



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**SÍNTESE, MARCAÇÃO COM ^{99m}Tc E BIOCINÉTICA DE
RADIOFÁRMACOS PERFUSÓRIOS DIAMINODITIÓLICOS
PARA CINTILOGRAFIAS CEREBRAIS**

MARCOS MOISÉS GONÇALVES

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

Orientador:

Dra. Maria Aparecida T. M. de Almeida

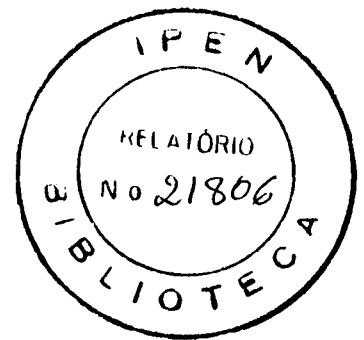
São Paulo

1999

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

**SÍNTESE, MARCAÇÃO COM ^{99m}Tc E BIOCINÉTICA DE
RADIOFÁRMACOS PERFUSÓRIOS DIAMINODITIÓLICOS
PARA CINTILOGRAFIAS CEREBRAIS**

MARCOS MOISÉS GONÇALVES



Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Doutor em Ciências
na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientador:
Dra. Maria Aparecida T.M. de Almeida

SÃO PAULO

1999

*Este trabalho é dedicado a Deus, à minha esposa Sheila,
a meus pais, à Cecília e principalmente ao meu filho Jonas,
que tantas vezes suscitou em vão a minha presença ...*

Agradecimentos

Ao IPEN, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares e ao Superintendente, Dr. Cláudio Rodrigues. Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), à Fundação para o Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por subsidiarem a pesquisa.

À Dra. Constância Pagano Gonçalves da Silva, chefe do Centro de Radiofarmácia, pela oportunidade concedida. À Orientadora, Dra. Maria Aparecida T. M. de Almeida por seu incondicional estímulo e incentivo à realização deste trabalho. Aos membros do Setor de Garantia de Qualidade do IPEN, na pessoa da Dra. Nilda P. S. de Pereira, à mestre Marycel Barbosa.

Às pesquisadoras do IPEN, Dra. Emiko Muramoto, à mestrando Tereza de Marilaque, à Dra. Elaine Bortoleti de Araújo e aos técnicos do C.R.Q. por prestimosa contribuição. À Prof.^a Dra. Antonia Tavares do Amaral do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e ao Prof. Dr. Leoberto Costa Tavares da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pelas importantes informações no planejamento racional dos novos radiofármacos.

Aos pesquisadores do National Centre for Scientific Research Demokritos – Atenas, especialmente aos doutores Estratos Chiotellis, Minas Papadopoulos, Alexandra Varvarigou, Ioannis Pirmettis por suas inestimáveis contribuições.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iv
ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O papel da medicina nuclear diagnóstica cerebral.....	1
1.2. O diagnóstico molecular como procedimento.....	2
1.3. Radiofármacos perfusórios cerebrais.....	4
1.4. Avanços em imagens de perfusão cerebral.....	4
1.5. O papel do tecnécio na farmácia nuclear.....	6
1.5.1. Obtenção de tecnécio-99m.....	8
1.5.2. Radiofármacos marcados com tecnécio-99m.....	11
1.5.3. Tecnécio-99m possui as propriedades químicas desejáveis.....	12
1.5.4. Tecnécio-99m possui as propriedades físicas desejáveis.....	12
1.6. Princípios básicos de SPET.....	14
1.6.1. A prática e a relevância de SPET para estudos cerebrais.....	18
1.7. Estudos de fluxo sangüíneo cerebral usando SPET.....	19
1.7.1. Método da microesfera para medição do fluxo sangüíneo cerebral.....	20
1.7.2. Aplicações clínicas relacionadas ao fluxo sangüíneo cerebral.....	21
1.7.3. Radiofármacos utilizados para medir o fluxo sangüíneo cerebral.....	22
1.8. A perfusão cerebral e suas aplicações clínicas.....	26
1.8.1. Estudo do fluxo sangüíneo cerebral regional.....	27
1.8.2. Estudo dos padrões de normalidade perfusória.....	28
1.9. Estudo de patologias relacionadas ao FSCR.....	31
1.9.1. Perfusão cerebral <i>versus</i> síncope cardiovascular reflexa.....	30
1.9.2. Alterações perfusórias em pacientes recém-operados por hemorragia sub-aracnóide.....	34
1.9.3 Utilização da perfusão cerebral para distinguir as várias formas de demência.....	36

1.9.4. Mapeamento da perfusão cerebral no auxílio do diagnóstico e prognóstico da isquemia cerebral.....	39
1.9.5. Alterações na perfusão cerebral de pacientes com diabetes do tipo I.....	43
1.9.6. Correlação entre mudanças no fluxo sanguíneo e epilepsia.....	46
1.10. A Evolução dos radiofármacos perfusórios cerebrais de ^{99m}Tc baseados em ligantes aminotiólicos.....	47
1.10.1. Introdução : requisitos moleculares para imagem de perfusão cerebral.....	47
1.10.2. Fatores que influenciam na difusão de fármacos.....	49
1.11. Complexos de nitrogênio e enxofre marcados com ^{99m}Tc que cruzam a barreira hematoencefálica.....	50
1.11.1. Quelatos bifuncionais de ^{99m}Tc do tipo DADT.....	59
1.12. Tectídeos de DADT que se ligam às plaquetas ativadas.....	62
1.13. Pró-Fármacos de DADT que agem como carreadores de radiofármaco.....	64
1.14. Marcadores bioquímicos baseados em DADT - ^{99m}Tc	65
1.15. Criação de radiofármacos perfusórios a serem marcados com ^{99m}Tc	67
1.15.1. Escolha racional candidatos a radiofármacos perfusórios ^{99m}Tc - DADT baseada nos descritores moleculares quantitativos.....	69
1.15.2. Coeficiente de partição.....	70
1.15.3. Descritores eletrônicos de molécula total.....	72
1.15.4. Labilidade à hidrólise.....	73
2.OBJETIVOS.....	78
2.1. Objetivo geral.....	78
2.2. Objetivos específicos.....	78
3. MATERIAIS, PLANEJAMENTO E MÉTODOS.....	80
3.1. MATERIAIS.....	81
3.1.1.Reagentes, solventes.....	81
3.1.2.Equipamentos.....	83
3.1.3.Aparatos de vidro.....	84
3.1.4.Materiais gerais.....	84
3.1.5.Animais.....	84

3.2. PLANEJAMENTO	85
3.2.1. Planejamento das rotas sintéticas.....	86
3.2.2. Planejamento racional dos radiofármacos perfusórios de ^{99m} Tc do tipo DADT.....	96
 3.3. MÉTODOS	 117
3.3.1. Determinação de CLOGP.....	117
3.3.2. Cálculo de polarizabilidade efetiva.....	119
3.3.3. Síntese dos intermediários e derivados DADT.....	120
3.3.4. Análises espectroscópicas e físico-químicas.....	132
3.3.5. Método de marcação e purificação dos derivados DADT.....	132
3.3.6. Análises radioquímicas.....	134
3.3.7. Distribuições biológicas dos produtos marcados.....	135
3.3.8. Ensaio de atoxicidade.....	140
 4. RESULTADOS	 141
4.1. Descritores moleculares.....	141
4.1.1. Valores teóricos dos coeficientes de partição – CLOGP.....	141
4.1.2. Valores de polarizabilidade efetiva calculada α_d	142
4.2. Características dos produtos de síntese.....	143
4.3. Análises espectroscópicas.....	144
4.3.1. Espectros de infravermelho em pastilhas de KBr.....	145
4.3.2. Espectros de ressonância magnética nuclear.....	151
4.4. Análises elementares.....	160
4.5. Análises radioquímicas.....	160
4.6. Perfis de cromatografia líquida de alta eficiência.....	161
4.6.1. Perfil de CLAE, derivado DADT-PR	161
4.6.2. Perfil de CLAE, derivado DADT-DIPA.....	162
4.7. Distribuições biológicas.....	163
4.7.1. Distribuição biológica do derivado DADT-Piperidínico Ramificado marcado com ^{99m} Tc.....	163
4.7.2. Distribuição biológica do derivado DADT-Diisopropilamínico marcado com ^{99m} Tc.....	164

4.7.3. Distribuição biológica do derivado DADT-Diisobutilamínico marcado com ^{99m}Tc	165
4.7.4. Distribuição biológica do derivado DADT-Butambeno marcado com ^{99m}Tc	166
4.7.5. Clareamentos sangüíneos dos derivados DADT em função do tempo.....	167
4.7.6. Clareamentos cerebrais dos derivados DADT em função do tempo.....	168
4.7.7. Clareamento cerebral do derivado DADT-BUT em função do tempo.....	169
4.7.8. Clareamento cerebral do derivado DADT-DIPA em função do tempo.....	170
4.7.9. Clareamento cerebral do derivado DADT-DIB em função do tempo.....	171
4.7.10. Clareamento cerebral do derivado DADT-PR em função do tempo.....	171
4.7.11. Mapas cerebrais de câmara de cintilação planar em camundongos.....	172
4.8. Tratamento estatístico dos dados de distribuição biológica.....	174
4.9. Ensaio de atoxicidade.....	176
5. DISCUSSÃO.....	177
6. CONCLUSÕES.....	186
Referências Bibliográficas.....	189

SÍNTESE, MARCAÇÃO COM ^{99m}Tc E BIOCINÉTICA DE RADIOFÁRMACOS PERFUSÓRIOS DIAMINODITIÓLICOS PARA CINTILOGRAFIAS CEREBRAIS

Marcos Moisés Gonçalves

RESUMO

As atuais técnicas de tomografia cerebral que utilizam-se de radiofármacos, estão contribuindo intensamente para a chamada era da certeza nos exames diagnósticos de quadros clínicos, síndromes e patologias pois permitem evidenciar fenômenos que ocorrem no âmbito molecular. O presente trabalho teve como propósito o desenvolvimento de novos radiofármacos perfusórios diaminoditiólicos (D.A.D.T.) de tecnécio-99m (^{99m}Tc) a serem utilizados em diagnósticos cerebrais pela técnica tomográfica S.P.E.T. ("Single Photon Emission Tomography"). Inicialmente procedeu-se ao planejamento racional das novas estruturas moleculares DADT candidatas a radiofármaco. Utilizando-se técnicas de Q.S.A.R. ("Quantitative Structure Activity Relationship"), foram estudados descritores moleculares tais como o coeficiente de partição e a polarizabilidade efetiva que incrementassem, respectivamente a passagem pela barreira hematoencefálica e o aumento na captação cerebral.

Aplicando-se técnicas de Q.S.P.R. ("Quantitative Structure Property Relationship") para latenciação de fármacos baseadas em grupos funcionais biolábeis, estudou-se a transformação dos derivados congêneres em pró-fármaco que viesse a funcionar como um carreador da porção DADT e que possibilitasse aumento da sua permanência no espaço intracerebral.

Em seguida, foram desenvolvidas rotas sintéticas e purificações químicas que possibilitassem a obtenção das estruturas químicas propostas. Cada novo derivado DADT

sintetizado foi, então, analisado por espectro de infravermelho e ressonância nuclear magnética e por análise elementar para confirmação de sua estrutura química proposta.

A partir deste ponto, o novo derivado foi marcado com ^{99m}Tc , purificado radioquimicamente e injetado intravenosamente em camundongos Swiss para elaboração de distribuição biológica que evidenciasse sua entrada e captação cerebral. Após a elaboração de cada distribuição biológica, reavaliou-se os estudos de planejamento racional para se julgar qual era o descritor molecular que mais intensamente influenciava a melhora de suas características perfusórias e os novos derivados DADT eram então sintetizados.

Três novos derivados DADT foram concebidos pela técnica de QSAR, a saber: DADT-piperidina ramificada (DADT-PR), DADT-diisopropilamínico (DADT-DIPA) e DADT - diisobutilamínico (DADT - DIB). Em termos de valores absolutos expressos em % dose/órgão, o DADT-DIPA apresentou maior captação cerebral por possuir coeficiente de partição mais próximo do ideal além de alta polarizabilidade. O DADT-DIPA provou que o coeficiente de partição é o descritor molecular que mais influencia na otimização da captação cerebral dos derivados pois o DADT-DIB, que possui maior polarizabilidade efetiva e coeficiente de partição que se distancia do ideal, mostrou possuir captação cerebral expressa em % dose/órgão, significativamente menor. O derivado DIPA é potencialmente um radiofármaco perfusório cerebral a ser pesquisado mais detalhadamente.

O DADT-BUT, desenvolvido pela técnica de QSPR, apesar de apresentar uma baixa captação cerebral, expressa em % dose/órgão, demonstrou possuir atribuições que sugerem comportamento de pró-fármaco pois, mesmo após terem decorridos 30 minutos de sua administração, o radiofármaco ainda possuía 62% do captação cerebral referente à do tempo de 5 minutos. Como o DADT-BUT provou possuir um clareamento cerebral pequeno com

relação à captação inicial, ele abre a possibilidade de se tornar um bom agente perfusório cerebral, uma vez que sua estrutura seja modificada de forma a assumir valores de coeficiente de partição próximos ao ideal.

SYNTHESIS, LABELING WITH ^{99m}Tc AND BIOKINETICS OF BRAIN SCINTIGRAPHY DIAMINODITHIOL PERFUSION RADIOPHARMACEUTICALS

Marcos Moisés Gonçalves

ABSTRACT

The recent tomography status using radiopharmaceuticals have been contributing greatly with the 'age of certainty' in the diagnosis examination of syndromes, pathologies and clinical signs, because they can evidence some phenomena occurring in a molecular manner. The purpose of this work, have had the development of new diaminodithiol (DADT) perfusion radiopharmaceuticals to be used in brain diagnosis using S.P.E.T. (Single Photon Emission Tomography).

Initially, the rational planning had been performed with the new DADT molecular structures as radiopharmaceutical candidates. Using of Q.S.A.R. (Quantitative Structure Activity Relationship) technics, the molecular descriptors such as partition coefficient and effective polarizability, have been studied in order to increase the blood brain barrier transport and the brain uptake respectively. Applying the Q.S.P.R. (Quantitative Structure Property Relationship) concepts to perform drug latentiation, based on bio-labile functional groups, the congener DADT derivative has been transformed into a pro-drug that works as a DADT moiety carrier, allowing the increasing of brain radiopharmaceutical uptake.

Later on, synthetic routes and chemical purifications have been developed allowing the creation of the proposed chemical structure. Each new DADT derivative has been synthesized and analyzed in terms of elemental analysis, infrared and NMR spectra, in order to confirm its

proposed chemical structure. Then, the new derivative has been labeled with ^{99m}Tc , radiochemically purified, intravenously injected in Swiss mice, allowing its biodistribution to evidence its brain transport and uptake. The rational planning studies have been re-evaluated after each biodistribution had been performed, to see what kind of molecular descriptor was responsible for causing a stronger optimization in the brain perfusion characteristics and then, new DADT derivatives have been prepared.

Three new DADT derivatives have been obtained by using QSAR : DADT-PR, DADT-DIPA, DADT-DIB. In terms of absolute values, expressed as % dose/organ, the DADT-DIPA showed the biggest brain uptake, because it has got the partition coefficient closest to the ideal and a high effective polarizability value. DADT-DIPA proved that the partition coefficient is the most important molecular descriptor in the optimization of the DADT derivatives because in the case of DADT-DIB, even possessing the most effective polarizability, but a non-ideal partition coefficient value, it was showed a significantly smaller brain uptake. The DADT-DIPA derivative is potentially a brain perfusion radiopharmaceutical to be explored in details.

The DADT - BUT, developed by QSPR despite the fact of having a low brain uptake expressed in terms of %dose/organ, presented pro-drug behaviour, because even 30 minutes after its administration, the radiopharmaceutical strikingly still retained 62% of the 5 minutes brain uptake. This DADT derivative has proved to possess low cerebral clearance, creating the possibility of becoming a good brain perfusion agent, once its structure assumes the closest to ideal partition coefficient value by adequate molecular modification.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Descritores moleculares relacionados aos coeficientes de partição e polarizabilidades efetivas dos derivados ^{99m}Tc -DADT alquilamínicos	98
Tabela 2 - Valores de pKa aparente e de captação (% dose/cérebro) dos epímeros de ^{99m}Tc -DADT	101
Tabela 3 - Taxa de hidrólise enzimática a $37,0^{\circ}\text{C}$ de ésteres de ácido benzóico	112
Tabela 4 - Valores teóricos e simulados de coeficientes de partição	141
Tabela 5 - Valores de polarizabilidade efetiva calculada α_d	142
Tabela 6 - Características dos produtos de síntese	143
Tabela 7 - Dados espectrais de infravermelho do intermediário IV	145
Tabela 8 - Dados espectrais de infravermelho do intermediário IV'	146
Tabela 9 - Dados espectrais de infravermelho do DADT-PR- intermediário IV	147
Tabela 10 - Dados espectrais de infravermelho do derivado DADT-DIPA	148
Tabela 11 - Dados espectrais de infravermelho do DADT-BID-intermediário V	149
Tabela 12 - Dados espectrais de infravermelho do derivado DADT-Butam-beno	150
Tabela 13 - Dados espectrais de ressonância magnética nuclear de ^1H do intermediário III'	151
Tabela 14 - Dados espectrais de ressonância magnética nuclear de ^1H do intermediário IV	152
Tabela 15 - Dados espectrais de ressonância magnética nuclear de ^{13}C do intermediário IV	153
Tabela 16 - Dados espectrais de ressonância magnética nuclear de ^1H do DADT -PR - intermediário V	155
Tabela 17 - Dados espectrais de ressonância magnética nuclear de ^1H do DADT-DIPA	156
Tabela 18 - Dados espectrais de ressonância magnética nuclear de ^1H do DADT -DIB - intermediário V	157
Tabela 19 - Dados espectrais de ressonância magnética nuclear de ^{13}C do DADT -DIB - intermediário V	158

Tabela 20 - Dados espectrais de ressonância magnética nuclear de ^1H do DADT-Butambeno.....	159
Tabela 21 - Pureza radioquímica dos derivados $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DADT candidatos a radiofármaco perfusório.....	160
Tabela 22 - Distribuição biológica do derivado DADT-Piperidínico Ramificado marcado com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ % em termos de DOSE / ÓRGÃO.....	163
Tabela 23 - Distribuição biológica do derivado DADT-Piperidínico Ramificado marcado com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ % em termos de DOSE / g.....	163
Tabela 24 - Distribuição biológica do derivado DADT-Diisopropilamínico marcado com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ % em termos de DOSE / ÓRGÃO.....	164
Tabela 25 - Distribuição biológica do derivado DADT-Diisopropilamínico marcado com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ % em termos de DOSE / g.....	164
Tabela 26 - Distribuição biológica do derivado DADT-Diidobutilamínico marcado com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ % em termos de DOSE / ÓRGÃO.....	165
Tabela 27 - Distribuição biológica do derivado DADT-Diidobutilamínico marcado com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ % em termos de DOSE / g.....	165
Tabela 28 - Distribuição biológica do derivado DADT- Butambeno marcado com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ % em termos de DOSE / ÓRGÃO.....	166
Tabela 29 - Distribuição biológica do derivado DADT-Butambeno marcado com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ % em termos de DOSE / ÓRGÃO.....	166
Tabela 30 - Comparação entre as médias de captação em % dose/cérebro (5 minutos) entre $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DADT-DIPA com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DADT- DIB por análise de variância de Bonferroni	174
Tabela 31 - Comparação entre as médias de captação em % dose/cérebro (5 minutos) entre $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DADT-DIPA com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DADT- PR por análise de variância de Bonferroni	174
Tabela 32 - Comparação entre as médias de captação em % dose/cérebro (5 minutos) entre $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DADT-DIPA com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DADT- BUT por análise de variância de Bonferroni	174
Tabela 33 - Comparação entre os valores das médias de captação (% dose/cérebro, 5 minutos) dos derivados $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DADT em termos de intervalos de confiança , nível de significância de 98%.....	175
Tabela 34 - Comparação entre os valores das médias de captação (% dose/cérebro, 15 minutos) dos derivados $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DADT em termos de intervalos de confiança , nível de significância de 90%.....	175

- Tabela 35** - Comparação entre os valores das médias de captação (% dose/cérebro, 15 minutos) dos derivados ^{99m}Tc -DADT em termos de intervalos de confiança, nível de significância de 95%..... 175
- Tabela 36** - Comparação entre os valores das médias de captação (% dose/cérebro, 30 minutos) dos derivados ^{99m}Tc -DADT em termos de intervalos de confiança, nível de significância de 90%..... 176
- Tabela 37** - Captações cerebrais em animais dos derivados DADT marcados com ^{99m}Tc 184

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Papel da Medicina Nuclear Diagnóstica Cerebral

As pesquisas bioquímicas e químico-farmacêuticas têm demonstrado possuir um papel importante na medicina nuclear e estão contribuindo intensamente para a chamada "era da certeza" na prática médica.¹³³ Estudos a partir de agentes endógenos marcados com radioisótopos, têm conseguido proporcionar informações úteis a respeito da bioquímica do metabolismo, em termos de homeostase e de estados patológicos.

Outrossim, estes agentes endógenos marcados têm elucidado inúmeras respostas biológicas ocasionadas por sua complexação com receptores biológicos. De forma interessante, no que diz respeito à prática diagnóstica, somente os estudos com fármacos e agentes endógenos marcados vieram a comprovar o fato de que um mesmo receptor biológico pode estar envolvido com patologias totalmente diversas, uma vez que estas possuem em comum uma implicação molecular. Seeman¹¹⁶ e outros autores^{77,78,79,89,90,100,101,117} puderam demonstrar que a doença de Parkinson, a esquizofrenia e a demência estão intimamente relacionadas com um subtipo comum de receptores dopaminérgicos, o subtipo D₂. Seeman¹¹⁵ provou que existe uma interessante correlação entre a dose clínica média de um agente neuroléptico e sua afinidade por receptores dopaminérgicos cerebrais, através de estudos de inibição da ligação do agente antagonista Espiroperidol marcado com ³H. Segundo O'Dell et al.⁹⁸, a administração continuada de neurolépticos típicos a seres humanos e animais, tem provocado efeitos colaterais extra-piramidais, incluindo desordens de movimentos parecidas com as do mal de Parkinson.

1.2. O Diagnóstico Molecular como Procedimento

Há pouco tempo atrás, os diagnósticos estavam na dependência exclusiva dos olhares atentos do médico e só se efetuavam se as patologias possuíam sinais ou sintomas evidentes à sua percepção. Entretanto, os fatores que irão originar tais sintomas possuem conotações metabólicas, podendo e devendo ser estudadas farmacologicamente ao nível molecular. Para exemplificar a técnica de diagnóstico molecular, pode-se citar o traçador $^{11}\text{CWIN 35428}$ que é usado mesmo que o paciente esteja no estágio I do mal de Parkinson.¹³³ Neste estágio I, metade das funções corpóreas permanecem normais, mas entretanto, existem marcantes reduções nas ligações existentes entre os traçadores e os transportadores endógenos nas porções anterior e particularmente posterior do putamen. Tais diferenças mostram-se mais proeminentes para pacientes neste estágio da patologia, com relação ao que ocorre para os indivíduos normais.¹³³

Estas notáveis anormalidades bioquímicas ocorrem em ambos os lados do cérebro de pacientes com a patologia hemi-Parkinsoniana, mesmo que um de seus lados permaneça inalterado em termos de sinais físicos e de sintomas. O fato do declínio dos neurônios pré-sinápticos, que ocorre com o passar da idade, poder acometer até as pessoas normais apoia a hipótese de que a doença de Parkinson ocorre quando um fator ambiental sobrepõe-se a um declínio normal dos neurônios pré-sinápticos no processo de envelhecimento.¹³³

No que diz respeito ao metabolismo dopaminérgico, várias informações importantes já podem ser acessadas, como a síntese da dopamina a partir da L-dopa marcada com flúor-18 (^{18}F), sua secreção a partir dos neurônios pré-sinápticos que é medida pelo efeito que esta provoca nos receptores pós-sinápticos, seu metabolismo através do sistema da monoamino oxidase e a re-captção da dopamina não-marcada pelo neurônio pré-sináptico.¹³³ Esta última

informação é de grande importância, devido ao fato da patologia idiopática de Parkinson estar relacionada à deficiência dos neurônios pré-sinápticos.¹³³

Pacientes com patologia idiopática de Parkinson possuem receptores D₁ e D₂ normais, e a degeneração nigroestriada afeta os neurônios dopaminérgicos pós sinápticos.²¹ No estágio inicial do mal de Parkinson, ocorrem maiores deficiências nos neurônios pré-sinápticos, que são examinados pela injeção de traçadores acumulados pelo transportador pré-sináptico de dopamina.¹³³ Contudo, o grande avanço proporcionado pelo diagnóstico molecular, reside em possuir uma sensibilidade a ponto de diagnosticar o mal de Parkinson, mesmo antes de seus primeiros sintomas se manifestarem.

O fato do diagnóstico molecular possuir grande sensibilidade, de maneira a poder ser efetuado mesmo antes da patologia apresentar sintomas, representa um dos avanços mais importantes da neurologia nas últimas duas décadas, uma vez que a terapêutica com os fármacos inibidores da monoamino oxidase só são eficazes se o tratamento se iniciar no estágio precoce do mal de Parkinson.¹³³

1.3. Radiofármacos Perfusórios Cerebrais

Oldendorf⁹⁹ já em 1978, percebeu a necessidade de serem desenvolvidos radiofármacos marcados com tecnécio-99m que fossem capazes de fornecer informações a respeito do fluxo sanguíneo cerebral local. Ele notou que as técnicas hospitalares de rotina, como as até então denominadas varreduras cerebrais com tecnécio ("Technetium Brain Scanning"), ou a tomografia de transmissão computadorizada CT ("Transmission Computerized Tomography") só eram capazes de demonstrar falhas na barreira hematoencefálica.

1.4. Avanços em Imagens de Perfusão Cerebral

No fim da década de 70, a técnica tomográfica por emissão de pósitrons denominada PET (" Positron Emission Tomography ") mostrou-se adequada pois apesar da captação cerebral (acúmulo) e clareamento (saída) de traçadores de livre difusão serem processos dinâmicos, estes dados são eficazmente coletados, pois esta tomografia consegue uma tomada rápida de dados.

No início da década de 80, foram desenvolvidos radiofármacos à base de ^{123}I para a tomografia de emissão de fótons puros do tipo SPET ("Single Photon Emission Tomography"). SPET demonstrou ser uma técnica útil para estudar epilepsia, demência, para avaliar isquemia cerebral reversível e detecção precoce de infarte cerebral.⁴⁹

Assim, ambas as técnicas demonstraram possuir capacidade de fornecer mais informações a respeito do potencial da imagem por perfusão cerebral, no diagnóstico e assistência à doença vascular cerebral e outras desordens neurológicas. Contudo, apesar dos

radiofármacos emissores de pósitrons e os radiofármacos marcados com ^{123}I terem provado seu potencial no campo da imagem tomográfica cerebral, nenhum deles pôde ser facilmente implantado para uso rotineiro. Segundo o pesquisador Nowotnik,⁹⁷ membro da Bristol-Myers Pharmaceutical Research Institute sediada em New Brunswick, New Jersey, a produção do radioisótopo ^{123}I de iodo possui um custo relativamente elevado e, por conseguinte, pouca disponibilidade nos hospitais. Por outro lado, conforme afirma Nowotnik⁹⁷, a utilização de radiofármacos emissores de pósitrons implica em gastos elevadíssimos em infra-estrutura hospitalar, devido ao fato de suas meias-vidas serem muito curtas, da ordem (de grandeza) de minutos, estes têm que necessariamente ser produzidos e utilizados localmente e estes gastos só se justificam para pouquíssimos centros especializados e abastados.

1. 5. O Papel do Tecnécio na Farmácia Nuclear

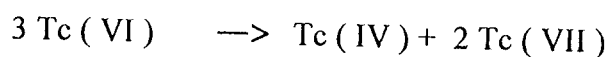
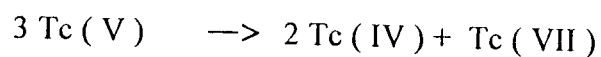
Tecnécio (Tc) é elemento de transição do grupo VIIB da tabela periódica, que possui 7 elétrons a mais do que a configuração dos gases nobres. Os outros membros deste grupo são o manganês e o rênio, formando uma tríade.¹⁰² Todos os elementos desta tríade perdem facilmente 7 elétrons para assumirem o estado de oxidação +7 e, quando presentes conjuntamente com os seus respectivos ânions, são espécies químicas denominadas permetalatos.⁸³

Tecnécio, elemento que possui número atômico 43, foi descoberto por Segré na década de 40, num ciclotron em Berkeley, Califórnia.⁸³ Segundo Lever⁸³, este foi o primeiro elemento feito pelo homem, e por isso mesmo seu nome foi derivado da palavra grega “technetos”, que semanticamente passa a idéia de artificial.

São conhecidos 21 isótopos de tecnécio, com a massa atômica de 90 a 110. Suas meias-vidas radioativas variam de 0,86 segundos a 26×10^6 anos e de todos estes nuclídeos, foi escolhido o isótopo metaestável de massa atômica 99, por possuir propriedades físicas apropriadas para a detecção externa de radiação, como uma energia dos raios gama emitidos de 140 keV e meia vida de 6,02 horas, além da baixa exposição radioativa do paciente.⁸³ Notavelmente, Owunwanne et al.¹⁰² consideram que a energia do raio gama que é útil para gerar imagem é justamente de 143 keV.

O tecnécio exibe vários estados de oxidação possíveis, podendo assumir desde -1 até +7, com estados de coordenação e geometria variáveis.¹⁰² Em solução aquosa, os estados de oxidação mais estáveis são +7 no pertecnetato (TcO_4^-) e +4 para o dióxido de tecnécio (TcO_2).¹⁰² Os outros diferentes estados de oxidação podem ser estabilizados por meio de diferentes ligantes químicos. Os estados de oxidação V e VI do tecnécio, quando o elemento

não está complexado com ligantes, sofrem reação de desproporcionamento¹⁰³, como demonstrado abaixo :



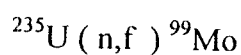
Esquema 1

Levando-se em consideração o fato do íon pertecnetato possuir o estado de oxidação mais alto para o tecnécio, ou seja +7, este não é capaz de se complexar diretamente com os ligantes. Dessa forma, são utilizados os agentes redutores para promoverem diminuições em seu estado de oxidação.⁸³ Em 1970, Eckelman e Richard³⁰ utilizaram-se do íon estanoso no desenvolvimento de conjuntos de reativos para a preparação do ácido dietilenotriaminopentacético para efetuar marcação com ^{99m}Tc (^{99m}Tc -DTPA), com um método de uma só etapa, o que facilitava grandemente a utilização do radiofármaco em hospitais e clínicas. A partir deste ponto, segundo Lever⁸³, a maioria dos radiotraçadores de tecnécio tem sido preparada utilizando-se o íon estanoso como agente redutor. É importante salientar o fato de que durante o próprio processo de redução, a presença do ligante (como por exemplo o DTPA), estabiliza o tecnécio quando este encontra-se em estado de oxidação menor. Caso contrário, forma-se TcO₂ que é espécie denominada de tecnécio coloidal, como subproduto. Assim, uma estrutura química que atue como ligante de tecnécio, pode ser ânion inorgânico ou uma molécula orgânica possuindo átomos que possam doar elétrons ao átomo

de tecnécio.⁸³ Por isso, moléculas contendo átomos que possuem intrinsecamente elétrons não compartilhados como nitrogênio, oxigênio e enxofre, usualmente atuam como pontos de coordenação para tecnécio. Como a coordenação que existe entre tecnécio e os ligantes é diversificada, os denominados radiotraçadores de tecnécio, que são produtos da reação entre a espécie tecnécio (possuindo os estados menores de oxidação) e um ligante (orgânico ou inorgânico), são também denominados de complexos.

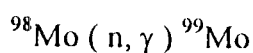
1.5.1. Obtenção de Tecnécio-99m

O tecnécio-99m pode ser obtido por um processo secundário, iniciado com a produção de molibdênio-99. Assim, ^{99}Mo pode ser formado quando o ^{235}U é colocado dentro do reator nuclear e sofre fissão do por intermédio de nêutrons térmicos:



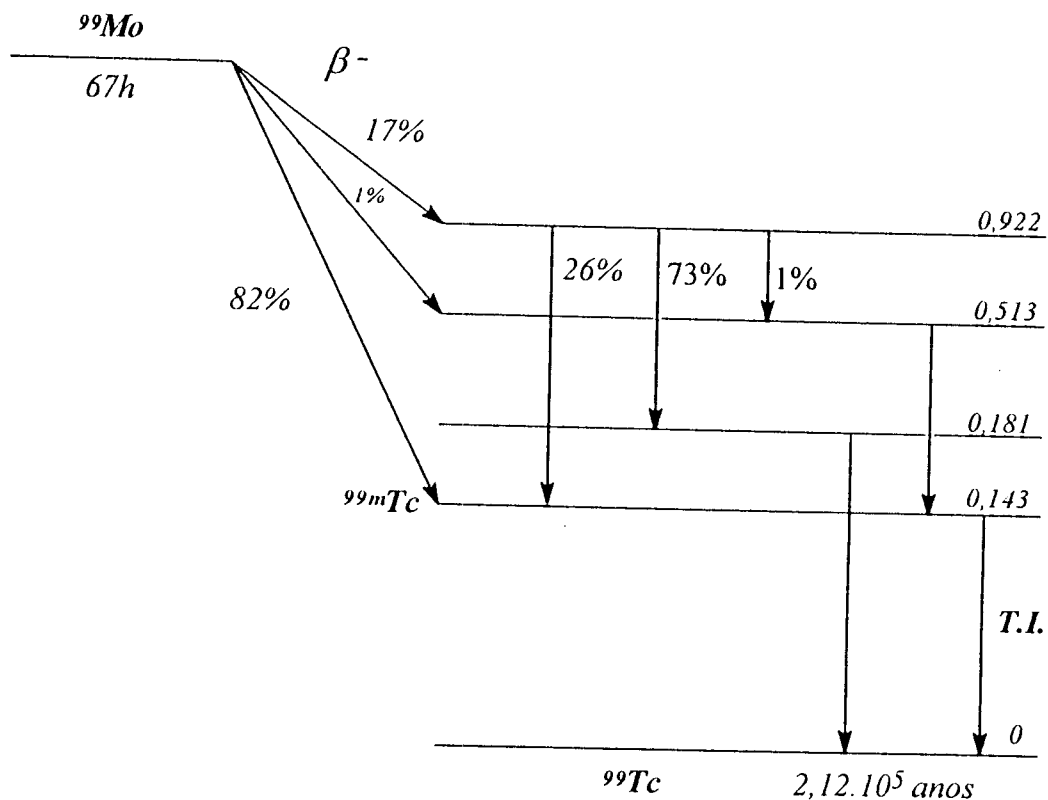
Esquema 2

Molibdênio-99 também é obtido utilizando-se o trióxido de molibdênio enriquecido com molibdênio-98, para ser bombardeado em reatores nucleares por nêutrons térmicos de baixa energia.¹⁰² Quando cada núcleo de ^{98}Mo incorpora 1 nêutron, este se rearranja nuclearmente e torna-se instável ou radioativo pois transformou-se em ^{99}Mo . Uma vez que o núcleo de molibdênio torna-se instável, ele passa a emitir raios gama, esquematicamente escreve-se :



Esquema 3

Tecnécio-99m é produzido quando o Molibdênio-99 decai emitindo partículas β^- :



Esquema 4

Segundo o que está demonstrado no esquema 4 acima, 17% do decaimento do ^{99}Mo consiste em emissões do tipo β^- . Desta fração, 73% se transformam em ^{99}Tc por emissão de raios gama de 922 keV e 181 keV. Já a fração de 82% corresponde ao decaimento direto de ^{99}Mo para o radionuclídeo $^{99\text{m}}\text{Tc}$, que é a espécie desejada para as aplicações em pesquisa e principalmente em uso clínico.

Entretanto, como a utilização ^{99m}Tc suscita a sua separação do ^{99}Mo , os pesquisadores de Brookhaven criaram o gerador $^{99}\text{Mo} / ^{99m}\text{Tc}$ no final dos anos 50. O ^{99m}Tc é obtido por eluição desse gerador, sob a forma do ânion pertecnetato na concentração de 10^{-6} a 10^{-8} M^{23} e, uma vez que a atividade específica do ^{99m}Tc é de $2,04 \times 10^8 \text{ GBq/g}$, a massa contida em eluatos de, por exemplo 740 MBq, equivale a poucos nanogramas de ^{99m}Tc .⁸³

O IPEN, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares de São Paulo, fabrica geradores de $^{99}\text{Mo} / ^{99m}\text{Tc}$ com tecnologia nacional adquirindo o ^{99}Mo , originado na fissão do ^{235}U , concebido em outro país, o que possibilita a utilização de ^{99m}Tc em hospitais e clínicas brasileiras.

1.5.2. Radiofármacos Marcados com Tecnécio-99m

A escolha do isótopo 99 metaestável de tecnécio para utilização em marcações de radiofármacos perfusórios, se deve a vários fatores pois as principais técnicas de rotina utilizadas principalmente em hospitais devem ser práticas e acessíveis. De acordo com Saha,¹¹¹ aproximadamente 80% dos radiofármacos utilizados em medicina nuclear são compostos marcados com tecnécio-99m, devido principalmente às características físicas favoráveis ao seu uso em clínicas e hospitais. Sua meia-vida física, de cerca de 6 horas e a baixa quantidade de emissão de elétrons, permite administrações de atividades radioatividade de tecnécio-99m da ordem de dezenas de mega becquerel, não implicando em uma dose significativamente alta de radiação para o paciente.¹¹¹

Outra propriedade favorável deste isótopo está na característica dos fótons emitidos serem monocromáticos, com uma energia de 140 KeV, o que os torna potencialmente colimáveis, permitindo assim a obtenção de imagens de resolução espacial superior. Saha¹¹¹ ainda chama a atenção para o fato da energia destes fótons estar próxima do ideal para a detecção pelas câmaras de cintilação. Adicionalmente, ^{99m}Tc é obtido rápida e facilmente no hospital a partir de eluição em gerador de molibdênio-99 / tecnécio-99m sob forma estéril, apirogênica e livre de carregador (espécie química não radioativa).

1.5.3. Tecnécio-99m Possui as Propriedades Químicas Desejáveis

Os variáveis estados de oxidação e números de coordenação do tecnécio têm permitido a preparação de uma grande variedade de radiofármacos.¹⁰² Por outro lado, tecnécio forma facilmente complexos quelatos, o que faz com que seja apropriado para a preparação de inúmeros radiofármacos no local hospitalar, pois separar quimicamente ^{99m}Tc de seu radionuclídeo-pai no gerador é uma tarefa simples com o eluato sendo obtido estéril, apirogênico e isotônico, não necessitando posterior processamento ou purificação, prestando-se assim para a administração direta no paciente ou para ser incluído em processos de marcação de radiofármacos para posterior injeção.¹⁰²

1.5.4. Tecnécio-99m Possui as Propriedades Físicas Desejáveis

Uma grande vantagem em se trabalhar com o radionuclídeo ^{99m}Tc é o fato deste praticamente não emitir radiações de alto L.E.T. ("linear transfer energy") para os tecidos biológicos, como as α e principalmente as β , o que propicia uma diminuição dos efeitos deletérios aos pacientes e principalmente ao pessoal que os manipula.

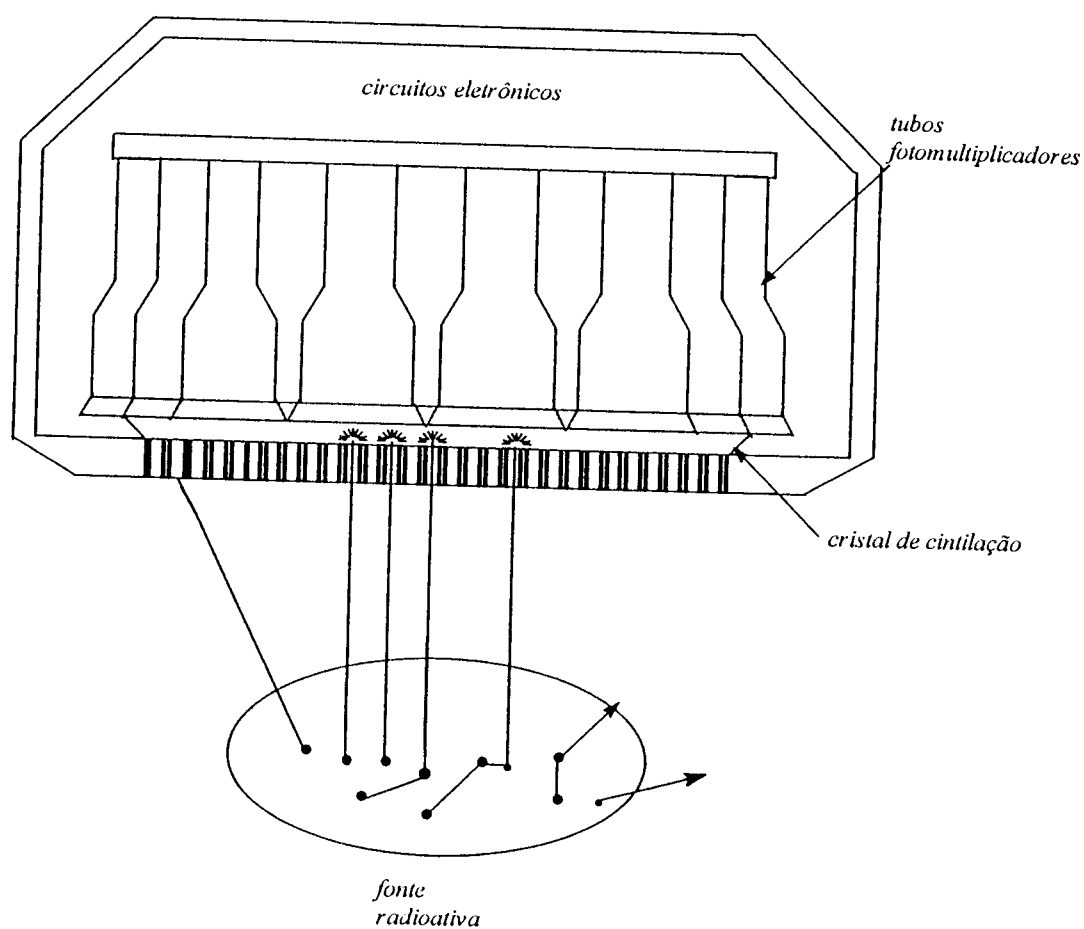
O radionuclídeo ^{99m}Tc pode ser considerado como emissor de raios-gama monoenergéticos de 140keV que são por isso facilmente colimáveis, proporcionando um número suficiente de fótons para estudos tomográficos. A sua meia-vida de 6,02 horas, tem sido considerada como longa o suficiente para se obter a informação diagnóstica desejada em vários estudos investigativos e curta o suficiente, de forma a causar pequena exposição a pacientes e ao pessoal que trabalha em contato direto com ele.¹⁰²

Deve-se levar em consideração também o fato da presença do radionuclídeo ^{99}Tc não ser carga adicional de radiação ao paciente, devido ao fato deste possuir uma meia vida longa de $2,12 \times 10^5$ anos, podendo-se considerá-lo como estável.¹⁰²

1.6. Princípios Básicos de SPET

O grande avanço da técnica de SPET, está na determinação das concentrações regionais relativas ou absolutas de radionuclídeos como função do tempo e pode-se dizer que a especificidade de cada radionuclídeo irá determinar as informações que as imagens poderão fornecer.⁵⁵ O maior avanço que a medicina nuclear pôde notar, deveu-se à introdução do gerador de radioisótopo de $^{99}\text{Mo} - ^{99\text{m}}\text{Tc}$ por Harper et al.⁴⁴ em 1965. SPET requer a colimação dos raios emitidos a partir da distribuição corpórea do radionuclídeo. Segundo Jaszczak e Tsoi⁵⁵ na câmara Anger, um colimador de chumbo colocado na frente do cristal age como uma lente em um sistema de imagem óptica. O colimador mais comumente usado consiste em um conjunto de orifícios paralelos, os denominados canais, que permitem aos fótons caminharem dentro de um ângulo de aceitação, passando através de canais, de forma a interagirem com o cristal.

Situado fisicamente atrás desse cristal, encontra-se um feixe de tubos fotomultiplicadores sensitivos com relação às cintilações produzidas pelas interações das radiações com o cristal. A larga área de cintilação permite a formação de imagem de órgãos inteiros, bem como de largas porções corpóreas de uma só vez.



Câmara Anger utilizada em SEPT captando uma fonte radioativa, figura adaptada de Jaszczak e Tsoi⁵⁵
figura 1

A figura 1 evidencia as possíveis trajetórias dos fótons emitidos a partir do corpo, que funciona como fonte de radioatividade.⁵⁵ Segundo a figura 1, pode-se perceber os fótons que não são captados, consistindo nos oblíquos, aqueles que escapam do colimador e aqueles que são emitidos de forma a adentrarem efetivamente no colimador, sendo detectados. Considerando-se as energias dos fótons emitidos pelo radionuclídeo, deve-se levar em consideração principalmente os dois tipos de interação da radiação com a matéria, a saber:

- Espalhamento Compton ;
- Interação Fotoelétrica.

A interação ou efeito fotoelétrico se refere a um fenômeno que resulta na emissão de elétrons a partir de superfícies metálicas que foram irradiadas por radiação eletromagnética. A explicação para este fenômeno baseia-se no fato dos elétrons atômicos presentes no metal estarem sob movimentação oscilatória provocada pela radiação incidente e a amplitude de oscilação dos elétrons ser determinada pela amplitude \mathcal{E}_0 do campo elétrico. Como \mathcal{E}_0^2 define a intensidade da radiação incidente e o quadrado da amplitude da oscilação dos elétrons resulta numa quantidade proporcional à energia cinética de cada elétron pode-se deduzir que, no efeito fotoelétrico, a energia cinética dos elétrons emitidos a partir da incidência da radiação eletromagnética é proporcional à intensidade da radiação incidente.

Por outro lado cada espalhamento Compton ocorre quando um fóton se choca com um elétron estacionário sofrendo uma colisão elástica de forma a se desviar provocando um recuo neste elétron. Assim a radiação espalhada consiste de dois componentes, o primeiro possui o mesmo comprimento de onda da radiação incidente e o segundo possui um comprimento de onda maior.

Fótons de espalhamento Compton podem se propagar dentro do ângulo de aceitação do colimador e são detectados dentro da janela de energia primária da câmara e aqueles fótons espalhados em direções que não passam pelos orifícios do colimador, não são então detectados. Quando estes tipos de fótons ocorrem no próprio corpo do paciente, o processo passa a se denominar atenuação e esta acaba por reduzir o número de radiação que efetivamente chega ao cristal detector. De forma particular, a magnitude da atenuação está diretamente relacionada com a energia dos fótons e das propriedades do meio atenuante.

Exatamente na energia dos fótons de 140keV do ^{99m}Tc , o espalhamento Compton é o fenômeno que possui a maior probabilidade de ocorrer na água dos tecidos. Somente uma

pequena fração dos fótons atenuados são absorvidos pelo processo fotoelétrico dentro do corpo.

1.6.1. A Prática e a Relevância de SPET para Estudos Cerebrais

A tomografia por emissão de fótons puros, SPET ("Single Photon Emission Tomography"), fornece importantes informações funcionais do cérebro, como o mapeamento do fluxo sanguíneo cerebral regional, para possibilitar a feitura de exames básicos.

Além disto, pode-se citar excelentes radiofármacos para o estudo do fluxo sanguíneo cerebral (F.S.C.) como o ^{99m}Tc -HMPAO (hexapropilenoamina oxima), ^{99m}Tc -ECD (dímero de etilcisteinato), ^{123m}I -IMP(isopropil-*p*-iodoanfetamina), que possibilitam os estudos não só da imagem do FSC relativo, mas também a quantificação dos valores de FSC.¹²⁹ Algumas notáveis aplicações deste tipo de tomografia podem ser citadas como a análise fisiopatológica das doenças cerebro-vasculares, a identificação de focos epilépticos, o diagnóstico de demências, a detecção e análises biológicas de tumores cerebrais.¹²⁹

O diagnóstico morfológico das disfunções cerebrais têm progredido acentuadamente desde a utilização dos raios-X, tomografia de transmissão computadorizada (C.T.) e técnicas de imagem por ressonância magnética (I.R.M.). Segundo as ponderações de Wyper et al.¹³⁹ e Heiss et al.⁴⁷, as análises das desordens neurológicas necessitam não somente da determinação das alterações estruturais ocorridas, mas também de informações a respeito das anormalidades funcionais regionais do cérebro.

A técnica de varredura tomográfica por emissão SPET produz mapas da distribuição *in vivo* dos traçadores radioativos¹²⁹, em que são utilizados modelos cinéticos do radiofármaco no tecido cerebral através de medições promovidas pela técnica de emissão tomográfica. O fluxo sanguíneo regional cerebral (F.S.C.R.), pode ser calculado a partir de curvas tempo-atividade radioativa do traçador na artéria (função-entrada) e no tecido regional do cérebro.¹²⁹

1.7. Estudos de Fluxo Sangüíneo Cerebral usando SPET

Uma das propriedades mais importantes para os radiofármacos utilizados como traçadores de fluxo é a denominada fração de extração de primeiro trânsito (E), ou seja, aquela fração de traçador que passou para o interior do tecido, com uma única passagem através dos capilares.^{19,109} A fração de extração E é função do fluxo sangüíneo f e do produto da permeabilidade P pela área superficial S :

$$E = 1 - e^{-P.S/f}$$

Equação 1

Numa condição ideal E é 1,0 para qualquer valor de fluxo. Mas Murase et al.⁹⁴ puderam averiguar que uma fração de extração limitada resulta numa determinação subestimada de fluxos sangüíneos altos e também afeta o padrão de FSC das regiões possuidoras de baixos fluxos regionais.

