



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**RADIOIODAÇÃO DE PROTEÍNA POR VIA DIRETA E  
INDIRETA: ESTUDO COMPARATIVO DA MARCAÇÃO DE  
PEPTÍDEO QUIMIOTÁTICO**

**TATIANA LAVINAS**

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

Orientadora:  
Dra. Elaine Bortoleti de Araújo

**São Paulo  
2004**

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

“RADIOIODAÇÃO DE PROTEÍNA POR VIA DIRETA E  
INDIRETA: ESTUDO COMPARATIVO DA MARCAÇÃO DE  
PEPTÍDEO QUIMIOTÁTICO.”

TATIANA LAVINAS



Tese apresentada como parte dos  
requisitos para a obtenção do grau de  
doutor em Ciências na Área de  
tecnologia Nuclear – Aplicações

Orientadora:  
Dra. Elaine Bortoleti de Araújo

SÃO PAULO  
2004

*Aos meus pais e ao meu marido*

*Pelo amor e incentivo*

## AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares e, em particular, ao Centro de Radiofarmácia (CR) pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) que proporcionou a execução deste trabalho através do apoio financeiro (bolsa de doutorado).

À Dra. Constança Pagano Gonçalves da Silva, chefe do Centro de Radiofarmácia, pela oportunidade concedida.

À Dra. Nilda P. S. de Pereira, chefe da Divisão da Garantia de Qualidade e Jair Mengatti, chefe da Divisão de Produção do Centro de Radiofarmácia pelas facilidades oferecidas.

À Dra. Elaine Bortoleti de Araújo pela orientação deste trabalho, pelos conhecimentos transmitidos, pelo apoio, confiança e amizade.

À Dra. Emiko Muramoto, pela colaboração inestimável fornecida na realização dos estudos de distribuição biológica deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Leoberto da Costa Tavares do Departamento de Tecnologia Bioquímica Farmacêutica da FCF da USP pela colaboração oferecida na realização da síntese e análise dos compostos.

Ao Wagner Nieto, pelo desenvolvimento do sistema para obtenção de baixa temperatura utilizado na síntese química realizada neste trabalho e pelo apoio sempre presente.

Aos pesquisadores, técnicos, bolsistas e estagiários pelo agradável e profícuo convívio durante a realização deste trabalho.

Aos meus amigos do CR pelo incentivo, contribuição na elaboração deste trabalho e carinho sempre presentes.

A todos aqueles que de uma forma ou de outra ajudaram e acreditaram na realização deste trabalho.

# RADIOIODAÇÃO DE PROTEÍNA POR VIA DIRETA E INDIRETA: ESTUDO COMPARATIVO DA MARCAÇÃO DE PEPTÍDEO QUIMIOTÁTICO

Tatiana Lavinias

## RESUMO

O desenvolvimento de métodos relativamente simples de marcação de proteínas com radioiodo tem estimulado a utilização *in vivo* de proteínas e peptídeos radioiodados. Há basicamente dois métodos para radioiodação de proteínas e peptídeos: marcação direta, que envolve a reação de uma espécie eletrofílica de radioiodo com grupos funcionais ativados na proteína, como o anel fenólico do resíduo tirosina e a conjugação de pequenas moléculas radioiodadas à proteína, também conhecido como método indireto. O maior problema da radioiodação direta é a rápida desalogenação *in vivo*. Este problema pode ser minimizado se um grupamento prostético não fenólico for utilizado para a radioiodação indireta do peptídeo. O derivado benzoato de 3-(tri-n-butilestanil) de N-succinimidila, denominado de ATE, quando radioiodado via iododesestanição eletrofílica origina o 3-[<sup>123</sup>/<sup>131</sup>I]iodobenzoato de N-succinimidila (SIB) que é posteriormente conjugado à proteína através de acilação do resíduo de lisina. Existem vários radiofármacos convencionais para imagem cintilográfica de infecção e inflamação, que são, entretanto, utilizados com limitações. Estas limitações estimularam a ascensão de uma nova classe de radiofármacos, os peptídeos radiomarcadores de receptores específicos, dentre eles os mediadores da resposta inflamatória, que apresentam alta afinidade pelos receptores expressos no tecido inflamado e rápido clareamento do sangue e outros tecidos não inflamados. Entre essas moléculas está o peptídeo quimiotático sintético o fNleLFNleYK que apresenta potente quimiotaxia por leucócitos, ligando-se com alta afinidade aos receptores presentes tanto nos leucócitos polimorfonucleares como nos fagócitos mononucleares. O objetivo do presente trabalho foi a síntese do ATE e estudo comparativo da radioiodação pelos métodos direto e indireto do peptídeo quimiotático sintético fNleLFNleYK com avaliação da pureza

radioquímica, estabilidade *in vitro* e *in vivo* dos compostos obtidos. O trabalho apresenta como contribuição inédita os estudos comparativos de distribuição biológica entre o peptídeo quimiotático marcado por via direta e indireta. O ATE foi obtido com rendimento (90,7%) satisfatório. Os parâmetros ótimos para radioiodação do ATE foram pH entre 3-4, 50  $\mu\text{mol}$  de t-butil-hidroperóxido e 30 minutos de reação. O SIB obtido foi purificado para remoção do ATE que não reagiu e ainda possíveis impurezas radioquímicas geradas durante a marcação. O peptídeo radioiodado por via direta foi obtido em um curto tempo de reação (10 minutos), com alta pureza radioquímica (> 96%) e com estabilidade *in vitro* (48 horas acondicionado em geladeira). Os estudos de biodistribuição em camundongos *Swiss* normais e com foco de inflamação desenvolvido a partir da injeção de terebentina na coxa traseira direita evidenciaram a potencialidade do composto para diagnóstico de focos de inflamação, uma vez que a captação na coxa inflamada foi significativamente maior que a captação na coxa normal em todos os tempos ( $p < 0,05$ , teste t Student). Porém a captação na tireóide aumentou no decorrer do tempo sugerindo a instabilidade do composto *in vivo* devido à desalogenação. O peptídeo radioiodado por via indireta também foi obtido com alta pureza radioquímica (>99%), porém somente após purificação por cromatografia líquida de alta eficiência e apresentou estabilidade *in vitro* (24 horas acondicionado em geladeira). Apesar da metodologia ser trabalhosa e com baixos rendimentos (26,3%), o composto gerado apresentou especificidade pelo foco de inflamação e estabilidade *in vivo* observada pela baixa captação na tireóide para todos os tempos, principalmente se comparada com a captação obtida com o peptídeo radioiodado por via direta. A grande estabilidade *in vivo* da proteína radioiodada por via indireta justifica a realização futura de estudos mais aprofundados, buscando métodos alternativos para purificação, que demandem menor tempo de processamento e resultem em melhor rendimento final.

# DIRECT AND INDIRECT RADIOIODINATION OF PROTEIN: COMPARATIVE STUDY OF CHEMOTACTIC PEPTIDE LABELING

Tatiana Lavinás

## ABSTRACT

The development of simple methods for protein radioiodination have stimulated the use of radioiodinated peptides *in vivo*. There are two basic methods for labeling proteins with radioiodine: direct labeling, reaction of an electrophilic radioiodine with functional activated groups on protein, like the phenol ring in the tyrosine residue, and the conjugation of a previously radioiodinated molecule to the protein, referred as indirect method. The great problem related to the direct radioiodination of proteins is the *in vivo* dehalogenation. This problem can be minimized if a non-phenolic prosthetic group is used in the indirect radioiodination of the peptide. The ATE prosthetic group, N-succinimidyl 3-(tri-n-butylstannyl) benzoate, when radioiodinated by electrophilic iododestannylation produces N-succinimidyl 3-[<sup>123</sup>I/<sup>131</sup>I] iodine benzoate (SIB) that is subsequently conjugated to the protein by the acylation of the lysine group. There are many radiopharmaceuticals employed in scintigraphic images of infection and inflammation used with some limitations. These limitations stimulated the improvement of a new class of radiopharmaceuticals, the receptor-specific related labeled peptides, as the mediators of the inflammatory response, that presents high affinity by receptors expressed in the inflammation process, and fast clearance from blood and non-target tissues. One of these molecules is the synthetic chemotactic peptide fNleLFNleYK that presents potent chemotaxis for leukocytes, with high affinity by the receptors presented in polymorphonuclear leukocytes and mononuclear phagocytes. The objective of this work included the synthesis of ATE prosthetic group and comparative radioiodination of the chemotactic peptide fNleLFNleYK by direct and indirect methods, with radiochemical purity determination and evaluation of *in vivo* and *in vitro* stability of

the compounds. This work presented an original contribution in the comparative biological distribution studies of the chemotactic peptide labeled by direct and indirect methods. The ATE was obtained with satisfactory yield (90,7%). The conditions for ATE radioiodination were pH 3 - 4, 50  $\mu$ mol of t-butylhydroperoxide and 30 minutes of reaction. The SIB was purified to remove the unreacted ATE and some radiochemical impurities presented in the reaction mixture. The peptide radioiodinated by direct method was obtained in a short reaction time (10 minutes), with high radiochemical purity (> 96%) and *in vitro* stability (48 hours under refrigeration). The biodistribution studies developed in normal *Swiss* mice and in mice with inflammatory focus developed by the administration of turpentine in the right thigh showed the ability of the compound to concentrate in the inflammatory focus as evidenced by the higher uptake in the inflamed thigh when compared to the normal thigh ( $p < 0.05$ , Student t) in all studied time. However, the uptake in thyroid increased in time due to the *in vivo* dehalogenation of the compound. The peptide radioiodinated by indirect method was also obtained with high radiochemical purity but only after high performance liquid chromatography purification (> 99%) and was stable *in vitro* (24 hours under refrigeration). Despite the indirect labeling procedure was laborious, time consuming and the product was obtained with low radiochemical yield (26,3%), the labeled peptide showed specificity by inflammatory focus and *in vivo* stability confirmed by the lower thyroid uptake when compared with the peptide labeled by direct method. The great *in vivo* stability of the peptide labeled by indirect method justifies the study of new and alternative purification procedure that reduces process time and increases the final yield.

## SUMÁRIO

	Página
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. OBJETIVO</b> .....	20
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	21
3.1 Iodo.....	21
3.2 Radioiodação.....	24
3.3 Inflamação/Infecção.....	32
3.4 Radiofármacos para imagem de inflamação/infecção: mecanismos de ação.....	38
3.4.1 Diferentes radiofármacos utilizados para inflamação/infecção.....	40
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	51
4.1 Materiais e equipamentos.....	51
4.2 Métodos.....	53
4.2.1 Síntese do grupo prostético – benzoato de 3-(tri-n-butil estanil) de N-succinimidila (ATE).....	53
4.2.1.1 Síntese do intermediário benzoato de 3-(tri-n-butilestanil) de tri-n-butil estanho (3).....	53
4.2.1.2 Síntese do ATE - benzoato de 3-(tri-n-butil estanil) de N-succinimidila (4).....	55
4.2.1.3 Análises físico-químicas.....	56
4.2.2 Radioiodação do peptídeo fNleLFNleYK pelo método indireto.....	56
4.2.2.1 Marcação do grupo prostético ATE com radioiodo.....	58
4.2.2.2 Conjugação do peptídeo fNleLFNleYK ao SIB purificado.....	59
4.2.2.3 Purificação do peptídeo fNleLFNleYK conjugado ao SIB em CLAE.....	60
4.2.2.4 Purificação do peptídeo fNleLFNleYK conjugado ao SIB em mini coluna compactada C <sub>18</sub> .....	60
4.2.2.5 Conjugação do peptídeo fNleLFNleYK conjugado ao SIB não purificado (sem purificação em mini coluna compactada de sílica).....	61
4.2.3 Radioiodação do peptídeo fNleLFNleYK pelo método direto.....	61

4.2.3.1 Procedimento de marcação usando cloramina T como agente oxidante.....	62
4.2.4 Estudos de distribuição biológica.....	62
4.2.4.1 Estudo da compatibilidade do radiofármaco com as células receptoras do foco inflamatório por meio da técnica de perfusão.....	63
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>65</b>
5.1 Síntese do ATE.....	65
5.2 Marcação do grupo prostético ATE com radioiodo.....	68
5.3 Estudo da radioiodação do peptídeo fNleLFNleYK pelo método indireto.....	73
5.3.1 Rendimento de marcação do ATE após purificação em mini coluna compactada de sílica.....	73
5.3.2 Conjugação do peptídeo fNleLFNleYK ao SIB.....	76
5.3.3 Rendimento de marcação do fNleLFNleYK, utilizando-se SIB após purificação.....	78
5.3.4 Estudo da marcação do fNleLFNleYK, utilizando-se SIB, sem purificação.....	78
5.4 Estudo da radioiodação do peptídeo fNleLFNleYK pelo método direto.....	79
5.5 Estudo da distribuição biológica do peptídeo fNleLFNleYK.....	82
5.5.1 Estudo da distribuição biológica do peptídeo fNleLFNleYK marcado pelo método direto.....	82
5.5.2 Estudo da distribuição biológica do peptídeo fNleLFNleYK marcado pelo método indireto.....	91
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>98</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>111</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>113</b>

## LISTA DE TABELAS

	Página
1. Dados da caracterização e rendimento do ATE sintetizado	65
2. Radioiodação do ATE: influência do pH	70
3. Radioiodação do ATE: influência da concentração de TBHP	70
4. Radioiodação do ATE: influência do tempo de reação	70
5. Rendimento (%) SIB purificado em mini coluna compactada de sílica	73
6. Rendimento (%) do peptídeo fNleLFNleYK conjugado ao SIB purificado	78
7. Porcentagem atividade/órgão do peptídeo fNleLFNleYK marcado pelo método direto e não purificado, administrado intravenosamente em camundongos <i>Swiss</i> normais	82
8. Porcentagem atividade/grama do peptídeo fNleLFNleYK marcado pelo método direto e não purificado, administrado intravenosamente em camundongos <i>Swiss</i> normais	83
9. Porcentagem atividade/órgão do peptídeo marcado pelo método direto e não purificado, administrado intravenosamente em camundongos <i>Swiss</i> com foco de inflamação na coxa direita traseira	84
10. Porcentagem atividade/grama do peptídeo marcado pelo método direto e não purificado, administrado intravenosamente em camundongos <i>Swiss</i> com foco de inflamação na coxa direita traseira	85
11. Análise da relação entre captação nas coxas inflamada e normal e atividade circulante do peptídeo marcado por via direta e não purificado	86
12. Porcentagem atividade/órgão do peptídeo marcado pelo método direto e purificado, administrado intravenosamente em camundongos <i>Swiss</i> com foco de inflamação na coxa direita traseira	86
13. Porcentagem atividade/grama do peptídeo marcado pelo método direto e purificado, administrado intravenosamente em camundongos <i>Swiss</i> com foco de inflamação na coxa direita traseira	87

	Página
14. Análise da relação entre captação nas coxas inflamada versus normal e atividade circulante do peptídeo marcado por via direta e purificado	88
15. Análise da captação nas coxas (inflamada e normal) do peptídeo marcado por via direta e purificado em animais sem perfusão e com perfusão	90
16. Porcentagem atividade/órgão do peptídeo fNleLFNleYK radioiodado por via indireta, administrado intravenosamente em camundongos <i>Swiss</i> normais	91
17. Porcentagem atividade/grama do peptídeo fNleLFNleYK radioiodado por via indireta, administrado intravenosamente em camundongos <i>Swiss</i> normais	92
18. Porcentagem atividade/órgão do peptídeo fNleLFNleYK radioiodado por via indireta, administrado intravenosamente em camundongos <i>Swiss</i> com foco de inflamação na coxa direita traseira	93
19. Porcentagem atividade/grama do peptídeo fNleLFNleYK radioiodado por via indireta, administrado intravenosamente em camundongos <i>Swiss</i> com foco de inflamação na coxa direita traseira	94
20. Análise da relação de captação do radiofármaco na região das coxas (inflamada e normal) e a contribuição da atividade sanguínea do peptídeo marcado por via indireta	95
21. Porcentagem atividade/sangue total do peptídeo marcado por via direta e indireta (purificados), administrados intravenosamente em camundongos <i>Swiss</i> com foco de inflamação na coxa direita traseira	96

## LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Reação entre espécie positiva de iodo e os aminoácidos histidina (acima) e tirosina (abaixo)	25
2. Grupamentos prostéticos com anel aromático fenólico: (1) reagente de Bolton-Hunter; (2) reagente de Wood; (3) <i>p</i> -hidroxibenzaldeído e (4) <i>p</i> -hidroxibenzacetaldéido	29
3. Reação geral – Iododesmetalção	29
4. Estrutura química do ATE	31
5. Etapas da síntese do ATE	53
6. Aparelho para a síntese do ATE	54
7. Fluxograma da marcação do peptídeo fNleLFNleYK por via indireta	57
8. Fluxograma da marcação do peptídeo fNleLFNleYK por via direta	61
9. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (300 MHz; CDCl <sub>3</sub> ) de 0 a 9 ppm do ATE sintetizado. Obtido no Espectrômetro Bruker modelo Advance DPX – 300 MHz (FCF-USP), utilizando-se clorofórmio deuterado como padrão de referência interna	66
10. Espectro IV do ATE sintetizado. O espectro foi registrado em espectrofotômetro Shimadzu IR-470 (FCF-USP), com a amostra na forma de um líquido oleoso, em filme	67
11. Perfil de CLAE do ATE sintetizado - detetor UV (254 nm). Coluna de sílica (10 $\mu$ ; 4,6x250mm); fase móvel, hexano:acetato de etila: ácido acético 70:30:0,2 (v:v:v); fluxo: 1mL/minuto; Rt ATE = 5,75 minutos	68
12. Perfil de CLAE do ATE sintetizado - detetor UV (220 nm). Coluna de fase reversa C <sub>18</sub> ; fase móvel, acetonitrila:TFA 0,1% 35:65 (v:v); fluxo de 0,5mL/minuto; Rt ATE = 10,67 minutos	68
13. Perfil de CLAE do SIB - marcação com iodo não radioativo - detetor UV (254 nm). Coluna de sílica (10 $\mu$ ; 4,6x250mm); fase móvel, hexano:acetato de etila: ácido acético 70:30:0,2 (v:v:v); fluxo: 1mL/minuto; Rt SIB = 11,39 minutos	69

14. Perfil de CLAE do SIB - marcação com iodo não radioativo - detetor UV (220 nm). Coluna de fase reversa C<sub>18</sub>; fase móvel, acetonitrila:TFA 0,1% 35:65 (v:v); fluxo de 0,5mL/minuto; Rt ATE = 16,72 minutos 69
15. Perfil radioativo de CLAE do SIB; agente oxidante TBHP (50 μmol). Coluna de sílica (10 μm; 4,6 x 250 mm); fase móvel, hexano:acetato de etila :ácido acético 70:30:0,2 (v :v :v); fluxo: 1mL/minuto; Rt SIB = 10,39 minutos 71
16. Perfil radioativo de CLAE do SIB; agente oxidante NCS 10 μmol. Coluna de sílica (10 μm; 4,6 x 250 mm); fase móvel, hexano:acetato de etila: ácido acético 70:30:0,2 (v :v :v); fluxo de 1mL/minuto; Rt SIB= 10,4 minutos; Rt NCS radioiodado = 8,4 minutos 72
17. Perfil radioativo de CLAE do meio reacional sem o ATE; agente oxidante NCS 10 μmol. Coluna de sílica (10 μm; 4,6 x 250 mm); fase móvel, hexano:acetato de etila: ácido acético 70:30:0,2 (v :v :v); fluxo de 1mL/minuto; Rt NCS radioiodado = 8,4 minutos 72
18. Perfil radioativo de CLAE do SIB antes da purificação. Coluna de fase reversa C<sub>18</sub>; fase móvel, acetonitrila:TFA 0,1% 35:65; fluxo de 0,5mL/minuto 74
19. Perfil radioativo de CLAE da fração de eluição hexano: acetato de etila 92:8. Coluna de fase reversa C<sub>18</sub>; fase móvel, acetonitrila:TFA 0,1% 35:65; fluxo de 0,5mL/minuto 75
20. Perfil radioativo de CLAE da fração de eluição hexano: acetato de etila 70:30. Coluna de fase reversa C<sub>18</sub>; fase móvel, acetonitrila:TFA 0,1% 35:65; fluxo de 0,5mL/minuto 76
21. Perfil de CLAE do peptídeo fNleLFNleYK conjugado ao SIB antes da purificação. Coluna de fase reversa C<sub>18</sub>; fase móvel, acetonitrila:TFA 0,1% 35:65; fluxo de 0,5mL/minuto; detetor de radiação (esquerda) e detetor UV (220nm) (direita) 77
22. Perfil radioativo de CLAE da marcação do peptídeo fNleLFNleYK por via indireta, utilizando-se SIB sem purificar. Coluna de fase reversa C<sub>18</sub>; fase móvel, acetonitrila:TFA 0,1% 35:65; fluxo de 0,5mL/minuto; Rt peptídeo conjugado = 7,7 min.; Rt impureza radioquímica = 11,33 min.; Rt SIB = 17,67 min. 79
23. Perfil de CLAE do peptídeo fNleLFNleYK em solução de DMF - detetor UV (220 nm); coluna de fase reversa C<sub>18</sub>; fase móvel, acetonitrila:TFA 0,1% 35:65; fluxo de 1,0mL/minuto (Esquerda) Rt peptídeo = 4,69 min.; fluxo de 0,5mL/minuto (Direita) Rt peptídeo = 7,7 min. 80

24. Perfil radioativo de CLAE do peptídeo marcado por via direta. Coluna de fase reversa C<sub>18</sub>; fase móvel, acetonitrila: TFA 0,1% 35:65 (v:v); fluxo de 1,0mL/ minuto; Rt iodo livre (<sup>131</sup>I)= 1,7 minutos ; Rt peptídeo radioiodado = 8,3 minutos; Rt (peptídeo frio) = 4,69 minutos 81
25. Porcentagem atividade/sangue total do peptídeo marcado por via direta com e sem purificação, administrado intravenosamente em camundongos *Swiss* normais e com foco de inflamação na coxa direita traseira 88
26. Porcentagem atividade nas coxas do peptídeo marcado por via direta, sem purificação, administrado em camundongos *Swiss* com foco de inflamação na coxa direita traseira 89
27. Porcentagem atividade nas coxas do peptídeo marcado por via direta purificado, administrado em camundongos *Swiss* com foco de inflamação na coxa direita traseira 89
28. Porcentagem atividade/sangue total do peptídeo marcado por via indireta purificado, administrado em camundongos *Swiss* normais e com foco de inflamação na coxa direita traseira 95
29. Porcentagem atividade nas coxas do peptídeo marcado por via indireta purificado, administrado em camundongos *Swiss* com foco de inflamação na coxa direita traseira 96
30. Porcentagem atividade/sangue total do peptídeo marcado por via direta e indireta (purificados), administrados em camundongos *Swiss* com foco de inflamação na coxa direita traseira 97

## 1. INTRODUÇÃO

Radiofármacos baseados em proteínas radiomarcadas, particularmente anticorpos monoclonais e peptídeos, têm sido extensivamente investigados, objetivando a produção de agentes para diagnóstico e terapia.

Peptídeos marcados com emissores gama de baixa energia como  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{123}\text{I}$  e  $^{111}\text{In}$  têm sido utilizados em diagnóstico diferencial de tumores, focos de infecção e pesquisa de trombos, em medicina nuclear.

O desenvolvimento de métodos relativamente simples de marcação de proteínas com radioiodo tem estimulado a utilização *in vivo* de proteínas e peptídeos radioiodados <sup>1-7</sup>. No entanto, estudos de distribuição biológica de anticorpos monoclonais marcados com  $^{131}\text{I}$  demonstraram captação de  $^{131}\text{I}$  livre na tireóide e estômago, assim como excreção urinária relativamente altas. Este fato reflete o maior problema com relação à utilização *in vivo* de proteínas radioiodadas, qual seja, o de serem extensamente desalogenadas *in vivo*. Essa desalogenação relaciona-se, provavelmente, com a interface de ligação do iodo na proteína. A incorporação do iodo nos resíduos de tirosina torna os mesmos bastante semelhantes estruturalmente aos hormônios da tireóide, que são passíveis de desalogenação pela ação de enzimas específicas <sup>2</sup>.

Há basicamente dois métodos para radioiodação de proteínas e peptídeos que são a marcação direta, envolvendo a reação de uma espécie eletrofílica de radioiodo com grupos funcionais ativados na proteína, como o anel fenólico do resíduo tirosina e, em menor extensão, o anel imidazólico do resíduo histidina e a marcação indireta que consiste na conjugação de pequenas moléculas radioiodadas à proteína <sup>1,6,7</sup>.

No método de marcação indireto utilizam-se pequenas moléculas denominadas grupos prostéticos, que contêm um núcleo aromático ativado para receber o radioiodo e uma ponte conectante que permite a ligação covalente à proteína. O grupo funcional mais comumente utilizado para a conjugação do grupo prostético radioiodado à proteína é o grupo amina, geralmente  $\epsilon$ -amina de resíduos lisina. Com relação ao núcleo aromático ativado, alguns grupos prostéticos utilizam anel fenólico para radioiodação eletrofílica, que promove a substituição com entrada do radioiodo na posição orto ao radical hidroxila do anel. Nestes casos o produto radioiodado, assim como no método direto, é suscetível à desalogenação *in vivo*<sup>4-7</sup>.

Outra classe de grupo prostético emprega intermediários organometálicos que podem ser usados com rapidez e eficiência para incorporação de radioiodo em diferentes compostos aromáticos. Os intermediários estanosos, particularmente os trialkilestanosos ( $\text{SnMe}_3$ ,  $\text{SnBu}_3$ ), têm se mostrado atrativos devido à sua relativa facilidade de preparação e manipulação, relativa estabilidade e alta reatividade com radiohalogênios<sup>2,4,5</sup>.

O derivado benzoato de 3(tri-n-butilestanil) de N-succinimidila recebeu de Zalutsky e Narula a denominação de ATE<sup>2</sup>. A radioiodação deste derivado via iododesestanição eletrofílica origina 3-[<sup>123/131</sup>I]iodobenzoato de N-succinimidila (SIB) que é posteriormente conjugado à proteína por meio da acilação do resíduo de lisina<sup>2,3,4,6,7,8</sup>.

Estudos comparativos documentam o fato de que a marcação de anticorpos monoclonais intactos e seus fragmentos  $\text{F}(\text{ab}')_2$  utilizando-se o grupo prostético ATE os torna mais resistentes à desalogenação do que quando se usa o método direto<sup>8-11</sup>.

A utilização de grupos prostéticos para radioiodação de proteínas tem se mostrado especialmente útil na marcação de pequenos peptídeos que não possuam resíduos anelares ou para aqueles cujos resíduos anelares encontram-se comprometidos na interação com receptores específicos.

Diversos peptídeos marcados com  $^{123}\text{I}$  já foram apresentados para pesquisa de focos de infecção e inflamação. A rápida identificação, localização e delineamento anatômico de um foco oculto de infecção e inflamação representa um importante passo para conduta terapêutica. Esses processos inflamatórios e/ou infecciosos podem ser detectados por técnicas como tomografia computadorizada (CT), ressonância magnética (RM) e ultrasonografia (US). No entanto, essas técnicas estão baseadas em mudanças anatômicas para definir a lesão e, portanto, não podem ser utilizadas para detectar lesões em fase inicial de desenvolvimento porque não há mudanças anatômicas substanciais nesse período <sup>12,13,14</sup>.

A imagem cintilográfica é um excelente método não-invasivo na pesquisa de corpo inteiro, permitindo a determinação tanto da localização quanto do número de focos de infecção e inflamação em todo o corpo, baseado em mudanças funcionais dos tecidos.

Independente da etiologia, a partir do dano tecidual, ocorre o início de uma série de eventos bioquímicos que resultam, principalmente, em três componentes fisiopatológicos da resposta inflamatória que são aumento da perfusão, aumento da permeabilidade vascular e exudação de leucócitos <sup>13, 15</sup>.

Os radiofármacos convencionais rotineiramente usados na clínica para determinação de foco de infecção e inflamação são citrato de  $^{67}\text{Ga}$ , leucócitos marcados com  $^{111}\text{In}$  ou  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  e imunoglobulinas humanas policlonais (IgG) marcadas com  $^{111}\text{In}$  ou  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Algumas limitações destes radiofármacos convencionais, como tempo entre a administração e a aquisição da imagem e o potencial risco de contaminação, encorajaram a pesquisa de novos agentes com características próximas do radiofármaco ideal <sup>12, 15</sup>.

Os radiofármacos baseados em pequenas proteínas e peptídeos radiomarcadores de receptores específicos evoluíram gradualmente a partir de grandes proteínas com mecanismo de captação inespecífico para grandes proteínas receptor-específicas, anticorpos e fragmentos de anticorpos seguida de

pequenas proteínas e peptídeos receptor-específicos, como por exemplo, os mediadores da resposta inflamatória <sup>12</sup>.

Estes mediadores tornaram-se disponíveis para estas aplicações por meio de sínteses ou técnicas de DNA recombinante. Na medicina nuclear, os mediadores de inflamação/infecção radiomarcados surgiram como uma classe promissora de agentes com características atrativas para detecção cintilográfica de inflamação e infecção. Teoricamente, a alta afinidade por receptores expressos no tecido inflamado facilita a retenção desses agentes enquanto o pequeno tamanho permite rápido clareamento do sangue e de outros tecidos não inflamados. <sup>12</sup>

Os problemas relacionados ao tempo entre a injeção e a detecção da imagem e o risco potencial de contaminação quando se utilizam as células brancas radiomarcadas *in vitro* podem ser, pelo menos, reduzidos quando se utilizam pequenas proteínas ou peptídeos marcados que se ligam *in vivo* a granulócitos e leucócitos circulantes para detecção de foco de infecção e inflamação. Entre essas moléculas estão o peptídeo quimiotático fMLF (formil-metil-leucil-fenilalanina) e seus análogos sintéticos, o fator plaquetário 4 e a interleucina-8 (IL-8) <sup>12,13, 15</sup>.

Muitos análogos sintéticos do fMLF se ligam a neutrófilos e macrófagos com igual ou maior afinidade que o peptídeo natural <sup>12,13,15</sup>. O peptídeo quimiotático sintético N-formil-norleucil-leucil-fenilalanil-norleucil-tirosil-lisina (fNleLFNleYK), apresenta uma potente quimiotaxia por neutrófilos humanos e pode ser prontamente radioiodado com alta atividade específica sem ocorrer perda de sua atividade biológica <sup>16</sup>.

Existem vários estudos promissores com relação à marcação dos análogos sintéticos do fMLF com <sup>111</sup>In, <sup>99m</sup>Tc e <sup>123</sup>I, objetivando gerar um radiofármaco efetivo para rápida localização de focos de infecção e inflamação <sup>12,15,16,17,18,19,20,21</sup>.

## 2. OBJETIVO

O presente trabalho visa a síntese do ATE (benzoato de 3-(tri-n-butilestanil) de N-succinimidila), estudo da radioiodação e conjugação à proteína, entendendo que o desenvolvimento desta metodologia será de grande importância para melhorar o comportamento *in vivo* de proteínas radioiodadas como anticorpos monoclonais intactos, seus fragmentos e também peptídeos para diagnóstico e terapia de diferentes doenças.

Estudar as condições de marcação do peptídeo quimiotático sintético N-formil-norleucil-leucil-fenilalanil-norleucil-tirosil-lisina (fNleLFNleYK) com radioiodo, por via indireta utilizando o grupo prostético estanilado ATE radioiodado, bem como por via direta, visando obter um radiofármaco com estabilidade *in vitro* e *in vivo* para uso em medicina nuclear no diagnóstico de focos de inflamação e infecção.

O trabalho apresenta como contribuição inédita os estudos comparativos de distribuição biológica entre o peptídeo quimiotático marcado por via direta e indireta.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Iodo

O iodo apresenta número atômico (Z) 53 e o isótopo estável, o  $^{127}\text{I}$ , com 74 nêutrons, ocorre com 100% de abundância na natureza. Pode gerar mais de 30 isótopos radioativos, com tempos de meia-vida entre frações de segundo ( $^{142}\text{I}$ ) e mais de 10 milhões de anos ( $^{129}\text{I}$ ). Os radioisótopos com menos nêutrons que o iodo estável decaem por captura eletrônica ou emissão de pósitron ( $\beta^+$ ) enquanto aqueles que apresentam excesso de nêutrons em relação ao isótopo estável decaem por emissão de nêutron ( $\beta^-$ )<sup>7,22,23</sup>.

Com relação às características físico-químicas do iodo sabe-se que este forma ligação covalente forte com o carbono. A força de ligação aumenta do alquil (222 KJ/mol), para aril (268 KJ/mol) e para vinil (297 KJ/mol). A eletronegatividade do iodo (2,66) e do carbono (2,55) são semelhantes na escala de Pauling. Deste modo, a polarização das ligações carbono-iodo e carbono-carbono também são semelhantes. O raio de Van der Waal do iodo (2,15 Å) é similar ao do grupamento metila (2,00 Å). Logo, o iodo pode substituir grupamentos alquil pequenos sem distorção esteroeletrônica excessiva<sup>7</sup>.

