



**AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO**

**OBTENÇÃO DE GRUPAMENTO PROSTÉTICO  
RADIOIODADO PARA MARCAÇÃO DE  
PROTEÍNAS POR VIA INDIRETA**

**JOSEFINA DA SILVA SANTOS**

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

**Orientadora:  
Dra. Elaine Bortoleti de Araújo**

**São Paulo  
2001**

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

**OBTENÇÃO DE GRUPAMENTO PROSTÉTICO  
RADIOIODADO PARA MARCAÇÃO DE  
PROTEÍNAS POR VIA INDIRETA**

**JOSEFINA DA SILVA SANTOS**



Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações

**Orientadora:**

**Dra. Elaine Rortoleti de Araújo**

**São Paulo**

**2001**

*À Deus*

*Fonte de amor sabedoria e bondade*

*Aos meus Pais*

*Pelo amor e incentivo em todas as  
etapas de minha vida*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN/CNEN/SP, nas pessoas do Superintendente Dr. Claudio Rodrigues e Dr Roberto Fulfaro Diretor do Departamento de Tecnologia de Aplicações Nucleares

À Dra. Constância 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 do Centro de de Radiofarmácia e Jair Mengatti, chefe da Divisão de Produção do Centro de Radiofarmácia pelas facilidades oferecidas

À Dra Elaine Bortoleti de Araújo pelo apoio, orientação e confiança a mim depositada, desde o início deste trabalho

À Dra Emiko Muramoto, pelo apoio e colaboração fornecidos na realização da distribuição biológica do produto e na dissertação deste trabalho

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), que proporcionou a execução deste trabalho através de bolsa de estudo

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio no início deste trabalho

À Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) pelo financiamento parcial deste trabalho

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

Aos amigos do laboratório de Radiofarmácia da UERJ pelo incentivo constante

Às amigas Ana Braga, Gleide Alencar e Sandra Mara que mesmo distantes souberam estar presentes nos momentos difíceis e aos novos amigos obtidos neste período

À toda minha família que me acompanha nesta dura e doce tarefa de viver com amor e carinho

À todos que de alguma maneira colaboraram com esse trabalho

# SUMÁRIO

	PÁGINAS
RESUMO	1
ABSTRACT	3
1 - INTRODUÇÃO	5
1.1 - Radiofármacos	5
1.2 - Controle de qualidade de radiofármacos	10
1.3 - Peptídeos e proteínas	12
1.4 - Iodo	19
1.5 - Radioiodação de proteínas	21
2 - OBJETIVO	30
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 - Materiais	31
3.2 - Métodos	34
4 - RESULTADOS	48
5 - DISCUSSÃO	73

6 - CONCLUSÕES

86

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

88

*“Não basta ensinar ao homem uma especialidade.*

*Porque se tornará assim, como uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que se adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto”*

**Albert Einstein**

# **OBTENÇÃO DE GRUPAMENTO PROSTÉTICO RADIOIODADO PARA MARCAÇÃO DE PROTEÍNAS POR VIA INDIRETA**

**Josefina da Silva Santos**

## **RESUMO**

Anticorpos monoclonais e seus fragmentos e, mais recentemente, peptídeos radiomarcados têm sido extensivamente estudados, visando a obtenção de radiofármacos para diagnóstico e terapia em Medicina Nuclear. A radioiodação de proteínas pode ser feita por método direto, incorporando-se o iodo radioativo nos resíduos de tirosina da proteína por meio de substituição eletrofílica. O principal problema associado ao uso de proteínas radioiodadas por método direto é a extensiva desiodação observada *in vivo*, atribuída à ação de enzimas específicas em função da similaridade existente entre o grupo iodofenil e o hormônio da tireóide. Várias metodologias de radioiodação de proteínas têm sido desenvolvidas para minimizar esta desalogenação utilizando grupos prostéticos para marcação por via indireta. Desta forma, o radioiodo seria primeiramente incorporado ao grupamento prostético e este ao grupo amino terminal da proteína ou a um ε amino grupo do resíduo de lisina. O objetivo deste trabalho foi a obtenção de um grupamento prostético radioiodado para marcação de proteínas por via indireta. O grupo escolhido foi o benzoato de 4-radioiodo de N-succinimidila (SIB), obtido a partir da iodação do ácido p-bromobenzóico seguido de reação com TSTU (tetrafluoroborato O-(N-succinimidila)-N,N,N',N'- tetrametiluronio). Os resultados dos estudos indicaram que o ácido p-radioiodobenzóico pode ser obtido com pureza radioquímica

superior a 92% e rendimento de aproximadamente 65%. Foram estudados diversos parâmetros da reação como temperatura, tempo de reação e massa de CuCl (catalizador). A reação de formação do SIB a partir do ácido p-radioiodobenzóico mostrou-se quantitativa, quando realizada em meio alcalino, após a evaporação, sob corrente de nitrogênio, dos resíduos de água do meio reacional. A cinética de reação mostrou-se bastante rápida com consumo total do ácido p-radioiodobenzóico a partir de 5 minutos. O acoplamento do grupamento radioiodado SIB às proteínas foi estudado utilizando-se como modelo Imunoglobulina Humana (IgG). Comparativamente, realizou-se a marcação da IgG por via direta pelo método de Iodogen. O rendimento de incorporação à proteína observado por via indireta foi baixo quando comparado com o método direto, ficando a maior parte da radioatividade aderida ao tubo de reação, parecendo haver uma relação entre o baixo rendimento observado para a marcação da IgG e a estrutura tridimensional do anticorpo, que deve dificultar a interação do SIB com os amino grupos. Camundongos *Swiss* (lotes controle normais e lotes com foco de infecção promovido por injeção de terebentina na pata traseira) receberam doses da IgG marcada por via direta ou indireta. A análise comparativa dos resultados de distribuição biológica demonstrou que a proteína radiomarcada por método indireto apresentou clareamento sanguíneo mais rápido, melhor relação órgão alvo/ radiação de fundo (foco de infecção) e menor captação na tireóide e no estômago ( $P < 0,01$ ), indicando a estabilidade *in vivo* da proteína marcada. O método desenvolvido representa a possibilidade futura de marcação de peptídeos de interesse com  $^{131}\text{I}$  ou  $^{123}\text{I}$ , mesmo os que não possuem resíduos tirosina, destinados a diagnóstico e terapia, com garantia de estabilidade *in vivo*.