Os fluxos sangüíneos podem ser calculados pelo método da microesfera, usando pacientes possuidores de oclusão na artéria cerebral média, em que o FSC foi reduzido linearmente e progressivamente de uma margem normal para o centro da lesão.

1.7.1. Método da Microesfera para Medição do Fluxo Sangüíneo Cerebral

Em 1987, Wagner et al.¹³² criaram uma estratégia alternativa para medição de fluxo sangüíneo local em animais, baseado num procedimento denominado método da microesfera. Segundo tal método, são injetados no ventrículo esquerdo cardíaco, traçadores com tamanho apropriado que se comportem como microesferas radioativas, de forma a serem distribuídas e capturadas no tecido, na mesma proporção do fluxo local. O fluxo sangüíneo pode então ser calculado a partir da radioatividade medida em amostras de tecido e no sangue arterial, coletado durante o experimento.

Assim, os pesquisadores têm investigado traçadores para tomografia com comportamento parecido com o de microesferas, que possam ser administrados intravenosamente, sendo levados para dentro do cérebro, ficando retidos aí na mesma proporção do fluxo sangüíneo. Para tanto, tais traçadores deveriam possuir uma distribuição estável no cérebro, facilitando a construção da imagem por parte do tomógrafo e as quantificações relativa e absoluta do fluxo. Entretanto, os fluxos sangüíneos podem ser calculados pelo método da microesfera, desde que o paciente possua oclusão na artéria cerebral média, em que o fluxo sangüíneo cerebral (FSC) foi reduzido linearmente e progressivamente numa margem normal para o centro da lesão.

1.7.2. Aplicações Clínicas Relacionadas ao Fluxo Sangüíneo Cerebral

Para várias disfunções, pode-se considerar que as principais evidências patológicas em termos FSC, são o decréscimo focal e o aumento do FSC. O decréscimo focal do FSC é causado por vários fatores como a diminuição da pressão de perfusão até um valor próximo do intervalo de auto-regulação, a redução da excitação e a perda neuronal parcial. Estes fatores estão relacionados com uma diminuição do metabolismo tissular, mas às vezes o FSC e metabolismo apresentam uma diminuição difusa.¹²⁹

O aumento focal do FSC pode ser induzido por excitação neuronal focal ou vasoparalisia regional, que pode ocorrer no próprio local, caracterizando a perfusão de luxúria que é uma perfusão excessiva para um tecido que esteja danificado por isquemia.¹²⁹ Segundo Uemura,¹²⁹ o fenômeno do aumento de FSC focalmente induzido através de excitação neuronal tem sido aplicado para várias análises patológicas das funções regionais cerebrais.

1.7.3. Radiofármacos Utilizados para Medir o Fluxo Sangüíneo Cerebral

Devido ao fato do FSC ser a fonte de informações de onde se fundamenta a neuroimagem funcional, radiofármacos desenvolvidos especialmente para SPET têm se tornado disponíveis comercialmente. O xenônio-133, por exemplo, foi introduzido por Lassen e Ingvar⁷⁴ em 1972, baseado em seu clareamento gasoso, em que as imagens eram construídas em duas dimensões. Desde o início da era da tomografia computadorizada (CT), o método do ^{133}Xe foi aprimorado por Kanno e Lassen⁶² para imagens tomográficas em resolução tridimensional.

^{133}Xe possui a vantagem de ser inerte e de se difundir livremente pelos tecidos além de possuir uma alta fração de extração de primeira passagem, que é propriedade perfusória fundamental e que permite uma excelente quantificação do FSC. Infelizmente, o método do ^{133}Xe não produz imagens espaciais com boa resolução devido ao fato dos raios-gama emitidos pelo radionuclídeo possuírem baixa energia.¹²⁹

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO por ser um radiofármaco utilizado intensamente, tem sido adaptado também para estudar o FSC. De forma a avaliá-lo como traçador a ser utilizado para medições de fluxo sangüíneo cerebral regional (FSCR), Payne et al.¹⁰⁵ utilizaram-se da tomografia de SPET e basearam-se no xenônio-133 como padrão de comparação, devido ao fato de se tratar da técnica mais bem estabelecida para estudos quantitativos de FSCR .

O fato da metodologia com gases inertes permitir a medição dinâmica do FSCR, faz com que ela seja útil para estudar a habilidade dos chamados traçadores estáticos como o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO em seguir este tipo de fluxo sangüíneo. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO é um traçador bastante utilizado em pesquisa e também em rotina, devido ao fato de ser radiofármaco aprovado pelo FDA ("Food and Drug Administration") e tem sido utilizado extensivamente como

marcador do FSCR porque consegue ultrapassar a barreira hematoencefálica na mesma proporção do fluxo, além de ficar retido aproximadamente como uma microesfera química permanecendo estável *in vivo* por muitas horas.^{2,73,96}

Payne et al.¹⁰⁵, utilizaram 5 indivíduos voluntários, neurologicamente e psicologicamente normais, 14 pacientes com deficiências perfusórias médias a moderadas, além de 7 pacientes com desordem depressiva, 1 com enxaqueca, 1 doença de Alzheimer, 1 com epilepsia e 1 com derrame. Inicialmente os indivíduos foram submetidos à inalação de ^{133}Xe e os FSCR's foram determinados para 24 diferentes regiões de interesse (R.I.) (essas regiões foram normalizadas para o fluxo sanguíneo cerebral global). Ao término dos estudos com ^{133}Xe , os indivíduos foram submetidos à injeção endovenosa de $^{99\text{m}}\text{Tc-HMPAO}$. Em seguida, foram então determinadas as densidades de contagem (D.C.) regionais para as mesmas 24 RI's, de forma a possibilitar a comparação com os valores de FSCR obtidos do estudo do ^{133}Xe .

A partir deste ponto, foi elaborado um método que possibilitasse a comparação entre os dados obtidos dos dois traçadores. Tais comparações foram então efetuadas expressando-se o FSCR do ^{133}Xe para 1 minuto, 1 ml de sangue e 100g de tecido, ao passo que os dados do $^{99\text{m}}\text{Tc-HMPAO}$ inicialmente obtidos em termos de DC, foram transformados para min/ml/100g correlacionando-se ambos os valores globais de FSC e DC do $^{99\text{m}}\text{Tc-HMPAO}$, uma vez que foi assumida a equivalência entre esses valores globais.

Os resultados dos dados para todos os indivíduos mostraram que a distribuição dos dois traçadores, para a maioria das RI's cerebrais, não foram significativamente diferentes para ^{133}Xe e $^{99\text{m}}\text{Tc-HMPAO}$ pois 8 RI's resultaram diferentes de um total de 24 RI's. Mas interessante, quando foram feitas comparações entre as regiões de todos os indivíduos,

as distribuições dos dois traçadores não foram significativamente diferentes. Os dados de ^{99m}Tc -HMPAO sugerem que ele subestima os altos fluxos e sobrestima os fluxos baixos.

Os esforços das pesquisas estão se concentrando no sentido de promover melhoras no desempenho do ^{99m}Tc -HMPAO em medir o FSCR. Uma alternativa tem sido a administração do medicamento vasoconstrictor Diamox, que é capaz de aumentar o FSC global em até 25%. Surpreendentemente, Payne et al.¹⁰⁵ puderam comprovar que as diferenças existentes anteriormente entre as taxas de FSCR do ^{133}Xe e as taxas DC do ^{99m}Tc -HMPAO desapareceram após a injeção do Diamox mas a os altos fluxos ficaram ainda mais subestimados. Comparando-se ^{99m}Tc -ECD e ^{99m}Tc -HMPAO, vários autores^{27,82,93,128,135} puderam perceber que os dois traçadores possuem uma limitada extração de primeira passagem devido à retrodifusão que ocorre para ambos. Porém Murase et al.⁹³ provaram que ^{99m}Tc -ECD possui retrodifusão significativamente menor do que ^{99m}Tc -HMPAO, ao passo que Di Rocco et al.²⁷ provaram que entre esses dois agentes, ^{99m}Tc -ECD apresenta uma menor fração de extração, principalmente considerando-se altos FSCR.^{27,73,93}

Em suma, este estudo comparativo mostrou que ^{99m}Tc -HMPAO geralmente segue o padrão de distribuição de fluxo sanguíneo do ^{133}Xe e ficou evidente o fato de que a comparação entre esses dois radiofármacos deve ser feita em termos de fluxo sanguíneo cerebral regional para ^{133}Xe (ml/min/100g) e fluxo sanguíneo cerebral regional derivado para ^{99m}Tc -HMPAO (ml/min/100g), ao invés de se utilizar as comparações entre eles em termos de taxa de densidade de contagem de ^{99m}Tc -HMPAO e taxa de fluxo sanguíneo cerebral regional de ^{133}Xe .

Outro radiofármaco notável que tem sido utilizado para medição do FSC é o *N*-isopropil-*p*- ^{123}I iodoanfetamina (^{123}IMP) que, quando injetado intravenosamente, fica retido

nos vasos pulmonares sendo liberado deste local, perfundindo em direção à circulação sistêmica. Uma notável propriedade do ^{123}I -IMP consiste no fato de sua captação cerebral ser proporcional ao FSCR. Winchel et al.¹³⁶ constataram que ^{123}I -IMP possui a propriedade perfusória fundamental de apresentar captação cerebral proporcional ao fluxo sanguíneo cerebral regional (FSCR). Considerando-se o período imediatamente posterior à injeção dos radiofármacos, ^{123}I -IMP possui uma extração de primeira passagem mais alta para o interior do cérebro se comparada com as dos radiofármacos de tecnécio-99m. Assim, as primeiras imagens adquiridas com o ^{123}I -IMP refletem bem o FSCR¹²⁹ e por isso, começaram a surgir metodologias elaboradas com o intuito de quantificar o FSC.

Entretanto, apesar do rápido clareamento sanguíneo cerebral deste radiofármaco dificultar a determinação do FSC em termos de valores absolutos, Iida et al.^{51,52} conseguiram superar este problema desenvolvendo um método não invasivo de quantificação não sujeito a esse tipo de limitação. Outro importante radiofármaco que tem sido utilizado para quantificar o FSC é o dímero de etilcisteinato (ECD) marcado com tecnécio-99m. Sua característica mais marcante é possuir pouco clareamento cerebral pois devido ao fato deste ficar fixado no cérebro, tem sido considerado como o radiofármaco de tecnécio-99m a produzir as imagens tomográficas do FSC possuidoras do melhor contraste. Entretanto, quando Devous et al.²⁵ fizeram as comparações entre as habilidades de medir FSCR entre $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ECD contra as do xenônio-133, eles concluíram que $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ECD sobrestima moderadamente os fluxos baixos e subestima moderadamente os altos.

1.8. A Perfução Cerebral e Suas Aplicações Clínicas

O valor clínico de se medir o fluxo sangüíneo cerebral regional (FSCR) é reconhecido há muito tempo já por Lassen et al.⁷⁶ em 1963. A medicina nuclear está transformando-se rapidamente num importante instrumento para o estudo *in vivo* de neuroquímica cerebral.¹ Vários neuroligantes que têm sido desenvolvidos estão proporcionando novas conclusões em várias desordens neurais, que podem incluir desde injúria cerebral até as doenças vasculares.^{53,54,81}

Radiofármacos cerebrais mostraram ser uma nova fonte de informação a respeito de dados funcionais do paciente. Mormente a propriedade perfusória sangüínea tem sido esse diferencial precioso para caracterizar alguns estados patológicos. Os esforços estão se centrando cada vez mais no sentido de esclarecer as características sangüíneas perfusórias cerebrais regionais de forma a caracterizar os estados de normalidade, homeostase ou saúde e, principalmente, os desvios da normalidade. A grande vantagem das características perfusórias é que determinadas patologias causam modificações específicas, de tal forma que permitem a feitura de seu diagnóstico.

1.8.1. Estudo do Fluxo Sangüíneo Cerebral Regional

Nos últimos dez anos, um número apreciável de trabalhos científicos têm sido publicados a respeito da investigação do fluxo sangüíneo cerebral regional, em várias patologias neurológicas e psiquiátricas utilizando-se HMPAO marcado com tecnécio – ^{99m}Tc para tomografias cerebrais de SPET. A avaliação do FSCR pode ser efetuada por meio das imagens de SPET, auxiliada por uma escala multi-colorida (ou em matizes de cinza) ou por uma análise semi-quantitativa, que é mais utilizada em pesquisa clínica devido ao fato de se tratar de um processo que possibilita um tratamento estatístico mais exato dos resultados.¹⁵

Em 1998, Abbas et al.¹ iniciaram um novo conceito em termos de radiofármaco perfusório que consiste em salbutamol marcado com ^{99m}Tc , na tentativa de efetuar uma interessante investigação que pudesse utilizar um fármaco clássico diretamente como agente quelante de ^{99m}Tc . Estes autores perceberam que a própria estrutura do salbutamol é intrinsecamente um potencial agente complexante de ^{99m}Tc por possui 4 átomos doadores de elétrons (3 oxigênios e um nitrogênio) e confirmaram sua capacidade de efetuar marcações com ^{99m}Tc . Assim, o salbutamol foi eleito no intuito ser capaz de se complexar com ^{99m}Tc e também como agente diagnóstico neural que possa monitorar desordens do fluxo cerebral.

1.8.2. Estudo dos Padrões de Normalidade Perfusória

Os diagnósticos de anomalias, estados patológicos e síndromes, suscitam normalmente a comparação dos mapas e dados semi-quantitativos, obtidos a partir de estudos tomográficos dos indivíduos que estão sendo analisados com aqueles considerados normais. Por isso, é fundamental estudarem-se detalhadamente os padrões de comportamento de normalidade anatômica e funcional, de forma a adotá-los como uma referência a ser utilizada para comparações.

Catafau et al.¹⁵ do Hospital Clínic, University of Barcelona, estudaram o comportamento do FSCR de indivíduos jovens e idosos classificados como anatomicamente normais quando analisados por mapas de CT ("transmission computerized tomography"). Adicionalmente, os indivíduos idosos foram submetidos a um ensaio geral de estado mental denominado "Mini-Mental State Examination" descrito por Folstein et al.³⁵ que é uma metodologia prática que classifica o estado cognitivo do paciente.

Utilizando-se do radiofármaco HMPAO marcado com ^{99m}Tc , esses autores investigaram o padrão normal de distribuição do FSCR e sua inter-relação com a idade, os gêneros e as assimetrias inter-hemisféricas perfusórias cerebrais. O FSCR foi avaliado a partir do procedimento semi-quantitativo de SPET, por meio dos índices resultantes da comparação de cada região do cérebro em relação a uma região-referência fixa (por exemplo o cerebelo).

Padrões de Normalidade de FSCR

Após análise minuciosa das diferentes regiões do cérebro, algumas características perfusórias importantes foram elucidadas e estabelecidas e serão descritas a seguir segundo Catafau et al.¹⁵

A região cerebelar mostrou possuir o maior FSCR do cérebro, ficando o lado occipital com a segunda maior intensidade. A massa cinzenta apresentou valores de FSCR substancialmente menores que a massa branca.

Relação entre FSCR e os Gêneros

Mulheres e homens das populações jovem e idosa estudadas não demonstraram possuir diferenças significativas de FSCR.

Relação entre FSCR e a Idade

Com relação à idade, os pacientes idosos saudáveis mostraram possuir taxas de FSCR significativamente menores quando comparados com as taxas dos jovens nas regiões do lobo frontal esquerdo e na região posterior do lobo temporal esquerdo. Este achado pode estar relacionado com o maior grau de atrofia destas regiões. O estudo de assimetria inter-hemisférica mostrou um resultado surpreendente, pois veio a provar que a distribuição do

FSCR das regiões cerebrais homólogas pode ser adotada como simétrica independente da idade. Estudos *in vivo* usando CT, mostraram haver um aumento progressivo no tamanho dos ventrículos e sulcos corticais com o passar da idade.^{8,39,141} As análises e comparações dos hemisférios direito e esquerdo de várias regiões homólogas demonstraram que a assimetria cerebral é mínima e independente da idade dos indivíduos .

Os estudos de assimetria perfusória são um exemplo notável de como os diagnósticos podem ser desenvolvidos por inferência, de forma assegurar a decisão do médico pois, segundo Catafau et al.,¹⁵ ainda que o FSCR do lobo temporal deva ser avaliado com cuidado para pessoas idosas, as assimetrias temporais maiores do que 10% podem ser consideradas como patológicas. O grupo dos idosos produziu dados que possuíram um desvio-padrão levemente maior na maioria das regiões cerebrais estudadas, com relação a uma região-referência. Esta constatação pode ser atribuída ao diferente grau de atrofia demonstrado pelos indivíduos idosos normais.¹⁵ Estudos *in vivo* utilizando tomografia de transmissão computadorizada (CT) evidenciaram haver um aumento progressivo no tamanho dos sulcos ventriculares e corticais com o passar dos anos.^{8,141}

Em resumo, as pequenas diferenças existentes nos valores de FSCR entre os indivíduos de diferentes faixas etárias, comprovaram que as determinações utilizando o complexo HMPAO - ^{99m}Tc e uma gama-câmera possuidora de uma única cabeça são muito reprodutíveis em indivíduos normais.

1.9. Estudo de Patologias Relacionadas ao FSCR

1.9.1. Perfusão Cerebral *versus* Síncope Cardiovascular Reflexa

Töry et al.¹²⁶ do departamento de fisiologia do Kuopio University Hospital na Finlândia, efetuaram uma brilhante pesquisa com a síncope cardiovascular reflexa (S.C.R.). O estudo desta patologia é especialmente adequado para ser efetuado com radiofármacos perfusórios, pois resulta de um estado de hipoperfusão cerebral, podendo ser provocada tanto por resistência vascular ou por uma pressão de perfusão cerebral inadequada, devida ao retorno deficitário de sangue ao coração ou bombeamento cardíaco deficitário.⁴³

Estudando seres humanos portadores de síncope cardiovascular reflexa vasodepressora, Töry et al.¹²⁶ provocaram intencionalmente nestes indivíduos os sintomas da SCR utilizando os ensaios investigantes de Kenny et al.⁶³ e Sheldon et al.¹¹⁸. Adicionalmente, eles efetuaram em dias separados um protocolo apropriado para que esses pacientes não apresentassem o estado de síncope possibilitando, assim, a elaboração da denominada "linha de base" a ser utilizada como referência para comparação com as síncozes provocadas.

Ensaio para Provocar a Síncope Cardiovascular Reflexa

Os ensaios descritos a seguir foram efetuados com o consentimento dos pacientes utilizando protocolos de estudo aprovados pelo " Ethics Committee of Kuopio University Hospital ".¹²⁶

Ensaio sem a Utilização de Medicamentos

Às 14h00, os indivíduos portadores de síncope cardiovascular reflexa vasopressora permaneceram em posição inerte com a respiração ocorrendo de forma espontânea durante 5 minutos. Em seguida, suas cabeças foram passivamente vibracionadas de forma a serem posicionadas eretas a 70⁰, empregando-se uma mesa vibratória assim permanecendo por 45 minutos.

Ensaio Efetuado com Administração de Medicamento Beta-Adrenérgico

Adicionalmente, foi efetuado o mesmo procedimento para a síncope administrando-se, às 14h00, isoprenalina (por infusão), com os pacientes sendo vibracionados a 70⁰ por um período de 15 minutos.

Ensaio para Obtenção da Linha de Base

Este protocolo foi utilizado para os mesmos pacientes portadores de SCR de tal forma que estes não apresentassem os seus efeitos, ou seja, o estado sincopal. Às 14h00, os indivíduos foram colocados a uma posição estacionária, a 70 ° com as suas respirações ocorrendo de forma espontânea por 5 minutos.

Ensaio Perfusórios

A perfusão cerebral regional foi monitorada por tomografia fotônica do tipo SPET utilizando o radiofármaco ECD (L, L - etilenodicisteínadietilester) marcado com tecnécio-99m e averiguando a pressão sanguínea por meio de um transdutor de impedância.

Uma nova descoberta deste estudo foi a confirmação de que , para os indivíduos no estado sincopal, a perfusão cerebral assessada por SPET decresceu intensamente durante o declínio da pressão sanguínea, se comparada à dos indivíduos sob o estado não sincopal. Os fluxos sanguíneos cerebrais regionais dos córtex pré-frontal, frontal, temporal, parietal e occipital bem como o cerebelo, matéria branca, tálamo e striatum claramente diminuíram.

Outro achado desta pesquisa, foi a constatação de que o desenvolvimento da síncope vasodepressora demonstrou possuir pouca influência em relação ao declínio da pressão sanguínea sistólica, pois os dados espectrais estudados por estes autores não mudaram. Outra evidência interessante foi a descoberta de que a hipotensão ortostática está relacionada com a hipoperfusão cerebral do fluxo sanguíneo na área frontal⁴⁵ do córtex esquerdo.¹²⁶

1.9.2. Alterações Perfusórias em Pacientes Recém – Operados por Hemorragia Sub-Aracnóide

Hemorragia sub-aracnóide (H.S.A.) é uma patologia que acaba originando alterações hemodinâmicas cerebrais e está diretamente envolvida com a probabilidade de ocorrência de hipoperfusão regional que, por sua vez, tem sido relacionada com vasoespasmos para a maioria dos casos.¹²⁷

Entretanto, a demora no diagnóstico ou no tratamento implica em alto risco do paciente sofrer isquemia irreversível.²³ Apesar de várias técnicas diagnósticas estarem sendo utilizadas em hospitais, a tomografia de transmissão computadorizada (C.T.) é considerada a melhor técnica para evidenciar as isquemias irreversíveis. Contudo, esta possui limitações no que diz respeito à pouca eficiência na detecção das deteriorações clínicas ocorridas no período transiente pós-hemorragico.¹⁰⁴ Devido justamente ao risco de ocorrerem deficiências neurológicas do vasoespasmos provocado como resposta secundária da HSA, os clínicos necessitavam de um método disponível que quantificasse a hipoperfusão tecidual.

Em mais um exemplo extraordinário da aplicabilidade dos radiofármacos perfusórios, Tranquat et al.¹²⁷ vieram a superar esta limitação, com sucesso, utilizando ^{99m}Tc -HMPAO em tomografias de SPET efetuadas nos terceiros e oitavos dias posteriores à operação dos pacientes que sofreram HSA. Estes autores quantificaram a hipoperfusão utilizando-se de um índice de assimetria obtido a partir da comparação direta entre as captações de duas regiões homólogas de interesse presentes numa mesma secção trans-axial do mapa tomográfico cerebral. Esta pesquisa veio a comprovar que a hipoperfusão foi evidenciada principalmente do mesmo lado em que as operações foram realizadas e, durante o período de hospitalização, o grau de hipoperfusão regrediu progressivamente.

Outra importante contribuição de Tranquat et al.¹²⁷ foi a comprovação de que um índice de assimetria menor do que 10% corresponde a uma ausência de problemas neurológicos. Esta constatação foi corroborada quando não se observou significativa assimetria entre os lados direito e esquerdo do cérebro de pacientes que não apresentavam nenhum tipo de deficiência neurológica.

Para indivíduos portadores de HSA que foram recém-operados, pode-se dizer agora que existe um acompanhamento eficaz da perfusão cerebral que pode ser considerado como procedimento objetivo para o correto tratamento desses pacientes. Esta técnica de SPET utilizando o radiofármaco ^{99m}Tc-HMPAO, que é o primeiro exame a permitir o acompanhamento da hipoperfusão para os casos de pacientes pós operados por HSA, pode ser executada até em pacientes que estejam sob respiração artificial. O acompanhamento pós-cirúrgico desenvolvido por Tranquat et al.¹²⁷, provou categoricamente que para prevenir a ocorrência do vasoespasmó e amenizar riscos de lesões irreversíveis, os pacientes necessitam de uma avaliação mais objetiva em termos de perfusão cerebral.

Nota: as medidas para se evitar o vasoespasmó consistem na administração de nimodipina (30 µg/kg por hora) e terapia hipertensiva com expansão de volume (60ml/kg diariamente).

1.9.3. Utilização da Perfusão Cerebral para Distinguir as Várias Formas de Demência

As doenças vasculares têm sido consideradas como a segunda principal causa de demência.²² Atualmente, os esforços têm se concentrado em conseguir um método para distinguir dentre as várias formas de demência vascular e em desenvolver critérios radiológicos e patológicos específicos para a demência vascular de Binswanger (D.V.B.).^{11,37,87}

Nesta patologia há predominância de injúria isquêmica para as áreas periventriculares e da substância branca dos hemisférios cerebrais.⁹² Estudos de perfusão cerebral com *N*-isopropil-*p*-¹²³Iodo-anfetamina (IMP) em DVB, revelaram um decréscimo significativo no índice de perfusão cerebral no tálamo, gânglio basal e no lobo frontal.¹²⁵ Nos pacientes afetados severamente, a perfusão foi reduzida em todas as regiões neocorticais e subcorticais.⁹²

Nas tomografias CT para os casos de DVB, normalmente observa-se atrofia cerebral e lesões sub-corticais hipodensas da substância branca rodeando o ventrículo lateral, denominadas por Hachinski et al.⁴² como leucarioses. Entretanto, as leucarioses estudadas até então não serviam como sinais definitivos para se diagnosticar a DVB, devido ao fato destas também ocorrerem para os casos de hipertensão, demência de Alzheimer, demência multi-infartada, leucoencefalopatia multifocal progressiva, encefalomielite aguda disseminada, necrose da substância branca causada por metotrexato, efeitos biológicos das radiações e leucodistrofia.^{34,46}

Shyu et al.¹²⁰ desenvolveram uma análise semi-quantitativa utilizando-se de tomografia SPET e ^{99m}Tc-HMPAO, em que foram correlacionadas as evidências clínicas com as neuro-imagens de pacientes possuidores de DVB. Esta análise foi efetuada por comparação das seções para-sagitais esquerda e direita, e as captações relativas do radiofármaco foram

obtidas por normalização das regiões cerebrais de interesse como os gânglios basais e córtex com relação ao cerebelo.

Nesta pesquisa foi efetuado um procedimento inovador para a análise quantitativa, uma vez que os mapas foram analisados por Shen, C-C. do grupo de Shyu et al.¹²⁰ sem que este tivesse acesso aos dados das avaliações clínicas, pois havia indivíduos com a patologia e voluntários com estado normal de saúde.

Estudo das Neuroimagens por CT

Segundo as imagens evidenciaram, leucarioses sub-corticais foram localizadas na região frontal para os pacientes com demências de média a moderada, classificadas como pertencentes ao grupo I, e de forma disseminada e difusa para pacientes com demência severa, ou do grupo II.

Estudos em SPET com ^{99m}Tc -HMPAO

A comparação visual das imagens revelaram redução da captação frontal cortical do radiofármaco ^{99m}Tc-HMPAO nos pacientes do grupo I e uma redução amplamente disseminada para aqueles do grupo II. Os dados semi-quantitativos mostraram resultados animadores pois revelaram as porções parietal e occipital como as importantes regiões-alvo para diferenciar dentre os tipos de demência, a de Binswanger, uma vez que estas regiões demonstraram possuir diferentes captações entre os pacientes dos grupos I e II bem como para os voluntários do grupo controle.

Surpreendentemente, os pacientes do grupo II demonstraram possuir menores captações parietal e occipital se comparados com aqueles do grupo I, ficando os indivíduos do controle com os maiores valores de captação. Shyu et al.¹²⁰, conseguiram ainda demonstrar que a leucariose e os defeitos perfusórios do pólo frontal, são importantes fatores determinantes de pacientes possuidores de DVB média. Mostraram ainda que a hipoperfusão cerebral difusa, a degeneração sub-cortical da substância branca e a atrofia cerebral são prováveis fatores que contribuem com a maior deterioração cognitiva e motora nos indivíduos com DVB avançada.

1.9.4. Mapeamento da Perfusão Cerebral no Auxílio do Diagnóstico e Prognóstico da Isquemia Cerebral

Introdução

Pacientes que são acometidos por acidente vascular cerebral (A.V.C.) agudo, acabam por ficar com modificações seqüenciais do FSC e alterações no metabolismo do oxigênio. Num cérebro normal, o FSC e o metabolismo estão bem correlacionados de forma regional. A fração de extração do oxigênio (F.E.O.), que correlaciona a taxa de consumo tecidual de oxigênio com o suprimento arterial de oxigênio, é também distribuída regionalmente pelo cérebro.¹²⁹

Por outro lado, pacientes possuidores de isquemia cerebral aguda, freqüentemente apresentam um comportamento para o fluxo e para o metabolismo que perde o paralelismo com a FEO, e a correlação acaba variando consideravelmente. Pacientes que possuem oclusão da artéria cerebral, apresentam mudanças seqüenciais típicas de FSC e do metabolismo de oxigênio.¹²⁹ Baron, J.C.⁹ comprovou que, as tomografias PET efetuadas 8 horas após a ocorrência do AVC, a partir de compostos marcados com oxigênio-15, demonstraram que o FSC ficou severamente diminuído e ocorreu redução menos severa da taxa de oxigênio metabólico.

A fração de extração de oxigênio (FEO), que é um indicador da passagem do oxigênio do sangue para os tecidos, ficou aumentada ao máximo pois a quantidade de sangue que chegou aos tecidos diminuiu muito. A perfusão demonstrada por este tipo de investigação clínica é denominada perfusão de miséria, pois evidencia o fato do oxigênio suprido pelo FSC reduzido ser insuficiente para atender as necessidades metabólicas do tecido.⁹

Entretanto, para melhor avaliar os casos de AVC com relação à recuperação dos pacientes, é importante salientar que mesmo para os casos de perfusão de miséria, os tecidos podem, pelo menos parcialmente, permanecer vivos.¹²⁹ Depois de uma semana após o quadro de isquemia ter se instalado, os dados de PET mostraram taxas de oxigênio metabólico severamente diminuídas, em que os tecidos apareceram danificados nas imagens e até a FEO ficou reduzida. Este quadro é denominado perfusão de luxúria, já que a perfusão sanguínea é excessiva, levando-se em consideração que o tecido se encontra danificado esquemicamente.⁷⁵ Aos 28 dias, o decréscimo do FSC associado à reduzida taxa de oxigenação metabólica, refletem a perda celular do tecido danificado.¹²⁹

É muito importante salientar que, para os pacientes que sofreram AVC, a distinção entre as áreas cerebrais irreversivelmente afetadas por isquemia, daquelas áreas com penumbra, potencialmente recuperáveis por possuírem neurônios viáveis,⁶⁶ pode ser crucial para o diagnóstico, prognóstico e para a monitoração da eficácia da terapia com medicamentos.⁸⁸

Sob as condições de hipóxia, ocorrem vários estados de distúrbio metabólico como as áreas de perfusão de miséria, penumbra e lesão isquêmica de centro infartado.⁸⁸ Entretanto, a dificuldade em se monitorar o grau de oxigenação tecidual *in vivo* suscita a tomada de decisão para as atividades de rotina clínica. Por isso, os trabalhos no campo da pesquisa clínica têm se concentrado no desenvolvimento de radiofármacos que se fixem, seletivamente, em locais com hipóxia.

Chapman, J.D.¹⁶ já em 1979, trabalhando com nitroimidazóis, fez uma importante descoberta no campo de compostos que se ligam em regiões hipóxicas. Ele constatou que o traçador [³H]misonidazol ficou retido preferencialmente em células hipóxicas, e que em

seguida, o grupo 2-nitro imidazol foi reduzido por redutases celulares, ficando o traçador preso aos componentes celulares.

Surpreendentemente, a presença do oxigênio em níveis normais re-oxida imediatamente esta molécula não permitindo sua posterior redução e, por conseguinte, ocorrendo sua retenção na área em que esta se encontra. Quando o mapeamento dos locais em hipóxia parecia ter se resolvido, afortunadamente, constatou-se que este traçador não era capaz de ficar retido em tecidos seriamente danificados, os quais estivessem com as redutases comprometidas. Justamente, nos casos de AVC, alguns tecidos poderão estar nestas condições de degradação, não permitindo o mapeamento por este tipo de traçador.

Para resolver tal impasse, Lythgoe et al.⁸⁸ propuseram um novo método de investigação da hipóxia cerebral com a utilização combinada de dois diferentes radiofármacos, a saber, o marcador de hipóxia iodo-125 azamicina arabinose (¹²⁵I-IAZA) e o agente perfusório ^{99m}Tc-HMPAO. Estes autores utilizaram estudos em modelos animais, em ratos de linhagem Wistar que foram submetidos à oclusão do canal carótido, no interior da artéria carótida, de forma a impedir o fluxo de sangue para os seus cérebros, numa metodologia denominada modelo M.C.A.O. ("Middle Cerebral Artery Occlusion").²⁶ Após decorridas duas horas de oclusão, injetaram-se nos animais ¹²⁵I-IAZA e ^{99m}Tc-HMPAO através da veia femoral mantendo-se o canal carótido ocluído por mais cinco horas. Seus cérebros foram então removidos, congelados e dissecados em seções de 20 μm.

Resultados dos Autoradiogramas

As imagens cerebrais emparelhadas dos dois radiofármacos, comprovaram que quando há um aumento do ^{125}I -IAZA, existe uma concomitante redução no fluxo sanguíneo ⁸⁸ acompanhado pelo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO e, desta forma, conseguiu-se delinear a região que apresentava hipóxia.^{26,41} Adicionalmente, ficou provado que a retenção do ^{125}I -IAZA ocorreu nas regiões aonde a perfusão cerebral diminuiu moderadamente. Nestes locais, o nível de oxigênio é suficientemente baixo a ponto de promover a seletiva retenção do radiofármaco.

Entretanto, para as áreas que estavam com o fluxo sanguíneo só levemente diminuído, não havia nenhuma captação de ^{125}I -IAZA, demonstrando categoricamente que o nível de oxigênio permanecia suficientemente alto para oxidar as porções nitroimidazol (previamente reduzidas nas células), fazendo com que a moléculas se difundissem livremente para fora dessas células sem ficarem retidas. Interessantemente, esta região pode representar uma área de perfusão de miséria, mas com suficiente liberação de oxigênio para manter a atividade celular. Justamente, a habilidade em definir áreas de perfusão de miséria pode possuir grande importância na monitoração da isquemia cerebral e auxiliar na adequada aplicação de terapia por fármacos em pacientes que sofreram de AVC.⁸⁸ A partir da comprovação de tais evidências corroboradas por estudos perfusórios cerebrais com $^{99\text{m}}\text{Tc}$, Lythgoe et al.⁸⁸ apresentaram uma notável utilização do marcador de hipóxia ^{125}I -IAZA, para possibilitar a investigação da hipóxia cerebral de forma mais incisiva.

1.9.5. Alterações na Perfusão Cerebral de Pacientes com Diabetes do Tipo I

Quirce et al.¹⁰⁸, do Hospital Universitário Marqués de Valdecilla em Santander, Espanha, verificaram que a qualidade de vida de pacientes diabéticos depende de procedimentos profiláticos e do tratamento das complicações crônicas da diabetes melito.¹⁰⁸ Kannel et al.⁶¹ e Barret-Connor et al.¹⁰, têm considerado a diabetes melito como fator de risco para desenvolvimento de patologias cerebrovasculares como o AVC. Apesar de Kameyama et al.⁶⁰ terem provado que há envolvimento de artérias cerebrais para esta patologia, poucos trabalhos têm sido desenvolvidos no campo de perfusão cerebral, mormente com aqueles indivíduos diabéticos que não apresentam doenças cérebro-vasculares.¹²⁴ A confirmação e a validação da técnica de SPET com ^{99m}Tc-HMPAO para avaliar o fluxo sanguíneo cerebral (FSC) e sua conseqüente introdução na prática clínica, têm criado novas possibilidades para correlacionar as chamadas alterações sub-clínicas em termos de fluxo sanguíneo cerebral de pacientes diabéticos.¹⁰⁸ Quirce et al.¹⁰⁸ acreditam que estas alterações podem permitir uma seleção precoce dos pacientes que possuam risco de contraírem doença cerebrovascular de forma a iniciar, de forma intensa, as medidas profiláticas. Jiménez-Bonilla et al.⁵⁶, pesquisadores do mesmo hospital, detectaram alterações no fluxo sanguíneo num número grande de pacientes com diabetes melito.

De posse de tantos dados, Quirce et al.¹⁰⁸ elaboraram um estudo prospectivo de SPET com ^{99m}Tc-HMPAO, a respeito do FSC de pacientes com diabetes melito que não possuíam doenças cerebrovasculares. Foram efetuados fatiamentos trans-axiais de SPET do cérebro, e cada um deles foi subdividido em 50 regiões de interesse (R.I.) para comparação das regiões

homólogas dos hemisférios esquerdo e direito. Os mapas dos indivíduos com a patologia foram então comparados contra os mapas de indivíduos do grupo controle em termos de porcentagem de captação e, as RI's que demonstravam valores de captação com diferença superior ou inferior a dois desvio-padrão, eram consideradas como áreas de hiper ou hipoperfusão.

A Incidência da Hipoperfusão

O estudo de Quirce et al.¹⁰⁸ evidenciou alterações de fluxo sangüíneo, tanto hipoperfusórias quanto hiperperfusórias. Apesar dos indivíduos do grupo controle também apresentarem alterações de fluxo sangüíneo, não houve uma diferença preferencial na incidência de hipo ou hiperperfusão.

Entretanto, para os indivíduos diabéticos, as áreas de hipoperfusão predominaram sobre aquelas de hiperperfusão. O alto grau das alterações na população com diabetes é uma evidência animadora de que o status de seu fluxo sangüíneo cerebral é muito diferente do grupo-controle, mesmo quando estes indivíduos com a patologia não possuem nenhum sinal clínico ou ocorrência prévia de distúrbios cérebro-vasculares .

A severidade do distúrbio, diagnosticada a partir dos dados de fluxo sangüíneo, pode ser futuramente definida pelo número de regiões de interesse (R.I.) envolvidas, já que para os indivíduos possuidores da patologia, notou-se uma maior incidência de RI's alteradas se comparadas às RI's do grupo-controle.

A hipótese sustentada por Quirce et al.¹⁰⁸, de que o dano cerebro-vascular ocorre em associação com as complicações vasculares do diabetes melito é reforçada pela comprovação da existência das RI's com hipoperfusão. Os locais que demonstraram possuir a maior incidência de hipoperfusão consistem nas regiões frontal, fronto-temporal e o cerebelo.

A hipoperfusão na região frontal tem sido relatada também por Keymeulen et al.^{64,65}, os quais basearam suas explanações no efeito da hipoglicemia no fluxo sanguíneo cerebral e por Somers et al.¹²², que correlacionaram a hipoperfusão com ensaios neuropsicológicos.

Os resultados das investigações de Quirce et al.¹⁰⁸ e Jiménez-Bonilla et al.⁵⁶ têm confirmado a existência de alterações sub-clínicas no fluxo sanguíneo cerebral para uma série de pacientes e têm definido suas regiões de ocorrência preferencial. Com isto, estes pesquisadores confirmaram a importância da utilização de dados a respeito do fluxo sanguíneo cerebral pela técnica de SPET como procedimento para diagnosticar tais alterações.

Uma vez que as pesquisas já se desenvolveram a este ponto, falta ainda conseguir informações adicionais quanto à fisiopatologia dos pacientes portadores de diabetes melito, no que diz respeito ao envolvimento cerebrovascular, com vistas a estabelecer as medidas preventivas definitivas.¹⁰⁸ Talvez a principal limitação da tomografia SPET efetuada com ^{99m}Tc-HMPAO seja o fato de não permitir a quantificação absoluta do FSRC.¹⁰⁸

1.9.6. Correlação entre Mudanças no Fluxo Sangüíneo e Epilepsia

Já na década de 30, Penfield, W.^{106,107} conseguiu encontrar evidências sistêmicas de mudanças de fluxo sangüíneo associadas com ataques epiléticos focais por meio de observações intraoperativas em vasos sangüíneos piais.

Como pondera Duncan²⁹, as técnicas PET e SPET podem investigar essas mudanças em pacientes epiléticos de forma não invasiva. Segundo Engel, J.³² a aplicabilidade das técnicas de SPET e PET está na dependência de se localizar o foco epilético.

Contudo, SPET é o procedimento tomográfico mais indicado por ser capaz de detectar modificações no FSC relacionadas com o foco epilético, principalmente quando o radiofármaco ^{99m}Tc-HMPAO é utilizado. Uma vez que após a injeção deste traçador radioativo, a maior fração fica aprisionada no interior do tecido cerebral, isto possibilita os estudos ictais e imediatamente pós-ictais de FSC por SPET na prática clínica rotineira.

Duncan²⁹ descreve três alterações do FSC após ocorrência de um ataque de origem temporal com hiperperfusão de todo o lobo temporal. Num período compreendido em, no máximo, 2 minutos de ocorrência do ataque denominado pós-ictal imediato, o córtex médio temporal apresenta hiperperfusão, com ocorrência de hipoperfusão no córtex lateral.²⁹ Após decorrer um período de 15 minutos, a hipoperfusão manifesta-se sozinha, à qual pode ser localizada ao lobo temporal ou mais difusa para alguns casos. Por sua vez, os ataques de origem extra-temporal parecem mostrar um padrão distinto de mudanças de FSCR.

Savic et al.¹¹³ observaram a ocorrência de uma importante redução de ligações no receptor benzodiazepínico no foco epilético. Levando-se em consideração o fato do radiofármaco iomazenil marcado com ¹²³I ter tornado possível o estudo de ligações ao

receptor benzodiazepínico, Uemura¹²⁹ pôde prever que este tipo de ligante pode ser adaptado para aplicação em larga escala na prática clínica.

1.10. A Evolução dos Radiofármacos Perfusórios Cerebrais de ^{99m}Tc Baseados em Ligantes Aminotiólicos

1.10.1. Introdução : Requisitos Moleculares para Imagem de Perfusão Cerebral

Os radiofármacos, ao serem injetados intravenosamente, irão formar imagem de perfusão cerebral uma vez que possuam a capacidade de passar eficazmente para o interior dos tecidos cerebrais, refletindo o fluxo sanguíneo regional.⁹⁷ A natureza descontínua do revestimento dos capilares distribuídos pelo corpo é tal que permite a livre passagem de pequenas macromoléculas através dos espaços intercelulares.⁹⁷ Para o cérebro, entretanto, o revestimento endotelial é caracterizado por possuir junções fortes entre as células a ponto de não permitir a difusão de tais macromoléculas nem por meio de pinocitose.¹¹⁰ Ao conjunto de fatores que contribuem na restrição da motilidade do soluto da corrente sanguínea para o cérebro denomina-se “barreira hematoencefálica”. O ideal seria utilizar o transporte ativo de substâncias para fazer adentrar traçadores no espaço intracerebral mas normalmente, o cérebro irá limitar a entrada de substâncias específicas, como nutrientes essenciais e metabólitos que possuem características moleculares rígidas. Para que os compostos de ^{99m}Tc sejam passíveis de sofrer transporte ativo eles deveriam manter características moleculares dos agentes endógenos como momento dipolar, tamanho, carga, formato a ponto

de serem confundidos com eles. Entretanto, a incorporação de ^{99m}Tc em moléculas se dá por formação de complexos que são estruturas volumosas e acabam por interferir nas propriedades intrínsecas dos agentes endógenos inviabilizando a utilização do transporte ativo.

Afortunadamente, a barreira hematoencefálica se comporta igualmente às outras membranas biológicas no que diz respeito à facilidade da difusão simples de moléculas que possuam adequada lipofilicidade. Este processo permite a difusão através de membranas biológicas que é proporcional à diferença de concentração entre os lados interno e externo, com a substância migrando da região mais concentrada para a menos concentrada, podendo difundir-se para o lado de dentro ou para fora. Este tipo de difusão simples possui várias vantagens por não causar dispêndio de energia, não ser passível de saturação além de não ser inibido por outras substâncias.⁹⁷

1.10.2. Fatores que Influenciam na Difusão de Fármacos

.Peso Molecular : quanto maior for o peso ou o tamanho físico da molécula, menor tende a ser a difusão

.Ligação às Proteínas Plasmáticas : fármacos fortemente ligados às proteínas plasmáticas estarão menos disponíveis para difundirem-se através das membranas

.Grau de Ionização : a passagem de moléculas por membranas biológicas é intensamente depreciada com o aumento do grau de ionização.

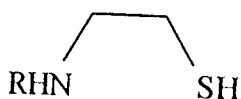
A afinidade entre diferentes espécies químicas está relacionada com o fato de possuírem características de polaridade próximas. Assim, compostos polares possuem afinidade por compostos polares e compostos apolares são afins de compostos apolares. Interessantemente, estes conceitos são relativos ao grau de polaridade que o composto possui, assim pode-se dizer que a afinidade entre 2 compostos tende a ser maior quando suas polaridades forem próximas.

Uma vez que as membranas biológicas possuem constituição lipo-proteica sabe-se que esta comporta-se preferencialmente como entidade apolar devido ao fato da fração lipídica (apolar) ser predominante.

1.11. Complexos de Nitrogênio e Enxofre Marcados com ^{99m}Tc que Cruzam a Barreira Hematoencefálica

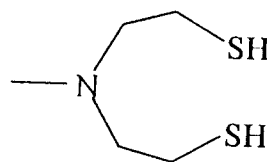
A partir de dados coletados da química inorgânica, os ligantes aminotiólicos bidentados e tridentados mostraram possuir a propriedade de formar complexos neutros com ^{99m}Tc além de serem facilmente sintetizáveis. Entretanto, estes tipos de ligantes não formaram complexos estáveis com ^{99m}Tc , desabilitando-os para o uso em hospitais e clínicas. Dannals et al.²⁰ puderam provar que estes complexos possuindo ^{99m}Tc faziam rápidas trocas com o ^{99}Tc , evidenciando assim, a não estabilidade destes.

Estruturas Bidentadas



aminoetanotiol

Estruturas Tridentadas



bis (mercaptoetil) aminas

Figura 2 - Estruturas ligantes de ^{99m}Tc

Alternativamente, foram sintetizados ligantes que possuísem mais pontos de ligação com o ^{99m}Tc , ou seja, as estruturas tetradentadas bis(hidroxietyl)etilenodiamínicas. Apesar destas formarem complexos neutros, nos estudos de estabilidade elas mantiveram o mesmo inconveniente de apresentarem sensível troca com ligantes.⁶⁷

Entretanto, análogos tetradentados contendo dois grupos tiólicos no lugar das duas hidroxilas produziram complexos neutros com ^{99m}Tc menos susceptíveis às trocas com outros ligantes capazes de fornecer uma captação transiente e correlacionada com o fluxo cerebral, característica perfusória desejada.⁷¹

Estruturas Tetradentadas Diaminoditiólicas

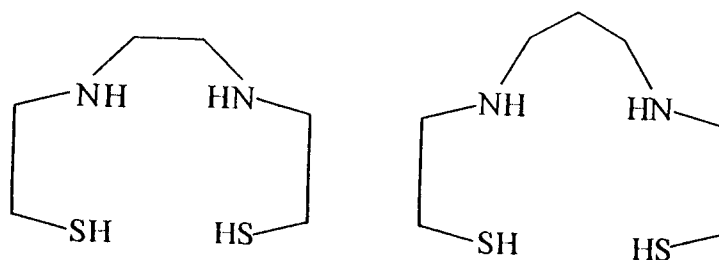


Figura 3 – Estruturas ligantes de ^{99m}Tc

Depois da descoberta dessas qualidades, restava fazer modificações que resultassem num radiofármaco melhorado em sua captação ou retenção cerebral. Kung et al.^{71,72}, em 1984, utilizaram-se de ligantes aminotiólicos (inicialmente denominados de BAT , *bis* aminotóis) que formavam complexos neutros de ^{99m}Tc e que fossem capazes de transpor a barreira hemato-encefálica devido ao fato de estarem desenvolvendo agentes perfusórios cerebrais.

Neste trabalho foram feitas substituições nos hidrogênios etilênicos e no hidrogênio amínico do ligante de forma a tentar otimizar a captação cerebral, conforme a figura 4 abaixo:

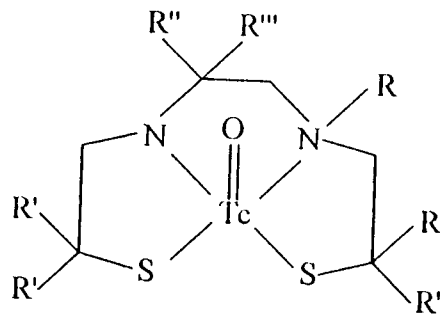


Figura 4 - BAT derivados marcados com ^{99m}Tc concebidos por Kung et al.⁷¹

Apesar dos diferentes derivados marcados apresentarem lipofilicidade e tamanhos moleculares variados, suas captações cerebrais não foram melhoradas a contento. Para otimizar sua retenção no espaço intracerebral, a estrutura deveria então possuir propriedades físico-químicas diferentes.