A contribuição do iodo e de grupamentos alquil na lipofilicidade de pequenas moléculas é bastante diferente. A substituição do iodo no lugar de uma metila ou ainda etila promove grande aumento na lipofilicidade. A lipofilicidade relativa pode ser uma determinante crítica na atividade biológica, particularmente *in vivo*, e seu aumento pode ser favorável ou desfavorável. Outros fatores, como a entrada do radioiodo em posição relacionada com a interação ao receptor, também podem influenciar a atividade biológica<sup>7</sup>.

Aproximadamente 30 miligramas de iodo estável ( $^{127}\text{I}$ ) está normalmente presente na glândula tireóide de um adulto normal. A falta de iodo no organismo é a causa do bócio nos humanos<sup>22</sup>. O estudo da glândula tireóide com radiotraçador foi o primeiro procedimento clínico importante em medicina nuclear e gerou um fundamental estímulo para a criação e rápido desenvolvimento desta especialidade médica.<sup>22</sup>

Os radioisótopos de iodo mais utilizados para marcação são  $^{125}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$  e  $^{131}\text{I}$  e atualmente os radioisótopos  $^{124}\text{I}$  e  $^{122}\text{I}$  têm sido pesquisados para aplicação clínica<sup>22</sup>. Algumas vezes a radioiodação de moléculas biologicamente importantes pode promover alteração nas suas biodistribuições<sup>7,24</sup>.

O  $^{123}\text{I}$  apresenta características ideais para procedimentos *in vivo*, como tempo de meia-vida de 13,3 horas e emissão gama principal de 159 keV (84%), proporcionando ótima eficiência de detecção pelas câmaras de cintilação (câmaras-gama). Emite RX característico com energia idêntica ao emitido pelo  $^{125}\text{I}$  (27,2 – 31,7 keV). Decai por captura eletrônica, não emite radiação particulada e é sendo considerado o radioisótopo ideal para imagem da tireóide e estudo de captação da glândula<sup>7,22,23</sup>.

O  $^{131}\text{I}$  foi usado quase que exclusivamente por duas décadas para imagem e quantificação da captação da glândula tireóide<sup>22</sup>. Emite partículas  $\beta^-$  com energia alta (máximo de 606 keV, 87%) e gama detectável (364 keV, 82%)<sup>23</sup>. As propriedades nucleares deste radioisótopo o tornam útil para aplicações terapêuticas. A emissão gama de 364 keV é relativamente alta para a interação com os cristais de cintilação das câmaras-gama e sistemas colimadores. O tempo de meia-vida relativamente longo (8,06 dias) resulta em altas doses de radiação absorvida em comparação com o  $^{123}\text{I}$ . Fótons de alta energia (637, 722 keV) acompanham 12% das desintegrações e impedem, em parte, a resolução espacial e contraste dos processos de imagem<sup>7</sup>.

O  $^{125}\text{I}$  apresenta tempo de meia-vida de 60,14 dias, emissão gama de 35,4 keV e não emite radiação particulada. Decai por captura eletrônica e emite RX característico com energia entre 27,2 – 31,7 keV<sup>23,25</sup>. É utilizado nos testes *in*

*vitro* de radioimunoensaio e também na braquiterapia encapsulado na forma de sementes que são implantadas no paciente para irradiação localizada <sup>22</sup>.

Originalmente, o <sup>124</sup>I era visto apenas como a impureza radionuclídica das preparações comerciais de <sup>123</sup>I. Sua presença nessas preparações resulta em aumento da dose de radiação e devido a seus fótons gama de 602 keV e 722 keV, gera uma degradação na qualidade da imagem. Porém, atualmente, existe interesse por métodos adequados de produção deste radioisótopo propiciando sua aplicação clínica <sup>22</sup>.

O <sup>122</sup>I, produzido por gerador de radionuclídeo, apresenta tempo de meia-vida de 3,6 minutos, decai por emissão de pósitron (77%) e emissão gama de 564 keV (18,4%) <sup>23,26</sup>. Sua aplicação está sendo proposta para determinação de taxas de metabolismo e imagens de biodistribuição em tempos curtos de fluxo sanguíneo de órgãos selecionados. A produção do <sup>122</sup>Xe (pai do <sup>122</sup>I) é dependente de aceleradores de alta energia e, portanto, pode influenciar a disponibilidade, desenvolvimento e aplicação deste radioisótopo de iodo <sup>22</sup>.

Os radioisótopos de iodo são comumente obtidos na forma de sal (NaI), podendo serem utilizados sem qualquer modificação para reações de substituição nucleofílica. Já as radioiodações eletrofílicas requerem a oxidação do iodo <sup>7</sup>.

Normalmente, a forma química do radioiodo para a marcação é o ânion iodeto livre de carregador (com alta atividade específica) <sup>22</sup>.

### 3.2. Radioiodação

Existem várias metodologias para radioiodação, entre elas, a troca isotópica, a substituição nucleofílica, a substituição eletrofílica aromática, a adição a duplas ligações, a desmetalização e a conjugação<sup>1,7</sup>.

A troca isotópica pode ser realizada em um solvente adequado ou, quando o composto não permitir a troca em solvente, esta pode ser feita em fusão ou fase sólida. Neste caso, a substância deve ser estável em seu ponto de fusão e a constante dielétrica favorável à dissolução do radioiodo. Essas limitações podem ser superadas com a utilização de acetamida, um sólido de baixo ponto de fusão estável em altas temperaturas. Outra variedade da metodologia de troca isotópica, para a marcação de compostos arílicos, é a troca nucleofílica catalisada por cobre (I) em condições de redução<sup>1,7,22</sup>.

A substituição nucleofílica não isotópica é uma técnica útil para a marcação de compostos alifáticos e aromáticos, possibilitando a obtenção de compostos radiomarcados com alta atividade específica<sup>1,7,22</sup>.

A troca do halogênio em sistemas aromáticos é, muitas vezes, difícil de ser realizada. No entanto, a troca de bromo por iodo, em compostos alifáticos, via substituição nucleofílica ou técnica em fusão têm o potencial de gerar compostos radioiodados<sup>1,7,22</sup>.

Uma reação clássica para a introdução do radioiodo em compostos como benzeno, naftalina ou outro composto aromático contendo inicialmente uma amina primária envolve a utilização da reação de Sandmeyer. Quando o grupo funcional está estável ou protegido durante a citada reação, a amina primária é diazotada e subsequente substituída pelo radioiodo via substituição nucleofílica. Esta metodologia de radioiodação é régio-específica e denominada dediazotação. A reação de Gatterman, uma modificação da reação clássica, com a incorporação de bronze e cobre como catalisadores e a reação de Wallach que resulta na formação de triazeno, podem ser aplicadas na radioiodação de compostos aromáticos que não apresentam anel aromático ativado<sup>1,22,24</sup>. Esta

metodologia apresenta algumas desvantagens, sendo a principal o fato de geralmente obter-se baixo rendimento radioquímico <sup>24</sup>.

As técnicas descritas até aqui não podem ser utilizadas para marcação de proteínas com radioiodo já que envolvem condições de reação desfavoráveis às proteínas tais como temperaturas elevadas e presença de solventes orgânicos.

Vários procedimentos de radioiodação foram desenvolvidos para marcar proteínas envolvendo condições de reação favoráveis à manutenção da integridade protéica e também considerando a natureza química dos grupos aromáticos presentes nas proteínas. Vale ressaltar que o mais comum é a reação entre espécies positivas de iodo e o aminoácido tirosina ou, em menor extensão, o aminoácido histidina, como mostra a FIG. 1, num procedimento comumente denominado marcação direta <sup>1</sup>.

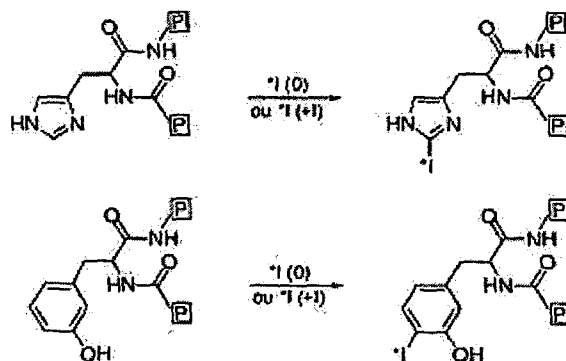


FIGURA 1. Reação entre espécie positiva de iodo e os aminoácidos histidina (acima) e tirosina (abaixo).

Estudos sobre o mecanismo da reação entre o iodo e a tirosina ou outros fenóis, em quantidades estequiométricas, indicaram que o ânion fenolato é o alvo de ataque pelo iodo oxidado <sup>1</sup>. O agente oxidante a ser utilizado deve ser compatível, não deve promover a desnaturação da proteína e deve ser de fácil separação após marcação <sup>24</sup>.

Quando a marcação de proteínas começou a ser realizada promovia-se a radioiodação de fenóis com iodo molecular. No entanto, foram desenvolvidas outras metodologias devido a algumas desvantagens como máxima pureza

radioquímica de apenas 50%, perda de radioatividade na etapa de oxidação o que aumenta a exposição ao operador e a volatilidade do iodo molecular que aumenta os riscos relacionados ao processo de marcação <sup>1</sup>.

Em 1958 McFarlane <sup>27</sup> publicou uma metodologia desenvolvida para pequenas proteínas que utilizava monocloreto de iodo (ICl) como reagente. A ligação carbono-iodo, neste reagente, é polarizada com carga parcial positiva no iodo, com rendimento radioquímico teórico alto. O mecanismo de iodação é substancialmente substituição eletrofílica porque o iodo eletrofílico ataca o íon fenóxido seguido pela perda lenta do próton. A substituição eletrofílica não é a única reação passível de ser realizada com o reagente ICl, sendo também possível a adição eletrofílica à dupla ligação especialmente para radioiodação de ácidos graxos e derivados <sup>1,7</sup>.

Uma das técnicas mais utilizadas para a radioiodação de proteínas foi desenvolvida por Greenwood e colaboradores <sup>28</sup>. Esta emprega a cloramina T (sal sódico de N-clorotoluenosulfonamida) como agente oxidante do iodeto. A cloramina T é um agente oxidante forte apresentando, portanto, como desvantagem, a exposição do composto a ser marcado às condições drásticas de oxidação, o que possibilita a ocorrência de reações indesejáveis como cloração, oxidação de grupos tiol, tioéter e quebra de ligação triptofanil de peptídeos. A técnica do "iodobeads" é uma versão em fase sólida da técnica da cloramina T <sup>1,24</sup>.

Outro agente oxidante da família da cloramina T também empregado na radioiodação é o iodogen (1,3,4,6-tetracloro-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -difenilglicoluril). Comparada com a cloramina T e o monocloreto de iodo (ICl), esta técnica demonstrou-se similar quanto ao rendimento radioquímico, porém gera menores danos oxidativos. O iodogen é insolúvel em água e pode ser utilizado como um filme impregnado na parede do frasco de reação, permitindo a marcação com mínimo contato entre o composto orgânico e o agente oxidante <sup>1,24,29</sup>.

Outra técnica que pode ser aplicada na radioiodação de proteínas está baseada na utilização de uma célula eletrolítica para oxidar o iodeto. Esta

apresenta como vantagem o fato de não expor o material a ser radioiodado às condições severas de oxidação, porém requer a utilização de equipamento específico<sup>1, 30</sup>.

As enzimas da família peroxidases, na presença de peróxido de hidrogênio, promovem a iodação de tirosinas. Em particular a lactoperoxidase é utilizada para radioiodação de proteínas. As histidinas também podem ser radioiodadas pela lactoperoxidase, porém em menor extensão que as tirosinas. A técnica enzimática é uma alternativa menos agressiva para a radioiodação de proteínas<sup>1, 29</sup>. Porém, o uso rotineiro parece não ser interessante uma vez que pode ocorrer a radioiodação da própria enzima, e ainda, as enzimas são mais caras que os agentes orgânicos comumente utilizados (cloramina T e iodogen)<sup>24</sup>.

Outros métodos de radioiodação envolvendo a oxidação direta do iodeto de sódio *in situ* utilizando agentes oxidantes como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HNO<sub>3</sub>, entre outros, também foram avaliados como capazes de promover a iodação de compostos com rendimento radioquímico teórico de 100%<sup>1</sup>.

É adequado salientar que o método mais comumente utilizado para radioiodação de proteínas envolve a iodação oxidativa utilizando-se cloramina T, iodogen ou lactoperoxidase como oxidantes, ou seja, marcação direta. Este método é aplicável apenas às proteínas e peptídeos contendo pelo menos um resíduo de tirosina em sua estrutura. Conseqüentemente, é impossível por este método clássico, a radioiodação de proteínas e peptídeos que não apresentem aminoácidos anelares em sua estrutura. Outra desvantagem associada às proteínas radioiodadas pelo método direto é a rápida desiodação *in vivo*. Essa desiodação relaciona-se, provavelmente, com a interface de ligação do iodo na proteína. A incorporação do iodo nos resíduos de tirosina torna os mesmos bastante semelhantes estruturalmente aos hormônios da tireóide, que são passíveis de desiodação pela ação de enzimas específicas<sup>2, 22</sup>.

Uma alternativa para marcação direta é a conjugação da proteína a uma molécula radioiodada (grupo prostético), também conhecida como método indireto de marcação. Um grupo prostético para radioiodação contém algum tipo

de grupamento aromático ativado para receber o agente marcador e uma ponte conectante para ligar-se covalentemente à proteína a ser marcada. Desta maneira é possível marcar o grupo prostético e depois acoplá-lo à molécula alvo em duas reações separadas, evitando a exposição da proteína às condições de oxidação. A reação de conjugação do grupo prostético marcado à molécula alvo deve ser eficiente para evitar a perda do marcador. Existe também a possibilidade de ligar-se o grupo prostético à molécula alvo e depois realizar a marcação <sup>1,24</sup>.

A conjugação é mais difícil de ser conduzida, envolve várias etapas e ainda resulta em baixos rendimentos radioquímicos quando comparada com a marcação direta. No entanto, a conjugação oferece alguns benefícios que não podem ser conseguidos com a marcação direta, como: (I) um método de introdução do radioiodo em proteínas que não podem ser marcadas diretamente; (II) um método de estabilização do radiomarcado contra desiodação *in vivo* promovida por enzimas; (III) um método de marcação que não expõe a proteína a agentes oxidantes e redutores severos e (IV) um método de marcação que pode potencialmente permitir algum controle da distribuição secundária do radioiodo <sup>24</sup>.

O grupo funcional mais comumente utilizado para conjugação de moléculas radioiodadas às proteínas é o grupo amino, geralmente os grupos  $\epsilon$ -amino de resíduos de lisina. Compostos que contêm grupos funcionais amino reativos, tais como ésteres, imidoésteres, aldeídos e isotiocianatos, têm sido utilizados na conjugação de proteínas <sup>1,24</sup>.

Com relação ao núcleo aromático ativado, alguns grupos prostéticos estudados, como o reagente de Bolton e Hunter, *p*-hidroxifenilpropionato de N-succinimidila <sup>31</sup>, o reagente de Wood, *p*-hidroxibenzimidato <sup>32</sup> e outros como o *p*-hidroxibenzaldeído <sup>33</sup> e o *p*-hidroxibenzacetaldeído <sup>34</sup>, utilizam anéis aromáticos fenólicos para a radioiodação eletrofilica, promovendo a substituição com entrada de um iodo em posição orto ao radical hidroxila. Neste caso, o anel aromático, assim como no método de marcação direta, é suscetível à desiodação *in vivo* (FIG. 2) <sup>4</sup>.

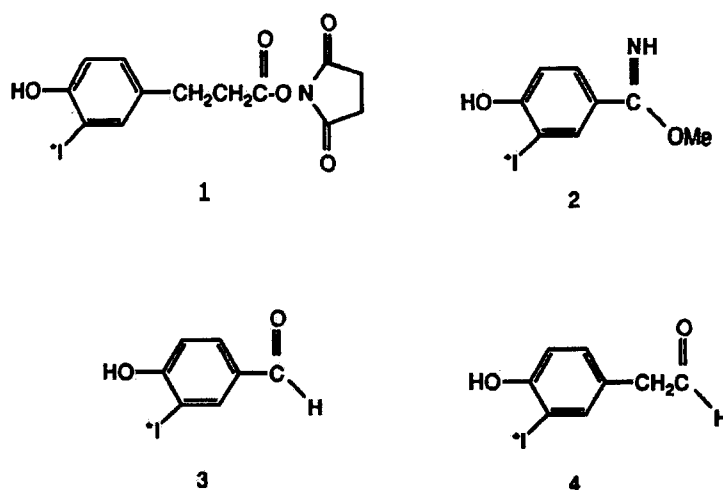


FIGURA 2. Grupamentos prostéticos com anel aromático fenólico: (1) reagente de Bolton-Hunter; (2) reagente de Wood; (3) *p*-hidroxibenzaldeído e (4) *p*-hidroxibenzacetaldeído.

O maior problema das proteínas radioiodadas pelo método direto é a rápida desiodação *in vivo* provocada por várias enzimas específicas. Este problema não aumenta necessariamente a dose de radiação para o paciente, mas a localização da proteína marcada no alvo diminui devido ao aumento da atividade circulante. Pode-se minimizar este problema com a utilização de grupos prostéticos não fenólicos para radioiodação dessas moléculas. A utilização desses grupos prostéticos não fenólicos diminui a semelhança estrutural aos hormônios da tireóide e, portanto, minimiza a desiodação *in vivo* <sup>35</sup>.

Neste sentido foram desenvolvidos alguns precursores organometálicos para radioiodação de proteínas. Esses precursores apresentam metais como boro, mercúrio, estanho, tálio, silício e germânio em estruturas aromáticas e são substituídos pelo radioiodo por meio de reação de iododesmetalção, representada de maneira geral pela equação a seguir (FIG.3)

22,24



FIGURA 3. Reação geral – Iododesmetalção

O uso de organoboratos para radioiodação foi descrito pela primeira vez por Kabalka <sup>36</sup>. Os métodos sintéticos disponíveis atualmente para radioiodação via organoboratos estão baseados em reações de substituição eletrofílica com o radioiodo para a obtenção do radiofármaco desejado <sup>22</sup>.

Os organoestanosos são intermediários versáteis. Os vinilestanosos sofrem rápida radioiododesestanição assim como os vinilboratos quando em presença do radioiodeto de sódio e de um agente oxidante moderado. Outros intermediários como os organotalatos e os organosilicatos também foram pesquisados para a radioiodação de proteínas. Entretanto estudos comparativos com diferentes intermediários organometálicos determinaram que, de maneira geral, os organoestanosos são provavelmente os melhores candidatos <sup>22,24</sup>.

A radioiodação de vários ligantes objetivando a preparação de diferentes agentes de imagem para receptores específicos é empregada de forma ativa em radiofarmácia. Das várias reações de iododesmetalção citadas, a aplicação da reação de iododesestanição para obtenção de compostos régio e estereo-específicos, com alta atividade específica, é proeminente <sup>22,24</sup>.

Estudos incorporando radioiodo e outros radiohalogênios em compostos aromáticos foram desenvolvidos utilizando-se intermediários organometálicos. Estes estudos demonstraram que tais intermediários podem ser usados com rapidez e eficiência para a incorporação de radioiodo em muitos compostos aromáticos diferentes <sup>2,4, 24</sup>.

Os intermediários estanosos, particularmente os trialkilestanosos ( $\text{SnBu}_3$ ,  $\text{SnMe}_3$ ), têm se mostrado atrativos devido à relativa facilidade de preparação e manipulação e alta reatividade com radiohalogênios <sup>2,4</sup>.

Inúmeros trabalhos descrevem a utilização de ésteres hidroxisuccinimídicos de intermediários organoestanosos <sup>2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 24, 37, 38, 39,</sup>

O derivado benzoato de 3-(tri-*n*-butilestanil) de N-succinimidila recebeu de Zalutsky e Narula a denominação de ATE (FIG. 4) <sup>2</sup>.

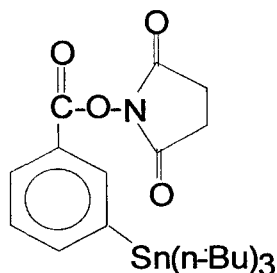


FIGURA 4. Estrutura química do ATE

A radioiodação deste derivado via iododesestanição eletrofílica origina o 3- [<sup>123</sup>/<sup>131</sup>I]iodobenzoato N-succinimidila (SIB) que é posteriormente conjugado à proteína via acilação do resíduo de lisina <sup>2,3,4,5,6,8</sup>.

O SIB desenvolvido é um composto conceitualmente similar ao reagente de Bolton-Hunter. No entanto, duas diferenças estruturais foram incorporadas ao SIB no intuito de torná-lo melhor para aplicação *in vivo*: os dois carbonos entre o anel aromático e o éster ativado foram removidos para aumentar o rendimento de acoplamento à proteína, pois minimiza hidrólise competitiva; além disto, o SIB não apresenta radical hidroxila na posição *orto* ao átomo de iodo, diminuindo assim a semelhança estrutural do sítio da proteína radioiodada aos hormônios da tireóide, para os quais várias enzimas são conhecidas <sup>5</sup>.

Zalutsky e Narula <sup>2</sup> propuseram uma rota sintética para a obtenção do ATE, baseada em grupamentos hidroxisuccinimida, na qual o ácido *m*-Br benzóico é litiado por *n*-BuLi à temperatura reduzida e subseqüentemente transmetalado ao derivado arilestanoso correspondente. A rota sintética, apesar de aparentemente simples, apresenta como principal inconveniente a manutenção de temperatura extremamente reduzida (-100°C) na primeira etapa. Os rendimentos estão, em parte, condicionados às etapas de purificação. O composto ATE obtido permanece estável durante vários meses se conservado à temperatura inferior a -20°C, em clorofórmio e atmosfera de gás inerte.

Outras rotas sintéticas alternativas estão relatadas na literatura para síntese do composto ATE e análogos<sup>3, 4, 41, 42, 43</sup>.

Vários trabalhos realizados demonstraram que o uso do 3- ou 4- iodo benzoato de N-succinimidila (SIB) para marcação de proteínas reduz significativamente a captação na tireóide (o indicador biológico *in vivo* da desalogenação) quando comparado com a marcação direta<sup>2, 4, 9, 10, 35, 38,41, 44, 45</sup>. Em alguns casos, as proteínas marcadas utilizando SIB também apresentaram melhores características de ligação *in vitro*<sup>2, 10, 45</sup>.

Assim como os derivados 3-iodobenzoato quando usados para marcar proteínas, os derivados 5-iodo-piridina-carboxilato também promovem estabilidade *in vivo* se comparados com a marcação direta. Estudos utilizando-se a mIBG (meta iodobenzilguanidina) como precursor para obtenção de derivados 3-iodobenzoato têm contribuído para demonstrar que o iodo na posição *meta* de compostos aril não fenólicos promove resistência à desiodação *in vivo* e mínima transformação<sup>35</sup>.

### 3.3. Inflamação/Infecção

A reação inflamatória é conhecida há muito tempo. Na antiguidade, os gregos já a definiam pelos seus sinais e sintomas típicos, considerados sinais cardinais: calor, rubor, tumor e dor<sup>46, 47</sup>.

A reação dos tecidos vascularizados a um agente agressor, denominada inflamação é caracterizada pela saída de líquidos e de células do sangue para o interstício. Apesar de suas características serem muito variadas, os mecanismos de aparecimento são comuns. O agente inflamatório age sobre o tecido e induz a liberação de mediadores que, ao agirem nos receptores existentes nas células da microcirculação e nos leucócitos, produzem aumento da permeabilidade vascular e exsudação de plasma e de células sanguíneas para o interstício. Cessada a ação do agente inflamatório, reduz-se a liberação dos

mediadores, a microcirculação recupera o estado hemodinâmico original e o líquido e as células exsudadas voltam à circulação sanguínea geralmente pelos vasos linfáticos. Se há necrose, o tecido destruído é fagocitado e logo depois surgem os fenômenos de cicatrização ou de regeneração, tudo dependendo da extensão da lesão e do órgão acometido. O processo inflamatório, portanto, é um fenômeno essencialmente dinâmico, razão pela qual seu aspecto morfológico se modifica com o tempo <sup>15, 46</sup>.

Quando a inflamação ocorre devido à invasão por microrganismos denomina-se infecção. Pode haver infecção sem inflamação, como ocorre em pacientes severamente imunodeprimidos. Por outro lado, também pode haver inflamação sem infecção, quando o dano tecidual não foi causado por microrganismos <sup>15</sup>.

A inflamação é dividida em padrões agudo e crônico. A inflamação aguda tem uma duração relativamente curta e suas principais características são a exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas (edema) e a migração de leucócitos, predominantemente células polimorfonucleadas (PMNs)<sup>15,46</sup>. A inflamação aguda possui três fases <sup>48</sup>:

- a. alteração do calibre dos vasos com conseqüente aumento do fluxo sanguíneo
- b. alterações estruturais dos vasos para que as proteínas plasmáticas e leucócitos deixem a circulação
- c. migração dos leucócitos da corrente sangüínea e seu acúmulo no local da lesão.

A inflamação crônica, por outro lado, tem uma duração maior e associa-se, em termos histológicos, com a presença de células mononucleadas como linfócitos, monócitos e macrófagos e com a proliferação de vasos sanguíneos e de tecido conjuntivo <sup>15, 46</sup>.

O conjunto de eventos que ocorre durante uma resposta inflamatória depende de muitos fatores, como a natureza do estímulo, sua porta de entrada e a característica do hospedeiro. Nem toda inflamação é mediada pelo sistema imunológico adquirido. Algumas substâncias estranhas podem ativar diretamente os neutrófilos e provocar inflamação aguda mediada por neutrófilos, sem a

participação dos linfócitos. De modo geral, os participantes da resposta inflamatória são parede vascular, células inflamatórias – células sanguíneas circulantes (neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, basófilos e plaquetas) e células residentes nos tecidos (mastócitos e macrófagos) – fibras colágenas e elásticas e membrana basal. As alterações inflamatórias se dão por mediadores químicos também chamados de citocinas <sup>46, 47, 49, 50, 51</sup> e que podem ser classificados em 4 grupos <sup>49</sup>:

1. mediadores com propriedades vasoativas e de contração do músculo liso. Ex.: Histamina, prostaglandinas e leucotrienos.
2. os que atraem outras células ou também chamados de fatores quimiotáticos, as quimiocinas. Ex.: Fração C5a do sistema complemento.
3. enzimas. Ex.: Proteinases
4. proteoglicanos. Ex.: Heparina.

As citocinas originam-se no citoplasma de células, ligam-se a receptores específicos na célula alvo e podem estimular a liberação de outros mediadores. Possuem vida curta, têm efeitos em um ou diversos alvos ou ainda em diferentes células e também apresentam potencial de causar efeitos danosos <sup>46</sup>.

Praticamente qualquer tipo de agressão para um tecido sólido, seja por traumatismo fechado, queimadura térmica ou química, laceração, infecção microbiana ou outras causas, tende a ser acompanhado de rápida dilatação dos pequenos vasos sanguíneos nos tecidos lesados ao seu redor. Esta reação vascular (vasodilatação) pode ocorrer dentro de poucos minutos após uma lesão aguda e envolve arteríolas, capilares e vênulas, resultando em aumento do fluxo sanguíneo local na área lesada. Com a dilatação dos vasos, as células endoteliais que revestem alguns destes vasos sofrem retração ativa. A retração resulta em aumento da permeabilidade da parede da vênula, permitindo ao líquido rico em proteínas do plasma extravasar através das lacunas, atravessar a membrana basal endotelial e fluir para o espaço extracelular do tecido circundante <sup>46, 47, 49, 51</sup>.

Na maioria dos casos, a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular constituem respostas reversíveis, cuja extensão e duração dependem da

natureza, gravidade e tipo de lesão. Em conjunto, são responsáveis, em grande parte, pelos achados clínicos de vermelhidão (eritema), calor e edema que acompanham quase todos os tipos de lesão dos tecidos sólidos <sup>46,49</sup>. Estas alterações fisiológicas são benéficas, de várias maneiras, para o indivíduo. Por exemplo, o aumento do suprimento sanguíneo local ajuda a melhorar o suprimento de oxigênio, plaquetas e fatores da coagulação na área lesada, o que, por sua vez, ajuda a estabilizar os tecidos lesados e facilita a cicatrização e reparo. Além disso, o líquido vascular que extravasa para os tecidos pode imediatamente diluir ou dissolver substâncias nocivas e trazer muitas das proteínas antimicrobianas do soro, ajudando a fornecer rapidamente fatores de defesa inespecíficos nos locais necessários <sup>49</sup>.

A consequência mais importante da resposta vascular é que ela promove o contato entre os leucócitos circulantes e o endotélio venular. As células que revestem as vênulas pós-capilares estão exclusivamente adaptadas a expressar altos níveis de certas moléculas de adesão na superfície quando ocorre lesão do tecido circundante, como parte de um processo denominado ativação da célula endotelial <sup>47, 49, 51</sup>.

Embora praticamente todos os tipos de leucócitos contribuam para a defesa do indivíduo, três tipos desempenham papéis particularmente proeminentes. Os neutrófilos e a linhagem de monócitos e macrófagos são células fagocíticas, que atuam ao fagocitar microrganismos, restos celulares e outros materiais particulados. Podem atuar em cooperação com os linfócitos, mas também são capazes de reconhecer e matar diretamente muitos patógenos, de modo que constituem os efetores celulares mais importantes do sistema imunológico inato. O grupo que compreende os linfócitos e células relacionadas, possui pouca capacidade fagocítica, mas realiza uma série de outras reações protetoras, coletivamente conhecidas como resposta imunológica. Os linfócitos são decisivos em todos os aspectos da imunidade adquirida. <sup>47, 49, 51</sup>.

Os neutrófilos formam um exército de fagócitos circulantes, equipados para responder rapidamente e em grande número toda vez que houver alguma lesão tecidual. As células maduras, também conhecidas como neutrófilos

segmentados (segs) ou leucócitos polimorfonucleares (PMN), podem ser facilmente identificadas pelo seu núcleo multilobulado característico e pelos abundantes grânulos em seu citoplasma que armazenam agentes bactericidas e enzimas lisossômicas até o momento em que se tornam necessários para destruir um microrganismo fagocitado <sup>49</sup>.

Se durante a sua circulação os neutrófilos forem levados para um local de lesão ou infecção, estes aderem rapidamente ao endotélio, migram através das paredes dos vasos e invadem os tecidos afetados, onde podem acumular-se em grande número. O processo de aderência dos neutrófilos à parede vascular é denominado marginação e ocorre em três fases. A primeira fase é mediada pelas selectinas (O, E e L) que estabelecem o contato inicial de adesão entre o neutrófilo e a parede vascular. Entretanto, o neutrófilo continua rolando ao longo da parede vascular durante esta fase, impelido pela força do fluxo sanguíneo <sup>47, 49, 51</sup>.

O rolamento do neutrófilo ao longo da parede das vênulas aumenta a exposição das células a um grupo variado de substâncias, coletivamente conhecidas como fatores quimiotáticos dos leucócitos, que podem ser expressos pelo endotélio ativado ou que difundem no sangue a partir do tecido lesado. Estes fatores ligam-se a receptores presentes sobre a superfície dos neutrófilos e deflagram a segunda fase denominada fase de ativação da ligação endotelial <sup>47, 49, 51</sup>.

Em geral os fatores quimiotáticos são substâncias que indicam mais a presença da lesão do que a sua causa. Esses fatores podem ser endógenos, incluem fragmentos de fibrina ou colágeno, fatores solúveis liberados por plaquetas ativadas e mastócitos e certos subprodutos da cascata do complemento; ou podem ser exógenos, constituem produtos exclusivos do metabolismo bacteriano, dos quais os mais notáveis são os oligopeptídeos N-formilados contendo resíduos de N-formilmetionina ou N-formilnorleucina. Este aminoácido modificado está presente na extremidade amino-terminal das proteínas da maioria das bactérias, mas não ocorre nas proteínas de origem humana. Cada fator quimiotático é reconhecido por um receptor específico

existente sobre a superfície dos leucócitos. Cada neutrófilo possui grande número de receptores para diferentes fatores quimiotáticos. O contato com esses fatores desencadeia alterações nas propriedades de adesão dos neutrófilos <sup>47, 49, 51</sup>.

O efeito mais importante dos fatores quimiotáticos consiste em induzir alterações nas configurações das integrinas sobre a superfície dos leucócitos, permitindo sua ligação a ligantes glicoproteicos específicos sobre o endotélio. Essas alterações iniciam a fase final de marginação do neutrófilo que é a fase mediada por integrinas. Resultando em contatos moleculares estáveis e prolongados, que impedem o movimento dos neutrófilos e fazem com que fiquem aderidos ao endotélio <sup>47, 49, 51</sup>.

