99m}Tc -S-acetil-MAG₃- βAla -NT(8-13).

6.3. Estabilidade radioquímica dos análogos radiomarcados

A avaliação de estabilidade dos conjugados radiomarcados foi realizada através de cromatografia de camada delgada. Ambos análogos radiomarcados não demonstraram instabilidade em relação ao controle, apresentando pureza radioquímica superior a 97% (TAB. 4).

Tabela 4. Estabilidade radioquímica dos conjugados radiomarcados.

Tempo (h)			
	0 (controle)	6	24
Produto			
HYNIC-NT ^a	99,4±0,3	98,8±0,1	98,3±0,5
MAG ₃ -NT ^a	99,2±0,6	99,0±0,7	98,5±0,8

^a Valores representam média ± desvio padrão (N=3)

6.4. Estabilidade radioquímica dos análogos radiomarcados em função da cisteína e glutathione

A força de ligação dos radiocomplexos foi determinada pelo deslocamento da radioatividade ligada a ambos, o aminoácido cisteína e ao tripeptídeo glutathione. Os estudos de transquelação demonstraram que a incubação de ambos radiopeptídeos com excesso de cisteína e do tripeptídeo glutathione não produziram nenhuma transquelação significativa (menor que 1%), mesmo nas maiores razões molares (agente transquelante/peptídeo) estudadas, indicando que a força de ligação dos radiocomplexos é elevada.

6.5. Determinação da lipofilicidade dos análogos radiomarcados

O estudo da lipofilicidade revelou que menos de 1% da radioatividade estava associada à camada de octanol ($\log P = -3,78$), demonstrando uma baixa lipofilicidade para o complexo radiomarcado via HYNIC, em contrapartida, ao significativo aumento (aproximadamente cem vezes superior) da lipofilicidade encontrada para o complexo marcado via MAG_3 ($\log P = -1,79$).

6.6. Estudo *in vitro* de ligação às proteínas plasmáticas

A ligação às proteínas plasmáticas revelou uma ligação similar para ambos análogos radiomarcados $22,5 \pm 1,7\%$ e $23,1 \pm 3,5\%$, respectivamente para os conjugados radiomarcados via HYNIC e MAG_3 .

6.7. Avaliação *in vitro* e *in vivo* da estabilidade metabólica

A avaliação *in vitro* da estabilidade metabólica frente a HSA corresponde a um importante método de predição quanto à estabilidade e distribuição dos radiofármacos em sistemas biológicos, desde que 60% das proteínas plasmáticas correspondem a albumina.

Os perfis cromatográficos das espécies radiomarcadas em colunas PD-10 estão graficamente expressos na [figura 11](#). Os tempos de eluição referentes à

máxima retenção das espécies foram nas 8^a, 7^a e 12^a frações, respectivamente, para albumina, análogo radiomarcado via HYNIC e MAG₃.

Figura 11 - Perfis cromatográficos das espécies radiomarcadas (A) albumina, (B) HYNIC-NT(8-13) e (C) MAG₃-NT(8-13) em colunas PD-10.

Analisando os resultados obtidos, quando os análogos radiomarcados foram incubados com a HSA, podemos observar que nenhuma tranqueação frente a albumina ocorreu para ambos radiocomplexos após 90 min de incubação (FIG. 12A e 12B).

Figura 12 - Perfil cromatográfico da análise *in vitro* dos radioconjugados (A) $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-NT(8-13)}$ e (B) $^{99m}\text{Tc-MAG3-}\beta\text{Ala-NT(8-13)}$ aos 90 min de incubação com albumina a 37 °C.

Figura 13 - Perfil de eluição *in vivo* do radioconjugado $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-NT(8-13)}$ aos 5, 30, 60 e 90 min *pi* em colunas PD-10.

Já na avaliação da estabilidade metabólica em modelos biológicos (FIG. 13 e 14), uma mudança no perfil da eluição foi obtida após os 30 min pi para ambos análogos radiomarcados. No caso do HYNIC (FIG. 13) o surgimento de um pico de menor intensidade foi observado na 14^a fração, indicando a formação de algum composto de massa molecular menor que a do radiocomplexo em análise. No tempo mais tardio avaliado, observamos a presença de três picos sobrepostos, correspondentes à 9^a, 14^a e 15^a frações.

No caso do análogo radiomarcado via MAG₃ (FIG. 14), a partir dos 30 min pi um pico bem definido e de baixa intensidade [10:1 (radiocomplexo: composto formado)] foi obtido na 8^a fração, aumentando bruscamente [7:2 (radiocomplexo: composto formado)] aos 90 min pi, provavelmente indicando uma transquelação frente a HSA (FIG. 11A).

Figura 14 - Perfil de eluição *in vivo* do radioconjugado $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-}\beta\text{Ala-NT(8-13)}$ aos 5, 30, 60 e 90 min pi em colunas PD-10.

6.8. Saturação

Os ensaios de saturação foram realizados utilizando concentrações crescentes dos análogos não-radiomarcados HYNIC-NT e MAG_3 -NT com o objetivo de determinar o momento de saturação dos receptores da NT em células da linhagem tumoral de mama MDA-MB-231. Como revelado pelas curvas de saturação (FIG. 15), os análogos demonstraram uma fraca, porém dose-dependente, interação com os receptores da NT presentes na linhagem tumoral avaliada. A ligação específica aumentou rapidamente a baixas concentrações para o análogo radiomarcado via HYNIC (aproximadamente 20 pM) atingindo a saturação em concentrações superiores a 30 pM.

(A)

(B)

Figura 15 - Curvas de saturação dos análogos radiomarcados (A) ^{99m}Tc -HYNIC- βAla -NT(8-13) e (B) ^{99m}Tc - MAG_3 - βAla -NT(8-13). As curvas foram obtidas utilizando concentrações crescentes (0-90 nM) dos análogos radiomarcados. A porcentagem de ligação específica foi calculada como a diferença entre a porcentagem de ligação total e a ligação inespecífica.

Apesar do mesmo comportamento ter sido observado para o análogo radiomarcado via MAG_3 , não somente a ligação específica aumentou menos acentuadamente do que aquela observada para o conjugado marcado via HYNIC, mas também, a saturação foi atingida em concentrações mais elevadas do radioligante (aproximadamente 80 pM). Uma alta afinidade pelos receptores foi revelada através dos valores obtidos relativos ao K_d 17,5 nM e 20,3 nM, respectivamente para os análogos radiomarcados via HYNIC e MAG_3 . Interessantemente, os valores de máxima ligação ($B_{máx}$) pelos análogos radiomarcados via HYNIC e MAG_3 (0,05 nM e 0,13 nM, respectivamente) diferiram na ordem de dez vezes.

6.9. Internalização e externalização

As porcentagens de radioatividade associada à célula em ambos os ensaios de internalização e efluxo estão representadas na [figura 16](#). Apesar de ter sido observada uma rápida internalização nas células da linhagem tumoral MDA-MB-231 para ambos análogos radiomarcados, os dados obtidos não revelaram um comportamento tempo-dependente. Um pico foi observado aos 30 minutos para os conjugados marcados via HYNIC e MAG_3 (72,5% e 76,68%, respectivamente). Uma queda brusca de radioatividade associada à célula foi observada no caso do análogo radiomarcado via HYNIC, atingindo valores menores que 30% após 90 min de incubação.

Figura 16 - Internalização e externalização dos análogos radiomarcados ^{99m}Tc -HYNIC- βAla -NT(8-13) e ^{99m}Tc -MAG₃- βAla -NT(8-13) em células da linhagem tumoral mamária MDA-MB-231 após incubação a 37 °C. Os resultados estão apresentados como porcentagem de ligação específica relacionada à atividade total associada às células.

Diferentemente, para o análogo radiomarcado via MAG₃, uma internalização mais lenta e gradual foi observada até o período mais tardio avaliado, em que as taxas de associação da radioatividade à célula foram de 40,22% e 27,77%, respectivamente para os tempos 90 e 120 min após incubação. No entanto, apesar da alta porcentagem internalizada dos radiocomplexos, uma baixa (< 0,5%) e constante porcentagem de ligação específica em relação ao total de radioatividade adicionada foi observada para ambos os complexos radiomarcados.

Em relação aos resultados obtidos para as taxas de liberação da radioatividade (FIG. 16) após o período de máxima internalização (30 min), valores superiores a 30% e 45% (respectivamente para os análogos radiomarcados via HYNIC e MAG₃), ainda continuaram retidos na célula mesmo no período mais tardio avaliado.

6.10. Biodistribuição dos análogos radiomarcados em camundongos saudáveis

A biodistribuição de radiofármacos é essencial à determinação da sua eficácia e utilidade. Isto inclui a absorção, distribuição através dos tecidos, depuração sanguínea e excreção após a administração do radiocomposto.

Os resultados do estudo de biodistribuição dos conjugados radiomarcados em camundongos saudáveis estão sumarizados em termos de porcentagem de dose injetada por grama (% DI/g) na [figura 17](#) e avaliação da cinética de excreção na [figura 18](#).

Uma rápida depuração da radioatividade em todos os órgãos foi encontrada nos estudos de biodistribuição. Os baixos níveis de radioatividade (<3%) encontrados no estômago em praticamente todos os tempos estudados, para ambos radioconjugados estudados, indicam uma mínima ou nenhuma dissociação *in vivo* dos radiocomplexos ([FIG. 17A e 17B](#)).

(A)

(B)

Figura 17 - Biodistribuição dos análogos radiomarcados (A) ^{99m}Tc -HYNIC-βAla-NT(8-13) e (B) ^{99m}Tc -MAG₃-βAla-NT(8-13) em camundongos Swiss em função do tempo. Resultados estão expressos em % DI/g (média±DP, n=6).

Analisando o tempo de 5 minutos após administração do radiocomposto, foram observados níveis significantes de radioatividade retida nos pulmões ($4,44 \pm 0,62\% \text{DI/g}$ e $5,22 \pm 0,51\% \text{DI/g}$, respectivamente para os complexos radiomarcados via HYNIC e MAG₃) (FIG. 17A e 17B). Adicionalmente, uma acentuada captação foi observada nos rins (FIG. 18A), $24,65 \pm 4,08\% \text{DI/g}$ e $28,09 \pm 7,92\% \text{DI/g}$ para os análogos radiomarcados via HYNIC e MAG₃, respectivamente, acompanhado de uma pronunciada captação no fígado ($17,46 \pm 1,08\% \text{DI/g}$) para o último (FIG. 18B).

(A)

(B)

Figura 18 - Análise da cinética de excreção dos análogos radiomarcados $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-NT(8-13)}$ e $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-}\beta\text{Ala-NT(8-13)}$ em função do tempo para (A) Rins, (B) Fígado, (C) Intestino delgado e (D) Intestino grosso.

Após 30 min de administração do radiocomposto, menos de 2% de radioatividade foi detectada nos órgãos avaliados, exceto para os rins ($10,48 \pm 5,53\% \text{DI/g}$), relativo ao conjugado radiomarcado via HYNIC, e valores acima de 8% foram obtidos para rins, fígado e intestino delgado para o conjugado radiomarcado via MAG_3 .

Seguindo a rota de excreção do conjugado radiomarcado via MAG_3 , uma elevada captação no intestino delgado ($18,11 \pm 6,84\% \text{DI/g}$) foi obtida aos 30 min pi, se mantendo elevada ($16,27 \pm 8,73\% \text{DI/g}$) até os 120 min pi (FIG. 18C). Uma brusca queda da radioatividade retida no intestino delgado ($1,53 \pm 0,52\% \text{DI/g}$, 240 min pi), acompanhada por um subsequente aumento na captação no intestino grosso foi observada em ambos 240 min e 360 min pi ($9,06 \pm 3,52\% \text{DI/g}$ e $5,60 \pm 2,02\% \text{DI/g}$, respectivamente) (FIG. 18D). No tempo de 1440 min pi, somente traços de radioatividade foram encontrados para ambos os análogos radiomarcados.

A análise de variância foi utilizada como ferramenta estatística para averiguar a influência das variáveis (AQB, órgãos e tempo de sacrifício), bem como suas interações no comportamento da captação do radiocomposto. Todos os fatores

considerados e suas interações foram estatisticamente significantes, exceto pela interação AQB e tempo ($p=0,1938$). A comprovação estatística da maior depuração corpórea encontrada para o análogo radiomarcado via HYNIC foi obtida através da análise individual do fator AQB (FIG. 19).

Figura 19 - Análise de interação estatística individual da variável AQB.

Dentre os parâmetros para determinação e escolha dos tempos que serão avaliados no modelo tumoral, as captações totais sanguínea, nos ossos e músculo representam um conjunto de fatores crucial para a boa aquisição de uma imagem cintilográfica.

Ambos radioconjugados foram rapidamente depurados do sangue, músculo e osso. Considerando o tempo de 30 minutos pi, a captação sanguínea total (FIG. 20) do análogo radiomarcado via HYNIC foi aproximadamente duas vezes maior que a encontrada para o análogo radiomarcado via MAG₃, porém ambos apresentaram valores abaixo de 0,5 %DI a partir dos 90 min pi (dados não apresentados na FIG. 20).

Figura 20 - Depuração sanguínea dos radioconjugados ^{99m}Tc -HYNIC-NT(8-13) e ^{99m}Tc -MAG₃-NT(8-13) em função do tempo. Dados apresentados como %DI de sangue total, considerando-se uma volemia de 6,5% do peso corpóreo dos camundongos (n=6).

Aos 30 min pi, podemos observar um acúmulo da atividade de $7,31 \pm 1,73\% \text{DI}$ e $4,85 \pm 1,39\% \text{DI}$ no músculo (FIG. 21A), e $2,68 \pm 0,61\% \text{DI}$ e $2,62 \pm 1,41\% \text{DI}$ no osso (FIG. 21B), respectivamente para o análogo radiomarcado via HYNIC e MAG₃. Comparativamente aos dados de 30 min pi, níveis de radioatividade menores que 1% foram encontrados no caso do conjugado marcado via HYNIC, enquanto uma maior retenção da atividade foi observada para o MAG₃-radiocomplexo para os dados de músculo e osso total aos 90 min pi. No caso do conjugado via MAG₃, ainda foi observado um aumento não significativo para o valor de músculo total aos 120 min pi. Em linhas gerais, embora o modelo de depuração dos radiocomplexos seja similar, o complexo radiomarcado via MAG₃ claramente

apresentou uma depuração muito mais lenta para os valores de músculo e osso total quando comparado com o conjugado marcado via HYNIC.

Figura 21 - Histogramas de (A) Músculo total e (B) Osso total para os conjugados via HYNIC e MAG₃. Os resultados estão expressos como % DI (média±DP, n=6.)

As porcentagens de dose injetada por órgão (%DI/órgão) para ambos os análogos estão apresentados na [tabela 5](#).

Curiosamente, observou-se que mais de 46% da dose injetada foi eliminada em ambos os casos nos primeiros 5 min após administração do radiocomposto. Estudos piloto realizados em nosso laboratório, indicaram que a atividade retida na seringa e carcaça representa um total de aproximadamente 20% da dose injetada nos camundongos.

Aos 90 minutos após administração do radiocomposto, os valores de corpo inteiro indicaram que mais de 97% e 85% da dose injetada foram excretados, respectivamente para os complexos marcados via HYNIC e MAG₃. Vale a pena ressaltar, que a porcentagem de dose restante para o último radiotraçador, $14,12 \pm 2,66\%DI$, está principalmente concentrada no fígado e no intestino delgado ($36,55 \pm 4,99\%$ e $48,73 \pm 2,06\%$, respectivamente). Apenas traços de radioatividade foram encontrados aos 1440 min pi ($< 2\%$) para ambos os radiocomplexos.

Tabela 5. Biodistribuição (% DI/órgão) dos análogos radiomarcados ^{99m}Tc -HYNIC-NT(8-13) e ^{99m}Tc -MAG₃-NT(8-13) em Camundongos Swiss sadios em função do tempo.

Órgão/Tecido	Tempo (min)							
	5		30		60		90	
	HYNIC	MAG ₃	HYNIC	MAG ₃	HYNIC	MAG ₃	HYNIC	MAG ₃
%DI/órgão ^a								
Coração	0,25±0,03	0,27±0,07	0,10±0,01	0,05±0,02	0,02±0,01	0,02±0,01	≥ 0,01	≥ 0,01
Pulmão	1,09±0,19	1,17±0,43	0,49±0,13	0,33±0,10	0,07±0,01	0,10±0,01	0,03±0,01	0,05±0,01
Rins	8,09±0,99	5,91±1,62	3,80±1,15	2,17±0,10	2,00±0,79	1,21±0,25	0,78±0,12	1,08±0,28
Baço	0,15±0,01	0,14±0,03	0,07±0,01	0,05±0,02	0,02±0,01	0,03±0,01	≥ 0,01	0,03±0,01
Estômago	0,48±0,10	0,67±0,08	0,21±0,06	0,23±0,04	0,08±0,04	0,12±0,06	0,04±0,02	0,08±0,03
Pâncreas	0,22±0,06	0,22±0,03	0,09±0,02	0,23±0,04	0,03±0,01	0,02±0,01	≥ 0,01	0,02±0,01
Fígado	1,92±0,30	13,89±0,94	0,80±0,13	7,52±0,81	0,26±0,06	5,60±0,91	0,16±0,04	4,74±1,01
Intestino Grosso	0,74±0,06	1,09±0,33	0,36±0,07	0,44±0,12	0,14±0,08	0,32±0,14	0,05±0,01	0,18±0,02
Intestino Delgado	0,71±0,14	2,03±0,20	0,51±0,06	6,06±1,06	0,23±0,06	5,15±2,17	0,10±0,03	5,93±1,66
Corpo Inteiro ^(b)	43,81±5,37	52,38±1,59	20,06±2,1	24,75±3,3	4,08±0,74	15,75±2,0	3,18±0,32	14,12±2,6

Órgão/Tecido	Tempo (min)							
	120		240		360		1440	
	HYNIC	MAG ₃	HYNIC	MAG ₃	HYNIC	MAG ₃	HYNIC	MAG ₃
%DI/órgão ^a								
Coração	----	≥ 0,01	----	≥ 0,01	----	----	----	----
Pulmão	0,03±0,01	0,07±0,01	0,02±0,01	0,04±0,01	0,01±0,01	0,03±0,01	≥ 0,01	----
Rins	1,42±0,47	0,78±0,27	1,46±0,51	0,78±0,13	1,28±0,36	0,42±0,12	0,65±0,15	0,26±0,01
Baço	≥ 0,01	0,02±0,01	≥ 0,01	0,02±0,01	≥ 0,01	≥ 0,01	≥ 0,01	----
Estômago	0,02±0,01	0,11±0,06	0,04±0,02	0,07±0,04	0,03±0,02	0,03±0,01	0,02±0,01	0,01±0,01
Pâncreas	≥ 0,01	0,02±0,01	≥ 0,01	----	----	----	----	----
Fígado	0,17±0,17	3,23±0,36	0,22±0,05	4,19±1,99	0,16±0,05	2,14±0,61	0,14±0,03	0,41±0,08
Intestino Grosso	0,07±0,02	0,23±0,03	0,11±0,04	2,74±0,85	0,08±0,03	0,94±0,37	0,05±0,02	0,04±0,01
Intestino Delgado	0,15±0,02	8,33±5,60	0,15±0,07	0,90±0,55	0,12±0,04	0,33±0,12	0,09±0,03	0,01±0,01
Corpo Inteiro ^(b)	2,66±0,57	14,16±0,85	2,60±0,54	11,28±2,5	2,17±0,35	4,27±0,48	1,43±0,17	1,05±0,08

^(a) Valores representam média±desvio padrão (n=6)

^(b) Representa a somatória da % DI/órgão e % sangue, músculo e osso total.