## **PRODUCTION OF RADIOIODINATED PROSTHETIC GROUP FOR INDIRECT PROTEIN LABELING**

**Josefina da Silva Santos**

### **ABSTRACT**

Monoclonal antibodies and their fragments and, more recently, radiolabeled peptides have been extensively studied in order to develop radiopharmaceuticals for diagnostic and therapy in Nuclear Medicine. The radioiodination of proteins can be done by a direct method, with radioiodine being incorporated in to a tyrosine residue of the protein by eletrophilic substitution. The main problem in the use of radioiodinated proteins, is that they are often dehalogenated in vivo by the action of specific enzymes, probably because of the structural similarity between iodophenyl groups and thyroid hormones. Several protein radioiodination methods have been developed in order to minimize this in vivo dehalogenation using prosthetic groups for indirect labeling. In this case, the radioiodine is first incorporated in to the prosthetic group that is subsequently attached to a terminal amino group or to a  $\epsilon$ -amino group of lisine residue. The aim of this work is to obtain a radioiodinated prosthetic group for indirect labeling of proteins. The prosthetic group selected was the N-succinimidyl-4-radioiodine benzoate (SIB), obtained by the iodination of the p-bromobenzoic acid followed by the reaction with TSTU (O-(N-succinimidyl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate). The results of these studies showed that the p-radioiodobenzoic acid was obtained with a radiochemical purity greater than 92% and a labeling yield of about 65%. Some reaction parameters were studied like temperature, time and CuCl mass (cataliser). The SIB was quantitatively obtained from p-radioiodobenzoic acid, using basic medium and after removing the water from the reaction using an nitrogen stream. The kinetic of this reaction is

very fast with complete consumption of the p-radioiodobenzoic acid after 5 minutes. The coupling of the SIB prosthetic group to the protein was studied using Human Immunoglobulin (IgG) as a protein model. In a comparative way, the same protein was used on direct labeling studies using the Iodogen method. The yield observed by indirect method was low when compared to the direct method, with the major part of the activity remaining in the reaction vial, what suggests that the tridimensional structure of the antibody may difficult the SIB interaction with the protein amino groups. *Swiss* mice (normal animals for control and animals with infection focus developed on the right foot by terebentine injection) were injected with radioiodinated IgG obtained by direct and indirect method. The comparison of the biological distribution results showed a fast blood clearance, better organ/background relation (infection focus), and low uptake in thyroid and stomach ( $P < 0,01$ ) for the protein labeled by the indirect method, what suggests a greater in vivo stability. The method developed makes it possible to label peptides with  $^{131}\text{I}$  or  $^{123}\text{I}$  in the future, even those peptides without tyrosine residues, and use them used in diagnostic and therapy with in vivo stability.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 RADIOFÁRMACOS

A Medicina Nuclear pode ser definida como a especialidade médica que se utiliza das propriedades nucleares de compostos radioativos para realizar avaliações diagnósticas das condições anatômicas e/ou fisiológicas, tratamentos terapêuticos e pesquisas médicas. Um aspecto único da Medicina Nuclear é a sensibilidade elevada para detectar alterações na função e/ou morfologia de um determinado órgão. Para tal, faz uso de radiofármacos<sup>18,20</sup>.

Radiofármacos podem ser definidos simplesmente como substratos que contêm um átomo radioativo em sua estrutura, podendo ser considerados como vetores que apresentam certa especificidade por algum órgão ou uma função fisiológica e/ou fisiopatológica. Por sua forma farmacêutica, quantidade e qualidade da radiação emitida, podem ser utilizados com finalidade diagnóstica ou terapêutica<sup>18</sup>.

Atualmente, radiofármacos marcados com diferentes radionuclídeos vêm sendo utilizados em aplicações diagnósticas e terapêuticas, sendo que 95% dos radiofármacos são usados com propósito de diagnóstico enquanto o restante é usado em terapia<sup>40</sup>.

No desenvolvimento de radiofármacos, vários fatores devem ser levados em conta, tais como a escolha e produção do elemento radioativo, a escolha e obtenção do substrato de marcação e o método a ser aplicado na marcação. Além disso, devem ser considerados os aspectos de pureza de natureza química, física e biológica relativos ao controle de qualidade deste radiofármaco<sup>10</sup>.

### ✓ **Escolha do radionuclídeo**

Radiofármacos com finalidades diagnósticas, utilizados na obtenção de imagens cintilográficas em Medicina Nuclear, devem ser, preferencialmente, constituídos por radioisótopos emissores de radiação gama (fótons), com energia entre 100-500 keV e com tempo de meia vida física ( $t_{1/2}$ ) relativamente curto (horas a poucos dias)<sup>8</sup>.

São exemplos de radioisótopos utilizados em radiofármacos para diagnóstico: Tecnécio-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ), Iodo-123 ( $^{123}\text{I}$ ), Gálio-67 ( $^{67}\text{Ga}$ ), Tálcio-201 ( $^{201}\text{Tl}$ ), Índio-111 ( $^{111}\text{In}$ ), entre outros<sup>3,19</sup>.

Já os radiofármacos destinados à terapia de tumores malignos, devem possuir radionuclídeos emissores de partículas  $\beta^-$  associadas a uma energia relativamente alta. São exemplos de radioisótopos utilizados para este fim, o Iodo-131 ( $^{131}\text{I}$ ), Samário-153 ( $^{153}\text{Sm}$ ), Rênio-186 ( $^{186}\text{Re}$ ), entre outros<sup>3,19</sup>.

### ✓ Escolha do substrato

Devido à especificidade e seletividade, os radionuclídeos, em Medicina Nuclear, raramente são usados na sua forma química mais simples, porém o seu uso torna-se praticamente irrestrito quando incorporado a determinados compostos com propriedades bioquímicas, fisiológicas e metabólicas adequadas<sup>10</sup>. Estes compostos, ligantes ou substratos, representados geralmente por moléculas orgânicas, podem ser ainda de natureza particulada ou coloidal, ou ainda, serem constituídos de células ou biomoléculas como proteínas e anticorpos em geral. A utilidade do radiofármaco é determinada pelas características conjuntas do radionuclídeo e do substrato<sup>20</sup>.

## ✓ Escolha do método de marcação

Alguns estudos devem ser considerados no desenvolvimento de um novo radiofármaco de modo a estabelecer o melhor método de radiomarkação, definir a condição ótima de marcação e a estabilidade *in vitro* da espécie radioquímica de interesse<sup>10,30,34</sup>.

Uma eficiência de marcação alta é sempre desejada, embora em alguns casos não seja atingida. Quanto maior a eficiência, melhor o método de marcação. Entretanto, uma baixa eficiência é, às vezes, aceitável, se o produto radiomarcado for factível de ser purificado e aplicável em uso clínico, não sendo o método dispendioso ou não havendo uma alternativa melhor<sup>34</sup>.