Uma vez fixado, o neutrófilo abandona a vênula e migra para o tecido adjacente, num processo denominado migração. Os neutrófilos deslocam-se ao longo do gradiente de concentração dos fatores quimiotáticos até alcançar o foco da lesão ou infecção. A migração e a quimiotaxia são facilitadas, em parte, pela ligação de integrinas da superfície dos neutrófilos à fibronectina e outros componentes da matriz extracelular <sup>47, 49, 51</sup>.

Ao alcançar o local lesado, os neutrófilos começam o processo de ingestão de qualquer bactéria, restos celulares ou material particulado estranho na área <sup>49, 51</sup>. As partículas englobadas pelo neutrófilo são inicialmente contidas dentro de vacúolos delimitados por membrana, os fagossomas. Após o engolfamento, os grânulos presentes nos lisossomos do neutrófilo começam a fundir-se com cada fagossoma, liberando seu conteúdo, num processo conhecido como desgranulação. Os grânulos dos neutrófilos contêm uma série de enzimas e outras substâncias com capacidade de degradar bactérias ou dissolver outros materiais englobados <sup>49,51</sup>. A associação entre o fagossomo e as enzimas lisossômicas dá origem ao fagolisossomo. Dentro desta estrutura o microrganismo será destruído e os restos serão eliminados da célula como corpo residual <sup>51</sup>.

Quase todos os tecidos, órgãos e cavidades serosas abrigam uma população de fagócitos mononucleares pertencentes a uma única linhagem,

conhecida como sistema mononuclear fagocítico. Os monócitos não são muito abundantes na circulação periférica e uma vez estabelecidos nos tecidos são denominados macrófagos teciduais. Como outros leucócitos, os monócitos no sangue circulante podem ser atraídos para um local de lesão ou infecção através de processo de fixação endotelial em três fases, que é essencialmente idêntico àquele descrito para os neutrófilos e que utiliza muitas das mesmas proteínas de adesão e fatores quimiotáticos <sup>47, 49, 51</sup>.

O processo de ativação do macrófago tecidual é caracterizado por rápido aumento no metabolismo, motilidade e atividade fagocítica. Os macrófagos ativados são ligeiramente maiores do que os inativos devido, principalmente, ao aumento do volume citoplasmático. Muitas proteínas novas são sintetizadas com o processo de ativação <sup>49</sup>. Após a ativação, os macrófagos passam a secretar uma ampla variedade de produtos biologicamente ativos que são importantes mediadores da destruição tecidual, da proliferação vascular e da fibrose características da inflamação crônica. Alguns destes produtos são tóxicos para as células ou para a matriz extracelular, alguns geram o ingresso de outros tipos celulares e outros, por sua vez, induzem a proliferação de fibroblastos e a deposição de colágeno <sup>47, 49, 51</sup>.

Muito embora os neutrófilos sejam a marca registrada da inflamação aguda, muitas formas de inflamação crônica continuam a apresentar grande número de neutrófilos; estes são induzidos pela persistência de bactérias, por mediadores produzidos por macrófagos ou ainda por células necróticas <sup>46</sup>.

#### **3.4. Radiofármacos para imagem de inflamação/ infecção: mecanismos de ação**

Com uma taxa anual de mortalidade ao redor de 35% em todo o mundo, as infecções representam uma significativa preocupação <sup>52</sup>. A rápida identificação, localização e delineamento anatômico de um foco oculto de infecção e inflamação representa um importante passo para conduta terapêutica em pacientes em estado crítico. Esses processos inflamatórios e infecciosos

podem ser detectados por técnicas como tomografia computadorizada (CT), ressonância magnética (RM) e ultrasonografia (US). No entanto, essas técnicas estão baseadas em mudanças anatômicas para definir a lesão e, portanto, não podem ser utilizadas para detectar processos em fase inicial de desenvolvimento porque não há mudanças anatômicas substanciais nesse período <sup>12,13,14</sup>.

A imagem cintilográfica é um excelente método não-invasivo na pesquisa de corpo inteiro, permitindo a determinação tanto da localização quanto do número de focos de infecção e inflamação, baseado em mudanças funcionais dos tecidos <sup>12</sup>.

O radiofármaco ideal para diagnóstico de infecção e inflamação deve apresentar alta especificidade e rápida captação no foco, sem se acumular nos tecidos normais, apresentar baixa toxicidade e um rápido clareamento sanguíneo, de modo que a nitidez da imagem faculte o parecer do médico nuclear. Além disso, deve ser de fácil e rápida preparação, boa disponibilidade e baixo custo, além de promover a diferenciação entre infecção e inflamação não microbiana <sup>12, 15</sup>. Não existe um radiofármaco que apresente todas as características ideais, portanto na prática, a aplicação dos radiofármacos para focos de infecção/inflamação está associada à disponibilidade e custo dos mesmos bem como à suspeita diagnóstica.

Os radiofármacos convencionais rotineiramente usados na clínica para determinação de foco de infecção e inflamação são: citrato de <sup>67</sup>Ga, leucócitos marcados com <sup>111</sup>In ou <sup>99m</sup>Tc e imunoglobulinas humanas policlonais (IgG) marcadas com <sup>111</sup>In ou <sup>99m</sup>Tc <sup>12, 15, 52</sup>. As limitações destes radiofármacos convencionais encorajaram a pesquisa de novos agentes com características próximas do radiofármaco ideal <sup>12, 15</sup>.

O aumento do fluxo sanguíneo, permeabilidade vascular e transudação são processos que podem ser utilizados para o acúmulo não específico dos traçadores. Deve-se enfatizar que todos os radiofármacos acumulam-se no foco de inflamação/infecção, pelo menos em parte, devido a processos não específicos

O processo específico de acúmulo compreende um número de possíveis interações entre o radiofármaco e o alvo, como por exemplo, ligação a receptores e ligação antígeno-anticorpo. A especificidade pode estar ligada a diferentes mecanismos. Entre eles citam-se <sup>15</sup>:

- a. marcação de leucócitos *in vitro* ou *in vivo*: os leucócitos ligam-se preferencialmente ao foco de inflamação/infecção por quimiotaxia e podem, portanto, ser usados para transportar radionuclídeos para a área inflamada. Eles se movem maciçamente para o foco e se concentram no local em grande número;
- b. os mediadores vasoativos ou quimiotáticos do processo inflamatório podem ser alcançados *in vivo* por radiofármacos ou podem ser radiomarcados *in vitro* e injetados;
- c. marcação de antibióticos: este mecanismo pode ser dito como o que gera a verdadeira imagem para infecção, uma vez que os radiofármacos usados teoricamente ligam-se especificamente ao microrganismo alvo;
- d. um mecanismo completamente diferente de acúmulo no foco inflamatório acontece usando-se a flúor-2- desoxi-D-glicose-<sup>18</sup>F (FDG-<sup>18</sup>F). Este mecanismo está baseado no aumento da captação de glicose pelos granulócitos infiltrados e macrófagos teciduais com metabolismo aumentado. O acúmulo da FDG em células com metabolismo de glicose aumentado é específico. No entanto, a FDG também é captada, por exemplo, por células tumorais (que também apresentam metabolismo de glicose aumentado). Portanto, a FDG não é específica para processos infecciosos e inflamatórios.

### 3.4.1. Diferentes radiofármacos utilizados para inflamação/infecção

#### a) Citrato de <sup>67</sup>Ga

Pode ser utilizado para diferentes condições patológicas, principalmente infecções. Quando injetado na circulação o citrato de <sup>67</sup>Ga liga-se à transferrina circulante e este complexo chega até o foco de infecção/inflamação devido ao aumento da permeabilidade vascular <sup>53, 54</sup>.

De maneira geral acredita-se que a transferrina leve <sup>67</sup>Ga até o abscesso. Uma vez no abscesso o <sup>67</sup>Ga pode ser transferido da transferrina para

a lactoferrina (LF), ferritina ou proteínas sideróforas. A lactoferrina apresenta alta afinidade pelo  $^{67}\text{Ga}$  e pode removê-lo da transferrina. Esta proteína está presente nos grânulos secundários dos leucócitos PMNs e é expulsa do grânulo quando há ataque bacteriano. A lactoferrina presente no foco pode se ligar a receptores LF presentes nos monócitos ou macrófagos e levar o  $^{67}\text{Ga}$  até a ferritina intracelular. A ferritina tem grande afinidade pelo  $^{67}\text{Ga}$ . Os microrganismos patogênicos presentes num abscesso purulento são provavelmente o fator mais importante para o acúmulo do  $^{67}\text{Ga}$ , pois a bactéria pode capturar uma quantidade significativa de  $^{67}\text{Ga}$ . Acredita-se que as proteínas sideróforas estejam envolvidas nesta captura, uma vez que estas são sintetizadas e secretadas por bactérias para seqüestrarem  $\text{Fe}^{+3}$ . As proteínas sideróforas são moléculas pequenas (500 – 1000 Da) que apresentam extrema afinidade pelo íon  $\text{Fe}^{+3}$  e também pelo  $^{67}\text{Ga}$ . Portanto, podem transportar  $^{67}\text{Ga}$  para dentro dos microrganismos por meio de um mecanismo saturável e energia dependente <sup>55</sup>.

Ocorre captação fisiológica do citrato de  $^{67}\text{Ga}$  no fígado, ossos, medula óssea e intestinos. Este agente é parcialmente excretado pelos rins (especialmente durante as primeiras 24 horas após a injeção) e também via trato-gastrintestinal <sup>14</sup>.

A cintilografia tem grande sensibilidade tanto para infecção aguda como crônica e inflamação. Entretanto, existem algumas limitações para a sua aplicação clínica <sup>14</sup>.

A especificidade deste traçador é baixa devido à excreção via trato-gastrintestinal e também acúmulo em tecidos malignos. Imagens ótimas somente são adquiridas após 72 horas da injeção. Estas características desfavoráveis em combinação com o desenvolvimento de novos radiofármacos para infecção limitaram a indicação clínica de cintilografia com citrato de gálio-67 a certos casos como suspeita de infecção pulmonar e osteomielite crônica <sup>15</sup>.

#### b) Imunoglobulinas

Inicialmente havia a hipótese de que a imunoglobulina humana policlonal era retida no foco inflamatório devido a interação com receptores  $\text{Fc-}\gamma$  expressos pelos leucócitos infiltrados <sup>56</sup>. Mais tarde, estudos demonstraram que a imunoglobulina humana policlonal radiomarcada acumula-se no foco infeccioso

através de extravazamento não específico devido ao aumento da permeabilidade vascular no local <sup>57</sup>.

A imunoglobulina humana policlonal pode ser marcada com <sup>111</sup>In ou com <sup>99m</sup>Tc. Ambos agentes apresentam clareamento sanguíneo lento e captação no fígado, baço e rins. Os ensaios clínicos destes agentes demonstraram a excelente capacidade de localização de infecção e inflamação músculo-esquelética e também bons resultados para infecção pulmonar, principalmente em pacientes imunodeprimidos, e inflamação abdominal <sup>15,58</sup>. A pequena sensibilidade para diagnóstico de endocardite e lesões vasculares em geral deve-se ao alto nível de atividade circulante por longo tempo. A limitação geral da imunoglobulina humana policlonal radiomarcada é o longo tempo entre a injeção e a aquisição da imagem (24 a 48 horas) <sup>15</sup>.

#### c) Lipossomas

São esferas de uma ou duas bicamadas lipídicas envolvendo um conteúdo aquoso. Os lipossomas foram propostos como veículos para imagem de infecção há mais de 20 anos, mas essas primeiras preparações eram rapidamente clareadas do sangue pelo sistema mononuclear-fagocítico. No entanto, se a superfície do lipossoma for recoberta com um polímero hidrofílico como o polietilenglicol (PEG) pode-se contrapor a ação do sistema mononuclear-fagocítico prolongando-se a permanência deste agente na circulação e aumentando-se assim a sua captação em focos infecciosos devido ao aumento da permeabilidade no local <sup>15,59</sup>.

Esses complexos lipossoma-PEG podem ser marcados com oxinato-<sup>111</sup>In ou hexametilpropilenoamina oxima (HMPAO-<sup>99m</sup>Tc) ou hidrazino nicotinamida (HYNIC-<sup>99m</sup>Tc). A marcação é rápida (poucos minutos) <sup>60</sup>. As primeiras avaliações clínicas mostraram boas imagens de focos de infecção. A visualização de infecções/inflamações músculo-esqueléticas e abdominais foi melhor do que utilizando-se a IgG-<sup>111</sup>In <sup>61</sup>.

#### d) Sistema avidina-biotina

Avidinas são uma família de proteínas. A estreptavidina é um membro desta família. A biotina é um composto de baixo peso molecular que pode ser radiomarcado. A avidina e estreptavidina ligam-se à biotina com extrema

afinidade. O uso do sistema avidina-biotina está baseado no fato da avidina (ou estreptavidina) localizar-se não especificamente em focos de infecção devido ao aumento da permeabilidade vascular no local. Primeiramente injeta-se a avidina (ou estreptavidina) e a biotina radiomarcada é injetada horas depois. Diagnósticos com boa precisão foram obtidos em estudos de infecção vascular e osteomielite crônica <sup>15, 62</sup>.

e) Leucócitos marcados *in vitro*

A marcação de leucócitos *in vitro* foi desenvolvida entre as décadas de setenta e oitenta e até hoje ainda é considerado como padrão ouro na medicina nuclear para imagem de infecção e inflamação <sup>15</sup>.

Após administração intravenosa os leucócitos são seqüestrados pelos pulmões com subsequente rápido clareamento da atividade. Há um rápido clareamento sanguíneo e em muitos casos há uma alta captação em infiltrados granulocíticos, enquanto uma substancial porção acumula-se no baço. Portanto, como radiofármaco, os leucócitos marcados são indicadores específicos da infiltração leucocitária no foco, mas não específicos para infecção <sup>15</sup>.

McAfee e Thakur <sup>63</sup> desenvolveram uma técnica de marcação de leucócitos autólogos com <sup>111</sup>In usando oxinato como quelante.

Peters e colaboradores <sup>64</sup> desenvolveram uma técnica de marcação usando HMPAO, um quelante lipofílico, que permite eficiente marcação dos leucócitos com o <sup>99m</sup>Tc.

Devido às características radioativas ótimas do <sup>99m</sup>Tc, os leucócitos marcados com este agente substituíram os marcados com <sup>111</sup>In em muitas indicações <sup>15</sup>.

A excelente performance dos leucócitos radiomarcados para imagem de infecção e inflamação foi demonstrada em uma série de estudos onde observou-se que a sensibilidade pelo foco excedeu 95% <sup>65,66</sup>. Havia uma preocupação em relação a possibilidade dos leucócitos marcados não serem capazes de detectar infecção crônica, pois essas infecções geram resposta leucocitária bem menos intensa que as agudas. No entanto, um estudo com 155 pacientes mostrou que a sensibilidade dos leucócitos marcados para detecção de infecções agudas (90%) não foi significativamente diferente da sensibilidade de detecção de infecções crônicas (86%) <sup>67</sup>.

Em relação à precisão do diagnóstico não há um agente para imagem melhor que os leucócitos autólogos marcados. Porém este agente apresenta desvantagens tais como preparação trabalhosa e longa que requer o uso de equipamentos específicos e a manipulação de volume significativo de sangue potencialmente contaminado <sup>15</sup>.

f) Leucócitos marcados *in vivo*

Este método tem por objetivo marcar os leucócitos *in vivo* (na circulação sanguínea ou no foco). O procedimento de marcação é fácil e não requer a manipulação de sangue potencialmente contaminado. O uso de anticorpos monoclonais radiomarcados contra antígenos presentes na superfície dos granulócitos foi um dos primeiros estudos realizados visando a marcação de leucócitos *in vivo*. Vários anticorpos monoclonais que reagem com antígenos expressos nos granulócitos (NCA, CD15, CD66 e CD67) foram desenvolvidos. Alguns anticorpos anti-granulócitos foram avaliados para imagem de infecção, tais como, anti-NCA-95 IgG, anti-NCA-90 Fab' e anti-SSEA-1 IgM. Cada um desses anticorpos anti-granulócito marcados com <sup>99m</sup>Tc ou <sup>123</sup>I permite um preciso delineamento da infecção. Como estes agentes radiomarcados são compostos diferentes dos leucócitos radiomarcados *in vitro*, logo apresentam biodistribuição diferente. De modo geral, o clareamento sanguíneo das preparações com IgG é muito lento gerando uma alta radioatividade de fundo que decresce lentamente com o tempo. Por esta razão, o tempo entre a injeção do anticorpo radiomarcado e a aquisição da imagem é relativamente longo. Não há captação inicial nos pulmões e a captação no baço é muito menor em comparação com os leucócitos marcados *in vitro*. As preparações baseadas em fragmentos de anticorpos apresentam excreção renal aumentada e a IgM apresenta captação no fígado maior que os leucócitos marcados *in vitro* <sup>15</sup>.

Becker e colaboradores <sup>68</sup> mostraram que menos de 10% do anticorpo BW 250/183 radioiodado presente no sangue liga-se aos granulócitos. Esta observação indicou que os anticorpos anti-granulócitos não representam um bom método para radiomarcagem de células brancas *in vivo*. Atualmente é aceito que os anticorpos anti-granulócitos radiomarcados localizam-se no foco de infecção basicamente devido ao extravasamento não específico relacionado ao aumento da permeabilidade vascular e que a ligação do anticorpo ao leucócito infiltrado no

tecido lesado (inflamado) pode contribuir com sua retenção no foco <sup>68</sup>. Entretanto, uma exceção deve ser feita para o anti-SSEA-1 IgM (anti-CD15), uma vez que este reconhece antígenos CD15 nos PMNs com alta afinidade e a ligação *in vivo* excede 50%, apontando para um processo mais específico de acúmulo no foco. A marcação do anticorpo monoclonal IgM anti-CD15 com <sup>99m</sup>Tc e sua avaliação em pacientes com diagnóstico equivocado de apendicite apresentou resultados promissores <sup>69</sup>.

Os radiofármacos baseados em anticorpos anti-granulócitos permitem a visualização de focos de infecção com uma sensibilidade entre 80 a 90% <sup>70</sup>. Devido ao clareamento sanguíneo lento é necessário que as imagens sejam realizadas 24 horas após a administração para uma correta localização dos focos inflamatórios. A maior desvantagem dos anticorpos monoclonais murínicos é que estes podem apresentar biodistribuição alterada após injeções subseqüentes. Neste caso é mais vantajoso o uso de fragmentos de anticorpos uma vez que estes são menos imunogênicos. Além disso, os fragmentos apresentam clareamento sanguíneo mais rápido podendo gerar imagens mais rapidamente <sup>15, 70</sup>.

#### g) Peptídeos Quimiotáticos

Os peptídeos com alta afinidade por receptores expressos preferencialmente por leucócitos podem ser usados para marcar leucócitos *in vivo*. Uma grande variedade de peptídeos que ligam-se a receptores expressos pelas células brancas tem sido avaliados para detecção de infecção. O primeiro peptídeo a ser estudado quanto a habilidade para detecção de focos de infecção/inflamação foi o peptídeo quimiotático formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLF). Este peptídeo composto por três aminoácidos com um grupo formil na porção N-terminal é um fator quimiotático produzido por bactéria, que se liga a receptores nos leucócitos e monócitos com alta afinidade ( $K_d=10-30$  nM) <sup>15</sup>. Os primeiros estudos sobre a radiomarcagem deste peptídeo tiveram início a mais de 20 anos com Zoghbi e colaboradores <sup>71</sup> e mais tarde McAfee e colaboradores <sup>72</sup>, que radiomarcaram tal peptídeo e estudaram seu comportamento *in vivo*. Foi verificado que mesmo em baixas doses o fMLF radiomarcado induz uma transiente granulocitopenia. Em 1991 Fischman e colaboradores <sup>20</sup> sintetizaram quatro análogos deste peptídeo quimiotático para marcação com <sup>111</sup>In. Todos os

peptídeos mantiveram a atividade biológica e a afinidade pelo receptor. Os peptídeos foram avaliados em ratos com infecção por *E.coli* e todos os análogos apresentaram localização preferencial no foco em uma hora após a administração. Em um estudo comparativo utilizando-se coelhos com infecção por *E. coli* ficou demonstrado que o peptídeo fMLF marcado com  $^{99m}\text{Tc}$  é superior para localização de infecção relativamente aos leucócitos marcados com  $^{111}\text{In}$  <sup>21</sup>. O peptídeo quimiotático sintético N-formil-norleucil-leucil-fenilalanil-norleucil-tirosil-lisina (fNleLFNleYK), apresenta uma potente quimiotaxia por neutrófilos humanos e pode ser prontamente radioiodado com alta atividade específica sem ocorrer perda de sua atividade biológica <sup>16</sup>.

Foi desenvolvido um agente, com alta atividade específica, marcado com  $^{99m}\text{Tc}$  com o intuito de reduzir a indução de granulocitopenia <sup>19</sup>.

Fischman e colaboradores <sup>13</sup> demonstraram que a neutropenia é dose dependente e que doses do peptídeo fNleLFNleYK menores que 10ng/Kg promovem somente um mínimo efeito sobre a contagem de leucócitos. Adicionalmente a estes resultados, ainda deve ser considerado o fato de que a alta atividade específica do composto marcado gerado permite a aquisição de imagem com dose de peptídeo aproximadamente 1000 vezes menor do que a dose capaz de gerar uma redução significativa na contagem de leucócitos <sup>12,13,15,73</sup>.

Vários antagonistas também foram desenvolvidos para contrapor este efeito biológico (granulocitopenia). Porém, estes antagonistas apresentam baixa captação no foco de infecção, muito provavelmente, devido a reduzida afinidade pelo receptor <sup>12,15</sup>.

Em resumo, a rápida aquisição de imagens de focos de infecção/inflamação é possível quando utilizados os peptídeo quimiotático fMLF e seus análogos sintéticos radiomarcados <sup>15</sup>.

#### h) Citocinas

As citocinas radiomarcadas são uma interessante classe de radiofármacos baseados em proteínas de baixo peso molecular. As interleucinas 1, 2 e 8 e o fator plaquetário 4 (IL-1, IL-2, IL-8 e PF-4) estão entre estas citocinas

A interleucina 1 (IL-1) liga-se a receptores expressos nos leucócitos, monócitos e linfócitos, com alta afinidade. Porém, mesmo em baixas doses (10 ng/Kg), efeitos biológicos adversos como hipotensão, impedem a aplicação clínica da IL-1 radiomarcada. O antagonista da IL-1, o IL-1ra também foi avaliado como agente para imagem. Este apresenta afinidade similar pelos receptores IL-1, mas carece de atividade biológica <sup>12,15,74</sup>.

A interleucina-2 (IL-2) radiomarcada liga-se especificamente a receptores IL-2 expressos nas células T ativadas. A IL-2 marcada tanto com <sup>123</sup>I quanto com <sup>99m</sup>Tc tem sido estudada para localização de regiões com infiltração de linfócitos. Os resultados sugerem que a IL-2 marcada pode ser potencialmente utilizada como agente *in vivo* para as células mononucleares infiltradas, como as que estão presentes nas doenças auto-imune <sup>12,15</sup>.

A IL-8 liga-se a receptores nos neutrófilos com alta afinidade (0,34 nM). O acúmulo de IL-8 radioiodada (<sup>123</sup>I) no abscesso é rápido e alto. A atividade específica relativamente baixa resulta em transiente redução na contagem de leucócitos periféricos após uma dose de IL-8-<sup>123</sup>I de 25 µg/Kg, seguida de leucocitose por algumas horas. Recentemente a preparação IL-8-<sup>99m</sup>Tc foi desenvolvida utilizando-se o HYNIC como quelante. Em coelhos com infecção por *E.coli* a alta captação do composto HYNIC-IL-8 -<sup>99m</sup>Tc no abscesso e a alta razão alvo-não alvo foram obtidas em comparação àquelas obtidas para a IL-8 radioiodada <sup>12,15</sup>.

O PF-4 liga-se a receptores expressos nos neutrófilos e monócitos e é denominado de agente neutralizante de heparina do organismo. O P483H é um peptídeo sintético que contém a região de ligação da heparina ao PF-4 complexada a uma heparina e uma lisina para facilitar o rápido clareamento renal. Este peptídeo marcado com <sup>99m</sup>Tc tem sido estudado em pacientes para se avaliar a aplicabilidade do mesmo como agente de imagem para detecção cintilográfica de infecção e inflamação e os resultados são favoráveis. Nenhum efeito adverso sistêmico foi observado, ou seja, a transiente neutropenia observada com o IL-8 e fMLF não é observada para o P482H. Porém em alguns pacientes foi observada excessiva captação na tireóide, o que sugere a instabilidade do composto *in vivo* com liberação de <sup>99m</sup>Tc <sup>12,15</sup>.

i) Moléculas de adesão

A selectina E é uma molécula de adesão exclusivamente expressa na superfície das células endoteliais ativadas com capacidade de ligação a leucócitos. Anticorpos monoclonais anti-selectina E radiomarcados ou fragmentos  $F(ab')_2$  anti-selectina E têm sido utilizados com sucesso para imagem de artrite e doença inflamatória crônica intestinal. Para prevenir a possibilidade de reação imunológica anti-murínica têm sido estudados fragmentos de anticorpos desenvolvidos por bioengenharia <sup>15,75, 76</sup>.

j) Antibióticos radiomarcados

Nenhum dos agentes discutidos até aqui é capaz de diferenciar infecção de inflamação, uma vez que, acumulam-se no foco devido a características comuns da infecção e inflamação <sup>15</sup>. A discriminação entre infecção bacteriana e inflamação estéril é clinicamente relevante em algumas situações. O primeiro radiofármaco proposto para esta aplicação foi a ciprofloxacina marcada com <sup>99m</sup>Tc. A ciprofloxacina, uma fluoroquinolona, é um agente anti-microbiano que liga-se às enzimas DNA-topoisomerase IV e DNA-girase presentes em várias bactérias em divisão celular. Portanto, este agente marcado com <sup>99m</sup>Tc teoricamente é capaz de discriminar entre infecção e inflamação estéril <sup>15,77</sup>. Os primeiros estudos clínicos mostraram alta precisão na detecção de infecção bacteriana. Os resultado da eficácia da ciprofloxacina-<sup>99m</sup>Tc, em 90 pacientes com suspeita de infecção revelaram sensibilidade de 70% e especificidade de 93% e ainda como este agente não se acumula em medula óssea, poderia ser útil para avaliação de infecção em próteses ortopédicas <sup>15,78, 79,</sup>

80

Em outro estudo realizado com a ciprofloxacina-<sup>99m</sup>Tc utilizando-se um modelo animal com prótese articular infectada, previamente validado, foi verificado, assim como nos estudos clínicos, que a ciprofloxacina-<sup>99m</sup>Tc apresentou boa sensibilidade para detecção de infecção na articulação protética, com acúmulo nos tecidos infectados próximos a prótese. No entanto, também foi observada significativa captação nas articulações não infectadas, persistindo até 24 horas após a infecção (imagens tardias não permitiram a diferenciação entre articulação protética infectada e não infectada) <sup>77</sup>. Tais dados são discordantes daqueles obtidos nos estudos clínicos preliminares.

Welling e colaboradores <sup>81</sup> também observaram captação similar de ciprofloxacina-<sup>99m</sup>Tc em focos de infecção e lesão inflamatória estéril induzidos no músculo da pata de camundongos. Tal acúmulo inespecífico pode ser causado pelo fato da ciprofloxacina, assim como outras fluorquinolonas, concentrar-se e ser transportada por macrófagos, monócitos e neutrófilos para a região inflamada <sup>77</sup>.

#### k) Peptídeos Antimicrobianos (HNPs)

Os peptídeos antimicrobianos são produzidos pelos neutrófilos humanos e ficam armazenados nos grânulos dos mesmos <sup>15</sup>. Geralmente contém menos que 50 aminoácidos, carga positiva devido ao excesso de resíduos básicos como lisina e arginina e aproximadamente 50% de aminoácidos hidrofóbicos. Apesar dos peptídeos antimicrobianos apresentarem diferentes estruturas químicas a base de sua atividade antimicrobiana está relacionada à interação do domínio catiônico do peptídeo com a superfície do microorganismo (carga negativa). Além da sua atividade antimicrobiana direta, estes apresentam quimiotaxia por vários monócitos e linfócitos <sup>82</sup>. O HNP-1 foi marcado com <sup>99m</sup>Tc, utilizando-se o método direto de redução das pontes de dissulfeto e os estudos biológicos em camundongos com infecção mostraram que este agente liga-se preferencialmente à bactéria do que aos leucócitos. Outros peptídeos antimicrobianos marcados com <sup>99m</sup>Tc tem sido avaliados <sup>15,82</sup>. Os peptídeos sintéticos derivados da ubiquidina humana são uma classe promissora de agentes cintilográficos uma vez que demonstraram diferenciar infecção de inflamação estéril em diferentes animais de laboratório. Estes traçadores detectam rapidamente infecção bacteriana (Gram positiva e Gram negativa) assim como fúngica e ainda há uma correlação entre a quantidade de peptídeo acumulado no foco de infecção e o número de microrganismos viáveis presente. Este fato sugere a possibilidade de utilização destes agentes também para a avaliação da eficácia da terapia antimicrobiana <sup>82</sup>.

#### l) Flúor-2- desoxi-D-glicose-<sup>18</sup>F (FDG-<sup>18</sup>F)

A utilização de FDG-<sup>18</sup>F tornou-se muito importante para diferenciação entre tumores malignos e benignos, determinação do estágio do tumor e avaliação da eficácia do tratamento <sup>15</sup>.

Sabe-se que há aumento no metabolismo de glicose em tumores e a FDG acumula-se quantitativamente em tumores malignos *in vivo* basicamente devido a esse alto metabolismo nos mesmos. Entretanto, durante uma pesquisa de tumor maligno com FDG, falsos positivos ocasionalmente podem ocorrer, principalmente devido a processos infecciosos ou granulomatosos<sup>83</sup>.

Em 1989 Tahara e colaboradores<sup>84</sup> demonstraram, pela primeira vez, que há uma grande captação de FDG em abscessos abdominais humanos. A FDG acumula-se em vários processos inflamatórios e infecciosos e este acúmulo está baseado no fato dos granulócitos e macrófagos usarem a glicose como fonte de energia. Quando ativados por um processo inflamatório, o metabolismo destas células e também a captação de FDG aumentam. A utilidade da FDG-<sup>18</sup>F para imagem de infecção foi demonstrada por vários estudos e apresenta sensibilidade e especificidade superior a 90%<sup>85, 86, 87, 88</sup>.

É especialmente bem sucedida para os casos de osteomielite uma vez que a resolução espacial permite diferenciação entre osteomielite, espondilite inflamatória e infecção dos tecidos moles que circundam o osso<sup>87</sup>.

A alta resolução espacial e o rápido acúmulo no foco são vantagens significativas sobre a técnica convencional utilizando-se os leucócitos marcados. Em contrapartida, o fato da captação ocorrer em qualquer tipo de célula com metabolismo de glicose aumentado é uma limitação para o uso da FDG-<sup>18</sup>F para imagem de infecção, uma vez que restringe sua especificidade pois não consegue distinguir entre tumor maligno e processo inflamatório<sup>15</sup>.

Além disto, como o <sup>18</sup>F é um emissor de pósitron de tempo de meia-vida físico bastante curto (109,7 minutos), o uso da FDG-<sup>18</sup>F está restrito aos serviços de medicina nuclear que possuam sistema PET (tomografia por emissão de pósitron) de aquisição de imagem ou SPECT (tomografia computadorizada por emissão de fóton único) com detector de duas ou três cabeças e circuito de coincidência, próximos do local de produção do radiofármaco.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido na Divisão de Pesquisa e Desenvolvimento de Radiofármacos (CRPD) do Centro de Radiofarmácia (CR), do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP) que conta com laboratórios equipados para a realização de síntese química, bem como das técnicas de marcação e manipulação de animais.