Existem grupamentos químicos que podem ser adicionados, por exemplo à estrutura (DADT) e que são apolares e capazes de ultrapassar membranas biológicas e, depois de adentrarem, passam a se polarizar no pH natural do ambiente proporcionando maior retenção cerebral. Trata-se de grupamentos amínicos ligados lateralmente ao DADT. A adição

desses grupamentos alquilamínicos ao esqueleto DADT para incrementar tal captação foi inicialmente sugerida por Kung et al.⁷¹

Efange et al.³¹ conceberam vários ligantes do tipo BAT possuindo uma cadeia alquilamínica na posição 5 com o nitrogênio sendo substituído por diferentes grupos químicos R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 , figura 5 :

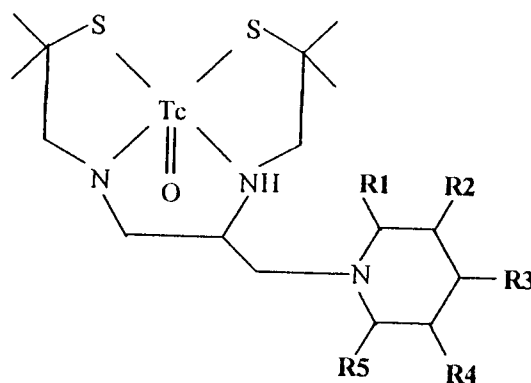


Figura 5 - Derivados BAT piperidínicos marcados com ^{99m}Tc concebidos por Efange et al.³¹

A inclusão da porção alquilamínica promoveu melhora significativa na retenção cerebral destes radiofármacos. A partir daí, os pesquisadores têm criado diversos derivados alquilamínicos e os ligantes BAT passaram a ser denominados de DADT (diaminoditiol).

A adição desses grupamentos alquilamínicos ao esqueleto DADT foi inicialmente estudada por Kung et al.⁷⁰ num trabalho que foi o ponto de partida para a elucidação de informações importantes a respeito das estruturas químicas que se formam especialmente quando o tecnécio-99m se complexa no esqueleto DADT. Quando o tecnécio se complexa com

a porção DADT possuidora de um grupo alquila na posição 4, o nitrogênio 4 por constituir hibridação sp^3 , possui três ligações químicas e um par de elétrons livres formando ângulos de aproximadamente 109° entre si, ocupando no espaço uma figura geométrica com o formato próximo ao de um tetraedro. Assim, quando o tecnécio se complexa, o nitrogênio 4 é capaz de posicionar o grupo alquila e duas diferentes maneiras, originando assim, dois tipos de compostos estereoisômeros, denominados respectivamente epímero A e epímero B (figura 6 abaixo) devido ao fato de originarem dois picos diferentes na espectrometria de ressonância nuclear magnética de próton e na cromatografia líquida de alta eficiência . Esse tipo de estereoisomeria geométrica foi também verificada por alguns autores.^{31,69,84}

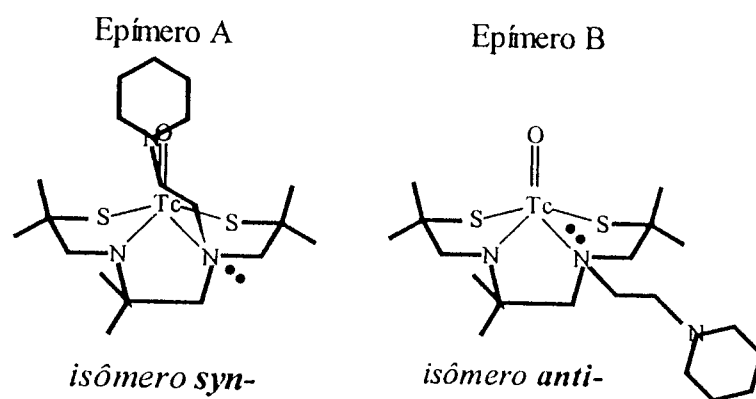


Figura 6– Isômeros geométricos de derivados DADT *N*-etilpiperidínicos marcados com ^{99m}Tc

Chiotellis et al.¹⁷, ensaiaram diferentes tipos de ligantes aminotiólicos de forma a averiguarem quais deveriam ser as estruturas mais adequadas para complexar com ^{99m}Tc , que fossem neutras ou lipofílicas e que pudessem ser consideradas como o ponto de partida para a criação de radiofármacos perfusórios cerebrais congêneres. Foram então concebidos ligantes do tipo N_2S_2 , N_3S_2 , N_4S_2 denominados de ligantes de configuração A, configuração B e configuração C respectivamente, figura 7. Os diferentes tipos de ligantes foram marcados com ^{99m}Tc e avaliados por meio de distribuições biológicas em animais.

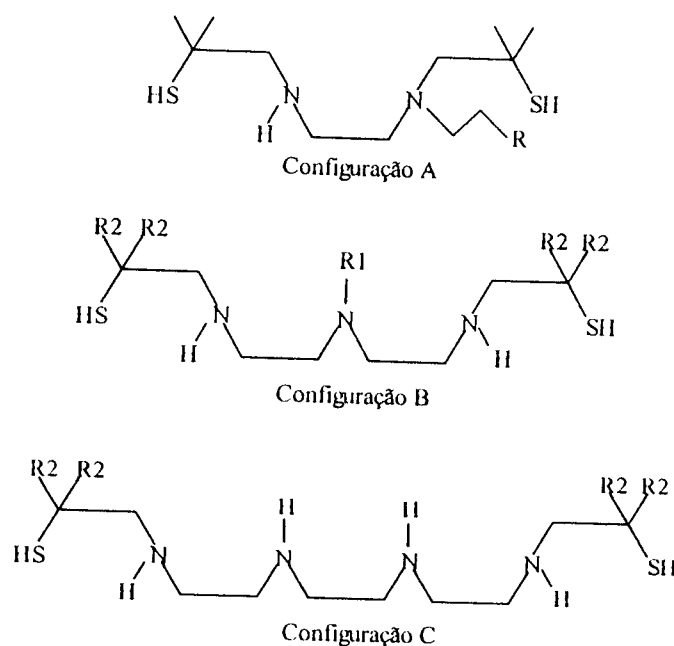


Figura 7 – Diferentes Ligantes N_2S_2 , N_3S_2 , N_4S_2 de ^{99m}Tc , Chiotellis et al.¹⁷

Estudos de relação estrutura-atividade evidenciaram o fato dos tipos de configuração dos ligantes estarem fortemente envolvidos com a penetração dos radiofármacos na barreira hematoencefálica e com suas respectivas retenções cerebrais. Em concordância com os achados de Efange et al.³¹, Chiotellis et al.¹⁷ também concluíram que as maiores afinidades pelo cérebro eram devidas à inclusão de um grupamento alquilamínico adicional ao ligante de configuração A. O grupamento amínico foi incluído em R, figura 7. Outro importante achado de Chiotellis et al.¹⁷ consiste na constatação de que o distanciamento do grupo amínico com relação ao ligante DADT de configuração A, provocado por uma cadeia alquílica mais longa propicia a formação de complexos de ^{99m}Tc com pouca afinidade pelo cérebro.

Assim, de forma a melhor esclarecer a influência exercida dos grupos alquilamínicos nos radiofármacos projetados à base de ligantes DADT, Scheffel et al.¹¹⁴ efetuaram também uma investigação de compostos equivalentes aos de Chiotellis et al.¹⁷ de forma a avaliar a influência dos pK_a 's de diferentes aminas ligadas por cadeia alquílica ao complexo ^{99m}Tc - DADT na captação cerebral dos radiofármacos. Scheffel et al.¹¹⁴ utilizaram-se de compostos equivalentes aos da configuração A de Chiotellis et al.¹⁷ em que seus grupamentos amínicos foram modificados, como mostra a figura abaixo:

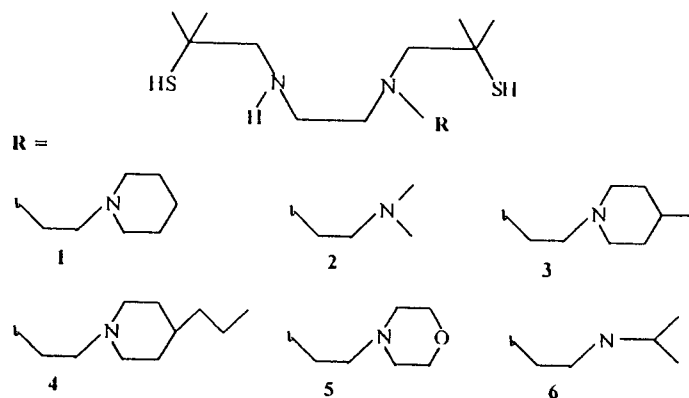


Figura 8 - Derivados DADT *N*-etilamínicos sintetizados por Scheffel et al.¹¹⁴

Adicionalmente, Scheffel et al.¹¹⁴ estudaram também o efeito provocado por derivados alquilamínicos possuindo cadeias carbônicas estendidas possuindo 6 grupos metilênicos :

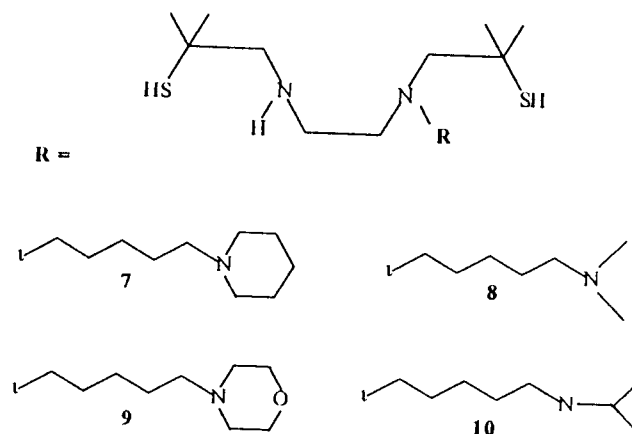


Figura 9 - Derivados DADT *N*-hexilamínicos sintetizados por Scheffel et al.¹¹⁴

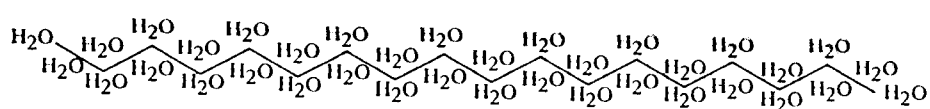
Para estes diferentes derivados sintetizados, Scheffel et outros¹¹⁴ correlacionaram seus coeficientes de partição octanol-tampão, com as respectivas captações cerebrais de forma a elucidar quais seriam os melhores candidatos a serem utilizados como agentes perfusórios cerebrais. Os resultados demonstraram claramente que a grande maioria dos radiofármacos de ^{99m}Tc, baseados nas aminas de cadeia carbônica mais curta (figura 8) demonstraram possuir maiores coeficientes de partição e superior captação cerebral, se comparados aos correspondentes radiofármacos de cadeia estendida da figura 9.

O complexo formado entre o derivado 3 e ^{99m}Tc resultou num coeficiente de partição mais elevado e na maior retenção cerebral. Em realidade, os derivados de cadeia carbônica estendida foram criados por Scheffel et al.¹¹⁴ na tentativa de resultarem em radiofármacos mais lipofílicos e, portanto, possuidores de maior captação cerebral. De fato, o coeficiente de partição possui propriedade aditiva-constitutiva, ou seja, a inclusão de, por exemplo, grupos

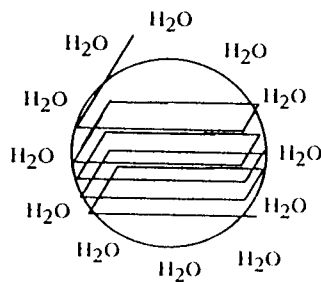
CH_2 numa molécula, faz com que esta tenha um incremento em seu coeficiente de partição que pode ser um fator 2, podendo chegar até 4.^{18,80}

Na prática, entretanto tais radiofármacos de cadeia mais longa demonstraram possuir menores coeficientes de partição, ou seja, menor lipofilicidade, contrariando a propriedade aditiva-constitutiva. Leo et al.⁸⁰ descreveram quais poderiam ser as influências das mudanças conformacionais de compostos orgânicos em solução no comportamento aditivo-constitutivo.

De acordo com estes autores, quando cadeias alifáticas se tornam suficientemente longas, pode-se prever que elas tendem a formar helicóides em solução com a formação de estruturas moleculares em formato de gotícula de óleo. Se a cadeia alifática assumiu o formato de gotícula, pode-se esperar que o número de moléculas de água que permanecem presas nas redondezas (formando um aglomerado de moléculas que permanecem vibrando) seja menor do que o número de moléculas de água que ficam circundando uma cadeia estendida, como na figura abaixo:



molécula distendida



molécula contorcida

Figura 10 - Águas de solvatação em cadeias estendida e contorcida

Como resultado, o coeficiente de partição das cadeias mais alongadas não experimentam os incrementos esperados nos coeficientes de partição. Adicionalmente, Scheffel et al.¹¹⁴ perceberam ainda que o aumento da cadeia carbônica ocasionou aumento nos valores de pka aparente, propiciando maior protonação das aminas e, conseqüentemente, depreciando a entrada dos radiofármacos no espaço intracerebral.

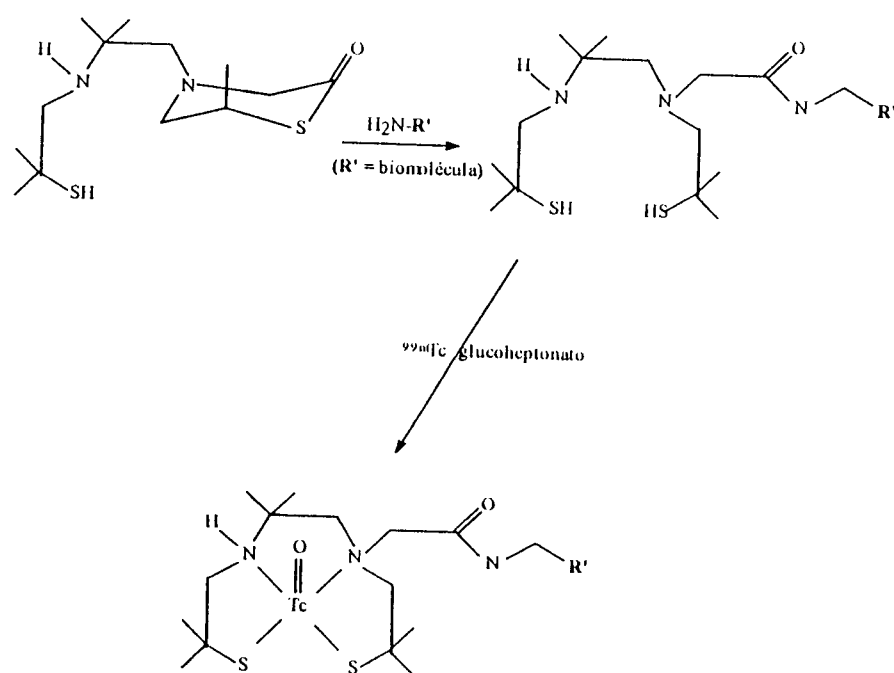
1.11.1. Quelatos Bifuncionais de ^{99m}Tc do Tipo DADT

Comparando estruturas químicas capazes de se complexar com ^{99m}Tc, Volkert¹³¹ concluiu que relativamente poucos ligantes mostraram ser eficientes para a preparação de quelatos formados à partir de pequenas quantidades de quelantes, da ordem de grandeza de 50 µmoles ou menos.

Para se conseguir tal eficiência, os ligantes acabam por ser estruturas tetradentadas, contendo grupos tiol sendo os restantes, grupos constituídos por átomos de nitrogênio doadores de elétrons, usualmente sob forma de nitrogênios amínicos ou amídicos.¹³¹

As estruturas do tipo diaminoditiólicas (DADT), baseadas no conceito de "agentes quelatos bifuncionais" têm sido utilizadas para conectarem especificamente ^{99m}Tc ou rênio às biomoléculas com a vantagem de se utilizar pequenas quantidades de ligante ou de biomolécula pré-conjugada.^{5,6,7,21,57,}

Baidoo et al.^{5,6,7} desenvolveram um processo de marcação especial de um grupamento DADT bifuncional do tipo tiolactona, capaz de se associar com biomoléculas, pois ele se conjuga com porções amínicas de forma a liberar grupos -SH livres, permitindo assim a incorporação de ^{99m}Tc (sob forma de ^{99m}Tc -glucoheptonato) com estas biomoléculas, com atividades específicas estimadas em 18,5 GBq/ μmol , esquema 5 :



Esquema 5 – Quelato tiolactona N_2S_2 para formar bioconjugados ^{99m}Tc -DADT adaptado de Baidoo et al.^{6,7}

A porção diaminoditióica tem sido utilizada para marcar especificamente agentes-alvo com afinidade por receptores biológicos. Os complexos de Tc ou Re formados, considerados como a porção conjugada da molécula como um todo, são neutros e lipofílicos^{21,28} para se difundirem livremente através das membranas celulares. DiZio et al.²⁸ sintetizaram um conjugado de progestina em que a porção DADT está acoplada ao esteróide, como indica a figura abaixo:

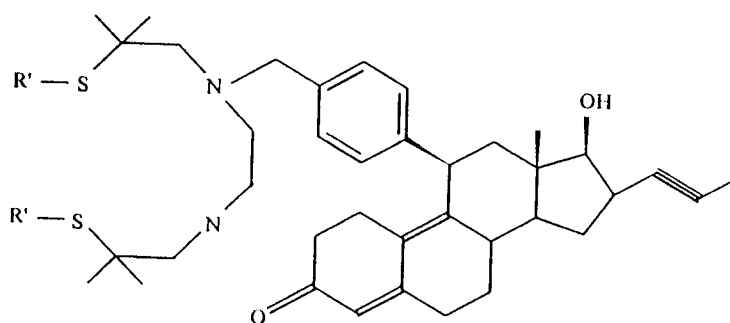


Figura 11 – Conjugado de Progestina e DADT, Dizio et al.²⁸

Pesquisas utilizando-se do conceito de marcadores bioquímicos têm incluído quelatos DADT conjugados com peptídeos de tal forma a não interferir na capacidade destes peptídeos em se ligar a receptores biológicos. Segundo Lister-James et al.⁸⁵, os peptídeos possuindo até 3.500 Da, considerados de baixo peso molecular e que são capazes de se ligar a receptores biológicos se constituem em excelentes agentes para a criação de radiofármacos adequados para efetuarem ligações específicas, de forma a atuarem como marcadores bioquímicos que produzam imagens *in vivo*.

Para simplificação de terminologia, Lister-James et al.⁸⁵ cognominaram os peptídeos de tecnécio como “techtides” e, de forma a aporuguesar tal neologismo adotou-se a palavra “tectídeos”.

1.12. Tectídeos de DADT que se Ligam às Plaquetas Ativadas

Lister-James et al.⁸⁵ investigaram uma categoria de peptídeos capazes de se ligar com o receptores do tipo GPIIb/IIIa que se situam na porção superficial das plaquetas ativadas. Esta pesquisa com tais radiofármacos, promoveu um relevante avanço na detecção de trombos venosos e arteriais, os quais ocorrem em casos de trombose venosa profunda, embolia pulmonar, placa aterosclerótica rompida, acidente vascular cerebral (A.V.C.), infarte do miocárdio, além de certos tumores.

Uma vez que as moléculas que conseguem mediar a adesão celular, tais como fibrinogênio, fibronectina e o fator de Willebrand, ligam-se ao receptor GPIIb/IIIa através de uma seqüência peptídica Arg-Gly-Asp e já que estes três amino-ácidos possuem somente uma baixa afinidade pelo receptor, Lister-James et al.⁸⁵ estudaram uma série de peptídeos de alta afinidade pelo receptor, em que o domínio de ligação do receptor foi confinado conformacionalmente dentro de uma porção sulfeto cíclica.

O peptídeo P357, figura 12 abaixo, é um dímero que possui a seqüência especial Apc-Gly-Asp, em que o amino-ácido arginina foi substituído pela Apc (S-(3-aminopropil) cisteína) para melhor se acoplar ao receptor biológico. O P357 inclui em sua estrutura o ligante DADT que é capaz de se complexar com ^{99m}Tc à temperatura ambiente:

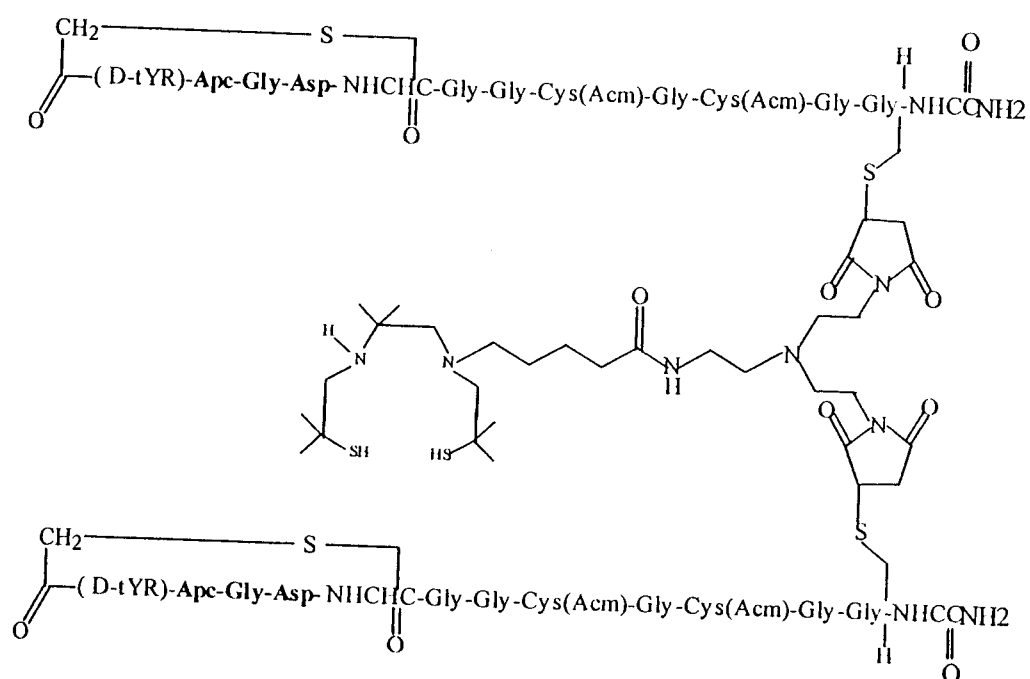
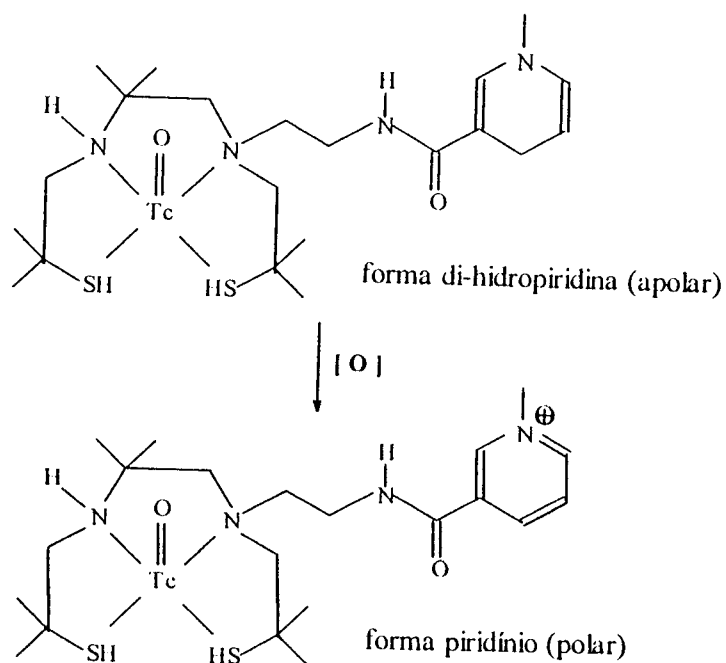


Figura 12 – Peptídeo P357, dímero conjugado com DADT, Lister-James et al.⁸⁵

Em testes com animais o P357 demonstrou possuir alta captação a nível de trombo. Além disto, o peptídeo P357 tem fornecido excelentes imagens clínicas não somente para trombose venosa profunda, mas também para embolia pulmonar.

1.13. Pró-Fármacos de DADT que Agem Como Carreadores de Radiofármaco

Gonçalves et al.⁴⁰ desenvolveram radiofármacos possuidores do ligante DADT e de um grupamento químico lipofílico carreador criado por Bodor et al.¹², com característica específica de facilitar a retenção cerebral. Este grupo carreador di-hidropiridina (DHP) constitui-se de um anel piridínico reduzido que possui grande oxidabilidade de forma a se transformar num grupamento piridínio, que é polarizado positivamente com carga iônica :



Esquema 6 – Oxidação do composto di-hidropiridina, adaptado por Gonçalves et al.⁴⁰

Dessa forma, estes fármacos foram projetados para, uma vez injetados, sua porção DHP é capaz de adentrar no cérebro sob forma de di-hidropiridina. Uma vez que a sua oxidação tenha acontecido dentro do cérebro, se transformando na forma piridínio, o fármaco polarizado fica retido no cérebro por tempo maior. Em realidade a porção DHP foi criada e fundamentada no conceito de pró-fármaco pois uma vez atingido o tecido-alvo, esta se transforma no fármaco biologicamente mais ativo, ou seja, a espécie polar piridínio é capaz de ficar retida no cérebro devido ao fato de não conseguir sair do espaço intracerebral por não transpor a barreira hematoencefálica.

1.14. Marcadores Bioquímicos Baseados em DADT - ^{99m}Tc

Kung et al.⁶⁸, num exemplo notável de avanço no campo diagnóstico da Farmácia Nuclear baseada em quelatos DADT- ^{99m}Tc , desenvolveram um novo conceito para marcadores bioquímicos. Enquanto os grupos de investigação concentram os seus esforços em desenvolver radiofármacos marcados com tecnécio-99m para o mapeamento de receptores biológicos, Kung e outros.⁶⁸ apresentaram à comunidade científica em 1998, uma pesquisa iniciada há dois anos, novos compostos derivados do tropano marcados com o mesmo radionuclídeo, que forneceram imagens capazes de avaliar os agentes endógenos transportadores da dopamina, no sistema nervoso central. Tais tropano-derivados, conjugados a uma porção DADT, após serem marcados com ^{99m}Tc , têm sido considerados como agentes úteis para o estudo do mal de Parkinson, efetuado através de imagens *in vivo* de SPET.

Segundo os mesmos autores, a captação cerebral dos tropano derivados deve ser estudada em especial para os primeiros dois minutos, após ter sido efetuada a administração intravenosa do radiofármaco, pois este espaço de tempo notável é um indicador-chave para a avaliação da penetração na barreira hematoencefálica. Um dos tropanos estudados, denominado TRODAT, figura 13, demonstrou possuir uma captação cerebral, expressa em %dose/órgão, de 0,4% considerada como boa para a construção de imagens além de possuir excelente captação seletiva para o striatum, sugerindo com isso possuir ligação aos transportadores da dopamina no cérebro :

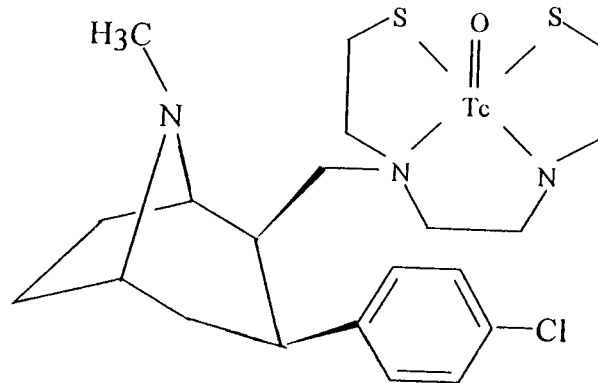


Figura 13 – TRODAT marcado com ^{99m}Tc , Kung et al.⁶⁸

1.15. Criação Racional de Radiofármacos Perfusórios a Serem Marcados com ^{99m}Tc

O desenvolvimento racional de agentes perfusórios cerebrais marcados com ^{99m}Tc , se concentra na descoberta de complexos que combinem corretamente propriedades físicas que os permitam se comportarem como traçadores de livre difusão.⁸⁶ Mas, para que o candidato seja adequado ao uso rotineiro em SPET ele deve, necessariamente, possuir uma retenção cerebral tal que seu clareamento do cérebro não mude mais do que um fator 2.⁹⁷

A pesquisa de novos fármacos é tarefa árdua uma vez que a tentativa aleatória de criação de uma nova estrutura química que satisfaça os requisitos a que se destinam possui a probabilidade de 1 / 3.000 a 1/20.000, números que inviabilizam a pesquisa laboratorial aleatória. Assim, pesquisadores que atuam na área de modelagem molecular, têm se ocupado em desenvolver métodos racionais que conduzam à concepção de fármacos biologicamente ativos que não impliquem em síntese de um número tão grande de compostos.

Entretanto para reduzir expressivamente as tentativas, deve-se desvendar quais são as propriedades físico-químicas que o fármaco possui e que confirmam a ele a ação biológica que se deseja desenvolver. Para se possuir um maior domínio das forças que guiam a ação biológica estão surgindo procedimentos que quantificam as influências de cada propriedade físico-química como a Q.S.A.R. ("Quantitative Structure Activity Relationship") e a Q.S.P.R. ("Quantitative Structure Property Relationship").

De acordo com Wold e Eriksson¹³⁷, o processo de estabelecer relações estrutura-atividade confiáveis envolve alguns passos importantes que estão intimamente relacionados. Primeiramente, são selecionados os compostos representativos que possibilitem o ajuste e validação da QSAR. Em seguida, procede-se então à caracterização química multivariada desta série de compostos e à caracterização do perfil biológico destes. Procede-se então à

modelagem de QSAR e à validação do modelo.¹³⁷ Hui et al.⁵⁰ elaboraram uma investigação de QSAR justamente a respeito de radiofármacos perfusórios cerebrais DADT marcados com ^{99m}Tc utilizando análise por regressão múltipla, de forma a elaborar equações que quantificassem a influência de cada parâmetro físico-químico na atividade biológica, expressa em % captação cerebral. Tais equações passam a ser importantes instrumentos de modelagem molecular, uma vez que possam predizer a atividade biológica de novos congêneres, candidatos a radiofármacos. A grande vantagem deste tipo de procedimento está em se minimizar o tempo de desenvolvimento laboratorial e os esforços para se obter fármacos otimizados uma vez que promoveu-se sensível redução no número de candidatos requeridos para serem concebidos e ensaiados.

1.15.1 Escolha Racional de Candidatos a Radiofármacos Perfusórios ^{99m}Tc -DADT Baseada nos Descritores Moleculares Quantitativos

O desenvolvimento racional de novos fármacos, pode ser baseado em descritores quantitativos de suas propriedades físico-químicas que estejam significativamente relacionados com sua atividade biológica.

Por inúmeras vezes a atividade biológica dos fármacos foi comprovadamente correlacionada preferencialmente a um descritor molecular. A natureza dos descritores utilizados e a extensão com que eles podem codificar as características das moléculas, se constitui numa tarefa crucial do estudo de QSAR.⁵⁹

Dentre as centenas de descritores, pode-se citar os parâmetros físico-químicos como o hidrofóbico, estérico ou eletrônico, ou descritores estruturais como a frequência de ocorrência de uma estrutura, ou podem ser eletrônicos os quais são obtidos a partir de cálculo de orbital molecular, ou geométricos obtidos a partir cálculo de superfície de área molecular.⁵⁹ Serão descritos a seguir os descritores moleculares que foram efetivamente utilizados na modelagem molecular dos candidatos a radiofármaco perfusório baseados em ^{99m}Tc -DADT.

1.15.2. Coeficiente de Partição^{59,80}

Dentre os vários trabalhos de QSAR elaborados para fármacos cerebrais, já é consenso o fato do coeficiente de partição ser o principal descritor molecular a ser estudado e otimizado uma vez que ele dita se o fármaco é capaz ou não de adentrar no cérebro, ou seja, de transpor a barreira hematoencefálica. O cérebro possui grande seletividade com relação às características de polaridade dos compostos químicos que conseguem penetrar no seu interior.

A fisiologia cerebral está correlacionada com a geração e recepção de impulsos nervosos, que são fenômenos de natureza elétrica. A entrada de compostos polares no interior do cérebro, como por exemplo eletrólitos, ocasionaria uma indução ou estimulação nervosa desordenada. Dessa forma, a barreira hematoencefálica só permite a livre difusão de espécies químicas lipofílicas ou com um determinado grau de apolaridade não importando se as mesmas são de natureza endógena ou exógena.

Entretanto, quando se projeta um fármaco para ficar retido no espaço intracerebral, este não pode possuir uma apolaridade muito pronunciada pois possuirá tanto a facilidade de entrar como a de sair, ficando dependente do gradiente de concentração de fármaco existente entre os dois lados. Outrossim, sua estrutura apesar de ser lipofílica, deve possuir um certo grau de polaridade. De forma a melhor ajustar o grau de polaridade dos fármacos, foi desenvolvido um descritor físico-químico denominado coeficiente de partição que mede a distribuição de um soluto quando submetido à agitação entre 2 líquidos imiscíveis, a saber o sistema n-octanol-água. Uma vez que as taxas de concentração do soluto, distribuído entre as duas fases, é constante e não dependente dos volumes utilizados, o processo de partição ocorrerá de forma a estabelecer um equilíbrio, pois há tendência de qualquer espécie molecular simples de soluto se deslocar para o solvente em que possui afinidade preferencial.

Neste sistema de solventes, o n-octanol representa a fase apolar e a água, a fase polar. Quando determinado fármaco é submetido à agitação no sistema n-octanol-água com seus solventes pré-saturados mutuamente, ele se distribui preferencial pela fase que possui polaridade mais próxima da sua. Assim o coeficiente de partição é calculado dividindo-se sua concentração na fase orgânica por sua concentração na fase aquosa:

$$\text{coeficiente de partição} = \frac{[\text{fármaco}]_{\text{fase orgânica}}}{[\text{fármaco}]_{\text{fase aquosa}}}$$

Equação 2

O coeficiente de partição é uma medida quantitativa e que acaba por fornecer informações à respeito com relação à polaridade de um composto.

1.15.3. Descritores Eletrônicos de Molécula Total

Existem vários descritores de molécula total que têm sido utilizados para efetuar sua codificação eletrônica.⁵⁹ Dentre eles destacam-se a polarizabilidade e refratividade na modelagem de novos radiofármacos perfusórios, pois além de serem propriedades fortemente correlacionadas entre si, estas são uma medida da susceptibilidade que a molécula tem de se tornar polarizada.⁵⁹ Adicionalmente, polarizabilidade é uma propriedade que está relacionada com a estabilização intramolecular de íons orgânicos em solução.^{14,138}

Sabe-se que o maior afluxo de radiofármaco para o interior do cérebro ocorre nos primeiros minutos após ter sido injetado intravenosamente. Isto significa que se o radiofármaco possuir alta polarizabilidade, e se este se polarizar no espaço intracerebral, tem-se então um especial mecanismo para aumentar sua retenção cerebral.

Polarizabilidade é uma medida da facilidade relativa de distorção da nuvem eletrônica de um sistema dipolar quando exposto a um campo elétrico externo. Polarizabilidade é um descritor eletrônico a ser explorado nos candidatos a radiofármaco perfusório por estar implicada também com a estabilização de uma amina protonada⁴. Portanto, estabelecer uma correlação existente entre polarizabilidade e captação cerebral, significa achar um indicador útil na modelagem de um fármaco que transponha a barreira hematoencefálica e se protonize no pH e ambiente intracerebral ficando assim retido mais intensamente.

Afortunadamente, em 1984, Gasteiger e Hutchings³⁸ até então pesquisadores do Organisch-Chemisches Institut, Technische Universität München, desenvolveram brilhantemente um modelo de metodologia de cálculo teórico de polarizabilidade que se ajustasse com as determinações empíricas ensaiadas por eles. Segundo tais autores, o valor de qualquer modelo só pode ser estimado ensaiando-se sua fidedignidade contra dados já

conhecidos. Assim os modelos de polarizabilidade foram ensaiados e comparados a três diferentes grupos de dados experimentais, a saber:

- Dados químicos obtidos a partir de equilíbrios de transferência de próton em alquilaminas (as determinações foram efetuadas em fase gasosa para eliminar as complexas influências dos solventes) ;
- Dois tipos de dados físicos relacionados a determinações de espectro fotoelétrico de raios-X : medida de elétrons ESCA que são associados aos deslocamentos da energia de ligação dos elétrons 1s de nitrogênio e dados derivados da combinação de experimentos ESCA-Auger efetuados em cloro e germânio.

Gasteiger et al.³⁸ desenvolveram o termo α_d , ou polarizabilidade efetiva que possui as dimensões da polarizabilidade e é uma medida da energia de estabilização molecular.

1.15.4. Labilidade à Hidrólise

A química orgânica tem estudado a labilidade de grupos funcionais em presença de solventes. Nos fenômenos denominados de solvólise, os solventes, que possuem o papel de agentes dispersantes de soluto, passam a reagir com estes assumindo o papel de reagente e fazendo com que o soluto seja degradado a outro tipo de espécie química (quando o solvente em questão é a água, o processo é denominado de hidrólise).

Interessantemente, a hidrólise é um processo de solvólise notável, considerando-se os fármacos de uma forma geral, por se levar em consideração que estes estarão, de alguma forma, imersos em água tissular, sangüínea, linfática, intersticial, lacrimal, etc.

Ao invés de ser estudado como processo de degradação dos fármacos, a solvólise tem sido utilizada pela técnica de latenciação de fármacos como forma de otimização de sua biodisponibilidade. Assim, são concebidos pró-fármacos possuindo grupamento químico hidrolábil que, após serem administrados no paciente, sofrem hidrólise liberando no local de ação o fármaco, espécie biologicamente ativa.

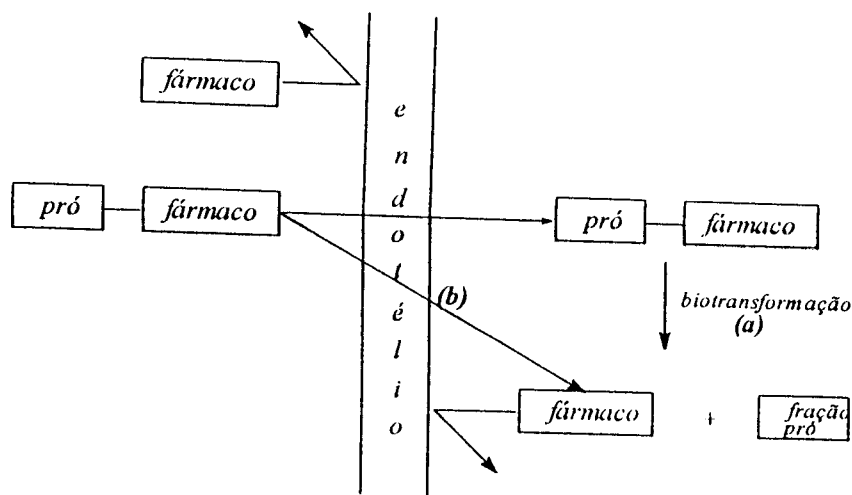
Friis et al.³⁶, descrevem o pró-fármaco rolitetraciclina, que foi projetado para possuir melhor dissolução e biodisponibilidade por via oral do que o fármaco que o originou. Rolitetraciclina é uma base de Mannich altamente solúvel em água que é usada clinicamente porque se decompõe quantitativamente em água, com uma meia-vida química de 40 minutos em pH 7,4 a 37°C, liberando a tetraciclina. As bases de Mannich se degradam independentemente de catálise enzimática pois as taxas de hidrólise ocorrem de forma similar tanto em soluções-tampão como no plasma.

Assim, em termos de latenciação de fármacos, labilidade é um caso especial de descritor molecular utilizado em estudos de QSPR ("Quantitative Structure- Property Relationship").

Pró-Fármacos Ésteres : Funções Bio-Lábeis

Segundo Friis e Bundgaard³⁶, os ésteres são funções largamente utilizadas como pró-fármacos devido ao fato do organismo humano ser pródigo em possuir esterases capazes de hidrolizá-los. A distribuição de tais enzimas é difusa no organismo e vários tipos podem ser encontrados no sangue, fígado e outros órgãos e tecidos.³⁶

Os ésteres podem e devem ser modelados para fornecerem ao pró-fármaco a característica de labilidade *in vivo* para que os subprodutos formados assim, sejam as espécies biologicamente mais ativas, o que significa em termos de radiofármacos perfusórios, maior retenção cerebral, como no esquema 7, abaixo:



Esquema 7 – Biotransformação enzimática (a), ou não enzimática (b) intracerebral, Friis e Bundgaard³⁶

Para se modelar o éster que deve ser incluído na estrutura do pró-fármaco, deve-se levar em consideração o fato de que sua reatividade química é previsível em termos de propriedades estéricas e eletrônicas dos substituintes do éster, nas porções acila, R' e álcool, R'', figura abaixo.

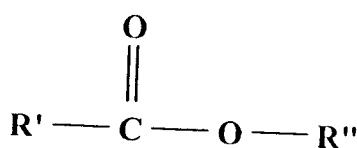


Figura 14 – Substituintes da função éster

Entretanto, no sistema biológico tais previsões não se aplicam, por se tratar de hidrólises enzimáticas.³⁶ Os efeitos estéricos geralmente influenciam e alteram tanto as taxas de hidrólise não enzimática como enzimática. Friis et al.³⁶ atentaram para o fato de que para este tipo de hidrólise enzimática, as propriedades hidrofílicas e a carga do éster podem exercer as influências mais intensas e ponderaram que os dados a respeito de hidrólise não enzimática não podem ser usados como referência confiável para predizer o comportamento das reações catalisadas por enzimas. Segundo estes autores, a melhor forma de se obter uma impressão precoce da taxa de hidrólise *in vivo* de um pró-fármaco pode ser a mensuração de tal taxa de hidrólise justamente na presença de um sistema apropriado que possua o tipo de enzima que se deparará com o pró-fármaco como por exemplo o plasma, homogenato de tecido cerebral para o caso dos radiofármacos perfusórios cerebrais.

Deve ser notado o fato de existirem sensíveis diferenças entre as susceptibilidades de hidrólise enzimática de ésteres, considerando-se os diferentes tipos de esterases e de substratos. Adicionalmente, os estudos de labilidade de substratos à hidrólise enzimática não devem ser efetuados em modelos animais, devido ao fato destas reações ocorrerem com velocidades significativamente diferentes no plasma de animais normalmente utilizados em experiências laboratoriais do que no plasma humano.³⁶

2.OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver novos radiofármacos do tipo diaminoditiólicos marcados com ^{99m}Tc de como potenciais agentes perfusórios cerebrais. Inicialmente, escolheram-se agentes diagnósticos tomográficos cerebrais, devido ao fato destes estarem se constituindo num dos maiores campos de interesse na medicina nuclear, graças à gama de informações que eles podem fornecer a respeito do sistema circulatório cerebral.

O escopo fundamental do trabalho consistiu em dar continuidade, no Brasil, às pesquisas mundiais de escolha de novos radiofármacos de ^{99m}Tc do tipo diaminoditiólicos, a serem utilizados como agentes perfusórios cerebrais para diagnósticos tomográficos SPET.

2.2 . OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O objetivo geral suscita, por sua vez, tarefas estratégicas básicas imprescindíveis ao seu andamento, como a nacionalização da tecnologia de síntese dos derivados diaminoditiólicos e o desenvolvimento de metodologias para separação e purificação dos intermediários de síntese, que são as espécies químicas adequadas à marcha de reações e que conduzem a rota sintética até a obtenção dos novos compostos químicos, candidatos a radiofármacos. Outra proposição estratégica consistiu na racionalização dos métodos de escolha das moléculas que seriam ensaiadas como radiofármacos perfusórios. Assim, diferentemente das tentativas aleatórias, procedeu-se à modelagem molecular fundamentada na técnica de QSAR, de forma a estudar uma série de compostos congêneres, possuidores da

estruturas comum do tipo DADT, pelo fato desta permitir a elaboração de estudos inferenciais com relação às suas atividades biológicas inerentes às estruturas químicas, delineando assim as alterações estruturais que conduzam à atividade biológica desejada. Outro procedimento de planejamento racional utilizou-se da técnica de QSPR, de forma a estudar grupamentos químicos que uma vez ligados à estrutura DADT, otimizassem suas características de biodisponibilidade no espaço intracerebral.

Com o intuito de ensaiar o potencial dos novos derivados DADT marcados com ^{99m}Tc como agentes perfusórios cerebrais, efetuou-se distribuições biológicas em camundongos Swiss, para ensaiar seus desempenhos em adentrar o espaço intracerebral, bem como as suas capacidades de ficarem retidos neste local.

3. MATERIAIS, PLANEJAMENTO E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Reagentes - Solventes

- Acetona PA (Carlo Erba) ;
- Acetato de etila PA (Merck) ;
- Ácido p-tolilsulfônico PA (Merck) ;
- Ácido clorídrico PA (merck) ;
- Ácido sulfúrico PA (Merck) ;
- Água deuterada, GE (Merck) ;
- Boroidreto de sódio PA (Fluka) ;
- Butambeno, picrato GF (Abbott – Laboratórios do Brasil) ;
- Cloreto de amônio PA (Sigma) ;
- Cloreto de cloroacetila PS (Fluka) ;
- Cloreto de sódio PA (Merck) ;
- Clorofórmio deuterado, GE (Merck) ;
- 1,2-diamino-2-metilpropano PS (Fluka) ;
- Dicloreto de dicnóxofre PS (Aldrich) ;
- Dimetilsulfóxido deuterado GE (Merck) ;
- Etanol PA (Merck) ;
- Éter dietílico PA (Carlo Erba) ;
- Éter de petróleo PA (Merck) ;
- Hidreto de lítio e alumínio PS (Fluka) ;
- Hidróxido de sódio PA (Merck) ;

- Isobutiraldeído, puríssimo > 99% (Fluka) ;
- Metanol PA (Merck) ;
- Pertecnetato de sódio, solução estéril apirogênica eluída de gerador ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (IPEN) ;
- Sulfato do magnésio PA (Nuclear) ;
- Tetracloroeto de carbono PA (Merck) ;
- Tetraidrofurano PA (Merck) .

Onde:

PA = grau de pureza para análise

PS = grau de pureza para síntese

GF = grau farmacêutico de pureza

GE = grau espectroscópico de pureza

3.1.2. Equipamentos

- Aparelho para determinação dos pontos de fusão e ebulição Mettler, modelo FP-5, Suíça ;
- Balança modelo HM100, Helmac, Brasil ;
- Balança analítica Mettler-Toledo modelo PB 303 , Suíça ;
- Calibrador de radioisótopos, modelo Mediac, Nuclear Chicago, Estados Unidos;
- Contador automático de poço, com cristal de NaI(Tl), modelo MAG 312, Berthold, Alemanha ;
- Câmara de cintilação digital planar Gama Technical, Micro Segams Softer System, modelo V4.19, Hungria ;
- Câmara anidra acrílica para manipulação de materiais higroscópicos, IPEN, Brasil ;
- Contador automático tipo poço, com cristal de NaI(Tl), modelo ANSR, Abbott, Brasil;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters - Multisolvant System, com degaseificador, detetor UV e integrador Waters, Estados Unidos e com detetor de radiação gama Camberra;
- Espectrômetro de ressonância nuclear magnética Bruker de 300 MHz, Estados Unidos ;
- Espectrômetro de ressonância nuclear magnética Bruker de 200 MHz ;
- Espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier, 1750, Perkin Elmer, Estados Unidos ;
- Evaporador rotatório Büchi, modelo R-124, Suíça.
- Glove box com pressão negativa para manipulação de materiais radioativos ;
- Medidor analógico de pH Metrohm Heriseo, modelo E-350-B, Suíça.

3.1.3. Aparatos de Vidro

- Aparelho dessecante de Abden Halden ;
- Aparato de destilação com coluna de Vigreux ;
- Balões de reação de 3 e 4 bocas com condensador de bolas ;
- Funil de adição com pressão compensada ;
- Aparato de cromatografia em coluna do tipo "Flash Chromatography" com válvula de alívio de pressão;
- Aparato de Dean-Stark .