6.11. Biodistribuição em camundongos portadores de tumor

Nos estudos de biodistribuição em camundongos portadores de tumor (TAB. 6) da linhagem de mama MDA-MB-231, uma depuração rápida de todos os órgãos foi encontrada para ambos análogos radiomarcados, corroborando com os achados na biodistribuição em camundongos sadios (TAB. 5; FIG. 17 e 18). Aos 30 min pi, o comportamento de ambos análogos foi similar. Nenhuma diferença significativa foi encontrada com relação à captação tumoral ($1,97 \pm 0,18$ %DI/g e $1,92 \pm 0,50$ %DI/g, respectivamente, para os conjugados radiomarcados via HYNIC e MAG_3). No tempo mais tardio avaliado (90 min), uma rápida depuração tumoral ($0,44 \pm 0,02$ %DI/g) foi observada para o análogo radiomarcado via HYNIC, ao contrário da encontrada para o complexo marcado via MAG_3 que manteve-se constante ($1,83 \pm 0,67$ %DI/g).

Nos estudos de bloqueio 30 min após administração da droga (TAB. 6), um similar acúmulo foi encontrada na maioria dos órgãos com exceção do tumor, intestino delgado e intestino grosso, em que a inibição da captação foi consideravelmente elevada, 45,94%, 36,39% e 27,73%, respectivamente, para o análogo radiomarcado via HYNIC. Em contrapartida, no caso do complexo radiomarcado via MAG_3 , os resultados revelaram uma inibição menos relevante para o tumor e intestino grosso (28,97% e 16,89%), quando comparados ao notável bloqueio no intestino delgado (51,44%).

Já aos 90 min pi, no caso do conjugado radiomarcado via HYNIC, a porcentagem de inibição foi menos acentuada para o tumor e intestino grosso (28,68% e 24,90%, respectivamente), acompanhada por um discreto aumento na inibição no intestino delgado (30,38%). Os resultados obtidos para o análogo radiomarcado via MAG_3 revelaram uma inibição superior a 60% para o tumor e intestino delgado (75,68% e 67,35%, respectivamente), e em menor extensão, para o intestino grosso (17,87%).

Tabela 6. Biodistribuição do análogo radiomarcado ^{99m}Tc -HYNIC- βAla -NT(8-13) e ^{99m}Tc -MAG₃- βAla -NT(8-13) em camundongos portadores de tumor aos 30 min e 90 min pi. Os resultados estão expressos em %DI/g (média±DP, n=6).

Tempo (min)	Órgão/Tecido												
	Sangue	Coração	Pulmão	Rins	Baço	Estômago	Pâncreas	Fígado	Intest. Grosso	Intest. Delgado	Músculo	Osso	Tumor
^{99m}Tc -HYNIC- βAla -NT(8-13)													
30	1,89±0,91	0,84±0,38	2,03±1,07	12,03±6,38	0,99±0,39	1,07±0,40	0,79±0,35	0,88±0,44	1,16±0,38	1,04±0,30	0,82±0,28	0,92±0,35	1,97±0,18***
30*	1,37±0,37	0,62±0,11	1,37±0,10	5,68±0,36	0,76±0,11	2,53±0,44	0,63±0,10	0,73±0,02	0,84±0,28**	0,66±0,19**	0,48±0,07	0,76±0,26	1,07±0,11**
90	0,34±0,05	0,16±0,02	0,49±0,06	6,63±0,96	0,58±0,21	1,91±0,24	0,21±0,07	0,60±0,04	0,45±0,01	0,50±0,07	0,10±0,02	0,27±0,02	0,44±0,02
90*	0,39±0,07	0,22±0,08	0,54±0,20	4,36±1,01	0,34±0,08	2,10±0,94	0,33±0,07	0,61±0,07	0,34±0,05**	0,35±0,04**	0,11±0,03	0,24±0,02	0,31±0,07**
^{99m}Tc -MAG ₃ - βAla -NT(8-13)													
30	1,70±0,79	0,67±0,31	2,72±1,26	10,31±4,0	1,28±0,4	1,58±0,77	0,97±0,40	7,91±4,36	2,41±0,90	10,49±3,2	0,65±0,27	0,82±0,34	1,92±0,50***
30*	1,77±0,17	1,32±0,48	1,45±0,17	12,54±2,6	2,21±0,4	1,80±0,55	1,37±0,47	8,15±2,87	2,00±0,99*	5,10±1,27*	1,34±0,39	1,11±0,37	1,36±0,24**
90	0,11±0,06	0,09±0,06	0,25±0,15	3,89±0,59	0,36±0,1	0,68±0,27	0,31±0,17	3,01±1,32	0,60±0,13	9,18±3,17	0,16±0,07	0,47±0,22	1,83±0,67
90*	0,69±0,08	0,46±0,22	0,58±0,07	3,76±0,78	0,57±0,1	0,52±0,15	0,29±0,10	3,25±0,33	0,49±0,12*	3,00±1,31*	0,20±0,07	0,34±0,12	0,45±0,24**

*Bloqueio. Animais receberam o análogo radiomarcado concomitantemente com 100µg/camundongo de NT(8-13) não-radiomarcada.

** p<0,05 Bloqueados vs. Não-bloqueados.

***p<0,05 Captação tumoral HYNIC vs MAG₃.

O estudo comparativo das razões tumor/órgão para ambos radioconjugados estão graficamente expressos na [figura 22A e 22B](#). A rápida depuração da radioatividade no tumor observada para o conjugado radiomarcado via HYNIC levou a baixas razões tumor/órgão (< 3) em ambos os tempos avaliados. Por outro lado, apesar do comportamento similar observado para o conjugado marcado via MAG_3 no tempo mais precoce avaliado (30 min), a retenção da radioatividade tumoral no tempo mais tardio (90 min) levou a razões superiores a 11, como no caso da razão tumor/sangue e tumor/músculo.

Figura 22 - Análise comparativa da razão tumor/órgãos dos análogos radiomarcados ^{99m}Tc -HYNIC- $\beta\text{Ala-NT}(8-13)$ e ^{99m}Tc - MAG_3 - $\beta\text{Ala-NT}(8-13)$ em (A) 30 min e (B) 90 min pi. (T=tumor; S=sangue; M=músculo; O=osso; ID= Intestino delgado; IG= Intestino grosso; R=Rins; F= Fígado)

No gráfico de cargas (FIG. 23 A) obtido através da análise por mínimos quadrados parciais observou-se que ambos análogos radiomarcados pouco tiveram influência sobre as variáveis resposta (%DI e %DI/g). Como esperado, a ausência do bloqueio possui uma relação direta com as variáveis resposta, ao contrário, a presença do bloqueio é inversamente proporcional, assim, quanto maior a quantidade do produto frio, menor a captação tumoral. A variável tempo após administração da droga produziu efeito significativamente inverso às variáveis resposta, indicando que quanto menor o tempo p_i , maior será a captação tumoral. Em contrapartida, efeitos diretamente proporcionais em relação às variáveis resposta, foram observados para os fatores peso do tumor e porcentagem da dose retida na cauda. Assim, quanto maior o peso do tumor e maior a porcentagem de dose retida na cauda, maior é a captação tumoral.

(B)

(C)

Figura 23 - Análise de mínimos quadrados parciais para o conjunto de camundongos portadores de tumor avaliados. (A) Gráfico de cargas, (B) Gráfico IPV, e (C) Gráfico biplot. Abreviações: CP – componente principal; CB – com bloqueio; SB- sem bloqueio; %DRC - % dose retida na cauda; T- tempo após injeção da droga; P- peso; H- HYNIC; M - MAG₃.

No gráfico IPV (FIG. 23 B), a importância de cada variável no modelo foi considerada separadamente. Assim, foi observado que as variáveis peso do tumor,

ausência ou presença de bloqueio são as variáveis que produziram maior efeito em relação às variáveis resposta %DI e %DI/g. As variáveis porcentagem da dose retida na cauda e os agentes quelantes bifuncionais não produziram nenhuma influência significativa no modelo proposto.

Por último, através da junção dos gráficos de marcas e cargas, foram determinadas as causas das diferenças entre as amostras em relação às variáveis consideradas (FIG. 23C). Através dele podemos observar que as variáveis tempo pi e presença de bloqueio produziram maior impacto principalmente nas amostras em que os camundongos foram injetados com uma dose do análogo radiomarcado via MAG_3 , produzindo a menor resposta na captação tumoral. Por outro lado, as variáveis ausência de bloqueio, porcentagem de dose retida na cauda e o peso do tumor foram determinantes para a maior variabilidade, predominantemente, nas amostras em que o conjugado marcado via HYNIC foi administrado aos camundongos, resultando assim, na maior captação tumoral em tempos mais precoces após administração do radioconjugado.

6.12. Aquisição de imagens cintilográficas

Como última etapa de um estudo pré-clínico foi realizada a aquisição de imagem cintilográfica (FIG. 24). A partir dela pode-se prever não somente o comportamento do radiofármaco em um tempo pré-estabelecido através da criação de regiões de interesse (RI), mas também, a quantificação da captação e visualização tumoral através dos aparelhos de imagem diagnóstica disponíveis atualmente. Com base nestas considerações, a aquisição das imagens referentes aos estudos sobre o comportamento do radiocomplexo ^{99m}Tc -HYNIC-NT(8-13) permitiu verificar que os valores de RI para bexiga e tumor aos 30 min pi (57,51% e 1,67%) e (75,44% e 0,46%) aos 90 min pi, respectivamente. Já para o radiocomplexo ^{99m}Tc - MAG_3 -NT(8-13) no tempo mais precoce avaliado (30 min) os valores de RI obtidos para bexiga e tumor foram 7,94% e 1,71%, respectivamente. Uma excreção renal, seguida por uma retenção da captação tumoral no tempo mais tardio avaliado (90 min) para o complexo radiomarcado via MAG_3 foi também obtida através dos RIs (49,90% e 1,82%, respectivamente), corroborando portanto, com os dados obtidos na biodistribuição em camundongos portadores de tumor.

(A)

(B)

Figura 24 - Imagens cintilográficas obtidas de camundongos Nude portando tumor da linhagem tumoral MDA-MB-231. As imagens foram adquiridas aos 30 e 90 min pi de (A) ^{99m}Tc -HYNIC-NT(8-13) e (B) ^{99m}Tc -MAG₃-NT(8-13).

7. DISCUSSÃO

Atualmente, o câncer de mama é o tipo de malignidade que leva ao maior número de óbitos no Brasil⁽¹²¹⁾. Em particular, apesar de ter sido observada uma queda na taxa de mortalidade de mulheres com câncer de mama nas últimas décadas, as diversas modalidades de imagem associadas ou isoladamente, não demonstraram uma homogeneidade quanto à detecção desta malignidade em estágio precoce. Isto se deve, primordialmente, à ausência de radiofármacos com mecanismos específicos que têm sido utilizados com frequência nas radiofarmácias hospitalares, como o $^{99m}\text{Tc-MIBI}$ ⁽¹³⁷⁾ e o $^{18}\text{F-FDG}$ ⁽¹³⁸⁾.

As tecnologias atuais de imageamento se destinam, principalmente, às mudanças macroscópicas físicas, fisiológicas ou metabólicas não específicas, que identificam os eventos moleculares específicos (isto é, expressão gênica) responsáveis pela doença⁽¹⁴⁵⁾. Neste sentido, a rápida evolução das modalidades de imagem, bem como a crescente utilização destas técnicas associadamente, permitem prognósticos mais precisos e precoces de patologias⁽¹⁴⁴⁾.

Medicina Nuclear é um ramo da medicina centrado na administração de radiotraçadores injetáveis à pacientes, fazendo uso de dispositivos diagnósticos de imagem, para medir a radiação externa emitida pelo radionuclídeo. A “Imagiologia Molecular” é um novo conceito, que implica a convergência de múltiplas técnicas de captura de imagem, biologia molecular/celular, química, medicina, farmacologia, física médica, biomatemática e bioinformática em um novo paradigma de imagem. É, também, uma disciplina emergente na pesquisa biomédica que estende as observações em animais a uma significativa dimensão, podendo ser definida como uma representação visual, caracterização e quantificação de processos biológicos em níveis celulares e subcelulares de organismos vivos intactos. Este campo multidisciplinar e notavelmente promissor, reflete etapas celulares e moleculares de

mecanismos *in vivo* da malignidade no contexto de ambientes fisiologicamente autênticos⁽¹⁴⁵⁾.

Aproveitando-se da ampla utilização e desenvolvimento na síntese de peptídeos, novos agentes diagnósticos tem sido desenvolvidos nas últimas décadas. Especificamente, a classe de peptídeos regulatórios, como a Neurotensina, vem ganhando atenção por representar uma gama de funções fisiológicas, e conseqüentemente, por participar ativamente de diversos processos no organismo, como o crescimento tumoral. Souzé et al.⁽⁹⁸⁾ identificaram, bioquimicamente, a interação entre os NTR-1 e as células da linhagem de tumor de mama MDA-MB-231. Partindo desta premissa associada à busca por novos agentes diagnósticos específicos para a detecção precoce de tumores de mama, a caracterização de um dos análogos da NT(8-13) mais promissores foi averiguada no presente estudo.

7.1. Eluição do radionuclídeo

O controle físico-químico e radioquímico indicaram que todos os parâmetros analisados estão dentro da faixa estabelecida pela XXVIII Edição da Farmacopéia Americana (USP).

A presença de eventuais impurezas radionuclídicas está relacionada com o modo de produção do radionuclídeo ou com uma preparação inadequada dos geradores. A presença de ^{99}Mo no eluído de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ é um exemplo de impureza radionuclídica. Já as impurezas radioquímicas têm origem na decomposição dos radiofármacos, devido à ação do solvente, temperatura, pH, luz, presença de agentes oxidantes ou redutores e radiólise⁽²⁾. A definição de pureza radioquímica é o percentual do radionuclídeo na forma química de interesse em uma determinada amostra radioativa. Desta forma, as principais impurezas radioquímicas encontradas nas marcações que utilizam a técnica do agente quelante bifuncional são o pertechnetato ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$) e o colóide $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$.

7.2. Radiomarcção e avaliação radioquímica dos análogos radiomarcados HYNIC- β Ala-NT(8-13) e S-acetil-MAG₃- β Ala-NT(8-13)

Em termos radiofarmacêuticos, uma alta atividade específica é necessária com a finalidade de não alterar a ação dos radiofármacos e para aqueles alvos de baixa densidade protéica, tais com os receptores celulares, que podem ser saturados mesmo se a massa total injetada ainda for baixa⁽¹⁴⁶⁾. Além disso, diversos estudos na literatura postulam que mesmo em pequenas quantidades, derivados agonistas de análogos da bombesina, gastrina ou neurotensina estimulam o crescimento tumoral *in vivo*⁽¹⁴⁷⁾, além de provocar diversos efeitos indesejáveis quando administrados mesmo em doses usuais (isto é, 10-20 μ g), como as utilizadas nas triagens clínicas. Um exemplo disto, seria o peptídeo bombesina, que causa o aceleração dos batimentos cardíacos, aumento da pressão sanguínea, e uma transiente vaso-constricção renal⁽¹⁴⁸⁾.

Neste sentido, a alta atividade específica obtida para ambos radiocomplexos favorece a sua utilização como potenciais agentes diagnósticos, na forma de conjuntos reativos ou “kits” liofilizados, desde que os estudos foram realizados com uma atividade máxima aproximada de 3700 MBq.

Os núcleos contendo HYNIC, originalmente aplicados para a marcação de anticorpos, são os mais amplamente explorados na literatura para radiomarcção também de pequenas biomoléculas com ^{99m}Tc ^(1,13,17,68). Apesar de intensa exploração e amplo desenvolvimento de sistemas de coligantes, os conjugados radiomarcados via HYNIC são caracterizados por serem quimicamente robustos, mas pobremente caracterizados em níveis traçadores⁽⁶⁴⁾. Diversas investigações foram realizadas nos últimos anos, buscando minimizar as possíveis reações de troca entre ligantes, mas nenhum sucesso foi obtido até então⁽¹⁴⁹⁾.

A ausência de formação de isômeros na formação dos núcleos ^{99m}Tc -HYNIC é um ponto importante a ser considerado, desde que indica que o ^{99m}Tc forma o complexo na posição desejada, garantindo a distância do sítio de ligação da biomolécula aos receptores sem interferir nas propriedades requeridas à biomolécula. Além disso se presentes, podem ter comportamentos diferentes com relação a características como lipofilicidade e biodistribuição em sistemas biológicos^(9,74).