### 4.1. Materiais e Equipamentos

1. Agitador mecânico, Q-250.1, Quimis, Brasil;
2. Aparelho de vidro para a síntese química do ATE (FIG.6)
3. Sistema para obtenção de baixa temperatura utilizado na síntese química do ATE – desenhado e desenvolvido por Wagner Nieto do CR (FIG. 6)
4. Aparelho de vidro para purificação cromatográfica, composto de coluna de vidro de 2,5 cm de diâmetro interno por 40 cm de comprimento e balão reservatório de solvente de 500 mL;
5. Balança analítica, M 220, Denver, EUA;
6. Bomba peristáltica, modelo P-3, Pharmacia, Suécia;
7. Camundongos *Swiss*, 20 – 30g, biotério IPEN-CNEN/SP.
8. Colunas para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE): sílica gel 60 (10  $\mu\text{m}$ ; 4,6x250 mm) Lichrocart 250-4, Merck e fase reversa C<sub>-18</sub> (300 A; 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6x150 mm) 218TP<sup>TM</sup>, Dionex Vydac;
9. Contador de radiação gama automático tipo poço, com cristal NaI(Tl) modelo D5002, cobrall, Packard-Camberra, EUA;
10. Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência - CG Instrumentos -dotado de detetor UV modelo CG 435-B (CG Instrumentos, Brasil) e detetor de radiação (Berthold, LB2040, Alemanha);
11. Cuba e fonte para eletroforese, EPS 301, Amersham Pharmacia Biotech, Suécia;

12. Evaporador rotatório, R-124 (Waterbath B-480), Büchi, Suíça;
13. Câmara para marcação tipo "glove-box" equipada com sistema de despressurização e instrumentos diversos, IPEN, Brasil;
14. Espectrofotômetro Shimadzu IR-470, Japão, (FCF-USP);
15. Instrumentos cirúrgicos (tesouras, pinças);
16. Luz ultravioleta, 8 Wats, GE, Brasil;
17. Medidor de radioatividade – Curiômetro, CRC<sup>®</sup>-15R , Capintec, EUA;
18. Membrana filtrante hidrofóbica e hidrofílica, 0,2 µm de poro, 47 mm de diâmetro, Millipore, Brasil;
19. Mini colunas compactadas, sílica - Sep-Pak<sup>®</sup> classic – Waters, EUA;
20. Mini colunas compactadas, C<sub>18</sub> - Sep-Pak<sup>®</sup> classic – Waters, EUA;
21. Nitrogênio gasoso, White Martins, Brasil;
22. Nitrogênio líquido, White Martins, Brasil;
23. Papel cromatográfico Whatman 1 e 3MM, Whatman, Brasil;
24. Peptídeo N-formil-norleucil-leucil-fenilalanil-norleucil-tirosil-lisina (fNleLFNleYK) – Sigma, EUA;
25. Placas de sílica gel-60 (20 x 20 cm) com e sem indicador de fluorescência, Merck, Brasil;
26. Reagentes e solventes (grau analítico e grau HPLC, respectivamente) Sigma-Aldrich: ácido m-bromo benzóico; cloreto tri-n-butil estanho; n-butil lítio 1,6 M em hexano; diciclohexilcarbodiimida (DCC); hexano; ácido acético; t-butilhidroperóxido (TBHP); N-hidrosuccinimida (NHS); tetrahidrofuran (THF); etanol absoluto; dietil éter; NaOH; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro; acetato de etila; clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>); clorofórmio deuterado; borato de sódio; fosfato de sódio; barbiturato de sódio; sílica gel 60; cloramina T; N-clorosuccinimida (NCS); acetonitrila; ácido trifluoroacético (TFA); trietilamina (TEA).
27. Solução de iodeto de sódio (iodo-131) Nordion, Canadá, processada no Centro de Radiofarmácia do IPEN-CNEN/SP.
28. Terebentina, Acrilex, Brasil;
29. Termômetro com escala para -200°C, Incoterm, Brasil;
30. Vidraria em geral.

## 4.2. Métodos

### 4.2.1. Síntese do grupo prostético - benzoato de 3-(tri-*n*-butilestanil) de *N*-succinimidila (ATE)

O ATE foi sintetizado em 3 etapas (FIG. 5) a partir do ácido *m*-bromo benzóico como descrito por Zalutsky e colaboradores <sup>2</sup>.

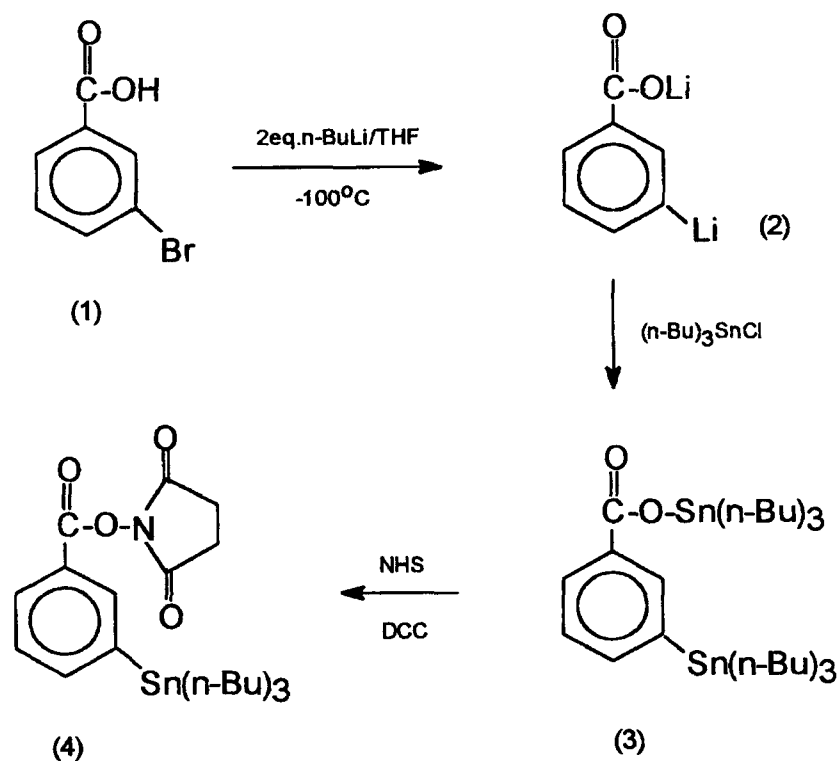


FIGURA 5. Etapas da síntese do ATE

#### 4.2.1.1. Síntese do intermediário - benzoato de 3-(tri-*n*-butilestanil) de tri-*n*-butil estanho (3)

Utilizando-se um aparato de vidro próprio para a síntese, como mostrado na FIG. 6, introduziu-se 1,25 g de ácido *m*-bromo benzóico (1) a 35mL de tetrahydrofurano (THF) sob agitação em atmosfera de nitrogênio. A temperatura dessa solução foi reduzida para aproximadamente  $-100^{\circ}\text{C}$  utilizando-se nitrogênio líquido e banho de óleo de silicone.

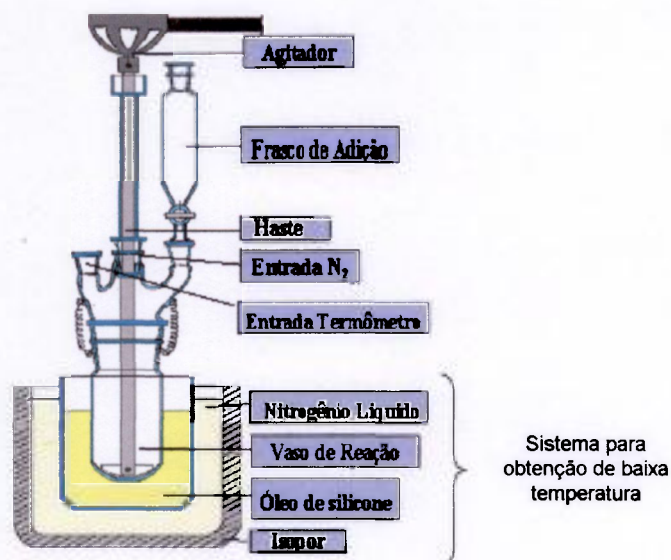


FIGURA 6. Aparelho para a síntese do ATE

Adicionou-se à mistura de reação 7,8 mL de n-butil lítio 1,6 M em hexano, promovendo-se agitação por 30 minutos com a temperatura mantida abaixo de  $-95^{\circ}\text{C}$ .

Para interromper a ação do ânion dilítio (2) a temperatura foi elevada para  $-75^{\circ}\text{C}$  seguida pela adição de 1,8 mL de cloreto de tri-n-butil estanho diluído em 8 mL de THF. A mistura foi mantida sob agitação por 30 minutos a  $-75^{\circ}\text{C}$  e posteriormente levada até temperatura ambiente e mantida sob agitação por mais 1 hora e meia.

O passo seguinte foi a diluição da mistura de reação com 100 mL de água, após o que a fase orgânica foi extraída com aproximadamente 60 mL de dietil éter (3 vezes), lavada com solução de hidróxido de sódio 5% (NaOH 5%) (20 mL) e então com água até obtenção de extrato aquoso neutro. Ao extrato etéreo adicionou-se sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) anidro e o solvente foi removido em evaporador rotatório.

O produto obtido foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel 60 de 15 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro, utilizando-se um sistema similar ao descrito por Still e colaboradores<sup>89</sup>. A coluna foi previamente saturada com

hexano e o produto obtido foi introduzido na coluna sendo subseqüentemente eluido com uma mistura de hexano: acetato de etila (70:30).

As frações eluidas foram monitoradas por cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCD-SG) com indicador de fluorêscencia, usando como fase móvel a mistura de hexano: acetato de etila (70:30) (volume total de 180 mL). As frações com mesmo perfil cromatográfico foram combinadas, o solvente removido e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando-se coluna de sílica gel (10  $\mu$ m; 4,6x250 mm) e como fase móvel a mistura hexano: acetato de etila: ácido acético 70:30:0,2 e fluxo de 1 mL por minuto.

Após a purificação obteve-se o intermediário benzoato de 3-(tri-n-butil estanil) tri-n-butil estanho (3) na forma de um líquido claro.

#### **4.2.1.2. Síntese do ATE - benzoato de 3-(tri-n-butilestanil) de N-succinimidila (4)**

A 1,4 g do intermediário estanil éster (3) obtido, adicionou-se 0,345 g de N-hidroxisuccinimida (NHS) e 0,62 g de dicitclohexilcarbodiimida (DCC). Essa mistura foi mantida sob agitação em 20 mL de THF por 12 horas em temperatura ambiente.

Após esse período submeteu-se a filtração para remoção de dicitclohexiluréia precipitada. A seguir, promoveu-se a purificação em coluna cromatográfica de sílica gel 60, com as mesmas dimensões descritas anteriormente, utilizando-se como fase móvel mistura hexano: acetato de etila (90:10) (volume total de 450 mL) para a obtenção do ATE (4). As frações de purificação foram igualmente monitoradas com CCD-SG com indicador de fluorescência, conforme descrito anteriormente.

#### **4.2.1.3. Análises físico-químicas**

##### **a- Espectroscopia na região do infravermelho (IV)**

Os espectros de IV foram registrados em espectrofotômetro Shimadzu IR-470 (FCF-USP), com as amostras na forma de um líquido oleoso, em filme.

##### **b- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)**

Os espectros de RMN-<sup>1</sup>H foram obtidos no Espectrômetro Bruker modelo Advance DPX – 300 MHz (FCF-USP), utilizando-se clorofórmio deuterado como padrão de referência interna.

##### **c- Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

O produto final e o intermediário foram analisados por meio de CLAE, com detetor UV (254 nm) utilizando-se coluna de sílica gel (10 µm; 4,6x250 mm) e como fase móvel mistura hexano: acetato de etila: ácido acético 70:30:0,2 e fluxo de 1 mL por minuto.

#### **4.2.2. Radioiodação do peptídeo fNleLFNleYK pelo método indireto**

As etapas de marcação e purificação do peptídeo fNleLFNleYK com radioiodo, utilizando-se o grupo prostético ATE radioiodado, encontram-se esquematizadas na FIG. 7.

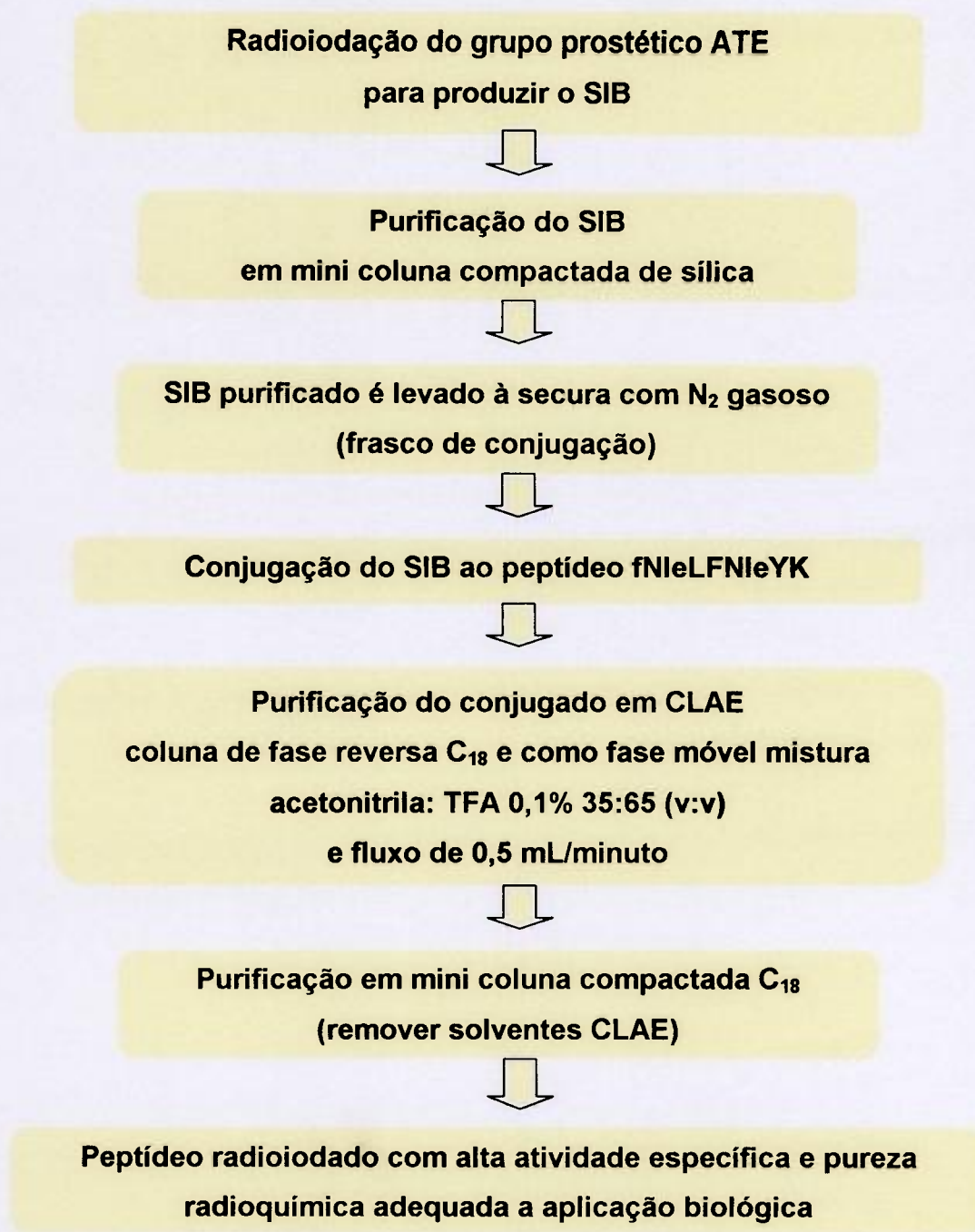


FIGURA 7. Fluxograma da marcação do peptídeo fNleLFNleYK por via indireta

#### 4.2.2.1 Marcação do grupo prostético ATE com radioiodo

Foram preparadas 4 soluções padrão:

- a.  $\text{Na}^{131}\text{I}$  – solução em  $\text{NaOH } 10^{-3} \text{ M}$  (pH 10 – 11) 740-1480 MBq/mL ou  $\text{NaI } 1\text{M}$  – solução em  $\text{NaOH } 10^{-2} \text{ M}$  (pH 10 – 11);
- b. Ácido acético glacial 1M em  $\text{CHCl}_3$ ;
- c. TBHP 1M em  $\text{CHCl}_3$  em presença de cristais de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro (remover água);
- d. ATE 0,1M em  $\text{CHCl}_3$ .

#### Marcação com iodo não radioativo (NaI)

Em frasco de reação foram colocados 10  $\mu\text{L}$  da solução **d** + 50  $\mu\text{L}$  da solução **c** + 50  $\mu\text{L}$  da solução **b** + 5  $\mu\text{L}$  da solução **a**.

A mistura de reação foi agitada por 30 minutos em temperatura ambiente.

A mistura de reação foi avaliada utilizando-se CCD-SG com indicador de fluorescência e mistura de hexano: acetato de etila (70:30) como fase móvel e CLAE utilizando-se detetor UV (254 nm) coluna de sílica (10  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm) e mistura hexano: acetato de etila: ácido acético (70:30:0,2) como fase móvel, conforme descrito por Garg e colaboradores <sup>3</sup>. Também foi avaliado o perfil cromatográfico de CLAE utilizando-se coluna de fase reversa  $\text{C}_{18}$  (5  $\mu\text{m}$ ; 4,6x150 mm) e como fase móvel a mistura acetonitrila:TFA 0,1% 35:65 (v:v).

#### Marcação com radioiodo ( $\text{Na}^{131}\text{I}$ )

Em um frasco de reação foram colocados 10  $\mu\text{L}$  da solução **d** + 50  $\mu\text{L}$  da solução **c** + 50  $\mu\text{L}$  da solução **b** + 5  $\mu\text{L}$  da solução **a**.

A mistura de reação foi agitada por 30 minutos em temperatura ambiente.

#### Purificação do SIB em mini coluna compactada de sílica

O ATE radioiodado (SIB) foi purificado em mini coluna compactada de sílica (Sep-Pak® sílica classic), utilizando-se como solvente para eluição hexano (40 mL), seguido de mistura hexano:acetato de etila 92:8 (25 mL) e mistura hexano:acetato de etila 70:30 (16 mL), de modo a eliminar o excedente de ATE

não radioiodado que interfere de forma negativa no rendimento de acoplamento do grupo prostético radioiodado à proteína <sup>2</sup>.

#### **Parâmetros estudados**

- ✓ Agentes oxidantes: t-butil hidroperóxido (TBHP) nas concentrações de 25 µmol, 50 µmol e 100 µmol e N-cloro succinimida (NCS) nas concentrações de 2,5 µmol, 5 µmol, 10 µmol e 50 µmol.
- ✓ pH do meio reacional: faixa de 3-4 e de 5-5,5
- ✓ Tempo de reação: 15, 30, 45 e 60 minutos.

Ressalta-se que, ao alterar um parâmetro para estudo, os demais permaneceram constantes e de acordo com a reação de marcação com radioiodo descrita anteriormente neste item.

#### **Controle de qualidade da marcação**

A pureza radioquímica da marcação foi determinada utilizando-se CCD de sílica gel, sem indicador de fluorescência, e mistura de hexano: acetato de etila (70:30) como fase móvel e CLAE utilizando-se coluna de sílica (10 µm; 4,6 x 250 mm) e mistura hexano: acetato de etila: ácido acético (70:30:0,2) como fase móvel, conforme descrito por Garg e colaboradores <sup>3</sup>.

#### **4.2.2.2. Conjugação do peptídeo fNleLFNleYK ao SIB purificado**

A fração de purificação hexano: acetato de etila (70:30) contendo o SIB purificado foi levada à secura em corrente de N<sub>2</sub> (no frasco de reação). Adicionou-se o peptídeo fNleLFNleYK (25 µg/ 5 µL DMF) e 5 µL de trietilamina (TEA) (para obtenção de pH 9). A mistura de reação permaneceu sob agitação em temperatura ambiente por 15 minutos.

#### **Controle de qualidade da conjugação**

O peptídeo fNleLFNleYK conjugado ao SIB foi analisado por CLAE, utilizando-se coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (5 µm; 4,6x150 mm) e como fase móvel a

mistura acetonitrila:TFA 0,1% 35:65 (v:v); fluxo de 0,5 mL/minuto, detetor de radiação e detetor UV (220nm).

#### **4.2.2.3. Purificação do peptídeo fNleLFNleYK conjugado ao SIB em CLAE**

A purificação foi realizada utilizando-se CLAE, coluna de fase reversa C<sub>18</sub> e como fase móvel uma mistura acetonitrila: TFA 0,1% 35:65 e fluxo de 0,5 mL/minuto.

Foram coletadas 44 frações sendo que a primeira e segunda frações foram coletadas a cada minuto. A partir do segundo minuto, as frações foram coletadas a cada 0,5 minuto até completar 16 minutos e depois as frações foram novamente coletadas a cada minuto até completar 30 minutos de corrida.

As frações contendo o conjugado puro foram reunidas e procedeu-se à purificação em mini coluna compactada C<sub>18</sub> para remoção dos solventes da fase móvel utilizada na purificação em CLAE.

#### **4.2.2.4. Purificação do peptídeo fNleLFNleYK conjugado ao SIB em mini coluna compactada C<sub>18</sub>**

A mini coluna compactada C<sub>18</sub> foi ativada com 5 mL de etanol 70% seguido de 5 mL de água destilada.

Após ativação, a coluna foi carregada com as frações contendo o conjugado, oriundas da purificação em CLAE. Procedeu-se à eluição com dois volumes de 5 mL de água destilada, secou-se a coluna com corrente de ar e depois eluiu-se com volumes de aproximadamente 250 µL de etanol absoluto (5 a 10 volumes).

#### 4.2.2.5. Conjugação do peptídeo fNleLFNleYK ao SIB não purificado (sem purificação em mini coluna compactada de sílica)

Após a marcação do ATE, adicionou-se à mistura de reação, contendo o SIB não purificado, o peptídeo fNleLFNleYK (25 µg/ 5 µL DMF) e 5 µL de trietilamina (TEA) (para obtenção de pH 9). A reação permaneceu sob agitação em temperatura ambiente por 15 minutos.

#### Controle de qualidade da conjugação

O peptídeo fNleLFNleYK conjugado ao SIB (não purificado) foi analisado por CLAE, utilizando-se coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (5 µm; 4,6x150 mm) e como fase móvel a mistura acetonitrila:TFA 0,1% 35:65 (v:v); fluxo de 0,5 mL/minuto, detetor de radiação e detetor UV (220nm).

#### 4.2.3. Radioiodação do peptídeo fNleLFNleYK pelo método direto

As etapas de marcação e purificação do peptídeo fNleLFNleYK com radioiodo por via direta estão esquematizadas na FIG. 8.

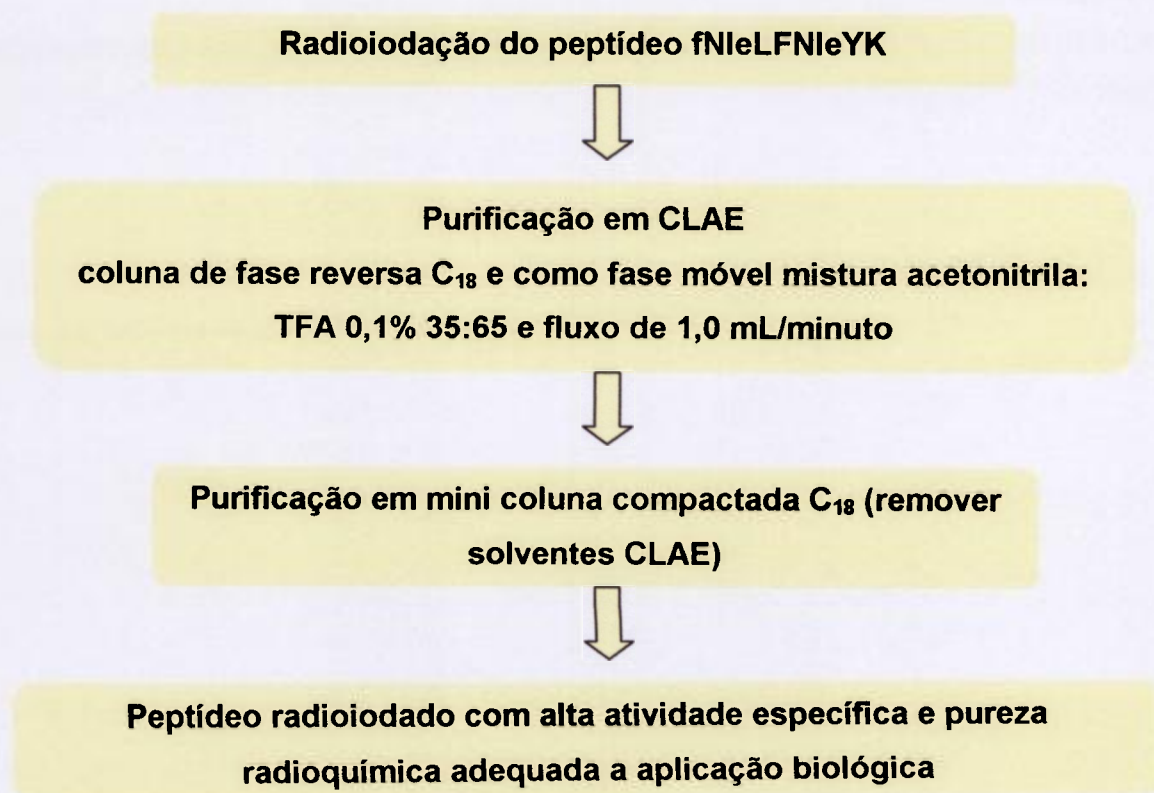


FIGURA 8. Fluxograma da marcação do peptídeo fNleLFNleYK por via direta

#### **4.2.3.1 Procedimento de marcação usando cloramina T como agente oxidante**

O peptídeo fNleLFNleYK (25 µg/ 5 µL DMF) foi adicionado ao frasco de reação, seguido de 5 µL da solução de cloramina T (1 mg/mL de DMF) e 5 µL da solução de Na<sup>131</sup>I em NaOH 10<sup>-3</sup>M (3,7 – 7,4 MBq). A iodação procedeu-se por 10 minutos em temperatura ambiente, sob agitação, sendo finalizada pela adição de 5 µL de solução de metabissulfito de sódio (2mg/mL de H<sub>2</sub>O destilada).

#### **Controle de qualidade da marcação**

A pureza radioquímica do marcado foi determinada por eletroforese utilizando-se papel Whatman 1, tampão barbital 0,05 M pH 8,6 e corrente de 295V por 40 minutos e por CLAE utilizando-se coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (5 µm; 4,6x150 mm) e mistura acetonitrila: TFA 0,1% 35:65 como fase móvel, fluxo de 1 mL/minuto, detetor de radiação e detetor UV (220 nm).

A purificação em CLAE do peptídeo fNleLFNleYK radioiodado e posteriormente em mini coluna compactada C<sub>18</sub> foi realizada seguindo as metodologias descritas nos itens 4.2.2.3 e 4.2.2.4, respectivamente.

#### **4.2.4. Estudos de distribuição biológica**

A biodistribuição do peptídeo radioiodado por ambos os métodos foi realizada em camundongos *Swiss* pesando entre 20-30 g, normais e com foco de inflamação experimental.

Os animais com foco de inflamação foram obtidos promovendo-se lesão inflamatória química pela inoculação de 0,1 mL de terebentina no subcutâneo da coxa traseira direita, quatro a cinco dias antes da realização dos experimentos<sup>90</sup>.

O estudo foi realizado utilizando-se método invasivo. Administrou-se a dose do radiofármaco (0,37 – 0,74 MBq/100 µL) na veia caudal dos animais (N=6 para cada tempo) e após intervalos de tempos pré-fixados foi puncionada a veia

do sinus orbital, com capilar de vidro heparinizado especial para a coleta de 100  $\mu$ L de alíquota sangüínea. Os animais foram imediatamente sacrificados para retirada dos órgãos de interesse que foram pesados e colocados em tubos para determinação da radioatividade incorporada, utilizando-se contador gama (tipo poço), calibrado para o radionuclídeo  $^{131}\text{I}$ . Para marcação pelo método direto foram avaliados os tempos de 1, 4 e 24 horas e para o método indireto foram incluídos os tempos menores de 15 e 30 minutos.

Além da amostra sangüínea, foram retirados os órgãos considerados de interesse. Em camundongos normais retirou-se cérebro, tireóide, pulmão, coração, baço, fígado, estômago, músculo da coxa direita traseira, rins e intestinos delgado e grosso com conteúdo. Ademais, foram extirpadas as patas traseiras direita (coxa com foco inflamatório) e esquerda (coxa normal), nos camundongos com foco inflamatório.

A porcentagem de captação da atividade administrada nos diferentes órgãos foi calculada em função da atividade administrada (equações 1 e 2).

$$\% \text{Atividade/órgão} = \frac{\text{cpm órgão}}{\text{cpm padrão}} \cdot 100 \quad (\text{equação 1})$$

onde cpm = contagem por minuto

$$\% \text{Atividade/grama de tecido} = \frac{\% \text{Dose / órgão}}{\text{peso órgão}} \quad (\text{equação 2})$$

#### **4.2.4.1. Estudo da compatibilidade do radiofármaco com as células receptoras do foco inflamatório por meio da técnica de perfusão**

Este estudo foi realizado com o peptídeo marcado com  $^{131}\text{I}$  por via direta e purificado, em animais com foco de inflamação experimental provocado pela injeção de terebentina na coxa traseira direita.

Administrou-se o radiofármaco na veia caudal dos animais (N=6) (0,37 – 0,74 MBq/100 $\mu$ L) e após intervalo de tempo de 1 hora realizou-se a perfusão com solução salina durante 1 hora, via inserção no ventrículo esquerdo e saída no ápice da aurícula direita. Após a perfusão, foram retiradas as coxas direita (coxa com foco de inflamação) e esquerda (coxa controle normal) para a determinação da radioatividade incorporada. A porcentagem de captação em ambas as coxas foi calculada em função da atividade administrada.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Síntese do ATE

O ATE sintetizado foi caracterizado por RMN-<sup>1</sup>H e IV. Na TAB. 1 apresentam-se os dados da caracterização e rendimento obtidos.

TABELA 1. Dados da caracterização e rendimento do ATE sintetizado

	RMN- <sup>1</sup> H (300 MHz; CDCl <sub>3</sub> )	IV	Rendimento (%)
Resultado obtido	0,92 – 1,67 ( <i>m</i> típico, 27H, 3x n-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> ); 2,90 ( <i>s</i> , 4H, -CO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO); 7,44 ( <i>t</i> , <i>j</i> =7Hz, C5-H); 7,77 ( <i>d</i> , <i>J</i> =7Hz, C4-H); 8,07 ( <i>d</i> , <i>J</i> =7Hz, C6-H); 8,20 ( <i>s</i> , 1H, C2-H)	1745 cm <sup>-1</sup> ; 1770 cm <sup>-1</sup> bandas de absorção das 3 carbonilas (vibração de deformação axial de C=O)	1 <sup>a</sup> síntese: 90,6% 2 <sup>a</sup> síntese: 90,8%

A FIG. 9 representa a caracterização do ATE sintetizado, em Ressonância Nuclear Magnética de prótons (RMN-<sup>1</sup>H).

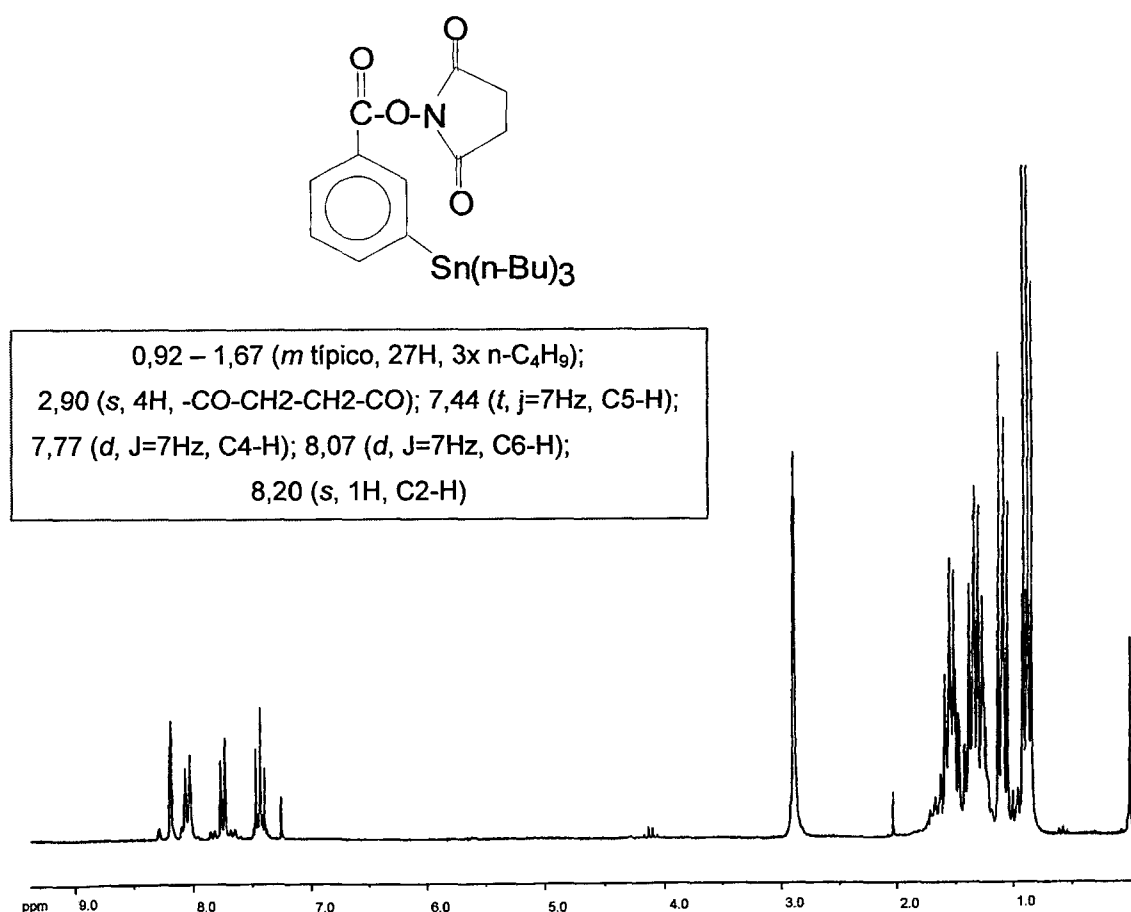


FIGURA 9. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>) de 0 a 9 ppm do ATE sintetizado. Obtido no Espectrômetro Bruker modelo Advance DPX – 300 MHz (FCF-USP), utilizando-se clorofórmio deuterado como padrão de referência interna.