3.1.4. Materiais Gerais

- Óxido de alumínio para cromatografia em coluna (Merck) ;
- Sílica gel para cromatografia em coluna (Aldrich) ;
- Sílica gel aluminizada para cromatografia em camada delgada TLC (Whatman) ;
- Papel para cromatografia em camada delgada de fibra de vidro impregnada de sílica-gel tipo ILTC-SG (Gelman) ;
- Sílica-gel para "Flash Chromatography" (Aldrich) ;
- Sílica-gel - 60 A⁰ para cromatografia em coluna (Riedel de Häen) ;

3.1.5. Animais

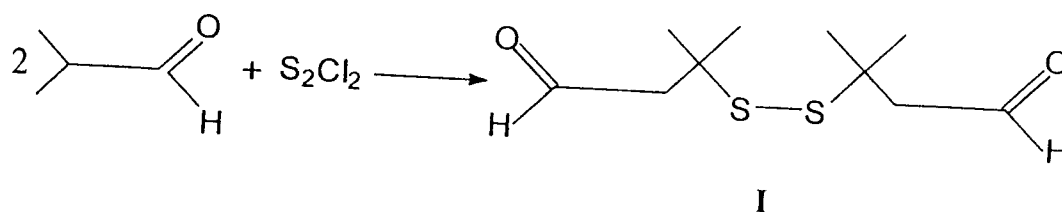
- Camundogos adultos fêmeas Swiss

3.2. PLANEJAMENTO

3.2.1. PLANEJAMENTO DAS ROTAS SINTÉTICAS

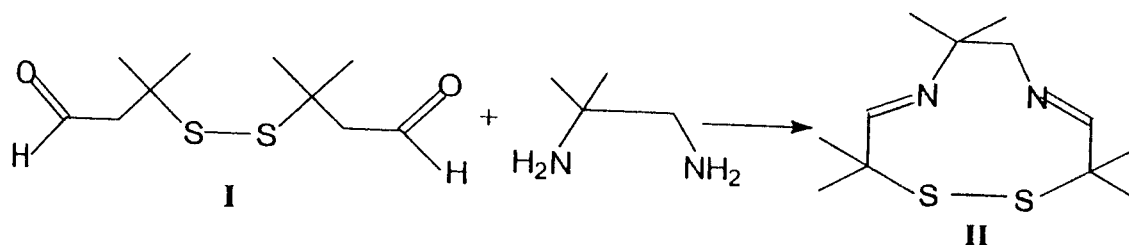
Síntese dos Derivados Diaminoditiólicos (DADT)

Inicialmente, sintetizou-se o intermediário **I** do tipo 2,2'-ditio-bis(2-metilpropanal) reagindo-se isobutiraldeído com dicloreto de dióxofre :



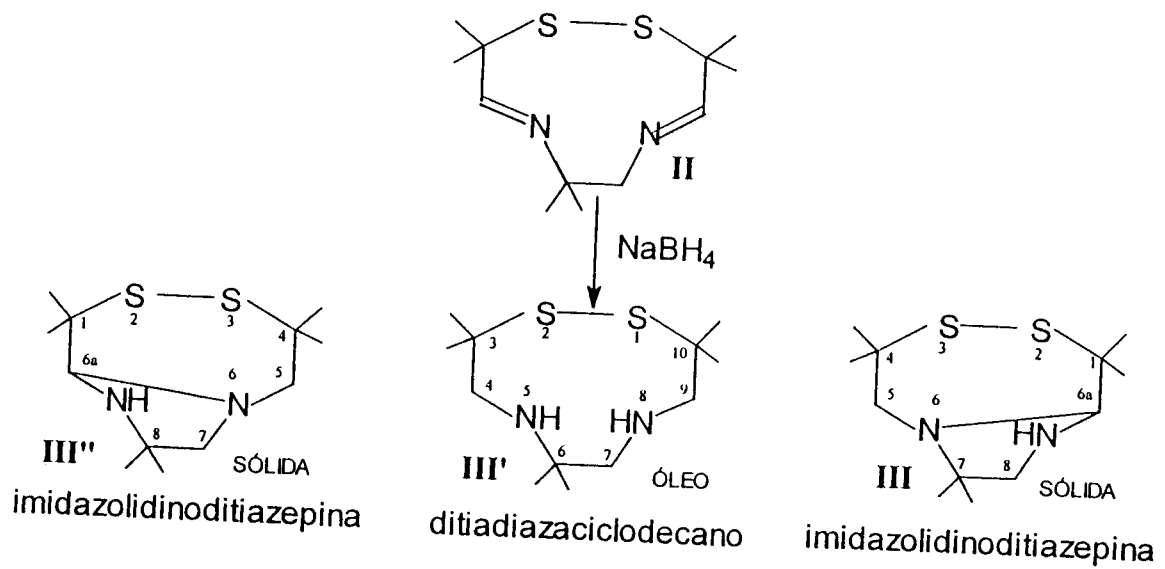
Esquema 8

Em seguida, esse composto **I** dialdeídico, ao reagir com o 2-metil-1,2-diaminopropano foi transformado na diimina cíclica **II** (3,3,6,6,10,10-hexametil-1,2-ditia-5,8-diazaciclodeca-4,8-dieno):



Esquema 9

O processo de redução da diimina **II** pelo boroidreto de sódio propicia a formação de três produtos (**III**, **III'**, **III''**) como descrito minuciosamente no trabalho de Joshua et al.⁵⁸ :



- III**: 7,7-dimetil-1,1,4,4-tetrametilimidazolidino [1,2-*d*] ditiazepina
III': 3,3,6,6,10,10-hexametil-1,2-ditia-5,8-diazaciclodecano
III'': 8,8-dimetil-1,1,4,4-tetrametilimidazolidino [1,2-*d*] ditiazepina

Esquema 10

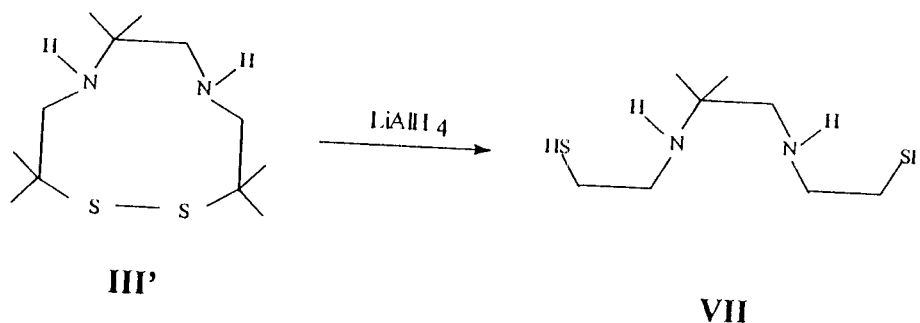
Para separar estes produtos, desenvolveu-se no IPEN Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, uma eficaz metodologia, como segue :

- Primeiramente tem-se uma mistura de dois isômeros bicíclicos sólidos e um produto monocíclico como líquido oleoso descrito no trabalho de Shiba et al¹¹⁹;
- Coloca-se a mistura num funil de Buchner com placa porosa e filtra-se usando alto vácuo até que todo o óleo **III'** seja coletado por um tubo de ensaio adaptado internamente a um kitassato de forma que a boca do funil de Buchner se aloje dentro do tubo de ensaio.
- Os isômeros **III** e **III''** ficam assim retidos no funil de Buchner como resíduo (esse resíduo contendo os dois deve ser lavado com água fria para facilitar a eliminação dos traços de óleo que permaneceram adsorvidos)

Desta etapa em diante as rotas sintéticas se bifurcaram pois utilizou-se na rota sintética-1 o composto monocíclico purificado, ou intermediário **III'**, para obter o derivado DADT-butambeno. Na rota 2, os isômeros bicíclicos foram utilizados para obter os derivados DADT-diisopropilamínico, DADT-diisobutilamínico e DADT-piperidínico ramificado.

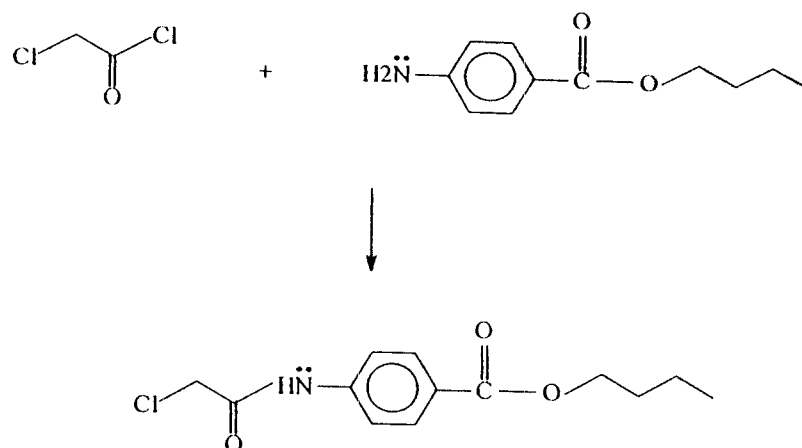
Rota Sintética 1

Procede-se primeiramente à redução do intermediário **III'**, monocíclico utilizando-se o método de Shiba et al.¹¹⁹, que é um processo brando :



Esquema 11 – Redução Branda do composto **III'**

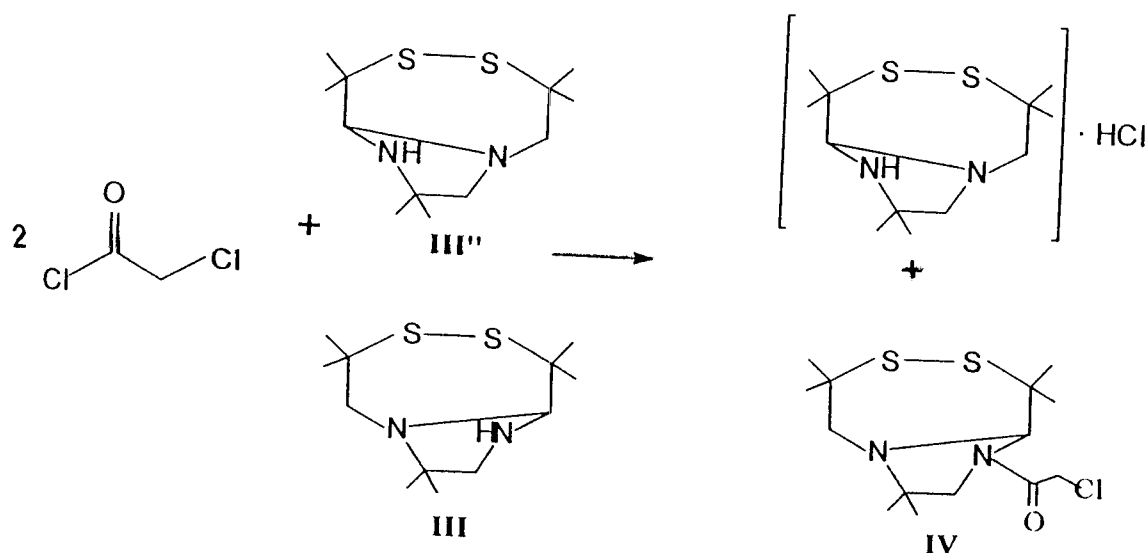
Paralelamente, o butambeno é colocado para reagir com o cloreto de cloroacetila:



Esquema 12 - Intermediário sintético formado a partir de butambeno

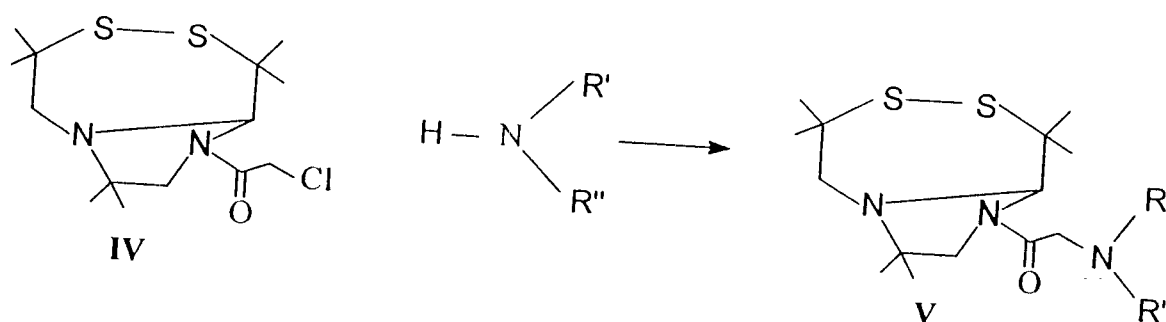
Rota Sintética 2

Colocam-se os dois isômeros **III** e **III''** para reagir com o cloreto de cloroacetila, sabendo-se só **III** reagirá, já que a amina secundária do composto **III''** está estericamente impedida pelas duas metilas em posição α a ela. Portanto, **III''** forma cloridrato com as moléculas de HCl provenientes da acilação: o cloridrato **IV'** é eliminado por filtração em que **IV** passa para o filtrado):

Esquema 14 – Acilação dos isômeros **III** e **III''**

Reação que Determina os Novos Compostos

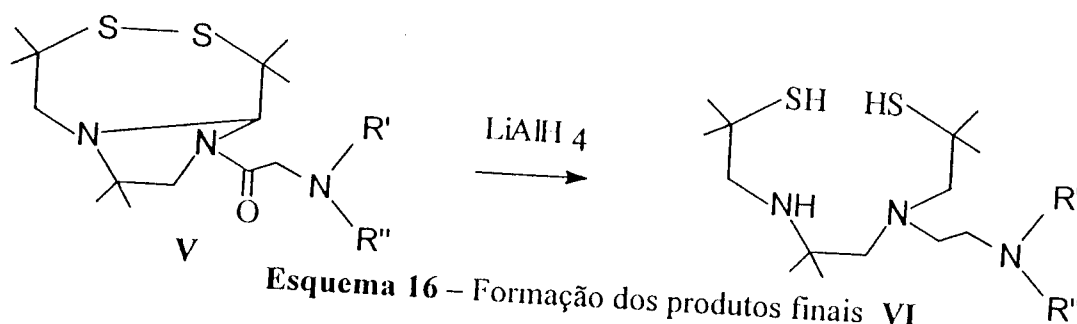
Reage-se então com o intermediário IV com as diferentes aminas para se obter diferentes produtos (por isso as aminas são consideradas reagentes diferenciadores), como ilustra o esquema abaixo :



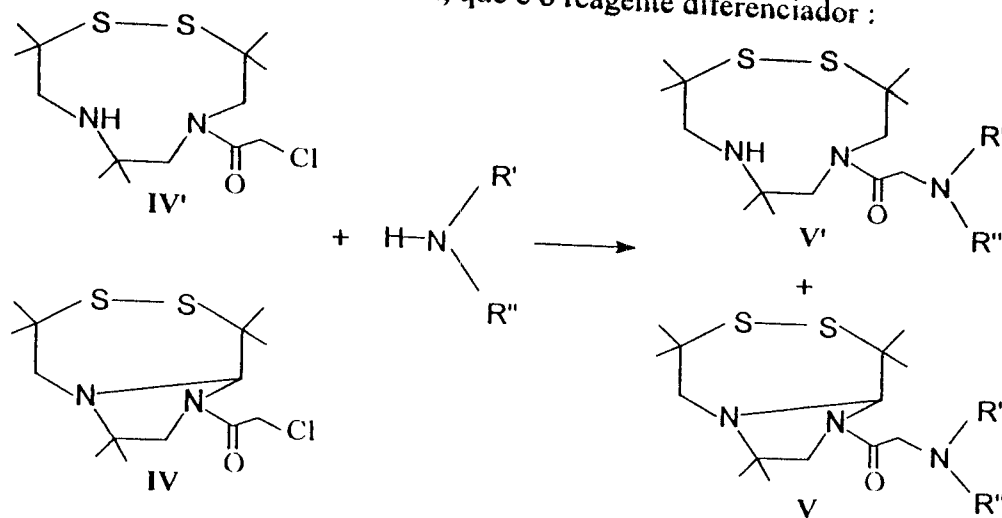
Esquema 15 – Reações que determinam os novos compostos

Última Etapa: Redução Energica

O intermediário V passa por uma redução química energética que é capaz de quebrar a ligação dissulfeto, a ligação no anel imidazolidínico e de reduzir a carbonila a metileno, formando os produtos finais :

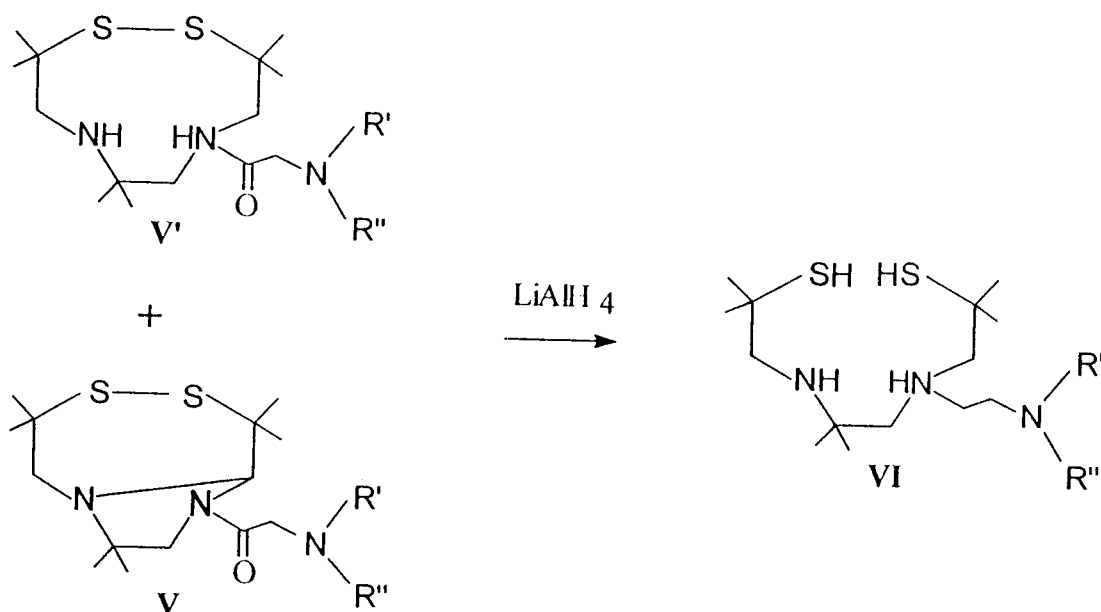


Adicionalmente, utilizou-se a interessante metodologia que Lever et al.⁸⁴ desenvolveram, para prosseguir a rota sintética sem separar os intermediários IV e IV', reagindo-os conjuntamente com a amina, que é o reagente diferenciador :



Última Etapa : Redução Energica

Os compostos V e V' passam então por uma redução energética de forma a produzirem um mesmo produto final VI :

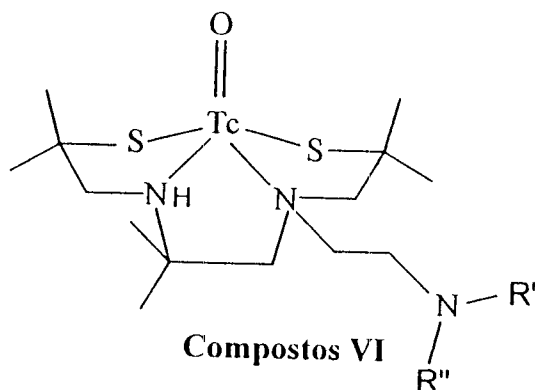


Esquema 18

Compostos DADT Marcados com ^{99m}Tc :

Radiofármacos Perfusórios

Os diferentes derivados DADT, compostos VI, como indicado na figura 15, se ligam com tecnécio- 99m , sob o estado de oxidação VI dando complexos piramidais. O ^{99m}Tc (sob forma de óxido $\text{Tc}=\text{O}$) liga-se aos átomos de nitrogênio e enxofre, formando um tipo de complexo tetradentado:



Nota: as metilas ligadas aos carbonos quaternários possuem o importante papel de estabilizar o complexo tetradentado formado pelo ^{99m}Tc e o esqueleto DADT.

Figura 15

É importante esclarecer o fato de que uma parte da estrutura destes compostos denominada de “estrutura complexante” possui unicamente a função de possibilitar a marcação pois se liga habilmente com o radionuclídeo ^{99m}Tc . As pesquisas da química de coordenação do rênio e tecnécio têm concluído que para os compostos sejam complexantes eficientes, suas estruturas devem possuir liberdade conformacional, por isso os compostos V e V' são reduzidos de forma a promover a abertura de seus anéis diminuindo grandemente a rigidez da estrutura.

3.2.2. Planejamento Racional dos Radiofármacos Perfusórios de ^{99m}Tc do Tipo DADT

Concepção do Derivado DADT-Diisopropilamínico (DADT - DIPA)

Hui et al.⁵⁰ trabalhando com relações quantitativas estrutura-atividade, mostraram que a captação cerebral dos derivados amínicos de DADT marcados com ^{99m}Tc está fortemente dependente de seu coeficiente de partição. Neste trabalho foram comparados os valores logarítmicos de coeficiente de partição de 20 destes compostos, com os respectivos valores logarítmicos de suas captações cerebrais. Como já é notório dos estudos de QSAR, $\log \% \text{captação cerebral}$ é uma função quadrática do \log coeficiente de partição (P) dos fármacos. Assim, quando Hui et al.⁵⁰ efetuaram a regressão linear múltipla de $\log \% \text{captação cerebral}$ em função do $\log P$, eles obtiveram uma relação parabólica com um coeficiente de correlação = 0,86.

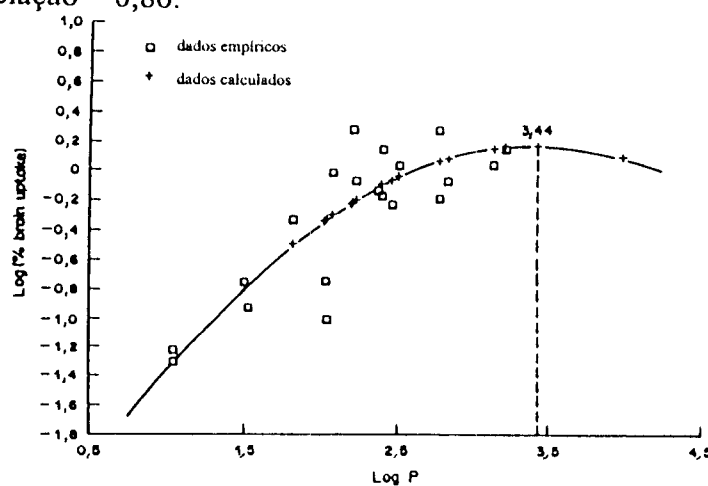


Gráfico 1 – Elaborado por Hui et al.⁵⁰

Conseqüentemente, no ápice da parábola ter-se-á uma captação cerebral otimizada. Efetuando-se então a primeira derivada da função quadrática do gráfico 1, equação 3

3.2.2. Planejamento Racional dos Radiofármacos Perfusórios de ^{99m}Tc do Tipo DADT

Concepção do Derivado DADT-Diisopropilamínico (DADT - DIPA)

Hui et al.⁵⁰ trabalhando com relações quantitativas estrutura-atividade, mostraram que a captação cerebral dos derivados amínicos de DADT marcados com ^{99m}Tc está fortemente dependente de seu coeficiente de partição. Neste trabalho foram comparados os valores logarítmicos de coeficiente de partição de 20 destes compostos, com os respectivos valores logarítmicos de suas captações cerebrais. Como já é notório dos estudos de QSAR, $\log \% \text{captação cerebral}$ é uma função quadrática do \log coeficiente de partição (P) dos fármacos. Assim, quando Hui et al.⁵⁰ efetuaram a regressão linear múltipla de $\log \% \text{captação cerebral}$ em função do $\log P$, eles obtiveram uma relação parabólica com um coeficiente de correlação = 0,86.

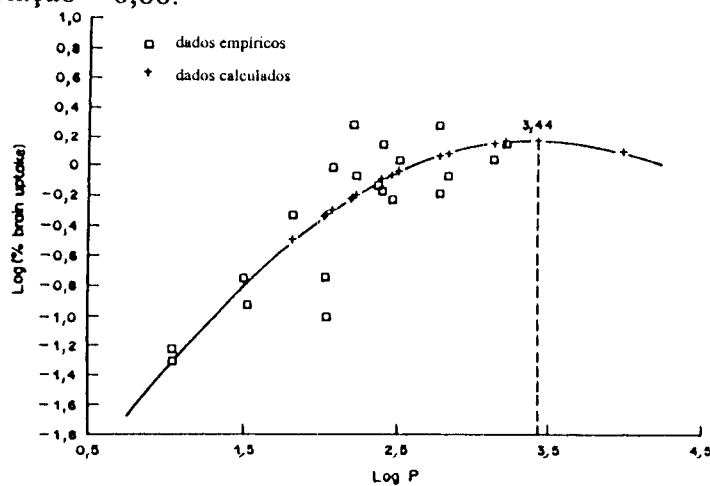


Gráfico 1 – Elaborado por Hui et al.⁵⁰

Conseqüentemente, no ápice da parábola ter-se-á uma captação cerebral otimizada. Efetuando-se então a primeira derivada da função quadrática do gráfico 1, equação 3

elaborada por Hui et al.⁵⁰, se determinará o log P correspondente ao ponto de tangência da curva, onde a captação cerebral será a maior para esses tipos de derivados estudados.

$$\log (\%cap.cerebral) = - 0,26 \log P^2 + 1,79 \log P - 2,88$$

[$n = 20$, $r = 0,86$, $s = 0,21$, $F_{2,17}$ (nível de significância > 99,9)], Hui et al.⁵⁰

Equação 3

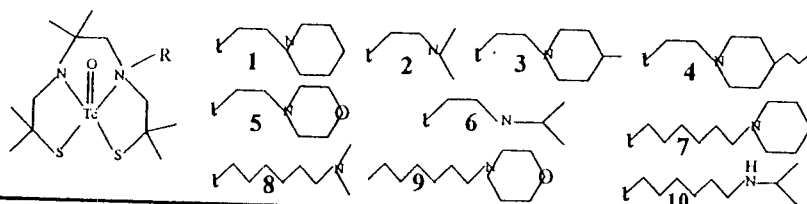
1ª Derivada:

$$0 = 2 \times 0,26 \log P - 1,79 \Rightarrow \log P = 3,4423$$

O valor notável de 3,44 para log P passa a servir então de referência para a concepção de um novo candidato a radiofármaco ^{99m}Tc-DADT desta série de derivados DADT alquilamínicos.

De posse destes dados, a professora Dra. Antônia Tavares do Amaral, membro do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, calculou através do programa de computador CLOGP, os valores dos coeficientes de partição teóricos dos compostos 1 a 6 da tabela 1 abaixo de forma a compará-los com os valores obtidos experimentalmente por Scheffel et al.¹¹⁴ (os compostos 7 a 10 foram desprezados devido ao fato de resultarem, em geral, em radiofármacos de débil captação cerebral).

Grupos Substituintes R:



COM-POSTO	(log P) Experim.	CLOGP Calc.	$\Delta \log P$ calc.- exp.	log PM _R	log ñd/d	Polarizabi lidade efetiva α_d	%dose/órgão
1 A	2,78	4,79	2,01	2,10	2,1	7,518	1,95±0,19
2 A	2,21	3,40	1,19	1,92	1,3	5,913	1,11±0,15
3 A	3,22	5,30	2,08	2,15	1,9	7,522	1,94±0,32
4 A	2,38	6,36	3,98	2,23	3,1	7,086	1,43±0,19
5 A	2,40	3,52	1,12	2,11	2,3	7,131	1,48±0,20
6 A	1,82	3,83	2,01	2,00	0,3	5,994	1,15±0,20
7 A	2,04			2,26	0,4	7,651	0,74±0,14
8 A	1,53			2,32	0,5	5,826	1,00±0,20
9 A	2,79			2,33	2,2	7,339	0,69±0,03
10 A	1,04			2,19	0,5	6,128	0,61±0,10
1 B	2,52	4,79	2,27	2,10	3,0	7,518	0,47±0,12
2 B	2,41	3,40	0,99	1,92	2,0	5,913	0,88±0,11
3 B	3,14	5,30	2,16	2,15	2,7	7,522	0,10±0,02
4 B	2,08	6,36	4,28	2,23	3,4	7,086	0,18±0,06
5 B	2,47	3,52	1,05	2,11	3,3	7,131	0,12±0,01
6 B	2,23	3,83	1,60	2,00	0,7	5,994	0,18±0,03
7 B	2,03			2,26	-0,1	7,651	0,68±0,17
8 B	1,50			2,32	0,5	5,826	1,14±0,32
9 B	2,84			2,33	2,1	7,339	0,05±0,01
10 B	1,04			2,19	0,5	6,128	0,06±0,01

Onde: PM_R (peso molecular de R), ñd (não dissociado), d (dissociado), A (isômeros ou epímeros do tipo A), B (isômeros ou epímeros do tipo B)

Dados: log P experimental, log PM_R, log ñd/d, %dose /órgão, coletados de Scheffel et al.¹¹⁴

Tabela 1 - Descritores moleculares relacionados ao coeficientes de partição e polarizabilidades efetivas de derivados ^{99m}Tc-DADT alquilamínicos .

Os valores de $\Delta\log P$ constantes na tabela 1 são resultado da diferença existente entre os $\log P$ determinados experimentalmente por Scheffel et al.¹¹⁴ e os calculados no programa CLOGP. Os valores de $\Delta\log P$ podem ser utilizados como importante recurso para se modelar novos candidatos a radiofármacos perfusórios ^{99m}Tc -DADT congêneres. Para tanto, o comportamento da nova estrutura deve ser similar ao daquela pela qual se efetuou o cálculo de $\Delta\log P$, pois procedendo-se assim, o paralelismo entre os dados teóricos e os práticos será mantido e o $\Delta\log P$ possui assim caráter inferencial.

Entretanto, este paralelismo só existirá uma vez que o nitrogênio do candidato a radiofármaco possua substituintes parecidos com os substituintes de um produto que possua dados experimentais de $\log P$, como um dos 20 compostos da tabela 1, pois procedendo-se assim, o pK_a do produto que está sendo modelado não será expressivamente diferente daquele já sintetizado e os comportamentos de ambos serão parecidos. Em seguida, num procedimento inverso, modela-se no computador um novo derivado possuidor de uma estrutura química que resulte num valor tal de CLOGP que subtraído de $\Delta\log P$ resulte num valor próximo de 3,44.

Desta forma, criou-se no presente trabalho o candidato a radiofármaco perfusório ^{99m}Tc -DADT, denominado derivado DADT-Diisopropilamínico (DADT - DIPA):

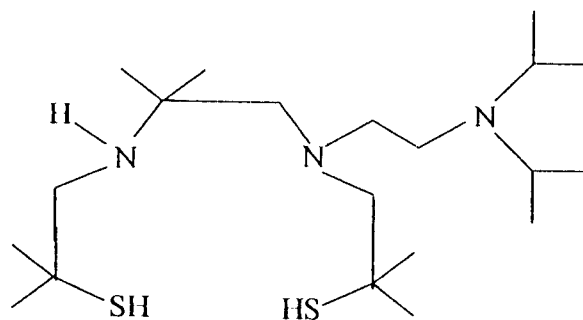


Figura 16 - Derivado DADT-Diisopropilamínico (DADT - DIPA)

O DADT – DIPA foi escolhido por apresentar um CLOGP de 5,08 e pode-se, através de cálculo, estimar o seu valor experimental de logP, se este for comparado com o composto 2, tabela 1, página 98, devido ao fato dos dois apresentarem comportamentos de pKa próximos uma vez que seus nitrogênios são parecidos, figura 17. Então subtrai-se o $\Delta\log P$ de 1,19 (do composto 2A), do valor de 5,08 (CLOGP do DADT DIPA) obtendo-se 3,89 que se aproxima consideravelmente do valor notável 3,44.

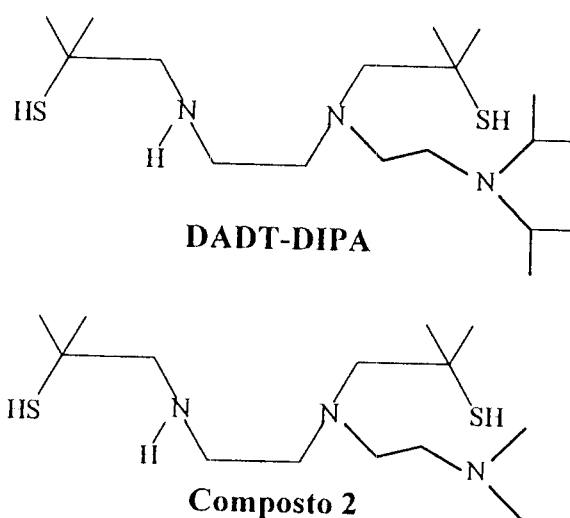


Figura 17 - Similaridades entre os nitrogênios do DADT-DIPA e do composto 2

Pode-se citar aspectos comuns aos nitrogênios desses 2 compostos:

- Os nitrogênios são terciários ;
- Os nitrogênios são acíclicos ;
- As cadeias carbônicas entre o nitrogênio do grupo R e a porção DADT, são etilênicas.

É importante notar que, para se efetuar este tipo de modelagem inferencial utilizando $\Delta\log P$ é mister se certificar que o tipo de amina a ser adotada possua um pKa aparente adequado tal que o radiofármaco não se ionize antes de encontrar a barreira hematoencefálica, o que depreciaria grandemente a captação cerebral. O trabalho de Hui et al.⁵⁰ provou categoricamente que, dentre os 20 derivados DADT alquilamínicos estudados, os que

possuem um pka aparente maior que 6,9 apresentaram uma captação cerebral depreciada, como segue :

Composto	pka Aparente	% dose/cérebro após 5min.
1 A	5,3	1,95 ± 0,19
1 B	4,4	1,11 ± 0,15
2 A	6,1	1,94 ± 0,32
2 B	5,4	1,43 ± 0,19
3 A	5,5	1,48 ± 0,20
3 B	4,7	1,15 ± 0,20
4 A	4,3	0,74 ± 0,14
4 B	4,0	1,00 ± 0,20
5 A	5,1	0,69 ± 0,03
5 B	4,1	0,61 ± 0,10
6 A	7,1	0,47 ± 0,12
6 B	6,7	0,88 ± 0,11
7 A	7,0	0,10 ± 0,02
7 B	7,5	0,18 ± 0,06
8 A	6,9	0,12 ± 0,01
8 B	6,9	1,18 ± 0,03
9 A	5,2	0,68 ± 0,17
9 B	5,3	1,14 ± 0,32
10 A	6,9	0,05 ± 0,01
10 B	6,9	0,06 ± 0,01

Tabela 2 – Valores de pKa aparente e de captação (% dose/cérebro) dos epímeros de ^{99m}Tc-DADT retirados do trabalho de Hui et al.⁵⁰

Na modelagem da estrutura do derivado DADT-DIPA foi incluída também a influência do descritor eletrônico de molécula total α_d , (polarizabilidade efetiva), equação 6, página 119, com o intuito de aumentar a estabilização dos nitrogênios protonados⁴ no interior do cérebro, uma vez que inicialmente seu coeficiente de partição foi projetado de tal forma que ele possuía lipofilicidade que o permitia transpor a barreira hematoencefálica. Assim, foram escolhidos dois substituintes isopropílicos para a amina do substituinte R (ver desenho da página 98) que proporcionaram uma alta polarizabilidade de 8,946, superior a de todos os compostos da tabela 1. Este valor de α_d foi alcançado graças às ramificações dos 2 grupos isopropilamina ligados diretamente em R que promovem um ganho significativo em α_d .

Concepção do Derivado DADT-Piperidínico Ramificado (DADT - PR)

DADT-Piperidínico Ramificado (DADT - PR) foi modelado para possuir um valor de α_d maior do que os derivados sintetizados por Scheffel et al.¹¹⁴

Para se estudar a interligação entre polarizabilidade efetiva e captação cerebral foi feita a comparação dos α_d 's dos compostos que possuem cadeia carbônica igual (com dois carbonos) e nitrogênios com substituintes similares (nitrogênios piperidínicos), ou seja, compostos 1A, 1B, 3A, 3B, 4A, 4B, 5A e 5B (tabela 1) com seus respectivos valores de captação cerebral, como mostra o gráfico abaixo :

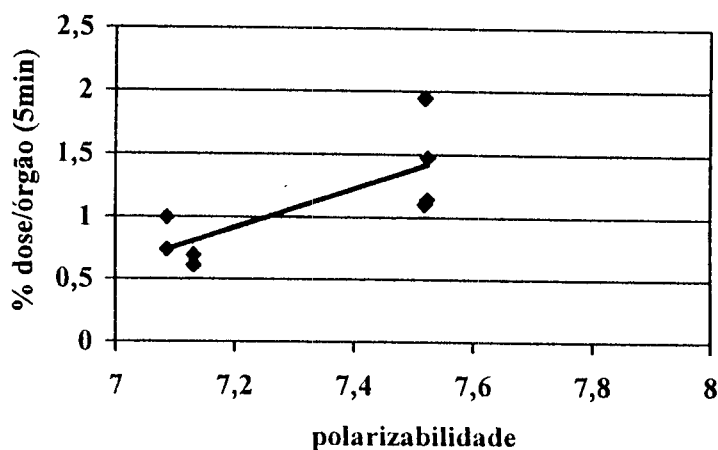


Gráfico 2

O gráfico 2, que foi elaborado de forma a incluir os epímeros A e B, mostrou possuir um coeficiente de correlação (r) de 0,769.

Entretanto, quando correlacionaram-se somente os Epímeros A com as respectivas captações cerebrais obteve-se um r de 0,941. Este coeficiente de correlação maior se deve ao fato de se considerar somente os Epímeros A que são isômeros geométricos e com isso diminuem-se as flutuações originárias do comportamentos dos Epímeros B que são quimicamente diferentes.

Segundo evidencia o gráfico 2, os valores mais altos de polarizabilidade estão relacionados com as maiores captações cerebrais. Isto implica numa informação de suma importância no sentido de se projetar um substituinte R que, segundo a equação de Gasteiger e Hutchings³⁸, possua valores de α_d quantitativamente maiores.

Para que isto seja possível, deve-se escolher R's com substituintes carbônicos ligados ao nitrogênio que possuam o maior grau de ramificações possíveis, pois as órbitas mais próximas ao nitrogênio central é que atuarão na estabilização de sua carga. Desta forma é que o R do tipo piperidínico ramificado foi escolhido já que possuirá um α_d de 8,276.

Para corroborar com a idéia da criação de derivados DADT baseados no descritor polarizabilidade é importante ressaltar que o cálculo de α_d proposto por Gasteiger et al.³⁸ foi concebido justamente para compostos alquilamínicos em que o nitrogênio é considerado o centro de carga.

A equação 6, página 119, é pródiga em informar que à medida que os átomos se distanciam do nitrogênio, centro de carga, eles irão dando uma contribuição à polarizabilidade efetiva cada vez menor, que é refletida pelo fator de depreciação d^{n-1} :

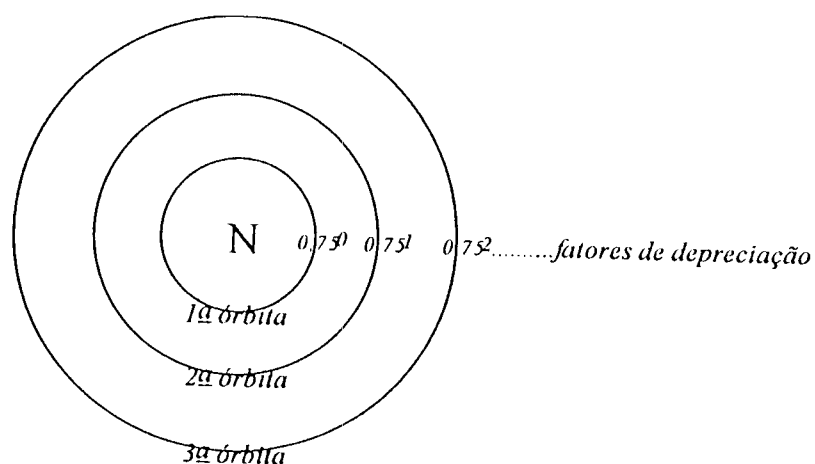


Figura 18 – Fatores de depreciação d^{n-1} nas órbitas do nitrogênio alquilamínico

A figura 18 mostra que a primeira órbita de ligação, onde os átomos estão diretamente ligados ao nitrogênio, o fator de depreciação é 1, ou seja, nesta órbita não há depreciação de α_d . Numa ideal devem-se criar derivados com o número máximo de substituintes ligados diretamente ao nitrogênio.

Apesar do nitrogênio ser capaz de efetuar até 4 ligações químicas, para efetuar-se a modelagem de radiofármacos perfusórios, só pode-se fazer 3 ligações alquílicas devido ao fato dos compostos quaternários se constituírem em espécies iônicas permanentes, o que as impossibilita ou as dificulta de adentrarem no espaço intracerebral.

Resta então incluir ao nitrogênio central, 3 átomos de carbono (figura 19), porque além de doarem uma contribuição para α_d quatro vezes maior do que a do átomo de hidrogênio, os derivados DADT sintetizados por Scheffel et. ¹¹⁴ al. em que os nitrogênios de R são terciários, mostraram possuir maior captação cerebral do que os secundários.

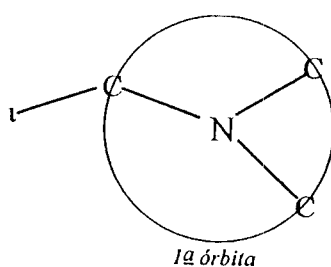


Figura 19 – Carbonos na 1ª órbita com relação ao nitrogênio

Para a segunda órbita de ligação, pode-se incluir mais átomos de carbono ligados diretamente aos carbonos α com relação ao nitrogênio central, o que faz com que o produto final seja ramificado. Então para projetar uma estrutura que possua valores maiores de α_d deve-se ligar o maior número possível de átomos nas ligações químicas mais próximas ao nitrogênio, como indicado na figura abaixo:

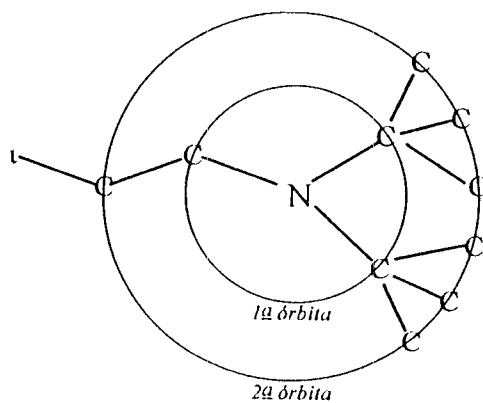


Figura 20 – Carbonos na 1ª e 2ª órbita com relação ao nitrogênio

Em suma, quanto mais ramificados forem os produtos, mais polarizabilidade efetiva eles apresentarão .

A estrutura do DADT-PR foi escolhida por possuir ramificações já nos carbonos α com relação ao nitrogênio piperidínico , o que possibilita um acréscimo em termos de polarizabilidade efetiva deste. Contudo, houve a necessidade de se incluir um segundo nitrogênio na estrutura para possibilitar a inclusão da porção piperidínica ramificada na estrutura DADT.

Entretanto, a síntese de um derivado DADT possuindo a piperidina ramificada no grupo substituinte R não deve ser efetuada diretamente entre o nitrogênio piperidínico e o intermediário sintético IV devido ao fato deste estar estericamente impedido pelos grupos metila das ramificações, como segue :

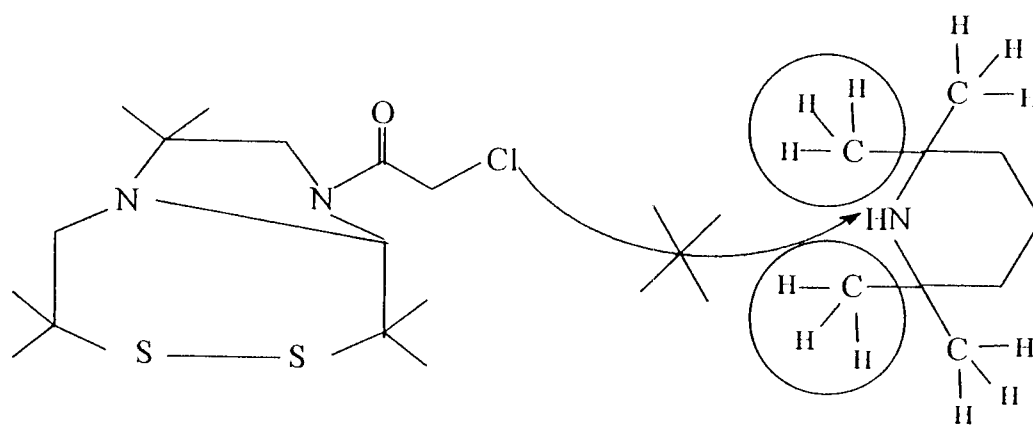


Figura 21 – Nitrogênio piperidínico impedido estericamente

Assim, foi incluído na estrutura da piperidina, um nitrogênio adicional desimpedido estericamente que faz com que esta seja espécie reativa em presença do intermediário IV, como segue:

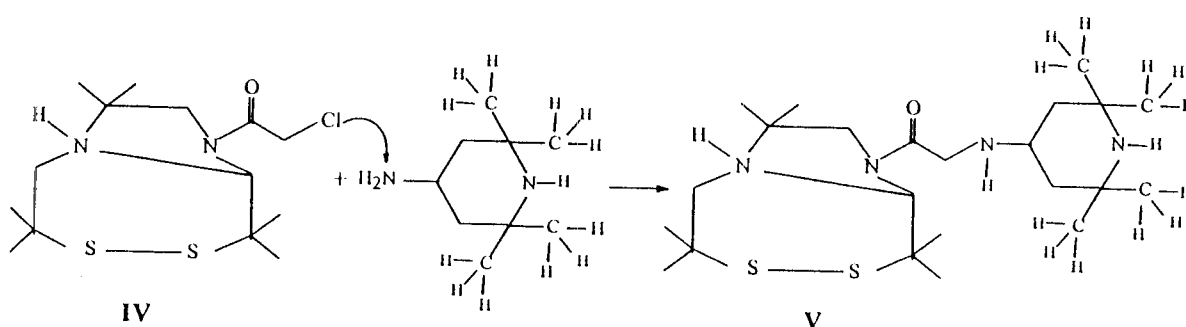


Figura 22 – Síntese do intermediário V piperidínico-ramificado.

Após proceder-se à redução deste intermediário V, chega-se então, ao derivado DADT-PR, produto final desta rota sintética:

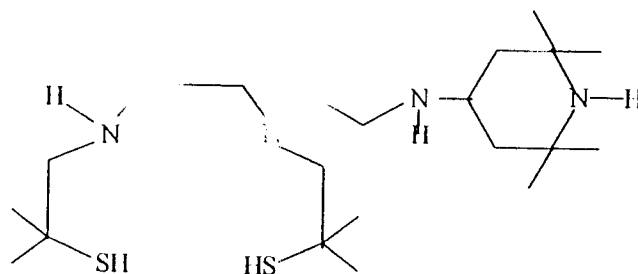


Figura 23 – Derivado DADT – Piperidínico Ramificado (DADT - PR)

Concepção do Derivado DADT-Diisobutilamínico (DADT – DIB)

O Derivado DADT-Diisobutilamínico (DADT – DIB) foi projetado levando-se principalmente em consideração o descritor eletrônico de molécula total, polarizabilidade efetiva, α_d , equação 6, página 119.

Assim , o derivado DADT-DIB foi criado à luz destes conceitos para possuir um α_d significativamente maior , como mostra a figura abaixo, foram incluídos substituintes ramificados ao nitrogênio central (porção diisopropilamínica) :

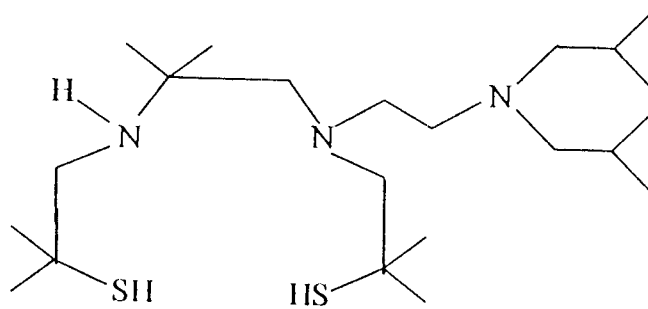


Figura 24 - Derivado DADT-Diisobutilamínico (DADT – DIB)

Adicionalmente, o derivado DADT-DIB foi projetado para resultar num radiofármaco com maior lipofilicidade que os derivados constantes na tabela 1 sintetizados por Scheffel et al.¹¹⁴ e para compensar as características dos compostos desta série de não seguirem a propriedade aditiva constitutiva do coeficiente de partição, o que acaba depreciando o coeficiente de partição experimental (todos compostos da tabela 1 apresentaram todos valores de log P experimentais menores do 3,44). Assim, a estrutura do DADT-DIB foi modelada para resultar em CLOGP de 6,37 expressivamente maior do que o valor 4,79 do composto 1, tabela 1, esse composto tende a possuir nitrogênio em R, com pka similar ao seu, pois possui substituintes parecidos com os seus, figura 25 :

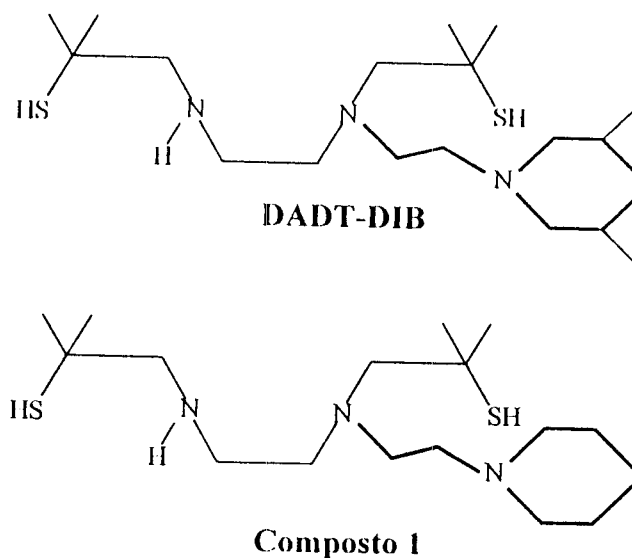


Figura 25 - Similaridades entre os nitrogênios do DADT-DIB e do composto 1

Aspectos comuns aos nitrogênios desses 2 compostos:

- Os nitrogênios são terciários ;
- As cadeias carbônicas entre o nitrogênio do grupo R e a porção DADT, são etilênicas.

Concepção do Derivado DADT-Butambeno (DADT - BUT)

O derivado DADT-Butambeno foi idealizado de uma forma totalmente diferente . A este, foram utilizados os conceitos de pró-fármacos como sistemas especiais de liberação do fármaco com a finalidade de facilitar a passagem pela barreira hematoencefálica e a retenção no espaço intracerebral .