A estabilidade radioquímica está relacionada ao tipo de ligação entre o radionuclídeo e o composto. Assim, por exemplo, compostos com ligações covalentes são relativamente estáveis em certas condições físico-químicas<sup>34</sup>.

A estrutura e/ou as propriedades biológicas do composto marcado podem ser alteradas por várias condições físico-químicas durante o procedimento de marcação. Proteínas, por exemplo, são desnaturadas pelo calor ou em pH abaixo de 2 e acima de 10, o que torna necessário o controle adequado dessas condições<sup>34</sup>.

Muitos compostos marcados são suscetíveis à decomposição em temperaturas elevadas. Proteínas e corantes marcados são degradados pelo calor e devem ser estocados em temperatura adequada. Outros podem se decompor pelas radiações emitidas pelos radionuclídeos presentes. Este tipo de decomposição é chamado radiólise. Radiações podem também decompor o solvente, produzindo radicais livres que podem quebrar a ligação química dos compostos marcados; este processo é chamado radiólise indireta<sup>34</sup>. Quanto mais longa for a meia vida do radionuclídeo e quanto mais energéticas forem as radiações, maior é a radiólise<sup>20</sup>.

Além da estabilidade *in vitro*, deve-se considerar ainda a estabilidade *in vivo* do radiofármaco, que pode estar sujeito a ação de enzimas específicas em processos de metabolização, muitas vezes precocemente, na corrente sanguínea<sup>51</sup>.

## 1.2 CONTROLE DE QUALIDADE DE RADIOFÁRMACOS

### ✓ Pureza radioquímica

A pureza radioquímica de um radiofármaco indica a fração da quantidade total de radioatividade que se encontra na forma química desejada<sup>3,10,30,34</sup>.

A contaminação por impurezas radioquímicas pode ser resultante da ineficiência do método de marcação empregado ou da decomposição química, devido à ação de solventes, temperaturas, pH, luz, agentes oxidantes ou redutores envolvidos e radiólise. A presença de impurezas radioquímicas num radiofármaco resulta em imagens cintilográficas de baixa qualidade devido ao pouco acúmulo no órgão de interesse e da alta radiação de fundo nos tecidos adjacentes<sup>3,34</sup>.

A pureza radioquímica pode ser determinada utilizando-se técnicas de cromatografia, eletroforese ou separação por solventes. As técnicas cromatográficas são as mais empregadas, desde a cromatografia de partição e adsorção, até a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)<sup>3,6,20,30</sup>.

## ✓ Estudos biológicos

Os estudos de distribuição biológica visam determinar as características de distribuição do composto, por meio da captação radioativa presente nos diferentes órgãos e sistemas de afinidade. Podem ser realizados por métodos invasivos e não invasivos. Nos métodos invasivos são utilizados animais de pequeno porte que são sacrificados após um determinado tempo da administração do radiofármaco. Nos métodos não invasivos são adquiridas imagens cintilográficas dos animais após administração do radiofármaco, empregando-se câmaras de cintilação<sup>3,30</sup>.

Estudos dosimétricos e toxicológicos também podem ser realizados, de modo a estabelecer uma quantidade segura de radiação e do composto químico que podem ser administrados ao homem sem submetê-lo a riscos excessivos<sup>10</sup>.

Os estudos de biodistribuição são realizados durante a fase de desenvolvimento do radiofármaco e também na sua rotina de produção, neste caso, para atestar a estabilidade *in vivo* do composto marcado<sup>3</sup>.

Quando se considera a produção de um radiofármaco para uso em humanos, também devem ser realizados ensaios de esterilidade e pirogênio já que a maioria dos radiofármacos são administrados pela via venosa<sup>3,10,34</sup>.

### **1.3 PEPTÍDEOS E PROTEÍNAS**

Peptídeos e proteínas são as únicas classes de moléculas constituídas de aminoácidos como unidades fundamentais. As propriedades dos peptídeos e proteínas (solubilidade, estrutura e função) são características da seqüência e composição dos aminoácidos<sup>29</sup>.

Embora as proteínas possam ser consideradas de natureza peptídica, os peptídeos podem ser distinguidos das proteínas com base no seu tamanho molecular. A distinção entre peptídeos e proteínas é, de alguma forma, arbitrária, com peptídeos sendo definidos como moléculas que contêm até 50 aminoácidos. Moléculas que apresentam mais que 50 aminoácidos geralmente apresentam estrutura tridimensional estável em solução aquosa e são denominadas proteínas. O termo “pequeno peptídeo” é utilizado para representar aqueles peptídeos que contêm menos de 30 aminoácidos ou um peso molecular menor ou igual a 3500 D<sup>29</sup>.

### ✓ **Marcação de proteínas com elementos radioativos**

Nas últimas décadas biomoléculas, particularmente as proteínas e peptídeos, constituem-se em importantes substratos utilizados no desenvolvimento de novos radiofármacos<sup>5,46</sup>.

### ✓ **Marcação de anticorpos**

Os anticorpos (Ac), devido às propriedades de alta especificidade e afinidade, foram intensamente estudados na obtenção de radiofármacos para diagnóstico e terapia. O seu uso baseia-se na competição entre o anticorpo marcado e o mesmo anticorpo não marcado pelos sítios de ligação de seus antígenos específicos, formando um complexo antígeno-anticorpo<sup>22</sup>.

Radiofármacos compostos de Ac policlonais podem formar uma variedade de complexos antígeno-anticorpo diferentes, tornando estes radiofármacos pouco específicos<sup>22</sup>.

Com o advento da tecnologia de hibridomas foi possível produzir Ac monoclonais, que apresentam alta especificidade por um determinante antigênico em particular. Esta especificidade impulsionou o desenvolvimento de radiofármacos a partir de Ac monoclonais, empregados, principalmente na identificação de tumores específicos<sup>2,11</sup>.

Entretanto, os Ac intactos apresentam um alto peso molecular (PM) limitando a difusão e localização e requerendo longos intervalos de tempo entre a administração do radiofármaco e a aquisição de imagens cintilográficas<sup>27,49,50</sup>.

Estes problemas foram, em parte, superados com a utilização de fragmentos de Ac que apresentam clareamento sangüíneo e acúmulo no tumor mais rápido do que os Ac intactos. Os fragmentos não apresentam a porção Fc do Ac, que pode reagir com receptores hepáticos e macrófagos imobilizados. Eles possuem também uma alta permeabilidade vascular. Atualmente os fragmentos mais utilizados são: o F(ab')<sub>2</sub> com PM de 100 kD, o Fab com aproximadamente 50 kD e o Fvs menores que os Fab cerca de 50%<sup>26,49,50</sup>.