Analisando-se o espectro de RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>) comprova-se a obtenção do ATE uma vez que se verifica a presença: do multipletto típico entre 0,92 e 1,67 ppm relacionado aos 27 prótons existentes no radical tri-butil estanho, de um singletto em 2,9 ppm relacionado aos 4 prótons presentes na função N-succinimidila, de um triplete em 7,44 relacionado ao próton ligado ao C-5 do anel, de um dupletto em 7,77 ppm relacionado ao próton ligado ao C-4 do anel, de um dupletto em 8,07 relacionado ao próton ligado ao C-6 do anel e um singletto em 8,20 relacionado ao próton ligado ao C-2 do anel.

Analisando-se o ATE por espectrometria no infravermelho (IV), conforme apresentado na FIG.10 a seguir, verifica-se a presença das bandas de absorção das 3 carbonilas (vibração de deformação axial de C=O) ocorrendo em  $1745\text{ cm}^{-1}$  e  $1770\text{ cm}^{-1}$ , que sugerem a formação do composto benzoato de 3-(tri-n-butil estânio) N-succinimidila – ATE <sup>91</sup>.

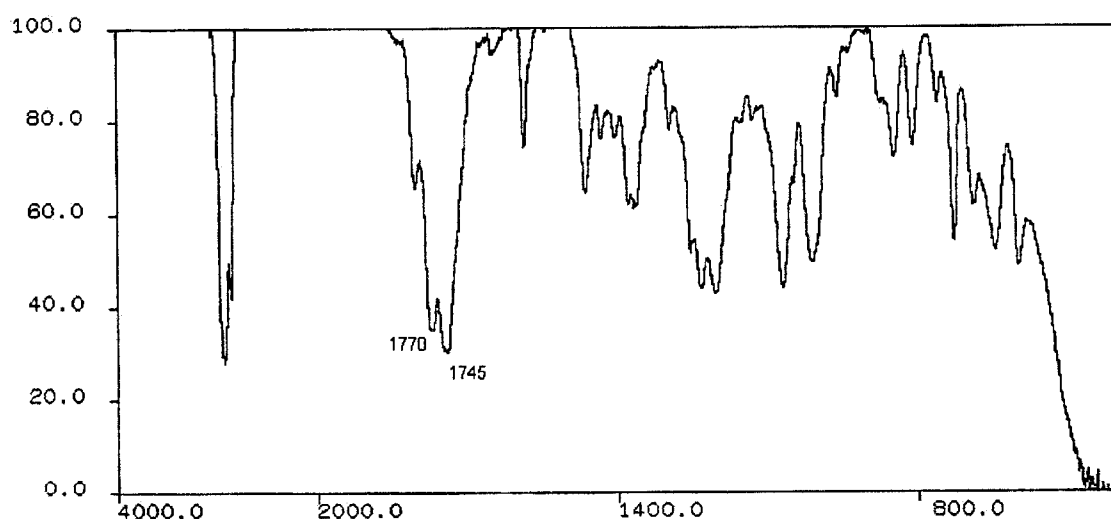


FIGURA 10 - Espectro IV do ATE sintetizado. O espectro foi registrado em espectrofotômetro Shimadzu IR-470 (FCF-USP), com a amostra na forma de um líquido oleoso, em filme.

A FIG. 11 representa o perfil do ATE sintetizado em CLAE-UV na coluna de sílica, com tempo de retenção de 5,75 minutos. A FIG. 12 ilustra o perfil de CLAE-UV (fluxo de 0,5 mL/min.) na coluna  $\text{C}_{18}$  do mesmo ATE, com tempo de retenção de 10,67 minutos.

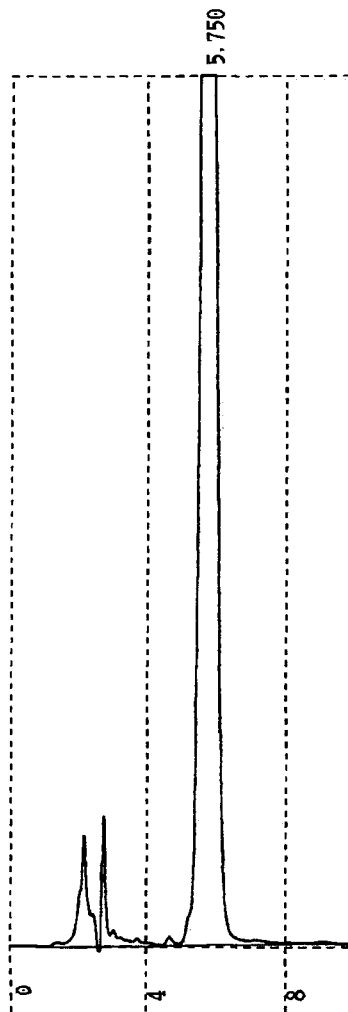


FIGURA 11- Perfil de CLAE do ATE sintetizado - detetor UV (254 nm). Coluna de sílica ( $10\mu$ ;  $4,6 \times 250$ mm) fase móvel, hexano:acetato de etila: ácido acético 70:30:0,2 (v:v:v); fluxo: 1mL/minuto  
Rt ATE = 5,75 minutos

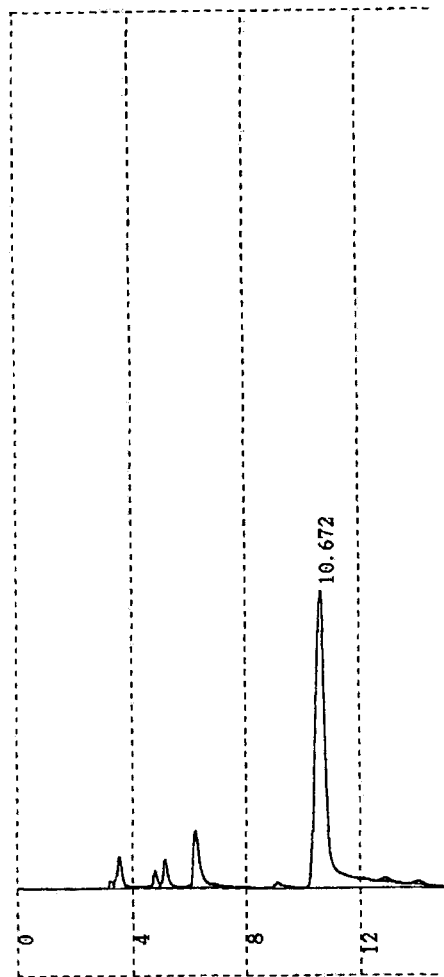


FIGURA 12- Perfil de CLAE do ATE sintetizado - detetor UV (220 nm). Coluna de fase reversa  $C_{18}$ ; fase móvel, acetonitrila:TFA 0,1% 35:65 (v:v); fluxo de 0,5mL/minuto  
Rt ATE = 10,67 minutos

## 5.2. Marcação do grupo prostético ATE com radioiodo

Iniciou-se o estudo promovendo-se a marcação do ATE sintetizado com iodo não radioativo. Este estudo sugere, pela análise em CCD, a conversão de ATE em SIB, pelo aparecimento de duas bandas com Rf 0,48 e 0,24 (conforme descrito por Zalutsky<sup>2</sup>) que correspondem ao ATE e SIB, respectivamente.

As FIG. 13 e 14 representam os perfis cromatográficos nas colunas de sílica e C<sub>18</sub> obtidos em CLAE, para o SIB preparado.

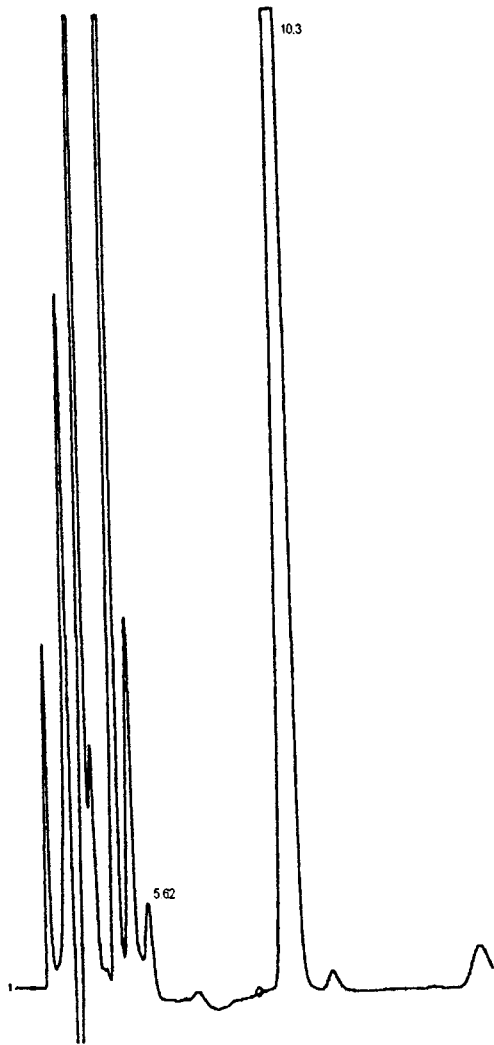


FIGURA 13. Perfil de CLAE do SIB -  
marcação com iodo não radioativo  
Detetor UV (254 nm).  
Coluna de sílica (10 $\mu$ ; 4,6x250mm)  
fase móvel, hexano:acetato de etila:  
ácido acético 70:30:0,2 (v:v:v);  
fluxo: 1mL/minuto  
Rt SIB = 10,3 minutos

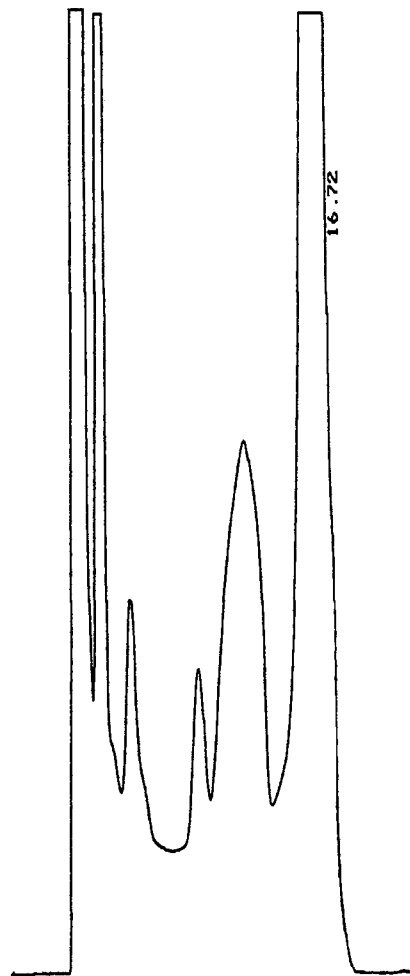


FIGURA 14. Perfil de CLAE do SIB -  
marcação com iodo não radioativo  
Detetor UV (220 nm).  
Coluna de fase reversa C<sub>18</sub>;  
fase móvel, acetonitrila:TFA 0,1%  
35:65 (v:v);  
fluxo de 0,5mL/minuto  
Rt SIB = 16,72 minutos

Quanto ao estudo dos parâmetros de marcação do ATE com radioiodo, a TAB. 2 apresenta os resultados de rendimento de SIB obtidos variando-se o pH do meio reacional.

TABELA 2. Radioiodação do ATE: influência do pH

<b>pH</b>	<b>% SIB (<math>\bar{x} \pm \sigma</math>)</b>	
3,0 – 4,0	74,5 ± 5,9	N=5
5,0 – 5,5	69,5 ± 4,2	N=5

Parâmetros fixos: concentração de TBHP 50  $\mu\text{mol}$  e tempo de reação de 30 minutos

Na TAB. 3 apresentam-se os resultados obtidos no estudo sobre a influência da concentração do agente oxidante TBHP no rendimento de marcação.

TABELA 3. Radioiodação do ATE: influência da concentração de TBHP

<b>Concentração TBHP (<math>\mu\text{mol}</math>)</b>	<b>% SIB (<math>\bar{x} \pm \sigma</math>)</b>	
25	70,9 ± 1,0 %	N=7
50	74,4 ± 2,7 %	N=10
100	72,0 ± 3,5 %	N=6

Parâmetros fixos: pH 3,0 – 4,0 e tempo de reação de 30 minutos

Outro parâmetro avaliado foi a influência do tempo de reação no rendimento de marcação. Na TAB. 4 estão os resultados obtidos.

TABELA 4. Radioiodação do ATE: influência do tempo de reação

<b>Tempo de reação (minutos)</b>	<b>% SIB (<math>\bar{x} \pm \sigma</math>)</b>	
15	72,7 ± 1,8 %	N=3
30	74,4 ± 2,7 %	N=10
45	75,9 ± 5,2 %	N=3
60	74,8 ± 5,2 %	N=3

Parâmetros fixos: concentração de TBHP 50  $\mu\text{mol}$  e pH 3,0 – 4,0

A marcação do ATE utilizando-se TBHP (concentração de 50  $\mu\text{mol}$ ) foi avaliada por CLAE como mostrado na FIG.15 e observou-se o pico de  $R_t \cong 10,4$  minutos, referente ao SIB, além dos picos correspondentes a outras espécies radioquímicas geradas.

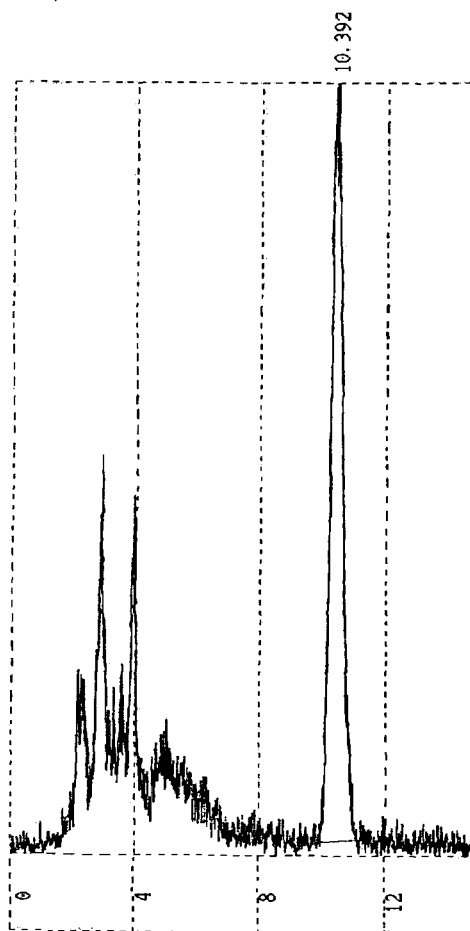


FIGURA 15 - Perfil radioativo de CLAE do SIB; agente oxidante TBHP (50  $\mu\text{mol}$ ). Coluna de sílica (10  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm); fase móvel, hexano:acetato de etila:ácido acético 70:30:0,2 (v :v :v); fluxo: 1mL/minuto  
 $R_t$  SIB = 10,392 minutos

Na análise em CLAE das marcações do ATE utilizando-se NCS como agente oxidante, observou-se o pico correspondente ao SIB ( $R_t= 10,4$  min.) e um segundo pico radioativo ( $R_t= 8,4$  min.) (FIG. 16), provavelmente relacionado à iodação do agente oxidante NCS. Tal hipótese foi reforçada realizando-se as marcações com NCS, porém excluindo-se do meio reacional o ATE, nas quais observou-se somente o pico de  $R_t=8,4$  minutos que parece corresponder ao agente oxidante NCS radioiodado (FIG. 17).

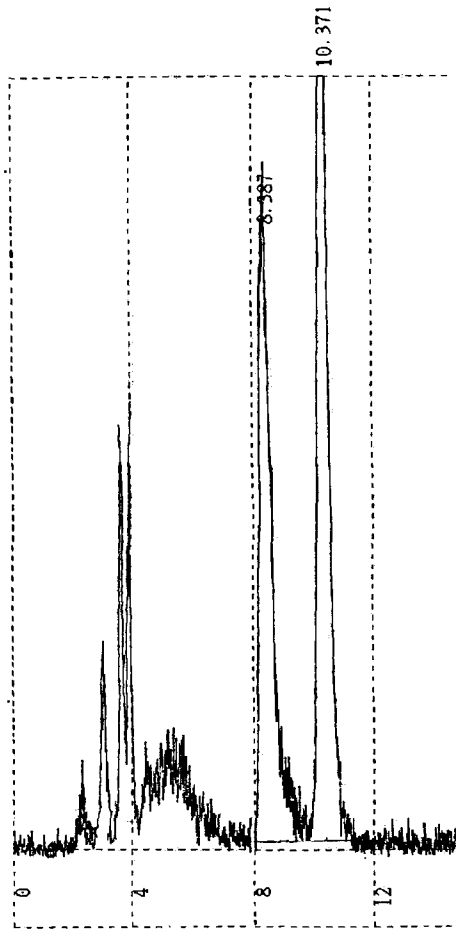


FIGURA 16- Perfil radioativo de CLAE do SIB; agente oxidante NCS 10  $\mu$ mol. Coluna de sílica (10  $\mu$ m; 4,6 x 250 mm); fase móvel, hexano:acetato de etila: ácido acético 70:30:0,2 (v :v :v); fluxo de 1mL/minuto  
Rt SIB = 10,4 minutos  
Rt NCS radioiodado = 8,4 minutos

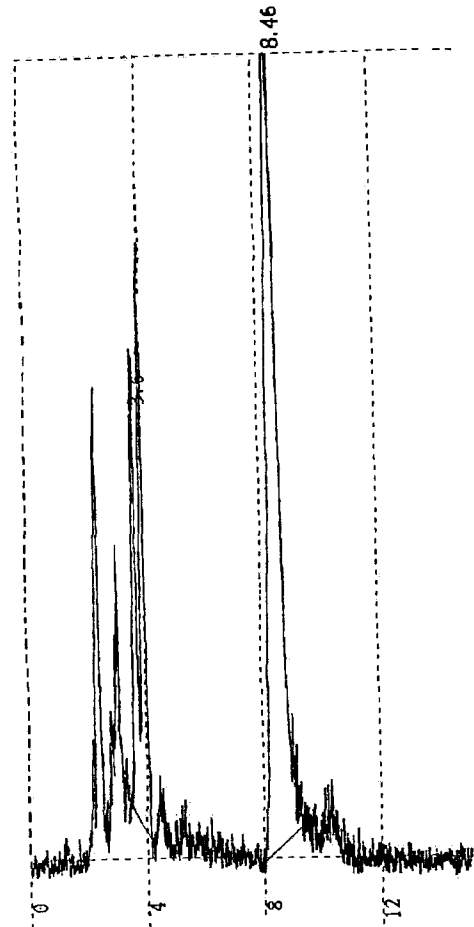


FIGURA 17- Perfil radioativo de CLAE do meio reacional sem o ATE; agente oxidante NCS 10  $\mu$ mol. Coluna de sílica (10  $\mu$ m; 4,6 x 250 mm); fase móvel, hexano:acetato de etila: ácido acético 70:30:0,2 (v :v :v); fluxo de 1mL/minuto  
Rt NCS radioiodado = 8,4 minutos

### 5. 3. Estudo da radioiodação do peptídeo fNleLFNleYK pelo método indireto

#### 5.3.1. Rendimento de marcação do ATE após purificação em mini coluna compactada de sílica

Na TAB. 5 encontram-se os resultados obtidos na purificação do SIB em mini coluna compactada de sílica e o rendimento final obtido (A7).

TABELA 5. Rendimento (%) SIB purificado em mini coluna compactada de sílica.

Ensaio	AI (MBq)	A1 (%)	A2 (%)	A3 (%)	A4 (%)	A5 (%)	A6 (%)	A7 (%)
1	37,3	22,2	8,2	23,7	44,2	5,5	9,9	34,3
2	13,3	17,5	6,7	21,4	43,0	12,2	10,5	32,5
3	140,6	15,1	4,3	17,1	55,8	6,4	8,8	46,8
4	297,1	17,4	5,0	19,9	51,0	3,6	7,9	43,1
5	171,7	10,7	4,2	24,6	55,6	3,6	16,4	39,2
6	158	13,1	4,6	23,2	52,7	3,2	5,8	46,8
$\bar{x} \pm \sigma$								$40,4 \pm 5,6$

AI= atividade inicial (MBq); A1= % da atividade residual no frasco de marcação; A2= % da atividade na fração de hexano; A3= % da atividade na fração mistura hexano: acetato de etila 8%; A4= % da atividade na fração mistura hexano: acetato de etila 30%; A5= % da atividade residual na coluna compactada de sílica; A6= % da atividade residual no frasco da fração 30%; A7= % da atividade recuperada da fração 30% para conjugação.

As análises de CLAE do SIB antes da purificação e das frações de purificação do SIB (A3 e A4), estão representadas respectivamente nas FIG. 18, 19 e 20.

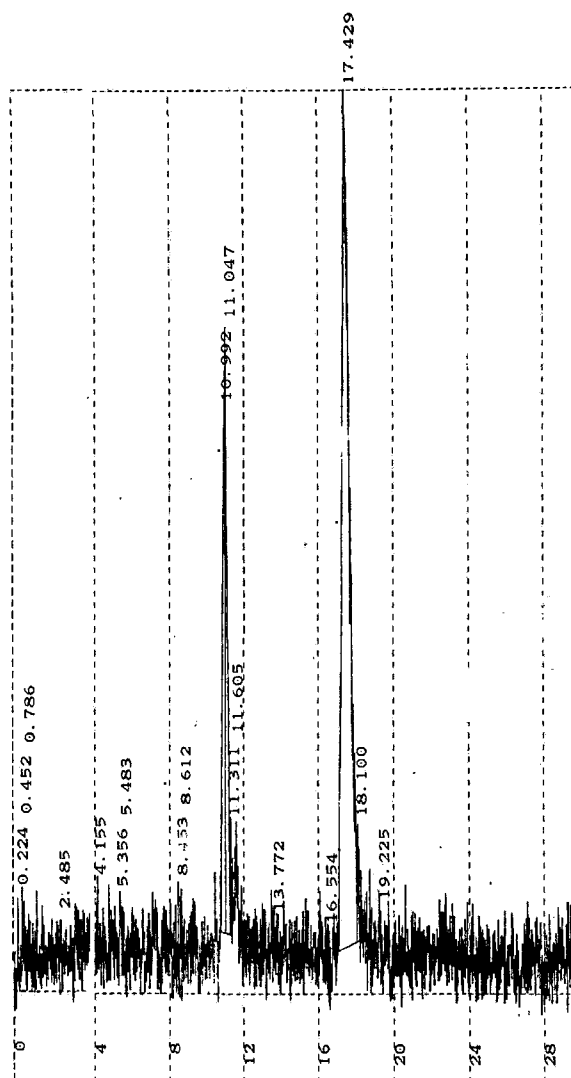


FIGURA 18- Perfil radioativo de CLAE do SIB antes da purificação. Coluna de fase reversa  $C_{18}$ ; fase móvel: acetonitrila:TFA 0,1% 35:65; fluxo de 0,5mL/minuto; detetor de radiação

Na FIG. 18 o pico com  $R_t = 17,4$  minutos corresponde ao SIB conforme verificado pelo CLAE em coluna  $C_{18}$  da marcação realizada com NaI não radioativo (FIG. 14) e o pico de 11 minutos corresponde a uma impureza radioquímica da marcação, não identificada, diferente do radioiodo livre ( $R_t \approx 3$  minutos).

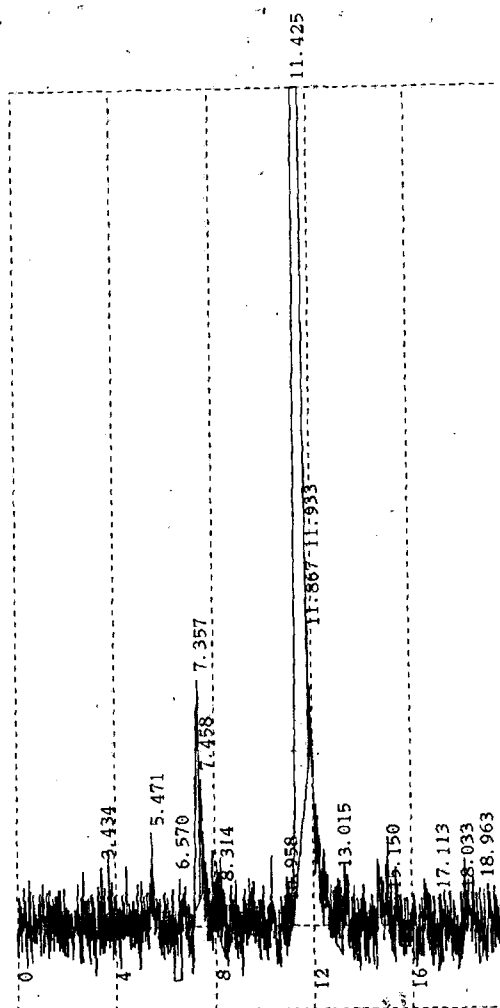


FIGURA 19- Perfil radioativo de CLAE da fração de eluição hexano: acetato de etila 92:8. Coluna de fase reversa C<sub>18</sub>; fase móvel: acetonitrila:TFA 0,1% 35:65; fluxo de 0,5mL/minuto; detetor de radiação

Na FIG. 19 verifica-se que a impureza radioquímica com  $R_t \cong 11$  minutos é removida na fração de purificação hexano: acetato de etila 8%. Uma segunda impureza radioquímica com  $R_t \cong 7,3$  minutos foi ainda identificada nesta fração que foi concentrada após evaporação do solvente com nitrogênio gasoso, para análise em CLAE.

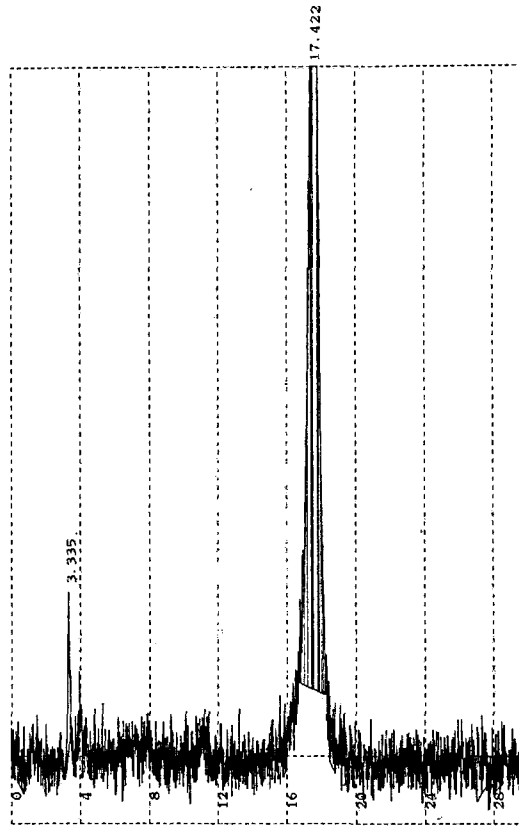


FIGURA 20- Perfil radioativo de CLAE da fração de eluição hexano: acetato de etila 70:30. Coluna de fase reversa C<sub>18</sub>; fase móvel: acetonitrila:TFA 0,1% 35:65; fluxo de 0,5mL/minuto; detetor de radiação

Na fração de eluição hexano: acetato de etila 30% observa-se o produto puro com  $R_t = 17,4$  minutos (FIG. 20). Um segundo pico com  $R_t = 3,33$  minutos correspondente ao radioiodo livre pode ser observado nesta fração de purificação, concentrada após evaporação do solvente com nitrogênio gasoso, em quantidade inferior a 3%.

### 5.3.2. Conjugação do peptídeo fNleLFNleYK ao SIB

A pureza radioquímica (CLAE) do conjugado antes da purificação foi de  $77,7 \pm 1,3$  % (N=3).

A FIG. 21, a seguir, mostra o perfil de CLAE do peptídeo fNleLFNleYK conjugado ao SIB antes da purificação.

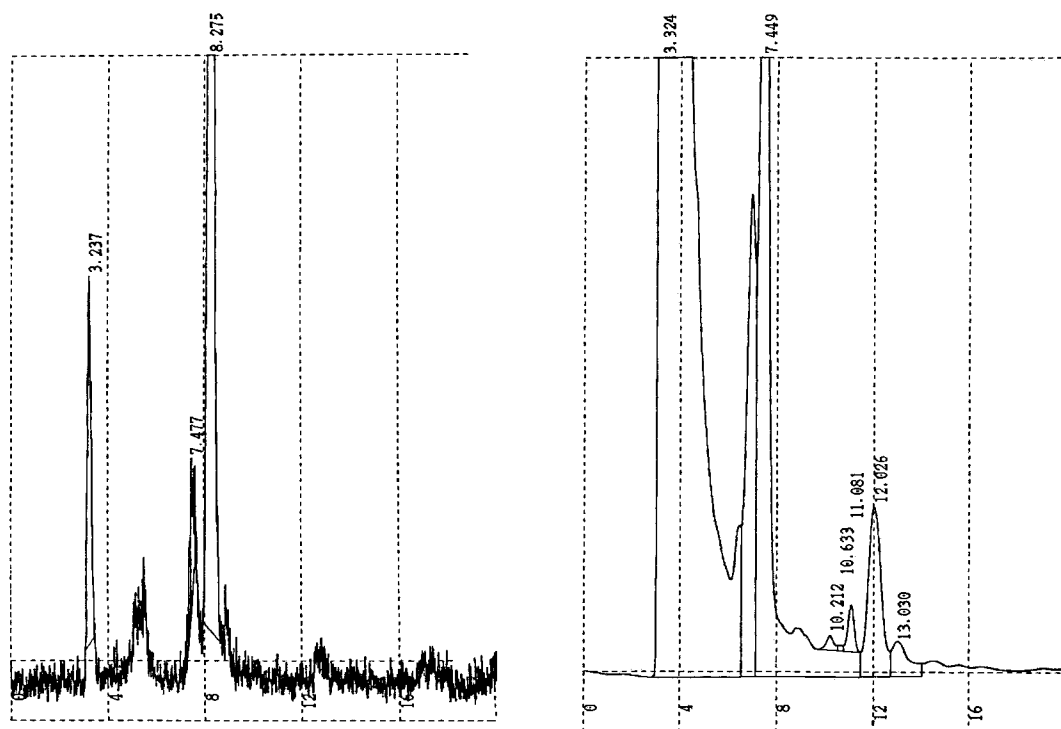


FIGURA 21- Perfil de CLAE do peptídeo fNleLFNleYK conjugado ao SIB antes da purificação. Coluna de fase reversa C<sub>18</sub>; fase móvel, acetonitrila:TFA 0,1% 35:65; fluxo de 0,5mL/minuto; detetor de radiação (esquerda) e detetor UV (220nm) (direita).

#### Detetor Radiação

Rt peptídeo fNleLFNleYK conjugado ao SIB = 8,3 minutos  
Rt iodo livre (<sup>131</sup>I) = 3,3 minutos

#### Detetor UV

Rt peptídeo fNleLFNleYK que não reagiu com o SIB = 7,4 minutos

Observando-se o perfil cromatográfico do peptídeo fNleLFNleYK conjugado ao SIB antes da purificação (FIG. 21), verifica-se que o sistema de CLAE estudado pode ser utilizado para separar o conjugado (Rt= 8,3 minutos) do peptídeo que não conjugou (Rt = 7,4 minutos) e do SIB que não reagiu (Rt= 17,4 minutos).

### 5.3.3. Rendimento de marcação do fNleLFNleYK utilizando-se SIB após purificação

Na TAB. 6 encontram-se os dados obtidos de rendimento (%) do peptídeo fNleLFNleYK conjugado ao SIB purificado.

TABELA 6: Rendimento (%) do peptídeo fNleLFNleYK conjugado ao SIB purificado

Ensaio	AI (MBq)	A1 (%)	A2 (%)
1	86,9	30,98	28,08
2	67,3	30,03	27,61
3	74,0	29,5	23,25
$\bar{x} \pm \sigma$		$30,17 \pm 0,61$	$26,31 \pm 2,17$

AI = atividade inicial da conjugação; A1 = % da atividade do conjugado após purificação em CLAE (coluna C<sub>18</sub>); A2 = % da atividade do conjugado após purificação em mini coluna compactada C<sub>18</sub>

A pureza radioquímica do conjugado puro, avaliada por eletroforese, foi de  $99,25 \pm 0,68$  % (N=4).