A conversão de pró-fármaco perfusório a fármaco deve ocorrer após ter ocorrido a sua distribuição para o espaço intracerebral, para que o mesmo fique retido mais intensamente uma vez que sob forma de pró-fármaco ele é apolar e quando transformado a fármaco ele é espécie polar. Então, para que ocorra essa conversão, deve-se incluir em sua estrutura grupos químicos funcionais que reconhecidamente são lábeis em sistemas biológicos, como ésteres, amidas, imidas, carbamatos, aminas.

Assim, para modelar-se o derivado DADT -Butambeno (DADT-BUT), coletaram-se de Friis e Bundgaard³⁶, dados de hidrólise enzimática de éster-derivados em plasma humano, tabela 3 abaixo e levou-se em consideração o fato de que o radiofármaco é injetado

intravenosamente e deve se hidrolisar preferencialmente após ter ultrapassado a barreira hematoencefálica :

COMPOSTO	SUBSTITUINTE	PLASMA HUMANO 80%	
		k (min^{-1}) constante hidrólise(éster)	$t_{1/2}$ (min) meia vida (éster)
1	$\text{CH}_2\text{-H}$	$6,4 \times 10^{-3}$	108,0
2	$\text{CH}_2\text{-CH}_3$	$3,3 \times 10^{-3}$	210,0
3	$(\text{CH}_2)_2\text{-CH}_3$	$1,5 \times 10^{-2}$	46,0
4	$(\text{CH}_2)_4\text{-CH}_3$	$2,9 \times 10^{-2}$	24,0
5	$\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	$3,7 \times 10^{-2}$	19,0
6	$\text{CH}_2\text{-COO}^-$	$< \times 10^{-4}$	$> 6.000,0$
7	$\text{CH}_2\text{-COOCH}_3$	$2,0 \times 10^{-1}$	3,50
8	$\text{CH}_2\text{-CONH}_2$	$1,7 \times 10^{-2}$	40,0
9	$\text{CH}_2\text{-CON}(\text{CH}_3)_2$	$> 5,0$	$< 0,13$
10	$(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$	$> 8,0$	$< 0,08$
11	$(\text{CH}_2)_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	$> 8,0$	$< 0,08$

Tabela 3 – Taxa de hidrólise enzimática a $37,0^\circ\text{C}$ de ésteres de ácido benzóico, dados coletados de Friis e Bundgaard ³⁶.

Para melhor elucidar as constantes de velocidade de hidrólise dos ésteres efetuadas por Friis e Bundgaard³⁶, procedeu-se a uma análise dimensional matemática para desvendar a qual cinética de degradação o processo pertence. O resultado da análise evidenciou que a degradação é de 1ª ordem com a seguinte equação:

$$\ln C = \ln C_0 - kt$$

Equação 4

Onde:

C – concentração instantânea do composto

C₀ – concentração inicial do composto

k - constante de velocidade de degradação

t – tempo decorrido

Como a tabela 2 incluiu dados de meia vida química, fez-se então a análise dimensional para o tempo notável de meia-vida química. Então, depois de decorrer uma meia-vida tem-se:

$$C = 0,5 \times C_0$$

Logo:

$$\ln 0,5 C_0 (g) = \ln C_0 (g) - k \cdot t_{1/2} (min.)$$

$$-k \cdot t_{1/2} (min.) = \frac{\ln 0,5 C_0 (g)}{C_0 (g)}$$

$$-k \cdot t_{1/2} (min.) = -0,693147$$

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k} \quad (min.)^{-1}$$

Equação 5

Assim, ao se calcular por exemplo o $t_{1/2}$ do composto 3, da tabela 3, obteve-se um valor de 46, 2 minutos, concordante com o valor expresso nesta tabela. Em realidade, a hidrólise tende a ser, por excelência, um caso clássico de solvólise em que a água, que é solvente, comporta-se também como reagente, caracterizando um processo de pseudo-primeira-ordem que é uma reação de segunda ordem com excesso de um dos reagentes.

O derivado DADT-Butambeno (DADT-BUT) foi criado segundo os conceitos de pró-fármaco possuindo um grupamento éster no substituinte R, figura 26 abaixo. O éster de ácido benzóico escolhido possui em sua porção alcoólica, cadeia carbônica com 4 carbonos, que é um comprimento intermediário entre os compostos 3 e 4 da tabela 3.

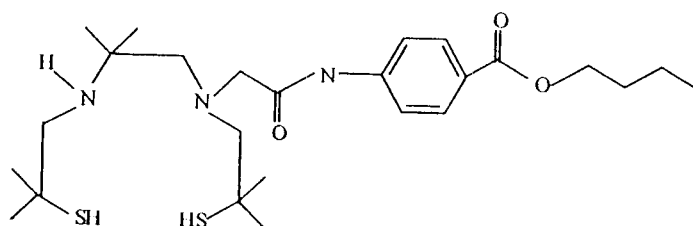


Figura 26 - Derivado DADT Butambeno (DADT-BUT)

Interessantemente, como a meia-vida química dos ésteres de ácido benzóico no plasma são inversamente relacionadas com o tamanho do grupo alquila substituído na porção alcoólica do éster, é possível se modelar compostos de forma a adequá-los para sofrerem hidrólise no espaço intracerebral. Considerando-se a hidrólise dos éster de ácido benzóico no plasma, poder-se-ia escolher o composto 7, tabela 3, para ser ligado à porção DADT pois possui um $t_{1/2}$ de 3,5 minutos e, logo após a injeção do radiofármaco marcado, este sofreria teoricamente hidrólise no espaço intracerebral, facilitando assim sua retenção cerebral (note-se que este composto possui dois grupamentos éster).

Entretanto, levando-se em consideração que a marcação do derivado DADT é feita em meio aquoso, sob agitação por 30 minutos, à temperatura ambiente, em presença de boroidreto de sódio e que os efeitos dessa marcação na hidrólise do éster não são inteiramente conhecidos, optou-se por escolher um éster menos lábil.

Sabendo-se que os três carbonos em R'' conferem ao composto 3 (tabela 2) um $t_{1/2}$ de 46 minutos e que os cinco carbonos em R'' conferem ao composto 4 um $t_{1/2}$ de 24 minutos, pode-se, por aproximação, concluir que o éster do DADT-BUT possuirá, provavelmente um $t_{1/2}$ intermediário entre os dois anteriores.

O butambeno foi então escolhido como reagente ideal de rota sintética por possuir justamente um grupamento éster com quatro carbonos em sua porção alcoólica, por ser derivado de ácido benzóico permitindo se fazer analogia com os compostos da tabela 3, além de possuir um grupamento amina, o que o torna intermediário sintético reativo com relação ao intermediário IV. De forma interessante, para que o derivado DADT-BUT fosse concebido foi necessário inverter a rota sintética para preservar os dois grupamentos carbonila presentes em sua estrutura final, uma vez que a rota original de Lever et al.⁸⁴ inclui, na última etapa, uma redução enérgica que o destruiria. Assim, procedeu-se primeiramente à redução do intermediário III', monocíclico:

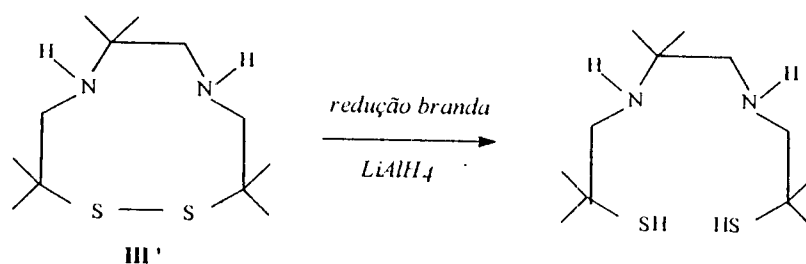


Figura 27 – Redução do composto III'

Em seguida, de maneira inversa, reagiu-se o butambeno com o cloreto de cloroacetila, para que os grupamentos éster e amida fossem preservados:

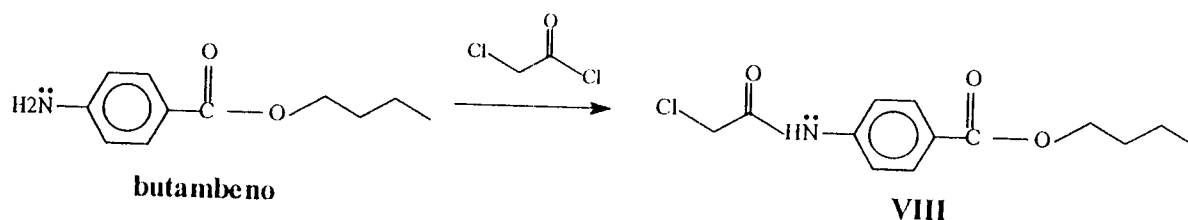


Figura 28 - Intermediário VIII, formado a partir de butambeno

O cloreto de butambeno formado foi colocado para reagir com o composto diaminoditiólico reduzido, resultando no produto final, derivado DADT - Butambeno (DADT - BUT) :

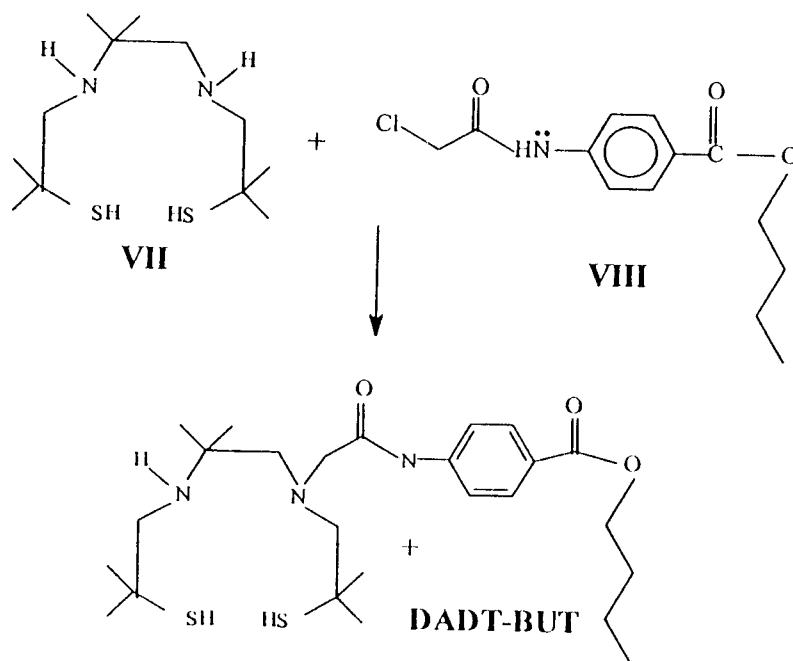


Figura 29 - DADT - Butambeno

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Determinação de CLOGP

Os valores teóricos de coeficiente de partição dos derivados DADT foram elaborados no programa CLOGP partindo-se da estrutura geral da figura 30 abaixo.

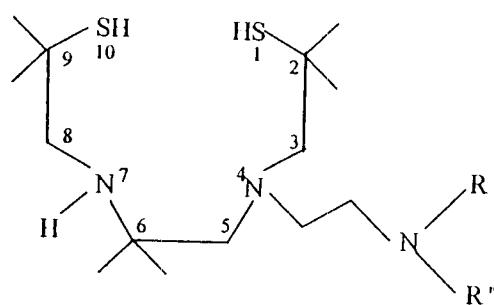


figura 30 - Estrutura geral dos derivados DADT - alquilamínicos .

Em seguida, elegeu-se um átomo para ser o ponto de partida, de onde se desenhou o restante da estrutura a ser incluída no programa e as informações foram então processadas. Escolheu-se como ponto de partida, o nitrogênio, átomo nº 4 da porção DADT, como na figura 31 abaixo :

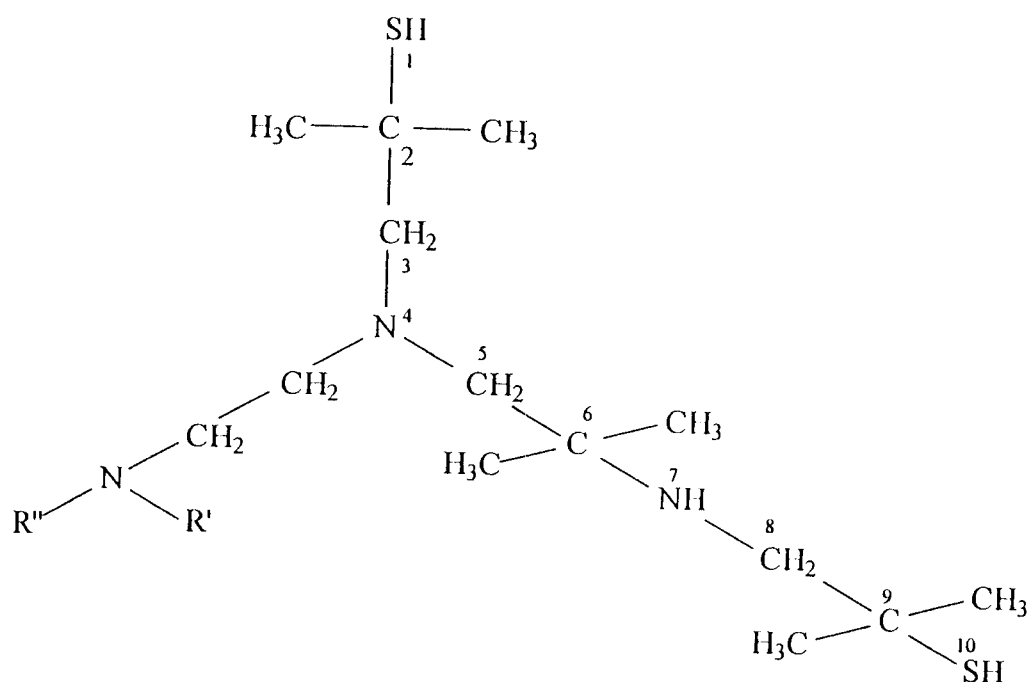


Figura 31 – Estrutura esboçada pelo programa CLOGP.

3.3.2. Cálculo de Polarizabilidade Efetiva

O termo polarizabilidade efetiva α_d , foi calculado segundo Gasteiger et al.³⁸ para os nitrogênios alquilamínicos do grupo substituinte R, que consistem no centro de carga:

$$\alpha_d = \frac{4}{N} \left(\sum_i d^{n_i-1} \cdot \tau_i \right)^2$$

Equação 6

Onde:

α_d : polarizabilidade efetiva

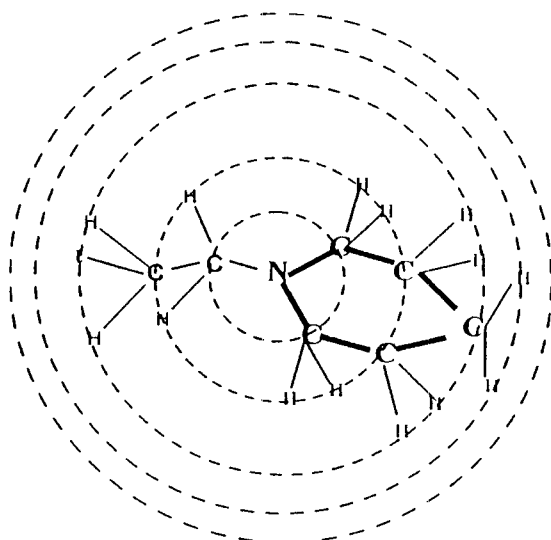
N : número total de elétrons excluindo os do nitrogênio central

n_i : menor número de ligações entre o nitrogênio central e o átomo em questão

d : constante com valor 0,75

τ_i : contribuição em polarizabilidade de cada átomo (valores utilizados do trabalho original³⁸)

Para se determinar, por exemplo α_d do nitrogênio presente no R do composto 1A (ou 1B), tabela 1, tem-se



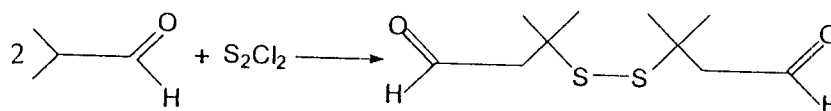
$$\alpha_d = \frac{4}{(14.1) + (6.7)} [0,75^0(3 \tau_C) + 0,75(6\tau_H + 3\tau_C) + 0,75^2(6\tau_H + \tau_C) + 0,75^3(2 \tau_H)]^2$$

$$\alpha_d = 7,518$$

Figura 32

3.3.3. Síntese dos Intermediários e Derivados DADT

Primeira Etapa: Síntese do Intermediário I ⁹¹ 2,2'-Ditio-Bis(2-Metilpropanal)



Reagentes - Solventes:

Isobutiraldeído.....	144 g
S ₂ Cl ₂	135g
CCl ₄	230g

Método:

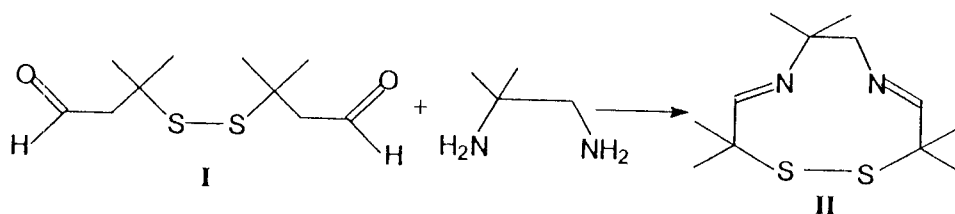
Primeiramente, destilou-se, à pressão atmosférica, o dicloreto de dióxifre, devido ao fato do mesmo não permanecer estável sob estocagem. Coletou-se e separou-se somente as frações destiladas no intervalo de 135,0 –139,0 °C.

Em seguida, em balão reacional de 1 litro contendo quatro bocas, conectou-se funil de adição com pressão compensada, condensador, termômetro, entrada para nitrogênio gasoso e adicionou-se de uma vez todo o isobutiraldeído. Sob agitação, aqueceu-se o sistema a 44,0 °C e adicionou-se vagarosamente dicloreto de dióxifre durante um intervalo de 20 minutos, de tal forma que a temperatura ficasse entre 40-50°C sob agitação. Misturou-se a 30-40 °C aplicando gás nitrogênio por 16 horas para eliminação dos vapores ácidos. Destilou-se a alto vácuo, o óleo formado.

Destilação do óleo coletando as frações nas seguintes condições :

- Temperatura dos vapores : 150°C
- Pressão de destilação :2-4 mmHg
- Banho de silicone, 170-190°C

Segunda Etapa: Síntese do Intermediário II ⁸⁴
 3,3,6,6,10,10-hexametil-1,2-ditia-5,8-diazaciclodeca-4,8-dieno



Reagentes - Solventes:

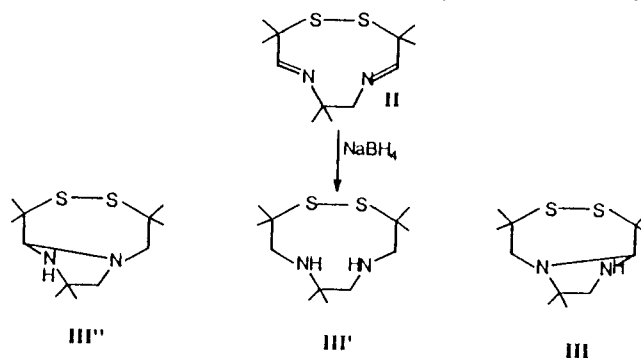
Benzeno.....	280ml
Ácido p-tolilsulfônico.....	50mg
Intermediário I (0,1430 mol).....	29,12g
2-metil-1,2-diaminopropano (0,1430 mol).....	12,6g

Método:

Em balão de reação possuindo aparelho de Dean-Stark , dissolveu-se o ácido p-tolilsulfônico no benzeno e adicionou-se o bis-aldeído. Em seguida, adicionou-se gota-a-gota a diamina, sob agitação e refluxou-se por 2h30, destilando azeotropicamente a água formada na reação. O ponto final de reação foi monitorado medindo-se a quantidade de água destilada coletada no aparelho de Dean-Stark.

Eliminou-se o solvente e cristalizou-se o produto com éter de petróleo e posteriormente com éter. Removeu-se o solvente dos filtrados de forma a deixar o sistema concentrado em soluto propiciando a recristalização do produto e filtrou-se novamente.

Terceira Etapa: Síntese dos Intermediários III, III', III'' ⁸⁴
 3,3,6,6,10,10-hexametil-1,2-ditia-5,8-diazaciclododecano



Reagentes - Solventes:

Boroidreto de sódio (0,195 mol).....	7,377g
Acetona.....	51ml
Etanol.....	605ml
Intermediário II (0,195 mol).....	50,388g

Método:

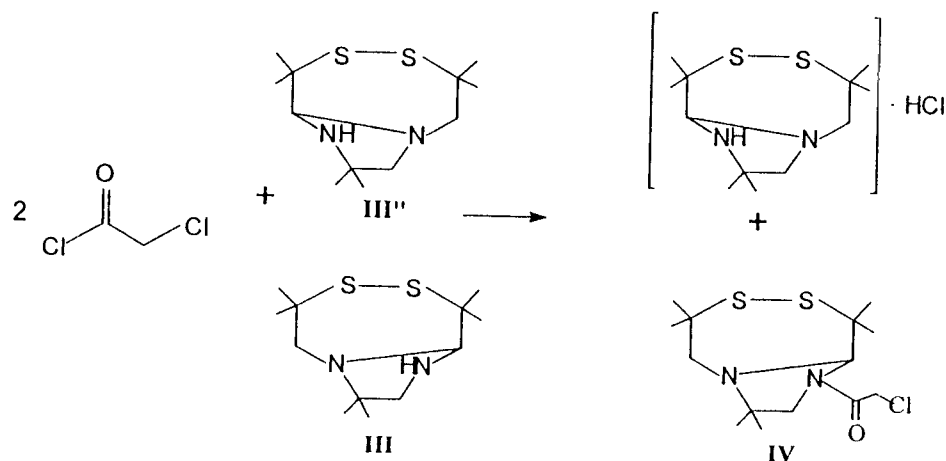
Dissolveu-se o Intermediário II no etanol em banho de silicone a 40°C por 10 minutos, sob agitação, até completa dissolução. Adicionou-se o boroidreto aos poucos, durante 1h20min e agitou-se por 2h à temperatura ambiente. A acetona foi adicionada e agitou-se por mais 20 minutos. Monitorou-se o fim da reação com fita cromatográfica de camada delgada de sílica-gel aluminizada, possuindo indicador de ultra-violeta e utilizou-se como fase móvel éter dietílico e éter de petróleo 1:1. O fim da reação foi evidenciado quando a mancha intensa do intermediário II desapareceu. Em seguida, eliminou-se o solvente à vácuo em rotaevaporador e aplicou-se corrente de nitrogênio para secar bem. Dissolveu-se a fração orgânica com 300ml de pentano a morno e filtrou-se com celite de forma suave utilizando vácuo. Lavou-se o funil de Buchner com 200ml de pentano.

Eliminação do Pentano:

- Utilizou-se primeiramente rotaevaporador à vácuo;
- Colocou-se o produto em béquer e eliminou-se o solvente remanescente em dessecador, sob alto vácuo, e pesou-se o béquer até peso constante.

O interediário líquido **III'**, foi separado mediante filtração à vacuo por 3 a 4 horas. O resíduo sólido, compreendendo os intermediários **III** e **III''**, foi tratado com éter de petróleo.

Quarta Etapa : Síntese do Intermediário IV ⁸⁴
 9 cloroacetil-7,7-dimetil-1,1,4,4-tetrametilimidazolidino-[1,2-*d*] ditiazepina



Reagentes - Solventes:

Cloreto de cloroacetila (0,038 mol).....	20,00g
Mistura isomérica (III + III'') (0,077 mol).....	4,40g
Eter dietílico.....	400ml

Método:

Em balão reacional de 1 litro contendo três bocas, conectou-se 2 funis de adição com pressão compensada e condensador de bolas, verteu-se 360ml de éter dietílico. Em um dos funis, dissolveu-se a mistura isomérica em 60ml de dietil éter e adicionou-se no balão de reação, gota-a-gota por 1h20 ao mesmo tempo em que o cloreto de cloroacetila dissolvido em 40ml foi gotejado mais rapidamente, durante 1h05. Agitou-se o sistema à temperatura ambiente por 2 horas. Monitorou-se o fim da reação com fita cromatográfica de camada delgada de sílica-gel aluminizada com indicador de ultra violeta e utilizou-se como fase móvel éter dietílico 1:1 éter de petróleo. Os reagentes III e III'' apresentaram r_f de 0,55 e r_f de 0,62 respectivamente e o produto, r_f de 0,48. Em seguida, filtrou-se lavando os resíduos com éter dietílico a 40°C.

Concentrou-se o filtrado em rotaevaporador a 96^oC e alto vácuo para eliminar o excesso do cloreto de cloroacetila. Os cristais foram então lavados com éter de petróleo para eliminar as impurezas líquidas.

Purificação : cromatografia "flash" em coluna com sílica-gel de porosidade de 6 A^o com corrente de

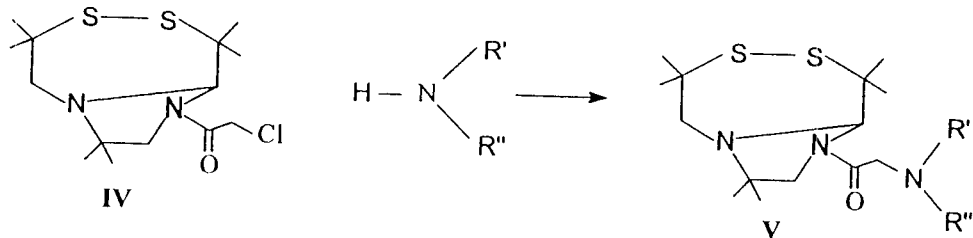
gás nitrogênio

1^o sistema de solvente: 100ml (éter de petróleo)

2^o sistema de solvente: 150ml (éter de petróleo 4 : 1 éter dietílico)

3^o sistema de solvente: 400ml (éter de petróleo 1 : 1 éter dietílico)

Quinta Etapa : Síntese do Intermediário V ⁸⁴



Reagentes - Solventes:

Amina (reagente diferenciador).....	2,1953 mol
Intermediário IV.....	0.1953 mol
Etanol.....	50ml

Método:

Adicionou-se a amina gradativamente sobre uma solução do intermediário IV em etanol. O sistema foi aquecido em refluxo por 2 horas. Monitorou-se o fim da reação com fita cromatográfica de camada delgada de sílica-gel aluminizada com indicador de ultra violeta e utilizou-se como fase móvel éter dietílico 1:4 éter de petróleo. O reagente, intermediário IV, possuiu rf de 0,30 e o produto apresentou rf diferente de 0,30 (os valores variaram de acordo com o reagente diferenciador escolhido). Em seguida, eliminou-se as frações voláteis sob pressão reduzida. Ajustou-se o pH do resíduo em 11 com solução de NaOH 0,1N, extraiu-se com éter dietílico, tratando a fase orgânica com carvão granulado, sílica gel e filtrou-se usando celite como pré-filtro. Cristais brancos foram obtidos por concentração do solvente.

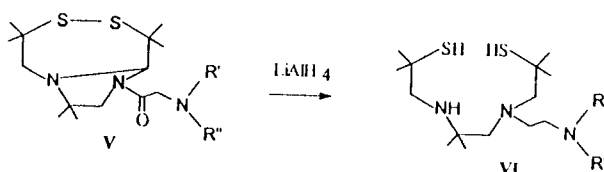
Purificação : cromatografia em coluna com sílica-gel de porosidade de 6 A^o com corrente de gás nitrogênio

1^o sistema de solvente: 100ml (éter de petróleo)

2^o sistema de solvente: 150ml (éter de petróleo 4 : 1 éter dietílico)

3^o sistema de solvente: 400ml (éter de petróleo 1 : 1 éter dietílico)

Sexta Etapa : Síntese dos Produtos Finais ⁸⁴



Reagentes - Solventes:

Hidreto de lítio e alumínio.....	0,04071 mol
Intermediário V	0,01934 mol
Tetra-hidrofurano.....	80ml

Método:

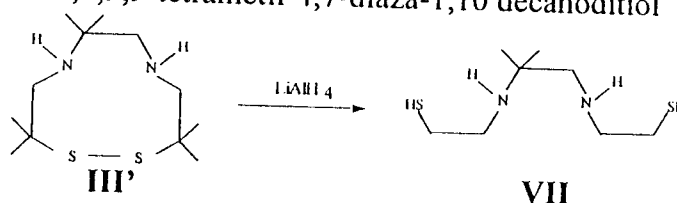
Previamente tratou-se o tetra-hidrofurano, utilizando-se sistema de aquecimento e refluxo e sódio metálico para extinguir as moléculas de água presentes no solvente. Para confirmação de que o solvente tornou-se anidro, monitorou-se o sistema até a formação de coloração azul por parte do indicador benzofenona. Em seguida, procedeu-se à sua destilação utilizando coluna vigreux e armadilha de sílica-gel na saída do condensador, para evitar a re-hidratação do solvente. Sob agitação, dissolveu-se o intermediário V em THF seco utilizando um balão de reação secado recentemente. Adicionou-se o hidreto de lítio e alumínio gradativamente em porções por 5 minutos. O sistema ficou sob refluxo por 24 horas em condensador de bolas contendo armadilha de sílica-gel, extinguiu-se o excesso de redutor com solução saturada de cloreto de amônio, removeu-se as frações voláteis à vácuo e 60° C. Adicionou-se 100ml de etanol ao resíduo, misturou-se por 2 horas, o líquido foi filtrado e o solvente foi eliminado à vácuo e 65° C.

Adicionou-se 50ml de água, ajustou-se o pH em 6 com NaOH 1N, extraiu-se com 50ml de éter dietílico para eliminar as impurezas solúveis em éter (essa fase etérea foi descartada). O pH foi ajustado em 6,2-7,2, extraiu-se com éter dietílico, secou-se com sulfato de sódio e aplicou-se HCl gasoso. O solvente foi eliminado à vácuo, a 45° C e o resíduo foi dessecado sob vácuo de 5 mmHg e pentóxido de fósforo por uma noite.

Rota Sintética Diferenciada

A rota sintética diferenciada (rota 1) é igual à rota 2 até a terceira etapa, a partir deste ponto o intermediário **III'** é utilizado.

Quarta Etapa : Síntese do Intermediário VII ¹¹⁹ 2,2,9,9-tetrametil-4,7-diaza-1,10 decanoditiol



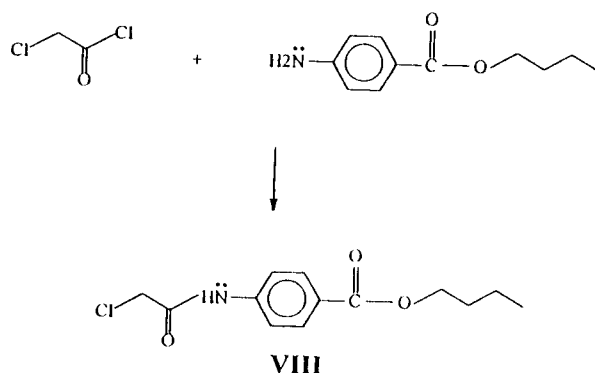
Reagentes - Solventes:

Intermediário III' (20mmol).....	5,00g
LiAlH ₄ (20mmol).....	51ml
Éter dietílico.....	300ml

Método:

Dissolveu-se o intermediário **III'** em 300ml de éter etílico seco e colocou-se em balão de reação de 500ml com duas bocas, contendo condensador de bolas com armadilha de sílica-gel (a vidraria foi recém-secada). Adicionou-se o hidreto de lítio e alumínio em porções durante aproximadamente 20 minutos. Adicionou-se solução saturada de ácido cítrico para hidrolisar e agitou-se por 30 minutos à temperatura ambiente. Extraiu-se com éter dietílico, o sistema foi secado com sulfato de sódio e eliminou-se o solvente com evaporador rotatório.

Quinta Etapa : Síntese do Intermediário VIII
 4-cloroacetilamino-*n*-butilbenzoato



Reagentes - Solventes:

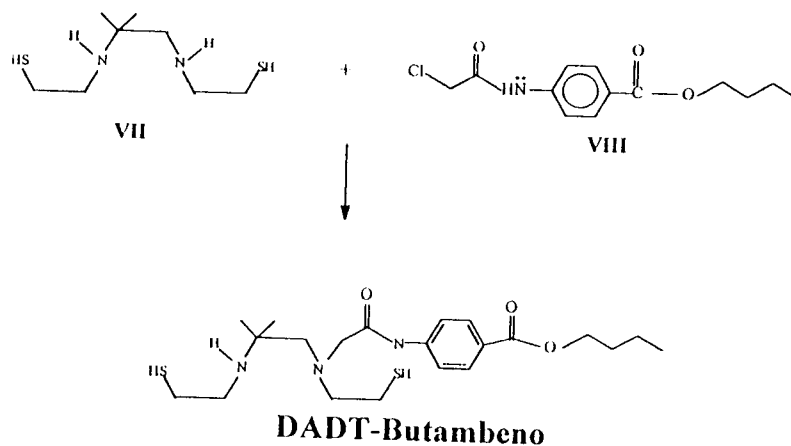
Cloreto de cloroacetila (20 mmol).....	2,26g
Butambeno base-livre (20 mmol).....	5,50g
Éter dietílico.....	400ml

Método:

Dissolveu-se o butambeno em 300ml de éter dietílico. Em funil de adição de pressão compensada, dissolveu-se o cloreto de cloroacetila em 100ml de éter dietílico e adicionou-se a solução, gota-a-gota, durante 40 minutos ao balão de reação. O sistema ficou reagindo por 2 horas, à temperatura ambiente, e filtrou-se lavando os resíduos com éter dietílico a 40°C. Concentrou-se o filtrado em rotaevaporador a 96°C e alto vácuo, para eliminar o excesso do cloreto de cloroacetila. Os cristais foram então lavados com éter de petróleo para eliminar as impurezas líquidas.

Sexta Etapa : Síntese do DADT-Butambeno

2,2,6,6,9,9-hexametil-4,7-diaza - 4-N-(4-butoxicarboniletanilida)-1,10-decanoditiol



Reagentes - Solventes:

Intermediário VII (10 mmol).....	2,650g
Intermediário VIII (2,5 mmol).....	0,674g
Etanol absoluto.....	400ml

Método:

Dissolveu-se o intermediário VII em 300ml de etanol absoluto no balão de reação. Em funil de adição de pressão compensada, dissolveu-se o intermediário VIII e adicionou-se, gota-a-gota, no sistema por 30 minutos. O sistema foi aquecido em refluxo por 2 horas.

Monitorou-se o fim da reação com fita cromatográfica de camada delgada de sílica-gel aluminizada com indicador de ultra violeta e utilizou-se como fase móvel acetato de etila 1:2 éter de petróleo. O reagente, intermediário VIII, possuiu rf de 0,95 e o produto apresentou rf de 0,84. Em seguida, eliminou-se as frações voláteis sob pressão reduzida. Filtrou-se, lavando o resíduo com éter de petróleo, para eliminação do excesso do intermediário VII .

Purificação : cromatografia em coluna com sílica-gel de porosidade de 6 A⁰ com corrente de gás nitrogênio

- 1^o sistema de solvente: 100ml (éter de petróleo 20 : 1 acetato de etila)
- 2^o sistema de solvente: 150ml (éter de petróleo 15 : 1 acetato de etila)
- 3^o sistema de solvente: 200ml (éter de petróleo 2 : 1 acetato de etila)
- 4^o sistema de solvente: 300ml (éter de petróleo 2 : 1 acetato de etila)

3.3.4. Análises Espectroscópicas e Físico-Químicas

De forma a identificar os produtos de síntese, foram efetuados os seguintes procedimentos para os compostos-chave :

- Espectro de infravermelho em pastilhas de KBr;
- Espectro de ressonância nuclear magnética de ^1H , para certos compostos efetuou-se também espectro de ressonância nuclear magnética de ^{13}C ;
- Ponto de fusão ;
- Análise elementar .

3.3.5. Método de Marcação e Purificação dos Derivados DADT

Inicialmente preparou-se tampão fosfato pH 7 utilizando 1,16 g de hidróxido de sódio, 6,8045g de fosfato monobásico de potássio para um volume final de 1 litro. Em ambiente de umidade reduzida, pesou-se 2 μmol de ligante (esses derivados DADT em geral são altamente higroscópicos) em frasco de centrífuga pequeno e dissolveu-se em 1ml de solução salina . Adicionou-se 2mg boroidreto de sódio, homogeneizou-se e adicionou-se 0,5ml de pertecnetato de sódio com atividade de 529 MBq , dissolvido em solução salina. Agitou-se mecanicamente, à temperatura ambiente, por 30 minutos.

Purificação dos Produtos Marcados

Procedeu-se à purificação dos produtos marcados utilizando-se a metodologia desenvolvida no Institute of Radioisotopes & Radiodiagnostic Products – Demokritos, Atenas para derivados DADT alquilaminínicos marcados com ^{99m}Tc . Assim, para separar o petecnetato de sódio ($\text{Na}^+\text{TcO}_4^-$) que é solúvel em água o sistema foi extraído 4 vezes com 0,8ml de cloreto de metileno utilizando-se agitador mecânico do tipo vórtex. Em seguida, com o auxílio de um funil de separação a fase orgânica foi integralmente reunida em frasco de penicilina e tratada com sulfato de magnésio para eliminação de traços de água presentes e para minimizar quantidades de $\text{Na}^+\text{TcO}_4^-$. O cloreto de metileno foi eliminado aplicando-se corrente de nitrogênio, até que o sistema se transformasse num resíduo sólido.

O resíduo foi então dissolvido com etanol e posteriormente com solução tampão pH 7 numa proporção de 20% de etanol e 80% de tampão de forma a obter uma solução final com 18,5 MBq/ml. Esta solução foi então filtrada em millipore (com porosidade de 0,8 A°) para minimizar a eventual presença de tecnécio coloidal (TcO_2), espécie radioquímica não desejada de tecnécio e pelo fato de ser filtração esterilizante, o que a torna adequada para efetuar administrações intravenosas em camundongos. Este procedimento de rotina do Instituto de Demokritos permite a obtenção de produtos marcados com pureza radioquímica de 90 - 98%.

Na realidade, optou-se por injetar a fração lipofílica contendo os epímeros A e B misturados para simular uma situação de uso em rotina clínica. Para cada tempo estudado foram utilizados 3 animais e, após decorrer períodos pré-estabelecidos de tempo, os animais foram sacrificados por decapitação, seus órgãos internos foram isolados por dissecação e contados em cintilador gama tipo po;co de forma a avaliar o comportamento de captação de cada agente perfusório.

Adicionalmente, para confirmar se os novos derivados DADT marcados com ^{99m}Tc (sintetizados no Brasil) possuem a tendência de formar os epímeros "A" e "B", procedeu-se, após a etapa de purificação química, à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para separá-los e evidenciá-los. Assim, os derivados DADT-PR, DADT-DIPA foram submetidos à cromatografia CLAE.

3.3.6. Análises Radioquímicas

A pureza radioquímica foi efetuada para detectar as porcentagens das espécies radioativas não desejadas, pertecnetato de sódio (TcO_4^-) e dióxido de tecnécio (TcO_2) presentes conjuntamente com cada produto marcado. Ao se subtrair as porcentagens presentes destas espécies da porcentagem total de radioatividade obtém-se a pureza radioquímica do produto marcado. Para este tipo de controle efetuou-se cromatografia em camada delgada com fitas de fibra de vidro impregnadas com sílica-gel, denominadas ITLC-SG utilizando solução salina para detectar TcO_4^- , neste sistema a radiação detectada no final da fita evidencia a quantidade de TcO_4^- (faixa de r_f 0,7 a 0,9). A presença de TcO_2 foi averiguada utilizando-se fitas de ITLC-SG e acetona como fase móvel. Neste sistema, o início da fita cromatográfica evidencia a quantidade de TcO_2 presente e os produtos marcados possuem r_f de 0,95.

3.3.7. Distribuições Biológicas dos Produtos Marcados

O estudo das distribuições biológicas foi efetuado visando averiguar se os diferentes produtos marcados com ^{99m}Tc são capazes de ultrapassar a barreira hematoencefálica, se fixando no cérebro por determinado período de tempo de forma a possibilitar a obtenção dos mapas pela técnica de SPET ("Single Photon Emission Computed Tomography"). Foram utilizados camundongos fêmea Swiss de 2 a 3 meses de vida anestesiados com uretana e, logo em seguida, injetados com os produtos marcados com ^{99m}Tc dissolvidos em solução salina e tampão fosfato de pH 7 através da veia caudal.

Após decorrer períodos pré-estabelecidos de tempo, os animais foram sacrificados por decapitação e, de forma a avaliar a captação de cada agente perfusório, procedeu-se à dissecação de cada animal com separação dos respectivos órgãos para contagem em contador gama tipo poço com cristal de NaI(Tl), automático. Sabendo-se que a atividade radioativa injetada intravenosamente pela seringa equivale a 100% da dose, calcula-se a porcentagem de dose por órgão com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ dose / ÓRGÃO} = \frac{\text{CPM/órgão}}{\text{dose administrada CPM}} \times 100$$

Onde : CPM = contagens por minuto

Equação 7

Afim de comparar as afinidades relativas dos radiofármacos por diferentes órgãos calculou-se também a % dose administrada por grama de tecido para se anular a aparente captação que ocorre em órgãos que possuem maior peso, onde: 7

$$\% \text{ dose / grama} = \frac{\text{CPM/grama de órgão}}{\text{dose administrada CPM}} \times 100$$

Onde: CPM = contagens por minuto

Equação 8

Afim de evidenciar o comportamento das captações cerebrais (%dose/órgão) e da %dose/sangue em função do tempo, construiu-se gráficos cartesianos.

Tratamento Estatístico dos Dados de Distribuição Biológica

O tratamento estatístico dos resultados foi especialmente aplicado para os valores de captação cerebral expressa em porcentagem de captação por órgão, de forma a averiguar se as propriedades físico-químicas realmente foram responsáveis por proporcionar aumento na captação cerebral dos diferentes produtos marcados. Como esta comparação tem que ser necessariamente efetuada entre diferentes populações (de camundongos) que possuem uma variâncias próprias, não se pode adotar uma análise de variância simples, como o ensaio t de Student aplicado diretamente.

Assim, utilizou-se a análise de variância de Bonferroni que compara duas-a-duas as médias (com desvios-padrão) das populações.

Para processar as informações utilizou-se o programa de computador MINITAB do Instituto de Matemática e Estatística da USP.

Para este tipo de procedimento, a hipótese nula H_0 considera que duas médias analisadas (por exemplo μ_1 , μ_2) são iguais, ou seja: $\mu_1 = \mu_2$. Esta hipótese é chamada de nula porque se as médias são iguais então elas se anulam: $\mu_1 - \mu_2 = \text{zero}$. Como se está querendo provar que determinado tipo de derivado DADT possui maior captação cerebral que outro, a hipótese nula não pode-se confirmar, ou seja, o teste de Bonferroni deve rejeitar a hipótese nula.

Entretanto para se comparar μ_2 com μ_1 deve-se verificar se μ_2 encontra-se ou não na região crítica de μ_1 . Se μ_2 estiver dentro desta região crítica, considera-se que μ_2 é diferente de μ_1 , pois a região crítica em questão é a região menos provável de se encontrar μ_1 . Nestas condições a hipótese nula é rejeitada e considera-se, por exemplo, que a captação cerebral (valor médio) de determinado derivado DADT é significativamente maior do que a do outro derivado (para um determinado tempo de estudo e um nível de significância).

Para os ensaios biológicos efetuados, utilizaram-se 3 camundongos para cada tempo estudado. Como as médias são comparadas duas a duas, cada comparação efetuada inclui três dados de uma média e três dados da outra, totalizando 6 dados. Estes seis dados implicam em quatro graus de liberdade, uma vez que cada média perde um grau de liberdade.

Em seguida, calcula-se o valor "t" de Student adequado à análise de variância de Bonferroni, com a seguinte equação :

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\text{QMR} \cdot \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

Equação 9

Onde :

\bar{x} : média dos valores experimentais

QMR : estimador de σ^2

t : valor de Student

n : número de dados usados na média

Cada valor t de Student que é obtido pela equação 7 acima, é calculado automaticamente quando se dá a entrada dos dados no programa MINITAB e se processa o comando para análise por variância "Two Way".

Uma vez calculado o valor de t e sabendo-se que a análise das duas médias possui 4 graus de liberdade, o valor da probabilidade "p" para a distribuição de Student é fornecido pelo MINITAB. Se p for menor do que 5% significa que a média μ_2 , que está sendo ensaiada, encontra-se na região crítica da média μ_1 e, assim, a hipótese nula é rejeitada significando que as médias são diferentes com um nível de significância de 95%.

Se p for maior do que 5%, a hipótese nula é aceita e estas duas médias são consideradas iguais para o nível de significância de 95%. Adicionalmente para corroborar com a análise dos valores de probabilidade das regiões críticas, calculou-se o intervalo de confiança para uma das médias (por exemplo μ_1) para se comparar com o intervalo de confiança calculado para a outra média (por exemplo μ_2) e evidenciar se as médias possuem algum provável ponto de interseção, onde são consideradas iguais ou se elas não possuem nenhuma região em comum sendo consideradas como diferentes.

Assim, o intervalo de confiança de cada média foi efetuado a partir da seguinte expressão :

$$\bar{x} - Z_{\gamma} \sqrt{\frac{QMR}{n}} < \mu < \bar{x} + Z_{\gamma} \sqrt{\frac{QMR}{n}}$$

Expressão 1

Onde :

QMR : estimador de σ^2

n: número de dados usados na média

μ : média calculada para o intervalo

γ : coeficiente de confiança

\bar{x} : média dos valores experimentais

Z : ordenada no gráfico de probabilidades que está relacionada com o valor do nível de significância

3.3.8. Ensaio de Atoxicidade

Para verificar a atoxicidade de radiofármacos desta categoria foi efetuado ensaio denominado toxicidade anormal segundo a European Pharmacopoeia – terceira edição e denominado de atoxicidade, segundo o Control de Calidad de Radiofarmacos da ALASBIMN (Asociacion Latinoamericana de Sociedades de Biologia y Medicina Nuclear segue. Utilizando-se 5 camundongos sadios adultos (foram utilizados 10 animais), injetar intravenosamente, 1,1mg de ligante não marcado (derivado de DADT) em cada animal, que é quantidade equivalente a 500 vezes a dose de ECD (produto perfusório aminotiólico que já é administrado em seres humanos), dissolvidos em 100µl de solução salina estéril, isotônica, apirogênica. A injeção é efetuada pela veia caudal em período que não deve ser superior a 5 segundos.

A substância passa no teste se após 6 horas de descanso em recinto fechado não houver morte de um ou mais camundongos. Havendo morte de um ou mais indivíduos, repete-se o ensaio em um número similar que deve ficar 24 horas de observação.

4. RESULTADOS

4.1. Descritores Moleculares

4.1.1. Valores Teóricos e Simulados de Coeficientes de Partição

COMPOSTO	CLOG P	$\Delta \log P$	$\Delta \log P$ ADOTADO	log P EXPERIMENTAL SIMULADO
1 A *	4,79	2,01	-	-
2 A *	3,40	1,19	-	-
3 A *	5,30	2,08	-	-
4 A *	6,36	3,98	-	-
5 A *	3,52	1,12	-	-
6 A *	3,83	2,01	-	-
DADT-DIPA	5,08	-	1,19 (composto 2 A)	3,89
DADT-DIB	6,32	-	2,01 (composto 1 A)	4,06
DADT-PR	4,30	-	-	-

* Compostos da tabela 1, idealizados por Scheffel et al.¹¹⁴

Tabela 4

4.1.2. Valores de Polarizabilidade Efetiva Calculada α_d

COMPOSTO	α_d (NITROGÊNIO DE R)
1*	7,518
2*	5,913
3*	7,522
4*	7,086
5*	7,131
6*	5,994
7*	7,651
8*	5,826
9*	7,339
10*	6,128
11*	7,518
12*	5,913
13*	7,522
14*	7,086
15*	7,131
16*	5,994
17*	7,651
18*	5,826
19*	7,339
20*	6,128
DADT - PR	8,276
DADT - DIPA	8,946
DADT - DIB	9,128

* Compostos da tabela 2, idealizados por Scheffel et al.¹¹⁴

Tabela 5

4.2. Características dos Produtos de Síntese.

Composto	Aspecto	Ponto De Fusão	Ponto de Ebulição	Rendimento
Intermediário I	Óleo amarelo pálido	-	150 ⁰ C, 2-4mmHg	50%
Intermediário II	Cristais branco-amarelados	97,9 ⁰ C	-	60%
Intermediário III	Cristais branco-amarelados	72,0 ⁰ C	-	30%
Intermediário III'	Óleo amarelo pálido	-	-	40%
Intermediário IV'	Cristais branco-amarelados	109,6 ⁰ C	-	70,3%
Intermediário IV	Cristais branco-amarelados	119,8 ⁰ C	-	25%
Intermediário V DADR-PR	Cristais amarelo-pardos	124,4 ⁰ C	-	26%
Intermediário V DADT-DIPA	Cristais amarelo-pálidos	122,2 ⁰ C	-	63%
Intermediário V DADT-DIB	Cristais branco-amarelados	109,0 ⁰ C	-	52%
Intermediário VII	Óleo amarelo pálido	-	-	58%
Intermediário VIII	Cristais amarelos	83,4 ⁰ C	-	91%
DADT-PR	Cristais brancos	*	-	3-5%
DADT-DIPA	Cristais brancos	*	-	3-5%
DADT-DIB	Cristais brancos	*	-	3-5%
DADT-BUT	Cristais brancos	*	-	3-5%

* Produtos higroscópicos

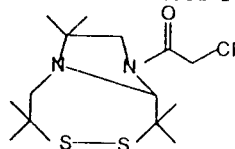
Tabela 6

4.3. Análises Espectroscópicas

As análises espectroscópicas foram efetuadas a partir dos Intermediários **IV** e **IV'**, que são produtos-chave nas rotas sintéticas dos produtos finais.