Babich et al.⁽¹⁵⁰⁾ foram os pioneiros no estudo da influência dos coligantes na biodistribuição *in vivo* de peptídeos radiomarcados. O grupo também averiguou que a variação dos mesmos (neste caso, entre glucarato, glucoheptonato, manitol e glucamina) teve participação significativa na modificação da farmacocinética dos radiocomplexos. Desde então, diversos grupos de pesquisadores não somente despenderam esforços substanciais na utilização de sistemas de coligantes únicos, como no caso da tricina para a radiomarcagem da imunoglobulina⁽¹⁵¹⁾, mas também, na utilização de sistemas de coligantes mistos, como no caso de tricina e EDDA⁽⁷¹⁾.

HYNIC/coligantes é um sistema atrativo para radiomarcagem de biomoléculas, uma vez que o procedimento de marcação é rápido, fácil, ocorre em pH neutro e utiliza concentrações nanomolares da biomolécula. Com os avanços no conhecimento sobre o modo de coordenação dos núcleos de ^{99m}Tc-HYNIC, elevados rendimentos de marcação, alta estabilidade frente à cisteína, histidina, glutatona, componentes do sangue *in vivo* foram relatados na literatura^(71,152).

O único pico obtido no perfil radiocromatográfico (FIG. 10), no caso do conjugado radiomarcado via HYNIC indicou a ausência de isômeros. Contudo, como já mencionado, nada pode ser garantido sobre a sua estrutura final, desde que as diversas reações de troca de ligantes, aliado a possibilidade de o agente quelante bifuncional HYNIC atuar como um ligante mono/bidentado (FIG. 6) nos radiocomplexos formados com ^{99m}Tc serem de difícil resolução⁽⁶⁾.

A marcação de moléculas bioativas com ^{99m}Tc utilizando HYNIC segue um mecanismo um pouco diferente aos métodos alternativos utilizando quelantes como N₂S₂ e N₃S, como o MAG₃. No último caso, os próprios quelantes fornecem os quatro átomos basais necessários à formação dos complexos com ^{99m}Tc. Estes átomos são necessários para neutralizar as cargas positivas, formando assim, ligações com caráter π , deslocando subsequente as nuvens eletrônicas do tecnécio, gerando ligações mais estáveis. As características comuns entre estes núcleos são as múltiplas ligações entre tecnécio, nitrogênio e oxigênio, reduzido comprimento de ligação (1,56-1,63 Å), e um estado de oxidação +5 para o tecnécio⁽⁶⁷⁾. Dessa maneira, complexos muito estáveis e quimicamente bem definidos são formados, como por exemplo, aqueles obtidos através da radiocomplexação utilizando o quelante NHS-MAG₃^(56,153).

7.3. Estabilidade radioquímica dos análogos radiomarcados

Como etapa inicial dos estudos de um novo radiofármaco, a avaliação de sua estabilidade através de simples métodos cromatográficos, constitui um dos parâmetros básicos para estimar o comportamento dos radiofármacos em kits liofilizados. A presença de impurezas ou outras espécies radioquímicas causam indesejável exposição de radiação ao paciente, eventual toxicidade em tecidos normais ou não- alvos e limitam altamante a sua eficácia clínica.

Neste sentido, a alta estabilidade dos traçadores marcados via HYNIC e MAG₃, mesmo no período mais tardio avaliado (TAB. 4) representa um forte indício da sua potencial aplicabilidade nas atuais radiofarmácias hospitalares.

7.4. Estabilidade radioquímica dos análogos radiomarcados em função da cisteína e glutathione

Os estudos de transquelação representam uma ferramenta essencial para se obter um maior entendimento sobre a distribuição de um radiofármaco no organismo, já que uma ligação indesejada do quelante a um componente do sangue e/ou às proteínas plasmáticas pode impedir que o fármaco atinja o órgão de interesse, ou mesmo, modificar sua rota de absorção no organismo.

Em mamíferos ambos cisteína e glutathione estão presentes em altas concentrações no plasma e nos tecidos. As concentrações de cisteína e glutathione livre estão na faixa de 10 a 100 μM e de 500 a 10.000 μM , respectivamente, apresentando maior expressão no fígado para o último. Em nível plasmático, as concentrações de cisteína e glutathione livre estão na ordem de 10 μM e 20 μM , respectivamente⁽⁶⁰⁾.

Além disso, as concentrações de aminoácidos livres nos tecidos de organismos vivos que possuem neoplasias, podem ser alteradas por diversos fatores (por exemplo, mudanças na absorção intestinal, alterações na biossíntese de aminoácidos não essenciais ao fígado, entre outras), influenciando diretamente na estabilidade e distribuição dos complexos radiomarcados *in vivo*⁽¹⁵⁴⁾. Como

exemplo, altos níveis intracelulares de glutathione já foram reportados em estudos clínicos realizados com mulheres que possuíam tumor de mama⁽¹³¹⁾.

O estudo *in vitro* do desafio do bioradiocomplexos com excesso de cisteína ou glutathione foi realizado para estimar a labilidade, força e/ou reações de decomposição dos radioconjugados *in vivo*. Os resultados obtidos revelaram uma alta estabilidade mesmo a razões molares mais elevadas estudadas (excesso molar 100 vezes maior em relação ao peptídeo) para ambos radiocomplexos.

O sistema HYNIC/Tricina/EDDA forneceu complexos altamente estáveis frente aos agentes transquelantes. Com relação aos experimentos de transquelação utilizando a cisteína, resultados similares aos obtidos no presente trabalho foram obtidos por outros grupos quando tricina foi utilizado como coligante⁽¹⁵⁵⁾. Ao contrário dos nossos achados, uma considerável transquelação foi relatada em outros estudos comparativos, quando anticorpos⁽¹⁵⁶⁾ e soro albumina humana⁽¹⁵⁷⁾ foram radiomarcados via HYNIC ou MAG₃ com ^{99m}Tc.

Baseado nestas considerações, os dados obtidos com os estudos de transquelação representam uma alta estabilidade dos complexos formados (tecnécio + peptídeo), já que foi observada uma dissociação menor que 10% em relação a estes agentes, mesmo em razões molares (agente transquelante/peptídeo) mais altas.

7.5. Determinação da lipofilicidade dos análogos radiomarcados

A lipofilicidade de uma biomolécula é determinada pela sua estrutura e pode ser refletida através da determinação da sua razão de partição entre água e n-octanol. Sendo assim, um valor de coeficiente de partição da ordem de aproximadamente cem vezes superior encontrada para o conjugado radiomarcado via MAG₃ sugere uma maior lipofilicidade quando comparada ao radiotraçador marcado via HYNIC. Estes achados foram confirmados através dos perfis cromatográficos obtidos através da CLAE, desde que uma interação entre compostos lipofílicos e a coluna cromatográfica é esperada, justificando o maior tempo de retenção encontrado para o conjugado marcado via MAG₃ (FIG.10).

Liu et al.⁽¹⁵⁸⁾ estudaram os efeitos de coligantes na lipofilicidade de radiocomplexos marcados via HYNIC. Notavelmente, nenhuma diferença

significativa foi encontrada quando os sistemas tricina/TPPTS; ISONIC (ácido isonicotínico); PDA (ácido 2,5-piridinodicarboxílico) foram utilizados, apesar do oposto ter sido estimado nos perfis cromatográficos realizados por CLAE neste estudo para os coligantes TPPTS e ISONIC. Ao contrário, Decristóforo et al.⁽¹⁵⁹⁾ observaram um aumento significativo da lipofilicidade quando EDDA, tricina e tricina/EDTA foram utilizados como coligantes, sendo o primeiro o mais hidrofílico.

Uma correlação da lipofilicidade aferida ao conjugado marcado via MAG_3 no presente trabalho, também pode ser feita através de estudos prévios utilizando o sistema de coligantes tricina/ligantes N_3S . Analogamente, quando coligantes dessa família foram inseridos ao sistema HYNIC/tricina, uma maior lipofilicidade dos radiocomplexos avaliados foi obtida por Decristoforo et al.⁽⁶⁸⁾, corroborando com os achados do presente trabalho.

7.6. Estudo *in vitro* de ligação às proteínas plasmáticas

A ligação às proteínas plasmáticas desempenha um papel crítico na determinação da biodistribuição, taxa de eliminação, circulação sanguínea, acesso ao sítio de ação e metabolismo da droga. Algumas delas têm associação limitada com os constituintes do sangue quando administrados, enquanto outros se associam ou se ligam a albumina, globulinas lipoproteínas e eritrócitos⁽¹⁶⁰⁾.

Radiocompostos altamente ligados apresentam baixas taxas de depuração da radioatividade do sangue, comprometendo sua liberação aos tecidos e/ou órgãos alvos. Somente drogas livres ou não ligadas na circulação são capazes de difundirem através das paredes dos vasos, alcançando assim o sítio de ação, ou mesmo, serem excretadas. Diferentes associações entre os análogos radiomarcados também podem ser explicadas por fatores que incluem carga da molécula, pH, e a concentração de ânions no plasma. A natureza da proteína, particularmente as que contêm grupos hidroxil, carboxil e grupos amino, bem como a configuração apresentada por estes grupamentos na estrutura da biomolécula, determinam a extensão e força com que elas se ligam aos radiofármacos⁽¹⁶¹⁾.

Em Medicina Nuclear, é essencial o entendimento e a quantificação deste fenômeno, de maneira a antecipar o comportamento *in vivo* dos radiotracadores. Exemplo disso, é o fato de que alguns radiotracadores como DMSA

ou IDA, obrigatoriamente tem que se ligar as proteínas plasmáticas para atingirem o sítio alvo. ^{99m}Tc -DMSA é captado pelos receptores de proteínas renais contendo grupos sulfidril, enquanto ^{99m}Tc -IDA é transferido pela albumina a partir da sinusóide às células hepáticas⁽¹⁶⁰⁾.

A baixa ligação dos radioconjugados às proteínas plasmáticas pode estar relacionada à ausência de tranqueação dos radiocomplexos *in vitro*. Contudo, uma diferença na porcentagem de LPP entre os dois radiotraçadores era esperada desde que parâmetros como tempo de retenção nos perfis cromatográficas obtidos por CLAE (FIG. 10) e a lipofilicidade representam fatores de predição para o comportamento da droga no organismo. Em outras palavras, o maior tempo de retenção e maior lipofilicidade obtidos para o análogo radiomarcado via MAG_3 , representavam indicadores à uma maior porcentagem de LPP quando comparado ao conjugado radiomarcado via HYNIC. Similarmente, nenhuma diferença relevante na porcentagem de LPP foi encontrada no estudo comparativo realizado por Vanderheyden et al.⁽¹⁵²⁾ quando a biomolécula Anexina-V foi radiomarcada com ^{99m}Tc .

Por outro lado, considerando o sistema ^{99m}Tc -HYNIC/coligantes, uma elevada porcentagem de LPP era esperada, desde que alguns estudos sugerem reações de troca do coligante tricina, com as proteínas plasmáticas e lisossomos podem ocorrer *in vivo*^(162,163). Sustentando tal idéia, Decristoforo et al.⁽¹⁵⁹⁾ primeiramente estudaram a influência do tempo em sistemas de coligantes mixtos para bioradiconplexos marcados via HYNIC. Eles averiguaram dois modelos de ligação às proteínas plasmáticas: o primeiro relacionado à hidrofobicidade dos complexos e o segundo relacionado com a cinética de troca entre os coligantes e as cadeias laterais das proteínas. Valores acima de 58% foram encontrados para o sistema EDDA e derivados de EDDA; e acima de 80% para o sistema EDTA e derivados de EDTA. Mais tarde, a porcentagem de LPP também foi avaliada em núcleos de HYNIC associados ao peptídeo RGD. O grupo obteve uma porcentagem de LPP por volta dos 40% quando utilizaram somente tricina como ligante, em contrapartida, aos valores extremamente baixos de LPP encontrados quando o sistema EDDA/tricina (< 5%) foi utilizado⁽⁷¹⁾.

O método de troca de ligantes com tricina, produz altos e reprodutíveis rendimentos de marcação⁽¹⁶⁴⁾. Confirmando outros estudos, o emprego de EDDA como coligante demonstrou ser consideravelmente vantajoso em relação à tricina para marcação de derivados de HYNIC, especialmente em relação aos baixos valores encontrados de LPP^(68,71).

Contudo, os dados relatados na literatura são frequentemente discrepantes devido a utilização de diferentes métodos de determinação. Por exemplo, estudos realizados com o agente renal ^{99m}Tc-MAG₃ revelaram uma faixa de 32-89% e 29-53%, quando foram utilizados os métodos utilizando extração por solvente orgânico (isto é, etanol, metanol, acetona, acetonitrila, entre outros) e por precipitação ácida (isto é, ácido trifluoroacético, ácido perclórico, entre outros), respectivamente^(160, 165).

7.7. Avaliação *in vitro* e *in vivo* da estabilidade metabólica

Metabolismo se define como sendo a soma total de processos químicos que acontecem em organismos vivos. Estes processos incluem o catabolismo (a quebra de moléculas por enzimas) e o anabolismo (formação de moléculas maiores a partir de menores). Apesar do controle de qualidade de um radiofármaco nos garantir a pureza radioquímica do biorradiocomplexo que está sendo administrado ao paciente, a estrutura química exata do radiotraçador que chega ao alvo não pode ser determinada, desde que se desconhece a velocidade da metabolização da biomolécula *in vivo*⁽¹⁶⁶⁾.

Neste sentido, a utilização de pequenos peptídeos, como a neurotensina, oferecem diversas vantagens sobre os anticorpos monoclonais no que diz respeito à metabolização, e subsequente, melhora na qualidade da imagem cintilográfica. Além disso, são facilmente sintetizados, modificados, estabilizados, e ainda suportam condições drásticas de radiomarkação⁽¹¹⁾. A maioria deles são peptídeos bioativos endógenos e possuem alta afinidade pelos seus receptores, com depuração plasmática mais rápida atingindo os tecidos alvo em altas concentrações⁽¹³⁾. No entanto, uma desvantagem quando comparados aos anticorpos monoclonais, é sua rápida degradação plasmática por peptidases endógenas e proteases^(1,12).

Como a albumina corresponde a aproximadamente 60% do total das proteínas plasmáticas, geralmente, a avaliação *in vitro* da estabilidade metabólica dos radioconjugados frente a HSA constitui uma ferramenta essencial para se estimar não somente a força do radiocomplexo, mas também sua degradação em sistemas biológicos. Além disso, a baixa resistência dos análogos da neurotensina frente às proteases presentes no corpo reforçaram a idéia de que a avaliação *in vivo* da estabilidade metabólica dos radiotraçadores nas proteínas do plasma fosse crucial na predição ou mesmo explicação do comportamento dos radioconjugados em modelos biológicos.

A degradação dos análogos da neurotensina é bem conhecida e fundamentada na literatura^(110-112,116). O entendimento sobre a ação das peptidases e proteases *in vivo* em análogos da neurotensina continuam sendo objeto de investigação de diversos grupos de pesquisa. Atualmente, conhecida as formas de ação de algumas destas peptidases, bem como, o desenvolvimento de estratégias de modelagem molecular para o impedimento da ação das mesmas, foi possível atingir $t_{1/2}$ maiores dos análogos da NT, para posterior aproveitamento da sua alta potencialidade como agente farmacêutico em uma gama de malignidades.

A técnica de separação utilizando as colunas PD-10 se baseia na exclusão por tamanho das espécies contidas no analito. Como ambos radioconjugados possuem massas moleculares muito próximas e a albumina possui um peso molecular de aproximadamente 60 vezes superior ao peso molecular dos radioconjugados, seria esperado que nas primeiras frações a albumina fosse eluída, e em posteriores, ambos os radiocomplexos fossem eluídos em frações similares.

Analisando o perfil cromatográfico do complexo marcado via HYNIC (FIG.11B) em colunas PD-10, surpreendentemente, o mesmo foi eluído em uma fração similar àquela observada para a HSA radiomarcada (FIG. 11A). Este comportamento anômalo pode sugerir dois fatos: (1) a formação de um aglomerado; e (2) a formação de complexo diferente daquele esperado e/ou proposto. A partir de diversos modelos de coordenação do sistema HYNIC/coligantes, o sistema de troca de ligantes proposto por diversos grupos de pesquisa, não indica a formação de aglomerados até os dias de hoje^(7,13,76,149). Em contrapartida, a interação entre a albumina e o coligante tricina é bem fundamentada na literatura, contudo, a

formação do suposto complexo ($^{99m}\text{Tc}/\text{HYNIC}/\text{tricina}/\text{EDDA}/\text{albumina}$) pode ser eliminada quando o perfil de eluição do complexo marcado via HYNIC foi traçado nas colunas PD-10.

Considerando tais afirmações, podemos verificar que os estudos de estabilidade metabólica *in vitro* frente a albumina após 90 minutos de incubação (FIG. 12) indicaram a formação de um único pico, demonstrando portanto, a alta estabilidade dos radioconjugados nestas condições. Em contrapartida, a avaliação metabólica em modelos animais, indicou uma fragmentação/degradação do conjugado marcado via HYNIC (FIG. 13A), e uma possível transquelação do conjugado marcado via MAG_3 a partir dos 30 min pi (FIG. 13B). Para o último, a hipótese de transquelação foi considerada, levando-se em conta que mais de 60% das proteínas plasmáticas são formadas por albumina, e correlacionando-se os dados de avaliação metabólica *in vivo* com os perfis cromatográficos obtidos na avaliação *in vitro* (FIG. 11A).

A presença de peptidases e proteases *in vivo* culminaram na principal diferença entre os perfis cromatográficos *in vitro* e *in vivo* obtidos para ambos radioconjugados. Embora a confirmação de uma possível transquelação frente à albumina não possa ser determinada para o conjugado marcado via HYNIC *in vivo*, claramente foi observada a degradação do radioconjugado no plasma, através da presença de picos sobrepostos na 14^o e 15^o frações aos 90 minutos pi.