Avaliou-se a estabilidade do peptídeo marcado por eletroforese e a pureza radioquímica manteve-se praticamente inalterada após 24 horas, quando acondicionado a 4°C.

### 5.3.4. Estudo da marcação do fNleLFNleYK utilizando-se SIB sem purificação (mini coluna compactada de sílica)

A FIG. 22 representa o perfil de CLAE da marcação do peptídeo fNleLFNleYK por via indireta, utilizando-se SIB sem purificar.

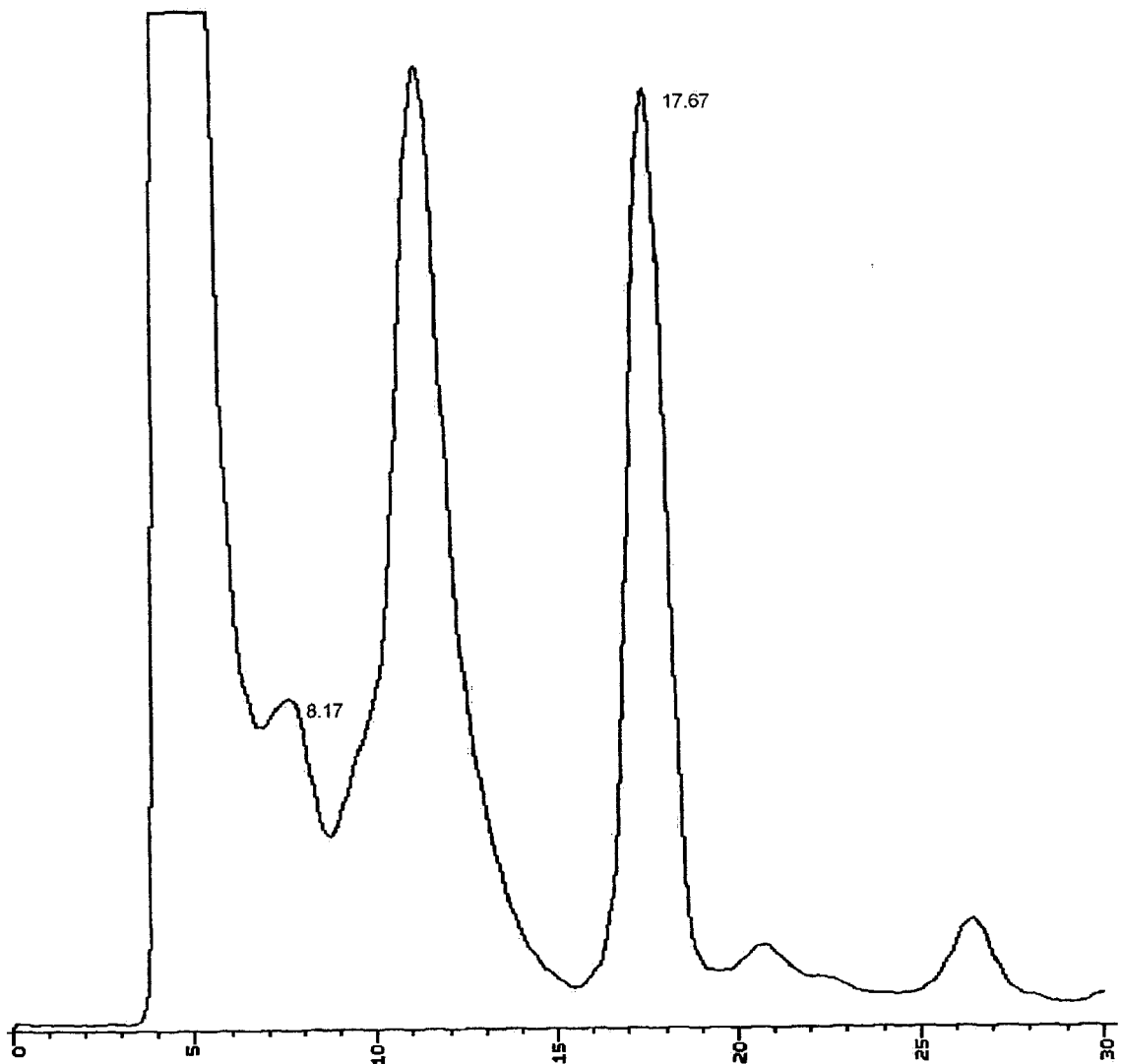


FIGURA 22 – Perfil radioativo de CLAE da marcação do peptídeo fNleLFNleYK por via indireta, utilizando-se SIB sem purificar.

Coluna de fase reversa C<sub>18</sub>; fase móvel, acetonitrila:TFA 0,1% 35:65; fluxo de 0,5mL/minuto.

Rt peptídeo conjugado = 8,17 minutos

Rt impureza radioquímica = 11,33 minutos

Rt SIB = 17,67 minutos

#### 5.4. Estudo da radioiodação do peptídeo fNleLFNleYK pelo método direto

A seguir na FIG. 23 está representado o perfil de CLAE do peptídeo fNleLFNleYK em solução de DMF.

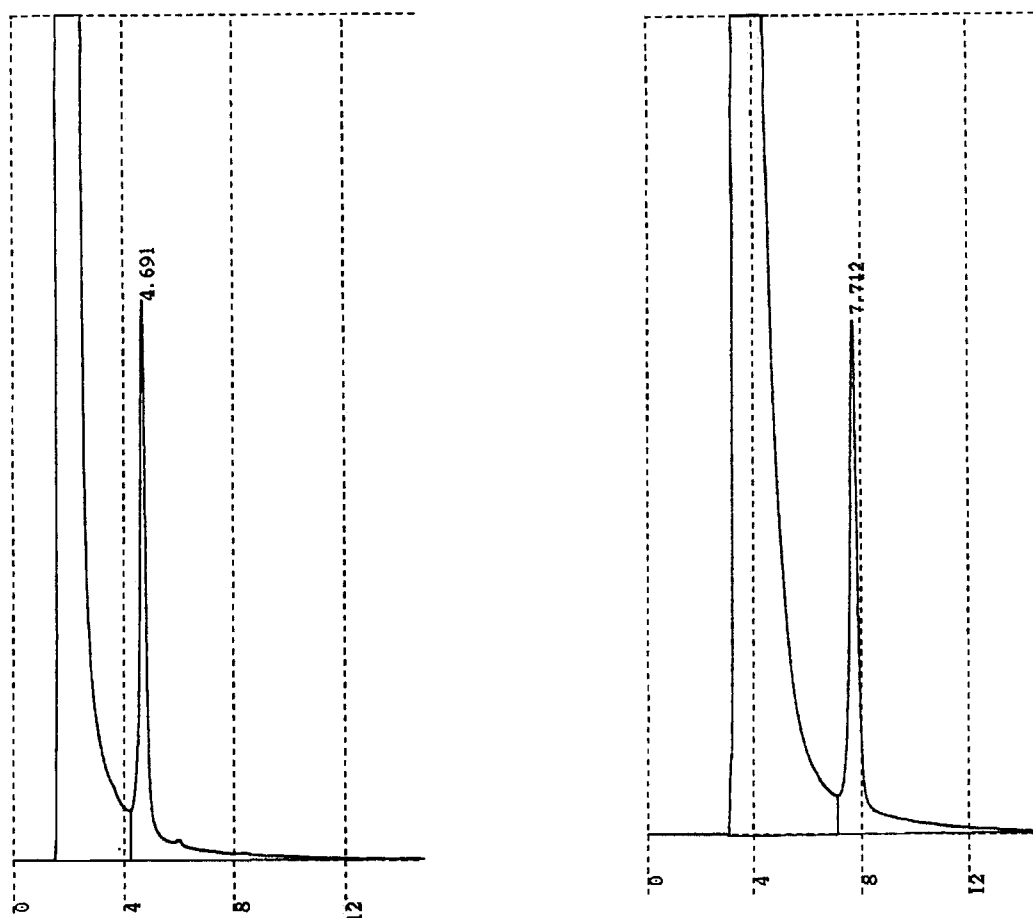


FIGURA 23 – Perfil de CLAE do peptídeo fNleLFNleYK em solução de DMF  
Detetor UV (220 nm); coluna de fase reversa C<sub>18</sub>; fase móvel, acetonitrila:TFA  
0,1% 35:65;  
fluxo de 1,0mL/minuto (Esquerda)                      fluxo de 0,5mL/minuto (Direita)  
Rt peptídeo = 4,69 minutos                                      Rt peptídeo = 7,7 minutos

O peptídeo radioiodado por via direta utilizando-se cloraminaT como agente oxidante foi obtido em um curto tempo de reação (10 minutos) e com alta pureza radioquímica ( $96,8 \pm 0,84 \%$ , N=6).

Foi avaliada a estabilidade do peptídeo radioiodado por via direta por eletroforese e o mesmo permaneceu estável por 48 horas, acondicionado a 4°C.

Na FIG. 24 é apresentado o perfil cromatográfico (CLAE) do peptídeo radioiodado por via direta.

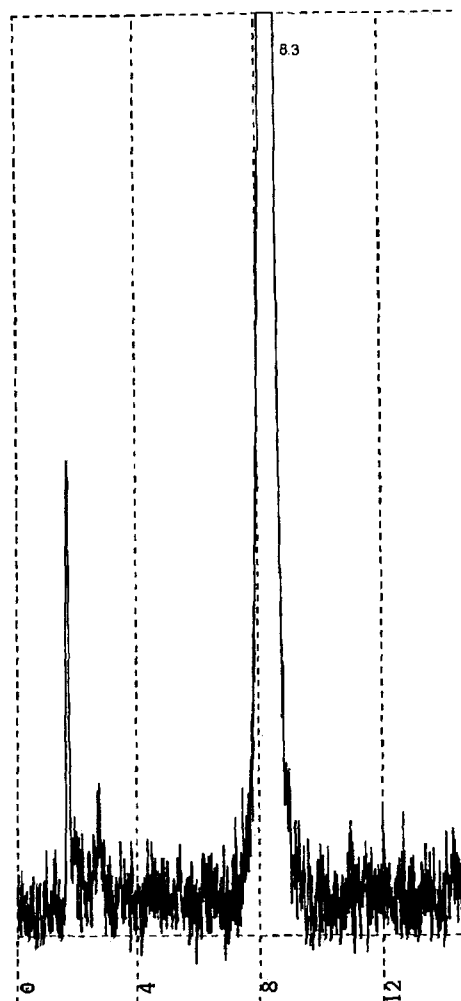


FIGURA 24 - Perfil radioativo de CLAE do peptídeo marcado por via direta .  
Coluna de fase reversa C<sub>18</sub>; fase móvel, acetonitrila: TFA 0,1% 35:65 (v:v); fluxo de 1,0mL/ minuto;  
Rt iodo livre (<sup>131</sup>I) = 1,7 minutos  
Rt peptídeo radioiodado = 8,3 minutos

## 5.5. Estudo da distribuição biológica do peptídeo fNleLFNleYK

### 5.5.1. Estudo da distribuição biológica do peptídeo fNleLFNleYK marcado pelo método direto

Na TAB. 7 é apresentado o resultado do estudo de distribuição biológica do peptídeo radioiodado por via direta e não purificado, utilizando-se camundongos *Swiss* normais.

TABELA 7 - Porcentagem atividade/órgão do peptídeo fNleLFNleYK marcado pelo método direto e não purificado, administrado intravenosamente em camundongos *Swiss* normais

ÓRGÃO	% Atividade administrada/órgão		
	Tempo 1 hora	4 horas	24 horas
Cérebro	0,19 ± 0,03	0,22 ± 0,05	0,04 ± 0,01
Tireóide	4,54 ± 0,35	9,93 ± 1,76	19,85 ± 2,54
Pulmão	2,06 ± 0,39	1,48 ± 0,22	0,16 ± 0,04
Coração	0,35 ± 0,03	0,33 ± 0,07	0,04 ± 0,01
Baço	1,32 ± 0,14	1,21 ± 0,03	0,12 ± 0,03
Fígado	12,46 ± 1,58	5,08 ± 1,01	0,56 ± 0,04
Estômago	5,34 ± 0,72	6,69 ± 0,57	0,44 ± 0,19
Músculo total	18,07 ± 2,15	14,81 ± 1,85	1,99 ± 0,57
Rins	1,45 ± 0,15	1,72 ± 0,33	0,14 ± 0,06
Intestino delgado	7,82 ± 0,48	9,89 ± 1,52	1,13 ± 0,38
Intestino grosso	4,72 ± 0,65	6,57 ± 0,61	1,84 ± 0,44
Sangue total	11,56 ± 1,36	10,92 ± 2,01	1,03 ± 0,43

Na TAB. 8 é apresentado o resultado do estudo de distribuição biológica (porcentagem atividade/grama) do peptídeo radioiodado por via direta e não purificado utilizando-se camundongos *Swiss* normais.

TABELA 8 - Porcentagem atividade/grama do peptídeo fNleLFNleYK marcado pelo método direto e não purificado, administrado intravenosamente em camundongos *Swiss* normais

ÓRGÃO	Tempo		
	% Atividade administrada/grama		
	1 hora	4 horas	24 horas
Cérebro	0,48 ± 0,04	0,50 ± 0,10	0,09 ± 0,03
Tireóide	-	-	-
Pulmão	6,66 ± 0,85	5,89 ± 1,43	0,49 ± 0,11
Coração	2,58 ± 0,45	2,46 ± 0,19	0,28 ± 0,10
Baço	14,78 ± 0,59	7,42 ± 0,86	1,56 ± 0,47
Fígado	10,28 ± 0,84	4,49 ± 0,88	0,43 ± 0,06
Estômago	18,88 ± 1,14	19,37 ± 1,11	1,47 ± 0,44
Músculo total	1,86 ± 0,16	1,60 ± 0,13	0,19 ± 0,06
Rins	4,10 ± 0,43	4,61 ± 0,15	0,30 ± 0,06
Intestino delgado	4,24 ± 0,18	6,05 ± 0,87	0,51 ± 0,11
Intestino grosso	4,83 ± 0,41	7,15 ± 0,19	1,59 ± 0,35
Sangue/mL	7,25 ± 0,47	6,96 ± 0,85	0,51 ± 0,12

Na TAB. 9 apresenta-se o resultado do estudo de distribuição biológica do peptídeo fNleLFNleYK radioiodado por via direta e não purificado utilizando-se camundongos *Swiss* com foco de inflamação experimental com terebentina na coxa direita traseira.

TABELA 9 - Porcentagem atividade/órgão do peptídeo marcado pelo método direto e não purificado, administrado intravenosamente em camundongos *Swiss* com foco de inflamação na coxa direita traseira

ÓRGÃO	Tempo		
	% Atividade administrada/órgão		
	1 hora	4 horas	24 horas
Cérebro	0,20 ± 0,04	0,17 ± 0,05	0,08 ± 0,02
Tireóide	2,29 ± 0,27	8,06 ± 2,16	19,51 ± 2,22
Pulmão	5,81 ± 0,60	2,61 ± 0,90	0,72 ± 0,12
Coração	0,30 ± 0,06	0,23 ± 0,04	0,094 ± 0,05
Baço	2,38 ± 0,46	0,99 ± 0,17	0,33 ± 0,06
Fígado	17,17 ± 0,85	6,00 ± 0,85	1,22 ± 0,12
Estômago	3,87 ± 0,71	6,22 ± 0,19	2,16 ± 0,29
Coxa direita	6,85 ± 0,54	5,72 ± 0,47	2,48 ± 0,67
Coxa esquerda	2,90 ± 0,22	1,90 ± 0,22	1,04 ± 0,23
Rins	1,98 ± 0,26	1,38 ± 0,18	0,62 ± 0,07
Intestino delgado	7,07 ± 0,96	5,87 ± 0,64	2,76 ± 0,29
Intestino grosso	4,21 ± 0,33	4,82 ± 0,68	2,86 ± 0,40
Sangue total	10,98 ± 1,81	8,09 ± 1,40	3,64 ± 0,50

Na TAB. 10 apresenta-se o resultado (% atividade/grama) do estudo de distribuição biológica do peptídeo fNleLFNleYK radioiodado por via direta e não purificado utilizando-se camundongos *Swiss* com foco de inflamação experimental na coxa direita traseira.

TABELA 10 - Porcentagem atividade/grama do peptídeo marcado pelo método direto e não purificado, administrado intravenosamente em camundongos *Swiss* com foco de inflamação na coxa direita traseira

ÓRGÃO	Tempo		
	% Atividade administrada/grama		
	1 hora	4 horas	24 horas
Cérebro	0,47 ± 0,10	0,47 ± 0,11	0,20 ± 0,04
Tireóide	-	-	-
Pulmão	18,35 ± 1,10	9,98 ± 1,92	2,44 ± 0,27
Coração	2,47 ± 0,32	1,68 ± 0,17	0,76 ± 0,16
Baço	17,84 ± 0,99	7,44 ± 0,82	2,97 ± 0,47
Fígado	11,52 ± 1,96	3,84 ± 0,65	1,16 ± 0,24
Estômago	10,91 ± 1,64	10,48 ± 0,81	9,09 ± 0,74
Coxa direita	2,76 ± 0,46	2,53 ± 0,39	1,37 ± 0,31
Coxa esquerda	1,47 ± 0,20	1,41 ± 0,21	0,76 ± 0,13
Rins	4,63 ± 0,75	3,61 ± 0,42	1,55 ± 0,22
Intestino delgado	3,91 ± 0,36	3,30 ± 0,28	1,96 ± 0,32
Intestino grosso	4,34 ± 0,36	4,69 ± 0,61	4,64 ± 0,62
Sangue/mL	5,25 ± 1,16	4,09 ± 0,24	1,94 ± 0,21

Para tentar avaliar a relação entre a captação no foco e o aporte sanguíneo à região inflamada, realizou-se a análise expressa na TAB. 11.

TABELA 11. Análise da relação entre captação nas coxas inflamada e normal e atividade circulante do peptídeo marcado por via direta e não purificado

Relação % Atividade	Tempos após a administração		
	1 hora	4 horas	24 horas
Coxa inflamada/coxa normal	2,4	3,0	2,4
Coxa inflamada/sangue	0,62	0,71	0,68
Coxa normal/sangue	0,26	0,23	0,28

Na TAB. 12 apresenta-se o resultado do estudo de distribuição biológica do peptídeo fNleLFNleYK radioiodado por via direta e purificado (CLAE e mini coluna C<sub>18</sub>) utilizando-se camundongos Swiss com foco de inflamação na coxa direita traseira.

TABELA 12 – Porcentagem atividade/órgão do peptídeo marcado pelo método direto e purificado, administrado intravenosamente em camundongos Swiss com foco de inflamação na coxa direita traseira

ÓRGÃO \ Tempo	% Atividade administrada/órgão		
	1 hora	4 horas	24 horas
Cérebro	0,12 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01
Tireóide	1,49 ± 0,15	4,78 ± 0,41	11,96 ± 1,48
Pulmão	0,90 ± 0,21	0,86 ± 0,14	0,38 ± 0,13
Coração	0,21 ± 0,05	0,17 ± 0,03	0,11 ± 0,04
Baço	0,27 ± 0,05	0,24 ± 0,07	0,14 ± 0,04
Fígado	2,31 ± 0,36	2,20 ± 0,15	1,11 ± 0,26
Estômago	4,41 ± 1,52	3,62 ± 1,40	1,36 ± 0,78
Coxa direita	4,88 ± 0,97	4,20 ± 0,69	2,25 ± 0,68
Coxa esquerda	2,06 ± 0,39	1,85 ± 0,17	1,10 ± 0,47
Rins	1,38 ± 0,12	1,09 ± 0,13	0,53 ± 0,15
Intestino delgado	4,02 ± 0,50	4,25 ± 0,53	3,26 ± 0,72
Intestino grosso	1,04 ± 0,15	1,02 ± 0,09	0,96 ± 0,08
Sangue total	9,48 ± 0,18	9,13 ± 0,77	3,63 ± 1,69

Na TAB. 13 apresenta-se o resultado (% atividade/grama) do estudo de distribuição biológica do peptídeo fNleLFNleYK radioiodado por via direta e purificado (CLAE e mini coluna compactada C<sub>18</sub>) utilizando-se camundongos *Swiss* com foco de inflamação na coxa direita traseira.

TABELA 13 – Porcentagem atividade/grama do peptídeo marcado pelo método direto e purificado, administrado intravenosamente em camundongos *Swiss* com foco de inflamação na coxa direita traseira

ÓRGÃO	% Atividade administrada/grama		
	Tempo 1 hora	4 horas	24 horas
Cérebro	0,30 ± 0,05	0,18 ± 0,03	0,13 ± 0,01
Tireóide	-	-	-
Pulmão	2,59 ± 0,38	2,45 ± 0,26	1,28 ± 0,54
Coração	1,34 ± 0,20	1,11 ± 0,22	0,71 ± 0,28
Baço	1,56 ± 0,21	1,49 ± 0,24	0,80 ± 0,22
Fígado	1,29 ± 0,23	1,28 ± 0,20	0,70 ± 0,17
Estômago	14,33 ± 2,20	8,26 ± 1,14	4,13 ± 1,24
Coxa direita	1,74 ± 0,24	1,68 ± 0,30	0,87 ± 0,28
Coxa esquerda	1,04 ± 0,21	0,98 ± 0,19	0,58 ± 0,23
Rins	2,75 ± 0,26	2,31 ± 0,21	1,04 ± 0,23
Intestino delgado	1,83 ± 0,44	1,68 ± 0,47	1,41 ± 0,53
Intestino grosso	1,35 ± 0,14	1,19 ± 0,13	0,93 ± 0,44
Sangue/mL	3,77 ± 0,45	3,73 ± 0,33	1,83 ± 0,48

Para tentar avaliar a relação entre a captação no foco e o aporte sanguíneo à região inflamada, realizou-se a análise expressa na TAB. 14.

TABELA 14. Análise da relação entre captação nas coxas inflamada versus normal e atividade circulante do peptídeo marcado por via direta e purificado

Relação % Atividade	Tempos após a administração		
	1 hora	4 horas	24 horas
Coxa inflamada/coxa normal	2,4	2,3	2,04
Coxa inflamada/sangue	0,51	0,46	0,61
Coxa normal/sangue	0,22	0,20	0,30

Na FIG. 25 estão representadas as curvas da atividade sangüínea do peptídeo marcado por via direta em três situações distintas. Cada ponto exprime a média do percentual da atividade administrada.

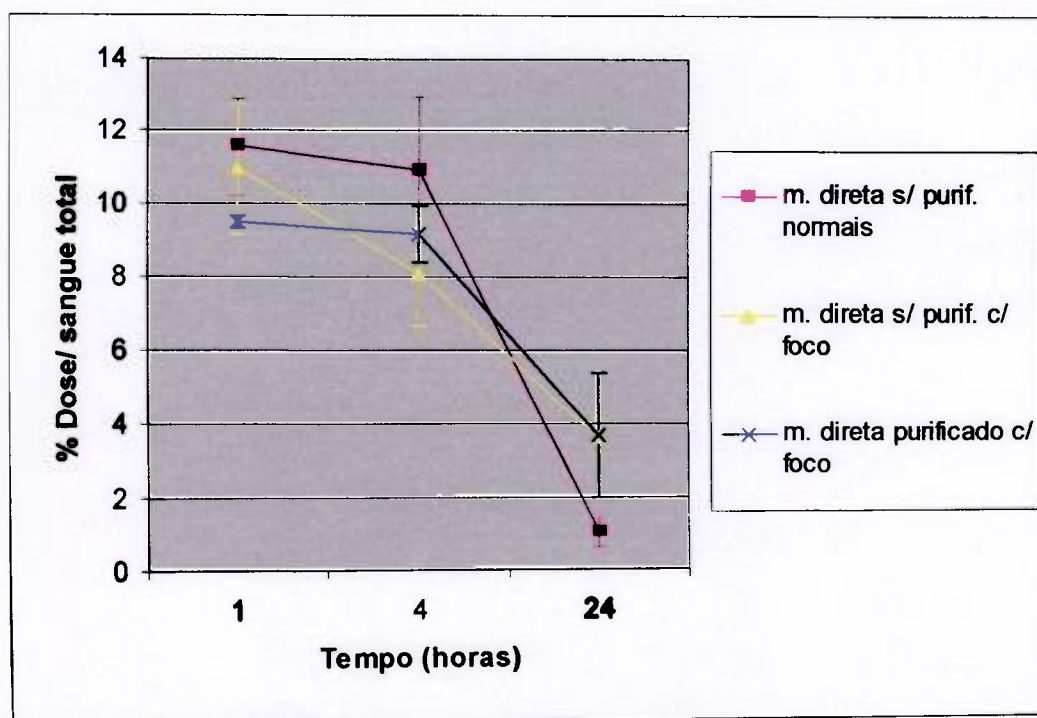


FIGURA 25. Porcentagem atividade/sangue total do peptídeo marcado por via direta com e sem purificação, administrado intravenosamente em camundongos Swiss normais e com foco de inflamação na coxa direita traseira

A FIG. 26 representa o diagrama dos valores da concentração radioativa do peptídeo marcado por via direta sem purificação em tecido normal e com processo inflamatório em função do tempo de administração.

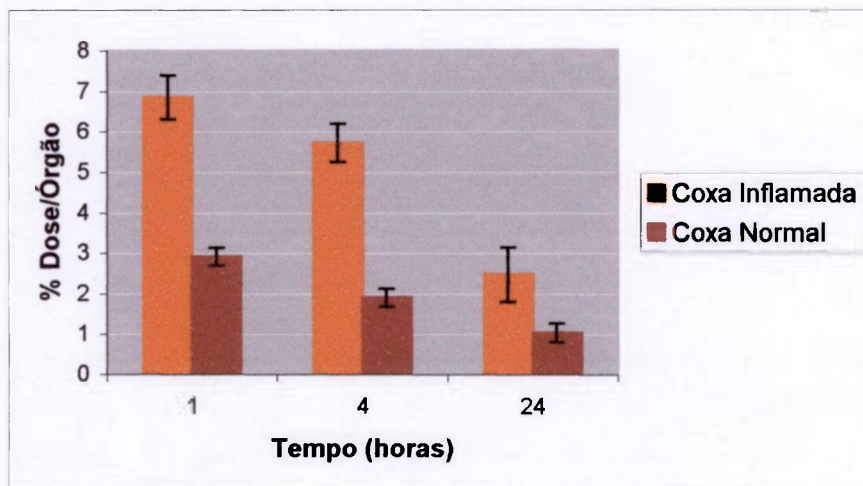


FIGURA 26. Porcentagem atividade nas coxas do peptídeo marcado por via direta, sem purificação, administrado em camundongos Swiss com foco de inflamação na coxa direita traseira

A FIG. 27 representa o diagrama dos valores da concentração radioativa do peptídeo marcado por via direta e purificação em tecido normal e com processo inflamatório em função do tempo de administração.

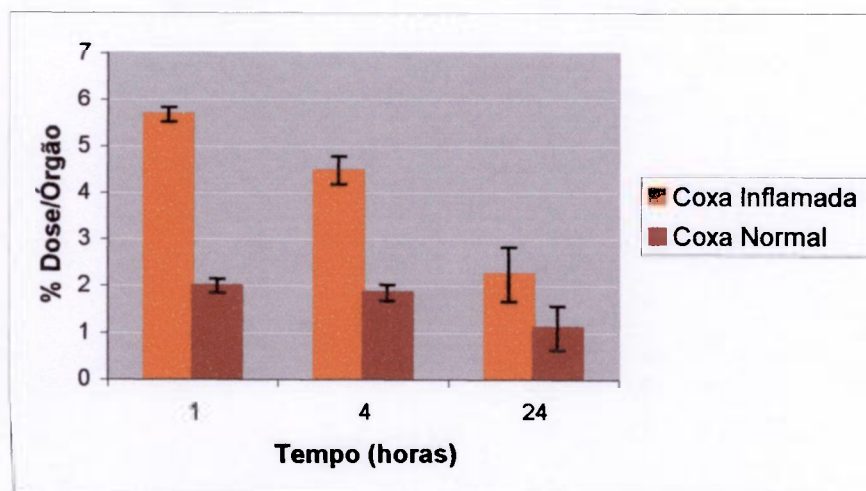


FIGURA 27. Porcentagem atividade nas coxas do peptídeo marcado por via direta purificado, administrado em camundongos Swiss com foco de inflamação na coxa direita traseira

Para melhor definir a ligação do radiofármaco aos receptores localizados na região inflamatória, sobretudo, que caracterize a sua especificidade, utilizou-se a técnica de perfusão com solução salina 0,9% para remoção do sangue circulante da região edemaciada como descrito no item 4.2.4.1.

Na TAB. 15 são comparados os resultados de captação, obtidos para as coxas, após uma hora da administração do peptídeo marcado por via direta purificado em animais sem perfusão e animais com perfusão.

TABELA 15. Análise da captação nas coxas (inflamada e normal) do peptídeo marcado por via direta e purificado em animais sem perfusão e com perfusão.

ÓRGÃO	% Dose/Órgão	
	Animais sem perfusão	Animais com perfusão
Coxa inflamada	4,88 ± 0,97	2,92 ± 0,76
Coxa normal	2,06 ± 0,39	1,37 ± 0,30

### 5.5.2. Estudo da distribuição biológica do peptídeo fNleLFNleYK radioiodado pelo método indireto

Na TAB. 16 apresenta-se o resultado do estudo de distribuição biológica do peptídeo radioiodado por via indireta e purificado, utilizando-se camundongos *Swiss* normais.

TABELA 16. Porcentagem atividade/órgão do peptídeo fNleLFNleYK radioiodado por via indireta, administrado intravenosamente em camundongos *Swiss* normais

Órgãos	% Atividade administrada/Órgão				
	15 minutos	30 minutos	1 hora	4 horas	24 horas
Cérebro	0,07 ± 0,02	0,03 ± 0,03	0,01 ± 0,003	0,003 ± 0,002	0,001 ± 0,000
Tireóide	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,005	0,03 ± 0,007	0,14 ± 0,05	0,28 ± 0,03
Pulmão	0,38 ± 0,14	0,20 ± 0,05	0,04 ± 0,01	0,01 ± 0,005	0,005 ± 0,001
Coração	0,12 ± 0,04	0,047 ± 0,03	0,01 ± 0,007	0,003 ± 0,001	0,002 ± 0,001
Baço	0,05 ± 0,02	0,02 ± 0,007	0,01 ± 0,002	0,003 ± 0,001	0,002 ± 0,000
Fígado	3,22 ± 0,82	1,49 ± 0,47	0,66 ± 0,14	0,07 ± 0,02	0,04 ± 0,008
Estômago	0,19 ± 0,03	0,14 ± 0,07	0,09 ± 0,05	0,04 ± 0,02	0,08 ± 0,02
Músculo	5,36 ± 1,97	2,40 ± 0,99	0,82 ± 0,40	0,43 ± 0,19	0,09 ± 0,02
Rins	4,42 ± 2,19	1,57 ± 0,90	0,40 ± 0,23	0,03 ± 0,02	0,02 ± 0,008
Int. delgado	2,26 ± 0,33	2,19 ± 0,29	2,24 ± 0,44	0,15 ± 0,08	0,07 ± 0,005
Int. grosso	0,34 ± 0,1	0,16 ± 0,07	0,19 ± 0,13	0,18 ± 0,12	0,06 ± 0,02
Sangue Total	4,50 ± 1,87	2,14 ± 0,91	1,19 ± 0,21	0,18 ± 0,09	0,06 ± 0,02

Na TAB. 17 apresenta-se os resultados (% atividade/grama) do estudo de distribuição biológica do peptídeo radioiodado por via indireta e purificado, utilizando-se camundongos *Swiss* normais.

TABELA 17. Porcentagem atividade/grama do peptídeo fNleLFNleYK radioiodado por via indireta, administrado intravenosamente em camundongos *Swiss* normais

Órgãos	% Atividade administrada/grama				
	15 minutos	30 minutos	1 hora	4 horas	24 horas
Cérebro	0,18 ± 0,07	0,05 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,006	0,000 ± 0,000
Tireóide	-	-	-	-	-
Pulmão	1,86 ± 0,59	0,60 ± 0,20	0,14 ± 0,07	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,007
Coração	0,88 ± 0,23	0,35 ± 0,11	0,11 ± 0,07	0,02 ± 0,006	0,01 ± 0,005
Baço	0,46 ± 0,15	0,22 ± 0,08	0,08 ± 0,02	0,03 ± 0,008	0,02 ± 0,006
Fígado	2,23 ± 0,12	1,26 ± 0,05	0,43 ± 0,08	0,06 ± 0,01	0,03 ± 0,005
Estômago	0,86 ± 0,19	0,56 ± 0,08	0,36 ± 0,15	0,19 ± 0,06	0,35 ± 0,02
Músculo	0,51 ± 0,19	0,22 ± 0,09	0,10 ± 0,007	0,04 ± 0,02	0,08 ± 0,004
Rins	12,36 ± 4,56	4,57 ± 1,22	1,33 ± 0,45	0,10 ± 0,06	0,05 ± 0,006
Int. delgado	3,64 ± 0,89	1,86 ± 0,20	1,54 ± 0,09	0,08 ± 0,03	0,04 ± 0,01
Int. grosso	1,46 ± 0,30	0,23 ± 0,07	0,30 ± 0,06	0,52 ± 0,38	0,10 ± 0,04
Sangue/mL	3,64 ± 0,89	1,34 ± 0,41	0,62 ± 0,08	0,12 ± 0,05	0,04 ± 0,01

Na TAB. 18 apresenta-se os resultados do estudo de distribuição biológica do peptídeo radioiodado por via indireta purificado, utilizando-se camundongos *Swiss* com foco de inflamação na coxa direita traseira.