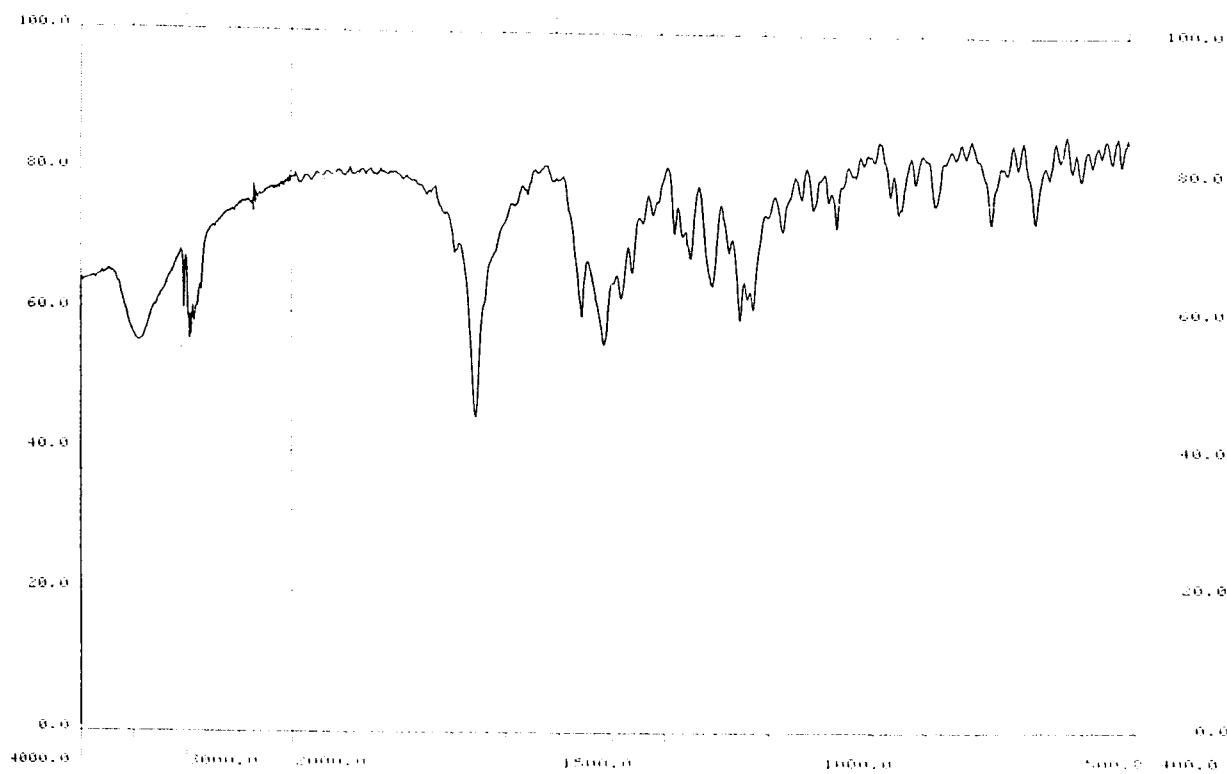
4.3.1. Espectros de Infravermelho em Pastilhas de KBr

Intermediário IV

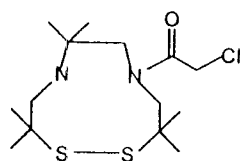


Número de Onda (cm ⁻¹)	Características
3.450,0	harmônica de 1.718,3 (amida terciária)
2.988,5	estiramento de C-H alifático
1.718,3	banda forte de amida terciária
1.651,9	deformação axial de carbonila de amida – banda I
1.313,6	banda forte de amina terciária
1.249,0	deformação axial de C-N
1.155,8	deformação de C-S
670,2	deformação axial de C-S
493,3	deformação axial de S-S

Tabela 7

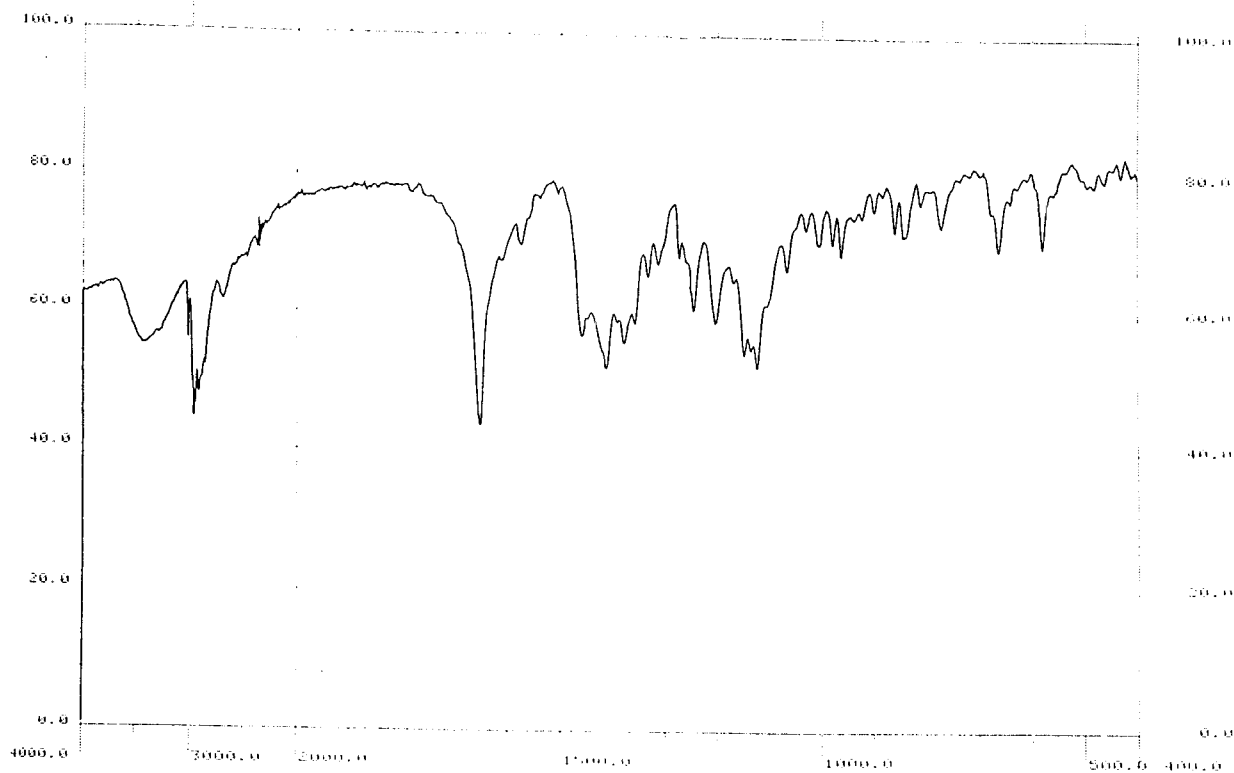


Intermediário IV'

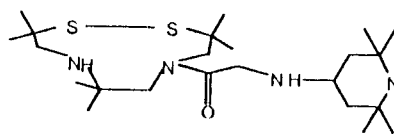


Número de Onda (cm ⁻¹)	Características
3.450,0	harmônica de 1.718,3 (amida terciária) estiramento de C-H alifático banda forte de amida Terciária deformação axial de carbonila de amida – banda I banda forte de amina Terciária deformação axial de C-N deformação de C-S deformação axial de C-S deformação axial de S-S
2.988,5	
1.718,3	
1.651,9	
1.313,6	
1.249,0	
1.155,8	
670,2	
493,3	

Tabela 8

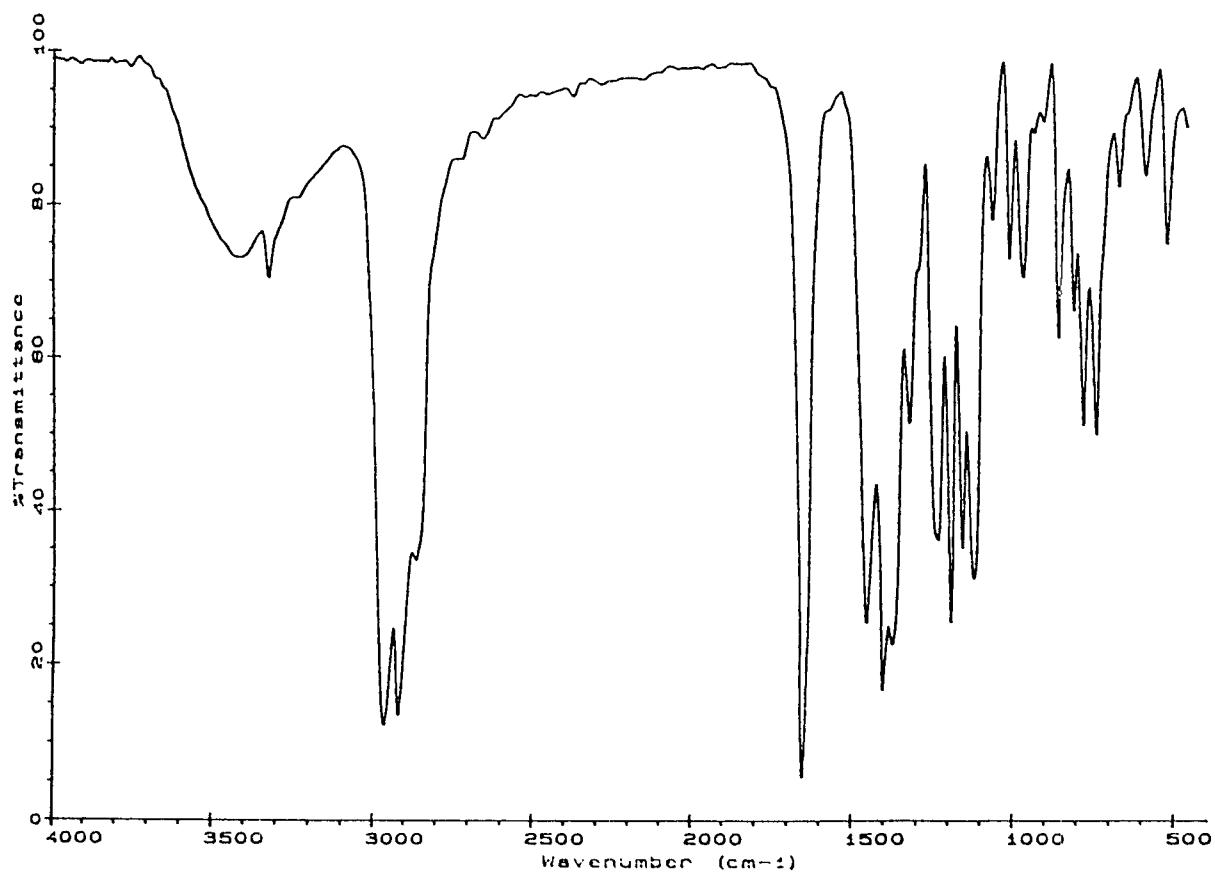


Derivado DADT - PR Intermediário V

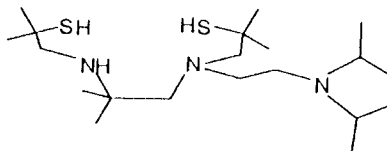


Número de Onda (cm ⁻¹)	Características
3.323,7	Deformação axial de N-H
2.917, 2.963,4	Estiramento de C-H alifático
2.867,4	Estiramento de C-H saturado
1.652,1	Deformação axial de carbonila de amida - banda I
1.010,3, 1.064,0	Deformação axial de C-N
669,25	Deformação angular simétrica de N-H
521,52	Deformação axial de S-S

Tabela 9

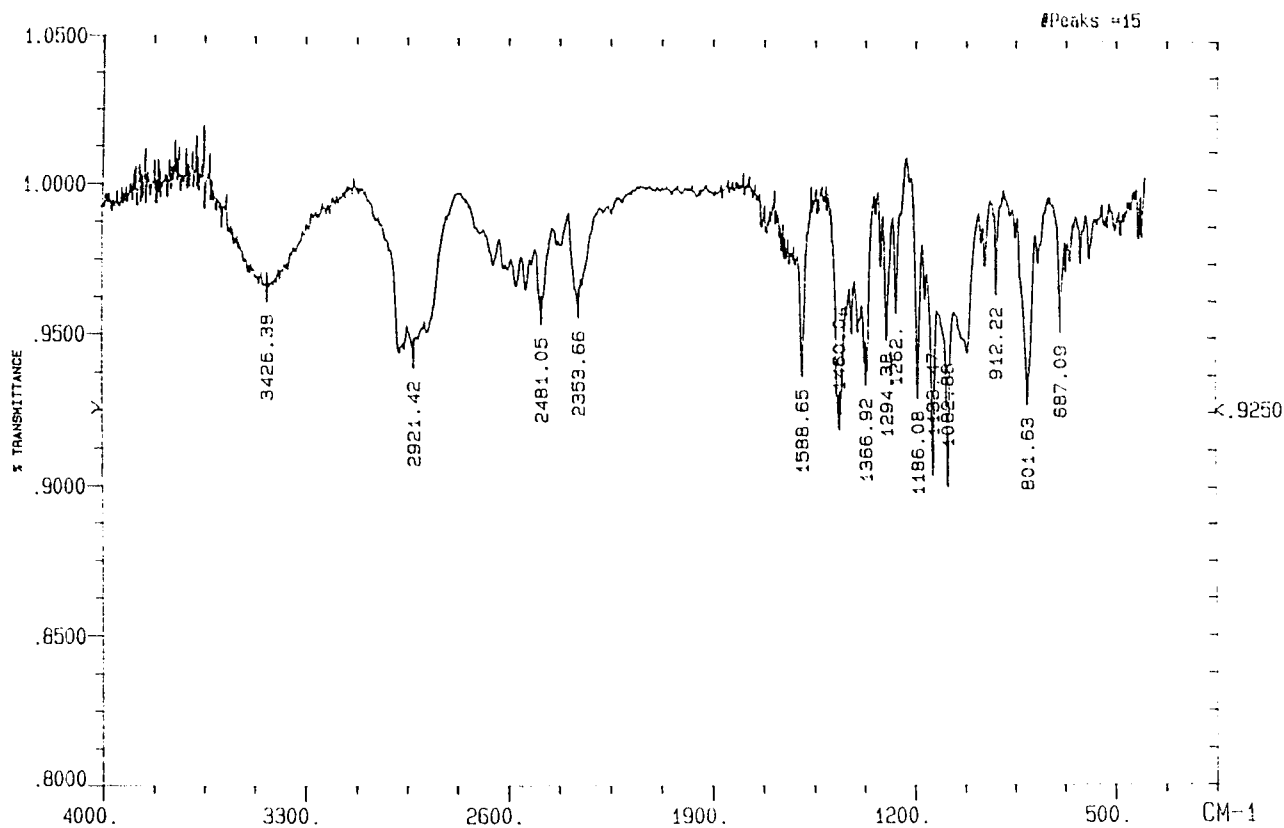


Derivado DADT - DIPA

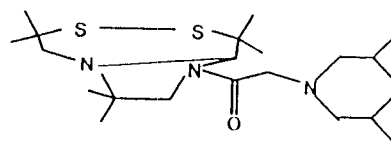


Número de Onda (cm ⁻¹)	Características
3.426,4	Deformação axial de N-H
2.921,4	Estiramento de C-H alifático
2.867,4	Estiramento de C-H saturado
2.560,0	Deformação axial de S-H, banda fraca
2.521,0	Deformação axial de S-H, banda fraca
1.558,65	Deformação angular simétrica N-H, banda forte
1.460,0	Deformação axial C-N
1.082,9 , 1.133,47	Deformação axial de C-N

Tabela 10

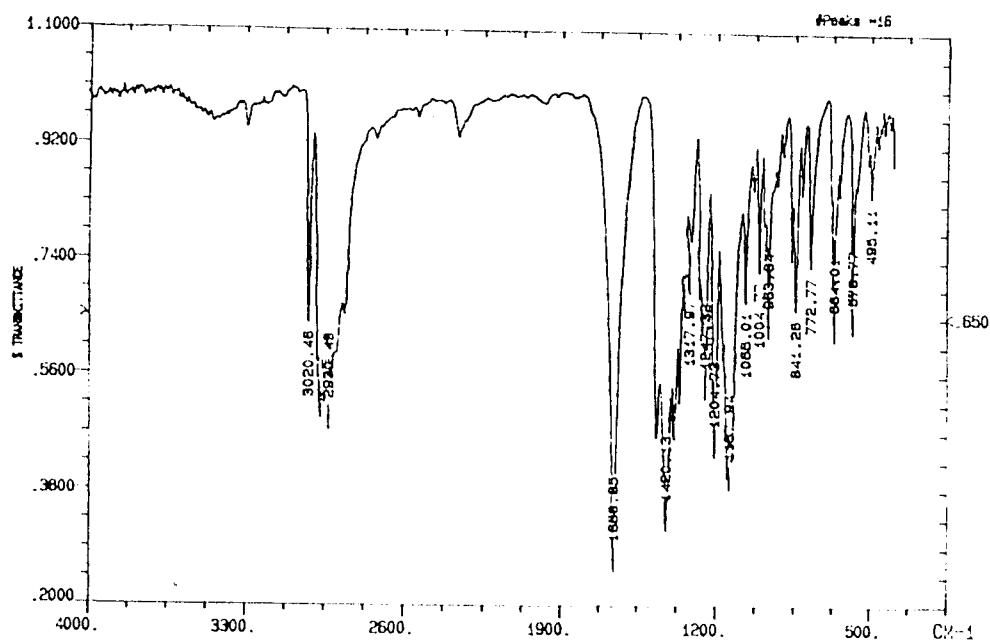


Derivado DADT-DIB Intermediário V

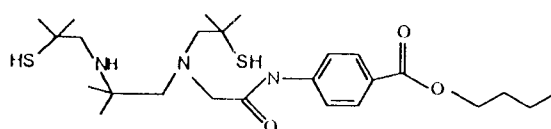


Número de Onda (cm ⁻¹)	Características
3.320,7	deformação axial N-H
2930,49	estiramento de ligação C-H saturada
1.420,13	deformação axial C-N
1656,85	deformação axial de carbonila de amida – banda I
1317,97	harmônica de 664,01 cm ⁻¹
1.247,32	banda de amina terciária
1.204,73	banda de amina terciária
1.137,94	banda de amina terciária
1.065,01	banda de C-S
1.004,77	banda de C-S
963,84	harmônica de 495,11 cm ⁻¹
664,01	deformação angular simétrica de N-II
495,11	Deformação axial de S-S

Tabela 11

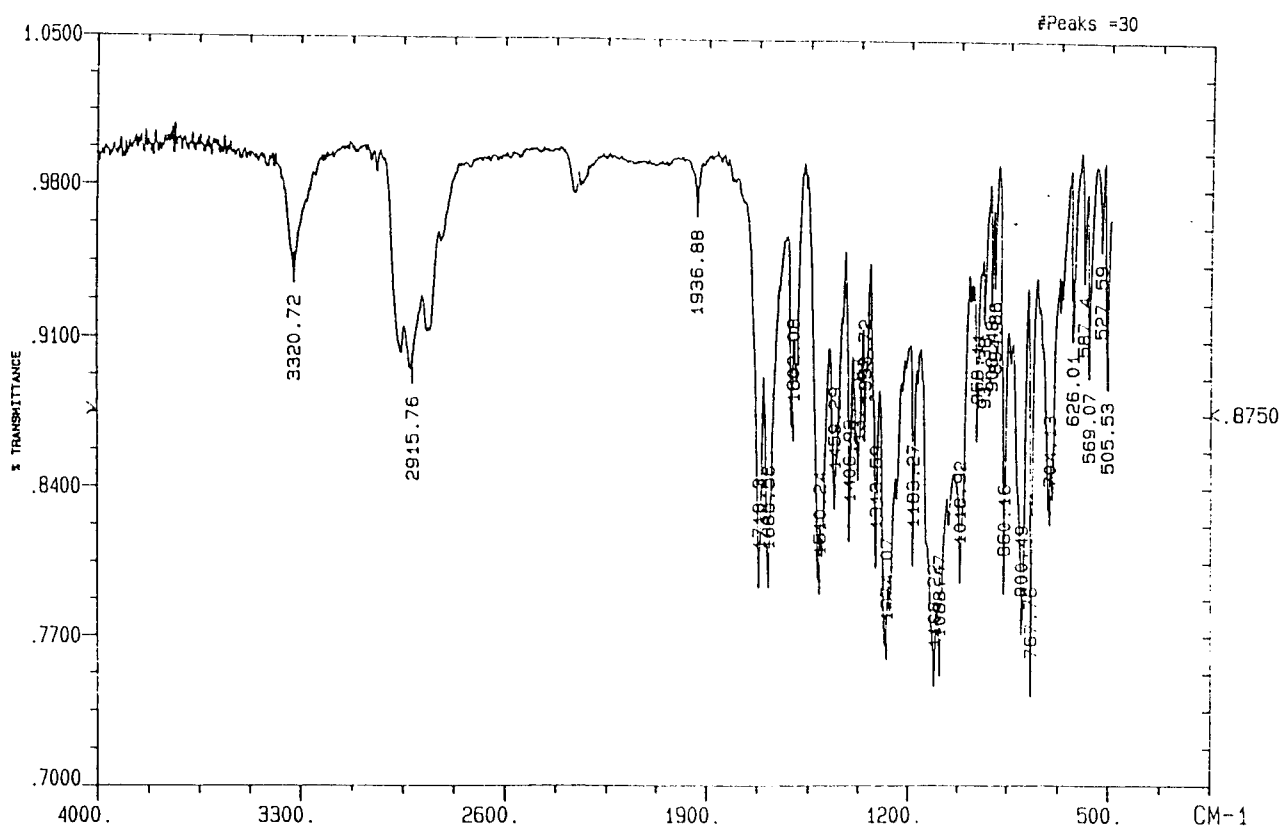


Derivado DADT - Butambeno

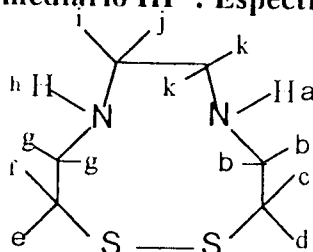


Número de Onda (cm ⁻¹)	Características
3.320,7	deformação axial simétrica e assimétrica de N-H
2.915,8	estiramento de C-H alifático
1.718,3	deformação axial de carbonila de éster
1.685,6	deformação axial de carbonila de amida - banda I
1.602,1	deformação angular N-H
1.459,3	harmônica de 704,1 (ligação C-S)
1.406,9	deformação axial de C-C de anel benzênico
1.274,1	deformação axial de C-N
800,2	deformação C-H angular fora do plano de anel benzênico
704,1	deformação axial C-S

Tabela 12

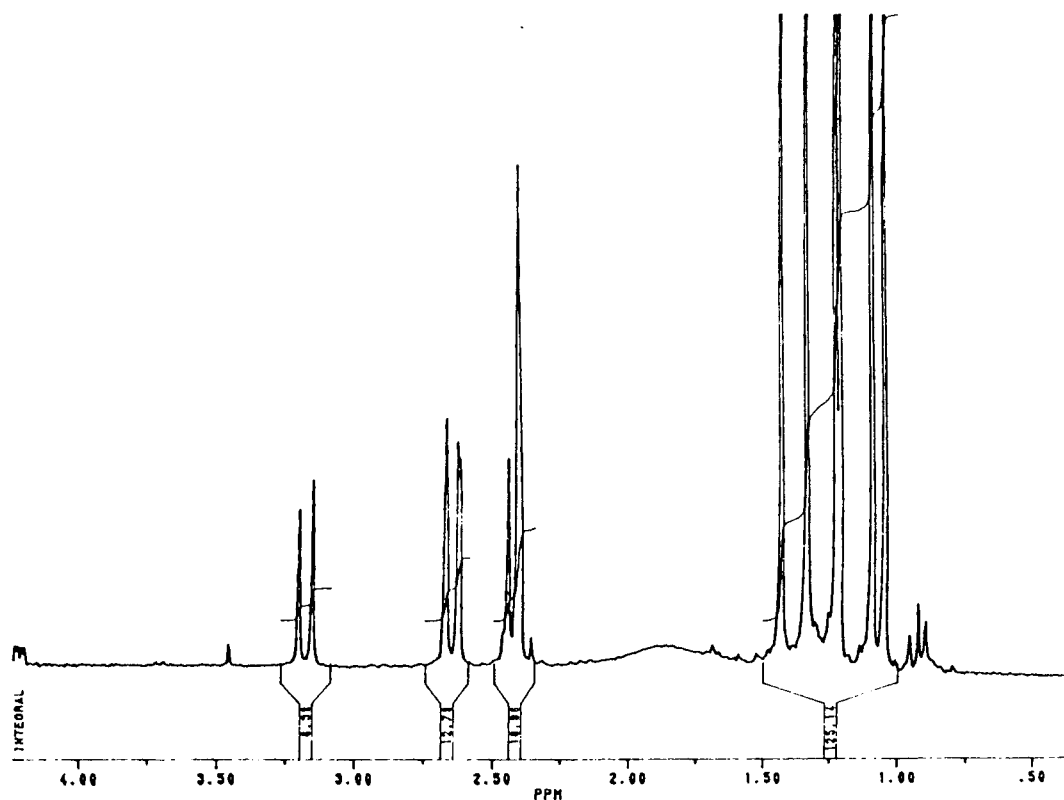


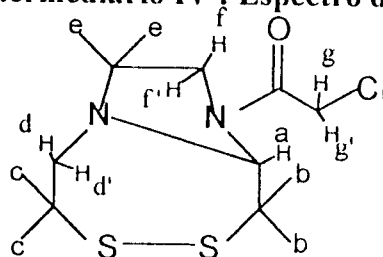
4.4.2. Espectros de Ressonância Nuclear Magnética

Intermediário III' : Espectro de ^1H 

δ ppm	n° de H's	Hidrogênios e suas Características
3,1785	1	1 dublete de acoplamento geminal : b , $J_{b,b} = 12,2$ Hz
2,,6446	1	1 dubletes de acoplamento geminal: b , $J_{b,b} = 12,2$ Hz
2,6280	1	1 singleto : g
2,4445 - 2,3569	3	multiplete : g, k, k
1,4333 , 1,3381	6	2 singletes : i , j
1,2275 , 1,2121	6	2 singletes : e , f
1,0929 , 1,0464	6	2 singletes : c , d
1,44333 - 1,3381	2	hidrogênios amínicos (deduzidos pela área total sob os picos: 18 hidrogênios metílicos e 2 hidrogênios amínicos)

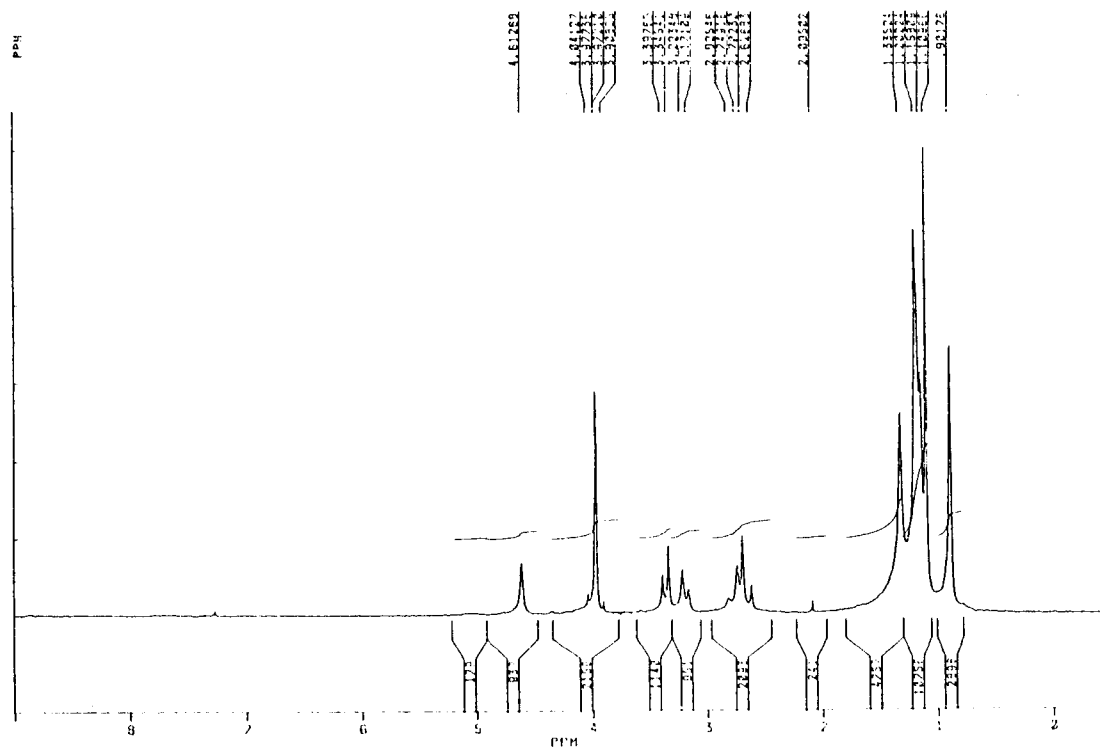
Tabela 15

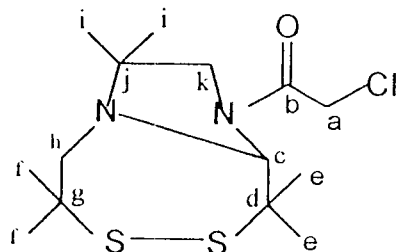


Intermediário IV : Espectro de ^1H 

δ ppm	n ^o de H's	Hidrogênios e suas Características
4,61268 3,9729	1 2	singleto de hidrogênio metínico: a 2 dubletes de acoplamento geminal: g, g' $J_{g,g'} = 13$ Hz (os dubletes são mais discretos devido ao fato do grupo metilênico ser acíclico)
3,37115 , 3,1973	2	2 dubletes de acoplamento geminal: f, f' ($J_{ff'} = 10$ Hz)
2,7873 , 2,6646	2	2 dubletes de acoplamento geminal: d, d' ($J_{dd'} = 15$ Hz)
1,10966 - 1,33524	18	multiplete : b, b, c, c, e, e

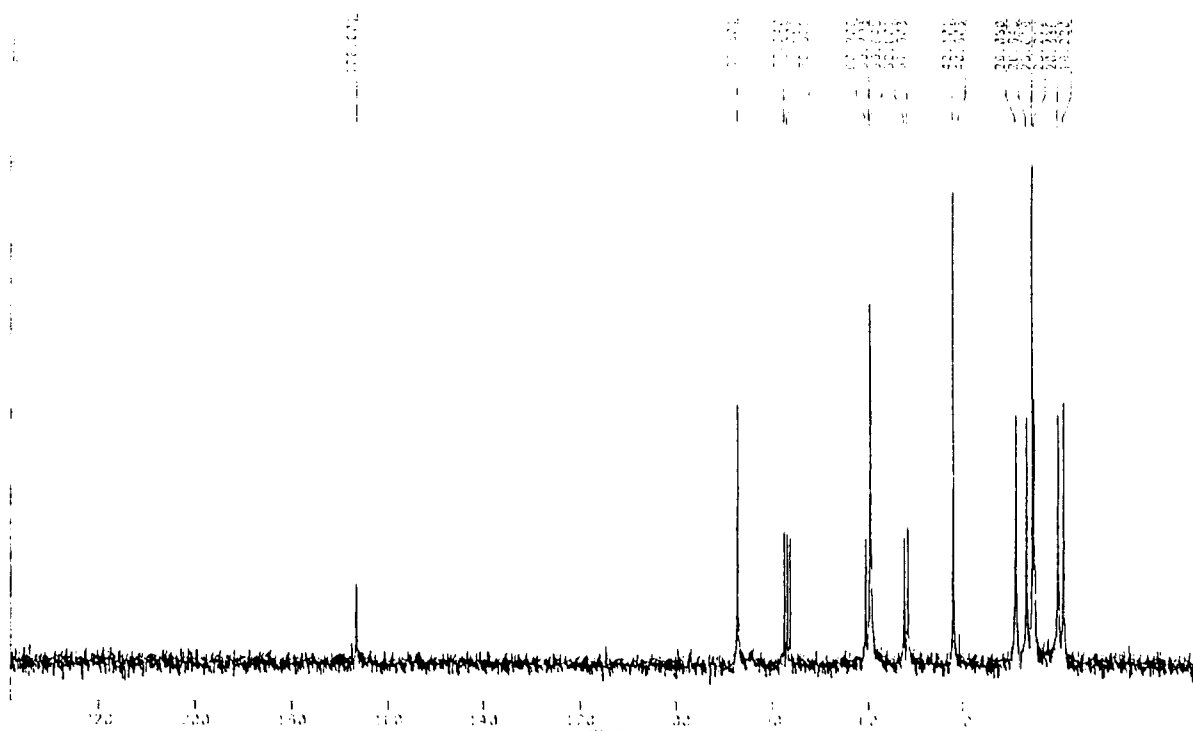
Tabela 13

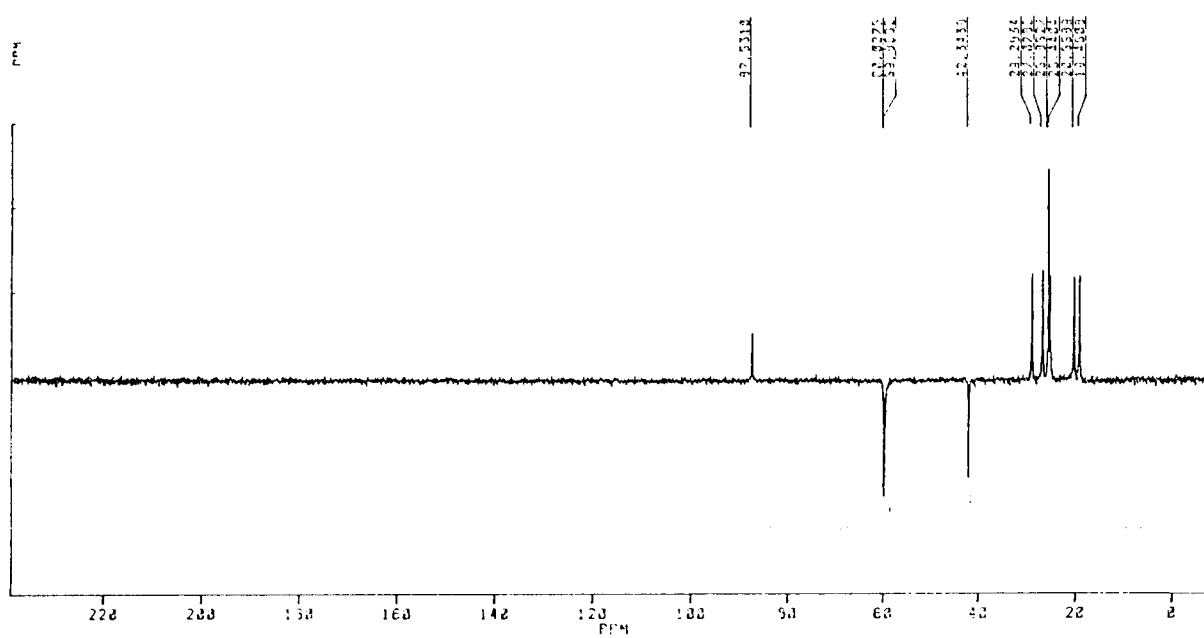


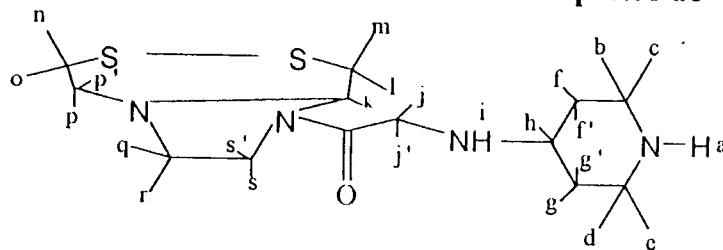
Intermediário IV : Espectro de ^{13}C 

δ ppm	n ^o de C's	Carbonos e suas Características
166,601	1	b : carbono quaternário (sinal sumiu no DEPT)
87,301	1	c : carbono metínico
60,706	1	k : carbono metilênico (sinal se inverteu no DEPT)
59,793	1	h : carbono metilênico (sinal se inverteu no DEPT)
59,645	1	d : carbono quaternário (sinal sumiu no DEPT)
52,601	1	g : carbono quaternário (sinal sumiu no DEPT)
51,803	1	j : carbono quaternário (sinal sumiu no DEPT)
42,285	1	a : carbono metilênico (sinal se inverteu no DEPT)
29,050 , 26,945	2	e, e' : carbonos metílicos
25,619 , 25,212	2	f, f' : carbonos metílicos
20,336 , 18,220	2	i, i' : carbonos metílicos

Tabela 14

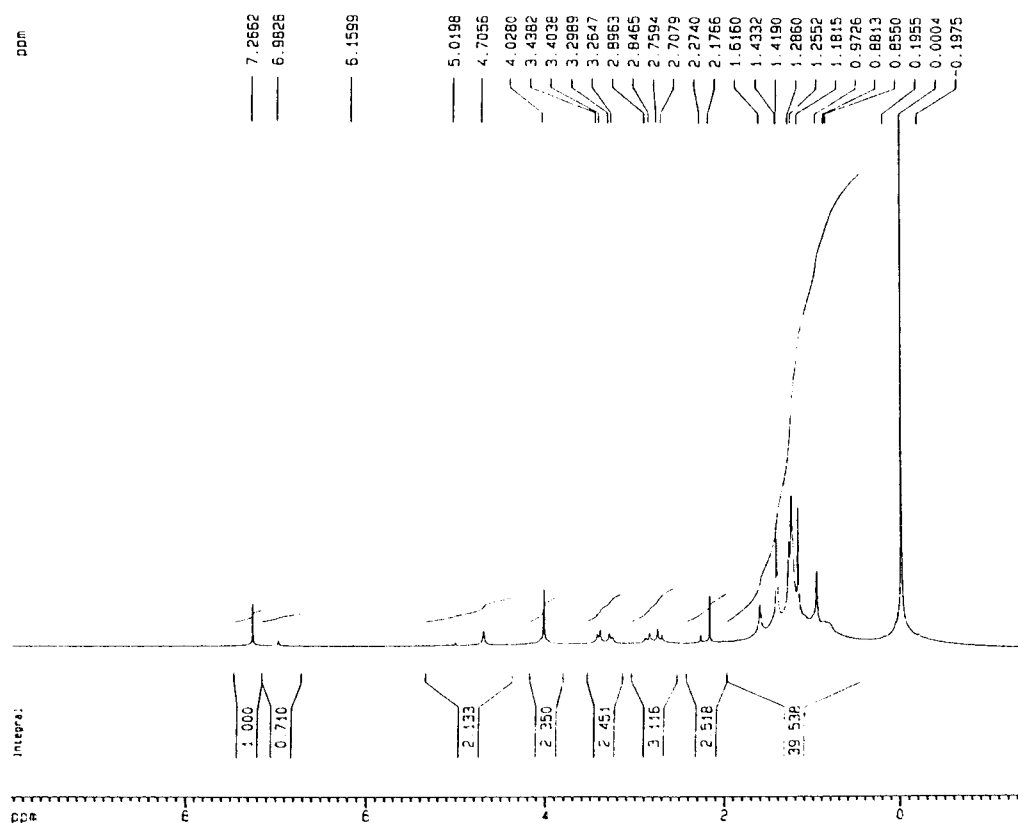


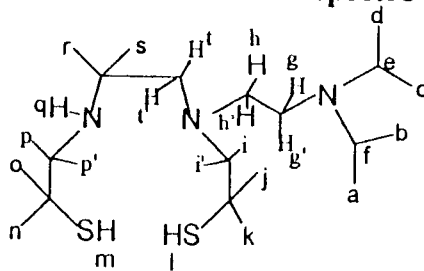
Intermediário IV : Espectro de ^{13}C com DEPT

Derivado DADT-PR Intermediário V: Espectro de ^1H 

δ ppm	n ^o de H's	Características dos hidrogênios
7,2662	1	singleto de hidrogênio aminico : i
6,9828	1	singleto de hidrogênio aminico : a
5,0198	1	singleto : h
4,0280	2	dois dubletes de acoplamento geminal : j, j' (os picos são mais discretos devido ao fato do grupo metilênico ser acíclico)
3,4210, 3,2818	2	2 dubletes de acoplamento geminal: s, s' $J_{s,s'} = 10$ Hz
2,8714 - 2,7337	2	2 dubletes de acoplamento geminal: p, p' $J_{p,p'} = 15$ Hz
2,2740 - 1,6160	4	hidrogênios metilênicos : f, f', g, g'
1,4332, 1,14190	6	dois singletes : l, m
1,2860, 1,2552	6	dois singletes : n, o
1,1815, 0,9726	6	dois singletes : q, r
0,8813, 0,8550	12	quatro singletes : b, c, d, e

Tabela 16



Derivado DADT – DIPA : Espectro de ^1H 

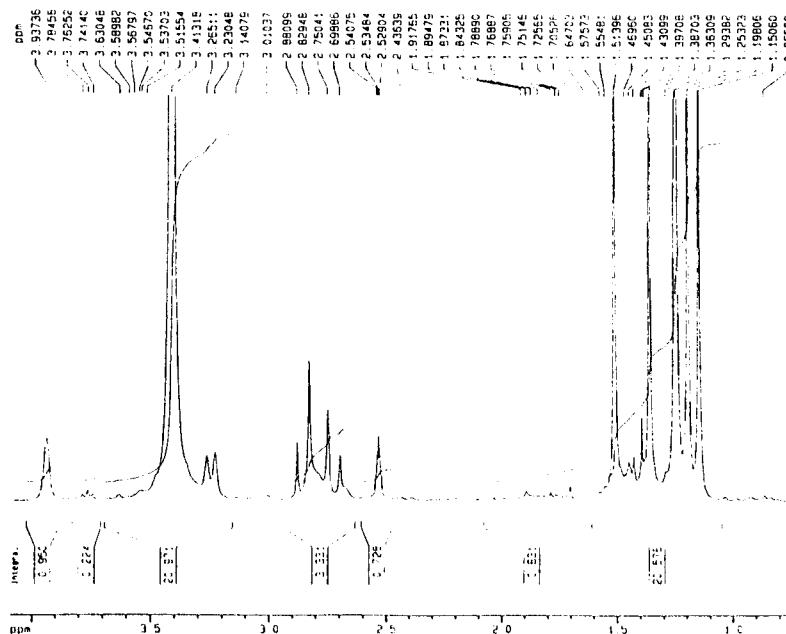
δ ppm	n ^o de H's	Características dos hidrogênios
3,93736	1	q , hidrogênio amínico
3,4132 - 3,2305	21	multiplete: 12H (a,b,c,d) hidrogênios metílicos, 9H metilênicos
2,79	3	multiplete: 2H (e,f *) - 2 Quadripletes superpostos de hidrogênios metínicos, 1 hidrogênio metilênico DMSO
2,5408, 2,5290, 2,5348		
1,51396 – 1,43099 & 1,36309 – 1,25323	12	multiplete: (j,k,n,o) , hidrogênios metílicos
1,39708 , 1,38703	2	2 singletes : (l,m) , hidrogênios sulfidrílicos
1,19806 , 1,50060	6	2 singletes (r,s), hidrogênios metílicos

Tabela 17

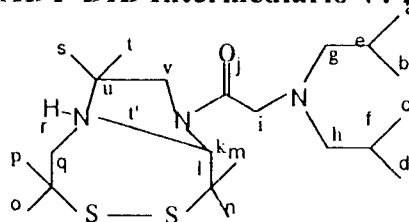
*Cálculos dos deslocamentos dos hidrogênios “e”, “f” segundo a regra de

$$\text{Shoolery}^{121}: \delta (\text{C-H}) \quad 1,55$$

$$\delta (\alpha \text{ NRR}') \quad \frac{1,33 +}{2,88}$$



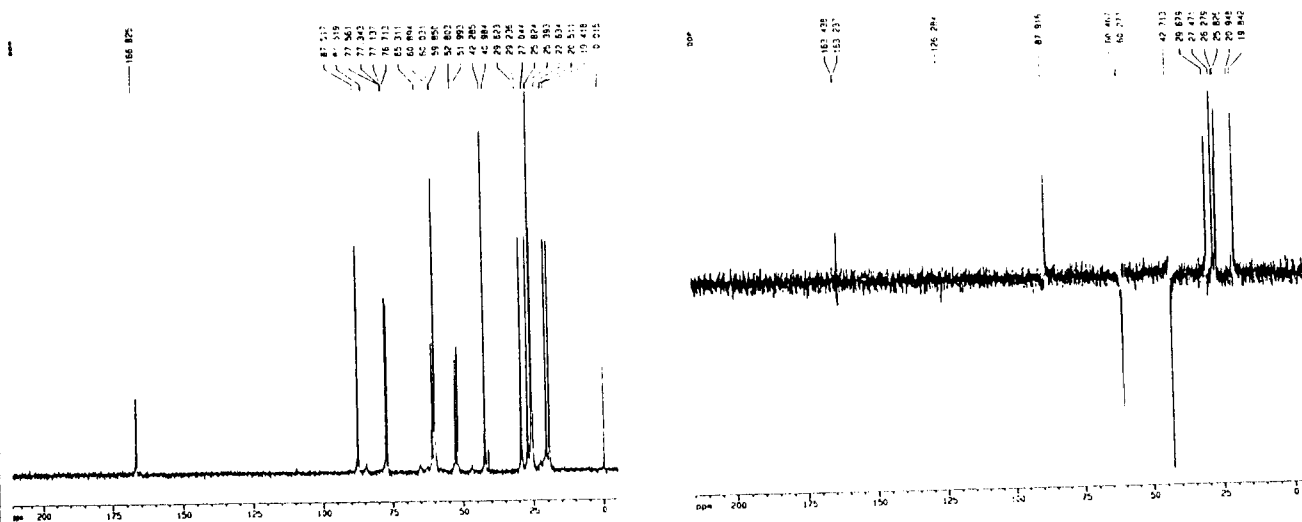
Derivado DADT-DIB Intermediário V: Espectro de ^{13}C

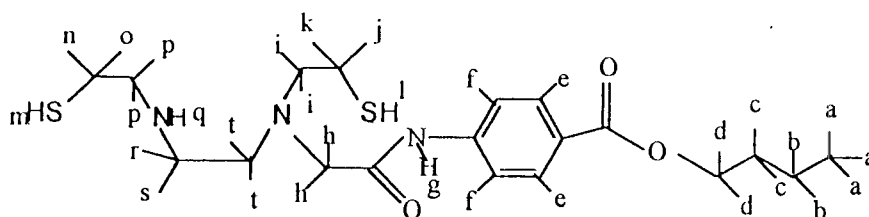


Foi elaborado espectro de RMN de ^{13}C para diferenciar o DADT-DIB Intermediário V do intermediário IV pois os espectros de ^1H são muito parecidos.