Mesmo que a força do complexo via MAG_3 já tenha sido afirmada anteriormente nos estudos de transquelação frente ao aminoácido cisteína e ao tripeptídeo glutatona, o aumento da massa molecular do suposto agente transquelante (HSA), bem como, as múltiplas possibilidades de interação entre o radionuclídeo e a albumina podem ser possíveis explicações para o fenômeno. Além disso, uma redução da interação entre o metal e o conjugado marcado via MAG_3 , com subsequente substituição desta ligação por moléculas de albumina era esperada, desde que a literatura aponta uma maior interação entre fármacos lipofílicos e a albumina⁽¹⁶⁰⁾.

Um obstáculo enfrentado pela maioria dos estudos de metabolismo refere-se à dificuldade em se determinar a identidade dos metabólitos radiomarcados formados *in vivo*. Diversos estudos publicados identificam o peso

molecular dos metabólitos utilizando as técnicas de exclusão por tamanho ou eletroforese, contudo, elas não são suficientes para caracterizar a identidade destes metabólitos. Técnicas mais avançadas, como a cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa (LC-MS), tem sido recentemente utilizadas⁽¹⁴⁹⁾.

7.8. Saturação

O objetivo da maioria dos peptídeos em Medicina Nuclear está baseada na localização de um receptor ou outros sítios moleculares que são expressos por um grupo celular específico ou tecidos no corpo. A expressão deste receptor está restrita a certos tipos de células envolvidas em doenças, através da sua localização pelo radionuclídeo em processos patológicos específicos, e posterior utilização no diagnóstico ou terapia. A localização é alcançada pela exploração das interações físico-químicas entre o peptídeo e o receptor alvo, e são normalmente baseadas em ligações iônicas, hidrofóbicas ou outras de curto alcance entre as cadeias laterais dos aminoácidos constituintes dos peptídeos ao alvo. No entanto, sabe-se que uma pequena porção da dose injetada se ligará ao alvo, e normalmente mais que 99% não se ligará⁽⁶⁸⁾.

Os fatores que determinam a extensão da localização e especificidade do radioligante podem ser divididos entre aqueles relacionados ao receptor alvo (isto é, densidade, disponibilidade, etc), que geralmente não são ajustáveis ou manipuláveis; e aqueles conferidos ao peptídeo radiomarcado (isto é, afinidade de ligação, estabilidade frente as proteases do soro, entre outras), que podem ser facilmente modificados através do processo de modelamento do peptídeo^(68,143).

Neste sentido, ensaios de saturação medem a captação específica mediada pelos receptores do radioligante de interesse no equilíbrio em relação ao efeito causado pelo aumento da sua concentração nas células. Estes experimentos são utilizados para medir a constante de dissociação no equilíbrio (K_d) e o número total de receptores expressos nas células ($B_{máx}$). Quanto menores os valores encontrados de K_d , maior a afinidade do radioligante pelos receptores. Estes resultados podem representar excelentes indicadores *in vitro* de como o radioligante atuará *in vivo*, estimam a quantidade máxima permitida (μg de peptídeo) nos conjuntos de reagentes liofilizados (a fim de evitar uma saturação dos receptores).

Já os valores de $B_{\text{máx}}$ representam a capacidade máxima total dos receptores por unidade de massa da proteína/peptídeo⁽¹⁴³⁾.

Além disso, a utilização de diversos protocolos na determinação do K_d e do B_{max} é crucial para a ligação de peptídeos e/ou proteínas. Métodos utilizando a “Scatchard plot”, membranas e adição de concentrações do ligante não-radiomarcado estão sendo amplamente explorados⁽¹⁴³⁾. Muitos deles apresentam vantagens, mas a escolha do método apropriado é amplamente dependente de parâmetros como atividade específica do radioligante, ligação não-específica e tipo de amostra celular. Resultados discrepantes já foram relatados quando o método de isolamento das membranas (método que tem a finalidade de evitar a regulação interna receptor/peptídeo) foi utilizado em análogos tetra-ramificados da NT⁽⁹⁷⁾.

Os experimentos de saturação revelaram que ambos análogos radiomarcados são altamente saturáveis em intervalos nanomolares (FIG. 15). Isto indica não somente uma alta afinidade pelos receptores contidos na superfície das células MDA-MB-231, mas também sugerem uma alta especificidade dos análogos por tal linhagem.

Como um peptídeo multifacetado, o potencial clínico da NT modificada já foi mensurado através a saturação dos receptores de diversas linhagens celulares (em faixas nanomolares) na literatura^(4,116). Os melhores resultados obtidos até então foram relativos ao análogo duplamente estabilizado [NT(8-13)] em células adenocarcinoma de cólon HT-29.

Recentemente Garcia-Garayoa et al.⁽¹¹⁷⁾ sugeriram um novo análogo da NT, denominado de NT-XIX (TAB. 2). Este análogo demonstrou ser superior aos demais previamente estudados na literatura, quanto à constante de dissociação no equilíbrio ($K_d = 15,0$ nM) na linhagem tumoral HT-29. Comparativamente aos bons resultados obtidos com o análogo triplamente estabilizado NT-XIX, é esperado que os valores de K_d (17,2 e 20,3 nM, respectivamente, para os conjugados radiomarcados via HYNIC e MAG_3) obtidos na linhagem tumoral MDA-MB-231, apresentem também uma alta taxa de internalização, elevada retenção de atividade internalizada e uma captação tumoral desejável para subsequente visualização do tumor nas imagens cintilográficas.

Uma diferença (na ordem de dez vezes) relativa aos valores de $B_{\text{máx}}$ não era esperada, desde que o reconhecimento dos receptores acontece de uma única forma quando se trata de estudos realizados com a mesma biomolécula, considerando obviamente, que uma mínima ou nenhuma alteração estrutural é acometida pela presença ou não de AQB's diferentes. Logo, os discrepantes valores de $B_{\text{máx}}$ obtidos podem ser atribuídos à forma como os receptores “enxergam” as biomoléculas. Em outras palavras, o impedimento estérico causado pela hipótese levantada sobre a possível aglomeração ou forma de quelação ao radionuclídeo, do conjugado marcado via HYNIC realizada na avaliação *in vivo* da estabilidade metabólica pode ter consideráveis impactos não somente nos valores de $B_{\text{máx}}$ obtidos, mas também pode agir como fator preditivo nas possíveis diferenças obtidas no comportamento biológico dos radiocomplexos.

7.9. Internalização e externalização

A internalização é um importante mecanismo na comunicação intracelular, que compreende ambas a degradação e a reciclagem da maioria dos peptídeos agonistas e seus receptores, resultando no acúmulo celular do ligante (ou radioligante). Embora seja um fenômeno altamente variável e dependente dos tipos e subtipos de receptores envolvidos, este mecanismo desempenha um papel fundamental na intensidade do sinal cintilográfico^(78,80).

Historicamente, análogos da somatostatina marcados com ^{111}In foram os primeiros radiofármacos utilizados no imageamento de tumores que expressavam receptores para somatostatina⁽¹³⁾. Desde então, outros peptídeos regulatórios emergiram como potenciais candidatos para o imageamento dos receptores por cintilografia de diversas neoplasias, tais como os receptores do polipeptídeo vaso intestinal (que são expressos pela maioria de tumores epiteliais)⁽⁷⁾, e os receptores da substância P (utilizado na detecção de diversas doenças auto-imunes)^(12,78). Aliado a isso, é conhecida a participação ativa dos GPCRs em tumores de mama e de pulmão. Esta participação é o resultado de uma mutação de uma subunidade da proteína G, em que uma base e um aminoácido são danificados levando a um descontrolado processo de divisão celular pela ativação do gene responsável pela proliferação celular, então denominado gene *ras*⁽¹⁶⁷⁾.

O mecanismo de comunicação intracelular de peptídeos que expressam receptores da proteína G acontece de forma cíclica. Em outras palavras, após o reconhecimento do receptor pelo peptídeo, ele se internaliza provocando as diversas cascatas intracelulares correspondentes a transdução do sinal. Neste estágio, os receptores se mantêm internalizados, impedindo assim, o seu reconhecimento por outras moléculas do efector e/ou peptídeo. Após transdução do sinal, os receptores, também denominados receptores de superfície, se externalizam, reconhecendo outras moléculas, e por sua vez, repetem o ciclo⁽¹⁶⁸⁾.

Os estudos de internalização (FIG. 16) não revelaram um comportamento tempo-dependente de internalização para ambos radioconjugados, já que uma queda acentuada nos valores (após os 30 min de incubação com as células) foi observada para o análogo radiomarcado via HYNIC e em menor extensão para o análogo radiomarcado via MAG₃. Este comportamento já era esperado, não somente pela alta afinidade dos análogos radiomarcados pelos receptores das células MDA-MB-231 (faixa nM) obtidos nos estudos *in vitro* de saturação (FIG. 15), mas também pelo fato da internalização induzida por todos os bioradiocomplexos derivativos da NT resultarem em uma regulação do receptor em resposta às altas concentrações extracelulares do peptídeo como previamente descrito para análogos da NT em células HT-29⁽¹⁶⁹⁾. Contudo, estes resultados não condizem com aqueles retratados na literatura para os demais análogos da NT em células de adenocarcinoma de cólon das linhagens HT-29^(111,116) e WiDr⁽¹¹⁵⁾.

Diversos estudos com GPCRs demonstraram que receptores ocupados por agonistas, como é o caso dos análogos radiomarcados via HYNIC e MAG₃, são rapidamente internalizados, enquanto receptores ocupados por antagonistas permanecem na superfície celular após ligação aos receptores⁽¹⁷⁰⁾. Portanto, este mecanismo de regulação, pode explicar o decréscimo da internalização no tempo mais tardio, bem como pode representar um fator culminante a baixa reprodutibilidade do experimento.

Correlacionando os dados obtidos nos experimentos de avaliação *in vivo* da estabilidade metabólica nas proteínas plasmáticas (FIG. 13) àqueles obtidos nos experimentos de internalização, podemos observar que uma menor retenção do complexo marcado via HYNIC não foi obtida como o esperado no tempo mais tardio

avaliado (90 min). Como os experimentos de internalização ilustram uma mimética *in vitro* da interação do receptor com o peptídeo, a ausência de peptidases e proteases presentes no organismo nestes experimentos, manteve intacta a estrutura do radioconjugado, permitindo portanto, o reconhecimento do efetor/peptídeo ao receptor. Tal explicação se justifica através do mesmo comportamento obtido nos estudos de estabilidade *in vitro* frente a albumina do conjugado marcado via HYNIC aos 90 min após incubação (FIG. 12A), em que nenhuma degradação foi observada.

Desde que os análogos da NT(8-13) são agonistas e promovem sua ação através de receptores acoplados a proteína G, era esperado que ocorresse a endocitose mediada pelos GPCRs⁽¹⁷¹⁾. Embora o mecanismo de aprisionamento e/ou retenção intracelular específica que coordena a retenção da atividade do ^{99m}Tc nas células MDA-MB-231 ainda não seja totalmente conhecido, é esperado, que após a ligação e internalização dos conjugados da NT radiomarcados às células, as proteases lisossomais degradem os radiocomplexos [^{99m}Tc-NT] à fragmentos menores. Os fragmentos que por sua vez continuem acoplados ao ^{99m}Tc, seriam as espécies químicas responsáveis pela retenção da atividade nas células por um determinado período de tempo⁽¹⁷²⁾. Após a quebra lisossomal, a taxa de atividade retida na célula é mensurada através dos estudos de externalização.

A liberação da atividade das células MDA-MB-231 após a máxima internalização (30 min) (FIG. 16), revelaram que a taxa de liberação do conjugado marcado via MAG₃ ocorreu de forma mais lenta do que aquela observada para o complexo marcado via HYNIC. Ainda assim, ambos radiocomplexos apresentaram valores de atividade retida nas células superior aos 30% no tempo mais tardio avaliado. Comparativamente, os valores de atividade retida por longos períodos de tempo não é um fenômeno inesperado, desde que a literatura sustenta que para outros análogos da NT radiomarcados, valores acima de 50% de atividade retida foram obtidos após 24 horas do período de máxima internalização^(111,117). Além disso, a radioatividade residual por períodos prolongados constitui um parâmetro crucial no desenvolvimento de um novo radiofármaco, desde que possibilita a aquisição de imagens cintilográficas em tempos mais tardios, e aumenta o potencial terapêutico do radiofármaco, garantindo uma maior localização da droga no sítio alvo, e consequentemente, uma menor exposição do paciente frente à radiação.

7.10. Biodistribuição dos análogos radiomarcados em camundongos sadios

Um modelo ideal de biodistribuição, é aquele em que qualquer radioatividade não ligada ao tumor e/ou não-específica, seja rapidamente depurada do sangue e eficientemente excretada sem significativa retenção por nenhum órgão normal ou não-alvo. Desde que a depuração hepatobiliar é necessariamente acompanhada por um relativamente baixo trânsito gastrointestinal da droga, antes que a radioatividade seja depurada do corpo, uma rota de excreção inteiramente renal do radiofármaco é desejada. Também, a redução da quantidade de radioatividade retida em ambos nos órgãos não-alvos e na circulação sanguínea são parâmetros importantes na determinação do tempo de aquisição das imagens cintilográficas⁽¹⁷⁾.

Os resultados do estudo de biodistribuição dos conjugados radiomarcados em camundongos sadios, em termos de %DI/g e %DI/órgão estão sumarizados nas [figura 17 e 18](#) e na [tabela 5](#). Um comportamento similar pode ser observado para ambos radioconjugados. As principais diferenças relacionadas à acumulação da radioatividade podem ser atribuídas não somente à escolha do AQB, mas também à escolha da biomolécula carregadora.

Sabe-se que, quando um radiofármaco apresenta $^{99m}\text{TcO}_4^-$ livre, o mesmo é transportado para o estômago, aumentando assim, a captação neste órgão e prejudicando muitas vezes a qualidade da imagem. Nesse sentido, os baixos níveis de radiação encontrados no estômago em todos os tempos estudados, para ambos radioconjugados estudados, indicam uma mínima ou nenhuma dissociação *in vivo* dos radiocomplexos. Estes resultados corroboram com os dados obtidos nos estudos de transquelação, bem como, com a taxa consideravelmente baixa de associação dos radioconjugados às proteínas plasmáticas.

Desde que ações modulatórias da NT(8-13) em níveis periféricos já estão bem estabelecidos^(84,110,173), uma pronunciada captação no trato gastrointestinal pode ser esperada. O complexo radiomarcado via MAG_3 mostrou uma alta captação no intestino delgado aos 30 min pi, seguido por uma acentuada queda após os 120 min pi ([FIG. 18D](#)). Logo, a influência da biomolécula nestes resultados pode ser

eliminada pela comparação dos mesmos dados obtidos, nas mesmas condições, para o radiocomplexo marcado via HYNIC.

Em linhas gerais, quando peptídeos são marcados com o agente quelante bifuncional MAG_3 , uma significativa quantidade da depuração ocorre via hepatobiliar. Estudos na literatura apontam que o agente renal $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3$ é transportado para o trato gastrointestinal via sistema hepatobiliar⁽¹⁷⁴⁾, justificando portanto, uma remanescente captação nestes órgãos durante a excreção do radiofármaco mesmo em tempos tardios.

Como exemplo disso, Guhlke et al.⁽¹⁷⁵⁾ demonstraram que cerca de 50% do radiofármaco $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-RC160}$ foi depurado por esta rota em camundongos. Resultados similares foram obtidos por Decristoforo et al.⁽¹⁷⁶⁾ quando radiomarcaram análogos da somatostina, assim como, van Gog et al.⁽¹⁷⁷⁾ obtiveram uma elevada taxa de retenção da radioatividade nos intestinos (>40%) quando radiomarcaram o dipeptídeo biocitina.

Uma rápida taxa de eliminação da radioatividade do sangue e dos rins nos primeiros tempos estudados via HYNIC não estão de acordo com aqueles utilizando somente tricina como coligante⁽⁶⁹⁾. Estudos utilizando o sistema HYNIC/coligantes sugerem que derivados de HYNIC utilizando somente EDDA como coligante mostram uma predominate captação renal e baixa atividade nos demais órgãos devido a rápida excreção. Já no caso do sistema HYNIC/tricina uma relativa atividade hepática foi encontrada, com subsequente excreção mais lenta quando comparada ao sistema HYNIC/EDDA. Os achados nos estudos realizados quando somente a tricina foi utilizado como coligante podem estar relacionados às interações entre o tricina e proteínas plasmáticas⁽⁶⁸⁾. Dessa maneira, uma atenuação do caráter hidrofílico de radiofármacos, redução da LPP, e aumento da eliminação da radioatividade pelos rins podem acontecer nos sistemas que utilizam coligantes mixtos, tais como o tricina/EDDA e tricina/fosfina⁽¹⁵⁹⁾.

A rápida excreção renal observada para o conjugado radiomarcado via HYNIC resultou em baixas captações no sangue (FIG. 20), fígado e intestinos (FIG. 18) quando comparado ao complexo marcado via MAG_3 . Estes resultados de excreção foram também confirmados através da análise estatística referentes aos estudos de interação entre AQB e órgãos e da análise isolada da variável AQB (FIG.

19). Nos tempos mais tardios estudados, no caso do MAG_3 , pode ser observado que a maior porcentagem da dose total injetada está acumulada em ambos os fígado e intestinos (TAB. 5). Estes achados estão de acordo com os valores de coeficiente de partição, que demonstrou um caráter mais lipofílico e uma subsequente excreção hepatobiliar, quando comparado com a excreção predominantemente renal observada para o radiocomplexo marcado via HYNIC.

É importante salientar que o tempo de meia vida biológica de um radiofármaco está diretamente relacionado às suas propriedades estruturais bem como estabilidade do radiocomplexo *in vivo*. Portanto, uma rápida depuração de um fármaco em tempos precoces não demonstra ser um aspecto positivo, no que tange ao seu tempo de circulação no organismo, e conseqüentemente ao seu tempo de acumulação nos sítios tumorais. No entanto, as %DI calculadas para sangue, músculo e osso totais (FIG. 20 e 21), indicam que a realização da avaliação em modelos tumorais seria mais adequada em um tempo igual ou superior aos 90 min pi, onde valores superiores a 96% e 83% da dose injetada foram depurados, para os análogos radiomarcados via HYNIC e MAG_3 , respectivamente.