TABELA 18. Porcentagem atividade/órgão do peptídeo fNleLFNleYK radioiodado por via indireta, administrado intravenosamente em camundongos *Swiss* com foco de inflamação na coxa direita traseira

Órgãos	Tempo				
	% Atividade administrada/Órgão				
	15 minutos	30 minutos	1 hora	4 horas	24 horas
Cérebro	0,08 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0,01 ± 0,004	0,004 ± 0,002	0,002 ± 0,001
Tireóide	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,007	0,03 ± 0,009	0,09 ± 0,05	0,40 ± 0,08
Pulmão	0,31 ± 0,11	0,15 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,006	0,005 ± 0,001
Coração	0,10 ± 0,04	0,05 ± 0,02	0,01 ± 0,002	0,003 ± 0,001	0,001 ± 0,000
Baço	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,006	0,01 ± 0,005	0,007 ± 0,002	0,002 ± 0,000
Fígado	2,29 ± 0,19	1,57 ± 0,19	0,60 ± 0,17	0,20 ± 0,09	0,06 ± 0,04
Estômago	0,11 ± 0,04	0,19 ± 0,04	0,08 ± 0,03	0,07 ± 0,02	0,02 ± 0,008
Coxa Direita	2,24 ± 0,34	1,09 ± 0,10	0,57 ± 0,10	0,17 ± 0,05	0,06 ± 0,01
Coxa Esq.	0,77 ± 0,11	0,32 ± 0,07	0,16 ± 0,05	0,04 ± 0,004	0,03 ± 0,008
Rins	2,58 ± 0,82	1,53 ± 0,62	0,28 ± 0,13	0,61 ± 0,12	0,013 ± 0,007
Int. delgado	2,08 ± 0,52	2,06 ± 0,23	1,86 ± 0,20	0,13 ± 0,04	0,09 ± 0,05
Int.grosso	0,44 ± 0,14	0,29 ± 0,06	0,10 ± 0,03	0,07 ± 0,02	0,04 ± 0,004
Sangue Total	3,28 ± 1,02	1,66 ± 0,45	0,59 ± 0,03	0,16 ± 0,04	0,09 ± 0,05

Na TAB. 19 apresenta-se os resultados (% atividade/grama) do estudo de distribuição biológica do peptídeo radioiodado por via indireta e purificado, utilizando-se camundongos *Swiss* com foco de inflamação na coxa direita traseira.

TABELA 19. Porcentagem atividade/grama do peptídeo fNleLFNleYK radioiodado por via indireta, administrado intravenosamente em camundongos *Swiss* com foco de inflamação na coxa direita traseira

Órgãos	% Atividade administrada/grama					
	Tempo	15 minutos	30 minutos	1 hora	4 horas	24 horas
Cérebro		0,17 ± 0,04	0,08 ± 0,02	0,02 ± 0,008	0,01 ± 0,005	0,000 ± 0,000
Tireóide		-	-	-	-	-
Pulmão		1,23 ± 0,14	0,46 ± 0,11	0,11 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,012 ± 0,004
Coração		0,63 ± 0,27	0,37 ± 0,08	0,06 ± 0,01	0,02 ± 0,005	0,01 ± 0,000
Baço		0,38 ± 0,05	0,16 ± 0,04	0,05 ± 0,006	0,03 ± 0,005	0,01 ± 0,000
Fígado		1,61 ± 0,12	0,93 ± 0,13	0,32 ± 0,05	0,11 ± 0,05	0,03 ± 0,01
Estômago		0,45 ± 0,11	0,63 ± 0,17	0,29 ± 0,07	0,26 ± 0,05	0,07 ± 0,02
Coxa Direita		0,75 ± 0,07	0,40 ± 0,04	0,18 ± 0,05	0,07 ± 0,006	0,02 ± 0,000
Coxa Esq.		0,43 ± 0,06	0,17 ± 0,07	0,08 ± 0,02	0,02 ± 0,004	0,01 ± 0,005
Rins		6,75 ± 2,90	2,12 ± 0,43	1,11 ± 0,07	0,47 ± 0,13	0,03 ± 0,000
Int. delgado		1,26 ± 0,18	1,16 ± 0,14	0,95 ± 0,13	0,09 ± 0,02	0,02 ± 0,000
Int.grosso		0,78 ± 0,17	0,43 ± 0,06	0,14 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,05
Sangue/mL		2,10 ± 0,42	0,66 ± 0,18	0,20 ± 0,04	0,08 ± 0,006	0,02 ± 0,005

Para verificar se a ligação do peptídeo marcado por via indireta ao foco inflamatório possui especificidade ou se está simplesmente relacionada ao aumento do aporte sangüíneo à região edemaciada, realizou-se a análise expressa na TAB. 20.

TABELA 20. Análise da relação de captação do radiofármaco na região das coxas (inflamada e normal) e a contribuição da atividade sanguínea do peptídeo marcado por via indireta

Relação	Tempos após a administração					
	% Atividade	15 min.	30 min.	1 h.	4 hs.	24 hs.
Coxa inflamada/Coxa normal		2,9	3,4	3,6	4,25	2,0
Coxa inflamada/sangue		0,68	0,66	0,97	1,06	0,67
Coxa normal/sangue		0,23	0,19	0,27	0,25	0,33

A FIG. 28 mostra o traçado da curva de decaimento sanguíneo do peptídeo marcado por via indireta em função do tempo de administração nos dois grupos de animais avaliados, camundongos normais e com foco de inflamação na coxa direita traseira.

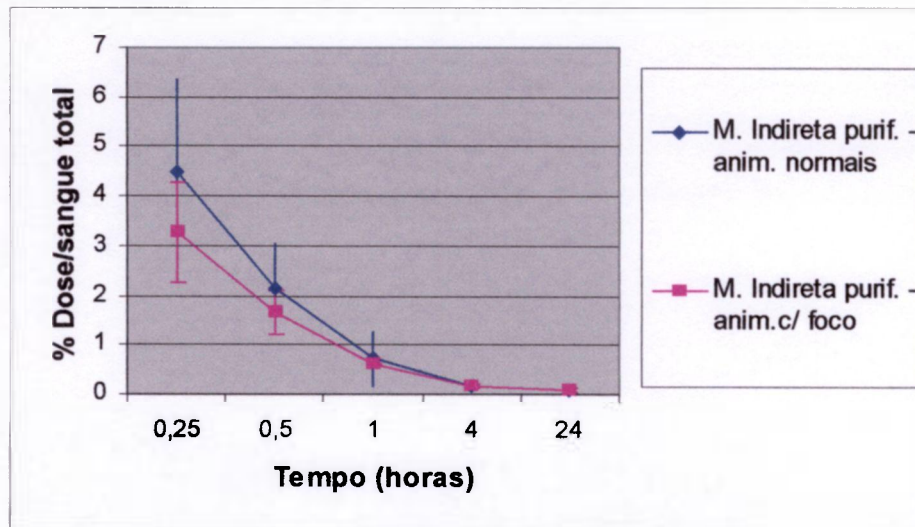


FIGURA 28. Porcentagem atividade/sangue total do peptídeo marcado por via indireta purificado, administrado em camundongos Swiss normais e com foco de inflamação na coxa direita traseira

A FIG. 29 representa o diagrama dos valores da concentração radioativa do peptídeo marcado por via indireta purificado em tecido normal e com processo inflamatório na coxa direita traseira em função do tempo de administração.

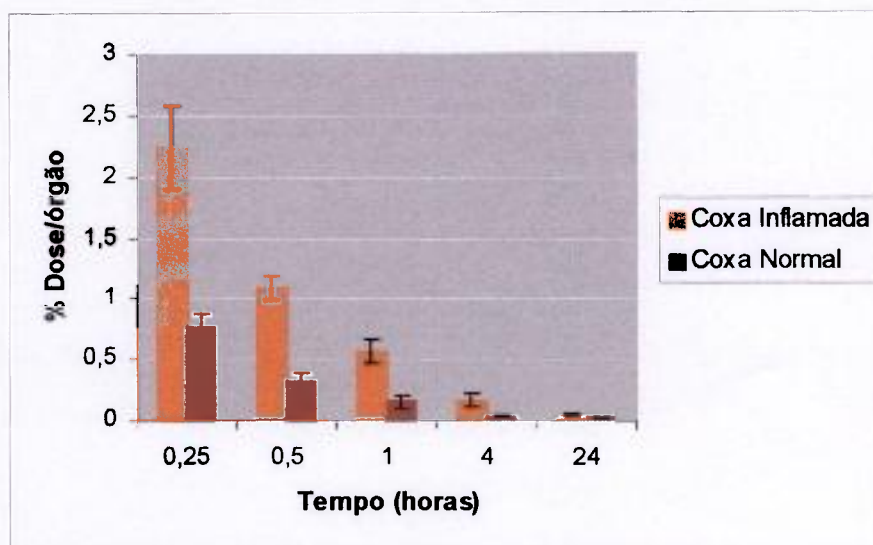


FIGURA 29. Porcentagem atividade nas coxas do peptídeo marcado por via indireta purificado, administrado em camundongos Swiss com foco de inflamação na coxa direita traseira

A TAB. 21 apresenta os valores de porcentagem atividade/sangue total obtidos para o peptídeo marcado por via direta e indireta (purificados) em camundongos Swiss com foco de inflamação na coxa direita traseira.

TABELA 21. Porcentagem atividade/sangue total do peptídeo marcado por via direta e indireta (purificados), administrados em camundongos Swiss com foco de inflamação na coxa direita traseira

Tempo	Marcação Direta	Marcação Indireta
	% Atividade sangue total	% Atividade sangue total
15 minutos	-	3,28 ± 1,016
30 minutos	-	1,66 ± 0,45
1 hora	9,48 ± 0,18	0,59 ± 0,030
4 horas	9,13 ± 0,77	0,16 ± 0,036
24 horas	3,69 ± 1,69	0,087 ± 0,053

Na FIG. 30 estão representadas as curvas da atividade sanguínea do peptídeo marcado por via direta e indireta (purificados). Cada ponto exprime a média do percentual da atividade administrada em camundongos Swiss com foco de inflamação na coxa direita traseira.

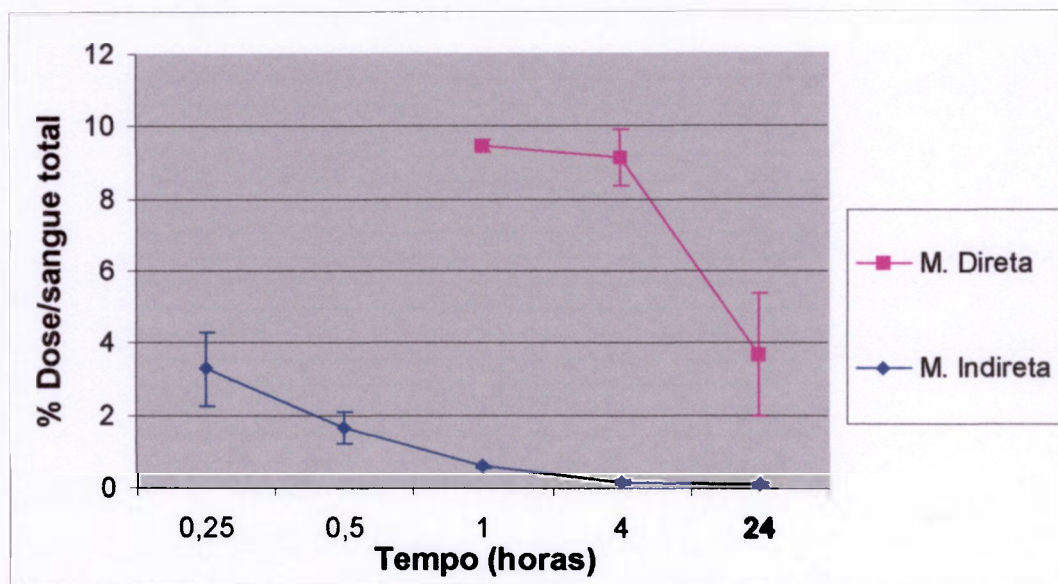


FIGURA 30. Porcentagem atividade/sangue total do peptídeo marcado por via direta e indireta (purificados), administrados em camundongos Swiss com foco de inflamação na coxa direita traseira

## 6. DISCUSSÃO

O estudo da síntese do ATE concentrou-se nos aspectos necessários para a obtenção do produto com rendimento e pureza satisfatórios, já que não se constituiu objeto deste trabalho promover modificações ou melhorias na síntese do composto.

Para que a síntese ocorresse de maneira adequada, gerando o ATE com rendimento e pureza satisfatórios, houve necessidade da realização prévia do doseamento do reagente BuLi 1,6 M em hexano, de modo a garantir a estequiometria da primeira etapa da síntese. Outro aspecto importante desta primeira etapa foi a manutenção da temperatura entre  $-95^{\circ}\text{C}$  e  $-100^{\circ}\text{C}$  durante a adição do reagente BuLi. Neste sentido, a utilização do banho de óleo de silicone e nitrogênio líquido foi determinante.

O ATE foi obtido com rendimento satisfatório (90,7%) e sua caracterização foi realizada por meio de RMN- $^1\text{H}$  e IV, como apresentado nas FIG. 9 e 10 respectivamente. Pozzi e colaboradores<sup>92</sup> realizaram a síntese do ATE utilizando uma rota sintética diferente e obtiveram rendimento menor que o obtido no presente trabalho (58%).

Ao marcar-se o ATE com iodo não radioativo verificou-se a formação do SIB pelo aparecimento da banda com Rf 0,24 na CCD conforme descrito por Zalutsky e Narula<sup>2</sup>. Tanto o ATE quanto o SIB foram também avaliados por CLAE (colunas de sílica e  $\text{C}_{18}$ ) para obtenção dos perfis cromatográficos que posteriormente auxiliaram nas etapas de purificação do SIB radioativo e purificação do conjugado.

Com relação aos parâmetros avaliados para a marcação do ATE com radioiodo (pH, concentração de TBHP e tempo de reação), foi aplicado o teste estatístico Student t ( $P < 0,05$ ) para avaliar a significância das diferenças observadas. A diferença observada para o parâmetro pH foi significativa, ou seja, utilizando-se pH entre 3-4 obtém-se melhor rendimento de marcação. Para concentração de TBHP, a diferença observada entre as concentrações de 25  $\mu\text{mol}$  e 50  $\mu\text{mol}$  foi significativa, entretanto a diferença entre 50  $\mu\text{mol}$  e 100  $\mu\text{mol}$  não foi significativa. Para o parâmetro tempo de reação as diferenças observadas não foram significativas.

Diante desta avaliação fixou-se como parâmetros ótimos para a marcação do ATE: pH entre 3-4; concentração de TBHP de 50  $\mu\text{mol}$  e tempo de reação de 30 minutos, assim como utilizado por Zalutsky e Narula <sup>2</sup>.

A análise em CLAE da mistura de marcação do ATE com radioiodo (figura 18) demonstrou a necessidade de purificação do SIB radioiodado, de modo a eliminar impurezas radioquímicas presentes na marcação. O pico de  $R_t = 11$  minutos corresponde a uma impureza radioquímica, não identificada, diferente do radioiodo livre ( $R_t \cong 3$  minutos).

Conforme descrito por Zalutsky e Narula <sup>2</sup>, a purificação em mini coluna compactada de sílica garante a eliminação quase por completo do ATE que não reagiu, nas frações de hexano e mistura hexano: acetato de etila (92:8). Ficando na fração hexano: acetato de etila (70:30) quantidade mínima de ATE, reduzindo desta forma a interferência do ATE durante a etapa de conjugação do SIB à proteína.

Na figura 19 verifica-se que a impureza radioquímica com  $R_t \cong 11$  minutos é removida na fração de purificação hexano: acetato de etila (92:8). Uma segunda impureza radioquímica com  $R_t \cong 7,3$  minutos foi ainda identificada nesta fração concentrada após evaporação do solvente com nitrogênio gasoso.

Na fração de eluição hexano: acetato de etila (70:30) obteve-se o SIB purificado com  $R_t = 17,4$  minutos em CLAE (FIG. 20). Um segundo pico com  $R_t = 3,33$  minutos correspondente ao radioiodo livre foi observado nesta fração de purificação, concentrada após evaporação do solvente com nitrogênio gasoso, em quantidade inferior a 3%, o que demonstra a estabilidade do produto nesta fase de purificação.

A atividade residual ( $A = 5,8 \pm 3,4\%$ ) na mini coluna compactada de sílica (TAB. 5) pode ser indicativa da presença de uma maior porcentagem de iodo livre que ficou retida na mesma.

A purificação do SIB em mini coluna compactada de sílica eliminou de maneira satisfatória as impurezas radioquímicas presentes na marcação do ATE, conforme evidenciado na FIG. 20.

O rendimento obtido de SIB purificado, disponível para conjugação, ( $40,4 \pm 5,6$ ) foi menor que o obtido por Zalutsky e Narula <sup>2</sup>. Grande parte desta perda foi devida à aderência do material radioativo aos frascos utilizados no processo.

A necessidade de purificação do SIB radioiodado e o baixo rendimento resultante das perdas de atividade no processo de purificação observados neste trabalho não foram observados por Al-Jammaz e colaboradores <sup>35</sup> que descreveram a síntese do SIB a partir da meta-iodo benzil guanidina com pureza radioquímica de  $96 \pm 4\%$  (N=6).

Também na formação do conjugado SIB-proteína observou-se a necessidade de purificação (pureza radioquímica do conjugado antes da purificação  $77,7 \pm 1,3\%$  ;N=3). Observando-se o perfil cromatográfico do peptídeo fNleLFNleYK conjugado ao SIB antes da purificação (FIG. 21), verifica-se que o sistema cromatográfico de CLAE estudado pode ser utilizado para separar o conjugado ( $R_t = 8,3$  minutos) do peptídeo que não reagiu ( $R_t = 7,4$  minutos) e do SIB que não reagiu ( $R_t = 17,4$  minutos).

O rendimento do conjugado puro foi baixo, evidenciando grande perda durante o processo (TAB. 6). Acredita-se que a perda esteja relacionada a um processo de aderência do composto a todo o sistema CLAE ("looping", tubulações e coluna do equipamento) e ainda pelo fato do sistema utilizado ser analítico e não ser apropriado para purificação.

A pureza radioquímica do conjugado puro, avaliada por eletroforese, foi de  $99,25 \pm 0,68$  % (N=4). O resultado indica que apesar do baixo rendimento, a metodologia empregada na purificação do conjugado gera o radiofármaco com pureza radioquímica adequada a aplicação biológica.

O conjugado purificado apresentou-se estável por pelo menos 24 horas, acondicionado em geladeira.

O peptídeo foi também conjugado ao SIB não purificado, em uma tentativa de simplificar o procedimento e minimizar o tempo gasto. Este conjugado foi avaliado por CLAE e o perfil (FIG. 22) mostrou várias espécies radioquímicas formadas, sugerindo que se o SIB não purificado fosse utilizado, o rendimento do conjugado diminuiria e ainda haveria maior dificuldade na purificação devido às inúmeras espécies radioquímicas presentes em grande porcentagem.

Logo, a marcação do peptídeo por via indireta, utilizando-se ATE, deve envolver obrigatoriamente a purificação do SIB bem como do conjugado sendo, portanto, um procedimento bastante trabalhoso, porém factível. O procedimento apresentou como principais limitações o baixo rendimento e o tempo envolvido relativamente grande, principalmente se comparado com o procedimento de marcação direta.

Diante dos resultados obtidos para a marcação do peptídeo por via indireta, pode-se sugerir como alternativa para diminuição da perda no processo de purificação em CLAE, bem como, do tempo gasto, que a purificação seja realizada apenas em mini coluna compactada  $C_{18}$ , como descrito por Al-Jammaz

e colaboradores <sup>35</sup>. Entretanto, este estudo não foi realizado no presente trabalho, sendo portanto, uma suposição.

O peptídeo radioiodado por via direta, utilizando-se cloramina T como agente oxidante, foi obtido em um curto tempo de reação, com alta pureza radioquímica ( $96,8 \pm 0,84$  %, N=6) não sendo necessária purificação para remoção de iodo-131 livre. Este procedimento mostrou-se simples, fácil, rápido e gerou bom rendimento de marcação. O peptídeo radioiodado por via direta também apresentou boa estabilidade (48 horas, acondicionado em geladeira).

A análise em CLAE do peptídeo radioiodado por via direta demonstrou que nas condições ensaiadas o radiofármaco pode ser facilmente purificado, sempre que necessário, garantindo alta atividade específica (FIG. 23 e 24). Para marcação por via direta também sugere-se que a purificação poderia ser realizada somente utilizando-se mini coluna compactada C<sub>18</sub>, conforme descrito por Al-Jammaz e colaboradores <sup>35</sup>.

Os resultados dos estudos de distribuição biológica demonstraram que utilizando-se o método direto para radioiodação do peptídeo fNleLFNleYK (sem purificação), a porcentagem da dose administrada presente na tireóide aumenta no decorrer do tempo, de  $4,54 \pm 0,35$ % em uma hora após a administração para  $19,85 \pm 2,54$ % em 24 horas para animais normais (TAB. 7) e de  $2,29 \pm 0,27$ % em uma hora após a administração para  $19,51 \pm 2,22$ % em 24 horas para animais com foco de inflamação (TAB. 9), o que indica a instabilidade do composto *in vivo* devido à desalogenação.

A afinidade do radiofármaco pelo local da inflamação foi evidenciada fazendo-se estudo comparativo entre as coxas inflamada e normal. Os dados obtidos no experimento demonstraram que a radioatividade concentrada na coxa inflamada foi significativamente superior durante todo o tempo de duração do bioensaio ( $P < 0,05$  teste Student t).

Ainda considerando-se os animais com foco de inflamação, a captação em certos órgãos como pulmão, fígado e baço foram relativamente maiores que as observadas nos animais normais (TAB. 7 e 9). Pode-se supor que em animais com foco de inflamação deva ocorrer efeito tóxico da droga administrada para promover a lesão, causando alterações nos órgãos citados uma vez que em situações patológicas há a ativação do sistema imunológico e funções fagocitárias.

A captação hepática relativamente elevada observada nas tabelas 7 e 9 pode ser conseqüência do transporte hepato-biliar do radiofármaco. Visto que a vesícula biliar encontra-se praticamente aderida na área central do fígado, este fato certamente contribui para a alta atividade concentrada no órgão. A tentativa de isolar a vesícula poderia levar a contaminação da cavidade abdominal.

Embora a atividade sanguínea esteja no nível de  $\cong 11\%$  da dose administrada em 60 minutos, em ambos os grupos (TAB. 7 e 9), no tempo de 4 horas essa concentração não se mostra reduzida o que permite supor a existência de um processo metabólico envolvido que estaria interferindo na dinâmica do radiofármaco no organismo animal.

A excreção do radiofármaco parece ocorrer pelas duas vias de eliminação, urinária e fecal. Na primeira hora, provavelmente na forma de iodeto ( $^{131}\text{I}$ ) derivado da desalogenação do composto radiomarcado e das impurezas presentes na solução administrada. Esse mecanismo corrobora, de certa forma, com a cinética do radionuclídeo.

A hipótese da presença de impurezas radioquímicas na solução administrada pode ser verificada analisando-se o perfil da biodistribuição do radiofármaco e comparando-se os dados obtidos do peptídeo radiomarcado por via direta e purificado (TAB. 12) que, demonstra redução significativa da taxa de captação no fígado, pulmão e baço.

Quando administrado em animais normais, o peptídeo radioiodado por via direta e não purificado, apresentou rápido clareamento sanguíneo e nos

demais tecidos não alvo. Em animais com foco de inflamação, apesar da alta captação na coxa inflamada (coxa direita) observada uma hora após a administração (TAB. 9 e 10), a relação coxa inflamada/sangue permaneceu praticamente inalterada nos tempos estudados (TAB.11). Estes resultados parecem sugerir que a captação na área inflamada poderia ser reflexo do fluxo sanguíneo. Resultados semelhantes foram observados para o peptídeo marcado por via direta e purificado em animais com foco.

A purificação (CLAE e mini coluna compactada C<sub>18</sub>) do peptídeo marcado por via direta apresenta como benefício a redução das captações pulmonar e hepática para níveis comparáveis ao do peptídeo marcado por via indireta purificado e redução da captação em demais órgãos não alvo, principalmente no que tange a glândula tireóide que é um órgão de maior afinidade do radioiodo.

Os resultados evidenciaram que utilizando-se o método direto de marcação para radioiodação do peptídeo fNleLFNleYK (purificado), a porcentagem da dose administrada presente na tireóide aumenta no decorrer do tempo, de  $1,49 \pm 0,15\%$  em uma hora após a administração para  $11,96 \pm 1,48\%$  em 24 horas (TAB. 12), o que confirma a instabilidade do composto *in vivo* devido à desalogenação.

A captação do peptídeo marcado por via direta e purificado na coxa inflamada (coxa direita) foi significativamente maior que na coxa normal (coxa esquerda), em todos os tempos avaliados ( $P < 0,05$  teste Student t).

Também neste caso, a relação coxa direita/sangue (TAB. 14), praticamente inalterada nos tempos estudados, sugeriu que a captação na área inflamada poderia ser reflexo do fluxo sanguíneo.

Para definir se a ligação do peptídeo radioiodado ao foco seria meramente um processo vascular, como inicialmente suposto, ou um mecanismo de especificidade, realizou-se um estudo de biodistribuição no qual o peptídeo marcado por via direta e purificado seria administrado intravenosamente em um

grupo de camundongos com lesão inflamatória em uma das coxas e que, a outra contraposta, serviria de controle. Após o período programado o animal foi perfundido com solução salina 0,9% para esvair todo o sangue contido na circulação. Essa operação permitiu estimar quanto do peptídeo marcado foi, realmente, captado na região afetada e qual a contribuição da atividade vascular (TAB. 15).

No caso dos animais com perfusão, considerando-se a coxa esquerda como residual e subtraindo-se este valor da captação total obtida na coxa direita (com foco de inflamação) estimou-se como sendo valor de captação "real" 1,55%, em média. Comparando-se com o valor médio obtido de 4,88% na coxa direita (animais sem perfusão) pode-se considerar que a captação no foco deve-se não só ao aumento do aporte sanguíneo na região inflamada, mas, também à especificidade do composto.

A velocidade de eliminação do composto radioiodado é um fator preocupante em termos de dosimetria por causa do efeito citotóxico. Nos experimentos realizados, todos os grupos com processo inflamatório apresentaram depuração mais lenta do organismo quando foi administrado intravenosamente o peptídeo marcado por via direta. Mesmo após a purificação, embora em menor escala, pode-se notar esse efeito. Esses dados observados em alguns órgãos podem ser atribuídos como sendo consequência da toxicidade da substância inoculada para obtenção de animais portadores de processo inflamatório.

Em relação à biodistribuição do peptídeo marcado por via indireta, observando-se os dados apresentados na TAB. 18, verifica-se que a captação na coxa inflamada para todos os tempos foi significativamente maior ( $P < 0.05$ , teste Student t) que da coxa normal, sugerindo a especificidade do composto pelo foco de inflamação.

A análise dos dados apresentados na TAB. 20 permite sugerir que o composto marcado por via indireta, demonstrou maior afinidade do radiofármaco pela área afetada quando comparado com o peptídeo marcado pelo método

direto. Com o declínio da atividade circulante do local com o decorrer do tempo, a região da inflamação vai se definindo de maneira visível e contrastante após uma hora da administração da dose. A coxa normal serve como controle da radioatividade vascular acumulada e a relação entre a coxa e o sangue provavelmente poderia ser considerada como sendo a atividade localizada no líquido intersticial da área edemaciada. A razão coxa inflamada/ coxa normal aumenta até o tempo de quatro horas com declínio nas 24 horas, certamente, devido ao mecanismo de excreção do composto do local de afinidade que apresenta diferente velocidade de eliminação do sangue e do tecido muscular.

A estabilidade *in vivo* do peptídeo radioiodado por via indireta foi confirmada com a baixa captação do composto na tireóide para todos os tempos estudados (TAB. 16 e 18), principalmente, se comparada com a captação obtida quando da radioiodação do mesmo peptídeo por via direta e não purificado (TAB. 7 e 9) ou purificado (TAB. 12). Portanto, tornou-se evidente que a radioiodação por via indireta, com a utilização de grupo prostético não fenólico, diminui a desalogenação do composto *in vivo*. Este fato também foi observado por Pozzi e colaboradores <sup>92</sup> e Al-Jammaz e colaboradores <sup>35</sup> que trabalharam com este mesmo peptídeo quimiotático. Esse fato já havia sido observado por outros pesquisadores para marcação de outras proteínas <sup>2,4,9,10,38,44,45,93</sup>.

Os estudos de distribuição biológica do peptídeo marcado por via indireta e purificado não demonstraram a existência de captação significativa do radiofármaco nos órgãos essenciais nem no sistema renal excretório de onde uma quantidade considerável é preferencialmente eliminada em poucos minutos.

Por outro lado, ainda deve-se considerar a estrutura química do composto gerado. A alteração da distribuição biológica em função da estrutura química foi evidenciada neste trabalho, pelos estudos de distribuição biológica realizados com o mesmo peptídeo marcado por via direta e indireta. Além disto, comparando-se os resultados obtidos no presente estudo com os de outros pesquisadores para este peptídeo quimiotático radioiodado por via indireta, pode-se observar que a purificação do conjugado radioiodado, bem como a sua estrutura química, parecem interferir na biodistribuição do composto.

Pozzi e colaboradores <sup>92</sup> trabalharam com o mesmo grupo prostético (com o radioiodo na posição meta ao radical) e após a conjugação foi realizada purificação em CLAE e também em mini coluna compactada C<sub>18</sub>. Apesar da similaridade entre os procedimentos de Pozzi e o aplicado no presente trabalho os resultados de biodistribuição obtidos por Pozzi foram diferentes, com maior captação (% dose/g) em todos os órgãos, principalmente no fígado. Deve-se considerar que a rota sintética utilizada por Pozzi para a obtenção do ATE bem como o sistema CLAE empregado na purificação do conjugado foram distintos.

Vaidyanathan e colaboradores <sup>93</sup> realizaram a marcação deste peptídeo quimiotático por via indireta com um grupo prostético semelhante, diferindo no agente marcador e posição do mesmo (<sup>18</sup>F no lugar do radioiodo na posição 4 ao radical). Este conjugado foi purificado em CLAE e os resultados de biodistribuição foram semelhantes aos obtidos no presente trabalho (% dose/g em animais normais) para o clareamento sanguíneo e diferentes órgãos avaliados exceto os rins. A maior captação renal pode ser relacionada à menor lipofilicidade do composto radioiodado na posição para quando comparado com o composto radioiodado na posição meta, conforme sugerido por Al-Jammaz e colaboradores <sup>35</sup>.

Al-Jammaz e colaboradores <sup>35</sup> trabalharam com um conjugado idêntico ao avaliado no presente estudo, porém, purificado apenas em mini coluna compactada C<sub>18</sub>. Os estudos de distribuição biológica evidenciaram maior captação (% dose/g) principalmente em pulmão e fígado do que a obtida no presente estudo. Esta alta captação chega a atingir níveis superiores aos observados por Pozzi <sup>92</sup>, principalmente no pulmão (animais normais). O autor sugere que a alta captação pode estar relacionada à grande quantidade de peptídeo injetado (purificação incapaz de retirar peptídeo que não reagiu) que satura os receptores nos leucócitos resultando em biodistribuição alterada. Esta suposição é corroborada, pelo menos em parte, pelos resultados obtidos no presente estudo, uma vez que, realizando-se a purificação do conjugado em CLAE e mini coluna compactada C<sub>18</sub>, observou-se baixa captação em órgãos como fígado e pulmão. A purificação em CLAE remove o excedente em massa do peptídeo que não conjugou.

Esta mesma avaliação em relação à purificação do composto e sua respectiva biodistribuição também é corroborada pela baixa captação em órgãos como fígado e pulmão do peptídeo marcado por via direta e purificado (CLAE e mini coluna compactada C<sub>18</sub>) quando comparada com a captação do peptídeo marcado por via direta e não purificado.