A retirada da porção Fc do Ac diminuiu a intensidade da reação imunológica provocada nos pacientes pela administração de uma proteína de origem murínica, mas não solucionou os problemas de esterilidade relacionados à presença de vírus e eventuais proteínas estranhas. A quimerização ou humanização dos Ac, mesclando regiões hipervariáveis murínicas a regiões constantes humanas,

melhorou o aspecto imunológico, mas a proteína ainda apresentava alto peso molecular e, conseqüentemente, clareamento sangüíneo lento<sup>38</sup>.

### ✓ **Marcação de peptídeos**

Peptídeos podem ser considerados como agentes potencialmente ideais para aplicações terapêuticas. Participam de inúmeras funções do organismo, de forma estimulante, inibitória ou regulatória<sup>29</sup>.

Vários processos biológicos podem ser visualizados com compostos biologicamente ativos radiomarcados. A detecção cintilográfica deste processos, utilizando-se radiofármacos, está baseada em quatro princípios gerais: alteração de fluxo, alteração na permeabilidade da parede capilar, metabolismo do radiofármaco e ligação específica do radiofármaco a sistemas receptores<sup>36</sup>.

O desenvolvimento de peptídeos regulatórios como instrumento para visualização e, mais recentemente, para tratamento de tumores malignos tem sido importante foco de interesse nos últimos anos<sup>5</sup>.

Em contraste com os anticorpos, peptídeos naturais biologicamente ativos, de peso molecular baixo ou intermediário, podem representar pontos de partida mais apropriados para o desenvolvimento de radiofármacos<sup>29</sup>.

Na busca de radiofármacos específicos, os peptídeos apresentam uma série de vantagens sobre os anticorpos monoclonais e fragmentos dentre elas o baixo peso molecular que promove sua rápida depuração sangüínea, rápida penetração no tecido extravascular e rápida excreção, permitindo a aquisição de imagens cintilográficas em tempos curtos, bem como a utilização de radioisótopos com tempo de meia vida física pequeno<sup>29</sup>.

Além disso, permite a síntese de análogos com especificidade similar ou superior ao peptídeo natural. A síntese de análogos também pode ser dirigida para produção de compostos com características melhoradas de estabilidade *in vivo* ou mesmo de modo a otimizar a marcação com diferentes radionuclídeos, utilizando-se métodos convencionais<sup>26</sup>.

A possibilidade de síntese química de peptídeos elimina os efeitos imunológicos e os problemas associados ao controle de esterilidade de produção.

Os peptídeos são compostos necessários em muitos processos biológicos fundamentais, mais que qualquer outra classe de moléculas. O peso molecular dos peptídeos biológicos ativos varia muito, de 3 a 5 resíduos de aminoácidos no TRH ( hormônio liberador de tirotrófina), até mais de 200 resíduos no

caso do hormônio de crescimento. O número de peptídeos biologicamente ativos que apresentam potencial como agentes para imagem é muito grande<sup>26</sup>.

O principal problema com peptídeos, é sua rápida proteólise no plasma promovido por proteases. O Peptídeo Intestinal Vasoativo (VIP) é um dos poucos peptídeos bioativos não modificados que apresenta sucesso em imagens de tumores. A maioria dos peptídeos necessitam sofrer mudanças moleculares de modo a inibir sua destruição enzimática<sup>26</sup>.

Por causa da alta potencialidade farmacológica de alguns peptídeos, a radiomarcagem deve permitir a obtenção de um produto com alta atividade específica, reduzindo, desta forma, a quantidade de massa do peptídeo presente na dose de modo a evitar a indução de efeitos colaterais<sup>36</sup>.

Estudos atuais revelam o interesse no desenvolvimento de radiofármacos baseados em peptídeos, utilizados para o diagnóstico de tumores específicos, tais como, os derivados da Somatostatina (SM) e o VIP entre outros, e ainda peptídeos quimiotáticos utilizados na identificação de focos de infecção como os derivados de N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (N-formil-Met-Leu-Phe ou formil-MLF)<sup>7</sup>.

A Somatostatina é um peptídeo cíclico que apresenta um largo espectro de ações biológicas e oncológicas<sup>33</sup>. Um análogo deste tetradecapeptídeo, composto por 8 aminoácidos, designado comercialmente Octreotide, marcado com Índio-111,

tem sido utilizado com sucesso para imagens de tumores com receptores para Somatostatina. Inúmeros derivados da SM mais resistentes à degradação enzimática foram desenvolvidos para marcação com Tecnécio-99m, tais como RC-160 (Vapreotide), HYNIC-(D)-Phe<sup>1</sup>-Tyr<sup>3</sup>-Octreotide e PnAO-(D)-Phe<sup>1</sup>-Octreotide (SDZ 219-387), entre outros<sup>29</sup>.

O VIP é um peptídeo biologicamente ativo composto por 28 aminoácidos, que apresenta uma larga variedade de atividade biológica, sendo potente vasodilatador e estimulante da secreção de hormônios. Apesar de vários tecidos normais expressarem receptores para VIP, os receptores são super expressados em uma variedade de células de tumores malignos (adenocarcinomas, câncer de mama, carcinoma pancreático e tumores endócrinos) com uma densidade de receptor frequentemente maior que os receptores para SM<sup>29</sup>.

O VIP tem sido empregado no diagnóstico de tumores específicos, marcado com Iodo-123<sup>43</sup>.

O peptídeo quimiotático N-formyl-Met-Leu-Phe (N-For-MLF) é um produto bacteriano que inicia a quimiotaxia leucocitária pela alta afinidade de ligação aos receptores polimorfonucleares (PMNs) e macrófagos mononucleares<sup>29</sup>

Muitos outros peptídeos e sistemas receptores vêm sendo investigados em animais de experimentação e em estudos *in vitro* e estão sendo sugeridos como potenciais traçadores. Dentre eles, os peptídeos ligados à glicoproteína IIb/IIIa para

detecção de trombos, e análogos do peptídeo liberador de Gastrina (GRP), com sequência C-terminal idêntica à da bombesina. Receptores para bombesina são expressos no Sistema Nervoso Central e em tecidos periféricos como intestinos e pâncreas. Muitos tumores como câncer de pequena célula pulmonar, glioblastoma, próstata, mama e câncer pancreático expressam receptores para bombesina/GRP. Vários análogos da bombesina/GRP marcados com Tecnécio-99m foram desenvolvidos<sup>29</sup>.

Inúmeras metodologias têm sido descritas para marcação de proteínas, glicoproteínas e peptídeos com uma ampla variedade de nuclídeos metálicos como:  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{90}\text{Y}$  e os radioisótopos do iodo ( $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$  e  $^{131}\text{I}$ ). Uma vantagem do uso de nuclídeos do iodo para marcação de biomoléculas é a disponibilidade de nuclídeos múltiplos com diferentes características de decaimento<sup>17</sup>.