O conjunto de dados apresentados na biodistribuição em animais sadios representa indicadores para a escolha e/ou determinação dos melhores tempos para a realização dos estudos nos animais portadores de tumor. A %DI/órgão (FIG. 20 e 21; TAB. 5) nos direciona quanto à distribuição e comportamento do radiofármaco no corpo, tempo de depuração sanguínea e tempo de acumulação do radiotraçador no corpo, constituindo assim, um conjunto de pré-requisitos essenciais para aquisição da imagem cintilográfica, bem como tempo de exposição da dose ao paciente. Já a %DI/g (FIG. 17 e 18) se ocupa da padronização destes dados, evitando assim, a retirada de conclusões inadequadas, desde que órgãos e/ou tecidos não possuem as mesmas dimensões.

Baseado nestes indicadores e da ampla pesquisa já relatada na literatura com análogos da NT radiomarcados⁽¹¹⁰⁻¹¹⁶⁾, a realização dos estudos em modelos tumorais foram realizados aos 30 e 90 minutos após administração dos radiocompostos.

7.11. Biodistribuição em camundongos portadores de tumor

Geralmente, a escolha de um modelo tumoral adequado para a avaliação de um novo radiopeptídeo representa um grande desafio. Idealmente, a escolha deste modelo deveria permitir a avaliação do comportamento do novo radiotraçador sob condições que mimetizem as reais condições em tumores humanos, ou mesmo, o mais próximo possível. Esta é a razão pela qual em muitos casos células tumorais de origem humana são utilizadas na inoculação em camundongos imunodeficientes (*Nude*), tais como, as células da linhagem tumoral humana de mama MDA-MB-231 presente neste trabalho. Além disso, estudos comparativos sugerem que somente quando modelos em que células tumorais humanas são implantadas em camundongos, as características farmacológicas e de ligação aos receptores são refletidas corretamente em pacientes, no caso de radiotraçadores que possuem afinidade pelos GPCRs⁽¹⁷⁸⁾.

Um similar perfil farmacocinético (TAB. 6) foi observado para ambos análogos radiomarcados. As principais diferenças encontradas foram respectivas aos valores mais acentuados para os órgãos de excreção, onde, não somente valores similares para a captação renal foram obtidos para ambos conjugados radiomarcados, mas também uma discrepante captação hepática e intestinal foi observada para o análogo radiomarcado via MAG₃, em ambos tempos avaliados. Estes resultados estão em pleno acordo com aqueles estimados no perfil farmacocinético obtido em camundongos sadios (FIG. 17 e 18), e reafirmam a excreção exclusivamente renal para o conjugado marcado via HYNIC, em contrapartida à dupla excreção (renal e hepatobiliar) no caso do complexo marcado via MAG₃.

Correlacionando os dados obtidos na caracterização dos bioradiocomplexos como potenciais agentes diagnósticos, observamos primeiramente, que a mais alta lipofilicidade do conjugado marcado via MAG₃, está de acordo com a elevada captação encontrada no fígado e nos intestinos, e a similar captação sanguínea obtida no perfil farmacocinético de ambos análogos radiomarcados, corroboram com a similar porcentagem de LPP.

Em linhas gerais, caso os análogos radiomarcados sejam utilizados para fins terapêuticos, uma elevada captação nos rins pode resultar em toxicidade

renal⁽¹⁷⁹⁾, e além disso, um efeito negativo no potencial efeito terapêutico do radiofármaco peptídico pode se proceder. Inúmeras estratégias têm sido desenvolvidas na tentativa de reduzir a captação renal, como a administração de aminoácidos básicos, catiônicos (isto é, L-lisina e arginina), ou mesmo a infusão de doses baixas de expansores de plasma baseados em gelatina^(180,181). A alta captação no trato gastrointestinal, através de receptores específicos da NT presentes neste tecido, pode também ser um fator limitante na dose aplicada aos pacientes. Ao contrário dos rins, o intestino é um órgão que possui uma rápida reposição celular, e sintomas de toxicidade intestinal provocadas pela radiação podem aparecer precocemente, durante ou pouco após a radioterapia. Menos freqüente, a toxicidade crônica intestinal pode ocorrer tardiamente, sendo normalmente caracterizada pela progressiva fibrose da parede intestinal e a esclerose vascular. Atualmente, diferentes métodos têm sido avaliados na tentativa de proteger o intestino contra esta toxicidade, tais como a interleuquina-11, imunomoduladores, inibidores receptores ativados por proteinase, entre outros⁽¹¹⁷⁾.

Com relação à captação tumoral, uma manutenção da acumulação foi observada para o conjugado marcado via MAG₃ ($1,83 \pm 0,67$ %DI/g), ao contrário da brusca queda observada para o traçador radiomarcado via HYNIC ($0,44 \pm 0,02$ %DI/g) aos 90 min pi. Este fato pode ser comprovado através da avaliação *in vivo* da estabilidade metabólica dos radioconjugados aos 90 min pi (FIG. 13). Através de estudos realizados por diversos grupos de pesquisa na literatura, a parte ativa da NT, e portanto, a responsável pela ligação aos receptores celulares está compreendida entre os aminoácidos Arg⁸---Leu¹³⁽¹⁸²⁾. Qualquer modificação, degradação ou clivagem na porção N-terminal da NT gera a perda da atividade biológica do peptídeo, reduzindo conseqüentemente, o seu reconhecimento pelo receptor⁽¹¹⁰⁾. Logo, como a avaliação da estabilidade metabólica indicou uma degradação do conjugado marcado via HYNIC aos 90 min pi, era esperado que uma redução da captação tumoral ocorresse.

O tempo de residência no sítio tumoral é um parâmetro importante a ser considerado. Apesar dos estudos de saturação (FIG. 15) indicarem uma afinidade similar para ambos análogos radiomarcados e o comportamento dos mesmo nos estudos de internalização e efluxo terem sido equivalentes (FIG. 16), a avaliação da

estabilidade metabólica foi determinante para o entendimento do baixo tempo de residência tumoral do análogo radiomarcado via HYNIC. Ao contrário do que foi observado no presente estudo, García-Garayoa et al.^(110,117) realizaram estudos com o mesmo análogo, em células tumorais de cólon da linhagem HT-29. Além da alta afinidade pelos receptores desta linhagem tumoral (faixa nM), foi observada uma rápida internalização dos análogos da ^{99m}Tc -NT(8-13), atingindo o ápice aos 30 min e mantendo-se elevada até 120 min após incubação com as células HT-29. Isso pode ser atribuído à linhagem celular estudada, bem como aos mecanismos de internalização do radiocomposto nas células desta linhagem tumoral.

Estudos na literatura apontam o potencial diagnóstico e terapêutico do análogo radiomarcado NT-XII (o mesmo utilizado no presente estudo) através da sua radiomarcagem com os radioisótopos ^{99m}Tc ⁽¹¹⁰⁾ e ^{188}Re ⁽¹¹⁷⁾. Apesar de uma captação tumoral superior (> 5%DI/g aos 90 min pi) ter sido observada quando NT-XII foi radiomarcado, a linhagem celular avaliada (células HT-29) e o núcleo de $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$ (núcleo $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$ -carbonila) utilizados foram diferentes dos adotados no presente estudo. Similarmente, novos análogos da NT continuaram a ser sintetizados para caracterização de um novo radiofármaco. Estes, apresentaram uma maior captação tumoral (>6%DI/g), boa depuração sanguínea e rápida cinética de excreção⁽¹¹⁷⁾.

A avaliação das razões tumor/órgãos não-alvos agem como fatores preditivos na aquisição das imagens cintilográficas, bem como para os estudos clínicos. Primordialmente, razões elevadas de T/S, T/M e T/O são essenciais para uma boa visualização tumoral, já que correspondem a boa parte do peso corpóreo. Neste sentido, as baixas razões tumor/órgãos não-alvos encontradas para ambos análogos radiomarcados no tempo mais precoce avaliado (30 min) (FIG. 22) indica que a visualização tumoral pode ser comprometida. Em contrapartida, como a captação tumoral encontrada para o análogo radiomarcado via MAG_3 se manteve no tempo mais tardio avaliado (90 min), aliada à elevada depuração da radioatividade nos órgãos não-alvos no tempo mais tardio avaliado (90 min), os índices das razões tumor/órgãos não-alvos foram favorecidos, fato este não observado para o traçador marcado via HYNIC.

Os estudos de bloqueio dos receptores específicos (TAB. 6) se ocupam da especificidade do produto, ou seja, quando uma quantidade da droga fria [isto é, NT(8-13) não-radiomarcada] é administrada previa ou simultaneamente, a mesma age bloqueando os órgãos/tecidos que apresentam receptores específicos para a biomolécula carregadora.

Dessa forma, em camundongos portadores de tumor que receberam uma quantidade de droga fria (bloqueados), houve uma similaridade de captação em todos os órgãos quando comparados aos camundongos não-bloqueados, exceto, pela significativa redução da captação nos intestinos e no tumor para ambos análogos radiomarcados em ambos tempos avaliados (30 e 90 min pi). Este comportamento era esperado desde que segundo a literatura^(110, 111, 112), o tumor e os intestinos apresentam NTR-1, bloqueando portanto, a ação do radiofármaco. Além disso, um efetivo bloqueio de órgãos que apresentam receptores para a biomolécula em estudo, agem como fator confirmatório de que a mesma ainda continua ativa e desempenhando sua ação mesmo após as condições de armazenamento por períodos prolongados.

Um planejamento experimental estatístico é recomendado antes do início do desenvolvimento de todo trabalho científico, buscando ao máximo, minimizar os experimentos realizados no laboratório. Embora estes planejamentos representem ferramentas valiosas no controle de parâmetros e na otimização de procedimentos, o controle de todas as variáveis se torna difícil em avaliações em sistemas biológicos. Primordialmente, isso se deve à complexidade dos modelos animais aliado às diferentes respostas de organismo para organismo frente a agentes externos. Neste sentido, diversas modalidades e técnicas estatísticas têm sido utilizadas na interpretação de resultados discrepantes, bem como, no melhor entendimento da influência de uma gama de variáveis, associadas ou independentemente, sobre os fatores resposta.

A técnica de mínimos quadrados parciais foi aplicada com o objetivo de explicar a influência das variáveis selecionadas na captação tumoral (FIG. 23). A significativa ausência de efeito nas variáveis resposta pelos radioconjugados, pode ser explicada pelo fato de nenhuma perda de atividade biológica da biomolécula ter sido conferida aos AQB. Apesar da relação direta obtida entre a porcentagem de

dose retida na cauda e a captação tumoral no gráfico de marcas (FIG. 23A), a sua importância individual na projeção foi insignificante (FIG. 23 B). A atividade biológica do radiofármaco também foi aferida através da avaliação da presença ou ausência de bloqueio. Assim, pode ser observado que um bloqueio mais efetivo foi principalmente encontrado para aquelas amostras em que o complexo marcado via MAG_3 foi administrado, onde no tempo mais precoce, a influência do bloqueio foi maior e consequentemente a captação tumoral reduzida (FIG. 23C).

7.12. Aquisição de imagem cintilográfica

Como última etapa de um estudo pré-clínico, a aquisição de imagens cintilográficas reafirmam todas as demais avaliações que caracterizam um radiofármaco, além de permitir avaliar a clareza e nitidez com que o potencial radiofármaco atinge os sítios alvos. Neste sentido, no tempo mais precoce avaliado, em que ambos radioconjugados tiveram captação tumoral semelhante, a visualização do tumor foi possível, mas ainda, consideráveis níveis de acumulação da radioatividade no sangue, para ambos radioconjugados, atenuaram a visualização tumoral. O maior valor de ROI obtido para a bexiga e ausência de captação no trato gastrointestinal salientou a exclusiva excreção renal do radioconjugado marcado via HYNIC. Em contrapartida, a relativamente elevada captação no trato gastrointestinal e reduzida eliminação através do ROI calculado para a bexiga, no caso do conjugado marcado via MAG_3 , comprovou a sua dupla excreção (renal e hepatobiliar) e também está de acordo com ambos os valores de coeficiente de partição e o comportamento da cinética de excreção obtido no modelo utilizando camundongos portadores de tumor. No tempo mais tardio avaliado, a rápida depuração sanguínea, a retenção tumoral e as elevadas razões tumor/órgãos não-alvo obtidas para o traçador marcado via MAG_3 , permitiu uma visualização tumoral mais clara. Já no caso do radioconjugado via HYNIC, a baixa captação tumoral no tempo mais tardio avaliado (90 min) foi confirmada, também, através do fraco contraste obtido nas imagens cintilográficas. Isso já era esperado, desde que a avaliação *in vivo* da estabilidade metabólica do radiocomplexo sugeriu uma degradação neste tempo.

Analogamente, Palmedo et al.⁽¹⁸³⁾ investigaram se o estadiamento e o diagnóstico primário de câncer de mama em pacientes podem ser melhorados através da aquisição de imagens utilizando a tomografia de emissão por pósitron ou a cintilografia. As duas modalidades de imagem têm demonstrado um valor limitado na detecção de pequenos linfonodos metastáticos, ou mesmo, de tumores primários. Além da resolução espacial do sistema, um outro fator importante que contribui para uma alta taxa de detecção tumoral é a especificidade do radiofármaco. Em um estudo clínico comparativo utilizando FDG, MIBI e DMSA(V) na detecção de tumores de mama, a incomparável superioridade do ^{18}F -FDG foi obtida na detecção deste tipo de tumores em relação aos outros radiofármacos avaliados. Contudo, a superioridade da técnica no emprego do ^{18}F -FDG foi estimada em termos da razão tumor/músculo, das dimensões do tumor e do mecanismo de localização do radiofármaco. Embora elevadas razões tumor/músculo tivessem sido obtidas, a especificidade e sensibilidade da técnica empregada foi amplamente dependente do tamanho tumoral.

7.13. Considerações finais

A incessante busca por novos radiofármacos, quimicamente melhor formulados e com mecanismos de detecção cada vez mais específicos, vem motivando, nas últimas décadas, a procura pelo desenvolvimento dos denominados radiofármacos alvo específicos. Aliado a isso, embora a tomografia de emissão por pósitron (PET) seja uma modalidade de imagem incomparavelmente superior à outras rotineiramente empregadas em medicina nuclear na detecção de tumores de mama, os altos custos envolvidos e a ineficiência na visualização de tumores menores que 1 cm ainda constituem um problema.

Nesse sentido, a utilização de peptídeos bioativos, que regulam uma grande variedade de funções fisiológicas no organismo, desempenham um papel crucial em condições patológicas e representam alvos atrativos para o diagnóstico tumoral⁽¹¹⁷⁾. Aqueles considerados de elevado potencial clínico, por reunirem características como elevada estabilidade *in vitro* e *in vivo*, alta captação tumoral e por fim alta razão órgão alvo/não-alvo, mas que, contudo, apresentam uma lenta ou indesejável excreção hepatobiliar (isto é, como no caso dos complexos formados via

MAG₃) tem sido redesenhados para que sua promissora aplicação não seja comprometida.

Visando contornar a cinética de excreção do análogo radiomarcado via MAG₃, seria necessário um estudo mais detalhado, no sentido de modificar sua rota de excreção (renal e hepatobiliar), desde que uma excreção renal é preferencialmente desejável para radiofármacos. As modificações da rota farmacocinética podem ser realizadas através da inserção de espaçadores; da formação de núcleos carregados negativamente ou positivamente; e da substituição de aminoácidos nos AQB. Apesar do papel destas modificações na forma de ação destes radiotraçadores não serem totalmente conhecidos, diversos estudos na literatura retratam estudos comparativos utilizando essas ferramentas como pontos de partida para possíveis soluções no atual contexto dos radiofármacos de terceira geração.

Também, as perspectivas futuras na utilização de diferentes modalidades e agentes de imagem, em geral, levarão a uma ortogonalidade diagnóstica, através da combinação independente e não correlacionada destas tecnologias. A combinação das informações obtidas, após compiladas em um mapa bioinformativo, aumentarão a especificidade e sensibilidade no diagnóstico, consequentemente, elevando as taxas de sobrevivência de pacientes diagnosticados com câncer.

Vale a pena ressaltar também, que pela participação da biomolécula multi- facetada NT, em uma gama de processos biológicos ser bem documentada na literatura⁽⁸⁵⁾, sua aplicação não se restringe à utilização em tumores de mama, como demonstrado. A partir do redesenho estrutural do radiofármaco ^{99m}Tc-S-acetil-MAG₃-βAla-NT(8-13), utilizações na detecção precoce de outros tumores poderão ser averiguadas e os mecanismos de interação (isto é, radiofármaco- linhagem tumoral) estudados.