Fischman e colaboradores<sup>20</sup> marcaram o peptídeo quimiotático fNleLFNleYK com <sup>111</sup>In utilizando como quelante DTPA. Este composto apresentou rápido clareamento sanguíneo, baixa captação em órgãos não alvo com exceção dos rins. Essa alta captação nos rins pode estar relacionada à diminuição da lipofilicidade gerada pela introdução do <sup>111</sup>In e do grupo quelante.

Analisando-se comparativamente a biodistribuição do peptídeo radioiodado por via direta e por via indireta, ambos purificados, verificou-se que no peptídeo marcado por via indireta o clareamento sanguíneo é mais rápido que o marcado por via direta. A causa aparente desta diferença reside na menor estabilidade *in vivo* do peptídeo marcado por via direta, que sofre maior desalogenação conforme observado pela captação na glândula tireóide e estômago, com liberação gradativa de <sup>131</sup>I. O radioiodo livre possui cinética de distribuição própria e diferenciada do composto marcado.

Comparando-se a captação no foco de inflamação para os dois métodos de radioiodação estudados (via direta e indireta), verifica-se que a cinética é mais rápida na via indireta, porém a porcentagem de captação no foco observada em 15 minutos após a administração não supera 2,5% sugerindo que as imagens devam ser adquiridas em tempos curtos após a administração da dose. Entretanto, o produto obtido por via direta apresenta cinética mais lenta, sugerindo que as imagens devam ser adquiridas entre 1-4 horas após a administração, dependendo da área a ser investigada de modo a clarear a captação em órgãos não alvo (particularmente para a preparação não purificada em CLAE).

Se por um lado o rápido clareamento sanguíneo do peptídeo marcado por via indireta constitui-se em vantagem para o paciente, pois permite a aquisição de imagem em tempos curtos após a administração, por outro lado, este fato diminui a captação no foco sugerindo a necessidade de utilização de doses maiores. A baixa captação resultante no foco inflamatório pode solicitar doses maiores do peptídeo radiomarcado, entretanto, o paciente provavelmente estará protegido já que o mecanismo de excreção do produto é bastante rápido e sem apresentar afinidade por nenhuma estrutura do organismo.

Pode-se sugerir também que o mecanismo de depuração acelerado do peptídeo marcado por via indireta, ou seja, cinética mais rápida possa estar relacionada à via metabólica diferente. Tal sugestão é feita baseando-se no fato dos compostos gerados por via direta e indireta apresentarem estruturas químicas diferentes. Como discutido anteriormente o composto gerado por via direta parece apresentar metabolismo hepático e excreção intestinal e renal, já o composto obtido por via indireta parece não apresentar metabolismo hepático com excreção renal, portanto, um composto mais hidrossolúvel. O próprio perfil de CLAE do peptídeo marcado por via direta e indireta, confirma a maior lipofilicidade do marcado por via direta (FIG. 21 e 24).

A captação na coxa inflamada aparenta não ser exclusividade da atividade sanguínea e muscular. Este fato ficou evidenciado pelos resultados obtidos dos ensaios de biodistribuição do peptídeo marcado por via direta e purificado em animais após a perfusão.

O maior problema associado ao uso clínico deste peptídeo quimiotático é o fato de poder promover uma transiente granulocitopenia. Este fato foi observado em várias tentativas de utilização de peptídeos quimiotáticos radiomarcados para imagem de inflamação/infecção<sup>20,71,72</sup>. No entanto, os métodos utilizados para o preparo destes compostos, na ocasião, geravam agentes com atividade específica relativamente baixa, o que ocasionava a utilização de quantidades farmacológicas de peptídeo quimiotático. Estas doses demonstraram produzir uma transiente neutropenia. Com a evolução das técnicas de preparo dos radiofármacos este potencial efeito adverso foi totalmente

eliminado. A obtenção de alta atividade específica possibilita a realização de imagens com concentração de peptídeo significativamente menor que a concentração efetiva ( $EC_{50}$ ) para resposta neutropênica. Com a utilização de um composto purificado em CLAE a margem de segurança pode ainda ser aumentada. Entretanto, a purificação em CLAE não é conveniente para preparação rotineira de radiofármacos para diagnóstico, principalmente devido ao tempo que demanda <sup>13, 19</sup>.

Portanto, além da sugestão de estudos mais aprofundados buscando métodos alternativos para purificação que demandem menor tempo de processamento e resultem em melhor rendimento final, aponta-se também a necessidade de alta atividade específica do radiofármaco para eliminar a possibilidade de indução de neutropenia.

## 7. CONCLUSÕES

O peptídeo fNleLFNleYK marcado com radioiodo tanto por via direta como por via indireta, apresenta especificidade aparente pelo foco de inflamação desenvolvido no modelo animal experimental, mostrando-se úteis para aplicação em diagnóstico de focos de inflamação/infecção, uma vez marcados com iodo-123.

As diferenças observadas na cinética de distribuição dos dois métodos de marcação, particularmente no clareamento sanguíneo, podem ser, em parte, relacionadas à presença de maior porcentagem de radioiodo livre no caso da marcação por via direta.

Por outro lado, não se pode deixar de considerar que a incorporação do radioiodo na molécula de proteína, utilizando as duas vias resulta em moléculas com estruturas químicas distintas e que a relação entre estrutura química e atividade biológica deve também ser considerada para análise dos resultados.

Para a proteína marcada pela via direta, a cinética mais lenta de incorporação no foco alvo e a captação em órgãos não alvo, particularmente o fígado, sugerem, quando de uma aplicação clínica, a obtenção de imagens no intervalo de 1 a 4 horas após a administração da dose.

No caso da marcação por via indireta, o rápido clareamento sanguíneo obrigaria a aquisição de imagens em tempos bem mais curtos. Se tal fato constitui-se, por um lado, em vantagem para o paciente, por outro lado, o rápido clareamento sanguíneo diminui, porcentualmente, a captação do radiofármaco no foco em comparação com a via direta, sugerindo a necessidade de utilização de doses maiores do radiofármaco.

Apesar das dificuldades observadas em relação a radioiodação por via indireta, tais como, metodologia trabalhosa, longa e com baixos rendimentos, os resultados biológicos são compensadores no que se refere à estabilidade do radiofármaco frente a desalogenação *in vivo*. A metodologia de incorporação indireta do radioiodo experimentada poderá ser aplicada à produção de outras moléculas marcadas, com particular interesse para radiofármacos com finalidade terapêutica para os quais a liberação do radioiodo *in vivo* pode representar doses de captação incompatíveis para a glândula tireóide e outros órgãos não alvo.

A grande estabilidade *in vivo* da proteína radioiodada por via indireta justifica, inclusive, a realização futura de estudos mais aprofundados, buscando métodos alternativos para purificação, que demandem menor tempo de processamento e resultem em melhor rendimento final.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SEEVERS, R. H.; COUNSELL, R. E. Radioiodination techniques for small organic molecules. *Chem. Rev.*, v. 82, p. 575-590, 1982.
2. ZALUTSKY, M. R.; NARULA, A. S. A method for the radiohalogenation of proteins resulting in decreased thyroid uptake of radioiodine. *Appl. Radiat. Isot.*, v. 38, n. 12, p. 1051-1055, 1987.
3. GARG, P. K.; ARCHER J, G. E.; BIGNER, D. D.; ZALUTSKY, M.R. Synthesis of radioiodinated N-succinimidyl iodobenzoate: Optimization for use in antibody labelling. *Appl. Radiat. Isot. - Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part A*, v.40, n.6, p.485-490, 1989.
4. WILBUR, D.S.; HADLEY, S.W.; HYLARIDES, M.D.; ABRANS, P.G.; BEAUMIER, P.A.; MORGAN, A. C.; RENO, J. M.; FRITZBERG, A. R. Development of a stable radioiodinating reagent to label monoclonal antibodies for radiotherapy of cancer. *J, Nucl. Med.*, v. 30, n. 2, p. 216-226, 1989.
5. VAIDYANATHAN, G.; ZALUTSKY, M. R. Protein radiohalogenation: Observations on the design of N-succinimidyl ester acylation agents. *Bioconjugate Chem.*, v. 1, n. 4, p. 269-273, 1990.
6. KHAWLI, L. A; KASSIS, A I. Synthesis of <sup>125</sup>I labeled N-succinimidyl p-iodobenzoate for use in radiolabeling antibodies. *Nucl. Med. Biol.*, v.16, n. 7, p. 727-733, 1989.
7. LEVER, J. R. Radioiodinated Compounds In: WAGNER J, H. N; SZABO, Z.; BUCHAMAN, J. editors. *Principles of Nuclear Medicine*. 2 ed., Philadelphia, PA:Saunders, 1995, p. 199-213.
8. GARG, P. K.; GARG, S.; ZALUTSKY, M. R. N-succinimidyl 4-methyl-3-(tri-n-butylstannyl)benzoate: Synthesis and potencial utility for the radioiodination of monoclonal antibodies. *Nucl. Med. Biol.*, v.20, n. 4, p. 379-387, 1993.
9. ZALUTSKY, M. R.; NARULA, A. S. Radiohalogenation of a monoclonal antibody using na N-succinimidyl 3-(tri-n-butylstannyl)benzoate intermediate. *Cancer Res.*, v. 48, p. 1446-1450, 1988.
10. ZALUTSKY, M. R.; NOSKA, M. A.; COLAPINTO, E. V.; GARG, P. K.; BIGNER, D. D. Enhanced tumor localization and in vivo stability of a monoclonal antibody radioiodinated using N-succinimidyl 3-(tri-n-butylstannyl)benzoate. *Cancer Res.*, v. 49, p. 5543-5549, 1989.

11. GARG, P. K.; ALSTON, K. L.; ZALUTSKY, M. R. Catabolism of radioiodinated murine monoclonal antibody F(ab')<sub>2</sub> fragment labeled using N-succinimidyl 3-iodobenzoate and iodogen methods. *Bioconjugate Chem.*, v. 6, n. 4, p. 493-501, 1995.
12. VAN DER LAKEN, C. J.; BOERMAN, O. C.; OYEN, W. J. G.; VAN DER VEM, M. T. P.; VAN DER MEER, J. W. M.; CORSTENS, F. H. M. Scintigraphic detectin of infection and inflammation: new developments with special emphasis on receptor interaction. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 25, n 5, p. 535-546, 1998.
13. FISCHMAN, A.J.; BABICH, J. W.; RUBIN, R. H. Infection imaging with technetium-99m-labeled chemotactic peptide analogs. *Sem. Nucl. Med.*, v. 24, n 2, p. 154-168, 1994.
14. PALESTRO, C. J. The current role of gallium imaging in infection. *Sem. Nucl. Med.*, v. 24, n 2, p. 128-141, 1994.
15. RENNEN, H. J. J. M.; BOERMAN, W. J. G.; CORSTENS, F. H. M. Imaging infection/inflammation in the new millennium. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 28, p. 241-252, 2001.
16. NIEDEL, J.; WILKINSON, S.; CUATRECASAS, P. Receptor-mediated uptake and degradation of <sup>125</sup>I-chemotactic peptide by human neutrophils. *J. Biol. Chem.*, v. 254, n 21, p. 10700-10706, 1979.
17. VAN DER LAKEN, C. J.; BOERMAN, O. C.; OYEN, W. J. G.; et al. Technetium-99m-labeled chemotactic peptides in acute infection and sterile inflammation. *J. Nucl. Med.*, v. 38, p. 1310-1315, 1997.
18. BABICH, J. W.; TOMPKINS, R. G.; GRAHAM, W.; BARROW, S. A.; FISCHMAN, A.J. Localization of radiolabeled chemotactic peptide at focal sites of *Escherichia coli* infection in rabbits: evidence for a receptor-specific mechanism. *J. Nucl. Med.*, v. 38, p. 1316-1326, 1997.
19. BABAICH, J. W.; SOLOMON, H.; PIKE, M.C.; KROON, D.; GRAHAM, W.; ABRAMS, M.J.; TOMPKINS, R.G.; RUBIN, R.H.; FISCHMAN, A.J. Technetium-99m-labeled hydrazino nicotinamide derivatized chemotactic peptide analogs for imaging focal sites of bacterial infection. *J. Nucl. Med.* v. 34, p. 1964-1974, 1993.
20. FISCHMAN, A.J.; PIKE, M.C.; KROON, D.; FUCELLO, A.J.; REXINGER, D.; TENKATE, C.; WILKINSON, R.; RUBIN, R.H.; STRAUSS, H.W. Imaging focal site of bacterial infection in rats with indium-111-labeled chemotactic peptide analogs. *J. Nucl. Med.*, v.32, p.483-491, 1991.

21. BABICH, J.W.; GRAHAM, W.; BARROW, S.A. Technetium-99m-labeled chemotactic peptides: comparison with indium-111-labeled white blood cells for localizing acute bacterial infection in the rabbit. *J. Nucl. Med.*, v.34, p.2176-2181, 1993.
22. FINN, R. Chemistry applied to iodine radionuclides In: WELCH, M.J.; REDVANLY, C.S. Ed. *Handbook of radiopharmaceuticals radiochemistry and applications*. England:John Wiley & Sons, 2003, p. 423-440.
23. LEGRAND, J.; PEROLAT, J.P.; LAGOUTINE, F.; LEGALLIC, Y. *Table de radionucléides Saclay*, Commissariat a L'Energie Atomique, 1975.
24. WILBUR, D.S. Radiohalogenation of proteins: An overview of radionuclides, labeling methods, and reagents for conjugate labeling. *Bioconjugate Chem.*, v. 3, n. 6, p.433-470, 1992.
25. KRISTESEN, K.; NORBYGAARD, E. *Safety and efficacy of radiopharmaceuticals 1987*. Papers presented at the 3<sup>rd</sup> European symposium on radiopharmacy and radiopharmaceuticals, Elsinore: Denmark, May 1-4, 1987.
26. MOERLEIN, S.M.; MATHIS, C.A.; YANO, Y. Comparative evaluation of electrophilic aromatic iododemetalation techniques for labeling radiopharmaceuticals with iodine-122. *Appl. Radiat. Isot.*, v.38, n. 2, p.85-90, 1987.
27. MCFARLANE, A.S. Efficient trace-labelling of proteins with iodine. *Nature* v.182, p.53, 1958 apud LEVER, J. R. Radioiodinated Compounds In: WAGNER J, H. N; SZABO, Z.; BUCHAMAN, J. editors. *Principles of Nuclear Medicine* 2 ed., Philadelphia, PA:Saunders, 1995, p. 199-213.
28. GREENWOOD, F.C.; HUNTER, M.W.; GLOVER, J.S. The preparation of <sup>131</sup>I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.*, v. 89, p. 114-123. 1963 apud WILBUR, D.S. Radiohalogenation of proteins: An overview of radionuclides, labeling methods, and reagents for conjugate labeling. *Bioconjugate Chem.*, v. 3, n. 6, p.433-470, 1992.
29. SALACINSKI, P. R. P.; MC LEAN, C.; SYRES, J. E. C.; CLEMENT-JONES, V. V.; LOWRY, P. J. Iodination of proteins, glycoproteins, and peptides using a solid-phase oxidizing agent, 1,3,4,6-tetrachloro-3 $\alpha$ , 6 $\alpha$ -diphenyl glycoluril (iodogen). *Anal. Biochem.*, v. 117, p. 136-146, 1981.
30. SAHA, G.B. *Fundamentals of nuclear pharmacy*. 4 ed., New York, NY:Springer, 1998. cap. 6, radiopharmaceuticals and methods of radiolabeling. p. 93-98.

31. BOLTON, A.E.; HUNTER, W.M. The labeling of proteins to a I-125 containing acylating agent. *Biochem. J.* v. 133, p. 529-539, 1973.
32. WOOD, F.T.; WU, M.M.; GERHART, J.C. The radioactive labeling of proteins with an iodinated amidination reagent. *Anal. Biochem.*, v. 69, p. 339-349, 1975.
33. SU, S.N.; JENG, I. Conversion of a primary amine to a labeled secondary amine by the addition of a phenolic group and radioiodination. *Anal. Biochem.*, v. 128, p. 405-411, 1983.
34. PANUSKA, J.R.; PARKER, C.W. Radioiodination of proteins by reductive alkylation. *Anal. Biochem.*, v. 160, p. 182-201, 1987.
35. AL-JAMMAZ, I.; AL-OTAIBI, B.; AMARTEY, J.K. A novel route to radioiodinated [<sup>123</sup>I]-N-succinimidyl-3-iodobenzoate, a reagent for radioiodination of bioactive peptides. *Appl. Radiat. Isot.*, v. 57, p. 743-747, 2002.
36. KABALKA, G.W.; GOOCH, E.E. Syntheses of organic iodides via reaction of organoboranes with sodium iodide. *J. Org. Chem.*, v. 46, p. 2582-2584, 1981 apud FINN, R. Chemistry applied to iodine radionuclides In: WELCH, M.J.; REDVANLY, C.S. Ed. *Handbook of radiopharmaceuticals radiochemistry and applications*. England: John Wiley & Sons, 2003, p. 423-440.
37. GARG, P.K.; SLADE, S.K.; HARRISON, C.L.; ZALUTSKY, M.R. Labeling proteins using aryl iodide acylating agents: Influence of meta vs para substitution on *in vivo* stability. *Nucl. Med. Biol.*, v. 16, p. 669-673, 1989.
38. SCHUSTER, J.M.; GARG, P.K.; BIGNER, D.D.; ZALUTSKY, M.R. Improved therapeutic efficacy of a monoclonal antibody radioiodinated using N-succinimidyl 3-(tri-n-butylstannyl)benzoate. *Cancer Res.*, v. 51, p. 4164-4169, 1991.
39. WILBUR, D.S.; JONES D.S.; FRITZBERG, A.R. Syntheses and radioiodinations of some aryltin compounds for radiolabeling of monoclonal antibodies. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, v. 23, p. 1304-1306 (abstract), 1986.
40. HADLEY, S.W.; GRANT, L.M.; WILBUR, D.S. Evaluation of radioiodinations and conjugations of 4-iodo-benzoates for protein labeling. *J. Nucl. Med.*, v. 28, p. 725 (abstract), 1987.

41. ARAÚJO, E.B.; SANTOS, J.S.; COLTURATO, M.T.; MURAMOTO, E.; SILVA, C.P.G. Optimization of a convenient route to produce N-succinimidyl 4-radiodobenzoate for radioiodination of proteins. *Appl. Radiat. Isot.*, v. 58, p. 667-673, 2003.
42. FREUD, A.; CANFI, A.; ZAFRAN, M. A convenient syntheses of N-succinimidyl-3-yodo-[<sup>125</sup>I]benzoate, a reagent for protein iodination. *Nucl. Med. Biol.*, v. 19, n. 6, p. 703-704, 1992.
43. KOZIOROWSKI, J.; HENSSEN, C.; WEINREICH, R. A new convenient route to radioiodinated N-succinimidyl 3- and 4-iodobenzoates, two reagents for radioiodination of proteins. *Appl. Radiat. Isot.*, v. 49, n. 8, p. 955-959, 1998.
44. BADGER, C.C.; WILBUR, D.S.; HADLEY, S.W.; FRITZBERG, A.R.; BERNSTEIN, I.D. Biodistribution of *p*-iodobenzoyl (PIP) labeled antibodies in a murine lymphoma model. *Nucl. Med. Biol.*, v. 17, p. 381-387, 1990.
45. GARG, P.K.; ALSTON, K.L.; WELSH, P.C.; ZALUTSKY, M.R. Enhanced binding and inertness to dehalogenation of  $\alpha$ -melanotropic peptides labeled using N-succinimidyl 3-iodobenzoate. *Bioconjugate Chem.*, v. 7, p. 233-239, 1996.
46. PEREIRA, F. E. L. Inflamações In: BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia Geral**. 2 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 111-147.
47. KUBY, J. **Immunology**. 3 ed., New York, NY: Freeman, 1997. cap.15, leucocyte migration and inflammation. p. 357-378.
48. COTRAN, R.S.; KEEMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.44-77.
49. STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLow, T. G. **Imunologia Médica**. 9 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.19-32 e 141-151.
50. MUSATTI, C. C. Mecanismos gerais da resposta imunológica In: JOBIM, L.F.J. **Imunologia Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1980. p.1-11.
51. ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Cellular and Molecular Immunology** 4 ed., Philadelphia, PA: Saunders, 2000. cap. 12, innate immunity. p. 270-290.

52. HUGHES, D. K. Nuclear medicine and infection detection: Relative effectiveness of imaging with  $^{111}\text{In}$ -Oxine-,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO-, and  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Stannous fluoride colloid - labeled leukocytes and with  $^{67}\text{Ga}$ -Citrate. *J. Nucl. Med. Tech.*, v.31, n.4, p.196-201, 2003.
53. STAAB, E.V.; MCCARTNEY, W.H. Role of gallium-67 in inflammatory disease. *Semin. Nucl. Med.*, v.8, p.219-234, 1978 apud RENNEN, H. J. J. M. ; BOERMAN, W. J. G. ; CORSTENS, F. H. M. Imaging infection/inflammation in the new millennium. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 28, p. 241-252, 2001.
54. TSAN, M.F. Mechanism of gallium-67 accumulation in inflammatory lesions. *J. Nucl. Med.*, v.26, p.88-92, 1985.
55. WEINER, R.E.; THAKUR, M.L. Metallic radionuclides: Applications in diagnostic and therapeutic nuclear medicine. *Radiochimica Acta*, 70/71, p. 273-287, 1995.
56. FISCHMAN, A.J.; RUBIN, R.H.; WHITE, J.A.; LOCKE, E.; WILKINSON, R.A.; NEDELMAN, M.; CALLAHAN, R.J.; KHAW, B.A.; STRAUSS, H.W. Localization of Fc and Fab fragments of nonspecific polyclonal IgG at focal sites of inflammation. *J. Nucl. Med.*, v.31, p.1199-1205, 1990.
57. FISCHMAN, A.J.; FUCELLO, A.J.; PELLEGRINO-GENSEY, J.L.; GELTOFSKY, J.; YARMUSH, M.L.; RUBIN, R.H.; STRAUSS, H.W. Effect of carbohydrate modification on the localization of human polyclonal IgG at focal sites of bacterial infection. *J. Nucl. Med.*, v.33, p.1378-1382, 1992.
58. NIJHOF, M.W.; OYEN, W.J.; VAN KAMPEN, A.; CLAESSENS, R.A.; VAN DER MEER, J.W.; CORSTENS, F.H.M. Evaluation of infections of the locomotor systems with indium-111-labelled human IgG scintigraphy. *J. Nucl. Med.*, v.38, p.1300-1305, 1997.
59. BOERMAN, O.C.; STORM, G.; OYEN, W.J.G.; VAN BLOOIS, L.; VAN DER MEER, J.W.M.; CLAESSENS, R.A.; CORSTENS, F.H.M. Sterically stabilized liposomes labeled with  $^{111}\text{In}$  to image focal infection in rats. *J. Nucl. Med.*, v.36, p.1639-1644, 1995.
60. LAVERMAN, P.; DAMS, E.T.M.; OYEN, W.J.G.; STORM, G.; KOENDERS, E.B.; PREVOST, R.; VAN DER MEER, J.W.M.; CORSTENS, F.H.M.; BOERMAN, O.C. A novel method to label liposomes with Tc-99m via the hydrazino nicotinyl derivative: a comparison with Tc-99m-HMPAO-labeled PEG-liposomes. *J. Nucl. Med.*, v.40, p.192-197, 1999.

61. DAMS, E.T.M.; OYEN, W.J.G.; BOERMAN, O.C.; LAVERMAN, P.; MEEUWIS, A.P.M.; KOENDERS, E.B.; BUIJS, W.C.A.M.; STORM, G.; BAKKER, J.; VAN DER MEER, J.W.M.; CORSTENS, F.H.M. Tc-99m-PEG-liposomes for the scintigraphy detection of infection and inflammation: clinical evaluation. *J. Nucl. Med.*, v.41, p.622-630, 2000.
62. HNATOWICH, D.; VIRZI, F.; RUSCKOWSKI, M. Investigation of avidin and biotin for imaging investigation. *J. Nucl. Med.*, v.28, p.1294-1302, 1987.
63. MCAFEE, J.G.; THAKUR, M.L. Survey of radioactive agents for the in vitro labeling of phagocytic leukocytes. I. Soluble agents. II. Particles. *J. Nucl. Med.*, v.17, p.480-492, 1976.
64. PETERS, A.M.; DANPURE, H.J.; OSMAN, S. Preliminary clinical experience with <sup>99m</sup>Tc-hexamethylpropylene-amineoxime for labeling leukocytes and imaging infection. *Lancet*, v.2, p.945-949, 1986.
65. PETERS, A.M. The utility of [<sup>99m</sup>Tc]HMPAO-leukocytes for imaging infection. *Semin. Nucl. Med.*, v.24, p.110-127, 1994.
66. DATZ, F.L. Indium-111-labeled leukocytes for the detection of infection: current status. *Semin. Nucl. Med.*, v.24, p.92-109, 1994.
67. DATZ, F.L.; THORNE, D.A. Effect of chronicity of infection on the sensitivity of the In-111-labeled leukocytes scan. *AJR Am J Roentgenol.*, v.147, p.809-812, 1986 apud RENNEN, H. J. J. M. ; BOERMAN, W. J. G. ; CORSTENS, F. H. M. Imaging infection/inflammation in the new millennium. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 28, p. 241-252, 2001.
68. BECKER, W.; BORST, U.; FISCHBACH, W.; PAURKA, B.; SCHAFFER, R.; BORNER, W. Kinetic data of in vivo labeled granulocytes in humans with a murine Tc-99m-labelled monoclonal antibody. *Eur. J. Nucl. Med.*, v.15, p.361-366, 1989.
69. THAKUR, M.L.; MARCUS, C.S.; HENNEMAN, P.; BUTLER, J.; SINOW, R.; DIGGLES, L.; MINAMI, C.; MASON, G.; KLEIN, S.; RHODES, B. Imaging inflammatory diseases with neutrophil-specific technetium-99m-labeled monoclonal antibody anti-SSEA-1. *J. Nucl. Med.*, v.37, p.1789-1795, 1996.
70. BECKER, W.; Goldenberg, D.M.; Wolf, F. The use of monoclonal antibodies and antibody fragments in the imaging of infectious lesions. *Semin. Nucl. Med.*, v.24, p.142-153, 1994.

71. ZOGBHI, S.S.; THAKUR, M.L.; GOTTSCHALK, A. Selective cell labeling: a potential radioactive agent for labeling of human neutrophils. *J. Nucl. Med.*, v.22, p.38 (abstract), 1981.
72. MCAFEE, J.G.; SUBRAMANIAN, G.; GAGNE, G. Techniques of leucocyte harvesting and labeling: problems and perspectives. *Semin. Nucl. Med.*, v.14, p.83-106, 1984.
73. FISCHMAN, A.J.; RAUH, D.; SOLOMON, H. et al. In vivo bioactivity and biodistribution of chemotactic peptide analogs in nonhuman primates. *J. Nucl. Med.*, v.34, p.2130-2134, 1993.
74. VAN DER LAKEN, C.J.; BOERMAN, O.C.; OYEN, W.J.G. VAN DER VEN, M.T.P.; VAN DER MEER, J.W.M.; CORSTENS, F.H.M. Imaging of infection in rabbits with radioiodinated interleukin-1 ( $\alpha$  and  $\beta$ ), its receptor antagonist and a chemotactic peptide: a comparative study. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 25, p. 347-352, 1998.
75. KEELAN, E.; CHAPMAN, P.; BINNS, R.; PETERS, A.; HASKARD, D. et al. Imaging vascular endothelial activation: an approach using radiolabeled monoclonal antibodies against the endothelial cell adhesion molecule E-selectin. *J. Nucl. Med.*, v.35, p.276-281, 1994.
76. BHATTI, M.; CHAPMAN, P.; JAMAR, F. et al. Immunolocalization of active inflammatory bowel disease (IBD) using a monoclonal antibody against E-selectin. *J. Nucl. Med.*, v.37, suppl. 5, p.114, 1996.
77. SARDA, L.; SALEH-MGHIR, A.; PEKER, C.; MEULEMANS, A.; CRÉMIEUX, A. C.; LÊ-GULUDEC, D. Evaluation of  $^{99m}\text{Tc}$ -Ciprofloxacin Scintigraphy in a rabbit model of *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infection. *J. Nucl. Med.*, v.43, p.239-245, 2002.
78. VINJAMURI, S.; HALL, A.V.; SOLANKI, K.K. et al. Comparison of  $^{99m}\text{Tc}$  Infecton imaging with radiolabelled white-cell imaging in the evaluation of bacterial infection. *Lancet*, v. 347, p.233-235, 1996.
79. BRITTON, K.E.; VINJAMURI, S.; HALL, A.V. et al. Clinical evaluation of technetium-99m Infecton for the localization of bacterial infection. *Eur. J. Nucl. Med.*, v.24, p.553-556, 1997.
80. HALL, A.V.; SOLANKI, K.K.; VINJAMURI, S.; BRITTON, K.E.; DAS, S.S. Evaluation of the efficacy of  $^{99m}\text{Tc}$ -Infecton, a novel agent for detecting sites of infection. *J. Clin. Pathol.*, v. 51, p.215-219, 1998.

81. WELLING, M.M.; NIBBERING, P.H.; PAULUSMA-ANNEMA, A.; HIEMSTRA, P.S.; PAUWELS, E.K.J.; CALAME, W. *J. Nucl. Med.*, v.41, p.2100-2102 (letter), 2000.
82. LUPETTI, A.; WELLING, M.M.; PAULWELS, E.K.J.; NIBBERING, P.H. Radiolabelled antimicrobial peptides for infection detection. *Lancet Infect. Dis.*, v.3, p.223-229, 2003.
83. STRAUSS, L.G. Fluorine-18 deoxyglucose and false-positive results: a major problem in the diagnostics of oncological patients. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 23, p.1409-1415, 1996.
84. TAHARA, T.; ICHIYA, Y.; KUWABARA, Y.; OTSUKA, M.; MIYAKE, Y.; GUNASEKERA, R.; MASUDA, K. High [<sup>18</sup>F]-fluorodeoxyglucose up-take in abdominal abscesses: a PET study. *J. Comput. Assist. Tomogr.*, v.13, p.829-831, 1989 apud RENNEN, H. J. J. M. ; BOERMAN, W. J. G. ; CORSTENS, F. H. M. Imaging infection/inflammation in the new millennium. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 28, p. 241-252, 2001.
85. SUGAWARA, Y.; BRAUN, D.K.; KISON, P.V.; RUSSO, J.E.; ZASADNY, K.R.; WAHL, R.L. Rapid detection of human infections with fluorine-18 fluorodeoxyglucose and positron emission tomography: preliminary results. *Eur. J. Nucl. Med.*, v.25, p.1238-1243, 1998.
86. GUHLMANN, A.; BRECHT-KRAUSS, D.; SUGER, G.; GLATTING, G.; KOTZERKE, J.; KINZL, L.; RESKE, S.N. Fluorine-18-FDG PET and technetium-99m antigranulocyte antibody scintigraphy in chronic osteomyelitis. *J. Nucl. Med.*, v. 39, p.2145-2152, 1998.
87. KALICKE, T.; SCHMITZ, A.; RISSE, J.H.; ARENS, S.; KELLER, E.; HANSIS, M.; SCHMITT, O.; BIERSACK, H.J.; GRUNWALD, F. Fluorine-18 fluorodeoxyglucose PET in infectious bone diseases: results of histologically confirmed cases. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 27, p.524-528, 2000.
88. STUMPE, K.D.; DAZZI, H.; SCHAFFNER, A.; VON SCHULTHESS, G.K. Infection imaging using whole-body FDG-PET. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 27, p.822-832, 2000.
89. STILL, W. C.; KAHN, M.; MITRA, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem.*, v. 43, n. 14, p. 2923-2925, 1978.
90. ERCAN, M.T.; TULIN, A.; ERKAN, U.; UNLU, M.; UNSAL, I.S.; HASCELİK, Z. <sup>99m</sup>Tc-Citrate versus <sup>67</sup>Ga-Citrate for the scintigraphic visualization of inflammatory lesions. *Nucl. Med. Biol.*, v. 20, n. 7, p.881-887, 1993.

91. SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos**, 5 ed., Rio de Janeiro:Guanabara, 1994. Cap. 3 Espectrometria no infravermelho, p. 85-152.
92. POZZI, O.R.; SAJAROFF, E.O.; EDREIRA, M.; GOMEZ, S.I.; MANZINI, A. <sup>123</sup>I labeled vasoactive intestinal peptide: optimization of the radioiodination method, *in vivo* and *in vitro* assays. In: **Optimization of synthesis and quality control procedures of the preparation of <sup>18</sup>F and <sup>123</sup>I labeled peptides for nuclear medicine**. Vienna: IAEA, Sept. 2002, p. 23-58 (IAEA-TECDOC-1310).
93. VAIDYANATHAN, G.; ZALUTSKY, M.R. Fluorine-18 labeled chemotactic peptides: a potencial approach for the PET imaging of bacterial infection. **Nucl. Med. Biol.**, v. 22, n. 6, p.759-764, 1995.