## 1.4 IODO

Descoberto em 1811 por Courtois, o iodo, um halogênio, ocorre escassamente na forma de iodeto nas águas do mar, como traços de compostos de nitratos metálicos, e em águas salobras de reservatórios de óleo e sal.

Existem, identificados, trinta isótopos radioativos de iodo, variando em número de massa de 115 a 141 e com meias-vidas de 0,5 segundos a  $1,6 \times 10^7$  anos. Apenas o isótopo estável  $^{127}\text{I}$  é encontrado na natureza. A Tabela 1.1 lista os isótopos de iodo mais utilizados em Medicina Nuclear, em estudos *in vivo* ( $^{123}\text{I}$  e  $^{131}\text{I}$ ) e estudos *in vitro* ( $^{125}\text{I}$ )<sup>24,25</sup>.

Tabela 1.1 - Propriedades dos nuclídeos de iodo mais utilizados em Medicina Nuclear

	$^{131}\text{I}$	$^{125}\text{I}$	$^{123}\text{I}$
Meia-vida física ( $t_{1/2}$ )	8,02 dias	60,14 dias	13,3 horas
Energia gama	364 keV	35,4 keV	159 keV
Energia beta	606 keV	–	–
Produção	reator	reator	ciclotron
Custo	baixo	alto	alto

Adaptado de Kneid Kristensen, Elisabeth Norbygard, 1987

O  $^{131}\text{I}$  tem sido um radioisótopo intensamente utilizado em Medicina Nuclear desde 1950. A princípio, o custo relativamente baixo e a meia-vida relativamente longa facilitavam tanto a estocagem desse isótopo radioativo nos serviços de Medicina Nuclear, quanto a sua rede de distribuição. No decorrer das décadas de 50 e 60, o Iodo-131 era tido como o “traçador universal”. Atualmente, é utilizado na marcação de proteínas com finalidade terapêutica<sup>10,22</sup>.

As propriedades físicas do Iodo-123 (emissor  $\gamma$  puro e meia vida física curta) são mais compatíveis para aquisição de imagens cintilográficas, sendo o radionuclídeo de iodo de escolha para estudos diagnósticos empregando proteínas radiomarcadas<sup>10,22</sup>.

## 1.5 RADIOIODAÇÃO DE PROTEÍNAS

A radioiodação é um dos métodos mais comuns para a marcação de proteínas. Em linhas gerais, existem 2 métodos para marcação de proteínas com os radioisótopos do iodo: método direto e método indireto.

### ✓ Método direto

Neste método ocorre uma reação de oxidação que modifica o íon do iodo ( $I^-$ ) para uma carga positiva, o qual é incorporado na posição orto do anel fenólico do resíduo de tirosina da proteína<sup>32,47</sup>. A reação ideal é aquela que resulta na incorporação de um átomo de iodo por molécula de proteína formando resíduos

monoiodo-tirosina, o que torna o produto mais estável do que quando dois ou mais átomos de iodo são incorporados à molécula<sup>4</sup>.

Entretanto, o principal problema associado ao uso de proteínas radiodadas é a desiodação que sofrem *in vivo*<sup>15</sup>. Esta desiodação das proteínas está relacionada à degradação enzimática do resíduo iodotirosina, provavelmente como resultado da semelhança estrutural com os hormônios da tireóide<sup>12</sup>.

Dentre os métodos diretos de radioiodação os mais comumente utilizados são:

- **Cloramina T** → o uso da Cloramina T (sal sódico de N-monocloro derivado do p-tolueno-sulfonamida) foi primeiramente descrito por Hunter e Greenwood em 1962. É um método relativamente barato e fácil de se realizar. Em solução aquosa a Cloramina T libera lentamente ácido hipocloroso, o qual oxida o I<sup>-</sup> ao radical hidratado H<sub>2</sub>OI<sup>+</sup>. A reação é interrompida pela adição de metabissulfito de sódio que reduz o excesso de Cloramina T<sup>37</sup>.

- **Iodogen** → descrito primeiramente por Fraker e Speck em 1978, utiliza como agente oxidante o Iodogen (1,3,4,6-tetracloro-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -difenilglicoluril). É um método rápido e em fase sólida, potencialmente menos destrutiva. Preparado em solvente orgânico, o oxidante é distribuído em tubos de reação. A remoção do solvente, por evaporação, resulta na formação de um filme fino na base do tubo. Os

tubos de reação, assim revestidos, podem ser preparados com antecedência e estocados à baixa temperatura. O Iodogen permanece em fase sólida durante a reação de iodação e a proteína é difundida na área em que está contido o reagente. A reação é interrompida pela simples remoção do produto marcado do tubo de reação<sup>37,41</sup>.

- **Lactoperoxidase** → originalmente descrito por Marchalonis em 1969, o método de oxidação enzimática utiliza a lactoperoxidase em presença de baixas concentrações de peróxido de hidrogênio. A iodação é interrompida pela adição de um redutor, usualmente cisteína ou mercaptoetanol<sup>4</sup>.

### ✓ Método indireto

Este método, por conjugação, envolve várias etapas químicas, sendo um procedimento mais complicado do que o método direto. Contudo, a marcação conjugada oferece alguns benefícios que não podem ser obtidos com a marcação direta, representando<sup>32,47,51</sup>:

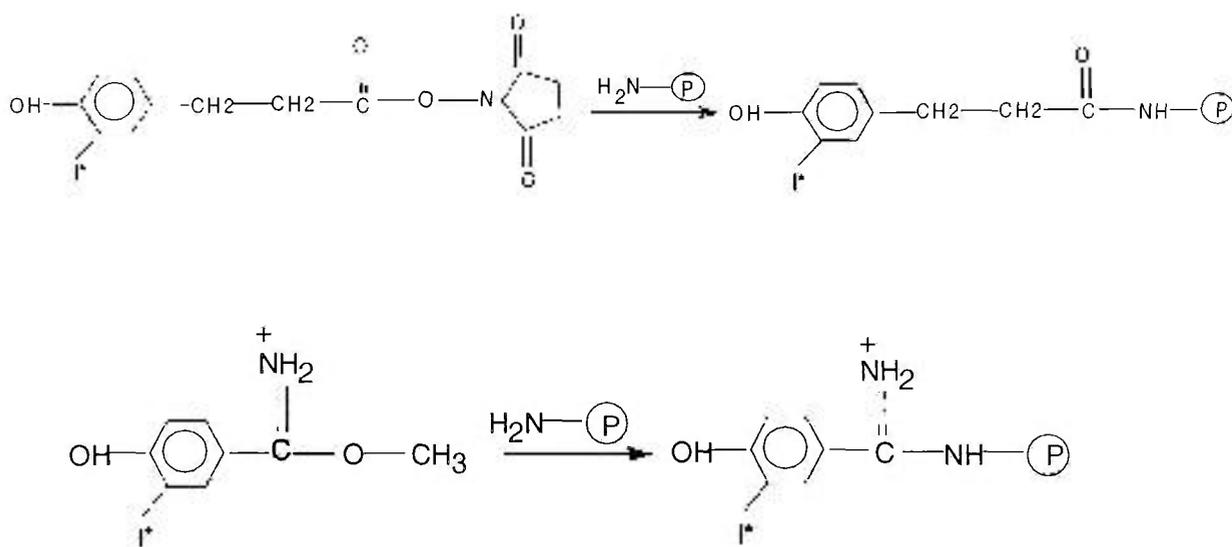
- (a) um método de introdução de radioiodo em proteínas ou peptídeos que não podem ser marcados diretamente por não possuírem resíduos anelares;
- (b) um método de estabilização do radiomarcado contra desalogenação *in vivo* promovida por enzimas;
- (c) um método de marcação que não expõe a proteína a agentes oxidantes e redutores severos;
- (d) um método de marcação que pode permitir um controle potencial da distribuição secundária do radioiodo.

Originalmente, um reagente adequado de conjugação, contendo um anel aromático ativado, é primeiramente radioiodado por um método oxidativo (usualmente a Cloramina T). Este reagente marcado é então acoplado à proteína<sup>6</sup>.

O grupo funcional mais comumente utilizado para conjugação de moléculas radioiodadas à proteínas é o grupo amino, como o amino grupo terminal ou 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 proteica e são comumente conhecidos como grupos prostéticos<sup>37</sup>.

Com relação ao núcleo aromático ativado, alguns grupos prostéticos estudados, como o reagente de Bolton e Hunter<sup>9</sup> e o reagente de Wood<sup>48</sup>, utilizam

anéis aromáticos fenólicos para radioiodação eletrofílica, promovendo a substituição com entrada de um iodo em posição orto ao grupo hidroxila. Neste caso, o anel aromático, assim como no método de marcação direta, é suscetível à desalogenação *in vivo* (Figura 1).



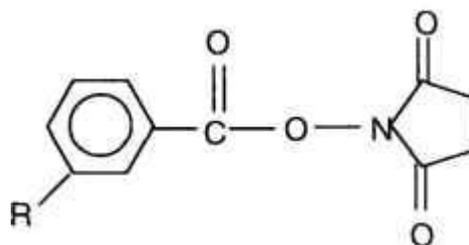
**Figura 1 – Reagentes de Bolton e Hunter (acima) e Wood (abaixo) na marcação de proteínas**

Nos últimos anos, muitos estudos incorporando radioiodo e outros radiohalogênios em compostos aromáticos têm sido desenvolvidos utilizando-se intermediários organometálicos. Estes estudos têm demonstrado que tais intermediários podem ser usados com rapidez e eficiência para incorporação de radioiodo em muitos compostos aromáticos diferentes<sup>46,51</sup>.

Os intermediários estanosos, particularmente os trialquilestanosos ( $\text{SnMe}_3$ ,  $\text{SnBu}_3$ ), têm se mostrado atrativos devido à relativa facilidade de preparação e manipulação, e alta reatividade com radiohalogênios<sup>46,51</sup>.

Zalutsky e Marula<sup>51</sup> e Wilbur e col.<sup>46</sup>, realizaram inúmeros estudos utilizando alguns ésteres hidroxissuccinimídicos de intermediários organoestanosos, de fórmula geral representada na Figura 2.

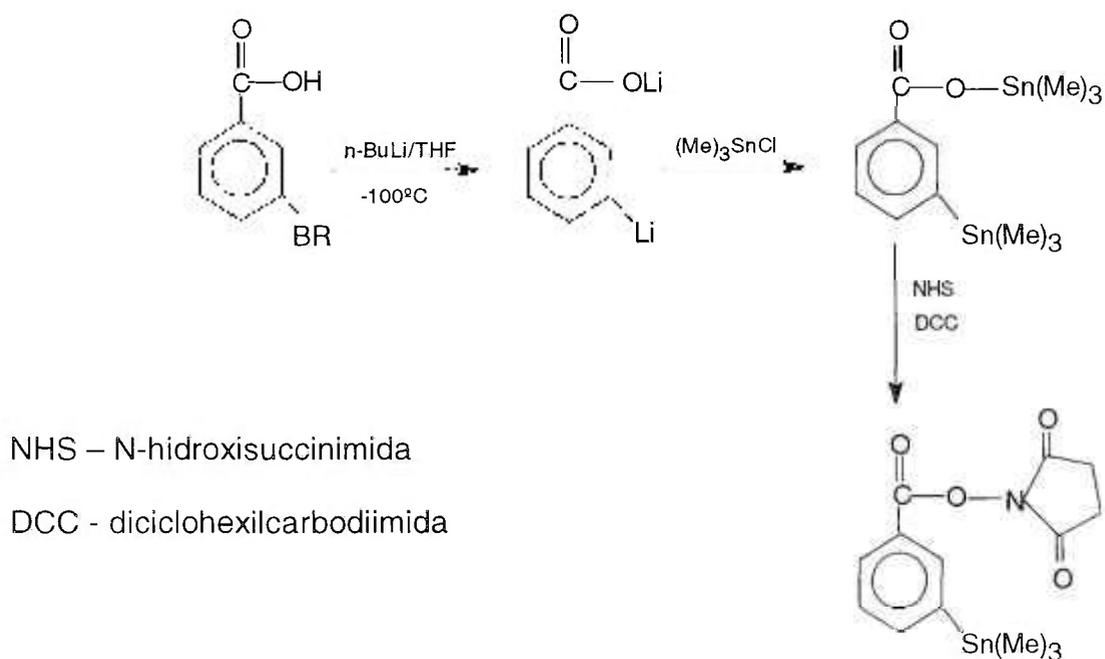
O derivado benzoato de 3-(tri-n-butilestanil) N-succinimidila recebeu de Zalutsky<sup>51</sup> a denominação de ATE. O derivado radioiodado (Benzoato de iodo Succinimidila), recebeu a denominação de SIB.