8. CONCLUSÃO

A superioridade do traçador marcado via MAG_3 foi comprovada no presente estudo. Isso se deve, primordialmente, à sua boa definição estrutural, refletida em todos os parâmetros avaliados. Embora similares perfis radioquímico, de estabilidade frente a agentes transquelantes, ligação aos receptores celulares na linhagem de mama proposta tenham sido obtidos para ambos radioconjugados, a resistência a degradação por proteases e peptidases, levou a uma maior retenção tumoral e às maiores razões tumor/órgãos-não-alvo, gerando o melhor contraste nas imagens no tempo mais tardio avaliado para o complexo marcado via MAG_3 . No entanto, a alta captação no trato gastrointestinal observada para o análogo marcado via MAG_3 , representa uma limitação à sua potencial aplicação como agente diagnóstico ou terapêutico. Neste sentido, um redesenho estrutural deve ser realizado, a fim de que sua aplicabilidade não seja comprometida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 LIU, S. The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals. **Chem. Soc. Rev.**, v. 33, p.445-461, 2004.
- 2 OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; FERREIRA, D.; COELHO, P. VEIGA, F. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. **Rev. Bras. Ciênc. Farmac.**, v. 42, p. 151-65, 2006.
- 3 ECKLEMAN, W. C. Sensitive of New Radiopharmaceuticals. **Nucl. Med. Biol.** v. 25, p. 169-173, 1998.
- 4 BANERJEE, S. R.; MARESCA, K. P.; FRANCESCONI, L.; VALLIANT, J.; BABICH, J. W.; ZUBIETA, J. New directions in the coordination chemistry of ^{99m}Tc : a reflection on technetium core structures and a strategy for new chelate design. **Nucl. Med. Biol.** v. 32, p. 1-20, 2005.
- 5 Van DALEN, J.; VOGEL, W. V.; CORSTENS, F. H. M.; OYEN, W. G. J. Multi-modality nuclear medicine imaging: artefacts, pitfalls and recommendations. **Canc. Imag.**, v. 7, p. 77-83, 2007.
- 6 SCHILLACI, O. and Simonetti, G. Fusion imaging in Nuclear Medicine – applications of dual-modality systems in oncology. **Canc. Biother. Rad.**, v. 19, p. 1-10, 2004.
- 7 LIU, S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 60, p. 1347-1360, 2008.
- 8 JURISSON, S; BERNING, D; JIA, W.; MA, D. Coordination compounds in Nuclear Medicine. **Chem. Rev.**, v. 93, p. 1137-1156, 1993.
- 9 BLOK, D.; FEITSMA, R. I. J.; VERMEIJ, P.; PAUWELS. E. J. K. Peptide radiopharmaceuticals in nuclear medicine. **Eur. J. Nucl. Med.**, v. 26, p. 1511-1519, 1999.
- 10 SAHA, G. B. **Fundamentals of Nuclear Pharmacy**, 4.ed. New York, N. Y.: Springer-Verlag, 1997.
- 11 LIU, S.; EDWARDS, D. S. ^{99m}Tc -labeled small peptides as diagnostic radiopharmaceuticals. **Chem. Rev.**, v. 99, p. 2235-2268, 1999.
- 12 OKARVI, S. M. Peptide-based radiopharmaceuticals: Future tools for diagnostic imaging of cancer and other diseases. **Med. Res. Rev.**, v. 24, p. 357-397, 2004.
- 13 OKARVI, S. M. Peptide-based radiopharmaceuticals and cytotoxic conjugates: Potencial tools against cancer. **Canc. Treat. Rev.**, v. 34, p. 13-26, 2008.
- 14 LIN, C. C.; CHAO, J. H. Radiochemistry of Iodine: Relevance to health and disease. **Comprehensive Handbook of Iodine**, p.171-182, 2009.

-
- 15 SRIVASTAVA, S. and DADACHOVA, E. Recent advances in radionuclide therapy. **Sem. Nucl. Med.**, v. 31, p. 330-341, 2001.
 - 16 MARQUES, F. L. M.; OKAMOTO, M. R. Y.; BUCHPIGUEL, C. A. Alguns aspectos sobre geradores e radiofármacos de tecnécio-99m e seus controles de qualidade. **Radiol. Bras.**, v.34, p. 233-39, 2001.
 - 17 SCHOTELLIUS, M.; WESTER, H. Molecular imaging targeting peptide receptors. **Methods**, v. 28, p. 161-177, 2009.
 - 18 KORNIEI, J. and OZKER, K. Technetium-99m radiopharmaceuticals: manufacture of kits. Technical Report Series n. 466 - **International Atomic Energy Agency**. Vienna, 2008.
 - 19 FAINTUCH, B. L. **Estudo de marcação, biodistribuição e análise compartimental da N-acetilcisteína marcada com ^{99m}Tc . Investigação comparativa com MIBI- ^{99m}Tc** . 1997. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Universidade de São Paulo, São Paulo.
 - 20 JONGE, F. A. A. and PAUWELS, E. K. J. Technetium, the missing element. **Eur. J. Nucl. Med.**, v. 23, p. 336-344, 1996.
 - 21 BANERJEE, S.; PILLAI, M. R. A.; RAMAMOORTHY, N. Evaluation of Tc-99m in diagnostic radiopharmaceuticals. **Sem. Nucl. Med.**, v. 31, p. 260-277, 2001.
 - 22 JURISSON, S. S.; LYDON, J. D.; Potencial Technetium small molecule radiopharmaceutical. **Chem. Rev.**, v. 99, p. 2205-2218, 1999.
 - 23 DEUTSCH, E. A.; LIBSON, K.; JURISSON, S. Technetium chemistry and technetium radiopharmaceuticals, in Lippard, S. J. (ed): **Progress in Inorganic Chemistry**. New York, John Wiley & Sons, Inc, p. 75-139, 1983.
 - 24 ALBERTO, R. **Technetium. Comprehensive Coordination Chemistry-II**. J. Mc Cleverty, T.S. Meer (Eds), v. 4. Amsterdam, Holand: Elsevier Science, 2003.
 - 25 KHARISOV, B. I. and MENDES-ROJAS, M. A. State-of-the-art coordination chemistry of radioactive elements. **Russian Chem. Rev.**, v. 70, p. 865-874, 2001.
 - 26 JURISSON, S. S. Tc and Re peptide chemistry: direct labeling. In NICOLINI, M.; MAZZI, U. (Ed.). **Technetium, rhenium and other metals in chemistry and nuclear medicine**. Padova, Italy: SGEEditoriali, 2002, v. 6, p. 15-21.
 - 27 WELCH, M. J.; REDVANLY, C. S. **Handbook of Radiopharmaceuticals – Radiochemistry and Applications**. England: Wiley, 2003.
 - 28 BOYD, R. E. Technetium-99m Generators – The Available Options. **Int. J. Ap. Rad. Isot.**, v. 33, p. 801-809, 1982.

-
- 29 ALBERTO, R.; SCHIBLI, R.; WAIBEL, R.; ABRAM, U.; SCHUBIGER, A. Basic aqueous chemistry of $[M(OH)_3(CO)_3]^+$ ($M = Re, Tc$) directed towards radiopharmaceutical application. **Coord. Chem. Rev.**, v. 190-192, p. 901-919, 1999.
- 30 TISATO, F.; PORCHIA, M.; BOLZATI, C.; REFOSCO, F.; VITTADINI, A. The preparation of substitution-inert ^{99}Tc metal-fragments: Promising candidates for the design of new ^{99m}Tc radiopharmaceuticals. **Coord. Chem. Rev.**, v. 250, p. 2034-2045, 2006.
- 31 MENDEZ-ROJAS, M. A.; KHARISOV, B. I.; TSIVADZE, A. Y. Recent advances on technetium complexes: coordination chemistry and medical applications. **J. Coord. Chem.**, v. 59, p.1-63, 2006.
- 32 FRIER, M.; GRIFFITHS, P.; RAMSEY, A. The physical and chemical characteristics of sulphur colloids. **Eur. J. Nucl. Med.**, v. 6, p. 255–260, 1981.
- 33 SUBRAMANIAN, G.; McAFEE, J.J.; BLAIR, R. ^{99m}Tc methylenediphosphonate: A superior agent for skeletal imaging - Comparison with other Tc complexes, **J. Nucl. Med.**, v.16, p. 744–754, 1977.
- 34 ARNOLD, R.W.; SUBRAMANIAM, G.; MCAFEE, J. G.; BLAIR, R. J.; THOMAS, F. D. Comparison of ^{99m}Tc complexes for renal imaging. **J. Nucl. Med.**, v. 16, p. 357–367, 1975.
- 35 WACKERS, F.J.; BERMAN, D. S.; MADDAHI, J.; WATSON, D. D.; BELLER, G. A.; STRAUSS, H. W.; BOUCHER, C. A.; PICARD, M.; HOLMAN, B. L.; FRIDRICH, R.; INGLESE, E.; DELALOYE, B.; BISCHOF-DELALOYE, A.; CAMIN, L.; MCKUSICK, K. Technetium-99m hexakis 2-methoxyisobutyl isonitrile: Human biodistribution, dosimetry, safety and preliminary comparison to thallium-201 for myocardial perfusion imaging. **J. Nucl. Med.**, v. 30, p. 301–311, 1989.
- 36 KELLY, J.D.; FORSTER, A. M.; HIGLEY, B.; ARCHER, C. M.; BOOKER, F. S.; CANNING, L. R.; CHIU, K. W.; EDWARDS, B.; GILL, H. K.; MCPARTLIN, M.; NAGLE, K. R.; LATHAM, I. A.; PICKETT, R. D.; STOREY, A. E.; WEBBON, P. M. Technetium-99m-tetrofosmin as a new radiopharmaceutical for myocardial perfusion imaging. **J. Nucl. Med.**, v. 34, p. 222–227, 1993.
- 37 ASENBAUM, S.; BRUCKE, T.; PIRKER, W.; PIETRZYK, U.; PODREGA, I. Imaging of cerebral blood flow with technetium-99m HMPAO and technetium-99m-ECD: A comparison, **J. Nucl. Med.**, v. 39, p. 613–618, 1998.
- 38 VANBILLOEN, H. P.; CLEYNHENS, B. J.; VERBRUGGEN, A. M. Importance of the two ester functions for the brain retention of ^{99m}Tc -labelled ethylene dicysteine diethyl ester (^{99m}Tc -ECD). **Nucl. Med. Biol.**, v. 25, p. 569-575, 1998.
- 39 BORMANS, G.; CLEYNHENS, B.; ADRIAENS, P.; VANBILLOEN, H.; DE ROO, M.; VERBRUGGEN, A. Investigation of the labelling characteristics of ^{99m}Tc -mercaptoacetyltriglycine. **Nucl. Med. Biol.**, v. 22, p. 339–349, 1995.

-
- 40 NUNN, A.D.; LOBERG, M.D.; CONLEY, R.A. A structure-distribution relationship approach leading to the development of ^{99m}Tc -mebrofenin: An improved cholescintigraphic agent. **J. Nucl. Med.**, v. 24, p. 423–430, 1983.
- 41 ALBERTO, R.; SCHIBLI, R.; EGLI, A.; SCHUBIGER, A. P. A novel organometallic aqua complex of technetium for the labelling of biomolecules: Synthesis of $^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3^+$ from $^{99m}\text{TcO}_4^-$ in aqueous solution and its reaction with a bifunctional ligand. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 120, p. 7987–7988, 1998.
- 42 BALDAS, J. and BONNYMAN, J. Effect of the Tc-nitrido group on the behaviour of ^{99m}Tc -radiopharmaceuticals. **Int. J. App. Radiat. Isot.**, v. 36, p. 919–923, 1985.
- 43 RENNEN, H.J.; BOERMAN, O.C.; KOENDERS, E.B.; OYEN, V.J.; CORSTENS, F.H. Labelling proteins with ^{99m}Tc via hydrazinonicotinamide (HYNIC): Optimization of the conjugation reaction. **Nucl. Med. Biol.**, v. 27, p. 599–604, 2000.
- 44 PLACHCINSKA, A.; MIKOLAJCZAC, R.; MAECKE, H. R.; MLODKOWSKA, E.; KUNERT-RADEK, J.; MICHALSKI, A.; RZESZUTEC, K. KOZAK, J.; KUSMIEREK, J. Clinical usefulness of ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-TOC scintigraphy in oncological diagnostics: A preliminary communication. **Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.**, v. 30, p. 1402–1406, 2003.
- 45 KUNG, H.F. Development of ^{99m}Tc labelled tropanes: TRODAT-1 as dopamine transporter imaging agent. **Nucl. Med. Biol.**, v. 28, p. 505–508, 2001.
- 46 ALBERTO, R.; SCHIBLI, R.; EGLI, A.; SCHUBIGER, P. A.; HERMANN, W. A.; ARTUS, G.; ABRAM, V.; KADEN, T. A. Metal carbonyl syntheses XXVII. Low-pressure carbonylation of $[\text{MoCl}_4]^-$ and $[\text{MoO}_4]^-$. The technetium(I) and rhenium(I) complexes $[\text{Net}_4]_2[\text{MCl}_3(\text{CO})_3]$. **J. Org. Chem.**, v. 492, p. 217–224, 1995.
- 47 FICHNA, J.; JANECKA, A. Synthesis of target-specific radiolabeled peptides for diagnostic imaging. **Bioconj. Chem.**, v. 14, p. 3–17, 2003.
- 48 KOWALSKY, R.J. & FALEN, S.W. **Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy and Nuclear Medicine**. 2. ed. Washington, DC: American Pharmacists Association, 2004.
- 49 ARANO, Y. Recent advances in ^{99m}Tc radiopharmaceuticals. **Annals of Nucl. Med.**, v. 16, p. 79–93, 2002.
- 50 KASINA, S.; SANDERSON, J.A.; FITZNER, J.N.; SRINIVASAN, A.; RAO, T.N.; HOBSON, L.J.; RENO, J.N.; AXWORTHY, D.B.; BEAUMIER, P.L.; FRITZBERG, A.R. Simplified preformed chelate protein radiolabeling with technetium-99m mercaptoacetamidoadipoylglycylglycine (N_3S -adipate). **Bioconj. Chem.**, v. 9, p. 108–117, 1998.

-
- 51 LIU, S.; EDWARDS, D.S. New N_2S_2 diamidedithiol and N_3S triamidethiols as bifunctional chelating agents for labelling small peptides with technetium-99m. 4. ed. In: Nicolini M., Bandoli G., Mazzi U. (Ed.). ***Technetium and Rhenium in chemistry and Nuclear Medicine***, Padova: SGEEditoriali, p. 383-393, 1995.
- 52 GANO, L.; PATRÍCIO, L.; MARQUES, E.; CANTINHO, G.; PENA, H.; MARTINS, T.; HNATOWICH, D.J. Human Polyclonal Immunoglobulin Labelled with Technetium-99m via NHS-MAG₃: A Comparison of Radiochemical Behavior and Biological Efficacy with Other Labelling Methods. ***Nucl. Med. Biol.***, v. 25, p. 395-403, 1998.
- 53 FRITZBERG, A. R.; KASINA, S.; ESHIMA, D.; JOHNSON, D. L. Synthesis and biological evaluation of technetium-99m MAG₃ as a hippuran replacement. ***J. Nucl. Med.***, v. 27, p. 111-116, 1986.
- 54 REYES, L.; NAVARRETE, M. Synthesis and preliminary study of ^{99m}Tc-mercaptoacetyl-triglicine (^{99m}Tc-MAG₃) for radiolabeling of imune globulins. ***J. Rad. Nucl. Chem.***, v. 251, p. 245-248, 2002.
- 55 VISSER, G. W.; GERRETSEN, M.; HERSCHEID, J. D.; SNOW, G. B.; VAN DONGEN, G. Labeling of monoclonal antibodies with rhenium-186 using the MAG₃ chelate for radioimmunotherapy of cancer: a technical protocol. ***J. Nucl. Med.***, v. 34, p. 1953-1963, 1993.
- 56 LIU, G.; DOU, S.; HE, J.; YIN, D.; GUPTA, S.; ZHANG, S.; WANG, Y.; RUSCKOWSKI, M.; HNATOWICH, D. J. Radiolabeling of MAG₃-morpholino oligomers with ¹⁸⁸Re at high labeling efficiency and specific radioactivity for tumor pretargeting. ***Appl. Rad. Isot.***, v. 64, p. 971-978, 2006.
- 57 WANG, Y.; LIU, G. and HNATOWICH, D. J. Methods for MAG₃ conjugation and ^{99m}Tc radiolabeling of biomolecules. ***Nature Protocols***, v. 1, p. 1477-1480, 2006.
- 58 WINNARD Jr., P.; CHANG, F.; RUSCHOWSKI, M.; MARDIROSSIAN, G. and HNATOWICH, D. J. Preparation and use of NHS-MAG₃ for technetium-99m labeling DNA. ***Nucl. Med. Biol.***, v. 24, p. 425-432, 1997.
- 59 ABRAMS, M. J.; JUWEID, M.; TENKATE, C. I.; SCHWARTZ D. A.; HAUSER M. M.; GAUL F. E. Technetium-99m human polyclonal IgG radiolabeled via the hydrazino nicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rats. ***J. Nucl. Med.***, v. 31, p. 2022-2028, 1990.
- 60 HNATOWICH, D. J.; MARDIROSSIAN, G.; RUSCOWSKI, M.; FORGARASI, M.; VIRZI, F.; AND WINNARD, P. Directly and indirectly technetium-99m labeled antibodies: A comparison of in vitro and animal in vivo properties. ***J. Nucl. Med.***, v. 34, p. 109-119, 1993.

-
- 61 van der LAKEN, C. J.; BOERMAN, O. C.; OYEN, W. J. G.; van der VEM, M. T. P.; EDWARDS, D. S.; BARRETT, J. A.; van der MEER, J. W. M. and Corstens, F. H. M. Technetium-99m-labeled chemotactic peptides in acute infection and sterile inflammation. **J. Nucl. Med.**, v. 38, p. 1310-1315, 1997.
- 62 KOPECKY, M.; SEMECKY, V.; TREJTNAR, F.; LAZNICEK, M.; LAZNICKOVA, A.; NACHTIGAL, P.; DECRISTOFORO, C.; MATHER, S. J.; MÄCKE, H. R. Analysis of accumulation of ^{99m}Tc -octreotide and ^{99m}Tc -EDDA-HYNIC-Tyr³-octreotide in the rat kidneys. **Nucl. Med. Biol.**, v.31, p. 231-239, 2004.
- 63 HNATOWICH, D. J.; WINNARD, P.; VIRZI, F.; FORGARASI, M.; SANO, T.; SMITH, C. L.; RUSCOWSKI, M. Technetium-99m labeling of DNA oligonucleotides. **J. Nucl. Med.**, v. 36, pp. 2306-2314, 1995.
- 64 NICHOLSON, T., COOK, J., DAVISON, A., ROSE, D. J., MARESCA, K. P., ZUBIETA, J. A., JONES, A. G. The synthesis and characterization of $[\text{MCl}_3(\text{N}=\text{NC}_5\text{H}_4\text{NH})(\text{HN}=\text{NC}_5\text{H}_4\text{N})]$ from $[\text{MO}_4]^-$ (where M = Re, Tc) organodiazenido, organodiazene-chelate complexes. The X-ray structure of $[\text{ReCl}_3(\text{N}=\text{NC}_5\text{H}_4\text{NH})(\text{HN}=\text{NC}_5\text{H}_4\text{N})]$. **Inorg. Chem.**, v. 252, p. 421-426, 1996.
- 65 ROSE, D. J., MARESCA, K. P., NICHOLSON, T., COOK, J., DAVISON, A., JONES, A. G., BABICH, J., FISHMAN, A., GRAHAM, W., DEBORD, J. R. D., ZUBIETA, J. A. Synthesis and Characterization of Organohydrazino Complexes of Technetium, Rhenium, and Molybdenum with the $\{\text{M}(\eta^1\text{-HxNNR})(\eta^2\text{-HyNNR})\}$ Core and Their Relationship to Radiolabeled Organohydrazine-Derivatized Chemotactic Peptides with Diagnostic Applications. **Inorg. Chem.**, v. 37, p. 2701-2716, 1998.
- 66 HIRSCH-KUCHMA, M., NICHOLSON, T., DAVISON, A., DAVIS, W. M., JONES, A. G. The synthesis and characterization of technetium and rhenium hydrazino pyrimidine chelate complexes. **J. Chem. Soc. Dalton Trans.**, v.18, p. 3185-3188, 1997.
- 67 LIU, G.; WESCOTT, C.; SATO, A.; WANG, Y.; LIU, N.; ZHANG, YU-MIN; RUSCOWSKI, M.; HNATOWICH, D. J. Nitriles form mixed-coligand complexes with ^{99m}Tc -HYNIC-peptide. **Nucl. Med. Biol.**, v. 29, p. 107-113, 2002.
- 68 DECRISTOFORO, C.; MATHER, S.J. The influence of chelator on the pharmacokinetics of ^{99m}Tc -labelled peptides. **Q. J. Nucl. Med.**, v. 46, p. 195-205, 2002.
- 69 DECRISTOFORO, C.; MATHER, S. J. Preparation, ^{99m}Tc -labeling, and in vitro characterization of HYNIC and N₃S modified RC-160 and [Tyr³]octreotide. **Bioconjug. Chem.**, v. 10, p. 431-438, 1999.