δ ppm	n ^o de C's	Carbonos e suas Características
166,825	1	j : carbono carbonílico
87,517	1	k : carbono metínico
65,311	1	l : carbono quaternário (sinal sumiu no DEPT)
60,894	2	g, h : carbonos metilênicos (sinais se inverteram DEPT)
60,031	1	r : carbono metilênico (sinal se inverteu no DEPT)
59,850	1	v : carbonos metilênicos (sinais se inverteram no DEPT)
52,803	1	q : carbono quaternário (sinal sumiu no DEPT)
51,993	1	u : carbono quaternário (sinal sumiu no DEPT)
42,285	1	i : carbonos metilênicos (sinal se inverteu no DEPT)
29,623 & 29,236	2	m, n : carbonos metílicos
27,044	2	s, t : carbonos metílicos
25,824	2	o, p : carbonos metílicos
25,393 , 22634	2	e, f : carbonos metínicos
20,511 & 19,418	4	a, b, c, d : carbonos metílicos

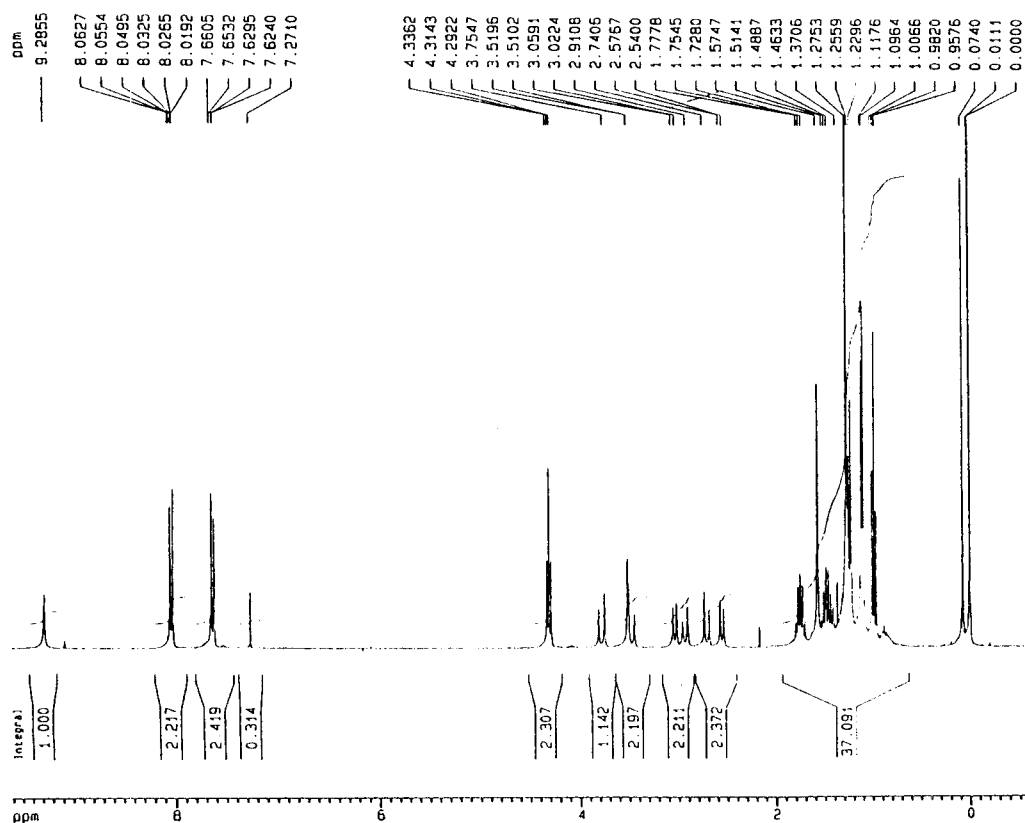
Tabela 19



Derivado DADT - Butambeno : Espectro de ¹H

δ ppm	n ^o de H's	Hidrogênios e suas características
0,09820	3	triplete: a
1,0964 - 1,2753	18	multiplete: j, m, p
1,3706	1	singleto: o
1,5190	2	sexteto: b
1,5747	2	2 singletes sobrepostos: k, l
1,7545	2	quinteto: c
2,5400 - 3,0591	2	2 dubletes de acoplamento geminal (picos de dubete I e IV) de hidrogênios metilênicos $J = 11,01\text{Hz}$
2,69-2,95	2	2 dubletes de acoplamento geminal (picos de dubete II e III) de hidrogênios metilênicos
3,45-3,81	2	2 dubletes de acoplamento geminal de hidrogênios metilênicos
3,5196	1	singleto de hidrogênio metilênico
4,3143	2	Triplete: d
7,6240 - 7,6605	2	2 dubletes sobrepostos: e
8,0192-8,0627	2	2 dubletes sobrepostos: f
9,2855	1	singleto: g

Tabela 20



4. 4. Análises Elementares

Os intermediários e produtos finais foram analisados com relação às porcentagens de carbono, nitrogênio e hidrogênio.

Composto	Fórmula Mínima	Valores Calculados			Valores Encontrados		
		% C	%N	% H	% C	%N	% H
Intermediário IV	$C_{14}H_{25}N_2S_2 ClO$	49,90	8,31	7,48	50,43	8,11	7,20
DADT-DIPA	$C_{20}H_{45}N_3S_2 \cdot 3HCl \cdot H_2O$	46,27	8,09	9,71	46,84	7,24	8,35
DADT-BUT-Interm.V	$C_{25}H_{39}N_3O_3S_2$	60,82	8,51	7,96	60,36	7,20	8,06
DADT-PR-Interm.V	$C_{23}H_{44}N_4OS_2$	60,48	12,27	9,71	60,47	12,39	9,44

Tabela 21 – Análises elementares de intermediários e produtos finais

4.5. Análises Radioquímicas

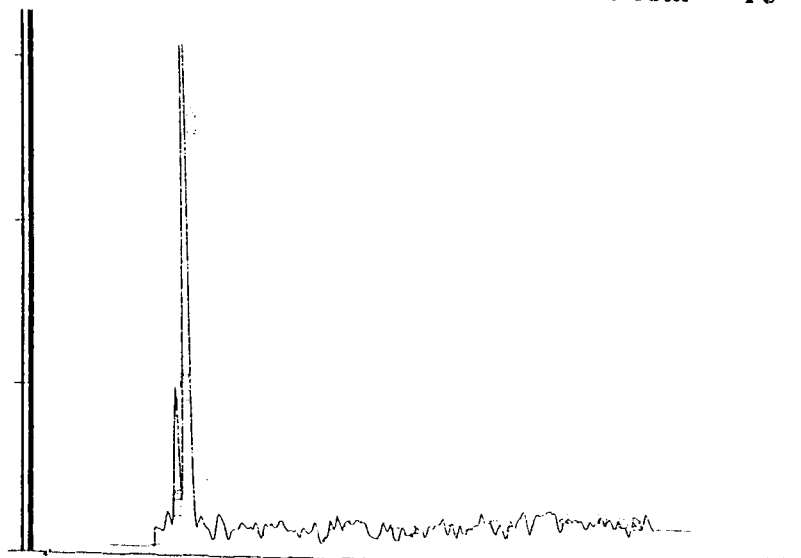
As porcentagens de TcO_2 presentes após o processo de marcação dos derivados DADT foram determinadas logo após ter sido efetuada a filtração em millipore de 0,8 A° e apresentaram valores entre 4 a 5 % independentemente dos intermediários analisados. Da mesma forma, ao determinarem-se as porcentagens de TcO_4^- observaram-se valores que variaram entre 3 a 4% e assim as purezas radioquímicas totalizaram os seguintes valores:

Produto	Pureza Radioquímica (%) após purificação
DADT-Piperidina Ramificada	$90,3 \pm 2,1$
DADT-Diisopropilamina	$92,0 \pm 1,3$
DADT-Diisobutilamina	$89,6 \pm 2,0$
DADT-Butambeno	$90,8 \pm 1,3$

Tabela 22

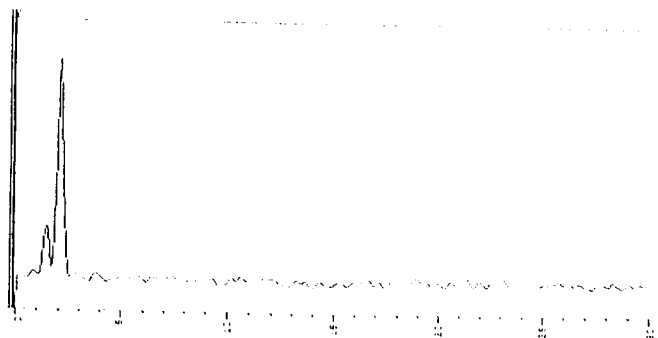
4.6. Perfis de Cromatografia Liquida de Alta Eficiência

4.6.1. Derivado DADT-PR Marcado com ^{99m}Tc



DADT-PR marcado com ^{99m}Tc
Fase móvel : tetraidrofurano : água (50:50)
Fase reversa, fluxo = 1,0 ml/min.

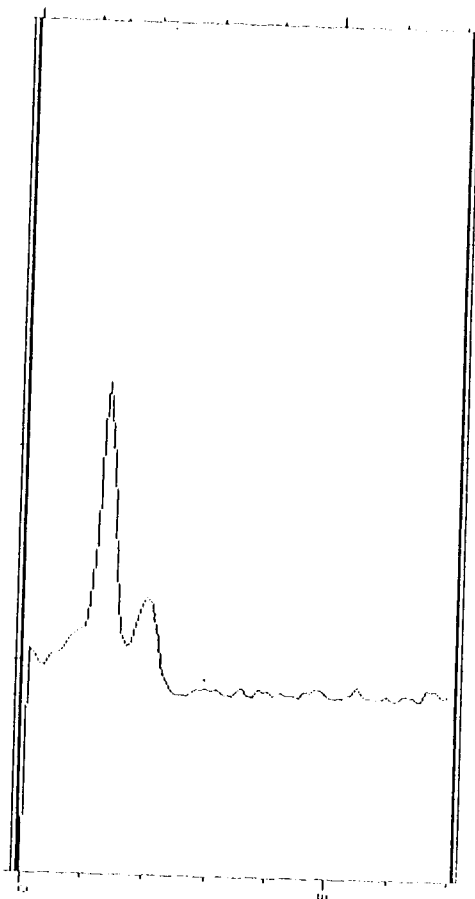
Figura 33 – Cromatograma CLAE traçado pelo detector de U.V.



DADT-PR marcado com ^{99m}Tc
Fase móvel : tetraidrofurano : água (50:50)
Fase reversa, fluxo = 1,0 ml/min.

Figura 34 – Cromatograma CLAE traçado pelo detector de radiação

4.6.2. Derivado DADT-DIPA Marcado com ^{99m}Tc



DADT- DIPA marcado com ^{99m}Tc
Fase Móvel : cloreto de metileno: etanol (30:70)
Fase reversa : fluxo = 2,10 ml/min.

Figura 35 - Perfil de CLAE, detector de radioatividade, escala em minutos

4.7. Distribuições Biológicas

4.7.1. Distribuição Biológica do Derivado DADT-Piperidínico Ramificado Marcado com ^{99m}Tc

DADT-PR ^{99m}Tc % DOSE / ÓRGÃO				
ÓRGÃO	2 MINUTOS	5 MINUTOS	15 MINUTOS	30 MINUTOS
Coração	1,22 ± 0,23	1,44 ± 0,26	0,63 ± 0,04	0,51 ± 0,11
Pulmão	5,92 ± 1,15	5,10 ± 0,73	4,58 ± 0,95	3,38 ± 0,65
Fígado	26,16 ± 3,46	33,00 ± 8,75	29,82 ± 6,29	27,79 ± 3,16
Cérebro total	0,36 ± 0,04	0,30 ± 0,17	0,28 ± 0,15	0,14 ± 0,02
Córtex	0,27 ± 0,02	0,24 ± 0,13	0,21 ± 0,11	0,18 ± 0,13
Cerebelo	0,09 ± 0,02	0,07 ± 0,04	0,07 ± 0,04	0,04 ± 0,01
Sangue Total	3,22 ± 0,25	2,57 ± 0,82	1,72 ± 0,44	1,38 ± 0,06

valores de média e desvio padrão para $n = 3$ experimentos

Tabela 23

DADT-PR ^{99m}Tc % DOSE / g				
ÓRGÃO	2MINUTOS	5 MINUTOS	15 MINUTOS	30 MINUTOS
Coração	1,36 ± 0,11	1,45 ± 0,15	0,73 ± 0,16	0,65 ± 0,08
Pulmão	4,02 ± 0,79	3,69 ± 0,07	2,90 ± 0,72	2,27 ± 0,29
Fígado	2,32 ± 0,22	3,12 ± 0,96	2,59 ± 0,69	2,48 ± 0,35
Cérebro total	0,25 ± 0,05	0,19 ± 0,09	0,17 ± 0,09	0,09 ± 0,00
Córtex	0,24 ± 0,04	0,18 ± 0,09	0,17 ± 0,09	0,09 ± 0,01
Cerebelo	0,29 ± 0,08	0,20 ± 0,09	0,20 ± 0,12	0,22 ± 0,16

valores de média e desvio padrão para $n = 3$ experimentos

Tabela 24

4.7.2. Distribuição Biológica do Derivado DADT-Diisopropilamínico Marcado com ^{99m}Tc

DADT-DIPA ^{99m}Tc				
% DOSE / ÓRGÃO				
ÓRGÃO	5 MINUTOS	15 MINUTOS	30 MINUTOS	60 MINUTOS
Coração	1,08 ± 0,67	0,52 ± 0,10	0,29 ± 0,08	0,24 ± 0,10
Pulmão	3,55 ± 1,25	2,36 ± 0,16	1,06 ± 0,30	0,84 ± 0,14
Fígado	31,22 ± 2,33	31,60 ± 4,58	27,12 ± 4,95	19,99 ± 7,11
Rins	3,19 ± 0,85	3,30 ± 0,20	1,91 ± 0,50	1,51 ± 0,14
Intestinos	25,56 ± 3,43	44,11 ± 12,53	52,08 ± 8,05	57,02 ± 7,11
Cérebro total	1,94 ± 0,70	0,92 ± 0,36	0,30 ± 0,08	0,25 ± 0,03
Córtex	1,39 ± 0,39	0,65 ± 0,23	0,22 ± 0,05	0,20 ± 0,02
Cerebelo	0,56 ± 0,31	0,28 ± 0,13	0,08 ± 0,04	0,05 ± 0,01
Estômago	3,95 ± 1,71	3,28 ± 0,65	2,16 ± 1,09	2,05 ± 0,45
Sangue	8,67 ± 1,89	7,99 ± 0,52	5,26 ± 1,82	5,65 ± 0,14

valores de média e desvio padrão para $n = 3$ experimentos

Tabela 25

DADT-DIPA ^{99m}Tc				
% DOSE / g				
ÓRGÃO	5 MINUTOS	15 MINUTOS	30 MINUTOS	60 MINUTOS
Coração	8,98 ± 5,86	5,19 ± 0,88	2,81 ± 0,78	2,17 ± 0,84
Pulmão	16,74 ± 10,75	12,68 ± 0,98	6,53 ± 2,32	3,77 ± 0,37
Fígado	24,31 ± 4,02	27,93 ± 3,73	25,78 ± 9,01	17,82 ± 1,90
Rins	10,67 ± 3,87	12,27 ± 2,75	7,12 ± 2,35	6,84 ± 2,61
Intestinos	7,36 ± 1,22	13,20 ± 2,36	18,53 ± 5,46	17,74 ± 2,97
Cérebro Total	5,16 ± 2,20	2,46 ± 0,95	0,85 ± 0,28	0,64 ± 0,07
Córtex	4,67 ± 1,69	2,44 ± 0,99	0,83 ± 0,27	0,63 ± 0,04
Cerebelo	8,58 ± 7,44	2,53 ± 0,88	0,90 ± 0,35	0,69 ± 0,27
Estômago	6,03 ± 2,24	6,72 ± 3,30	4,57 ± 0,87	3,18 ± 1,13

valores de média e desvio padrão para $n = 3$ experimentos

Tabela 26

4.7.3. Distribuição Biológica do Derivado DADT-Diisobutilamínico Marcado com ^{99m}Tc

DADT-DIB ^{99m}Tc				
% DOSE / ÓRGÃO				
ÓRGÃO	5 MINUTOS	15 MINUTOS	30 MINUTOS	60 MINUTOS
Coração	0,50 ± 0,11	0,25 ± 0,03	0,36 ± 0,31	0,11 ± 0,01
Pulmão	1,46 ± 0,32	1,06 ± 0,04	0,78 ± 0,13	0,50 ± 0,01
Fígado	22,08 ± 3,60	24,24 ± 1,64	20,62 ± 1,98	17,19 ± 3,66
Rins	2,38 ± 0,41	2,01 ± 0,43	1,79 ± 0,32	1,20 ± 0,26
Intestinos	12,92 ± 2,15	26,81 ± 6,63	37,83 ± 3,12	38,39 ± 3,64
Cérebro total	0,71 ± 0,04	0,30 ± 0,04	0,16 ± 0,04	0,11 ± 0,02
Córtex	0,51 ± 0,05	0,20 ± 0,04	0,11 ± 0,04	0,06 ± 0,01
Cerebelo	0,20 ± 0,04	0,09 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,01
Estômago	2,63 ± 0,01	5,47 ± 2,25	2,11 ± 0,66	2,33 ± 1,82
Sangue	6,15 ± 0,70	4,58 ± 0,67	3,22 ± 1,46	2,59 ± 1,17

valores de média e desvio padrão para $n = 3$ experimentos

Tabela 27

DADT-DIB ^{99m}Tc				
% DOSE / g				
ÓRGÃO	5 MINUTOS	15 MINUTOS	30 MINUTOS	60 MINUTOS
Coração	3,52 ± 0,05	1,76 ± 0,47	2,99 ± 2,68	0,78 ± 0,01
Pulmão	7,62 ± 1,24	3,85 ± 0,70	3,51 ± 0,88	1,88 ± 0,35
Fígado	12,60 ± 3,58	15,46 ± 1,32	17,22 ± 4,82	11,65 ± 5,09
Rins	6,10 ± 0,58	5,26 ± 0,52	5,91 ± 0,22	3,19 ± 0,91
Intestinos	4,01 ± 2,50	7,60 ± 3,00	37,83 ± 3,12	12,53 ± 2,68
Cérebro total	1,80 ± 0,11	0,71 ± 0,13	0,42 ± 0,08	0,27 ± 0,03
Córtex	1,75 ± 0,02	0,68 ± 0,14	0,39 ± 0,11	0,23 ± 0,05
Cerebelo	2,07 ± 0,61	0,79 ± 0,11	0,48 ± 0,10	0,36 ± 0,08
Estômago	4,73 ± 2,66	10,14 ± 4,64	3,60 ± 1,67	3,98 ± 3,50

valores de média e desvio padrão para $n = 3$ experimentos

Tabela 28

4.7.4. Distribuição Biológica do Derivado DADT-Butambeno Marcado com ^{99m}Tc

DADT-BUT ^{99m}Tc % DOSE / ÓRGÃO				
ÓRGÃO	5 MINUTOS	15 MINUTOS	30 MINUTOS	60 MINUTOS
Coração	0,60 ± 0,13	0,24 ± 0,05	0,24 ± 0,14	0,15 ± 0,02
Pulmão	3,05 ± 0,34	1,51 ± 0,07	0,91 ± 0,78	0,68 ± 0,07
Fígado	35,38 ± 0,86	27,81 ± 0,84	22,24 ± 1,58	18,32 ± 3,05
Rins	2,84 ± 0,30	1,71 ± 0,16	2,03 ± 0,67	0,96 ± 0,01
Intestinos	10,63 ± 2,84	19,66 ± 1,59	26,77 ± 3,39	27,65 ± 4,77
Cérebro total	0,29 ± 0,05	0,24 ± 0,03	0,18 ± 0,03	0,13 ± 0,06
Córtex	0,21 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,13 ± 0,03	0,10 ± 0,04
Cerebelo	0,08 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,11 ± 0,09
Estômago	1,00 ± 0,40	3,70 ± 2,22	1,93 ± 0,52	2,83 ± 1,12

valores de média e desvio padrão para $n = 3$ experimentos

Tabela 29

DADT-BUT marcado com ^{99m}Tc % DOSE / g				
ÓRGÃO	5 MINUTOS	15 MINUTOS	30 MINUTOS	60 MINUTOS
Coração	6,17 ± 1,90	2,54 ± 0,56	2,52 ± 1,28	1,25 ± 0,13
Pulmão	14,72 ± 1,64	5,19 ± 0,98	4,58 ± 0,18	2,29 ± 0,33
Fígado	25,89 ± 3,81	23,02 ± 4,59	18,89 ± 1,79	13,37 ± 2,40
Rins	11,13 ± 1,55	7,08 ± 1,49	6,03 ± 2,65	2,68 ± 0,01
Intestinos	3,36 ± 0,24	7,31 ± 0,62	8,80 ± 2,57	7,93 ± 0,79
Cérebro total	0,87 ± 0,18	0,63 ± 0,12	0,44 ± 0,03	0,30 ± 0,12
Córtex	0,82 ± 0,16	0,55 ± 0,06	0,44 ± 0,04	0,29 ± 0,11
Cerebelo	1,02 ± 0,27	0,98 ± 0,34	0,45 ± 0,03	0,34 ± 0,15
Estômago	1,89 ± 0,41	8,91 ± 6,00	4,55 ± 2,04	2,83 ± 1,12

valores de média e desvio padrão para $n = 3$ experimentos

Tabela 30

4.7.5. Clareamentos Sangüíneos dos Derivados DADT em Função do Tempo :

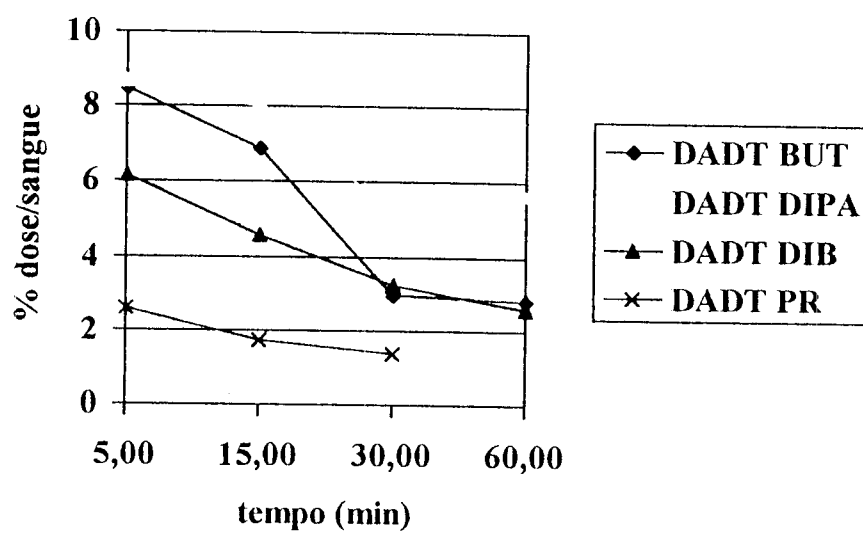


Gráfico 3

4.7.6. Clareamentos Cerebrais dos Derivados DADT em Função do Tempo:

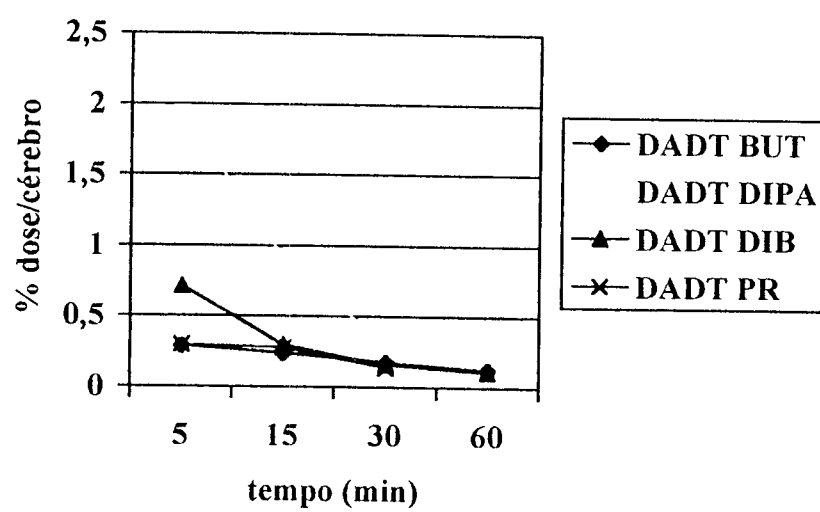


Gráfico 4

4.7.7. Clareamento Cerebral do Derivado DADT-BUT em Função do Tempo :

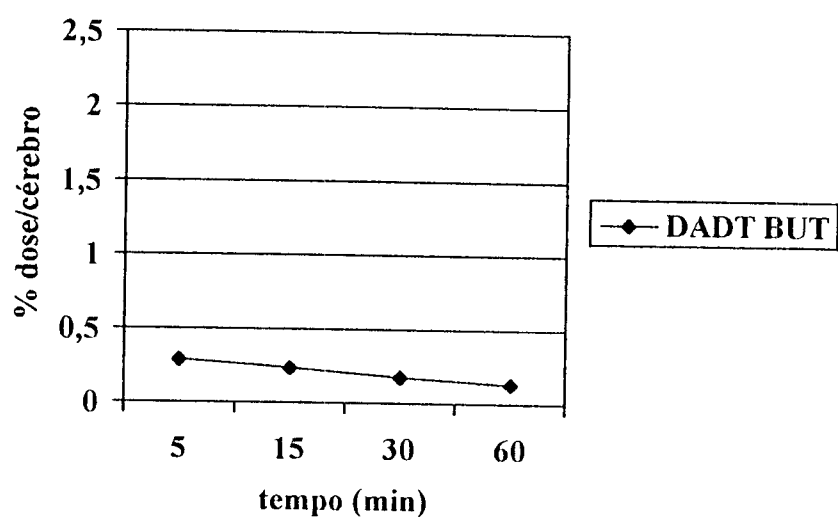


Gráfico 5

4.7.8. Clareamento Cerebral do Derivado DADT-DIPA em Função do Tempo:

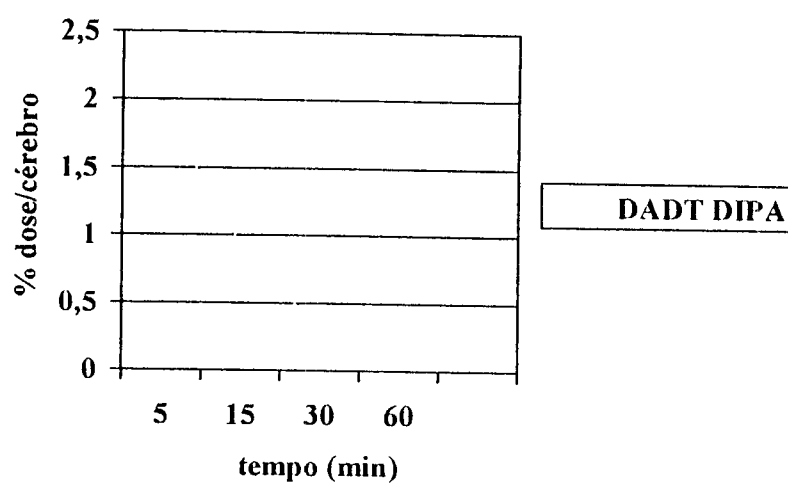


Gráfico 6

4.7.9. Clareamento Cerebral do Derivados DADT-DIB em Função do Tempo:

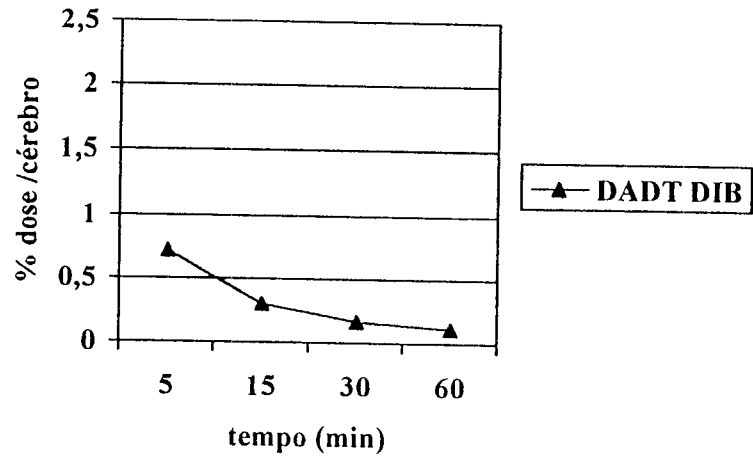


Gráfico 7

4.7.10. Clareamento Cerebral do Derivado DADT-PR em Função do Tempo:

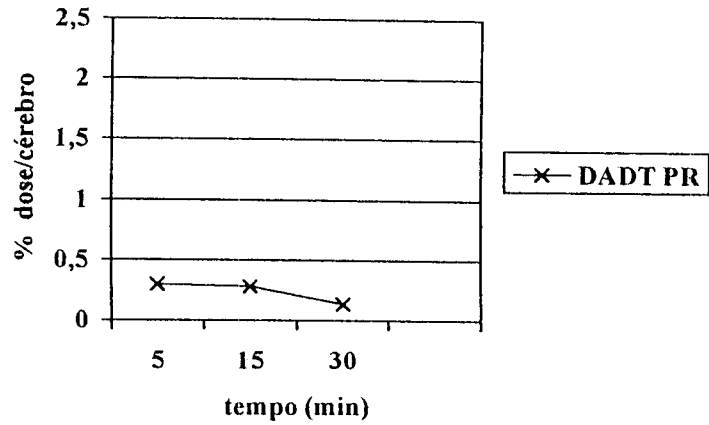


Gráfico 8

4.7.11. Mapas Cerebrais de Câmera de Cintilação Planar em Camundongos

Derivado DADT-DIPA Marcado com ^{99m}Tc

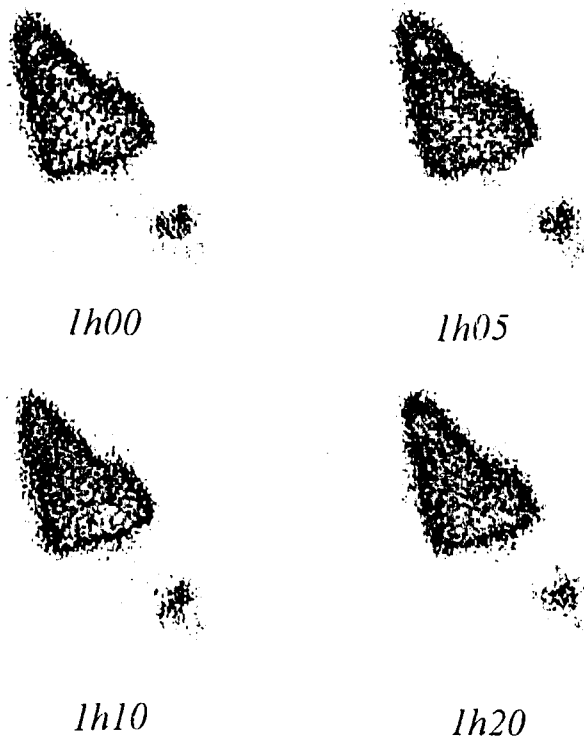


Figura 36 - Captações cerebrais do DADT-DIPA após 1 hora

Derivado DADT-DIB Marcado com ^{99m}Tc

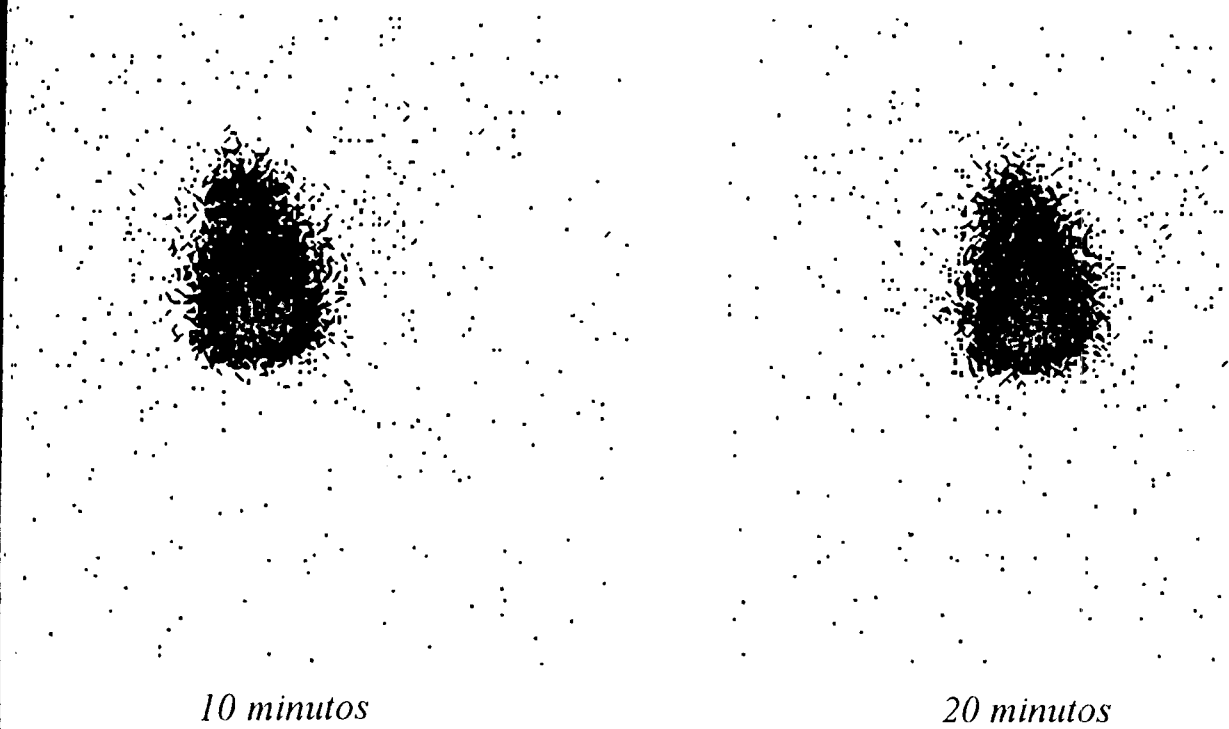


Figura 37 - Captações cerebrais do DADT-DIB após 10 minutos.

4.8. Tratamento Estatístico dos Dados de Distribuição Biológica

Após processarem-se os dados no programa MINITAB obteve-se comparações de médias duas a duas como segue :

Comparação de $^{99m}\text{Tc-DADT-DIPA}$ com $^{99m}\text{Tc-DADT-DIB}$				
Tempo : 5 minutos				
QMR = 0,105	t = 4,64405	p = 0,0072	Ho : rejeição	$\mu_{\text{DADT-DIPA}^*} \neq \mu_{\text{DADT-DIB}^*}$
Intervalos de Confiança (nível significância 95%) : não há interseção				
1,5751 < $\mu_{\text{DADT-DIPA}^*}$ < 2,3085				
0,3464 < $\mu_{\text{DADT-DIB}^*}$ < 1,0798				

* = produto marcado com ^{99m}Tc

Tabela 31

Comparação de $^{99m}\text{Tc-DADT-DIPA}$ com $^{99m}\text{Tc-DADT-PR}$				
Tempo : 5 minutos				
QMR = 0,109	t = 6,4029	p = 0,0018	Ho : rejeição	$\mu_{\text{DADT-DIPA}^*} \neq \mu_{\text{DADT-PR}^*}$
Intervalos de Confiança (nível significância 95%) : não há interseção				
1,5751 < $\mu_{\text{DADT-DIPA}^*}$ < 2,3085				
-0,0706 < $\mu_{\text{DADT-PR}^*}$ < 0,6766				

* = produto marcado com ^{99m}Tc

Tabela 32

Comparação de $^{99m}\text{Tc-DADT-DIPA}$ com $^{99m}\text{Tc-DADT-BUT}$				
Tempo : 5 minutos				
QMR = 0,105	t = 6,25115	p = 0,0020	Ho : rejeição	$\mu_{\text{DADT-DIPA}^*} \neq \mu_{\text{DADT-BUT}^*}$
Intervalos de Confiança (nível significância 95%) : não há interseção				
1,5751 < $\mu_{\text{DADT-DIPA}^*}$ < 2,3085				
-0,1300 < $\mu_{\text{DADT-BUT}^*}$ < 0,6034				

* = produto marcado com ^{99m}Tc

Tabela 33

Comparação dos Intervalos de Confiança para o Tempo de 5 Minutos Nível de Significância de 98%	
Intervalos de Confiança : não há interseções	
$1,3637 < \mu_{\text{DADT-DIPA}^*} < 2,5199$	
$0,1350 < \mu_{\text{DADT-DIB}^*} < 1,2912$, logo : $\mu_{\text{DADT-DIPA}^*} \neq \mu_{\text{DADT-DIB}^*}$	
$-0,286 < \mu_{\text{DADT-PR}^*} < 0,8920$, logo : $\mu_{\text{DADT-DIPA}^*} \neq \mu_{\text{DADT-PR}^*}$	
$-0,2902 < \mu_{\text{DADT-BUT}^*} < 0,8660$, logo : $\mu_{\text{DADT-DIPA}^*} \neq \mu_{\text{DADT-BUT}^*}$	

* = produto marcado com ^{99m}Tc

Tabela 34

Comparação dos Intervalos de Confiança para o Tempo de 15 Minutos Nível de Significância de 90%	
Intervalos de Confiança : não há interseções	
$0,6144 < \mu_{\text{DADT-DIPA}^*} < 1,2300$	
$-0,0085 < \mu_{\text{DADT-DIB}^*} < 0,6071$, logo : $\mu_{\text{DADT-DIPA}^*} \neq \mu_{\text{DADT-DIB}^*}$	
$-0,0293 < \mu_{\text{DADT-PR}^*} < 0,5863$, logo : $\mu_{\text{DADT-DIPA}^*} \neq \mu_{\text{DADT-PR}^*}$	
$-0,0711 < \mu_{\text{DADT-BUT}^*} < 0,5445$, logo : $\mu_{\text{DADT-DIPA}^*} \neq \mu_{\text{DADT-BUT}^*}$	

* = produto marcado com ^{99m}Tc

Tabela 35

Comparação dos Intervalos de Confiança para o Tempo de 15 Minutos Nível de Significância de 95%	
Intervalos de Confiança : há interseções	
$0,5555 < \mu_{\text{DADT-DIPA}^*} < 1,2889$	
$0,1896 < \mu_{\text{DADT-DIB}^*} < 0,6660$, logo : $\mu_{\text{DADT-DIPA}^*} = \mu_{\text{DADT-DIB}^*}$	
$-0,0951 < \mu_{\text{DADT-PR}^*} < 0,6521$, logo : $\mu_{\text{DADT-DIPA}^*} = \mu_{\text{DADT-PR}^*}$	
$-0,1300 < \mu_{\text{DADT-BUT}^*} < 0,6034$, logo : $\mu_{\text{DADT-DIPA}^*} = \mu_{\text{DADT-BUT}^*}$	

* = produto marcado com ^{99m}Tc

Tabela 36

Comparação dos Intervalos de Confiança para o Tempo de 30 Minutos Nível de Significância de 90%	
Intervalos de Confiança : há interseções	
$-0,0100 < \mu_{\text{DADT-DIPA}^*} < 0,6056$	
$-0,1499 < \mu_{\text{DADT-DIB}^*} < 0,4657$	logo : $\mu_{\text{DADT-DIPA}^*} = \mu_{\text{DADT-DIB}^*}$
$-0,1767 < \mu_{\text{DADT-PR}^*} < 0,4505$	logo : $\mu_{\text{DADT-DIPA}^*} = \mu_{\text{DADT-PR}^*}$
$-0,1316 < \mu_{\text{DADT-BUT}^*} < 0,4840$	logo : $\mu_{\text{DADT-DIPA}^*} = \mu_{\text{DADT-BUT}^*}$

* = produto marcado com ^{99m}Tc

Tabela 37

4.9. Ensaio de Atoxicidade

O ensaio de atoxicidade foi efetuado para o DADT-DIPA e não foi detectada nenhuma morte nem mudança notável de comportamento num grupo de 10 animais num período de observação de 24 horas .

5. DISCUSSÃO

Um dado curioso do processo sintético mostrou que certas sutilezas interferem no trabalho de pesquisa. Certos derivados DADT concebidos por Scheffel et al.¹¹⁴, sintetizados no Instituto Demokritos de Atenas a título experiência, foram também preparados no Brasil. Interessantemente, o mesmo processo efetuado com sucesso na Grécia não teve igual êxito no Brasil mesmo utilizando-se os mesmos reagentes, solventes e recursos. Após análise detalhada dos procedimentos chegou-se a intrigante conclusão que a umidade relativa do ar de São Paulo estava propiciando a deliquescência dos produtos justamente no último passo de síntese. Como alternativa para o impasse, construiu-se, no IPEN uma câmara anidra de acrílico e utilizou-se desumidificador de ar para manipular tais produtos.

Ao serem comparados, na tabela 1, página 98, os valores de coeficiente de partição teóricos, denominados CLOGP com os valores experimentais citados por Hui e outros⁵⁰, percebe-se que os valores teóricos são maiores devido a alguns fenômenos que não são computados pelo programa CLOGP. Primeiramente, os valores empíricos foram determinados para os produtos marcados com ^{99m}Tc que forma uma estrutura piramidal quando se complexa no ligante, porção DADT.

O programa CLOGP, por sua vez, não inclui no cálculo o elemento de transição tecnécio-99m quelado, formando complexo com o DADT. Além disto, existem fenômenos que ocorrem na prática e que contribuem para a existência do desvio entre os valores calculados e os observados, a saber :

- As conformações adotadas pela molécula podem modificar o tipo de solvatação que a mesma irá experimentar⁸⁰ alterando a propriedade aditiva constitutiva do coeficiente de partição;
- Algumas moléculas são capazes de formar ponte de hidrogênio intramolecular ;
- As diferenças existentes entre os valores de pka dos compostos e o dos adotados pelo programa.

Entretanto, a inclusão do $\Delta \log P$ no cálculo do coeficiente de partição teórico ou presumido é utilizada em modelagem molecular como um método racional de criação de novos derivados que se aproximem do valor otimizado de 3,44 calculado por Hui et al.⁵⁰, página 97. O $\Delta \log P$ é um valor válido quando elege-se uma nova estrutura química que possua um átomo de nitrogênio apresentando um pka que se aproxime ao pka do nitrogênio do produto já sintetizado que originou o $\Delta \log P$. Dessa forma as diferenças, existentes entre os valores de coeficiente de partição teóricos e os práticos fica otimizada uma vez que este $\Delta \log P$ reflete justamente tais diferenças. Assim, este $\Delta \log P$ é subtraído do valor de CLOGP obtendo-se um número que simula o valor experimental de log P.

Assim, a modelagem dos novos derivados DADT foi então efetuada de tal forma que o novo candidato apresentasse nos cálculos, um valor simulado de log P experimental que se aproximasse do valor ideal de 3,44. O derivado DADT-DIPA, por exemplo, que foi concebido principalmente levando-se em consideração o descritor molecular “coeficiente de partição”,

apresentou realmente um log P experimental simulado de 3,89 bem próximo do valor ideal de 3,44.

Considerando-se os valores de polarizabilidade efetiva α_d , constantes na tabela 5, página 142, nota-se que os derivados DADT sintetizados no presente trabalho apresentaram valores de α_d numericamente superiores do que os derivados concebidos por Scheffel et al.¹¹⁴ calculados pela equação 3, página 119. Isto ocorre devido ao fato de terem sido idealizados racionalmente para possuírem seu átomo de nitrogênio mais ramificado nas posições α e β , o que resulta em contribuições numéricas maiores de π e, por conseguinte valores maiores de α_d .

Fazendo-se alusão à metodologia sintética pode-se afirmar que tratou-se de processos multi-etapas em que os intermediários sintéticos e produtos finais foram purificados através utilização de solventes para remoção de impurezas, por concentração de solventes e por recristalizações. As purificações dos produtos de síntese, efetuadas em cromatografia de coluna utilizando sílica-gel e corrente de gás nitrogênio foram bem sucedidas a ponto de se isolar os produtos purificados com grau de pureza espectroscópica.

Um importante tento do trabalho consistiu no desenvolvimento de uma metodologia simples e eficaz quantitativamente de separação dos produtos de síntese formados na quarta etapa da rota sintética, intermediários **IV**, **IV'**, **IV''**. Nesta metodologia, descrita na página 88 (ver esquema 9), o intermediário **IV'** foi isolado por filtração a um vácuo de

6 mmHg, o que propiciou rotas sintéticas alternativas para sínteses diferenciadas de produtos finais, como o caso do derivado DADT-BUT.

As análises espectroscópicas de infravermelho efetuadas nos intermediários sintéticos e produtos finais evidenciaram a presença dos grupos funcionais pertencentes às suas estruturas. As únicas bandas que não apareceram pronunciadas nos espectros de infravermelho foram as correspondentes aos grupos SH do derivado DADT-BUT. Estas bandas normalmente são fracas e podem, de fato, não produzir picos proeminentes apesar de estarem presentes na estrutura do composto.

Entretanto, a presença destes dois grupos sulfidríla foram demonstradas no espectro de ressonância magnética nuclear através dos picos dos hidrogênios "l" e "m" da tabela 20, página 159.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^{13}C e ^1H dos intermediários e produtos finais analisados demonstraram-se consistentes com suas estruturas declaradas ou propostas. Os espectros de ^{13}C do intermediário sintético **IV** foram especialmente elaborados para comprovar o fato de que este composto constitui-se de estrutura bicíclica. Para tanto efetuou-se o espectro de ^{13}C do composto **IV** e, em seguida, utilizou-se a técnica de DEPT nesta amostra para inverter os picos dos carbonos metilênicos. Assim, no espectro constante na página 153, os picos "a", "h", "k" apareceram invertidos no espectro com DEPT, na página 154. Este comportamento do composto **IV** quando submetido ao DEPT prova que este é de fato bicíclico pois, se o mesmo fosse monocíclico, como no caso do intermediário **IV'**, ele possuiria 4 carbonos metilênicos, o que resultaria em 4 inversões de pico. Este

comportamento de estrutura bicíclica submetida ao DEPT é corroborado também pelo intermediário V do derivado DADT-DIB, página 158 em que aparecem 3 inversões de pico no espectro com DEPT.

As análises elementares descritas no item 4.5. , página 160, mostraram-se consistentes com as fórmulas mínimas propostas dos compostos analisados.

As análises radioquímicas dos derivados DADT marcados com ^{99m}Tc e purificados por extração com solventes, tabela 22, página 160, deram valores de pureza radioquímica próximos de 90% que se prestaram aos estudos de distribuição biológica, mas que devem ser posteriormente otimizados principalmente para os dois derivados ^{99m}Tc -DADT-DIPA e ^{99m}Tc - DADT-DIB devido ao fato destes serem mais promissores como radiofármacos perfusórios cerebrais.

Para verificar se os derivados marcados preparados no Brasil realmente formaram os epímeros syn e anti (figura 6, página 54), procedeu-se às separações por cromatografia de alta eficiência (CLAE) dos derivados ^{99m}Tc -DADT-PR (figuras 33 e 34, página 161) e ^{99m}Tc -DADT-DIPA (figura 35,página 162) e evidenciaram-se os dois picos correspondentes aos epímeros "A" e "B" para ambos os quelatos de ^{99m}Tc .

Os dados provenientes da distribuições biológicas dos produtos marcados mostraram clareamentos cerebrais diferentes para os quatro derivados DADT. Analisando-se na página 167 o clareamento dos derivados comparativamente à captação inicial de 5 minutos, nota-

se que os derivados ^{99m}Tc -DADT-DIPA e ^{99m}Tc -DADT-DIB possuem um clareamento mais intenso. Curiosamente, o ^{99m}Tc -DADT-BUT, apesar de apresentar baixa captação cerebral apresenta um interessante comportamento que sugere ser o de um pró-fármaco devido ao fato de sua captação não diminuir muito com o passar do tempo. Em realidade, para ensaiar melhor esta característica de pró-fármaco, poder-se-ia conceber um radiofármaco possuindo a função éster que apresentasse um coeficiente de partição mais próximo de 3,44.

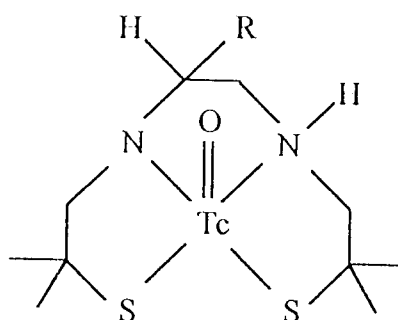
Ao se efetuar a análise estatística dos dados comprovou-se que a média da captação do ^{99m}Tc -DADT-DIPA, em % dose/cérebro para o tempo de 5 minutos, tabela 34, página 175, é maior do que a dos outros três derivados DADT e mostrou-se diferente mesmo a um nível de significância de 99,8%. A análise de variância de Bonferroni efetuada a um nível de significância de 95% demonstrou, tabela 31, página 174, que a probabilidade da média do ^{99m}Tc -DADT-DIPA ser igual à do ^{99m}Tc -DADT-DIB é de 0,72% e para os outros derivados (DADT-PR e DADT-DIPA) esta probabilidade é ainda menor, tabelas 31 e 32.

Estudando-se os intervalos de confiança gerados a partir dos valores de captação média (%dose/cérebro) para o tempo de 15 minutos, tabelas 35 e 36, página 175, notou-se que a captação do DADT-DIPA é significativamente maior do que a dos outros três derivados DADT apenas se considerarmos um nível de significância de 90% onde a média do DADT-DIPA é considerada diferente. Entretanto, a um nível de significância de 95% as médias não podem ser consideradas diferentes, onde a captação do DADT-DIPA é considerada igual à dos outros derivados DADT.

A captação (%dose/orgão) especialmente baixa do ^{99m}Tc -DADT-PR, tabela 23, página 163, teve explicação em um fenômeno que foi explanado recentemente por Nowotnik³⁰³, a partir da proposição de Stein¹²³ de que a constante de permeabilidade de um composto lipossolúvel penetrando numa membrana celular por difusão passiva é inversamente relacionada com o número de pontes de hidrogênio intensas em solução aquosa. Notavelmente, o derivado DADT-PR possui um nitrogênio a mais propiciando a formação mais intensa de ponte de hidrogênio o que sugere depreciar sua captação cerebral. Stein¹²³ sugeriu que para adentrar numa membrana lipídica as ligações de hidrogênio entre o substrato e as moléculas de água devem ser quebradas ou desfeitas.

Segundo Nowotnik⁹⁷, este tipo de interação implica em processos nos quais o substrato possui um tempo limitado de interação com uma membrana biológica que, por conseguinte, pode ser a barreira hematoencefálica. Utilizando o método de atribuições, Pardridge et al.¹⁰³ estudaram a interação existente entre a permeabilidade de compostos pela barreira hematoencefálica com relação às pontes de hidrogênio para estimar o o número dessas ligações de hidrogênio e Young et al.¹⁴⁰ mediram a ponte de hidrogênio intramolecular por comparação dos coeficientes de partição dos sistemas octanol-água. Como resultado os autores puderam confirmar que a permeabilidade da barreira hematoencefálica realmente relacionava-se inversamente às pontes de hidrogênio. Nowotnik ainda chama atenção para o fato de ainda não haver estudos que tratam da interrelação entre as ligações de hidrogênio e a captação cerebral em termos de radiofármacos de tecnécio mas existem dados na literatura onde percebe-se os efeitos provocados pelas pontes de hidrogênio na captação cerebral de complexos de ^{99m}Tc . Assim, utilizando-se dados de Kung et al.⁷². Nowotnik et al. Cita o

produto 1, da tabela 39 abaixo, possuindo um substituinte com hidroxila livre que apresenta um coeficiente de partição que permite seu transporte pela barreira hematoencefálica, mas que demonstrou possuir captação cerebral substancialmente menor se comparada ao composto 2, que é um análogo possuindo amina primária.