R = Sn Me<sub>3</sub> ou SnBu<sub>3</sub>

**Figura 2 – Estrutura genérica de éster hidroxissuccinimídico de intermediário organoestano**

Zalutsky e Marula<sup>51</sup> propuseram uma rota sintética para a obtenção do ATE, baseada em grupamentos hidroxissuccinimida, na qual compostos p- ou m-Br são litiados por n-BuLi à temperatura reduzida e subsequentemente transmetalados ao derivado arilestanoso correspondente (Figura 3).



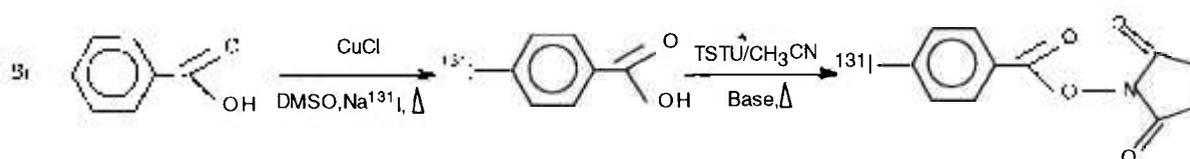
**Figura 3 – Síntese de derivados organoestanosos baseados em grupamentos hidroxissuccinimida**

A rota sintética mencionada, apesar de aparentemente simples, apresenta como principal inconveniente a manutenção de temperatura extremamente reduzida ( $-100^{\circ}\text{C}$ ) na primeira etapa. Além disso, os rendimentos estão condicionados às etapas de purificação utilizando cromatografia em resina de sílica gel 60 e são relativamente baixos para as duas etapas da reação<sup>51</sup>.

Além destes inconvenientes, o composto ATE obtido é relativamente instável, devendo ser conservado à temperatura inferior a  $-20^{\circ}\text{C}$  e atmosfera de gás inerte para que possa ser utilizado no prazo de alguns meses<sup>51</sup>.

Outras rotas sintéticas alternativas estão relatadas na literatura para síntese do composto ATE e análogos<sup>14,15,21,46</sup>.

Stocklin e col.<sup>39</sup> propuseram uma rota sintética alternativa para obtenção do grupamento prostético radioiodado (SIB) (Figura 4). Por meio desta via, o ácido p- ou m-bromobenzóico reage com radioiodo em meio de dimetilsulfóxido (DMSO) sob temperatura elevada e em presença de catalisador de Cu (I)<sup>28</sup>. Após diluição com água e fixação em coluna Sep-Pack C 18, o ácido p- ou m-radioiodobenzóico é eluído em acetonitrila. Adiciona-se, então TSTU (tetrafluoroborato de O-(N-succinimidila)-N,N,N',N'-tetrametilurônio) sob condições alcalinas e obtem-se o grupo prostético radioiodado (SIB).



\* TSTU: tetrafluoroborato de O-(N-succinimidila)-N,N,N',N'-tetrametilurônio

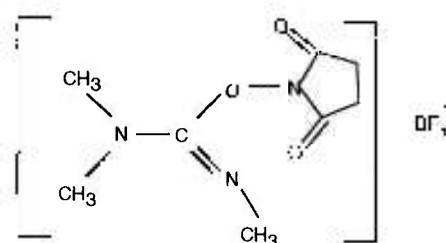


Figura 4 – Síntese radioquímica do Benzoato de Iodo Succinimidila (SIB).

Esta rota alternativa possui a vantagem de ser simples, envolvendo a aquisição de um número menor de reagentes, sendo o produto preparado no momento de sua utilização.

## 2.OBJETIVO

O objetivo deste trabalho consiste em produzir o grupamento prostético radioiodado SIB utilizando metodologia proposta por Stocklin e colaboradores<sup>39</sup> e estudar a incorporação do SIB às proteínas utilizando como modelo Imunoglobulina humana (IgG).

Por meio de estudos comparativos de distribuição biológica do IgG radioiodado por método direto (Iodogen) e indireto (via SIB) em camundongos, verificar a potencialidade do SIB como marcador de proteínas com radioiodo, investigando a estabilidade à desalogenação *in vivo* e capacidade de ligação ao sítio alvo (foco de infecção).

Avaliar a viabilidade de produção rotineira do grupo prostético radioiodado com vistas à marcação futura de peptídeos de interesse com radioiodo para aplicação em Medicina Nuclear.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 MATERIAIS**

#### **✓ EQUIPAMENTOS**

- 1) Agitador de tubos modelo EV 03, Evlab, Brasil;
- 2) Balança analítica modelo B6, Mettler, Alemanha;
- 3) Bomba peristáltica modelo P-3 Pharmacia, Suécia;
- 4) Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência composto pelos seguintes módulos:
  - ✓ Módulo Gradiente modelo CG - 480C com injetor manual, CG, Brasil;
  - ✓ Integrador modelo CR4A, Shimadzu, Japão;
  - ✓ Detetor UV modelo CG 435-B, CG Instrumentos, Brasil;
- 5) Calibrador de doses modelo CRM<sup>TM</sup>-35R, Carpintec, EUA;
- 6) Cadinho eletrônico com controle digital de temperatura, IPEN, Brasil;
- 7) Contador automático tipo poço, com cristal NaI(Tl) modelo D5002, cobra II, Packard-Camberra, EUA;

- 8) Centrífuga modelo CF7D2, Himac, Brasil;
- 9) Espectrofotômetro UV-visível modelo DMS 80, Intralab, Brasil;
- 10) Glove-box equipada com sistema de despressurização, IPEN, Brasil;
- 11) Medidor de pH modelo PA200, TecnoPON, Brasil;
- 12) Ultrassom modelo T7, Thornton Inpec Eletrônica, Brasil.

### ✓ REAGENTES

- 1) Acetato de etila, grau HPLC, EM Science, EUA;
- 2) Acetonitrila, grau HPLC, EM Science, EUA;
- 3) Ácido acético glacial, grau de pureza 99,9%, Mallinckrodt;
- 4) Ácido bórico, grau de pureza p.a., Merck, Brasil;
- 5) Ácido p-bromobenzoico, grau de pureza 98%, Aldrich, EUA;
- 6) Clorofórmio, grau de pureza p.a., Merck; Brasil;
- 7) Cloreto de cobre, grau de pureza p.a., Merck; Brasil;
- 8) Cloreto de sódio, grau de pureza p.a., Merck, Brasil;
- 9) DMF : Dimetilformamida , grau de pureza p.a., Merck; Brasil;
- 10) DMSO : Dimetilsulfóxido, grau de pureza 99,9%, Sigma-Aldrich, EUA;
- 11) Fosfato dissódico, grau de pureza p.a., Merck, Brasil;
- 12) Fosfato de sódio monobásico, grau de pureza p.a., Merck, Brasil;
- 13) Glicina, grau de pureza 99%, Aldrich, EUA;
- 14) Heparina, solução 5000UI/mL - Liquemine, Roche, Brasil;
- 15) Hexano, grau HPLC, EM Science, EUA;

- 16) Hidróxido de sódio, grau de pureza p.a., Merck, Brasil;
- 17) Imunoglobulina G humana, Novartis Pharma AG, Suíça;
- 18) Iodogen : 1,3,4,6-tetracloro-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -difenilglicoluril, Sigma, EUA;
- 19) Metanol, grau HPLC, EM Science, EUA;
- 20) Tetraborato de sódio, grau de pureza p.a., Merck, Brasil;
- 21) TSTU : tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio, Fluka, Suíça;
- 22) Terebentina, Acrilex, Brasil;
- 23) Solução de Na<sup>131</sup>I, MS Nordion, Canadá – processada no CR-IPEN, Brasil.