-
- 70 EDWARDS, D. S.; LIU, S.; BARRETT, J. A.; HARRIS, A. R.; LOOBY, R. J.; ZIEGLER, M. C.; HEMINWAY, S. J.; CARROL, T. R. New and versatile ternary ligand system for technetium radiopharmaceuticals: water soluble phosphines and tricine as coligands in labeling a hydrazinonicotinamide-modified cyclic glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonist with ^{99m}Tc . **Bioconjug. Chem.**, v. 8, p. 146-154, 1997.
- 71 DECRISTOFORO, C.; FAINTUCH, B. L.; REY, A.; von GUGGENBERG, E.; RUPPRICH, M.; HERNANDEZ-GONZALES, I.; HAUBNER, R.; TEODORO, R. [^{99m}Tc]HYNIC-RGD for imaging integrin $\alpha_v\beta_3$ expression. **Nucl. Med. Biol.**, v. 33, p. 945-952, 2006.
- 72 LIU, S.; EDWARDS, D. S.; HARRIS, A. R. A novel ternary ligand system for ^{99m}Tc -labeling of hydrazine nicotinamide-modified biologically active molecules using imine-N-containing heterocycles as coligands. **Bioconjug. Chem.**, v. 9, p. 583-595, 1998.
- 73 EDWARDS, D. S.; LIU, S.; ZIEGLER, M. C.; HARRIS, A. R.; CROCKER, A. C.; HEMINWAY, S. J.; BARRETT, J. A.; BRIDGER, G. J.; ABRAMS, M. J.; HIGGINS, J. D. RP463: A stabilized technetium-99m complex of a hydrazino nicotinamide conjugated chemotactic peptide for infection imaging. **Bioconjug. Chem.**, v. 10, p. 884-891, 1999.
- 74 LIU, S.; EDWARDS, D. S.; ZIEGLER, M. C.; HARRIS, A. R. ^{99m}Tc -labeling of a hydrazinonicotinamide-conjugated LTB₄ receptor antagonist useful for imaging infection. **Bioconjug. Chem.**, v. 13, p. 881-886, 2002.
- 75 LIU, S.; EDWARDS, D. S.; ZIEGLER, M. C.; HARRIS, A. R.; HEMINGWAY, S. J.; BARRETT, J. A. ^{99m}Tc -Labeling of a hydrazinonicotinamide-conjugated vitronectin receptor antagonist. **Bioconjug. Chem.**, v. 12, p. 624-629, 2001.
- 76 KING, R. C.; SURFRAZ, M. B.; BIAGINI, S. C. G.; BLOWER, P. J.; MATHER, S. J. How do HYNIC-conjugates peptides bind technetium? Insights from LC-MS and stability studies. **Dalton Trans.**, v. 43, p. 4998-5007, 2007.
- 77 EGLI, A.; ALBERTO, R.; TANNAHILL, L.; SCHIBLI, R.; ABRAM, U.; SCHAFFLAND, A.; WAIBEL, R.; TOURWÉ, D.; JEANNIN, L.; ITERBEKE, K. AND SCHUBIGER, P. A. Organometallic ^{99m}Tc -Aquaion labels peptide to an unprecedented high specific activity. **J. Nucl. Med.**, v. 40, p. 1913-1917, 1999.
- 78 REUBI, J. C. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. **Endocr. Rev.**, v.24, p. 389-427, 2003.
- 79 WEINER, R. E. and Thakur, M. L. Radiolabeled peptides in diagnosis and therapy. **Sem. Nucl. Med.**, v. 31, p. 296-311, 2001.
- 80 REUBI, J. C. Regulatory peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. **Q. J. Nucl. Med.**, v. 41, p. 63-70, 1997.
- 81 VEULENS, A. N.; RODRÍGUEZ, R. G protein coupled receptors as targets for drug design. **Biotec. Apl.**, v. 26, pp. 24-33, 2009.

-
- 82 LEEMAN, S. Substance P and Neurotensin: discovery, isolation, chemical characterization and physiological studies. **J. Exp. Biol.**, v. 89, p. 193-200, 1980.
- 83 CARRAWAY, R. E. and LEEMAN, S. E. The Isolation of a New Hypotensive peptide, Neurotensin, from Bovine Hypotalamy. **J. Biol. Chem.** v.248, p. 6854-6861, 1973.
- 84 BINDER, E.B.; KINKEAD, B.; OWENS, M. J.; NEMEROFF, C. B. Neurotensin and dopamine interactions. **Pharmac. Rev.**, v. 53, p. 453-86, 2001.
- 85 EVERS, B. M. Neurotensin and growth of normal and neoplastic tissues. **Peptides**, v. 27, p. 2424-2433, 2007.
- 86 SEFLER, A. M.; HE, J. X.; SAWYER, T. K.; HOLUB, K. E.; OMECINSKY, D. O.; REILY, M. D.; THANABAL, V.; AKUNNE, H. C.; CODY, W. L. Design and Structure-Activity Relationships of C-terminal cyclic neurotensin fragments analogues. **J. Med. Chem.**, v. 38, p. 249-257, 1995.
- 87 CARRAWAY, R. E.; LEEMAN, S. E. The synthesis of neurotensin. **J. Biol. Chem.**, v. 250, p. 1912-1918, 1974.
- 88 FOLKERS, K.; CHANG, D.; HUMPHRIES, J.; CARRAWAY, R. E.; LEEMAN, S. E.; BOWERS, C. Y. Synthesis and activities of neurotensin and its acid and amide analogues: Possible natural occurrence of [Gln⁴]-neurotensin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 73, p. 3833-3837, 1976.
- 89 RIVIER, J. E.; LAZARUS, L. H.; PERRIN, M. H.; BROWN, M. R. Neurotensin analogues, structure-activity relationships. **J. Med. Chem.** v. 20, p. 1409-1413, 1977.
- 90 St-PIERRE, S.; LALONDE, J. M.; GENDREAU, M.; QUIRION, R.; REGOLI, D.; RIOUX, F. Synthesis of peptides by the solid-phase method. 6. Neurotensin, fragments, and analogues. **J. Med. Chem.** v. 24, p. 370-376, 1981.
- 91 BAYER, V. V.; MIROSHNIKOV, A. I.; KLUSA, V. I.; MISINA, I. P. Synthesis and biological activity of neurotensin and its analogues. **Bioorg. Khim.** v. 6, p. 379-385, 1980.
- 92 QUIRION, R.; RIOUX, F.; REGOLI, D.; St-PIERRE, S. Pharmacological studies of neurotensin, several fragments and analogues in the isolated perfused rat heart. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 66, p. 257-266, 1980.
- 93 MOODY, T. W.; MAYR, C. A.; GILLESPIE, T. J.; DAVIS, T. P. Neurotensin is metabolized by endogenous proteases in prostate cancer cell lines. **Peptides**, v. 19, p. 253-258, 1998.

- 94 GARCIA-GARAYOA, E.; ALLEMANN-TANNAHILL, L.; BLAUENSTEIN, P.; WILLMANN, M.; CARREL-REMY, N.; TOURWE, D.; ITERBEKE, K.; CONRATH, P.; SCHUBIGER, P. A. *In vitro* and *in vivo* evaluation of new radiolabeled neurotensin(8-13) analogues with high affinity for NT1 receptors. **Nucl. Med. Biol.**, v. 28, p. 75-84, 2001.
- 95 CARRAWAY, R. E. AND PLONA, A. M. Involvement of neurotensin in cancer growth: Evidence, mechanisms and development of diagnostic tools. **Peptides**, v. 27, p. 2445-2460, 2006.
- 96 MAZELLA, J. and VINCENT, J. Functional roles of NTS2 and NTS3 receptors. **Peptides**, v. 27, p. 2469-2475, 2006.
- 97 FALCIANI, C.; FABBRINI, M.; PINI, A.; LOZZI, L.; LELLI, B.; PILERI, S.; BRUNETTI, J.; BINDI, S.; SCALI, S. and BRACCI, L. Synthesis and biological activity of stable branched neurotensin peptides for tumor targeting. **Mol. Cancer Ther.**, v. 6, p. 2441-2448, 2007.
- 98 SOUAZÉ, F., DUPOUY, S.; VIARDOT-FOUCAULT, V.; BRUYNEEL, E.; ATTOUB, S.; GESPACH, C.; GOMPEL, A. AND FORGEZ, P. Expression of Neurotensin and NT1 receptor in Human Breast Cancer: A potential role in tumor progression. **Canc. Res.**, v. 66, p. 6243-6249, 2006.
- 99 JI, T. H. AND JI, JI. G protein-coupled receptors. **J. Biol. Chem.**, v. 28, p. 17299-17302, 1998.
- 100 VEULENS, A. N.; RODRÍGUEZ, R. G protein coupled receptors as targets for drug design. **Biotec. Apl.**, v. 26, p. 24-33, 2009.
- 101 OKAMOTO, T.; MURAYAMA, Y.; HAYASHI, Y.; INAGAKI, M.; OGATA, E.; NISHIMOTO, I. Identification of a Gs activator region of the beta 2-adrenergic receptor that is autoregulated via protein kinase A-dependent phosphorylation. **Cell**, v. 67, p. 723-30, 1991.
- 102 ST-GELAIS, F.; JOMPHE, C.; TRUDEAU, L. The role of Neurotensin in central nervous system pathophysiology: What is the evidence? **J. Psych. Neurosci.** v. 31 p. 229-245, 2006.
- 103 SOMAI, S.; GOMPEL, A.; ROSTENE, W.; FORGEZ, P. Neurotensin coneracts apoptosis in breast cancer cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 295, p. 482-488, 2002.
- 104 BOZOU, J. S.; AMAR, S.; VINCENT, J. P.; KITABGI, P. Neurotensin-mediated inhibition of cyclic AMP formation in Neuroblastoma N1E115 cells: involvement of inhibitory GTP-binding component of adenylate cyclase. **Mol. Pharmacol.**, v. 29, p. 489-496, 1986.
- 105 SLUSHER, B. S.; ZACCO, A. E.; MASLANSKI, J. A.; NORRIS, T. E. MCLANE, M. W. MOORE, W. C. The cloned neurotensin receptor mediates cyclic GMP formation when coexpressed with nitric oxide synthase cDNA. **Mol. Pharm.**, v. 46, p. 115-121, 1994.

-
- 106 GOEDERT, M.; PINNOCK, R. D.; DOWNES, C. P.; MANTHY, P. W.; EMSON, P. C. Neurotensin stimulates inositol phospholipid hydrolysis in rat brain slices. **Brain Res.**, v. 323, p. 193-197, 1984.
 - 107 BISSETTE, G. and NEMROFF, C. B. **The neurobiology of neurotensin. In: Neuropsychopharmacology.** KUPFER, D. and BLOOM, F. E. (Eds.) **The Fourth Generation of Progress.** p. 573-582, , New York, N. Y.: Raven Press, 1995.
 - 108 KOKKO, K. P.; HADDEN, M. K.; ORWING, K. S.; MAZELLA, J. DIX, T. A. In vitro analysis of stable, receptor-selective neurotensin(8-13) analogues. **J. Med. Chem.**, v. 46, p. 4141-4148, 2003.
 - 109 BOULES, M.; FREDRICKSON, P.; RICHELSON, E. Bioactive analogs of neurotensin: Focus on CNS effects. **Peptides**, v. 27, p. 2523-2533, 2006.
 - 110 GARCIA-GARAYOA, E.; MAES, V.; BLAUESTEIN, P.; BLANC, A.; HOHN, A.; TOURWE, D.; SCHUBIGER, P. A. Double-stabilized neurotensin analogues as potencial radiopharmaceuticals for NTR-positive tumors. **Nucl. Med. Biol.**, v. 33, p. 495-503, 2006.
 - 111 GARCIA-GARAYOA, E.; BLAUENSTEIN, P.; BRUEHJMEIER, M.; BLANC, A.; ITERBEKE, K.; CONRATH, P.; TOURWE, D.; SCHUBIGER, A. Preclinical evaluation of a new, stabilized neurotensin(8-13) pseudopeptide radiolabeled with ^{99m}Tc. **J. Nucl. Med.**, v. 43, p. 374-383, 2002.
 - 112 BRUEHLMEIER, M.; GARCIA-GARAYOA, E.; BLANC, A.; HOLZER, B.; GERGELY, S.; TOURWÉ, D.; SCHUBIGER, P. A.; BLAUENSTEIN, P. Stabilization of neurotensin analogues: effect on peptide catabolism, biodistribution and tumor binding. **Nucl. Med. Biol.**, v. 29, p. 321-327, 2002.
 - 113 VISSER, M.; JANSSEN, P. J. J. M.; SRINIVASSAN, A.; REUBI, J. C.; WASER, B.; ERION, J. L.; SCHIMDT, M. A.; KRENNING, E. P.; JONG, M. Stabilised ¹¹¹In-labelled DTPA-and DOTA-conjugated neurotensin analogues for imaging and therapy of exocrine pancreatic cancer. **Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.**, v. 30, p. 1134-1139, 2003.
 - 114 HULTSCH, C.; PAWELKE, B.; BERGMANN, R.; WUEST, F. Synthesis and evaluation of novel multimeric neurotensin(8-13) analogs. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 14, p. 5913-5920, 2006.
 - 115 MAINA, T.; NIKOPOULOU, A.; STATHOPOULOU, E.; GALANIS, A. S.; CORDOPATIS, P.; NOCK, B. A. [^{99m}Tc]Demotensin 5 and 6 in the NTS1-R-targeted imaging of tumours:synthesis and preclinical results. **Eur. J. Med. Mol. Imag.**, v. 34, p. 1804-1814, 2007.
 - 116 BLAUENSTEIN, P.; GARCIA-GARAYOA, E.; RUEG, D.; BLANC, A.; TOURWÉ, D.; BECK-SICKINGER, A.; SCHUBIGER, P. A. Improving the tumor uptake of ^{99m}Tc-labeled neuropeptides using stabilized peptide analogues. **Canc. Bio.**, v. 19, p. 181-188, 2004.

-
- 117 GARCIA-GARAYOA, E.; BLUENSTEIN, P.; BLANC, A.; MAES, V.; TOURWE, D.; SCHUBIGER, P. A. A stable neurotensin-based radiopharmaceutical for targeted imaging and therapy of neurotensin receptor-positive tumours. ***Eur. J. Mol. Imag.***, v. 36, p. 37-47, 2009.
 - 118 ALBERTO, R.; SCHIBLI, R.; EGLI, A.; SCHUBIGER, P. A.; HERMANN, W. A.; ARTUS, G.; ABRAM, V.; KADEN, T. A. Metal carbonyl syntheses XXVII. Low-pressure carbonylation of $[\text{MoCl}_4]^-$ and $[\text{MoO}_4]^-$. The technetium(I) and rhenium(I) complexes $[\text{Net}_4]_2[\text{MCl}_3(\text{CO})_3]$. ***J. Org. Chem.***, v. 492, p. 217-224, 1995.
 - 119 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Cancer Report, 2008**. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 2009.
 - 120 American Cancer Society. **Cancer facts & figures 2008**. Atlanta: American Cancer Society, 2008.
 - 121 CORDEIRO, B. P. V.; FELIPE, C. F. P.; NORONHA, C. P.; RAMOS, D. N.; CABRAL, E. S. C.; FERREIRA, J. M. O.; OLIVEIRA, J. F. P.; SANTOS, M. O.; COSTA, M. C. E.; REBELO, M. S.; REIS, R. S. **Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil/Instituto Nacional do Câncer (INCA)**. Rio de Janeiro, R. J.: INCA, 2009.
 - 122 ALTHUIS, M. D.; DOZIER, J. M.; ANDERSON, W. F.; DEVESA, S. S.; BRINTON, L. A. Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973-1997. ***Int. J. Epidemiol.***, v. 34, p. 405-12, 2005.
 - 123 TIEZZI, D. G. Epidemiologia do câncer de mama. ***Rev. Bras. Ginecol. Obstet.***, v. 31, p. 213-215, 2009.
 - 124 MACMAHON, B. Epidemiology and the causes of breast cancer. ***Int. J. Cancer.***, v.118, p. 2373–2378, 2006.
 - 125 ESTEVES, V. F.; THULER, L. C. S.; AMÊNDOLA, L. C.; KOIFMAN, R. J.; KOIFMAN, S.; FRANKEL, P. P.; VIEIRA R. J. S. The Brazilian Network of Breast and Ovarian Familial Cancer Aggregation. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in families with medium and high risk of breast and ovarian cancer in Brazil. ***Braz. J. Med. Biol. Res.***, v. 42 p. 453-457, 2009.
 - 126 HARRIS, J.; MORROW, M.; NORTON, L. Malignant tumors of the breast. In: Cancer of the breast, cancer. ***Lippincot***, Capítulo 36.2., Philadelphia, 1997.
 - 127 JACKSON, V. P.; HENDRICK, R. E.; FEIG, S. A.; KOPANS, D. B. Imaging the radiographically dense breast. ***Radiology***, v. 188, p. 297-301, 1993.
 - 128 COLE, E. B.; PISANO, E. D.; KISTNER, E. O.; MULLER, K. E.; BRON, M. E.; FEIG, S. A.; JONG, R. A.; MAIDMENT, A. D. A.; STAIGER, M. J.; KUZMIAK, C. M.; FREIMANIS, R. I.; LESKO, N.; ROSEN, E. L.; WALSH, R. WILLIFORD, M.; BRAEUNING, P. Diagnostic accuracy of digital mammography in patients with dense breast who underwent problem solving mammography: effects of image processing and lesion type. ***Radiology***, v. 226, p. 153-160, 2003.