Composto	R	% dose órgão (2 min. após injeção)	Referência Bibliográfica
1	CH ₂ OH	0,4	72
2	CH ₂ NH ₂	1,3	72
3		3,8	70
4		0,2	70

Tabela 38 - Captações cerebrais em animais dos derivados DADT marcados com ^{99m}Tc

O análogo que possui amina terciária, composto 3, possui captação cerebral ainda maior do que o composto 2. Como a força de ligação das pontes de hidrogênio geralmente

segue a seqüência $\text{OH} > \text{NH}_2 > \text{NR}_3$, a captação cerebral nesta série parece ser inversamente proporcional à força das pontes de hidrogênio.

Curiosamente, quando o análogo possuir um nitrogênio adicional, como no caso do composto 4, existe mais um ponto de formação de ponte de hidrogênio contribuindo fortemente para depreciar sua captação cerebral.

6. CONCLUSÕES

Os intermediários e produtos finais envolvidos nas seis etapas de rota sintética foram espectroscopicamente analisados e suas estruturas mostraram-se consistentes com os espectros de infravermelho, ressonância magnética nuclear além de serem confirmados por análise elementar.

Pode-se afirmar que a metodologia de síntese de derivados DADT foi adaptada para o Brasil para fins de pesquisa. Mas este tipo de processo sintético multi-etapas deve ser otimizado para se tornar mais simples e rápido a ponto de facilitar a produção rotineira dos compostos químicos.

Analisando-se as porcentagens de captação cerebral (%dose/órgão, tabela 25, página 164) teve-se a grata surpresa de confirmar a captação muito boa do ^{99m}Tc -DADT-DIPA de $1,94\% \pm 0,70$ para 5 minutos. Esse valor está entre os melhores valores que a equipe de Scheffel¹⁵ conseguiu para o composto **1 A** criado por Scheffel et al.¹¹⁴ (tabela 1, página 98) e se levar-se em consideração o fato de que a captação do ^{99m}Tc -DATD-DIPA foi obtida com a mistura dos isômeros **A** e **B**, pode-se dizer que ele teoricamente possui uma captação cerebral melhor do que a do composto **1**.

Outra característica notável deste radiofármaco está em sua afinidade pelo tecido cerebral, tabela 26, página 164, que mostra valores percentuais de captação dose/g para cérebro comparáveis com outros órgãos como intestinos, estômago e coração para o tempo de 5 minutos.

Ao analisarem-se as captações dos radiofármacos criados expressos em %dose/g, vê-se claramente que o derivado ^{99m}Tc -DIPA possui, após 1 hora, uma captação de $0,64 \pm 0,07$ (tabela 26, página 164) ainda superior ao valor de $0,25 \pm 0,05$ do derivado ^{99m}Tc -piperidínico para os 2 minutos (tabela 24, página 163).

Apesar do DADT-DIPA possuir um clareamento cerebral intenso, ele pode ser ensaiado como potencial agente perfusório cerebral porque mesmo após terem decorridos trinta minutos após a administração, sua captação ainda foi de $0,30\% \pm 0,08$, que pode ser considerado valor relevante pois Kung et al.⁶⁸, em seu trabalho com radiofármacos DADT para uso em imagens cerebrais, chamam atenção para o fato de que uma captação cerebral de 0,5% já ser suficiente para que o radiofármaco possa ser utilizado como agente perfusório em SPET.

Dos três derivados DADT marcados com ^{99m}Tc concebidos pela técnica de QSAR, a saber : DADT-diisopropilamínico (DADT-DIPA), DADT-piperidina ramificada (DADT-PR), e DADT - diisobutilamínico (DADT - DIB), o derivado ^{99m}Tc -DADT-DIPA apresentou maior captação cerebral, em termos de valores absolutos expressos em % dose/órgão, por possuir coeficiente de partição calculado mais próximo do ideal além de alta polarizabilidade. O ^{99m}Tc -DADT-DIPA provou que o coeficiente de partição é o descritor molecular que mais influencia na otimização da captação cerebral dos derivados pois o ^{99m}Tc - ^{99m}Tc -DADT-DIB, que possui maior polarizabilidade efetiva e coeficiente de partição experimental simulado que se distancia do ideal ,mostrou possuir captação cerebral expressa

em % dose/órgão, significativamente menor. O derivado DIPA marcado com ^{99m}Tc é potencialmente um radiofármaco perfusório cerebral a ser pesquisado mais particularmente. Analisando-se o mapa da câmara de cintilação planar, figura 36, nota-se que mesmo após a, a captação cerebral do ^{99m}Tc -DADT-DIPA ainda é evidente após ter decorrido um intervalo de 1 hora após sua injeção. O ^{99m}Tc -DADT-DIB, efetuado para os primeiros minutos após a administração revela um mapa que mostra uma captação menos intensa se comparado com o mapa do derivado ^{99m}Tc -DADT-DIPA.

O ^{99m}Tc -DADT-BUT, desenvolvido pela técnica de QSPR apesar de apresentar uma baixa captação cerebral, expressa em % dose/órgão, demonstrou possuir atribuições que sugerem comportamento de pró-fármaco, pois mesmo após terem decorridos 30 minutos de sua administração, o radiofármaco ainda possuía 62% da captação cerebral referente à do tempo de 5 minutos. Como o ^{99m}Tc -DADT-BUT provou possuir um clareamento cerebral pequeno com relação à captação inicial, ele abre a possibilidade de se tornar um bom agente perfusório cerebral uma vez que sua estrutura seja modificada de forma a assumir valores de coeficiente de partição próximos ao ideal.

Referências Bibliográficas

- 1- ABBAS, H.G.; JAVED, M.; SAEEDA, A.; KHAN, M.S. Development of a novel ^{99m}Tc - labelled brain perfusion agent. In: MODERN TRENDS IN RADIOPHARMACEUTICALS, 30 March – 3 April, 1998, Lisbon. *Proceedings...* Vienna: IAEA, 1998. p. 243-248.
- 2- ANDERSEN, A.R.; FRIBERG, H.I.; SCHIMIDT, J.F. HASSELBACH, S.G. Quantitative measurements of cerebral blood flow using SPECT and [^{99m}Tc]-d,l-HMPAO compared to ^{133}Xe . *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, v.8, p.569-581, 1988.
- 3- ASOCIACION LATINOAMERICANA DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA Y MEDICINA NUCLEAR (ALASBIMN). MITA, A.E.A.; ROBLES, A.M.(Eds.). *Control de Calidad de Radiofármacos*. Montevideo: Comite de Radiofarmácia de ALASBIMN, p.11, 1986.
- 4- AUE, D.H., BOWERS, M.T. In : BOWERS, M.T. (Ed.). *Gas Phase Ion Chemistry*. New York, N.Y. : Academic , 1979. v.2, p.1.
- 5- BAIDOO, K.E.; LEVER, S.Z.; SCHEFFEL , U. Bifunctional chelator for facile preparation of technetium complexes. *Bioconj. Chem.* , v.5, p.114-118, 1994.
- 6- BAIDOO, K.E.; LEVER, S.Z. Synthesis of a diamedithiol bifunctional chelating agent for incorporation of ^{99m}Tc into biomolecules. *Bioconj. Chem.* , v.1, p.132-137, 1990.
- 7- BAIDOO, K.E.; SCHEFFEL, U.; LEVER, S.Z. ^{99m}Tc -labeling of proteins : initial evaluation of a novel diaminedithiol bifunctional chelating agent. *Cancer Res.*, v.50, suppl., p.795-803, 1990.
- 8- BARON, S.A. ; JACOBS, L.; KINKEL, W. Changes in size of normal lateral ventricles during aging determined by computer tomography. *Neurology* , v.26, n.11, p.1011-1015, 1976.

- 9- BARON, S.C. "Ischemic stroke studied by O-15 labeled compounds : misery perfusion and luxury perfusion", clinical efficacy of positron emission tomography. In : HEISS, W.-D.; PAWLIK, G.; HERHOLZ, K.; WIENHARD, K. (Eds.). Nijhoff, Dordrecht, 1987, p.15-23 apud UEMURA, K. Brain studies using SPECT AND PET. In: TOMOGRAPHY IN NUCLEAR MEDICINE, August 21-25, 1995, Vienna. *Proceedings ...* Vienna: IAEA, 1996, p. 233-257.
- 10- BARRET-CONNOR, E.; KHAW, K.T. Diabetes mellitus : an independent risk factor for stroke? *Am. J. Epidemiol.* , v.128 , p.116-123, 1988.
- 11- BENNET,D.A.; WILSON, R.S.; GILLY,D.W.; FOX, J.H. Clinical diagnosis of Binswanger's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* , v.52, p.961-965, 1990.
- 12- BODOR, N., FARAG, H. Improved delivery throught biological membranes. A redox chemical drug-delivery system and its use for brain specific delivery of phenylethylamine . *J. Med. Chem.*, v.26, p.313-318, 1983.
- 13- BOK, B.D.; BICE, A.N.; CLAUSEN, M.; WONG, D.F.; WAGNER Jr, H.N. Artifacts in camera based single photon emission tomography due to time activity variation. *Eur. J. Nucl. Med.*, v.13, p. 439-442, 1987 apud NOWOTNIK, D.P. Technetium-based brain perfusion agents; In: NUNN, A.D. (Ed.) *Radiopharmaceuticals*. New York, N.Y. : Marcel Dekker , 1992. p.37-95.
- 14- BORDWELL, F.G.; DRUCKER, G.E.; Mc COLLUM. G.J. Stabilization of Carbanions by polarization of alkyl groups on non adjacent atoms. *J. Org. Chem.*, v.47, p.2504-2510, 1982.
- 15- CATAFAU, A. M.; LOMEÑA, F.J.; PAVIA, J.; PARELLADA, E.; BERNARDO, M., SETOAIN, J.; TOLOSA, E. Regional cerebral blood flow pattern in normal young and aged volunteers : a ^{99m}Tc-HMPAO SPET study. *Eur. J. Nucl. Med.* , v. 23, p.1329-1373, 1996.
- 16- CHAPMAN, J.D. Hypoxic sensitisers-implication for radiation therapy. *N. Engl. J. Med.*,v. 301, p. 1429-1432, 1979.

- 17- CHIOTELLIS, E.; VARVARIGOU, A.D.; MAINA, T.H.; STASSINOPOULOU, C.I. Comparative evaluation of ^{99m}Tc -labeled aminothiols as possible brain perfusion imaging agents. *Nucl. Med. Biol.*, v.15, n.2, p.215-223, 1988.
- 18- CHON, E.; EDSAL, J. *Proteins, amino acids and peptides*, New York, N.Y. : Reinhold, 1943.
- 19- CRONE, C. The permeability of capillaries in various organs as determined by use of indicator diffusion method. *Acta Physiol. Scand.*, v.58, p.292-305, 1963.
- 20- DANNALS, R.F., BURNS, H.D., MARZILLI, L.G., T.E. DANNALS, KRAMER, A.V., WAGNER. The use of technetium-99 and technetium-99m in the development and characterization of new radiotracers for diagnostic nuclear medicine. In: LAMBRECH, M., MORCOS, N. (Eds.). *Application of nuclear and radiochemistry*. New York: Pergamon, 1982. p. 127-138.
- 21- DEL ROSARIO, R.B.; JUNG, Y.W.; BAIDOO, K.E.; LEVER, S.Z.; WIELAND, D.M. Synthesis and evaluation of a ^{99m}Tc - DADT - benzovezamicol - a potential marker for cholinergic neurons. *Nucl. Med. Biol.*, v.21, p.197-203, 1994.
- 22- DEL SER, T.; BERMEJO, F.; PORTERA, A.; ARREDONDO, I.M., BOURAS, C. CONSTANTINIDIS, J. Vascular dementia. A clinicopathological study. *J. Neurol. Sci.*, v.96, p.1-17, 1990.
- 23- DERUTY, R.; PATET, J.D.; MOTTOLESE, C.; HONORATO, D. Outcome of ruptured intra-cranial aneurism treated by a deferred operation. *Neurol. Res.*, v.8, p.183-188, 1986.
- 24- DEUSTCH, E.; HEINEMAN, W.R.; ZODDA, J.P.; WILLIAMS, C.C. Preparation of no carrier added ^{99m}Tc complexes : Determination of the total technetium content of $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ generator eluents. *Int. J. Appl. Rad. Isot.*, v.33, p. 843-848, 1982.
- 25- DEVOUS Sr, M.D.; PAYNE, J.K.; LOWE, J.L.; LEROY, R.F. Comparison of ^{99m}Tc -ECD to ^{133}Xe SPECT in normal controls and in patients with mild-to-moderate regional cerebral blood flow abnormalities. *J. Nucl. Med.*, v.34, p.754-1761, 1993.1

- 26- DI ROCCO, R.J.; KUCZYNSKI, B.L., PIRRO, J.P.; BAUER, A.; LINDER, K.E.; RAMALINGAM, K.; CYR, J.E.; CHAN, Y.W.; RAJU, N.; NARRA, R.K.; NOWOTNIK, D.P.; NUNN, A.D. ; Imaging ischemic tissue at risk of infarction during stroke. *J.Cereb. Blood Flow Metab.*, v.13, n.5, p.755-762, 1993.
- 27- DI ROCCO, R.J.; SILVA, D.A.; KUCZYNSKI, B.L.; BAUER, A.; LINDER, K.E.; RAMALINGAN, K. CYR, J.E.; CHAN, Y.W.; RAJU, N., NARRA, R.K.; NOWOTNIK, D.P.; NUNN, A.D.; ECKELMAN, W.C. The single-pass cerebral extraction and capillary permeability-surface area product of several putative cerebral blood flow imaging agents. *J. Nucl. Med.*, v.34, p.641-648, 1993.
- 28- DIZIO, J.P.; FIASCHI, R.; DAVISON, T et al. Progestin-Rhenium complexes : metal-labeled steroids with high receptor binding affinity, potential receptor-direct agents for diagnostic imaging therapy. *Bioconj. Chem.*, v.2, p. 353-366, 1991 apud VOLKERT, W.A. Ligand systems useful in designing high specific activity ^{99m}Tc or $^{186/188}\text{Re}$ radiopharmaceuticals. In: NICOLINI, M.; BANDOLI, G.; MAZZI, U. (Eds.). *Technetium and rhenium in chemistry and nuclear medicine*, Padova, Cortina Intenacional, Verona, 1994, p.17-32.
- 29- DUNCAN, R. Epilepsy, cerebral blood flow, and cerebral metabolic rate. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.*, v.4, p.105-121, 1992.
- 30- ECKELMAN, W.C.; RICHARD, P. Instant ^{99m}Tc -DTPA. *J. Nucl. Med.*, v.11, p.761, 1970.
- 31- EFANGE, S.M.N.; KUNG, H.F.; BILLINGS, J.J.; BLAU, M. Synthesis and biodistribution of ^{99m}Tc -labeled piperidinyl bis (aminoethanethiol) complexes: Potential brain perfusion imaging agents for single photon emission computed tomography. *J. Med. Chem.*, v.31, p.1043-1047, 1988.
- 32- ENGEL, J.; HENRY, T.R.; RISINGER, M.W.; MAZZIOTTA, J.C.; SUTHERLLING, W.W.; LEVESQUE, M.F.; PHELPS, M.E. Presurgical evaluation for partial epilepsy: Relative contributions of chronic depth electrode recordings versus FDG-PET and scalp-sphenoidal ictal EEG. *Neurology*, v.40, n.11, p.1670-1677, 1990.
- 33- EUROPEAN PHARMACOPOEIA .2ed. Strasburg : Pharmeuropa Quarterly Forum Publication, 1997, p.81.

- 34- FERNANDES, R.E.; KISHORE, P.R.S. White matter disease of the brain, In: SEUNGHO, H.L.; KRIHSNA, C.V.G. (Eds.). *Cranial Computed Tomography*, New York, N.Y.: Mc Graw-Hill, 1983, p.659-679.
- 35- FOLSTEIN, M.F.; FOLSTEIN, S.E.; Mc-HUGH, P.R. "Mini-mental state" : a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J. Psychiatr. Res.*, v. 12, p.189-198, 1975.
- 36- FRIIS, G.J.; BUNDGAARD, H.; Design and application of prodrugs. In : KROGSGAARD, LARSEN, D.; LILJEFORS, T.; MADSEN, U. (Eds.). *A textbook of drug design and development. 2ed.* Copenhagen, Denmark : Harwood, 1996, p.351-385.
- 37- GALASSI, R.; MONEALE, A.; MONTAGNA, P. Binswanger's disease and normal pressure hydrocephalus: clinical and neuropsychological comparison. *Arch. Neurol.* v.48, p.1156-1159, 1991.
- 38- GASTEIGER, J.; HUTCHINGS, M.G. Quantification of effective polarizability. Applications to studies of X-ray photoelectron spectroscopy and alkylamine Protonation. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, p.559, 1984.
- 39- GLYDENSTED, C. KOSTELJANETZ, M. Measurements of the normal ventricular system with computer tomography. *Neuroradiology*, v.10, p.205-211, 1976.
- 40- GONÇALVES, M.M.; CARVALHO, O.G.; MURAMOTO, E.; ZERAIB, A.B.; ALMEIDA, M.A.T.M. Bioavailability optimization of brain perfusion radiopharmaceuticals using the prodrug concept .In: NICOLINI, M.; BANDOLI, G.; MAZZI, U. (Eds.). *Technetium and rhenium in chemistry and nuclear medicine 5*, Padova, 1998, em gráfica.
- 41- GROSHAR, D.; Mc EWAN, A.J.B.; PARLIAMENT, M.B.; URTASUN, R-C ; GOLDBERG, L.E.; HOSKINSON, M.; MERCER, J-R ; MANNAN, R.H.; WIEBE, L.I.; CHAPMAN, J.D. Imaging tumor hypoxia and tumor perfusion . *J. Nucl. Med.*, v.34, p.885-888, 1993.
- 42- HACHINSKI, V.C.; POTTER, P.; MERSKEY, H. Leuko-araioses. *Arch. Neurol.*, v.44, p. 21-23, 1987.

- 43- HAINSWORTH, H.R. Syncope and fainting .In: BANNISTER, R.; MATHIAS, C. J. (Eds.). *Autonomic failure. A textbook of clinical disorders of the autonomic nervous system.* . Oxford.: Oxford University, 1992. p. 761-781.
- 44- HARPER, P.V.; LATHROP, K.A.; JAMINEZ, F.; FINK, R; GOTTSCHALK, A. Technetium-99m as a scanning agent. *Radiology*, v.85, p.101, 1965.
- 45- HAYASHIDA, K.; NISHIDEDA, Y.; HIROSE, Y.; ISHIDA, Y.; NISHIMURA, T. Maladaptation of vascular response in frontal area of patients with ortostatic hypotension. *J. Nucl. Med.* , v.37, p.1-4, 1996.
- 46- HEIN, E.R.; DRAYER, B.P.; HAENGGELI,C.A; PAINTER, M.J.; CRUMRINE, P.C. Computed tomography in white matter disease. *Radiology*, v.130, p.371-378, 1979.
- 47- HEISS, W.-D.; PODREKA, I. Role of PET and SPECT in the assessment of ischemic cerebrovascular disease. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.*, v.5, p.235-263, 1993.
- 48- HERSCOVITCH, P. Cerebral Blood Flow, volume, and oxygen metabolism. In: WAGNER Jr, H.N.; SZABO, Z.; BUCHAMAN, J.W. (Eds.). *Principles of nuclear medicine*. Philadelphia, PA. : W.B. Saunders, 1995, p.510.
- 49- HOLMAN, B.L.;HILL, T.C.Functional imaging of the brain with SPECT. *Appl. Radiol.* p.21-27, 1984.
- 50- HUI, M.B.V.; CHEN, D.C.P.; LIEN, E.J. Analysis of the quantitative structure activity relationship of technetium - 99m - labeled diaminedithiol (DADT) and propileneamineoxime (PAO) brain flow analogues. *Appl. Radiat. Isotopes.*, v.42, n.6, p. 503-508, 1991.
- 51- IIDA, H.; ITOH, H.; BLOOMFIELD, P.M.; MUNAKA, M.; HIGANO,S.; MURAMAKY, M.; INUGAMI, A.; EBERL, S.; AIZAWA, Y.; KANNO, I.; UEMURA, K. A method to quantitate cerebral blood flow using a rotating gamma camera and iodine-123 iodoamphetamine with one blood sampling *Eur. J. Nucl. Med.*, v.21, p.1072-1084, 1994.

- 52- IIDA, H.; ITOH, H.; NAKAZAWA, M.; HATAZAWA, J.; NISHIMURA, H.; ONISHI, Y.; UEMURA, K. Quantitative mapping of regional cerebral blood flow using iodine-123-IMP and SPECT. *J. Nucl. Med.*, v.35, p.2019-2030, 1994.
- 53- ISHIZU, K.; YONEKURA, Y.; MAGATA, Y.; OKAZAWA, H.; FUKUYAMA, H.; TANAKA, F.; HATORRI, N.; KITANO, H.; FUJITA, T.; TANAKA, N.; KONISHI, J. Extraction and retention of technetium-99m-ECD in human brain: Dynamic SPECT and Oxygen-15-water PET studies. *J. Nucl. Med.*, v.37, p.1600-1604, 1996.
- 54- JACOBS, A.; PUT, E.; INGELS, M.; BOSSUYT, A. One year follow-up of technetium-99m-HMPAO SPECT in mild head injury. *J. Nucl. Med.*, v.37, p. 1605-1609, 1996.
- 55- JASZCZAK, R.J.; TSOI, B.M.W. Single photon emission tomography (SPECT). In : WAGNER Jr, H.N.; SZABO, Z.; BUCHANAN, J.W. (Eds.). *Principles of nuclear medicine*, Philadelphia, P.A. : W.B. Saunders, 1995, p.317-328.
- 56- JIMÉNEZ-BONILLA, J.; CARRIL, J.M.; QUIRCE, R.; GÓMEZ-BARQUÍN, R.; AMADO, A.; GUTIÉRREZ-MENDIGUCHÍA, C. Assessment of cerebral blood flow in diabetic patients with no clinical history of neurological disease. *Nucl. Med. Commun.*, v.17, p.790-794, 1996.
- 57- JOHN, C.S.; JOHN, E.K.; LI, J.; BARR, J.; McAFEE, J.G.; THAKUR, M.L. Modified synthesis, characterization and evaluation of thiolactones. *J. Labeled. Comp. Radiopharm.*, v.35, p.65-68, 1994.
- 58- JOSHUA, A.L.; SCOTT, J.R.; SONDHAI, S.M.; BALL, R.G.; LOWN, J.W. Transannular cyclizations of 1,2-dithia-5,8-diazacyclodeca-4,8-dienes during borohydride reduction. *J. Org. Chem.*, v. 52, p.2447-2451, 1987.
- 59- JURIS, P.C.; DIXON, S.L.; EGOLF, L.M. Molecular concepts-representations. In: MANNHOLD, R.; KROOGAARD-LARSEN, P.; TIMMERMAN (Eds.). *Chemometric Methods in Molecular Design*. Weinheim, Düsseldorf : Ham van de Waterbeemb, 1995, p.31.

- 60- KAMEYAMA, M.; ENDO, T.; MURATI, T. Diabetes mellitus and cerebral vascular disease. *J. Jpn. Diab. Soc.*, v.14, p.345-351, 1971.
- 61- KANNEL, W.B.; Mc GEE, D.L. Diabetes and cardiovascular disease: the Framingham study. *J.A.M.A.*, v.241, p.235-238, 1979.
- 62- KANNO, I.; LASSEN, N.A. Two methods for calculating regional cerebral blood flow from emission computed tomography of inert gas concentrations. *J. Comput. Assist. Tomogr.*, v.3, p.71-76, 1979.
- 63- KENNY, R.A.; BAYLISS, J.; INGRAM, A.; SUTTON, R. Head-up tilt test : a useful test for investigating unexplained syncope. *Lancet*, v.1, p. 1352-1355, 1988.
- 64- KEYMEULEN, B.; JACOBS, A.; DE METZ, K.; DE SADELEER, C.; BOSSUYT, A.; SOMERS, G. Regional cerebral hypoperfusion in long-term type I (insulin-dependent) diabetic patients: relation to hypoglycaemic events. *Nucl. Med. Comm.*, v.16, p.10-16, 1995.
- 65- KEYMEULEN, B.; DE METZ, K.; CLUYDTSE, R.; BOSSUYT, A.; SOMERS, G. Technetium-99m hexamethylpropylene amine oxime single photon emission tomography of regional cerebral blood flow in insulin-dependent diabetes. *Eur. J. Nucl. Med.*, v.23, 163-168, 1996.
- 66- KINOUCI, H.; SHARP, F.R.; KOISTINAHO, J. HICKS, K.; KAMII, H.; CHAN, P.H. Induction of heat shock hsp70 messenger RNA and HSP70-kDa protein in neurons in the 'penumbra' following focal cerebral ischaemia in the rat. *Brain Res.*, v.619, p.334-338, 1993.
- 67- KRAMER, A.V.; EPPS, L.A.; BURNS, H.D.; JOHNSON, A.N.; RANGANATHAN, N.; RAERT, H.T. Synthesis and characterization of neutral aminoethanol complexes of technetium. *J. Nucl. Med.*, v. 24, p.127, 1983.
- 68- KUNG, H.F.; MEEGGALLA, S.; PLOESSL, K.; KUNG, M.P.; MU, M. Two Tc-99m N_2S_2 complexes as dopamine transporter imaging agents. In: NICOLINI, M.; BANDOLI, G.; MAZZI, U. (Eds.). *Technetium and rhenium in chemistry and nuclear medicine 5*, Padova, 1998, em gráfica.

- 69- KUNG, H.F.; GUO, Y-Z.; YU, C-C.; BILLINGS, J.; SUBRAMANYAN, V.; CALABRESE, J. New brain perfusion imaging agents based on ^{99m}Tc -bis (aminoethanethiol) complexes : stereoisomers and biodistribution. *J. Med. Chem.*, v.32, p.433-437, 1989.
- 70- KUNG, H.F., EFANGE, C.C., YU, C.C., BILLINGS, J., BLAU, M. Synthesis and biodistribution of Tc-99m bis-aminoethanethiol (BAT) complexes with amine sidechains. *J. Nucl. Med.*, v. 26 : P18, 1985.
- 71- KUNG, H.F., MOLNAR, M., BILLINGS, J., WICKS, R., BLAU, M. Synthesis and biodistribution of neutral lipid-soluble Tc-99m complexes that cross the blood-brain barrier . *J. Nucl. Med.*, v.25, n.5, p. 326-332, 1984.
- 72- KUNG, H.F., YU, C.C., BILLINGS, J., MOLNAR, M., WICKS, R., BLAU, M. New Tc-99m Brain imaging agents. *J. Nucl. Med.*, v.25, n.5, p.P16, 1984.
- 73- LASSEN, N.A.; ANDERSEN, A.L.; FRIBERG, L.; PAULSON, O.B. The retention of [^{99m}Tc]-d,l-HMPAO in human brain after intracarotid bolus injection : a kinetic analysis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, v.8, S13-S22, 1988.
- 74- LASSEN, N.A.; INVGAR, D.H. "Radioisotopic assessment of regional cerebral blood flow". In : POTCHEN, R.J.; CREADY, V.D. (Eds.). *Progress in nuclear medicine*. Basel: Karger , 1972, p.376-409.
- 75- LASSEN, N.A. The luxury perfusion syndrome and its possible relation to acute metabolic acidosis localized within the brain. *Lancet*, v.2, 1113-1115, 1966.
- 76- LASSEN, N.A.; HOEDT-RASMUSSEN, K.; SORENSEN, S.; et al. Regional cerebral blood flow in man determined by krypton . *Neurology*, v.13, p.719-727, 1963.
- 77- LEE, T.; SEEMAN, P. Dopamine receptor binding in schizophrenia and Parkinson's disease. Proceedings of the 12th Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (Göteborg). *Progr. Neuropsychopharmacol.* v.4 suppl., abstr. no. 391, 1980.

- 78- LEE, T.; SEEMAN, P.; TOURTELLOTE, W.W.; FARLEY, I.J.; HORNYKIEWICZ, O. Binding of ^3H -neuroleptics and ^3H -apomorphine in schizophrenic brains. *Nature*, v. 274, p. 897-900, 1978.
- 79- LEE, T.; SEEMAN, P. Dopamine receptors in normal and schizophrenic human brains. *Soc. Neurosci. Abstr.*, v.3, p.443, 1977.
- 80- LEO, A.; HANSCH, C.; ELKIN, D. Partition coefficients and their uses. *Chem. Rev.*, v.71, n.6, p.525-616, 1971.
- 81- LESLIE, W.D.; ABRAMS, D.N.; GREENBERG, C.R.; HOBSON, D. Comparison of iodine-123-epidepride and iodine-123-IBZM for dopamine D2 receptor imaging. *J. Nucl. Med.*, v.37, p.1589-1591, 1996.
- 82- LÉVEILLÉ, J.; DEMONCEAU, G.; WALOVITCH, R.C. Intrasubject comparison between $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ECD and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO in healthy human subjects. *J. Nucl. Med.*, v.33, p.480-484, 1992.
- 83- LEVER, S.Z. Technetium and rhenium compounds .In : WAGNER Jr, H.N.; SZABO, Z.; BUCHANAN, J.W.(Eds.). *Principles of nuclear medicine*, Philadelphia, P.A. : W.B. Saunders, 1995, p. 213.
- 84- LEVER, S.Z., BURNS, H.D., KERVITSKY, T.M., GOLDFARB, H.W., WOO, D.V., WONG, D.F., EPPS, L.A., KRAMER, A.V., WAGNER, H.N. Design, preparation, and biodistribution of a technetium-99m, triaminedithiol complex to assess regional cerebral blood flow. *J. Nucl. Med.*, v. 26, p.1287-1294, 1985.
- 85- LISTER-JAMES, J.; Mc. BRIDE, W.J.; BUTTRAM, S.; CIVITELLO, E.R.; MARTEL, L.J.; PEARSON, D.A.; WILSON, D.M.; DEAN, R.T. Technetium-99m chelate containing receptor-binding peptides. In: NICOLINI, M.; BANDOLI, G.; MAZZI, U. (Eds.). *Technetium and rhenium in chemistry and nuclear medicine 4*, Padova : Cortina Intenacional, Verona, 1994, p.269-274.
- 86- LOBERG, M.D., CORDER, E.H., FIELDS, A.T., CALLERY, P.S. Membrane transport of Tc-99m-labelled radiopharmaceuticals. 1, Brain uptake by passive transport. *J. Nucl. Med.*, v.20, p. 1181-1188, 1979.

- 87- LOIZOU, L.A.; KENDALL, B.E.; MERSHALL, J. Subcortical arteriosclerotic encephalopathy: a clinical and radiological investigation. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, v.44, p.294-304, 1981.
- 88- LYTHGOE, M.F.; WILLIAMS, S.R.; WIEBE, L.I.; Mc Ewan, A.B.; GORDON, J. Autoradiographic imaging of cerebral ischaemia using a combination of blood flow and hypoxic markers in an animal model. *Eur. J. Nucl. Med.*, v.24, p.16-20, 1997.
- 89- MACKAY, A.V.; DOBLE, A.; BIRD, E.D.; SPOKES, E.G.; QUIK, M.; IVERSEN, L.L.; ³H-Spiperone binding in normal and schizophrenic post-mortem human brain. *Life Sci.*, v.23, p.527-532, 1978.
- 90- MELTZER, H.Y. (Ed.). *Psychopharmacology : the third generation of progress*. New York, N.Y.: Raven, 1987, 1780 p.
- 91- MERZ, K. W.; SPECKER, M. Kondensationsversuche mit 2,2,5,5-tetramethyl-3,4-dithia hexandial -(1,6), *Arch. Pharm.*, v.296, p. 427-438, 1963.
- 92- MÜLLER,-GÄRTNER, H.W. Dementia, In : WAGNER Jr, H.N.; SZABO, Z.; BUCHANAN, J.W. (Eds). *Principles of nuclear medicine*. Philadelphia, P.A., W.B.: Saunders, 1995, p.553.
- 93- MURASE, K.; TANADA, S.; INOUE, T.; SUGAWARA, Y.; KIMURA, Y.; SAKAKI, S.; HAMAMOTO, K. Kinetic behaviour of ^{99m}Tc-ECD in the human brain using compartment analysis and dynamic SPECT: comparison with ^{99m}Tc-HMPAO. *J. Nucl. Med.*, v.33, p.909, 1992.
- 94- MURASE, K. et al. Measurement of the blood brain barrier permeability of I-123 IMP, Tc-99m-HMPAO and Tc-99m ECD in human brain using compartment model analysis and dynamic SPECT. *J. Nucl. Med.*, v.32, p.911, 1991 apud UEMURA, K. Brain studies using SPECT AND PET. In: TOMOGRAPHY IN NUCLEAR MEDICINE, August 21-25, 1995, Vienna. *Proceedings ...* Vienna: IAEA, 1996, p. 233-257.

- 95- MUT, F.; ABOAL, C.; AZNAREZ, A. ; NUNEZ, M.; BRIANO, M.; BOROVICH, B. Imaging of secreting pituitary adenomas using $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ isonitriles (CPI and SESTAMIBI). In : TOMOGRAPHY IN NUCLEAR MEDICINE, August 21-25, 1995, Vienna . *Proceedings ...* Vienna: IAEA, 1996, p.269-275.
- 96- NEIRINCKX, R.D.; CANNING, L.R.; PIPER, I.M.; NOWOTNIK, D.P.; PICKETT, R.D.; HOLMES, R.A.; VOLKERT, W.A.; FORSTER, A.M.; WEISNER, P.S.; MARRIOTT, J.A.; CHAPLIN, S.B. Technetium-99m d,l-HMPAO: A new radiopharmaceutical for SPECT imaging of regional cerebral blood perfusion. *J. Nucl. Med.*, v.28, p.191-202, 1987.
- 97- NOWOTNIK, D.P. Technetium-based brain perfusion agents. In: NUNN, A.D.(Ed.). *Radiopharmaceuticals*, New York, N.Y.: Marcel Dekker, 1992, v.55, p.37-95.
- 98- O'DELL, S.J., La HOSTE, G.J., WIDMARK, C.B.; SHAPIRO, R.M.; POTKIN, S.G.; MARSHALL, J.F. Chronic treatment with clozapine or haloperidol differentially regulates dopamine and serotonin receptors in the rat brain . *Synapse*, v.6, p.146-153, 1990.
- 99- OLDENDORF, W.H. Need for new radiopharmaceuticals. *J.Nucl.Med.*, v.19, p.1182, 1978.
- 100-OWEN, F.; CROW, T.J.; POULTER, M.; CROSS, A.J.; LONGDEN, A.; RILEY, G.J. Increased dopamine-receptor sensitivity in schizophrenia. *Lancet* , v.2, p.223-226, 1978.
- 101-OWEN, F.; LONGDEN, A.; CROW, T.J. Dopaminergic mechanism in schizophrenia. *Coll. Int. Neuropsychopharmacol.* , v.11, p.307, 1978.
- 102-OWUNWANNE, A.;PATEL, M.;SADEK,S.*The handbook of Radiopharmaceuticals*. London, U.K. : Chapman & Hall Medical, 1995.
- 103-PARDRIDGE, W.M.; MIETUS, L.R. Transport of steroid hormones through the rat blood-brain barrier. *J. Clin. Invest.* , v.64, p.145-154, 1979.

- 104-PASQUALIN, A.; ROSTA, I.; DAPIAN, L.; CAVAZZANI, P.; SCIENZA, R. Role of computed tomography in the management of vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*, v.15, n.3, p.344-353, 1984.
- 105-PAYNE, J.K.; TRIVEDI, M.H.; DEVOUS Sr, M.D. Comparison of technetium-99m-HMPAO and Xenon-133 measurements of regional cerebral blood flow by SPECT. *J. Nucl. Med.*, v.37, p.1735-1740, 1996.
- 106-PENFIELD, W. The evidence for cerebral vascular mechanism in epilepsy. *Ann. Intern. Med.*, v.7, p.303-310, 1933.
- 107-PENFIELD, W. The circulation of the epileptic brain. *Res. Publ. Assoc. Nerv. Ment. Dis.*, v.18, p. 605-737, 1933.
- 108-QUIRCE, R.; CARRIL, J.M.; JIMÉNEZ-BONILLA, J.F.; AMADO, J.A.; GUTIÉRREZ-MENDIGUCHÍA, BANZO, I.; BLANCO, I.; URIARTE, I.; MONTERO, A. Semi-quantitative assessment of cerebral blood flow with ^{99m}Tc -HMPAO SPET in type I diabetic patients with no clinical history of cerebrovascular disease. *Eur. J. Nucl. Med.*, v.24, p.1507-1513, 1997.
- 109-RENKIN, E.M. Transport of potassium-42 from blood to tissue in isolated mammalian skeletal muscles. *Am. J. Physiol.*, v.197, p.1205-1210, 1959.
- 110-SAGE, M.R.. Blood brain barrier : A phenomenon of increasing importance to the imaging clinician. *Am. J. Roentg.*, v.138, p.887-898, 1982.
- 111-SAHA, G.B. Radiopharmaceuticals and methods of radiolabeling . In : SAHA, G.B. (Ed.). *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, New York, N.Y.: Springer, New York, N.Y., 1992, p.98.
- 112-SAMNICK, S.; BRANDAN, W.; SCHOBBER, O. Synthesis characterization and biodistribution of neutral and lipid-soluble ^{99m}Tc -BP-BAT and ^{99m}Tc -BUP-BAT: Possible ligands for dopamine receptor imaging with SPECT. In: NICOLINI, M.; BANDOLI, G.; MAZZI, U. (Eds.). *Technetium and rhenium in chemistry and nuclear medicine 4*, Padova : Cortina Intenacional, Verona, 1994, p.569-572 .

- 113-SAVIC, I.; ROWLAND, P.; SEDVALL, G.; PERSSON, A.; WIDEN, L. In-vivo determination of reduced benzodiazepine receptor binding in human epileptic foci. *Lancet*, v.2, p.863-866, 1988.
- 114-SCHEFFEL, U., GOLDFARB, H.W., LEVER, S., GUNSON, R.L., BURNS, H.D., WAGNER JR, H.N., Comparison of technetium-99m aminoalkyl diaminedithiol (DADT) analogs as a potential brain blood flow imaging agents. *J. Nucl. Med.*, v.29, p.73-82, 1988.
- 115-SEEMAN, P. Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Synapse*, v.1, p. 133-152, 1987.
- 116-SEEMAN, P. Brain dopamine receptors. *Pharmacol. Rev.*, v.32, n.3, p.229-313, 1980.
- 117-SEEMAN, P.; LEE, T.; BIRD, E.D.; TOURTELLOTE, W.W. Elevation of brain neuroleptic/dopamine receptors in schizophrenia. In : BAXTER, C.; MELNECHUK, (Eds.). *Perspectives in schizophrenia research*. New York, N.Y.: Raven, 1979, p.195-202.
- 118-SHELDON, R.S.; KILLAM, S. Methodology of isoproterenol-tilt table testing in patients with syncope. *J. Am. Coll. Cardiol.*, v.19, p. 773-779, 1992.
- 119-SHIBA, K.; MORI, H.; MATSUDA, H.; HISADA, K. Technetium-99m p-Iodophenethyl-diaminedithiol (DADT-IPE) potential brain perfusion imaging agent for SPECT. *Nucl. Med. Biol.*, v.19(3), p.303-310, 1992.
- 120-SHYU, W-C; LIN, J-C; SHEN, C-C; HSU, Y-D; LEE, C-C; SHIAH, I-S; TSAI, W-L. Vascular dementia of Biswanger's type: clinical, neuroradiological and ^{99m}Tc-HMPAO SPET study. *Eur. J. Nucl. Med.*, v.23, p.1338-1344, 1996.
- 121-SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C; MORRIL, T.C. *Identificação espectroscópica de compostos orgânicos*. Rio de Janeiro, R.J., 1991, 387 p.

- 122-SOMERS, G. ; TERSAGO, K.; KEYMEULEN, B.; VAN MULDERES, I.; DEMETZ, C.; BOSSUYT, A.; CLUYDTS, R. Regional cerebral blood flow and neuro-psychological performance in the type I diabetes. *Diabetologia* , v.37(SI): A 26, 1994.
- 123-STEIN, W.D. *The movement of molecules across cell membranes* . New York, N.Y.: Academic, 1967.
- 124-TERAI, T.; SYOMORI, T.; HIMEL, H; MATSUOKA, T. Cerebral blood flow disorder in elderly patients with diabetes mellitus. *No To Shinkei* , v.45 , p. 945-949, 1993 apud QUIRCE, R.; CARRIL, J.M.; JIMÉNEZ-BONILLA, J.F.;AMADO, J.A.; GUITIÉRREZ-MENDIGUCHÍA, BANZO, I.; BLANCO, I.; URIARTE, I.; MONTERO, A. Semi- quantitative assessment of cerebral blood flow with ^{99m}Tc-HMPAO SPET in type I diabetic patients with no clinical history of cerebrovascular disease. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 24, p. 1507 - 1513, 1997
- 125-TOHGI, H.; CHIBA, K.; SASAKI, K.; HIROI, S.; ISHIBASHI, Y. Cerebral perfusion patterns in vascular dementia of Binswanger type compared with senile dementia of Alzheimer type: A SPECT study. *J. Neurol.* , v.238, p.365-370, 1991.
- 126-TÖYRY, J.P.; KUIKKA, J.T.; LÄNSIMIES, E.A. Regional cerebral perfusion in cardiovascular reflex syncope. *Eur.J.Nucl.Med.*, v. 24, p. 215-218, 1997.
- 127-TRANQUAT, F.; ADES, P.E.; GROUSSIN, P.; RIEANT, J.F.; JAN, M.; BAULIEU, J.L. Postoperative assessment of cerebral blood flow in subarachnoid haemorrhage by means of ^{99m}Tc-HMPAO tomography. *Eur. J. Nucl. Med.* , v.20, p.53-58, 1993.
- 128-TSUCHIDA, T.; NISHIZAWA, S.; YONEKURA, Y.; SADATO, N.; IWASAKI, Y.; FUJITA, T.; MATOBA, N.; MAGATA, Y.; TAMAKI, N.; KONISHI, J. SPECT images of ^{99m}Tc-ethylcysteinate dimer in cerebrovascular diseases: comparison with other cerebral perfusion tracers and PET. *J. Nucl. Med.*, v.35, p.27-31, 1994.
- 129-UEMURA, K. Brain studies using SPECT AND PET. In: TOMOGRAPHY IN NUCLEAR MEDICINE, August 21-25, 1995, Vienna. *Proceedings ...* Vienna: IAEA, 1996, p. 233-257.

- 130-UEMURA, K. Regional cerebral blood flow and oxygen metabolism in patients with cerebral stroke studied by positron emission tomography. *Jpn. J. Stroke*, v.9, p.489-498, 1987.
- 131-VOLKERT, W.A. Ligand systems useful in designing high specific activity ^{99m}Tc or $^{186/188}\text{Re}$ radiopharmaceuticals. In: NICOLINI, M.; BANDOLI, G.; MAZZI, U. (Eds.). *Technetium and rhenium in chemistry and nuclear medicine 4*, Padova : Cortina Intenacional, Verona, 1994, p.17-32.
- 132-WAGNER, D.S.; KASSEL, N.F.; BOARINI, D.J. : Microsphere cerebral blood flow determination. In: WOOD, J.H. (Ed.). *Cerebral blood flow – Physiologic and clinical aspects*. New York, N.Y. : Mc Graw Hill, 1987, p. 288-298.
- 133-WAGNER Jr., H.N. Diseases as dissonance.: PET/SPECT imaging communication disorders. In: TOMOGRAPHY IN NUCLEAR MEDICINE, August 21-25, 1995, Vienna. *Proceedings ...* Vienna: IAEA, 1996., p. 3-15.
- 134-WAKISAKA, M., NAGAMACHI, S. INOUE, K.; MOROTOMI, Y.; NUNOI, K.; FUJISHIMA, M. Reduced regional cerebral blood flow in aged noninsulin – dependent diabetic patients with no history of cerebro-vascular disease : evaluation by *N*-isopropyl - ^{123}I -*p*-iodoamphetamine with single-photon emission computed tomography. *J. Diabetes Complications*, v.4, p.170-174, 1990 apud QUIRCE, R.; CARRIL, J.M.; JIMÉNEZ-BONILLA, J.F.; AMADO, J.A.; GUTIÉRREZ-MENDIGUCHÍA, BANZO, I.; BLANCO, I.; URIARTE, I.; MONTERO, A. Semi- quantitative assessment of cerebral blood flow with ^{99m}Tc -HMPAO SPET in type I diabetic patients with no clinical history of cerebrovascular disease. *Eur. J. Med.*, v.24, p.1507-1513, 1997
- 135-WALOVITCH, R.C.; HILL, T.C; GARRITY, S.T.; CHESSMAN, E.H.; BURGESS, B.A.; O'LEARY, P.H.; WATSON, A.D.; GANEY, M.V.; MORGAN, R. A.; WILLIAMS, S.J. Characterization of ^{99m}Tc -I,I-ECD for brain perfusion imaging. Part I : pharmacology of ^{99m}Tc -ECD in nonhuman primates. *J. Nucl. Med.*, v.30, p.1892-1901, 1989.
- 136-WINCHELL, H.S.; HORST, W.D.; BRAUN, L.; OLDENDORF, W.H.; HATTNER, R.; PARKER, H.. N-isopropyl[I-123]p-iodoamphetamine: single pass brain uptake and washout, binding to brain synaptosomes, and localization in dog and monkey brain. *J. Nucl. Med.*, v.21, p.947-952, 1980.

- 137-WOLD, S.; ERIKSSON, L. Statistical validation tools, In : MANNHOLD, R.; KROOGAARD-LARSEN, P.; TIMMERMAN (Eds.). *Chemometric Methods in Molecular Design*. Weinheim, Düsseldorf : Ham van de Waterbeemb, 1995, p.309.
- 138-WOLF, J.F.; ABOUD, J.L.M.; TAFT, R.W. Regarding polarizability effects of hydrocarbons substituents on base strengths in solution. *J. Org. Chem.*, v.42, p.3316-3317, 1977.
- 139-WYPER, D.J. Functional neuroimaging with single photon emission computed tomography (SPECT). *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.*, v.5, p.199-217, 1993.
- 140-YOUNG, R.C.; MITCHELL, R.C.; BROWN, T.H.; GANELLIN, C.R.; GRIFFITHS, R.; JONES, M.; RANA, K.K.; SAUNDERS, D.; SMITH, I.R.; SORE, N.E.; WILKS, T.J. Development of a new physiochemical model of brain penetration and its Application to the design of the centrally acting H₂ receptor histamine and antagonists. *J. Med. Chem.*, v.31, p.656-671, 1988.
- 141-ZATS, L.M.; JERNIGAN, T.L.; AHUMADA Jr, A.J. et al.. Changes on computer on computer cranial tomography with aging : intracranial fluid volume. *Am. J. Neuroradiol.*, v.3, p.1-8, 1982 apud CATAFAU, A. M.; LOMENÑA, F.J.; PAVIA, J.; PARELLADA, E.; BERNARDO, M., SETOAIN, J.; TOLOSA, E. Regional cerebral blood flow pattern in normal young and aged volunteers : a ^{99m}Tc-HMPAO SPET study. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 23, p.1329-1373, 1996.

- 137-WOLD, S.; ERIKSSON, L. Statistical validation tools, In : MANNHOLD, R.; KROOGAARD-LARSEN, P.; TIMMERMAN (Eds.). *Chemometric Methods in Molecular Design*. Weinheim, Düsseldorf : Ham van de Waterbeemb, 1995, p.309.
- 138-WOLF, J.F.; ABBOUD, J.L.M.; TAFT, R.W. Regarding polarizability effects of hydrocarbons substituents on base strengths in solution. *J. Org. Chem.*, v.42, p.3316-3317, 1977.
- 139-WYPER, D.J. Functional neuroimaging with single photon emission computed tomography (SPECT). *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.*, v.5, p.199-217, 1993.
- 140-YOUNG, R.C.; MITCHELL, R.C.; BROWN, T.H.; GANELLIN, C.R.; GRIFFITHS, R.; JONES, M.; RANA, K.K.; SAUNDERS, D.; SMITH, I.R.; SORE, N.E.; WILKS, T.J. Development of a new physiochemical model of brain penetration and its Application to the design of the centrally acting H₂ receptor histamine and antagonists. *J. Med. Chem.*, v.31, p.656-671, 1988.
- 141-ZATS, L.M.; JERNIGAN, T.L.; AHUMADA Jr, A.J. et al.. Changes on computer on computer cranial tomography with aging : intracranial fluid volume. *Am. J. Neuroradiol.*, v.3, p.1-8, 1982 apud CATAFAU, A. M.; LOMENÑA, F.J.; PAVIA, J.; PARELLA, E.; BERNARDO, M., SETOAIN, J.; TOLOSA, E. Regional cerebral blood flow pattern in normal young and aged volunteers : a ^{99m}Tc-HMPAO SPET study. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 23, p.1329-1373, 1996.