-
- 129 BASSET, L. W.; SMITH, C. K. Breast sonography. **AJR**, v. 156, p. 449-455, 1991.
 - 130 BAGNI, B.; FRANCESCHETTO, A.; CASOLO, A.; DE SANTIS, M.; BAGNI, I.; PANSINI, S.; DI LEO, C. Scintimammography with ^{99m}Tc -MIBI and magnetic resonance imaging in the evaluation of breast cancer. **Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.**, v. 30, p. 1383-1388, 2003.
 - 131 WILCZEK, B.; SVENSSON, L.; DANIELSSON, R.; CELEBIOUGLU, F.; LARSSON, S.; JACOBSSON, H. ^{99m}Tc -Exametazime as a breast tumor-seeking agent: Comparison with ^{99m}Tc -Sestamibi. **J. Nucl. Med.**, v. 45, pp2040-44, 2004.
 - 132 CWIKLA, J. B.; BUSCOMBE, J. R.; KOLASINSKA, A. D.; HOLLOWAY, B.; HILSON, A. J. Evaluation of scintimammography as an additional test to conventional mammography in detection of breast cancer. **Ginecol. Pol.**, v. 74, p. 362-370, 2003.
 - 133 KOLASINSKA, A. D.; BUSCOMBE, J. R.; CWIKLA, J. B.; HOLLOWAY, B.; PARBHOO, S. P.; DAVIDSON, T.; HILSON, A. J. The role of scintimammography in recurrent breast cancer. Evaluation of their accuracy using ROC curves. **Nucl. Med. Rev. Cent. East. Eur.**, v. 4, p. 77-82, 2001.
 - 134 HIGLEY, B.; SMITH, F. W.; SMITH, T.; GEMMELI, H. G. Technetium-99m-1,2bis(2-Ethoxyethyl) phosphino-ethane: human biodistribution dosimetry and safety of a new myocardial perfusion imaging agent. **J. Nucl. Med.**, v. 34, p. 30-38, 1993.
 - 135 LIND, P.; GALLOWITSCH, H. J.; KOGLER, D.; KRESNIK, E.; MIKOSCH, P.; GOMEZ, I. ^{99m}Tc -tetrofosmin scintimammography: a prospective study in primary breast lesions. **Nuklearmedizin**, v. 35, p. 225-229, 1996.
 - 136 MANSI, L.; RAMBALDI, P. F.; PROCACCINI, E.; DI GREGORIO, F.; LAPROVITERA, A.; PECORI, B.; DEL CECCHIO, W. Scintimammography with Technetium 99m-tetrofosmin in the diagnosis of breast cancer and lymph node metastases. **Eur. J. Nucl. Med.**, v.23, p.932-939, 1996.
 - 137 O`CONNOR, M.; RHODES, D.; HRUSKA, C. Molecular breast cancer imaging. **Exp. Rev. Anticancer Ther.**, v. 9, p. 1073-1080, 2009.
 - 138 DAS, C. J.; AL-MULLAH, A.; KUMAR, R. FDG-PET dynamic contrast-enhanced CT in the management of breast cancer. **PET Clin.**, v. 4, p. 255-263, 2009.
 - 139 FAINTUCH, B.L.; SANTOS, R.L.S.R.; SOUZA, A.L.F.M.; HOFFMAN, T.J.; GREELEY, M.; SMITH, C.J.; 2005. ^{99m}Tc -HYNIC-bombesin (7-14)NH₂: Radiochemical evaluation with co-ligands EDDA (EDDA=ethylenediamine-N,N'-diacetic acid), tricine, and nicotinic acid. **Synthesis and reactivity in Inorganic, Metal-Organic and Nano-metal Chemistry**, v. 35, 43-51, 2005.
 - 140 OKARVI, S. M. Synthesis, radiolabeling and in vitro and in vivo characterization of a technetium-99m-labeled alpha-M2 peptide as a tumor imaging agent. **J. Peptide Res.**, v.63, p. 460-468, 2004.

-
- 141 VANLIÉ-RAZUMENIC, N.; PETROVIC, J.; GORKIC, D. Biochemical studies of renal radiopharmaceutical compound dimercaptosuccinate. IV. Interaction of ^{99m}Tc -DMS and ^{99}Tc -DMS complexes with blood serum proteins. **Eur. J. Nucl. Med.**, v. 9, p. 370-373, 1984.
 - 142 REHLING, M. Stability, protein binding and clearance studies of [^{99m}Tc]DTPA. Evaluation of a commercially available dry-kit. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v. 48, p. 603-609, 1988.
 - 143 BIGOTT-HENNKENS, H. M.; DANNOON, S.; LEWIS, M. R.; JURISSON, S. S. In vitro receptor binding assays: general methods and considerations. **Q. J. Nucl. Med. Mol. Imag.**, v. 52, p. 245-253, 2008.
 - 144 SCHILLACI, O.; SIMONETTI, G. Fusion imaging in Nuclear Medicine. – Application of dual-modality systems in oncology. **Canc. Biother. Rad.**, v.19, p. 1-10, 2004.
 - 145 MASSOUD, T. F.; GAMBHIR, S. S. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. **Genes and development**. Disponível em: <www.genesdev.org>. Acessado em: 22 de Agosto, 2006.
 - 146 SCHEIBE, P. O. Identifiability analysis of second-order systems. **Nucl. Med. Biol.**, v. 30, p. 827–832, 2003.
 - 147 REUBI, J. C. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. **Endocr. Rev.**, v. 24, p. 389-427, 2003.
 - 148 LANTRY, L. E.; CAPPELETTI, E.; MADDALENA, M. E.; FOX, S. J.; FENG, W.; CHEN, J.; THOMAS, R.; EATON, S. M.; BOGDAN, N. J.; ARUNACHALAN, T.; REUBI, J. C.; RAJU, N.; METCLAFE, E. C.; LATTUADA, L.; LINDER, K. E.; SWENSON, R. E.; TWWEEDLE, M. F.; NUNN, A. D. ^{177}Lu -AMBA: Synthesis and Characterization of a Selective ^{177}Lu -Labeled GRP-R Agonist for Systemic Radiotherapy of Prostate Cancer. **J. Nucl. Med.**, v. 47, p. 1144-1152, 2006.
 - 149 SURFRAZ, M. B.; KING, R.; MATHER, S. J.; BIAGINI, S.; BLOWER, P. J. Technetium-binding in labelled HYNIC-peptide conjugates: role of coordinating amino acids. **J. Inorg. Biochem.**, v. 103, p. 971-977, 2009.
 - 150 BABICH, J. W.; FISCHMAN, A. J.; Effect of “co-ligand” on the biodistribution of ^{99m}Tc -labeled hydrazino nicotinamide acid derivatized chemotactic peptides. **Nucl. Med. Biol.**, v. 22, p. 25-30, 1995.
 - 151 LARSON, S.; CALDWELL, G.; HIGGINS, J.; ABRAMS, M.; SOLOMON, H.; Technetium complexes of tricine: useful precursor for the ^{99m}Tc labeling of hidrazinonicotinamide modified proteins. **J. Labeled Cmpds.**, v. 35, p. 1-2, 1994.
 - 152 VANDERHEYDEN, JEAN-LUC; LIU, G.; HE, J.; PATEL, B.; TAIT, J. F.; HNATOWICH, D. J. Evaluation of ^{99m}Tc -MAG3-annexin V: influence of the chelate on in vitro and in vivo properties in mice. **Nucl. Med. Biol.**, v. 33, p. 135-144, 2006.

-
- 153 ZHANG, Y. M.; LIU, N.; ZHU, Z. H.; RUSCOWSKI, M.; HNATOWICH, D. J. Influence of different chelators (HYNIC, MAG3 AND DTPA) on tumor cell accumulation and mouse biodistribution of technetium-99m labeled to antisense DNA. **Eur. J. Nucl. Med.**, v. 27, p. 1700-1707, 2000.
- 154 MARTINS, A. M. C. R. P. F., Metabolismo da glutamina na célula tumoral. **Arq. Inst. Biol.**, v. 70, p. 231-237, 2003.
- 155 ZHANG, Y. M.; LIU, N.; ZHU, Z. H.; RUSCOWSKI, M.; HNATOWICH, D. J. Influence of different chelators (HYNIC, MAG3 AND DTPA) on tumor cell accumulation and mouse biodistribution of technetium-99m labeled to antisense DNA. **Eur. J. Nucl. Med.**, v. 27, p. 1700-1707, 2000.
- 156 LEI, K.; RUSCOWSKY, M.; CHANG, F.; QU, T.; MARDIROSSIAN, G.; HNATOWICH, D. J. Technetium-99m antibodies labeled with MAG₃ and HYNIC-an in vitro and animal in vivo properties. **Nucl. Med. Biol.**, v. 23, p. 917-922, 1996.
- 157 VERBKE, K.; HJESLSTUDEN, O.; DEBROCK, E.; CLEYTHENS, B.; DE ROO, M.; VERBRUGGEN, A. Comparative evaluation of ^{99m}Tc-HYNIC-HAS and ^{99m}Tc-MAG3-HAS as possible blood pool agents. **Nucl. Med. Comm.**, v. 16, p. 942-957, 1995.
- 158 LIU, S.; HSEIH, W.; KIM, Y.; MOHAMMED, S. I. Effect of coligands on biodistribution characteristics of ternary ligand ^{99m}Tc complexes of a HYNIC-conjugated cyclic RGDfk dimer. **Bioconj. Chem.**, v. 16, p. 1580-1588, 2005.
- 159 DECIRSTOFORO, C.; MATHER, S. ^{99m}Technetium-labelled peptide-HYNIC conjugates: effects of lipophilicity and stability on biodistribution. **Nucl. Med Biol.**, v. 26, p. 389-396, 1999.
- 160 Jeghers, O.; Piepzs, A.; Ham, H. R. What does protein binding of radiopharmaceuticals mean exactly. **Eur. J. Nucl. Med.**, v. 17, p. 101-102, 1990.
- 161 CAMPELLO, M. P.; MARQUES, F.; GANO, L.; LACERDA, S; SANTOS, I. Radiochemical and biological behaviour of ¹⁵³Sm and ¹⁶⁶Ho complexes anchored by a novel bis(methylphosphonate) tetraazamacrocyclic. **Radiochim. Acta**, v. 95, p. 329-334, 2007.
- 162 ONO, M.; ARANO, Y.; UEHARA, T.; FUJIOKA, Y.; OGAWA, K.; NAMBA, S.; MUKAI, T.; NAKAYAMA, M.; SAJI, H. Intracellular metabolic fate of radioactivity after injection of technetium-99m-labeled hydrazino nicotinamide derivatized proteins. **Bioconj. Chem.**, v. 10, p. 386-394, 1999.
- 163 ONO, M.; ARANO, Y.; MUKAI, T.; UEHARA, T.; FUJIOKA, Y.; OGAWA, K.; NAMBA, S.; NAKAYAMA, M.; SAGA, T.; KONISHI, J.; SAJI, H. Plasma protein binding of ^{99m}Tc-labeled hydrazino nicotinamide derivatized polypeptides and peptides. **Nucl. Med. Biol.**, v. 28, p.155-164, 2000.

- 164 von GUGGENBERG, E.; SARG, B.; LINDNER, H.; MELENDEZ, L.; ALAFORT, S. J.; MATHER, R. Preparation via coligand exchange and characterization of [^{99m}Tc -EDDA-HYNIC-d-Phe¹, Tyr³]octreotide, (^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-TOC). **J. Lab. Cmpds. Radiopharm.**, v. 46, 307-318, 2003.
- 165 OKARVI, S. M.; BAKE, B.; VOLKMANN, R. Evaluation of methods to determine plasma protein binding of renal pharmaceuticals. **Technetium, Rhenium and other metals in chemistry and Nuclear Medicine**. Marino Nicolini & Ulderico Mazzi. SGE Editoriali, Itália, 1999.
- 166 ANDERSON, C. J. Metabolism of radiometal-labeled proteins and peptides: What are the real radiopharmaceuticals in vivo? **Cancer Biother. Rad.**, v. 16, p. 451-455, 2001.
- 167 BOURNE, H. R.; SANDERS, D. A. MCCORMICK, F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. **Nature**, v. 349, p. 117-127, 1991.
- 168 DEWANJEE, M. K. Intercellular and intracellular communication - Capítulo IV. In: WAGNER, H. N.; SZABO, Z.; BUCHANAN, J. W. (Eds). **Principles of Nuclear Medicine**. Philadelphia, EUA: Saunders, 1995, p. 28-39.
- 169 TURNER, J. T.; JAMES KRACKC, M. R., CAMDEN, J. M. Regulation of the neurotensin receptor and intracellular calcium mobilization in HT-29 cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 253, p. 1049-1056, 1990.
- 170 BOHN, S. K.; GRADY, E. F.; BUNNETT, N. W. Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. **Biochem. J.**, v.322, p. 1-18, 1997.
- 171 SMITH, C. J.; GALI, H.; SIECKMAN, G. L.; HIGGINBOTHAM, C.; VOLKERT, W. A.; HOFFMAN, T. J. Radiochemical investigations of ^{99m}Tc -N₃S-BBN[7-14]NH₂: An in vitro/in vivo structure-activity relationship study where X=0-, 3-, 5-, 8-, and 11-Carbon tethering moieties. **Bioconj. Chem.**, v. 14, p. 93-102, 2003.
- 172 PRESS, O. W.; SHAN, D.; HOWELL-CLARK, J.; EARY, J.; APPELBAUM, F. R.; MATTHEWS, D.; KING, D. J.; HAINES, A. M.; HAMANN, P.; HINNAN, L.; SHOCHAT, D.; BERNSTEIN, I. D. Comparative metabolism and retention of iodine-125, yttrium-90, and indium-111 radioimunoconjugates by cancer cells. **Canc. Res.**, v. 56, p. 2123-2129, 1996.
- 173 NOCK, B. A.; NIKOLOPOULOU, A.; REUBI, J.; MAES, V.; CONRATH, P.; TOURWE, D.; MAINA, T. Toward stable N₄-Modified neurotensin for NTS1-receptor-targeted tumor imaging with ^{99m}Tc . **J. Med. Chem.**, v. 49, p. 4767-4776, 2006.
- 174 TAYLOR, A. T.; LIPOWSKA, M.; HANSEN, L.; MALVEAUX, E.; MARZILLI, L. M. ^{99m}Tc -MAEC Complexes: New Renal Radiopharmaceuticals Combining Characteristics of ^{99m}Tc -MAG₃ and ^{99m}Tc -EC. **J. Nucl. Med.**, v. 45, p. 885-891, 2004.

-
- 175 GUHLKE, S.; SCHAFFLAND, A.; ZAMORA, P. O.; SARTOR, J.; DIEKMAN, D.; BENDER, H.; KNAPP, F. F.; BIRSACK, H. J. ^{188}Re - and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG₃ as prosthetic groups for labeling amines and peptides. *Nucl. Med. Biol.*, v. 25, p. 621-631, 1998.
- 176 DECRISTOFORO, C.; MATHER, S. J.; Technetium-99m somatostatin analogues: effect of labeling methods and peptide sequence. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 26, p. 869-876, 1999.
- 177 van GOG, F. B.; VISSER, G. W.; GOWRISING, R. W.; SNOW, G. B.; van DONGEN, G. A. Synthesis and evaluation of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - ^{99}Tc -MAG₃-biotin conjugates for antibody pretargeting strategies. *Nucl. Med. Biol.*, v. 25, p. 611-619, 1998.
- 178 MAINA, T.; NOCK, B. A.; ZHANG, A.; NIKOLOPOULOU, A.; WASER, B.; REUBI, J. C.; MAECKE, J. Species differences of bombesin analogs interactions GRP-R define the choice of animal models in the development of GRP-R-targeting drugs. *J. Nucl. Med.*, v. 46, p. 823-830, 2005.
- 179 LAMBERT, B.; CYBULIA, M.; WEINER, S. M.; VAN DE WIELE, C.; HAM, H.; DIERCKX, R. A. Renal toxicity after radionuclide therapy. *Radiat. Res.*, v. 161, p. 607-611, 2004.
- 180 BERH, T. M.; GOLDEMBERG, D. M.; BECKER, W. Reducing the renal uptake of radiolabelled antibody fragments and peptides for diagnosis and therapy: present status, future prospects and limitations. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 25, p. 201-212, 1998.
- 181 ROLLEMAN, E. J.; VALKEMA, R.; DE JONG, M.; KOOIJ, P. P. KRENNING, E. P. Safe and effective inhibitions of renal uptake of radiolabelled octreotide by a combination of lysine and arginine. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 30, p. 9-15, 2003.
- 182 EINSIEDEL, J.; HUBNER, H.; HERVERT, M.; HARTERICH, S.; KOSCHATZKY, S.; GMEINER, P. Peptide backbone modifications on the C-terminal hexapeptide of neurotensin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 18, p. 2013-2018, 2008.
- 183 PALMEDO, H.; HENSEL, J.; REINHARDT, M.; von MALLEK, D.; MATTHIES, A.; BIRSACK, H. Breast Cancer Imaging with PET and Spect agents: an *in vivo* comparison. *Nucl. Med. Biol.*, v. 29, p. 809-815, 2002.