### ✓ OUTROS

- 1) Nitrogênio gasoso, White Martins, Brasil;
- 2) Coluna cromatográfica Partisil 10 ODS-1 (RP-C<sub>18</sub>) para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, 250 × 4,6 mm, 10 $\mu$ m, Waters, EUA;
- 3) Coluna cromatográfica Partisil 10 (sílica) para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, 250 × 4,6 mm, 10 $\mu$ m, Waters, EUA;
- 4) Coluna cromatográfica Sephadex G-25, 5 × 1cm, Pharmacia, Suécia;
- 5) Cromatofolha AL TLC 20 × 20cm sílica gel 60 com e sem indicador de fluorescência, Merck, Brasil;
- 6) Fibra de vidro impregnada com sílica gel 5 × 20cm, ITLC-SG, Gelman Sciences, EUA;

- 7) Instrumentos cirúrgicos
- 8) Luz ultravioleta, 8 Wats, GE, Brasil;
- 9) Membrana filtrante fluoropore em PTFE, 0,2 $\mu$ m de poro, 47 $\mu$ m de diâmetro, Millipore, Brasil;
- 10) Membrana filtrante durapore em PVDF, 0,2 $\mu$ m de poro, 47 $\mu$ m de diâmetro, Millipore, Brasil;
- 11) Mini colunas compactadas, C18 – Sep-Pack classic – Waters, EUA;
- 12) Mini colunas compactadas, sílica – Sep-Pack classic – Waters, EUA;
- 13) Papel cromatográfico Whatman 3MM, Whatman, Brasil;
- 14) Vidraria em geral.

### ✓ ANIMAIS

- 1) Camundongo *Swiss*, fêmea de 20-30g, biotério IPEN–CNEN/SP.

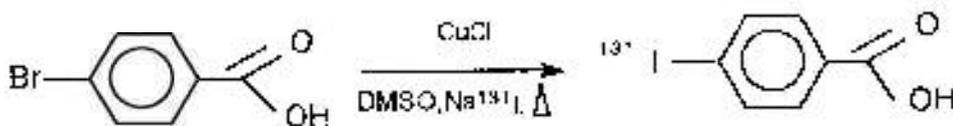
## 3.2 MÉTODOS

O grupo prostético radioiodado do tipo Benzoato de Iodo Succinimidila (SIB) foi obtido por via alternativa, conforme proposto por Stocklin e col<sup>39</sup>. e seguindo os procedimentos descritos nas Fases I e II a seguir:

## FASE I

### ✓ Substituição de Br catalisada por Cu(I)

Esta fase envolve a substituição do bromo do ácido p-bromobenzóico pelo radioiodo conforme descrito por Moerlin<sup>28</sup> e representado na Figura 5.



**Figura 5 – Fase I: Substituição de Br catalisada por Cu(I)**

A reação foi desenvolvida em frasco de vidro de fundo cônico para marcação.

A 50  $\mu\text{L}$  de ácido p-bromobenzóico 0,2 M em DMSO, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de solução de CuCl em DMSO (0,001-0,3 M) seguida de 5  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{Na}^{131}\text{I}$  (3,7 MBq; 100  $\mu\text{Ci}$ ). A reação foi desenvolvida em temperatura elevada (155-

175 °C) por 15-60 minutos. A mistura foi resfriada até atingir temperatura ambiente e submetida a purificação e controle radioquímico.

Nesta etapa de reação foram estudados os seguintes parâmetros:

- Massa de CuCl
- Tempo de reação
- Temperatura de reação

#### ✓ Controle radioquímico da marcação do Br-areno

O controle radioquímico deve possibilitar a separação das diferentes espécies radioquímicas presentes nas marcações.

No caso da marcação do bromoareno com radioiodo foram ensaiados vários sistemas cromatográficos, utilizando-se papel Whatman 3MM (W3MM) e placas aluminizadas recobertas com camada fina de sílica gel (TLC-SG). Como fase móvel foram ensaiados diferentes solventes e misturas de solventes objetivando melhorar a qualidade de separação das espécies radioquímicas ácido p-iodobenzóico e iodeto. Um dos sistemas que apresentou melhor eficiência de separação foi o que utilizou papel Whatman 3MM e como solvente a mistura

clorofórmio: ácido acético (9:1). Neste sistema o Rf do ácido p-radioiodobenzóico é 1,0 e do radioiodo livre é 0,0.

Foi também executada análise do cromatograma com os perfis de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do composto radiomarcado utilizando-se o seguinte sistema<sup>28</sup>:

Coluna: Partisil 10 ODS (C18) (5  $\mu$ m, 4,6  $\times$  250 mm), 10  $\mu$ m

Gradiente metanol:água destilada – variando a % de água de 0 a 40% (t = 0 a 0,25 minutos), 40 a 50% (t = 0,25 a 0,50 minutos), 50 a 70% (t = 0,5 a 1,0 minutos) e 70% até t = 10 minutos.

Comprimento de onda: 254 nm

Fluxo: 1 mL/min

### ✓ Estudo da Purificação do composto iodado

Na otimização da purificação do ácido p-radioiodobenzóico foram utilizadas as seguintes técnicas:

**Purificação por precipitação:** adiciona-se água destilada (1 mL) à mistura reagente final, precipitando o ácido p-radioiodobenzóico, que foi separado do radioiodo livre

após centrifugação e separação das fases. O procedimento foi repetido e o produto recuperado em acetonitrila (400-600  $\mu$ L).

#### **Purificação em colunas compactadas Sep-Pack-C18:**

(a) foi realizada conforme descrito por Stocklin e col.<sup>39</sup>. No topo da coluna previamente saturada com água destilada, a amostra foi aplicada e eluída primeiramente com 5 mL de água destilada e subseqüentemente com 10 mL de acetonitrila com fluxo de 10 mL/min.;

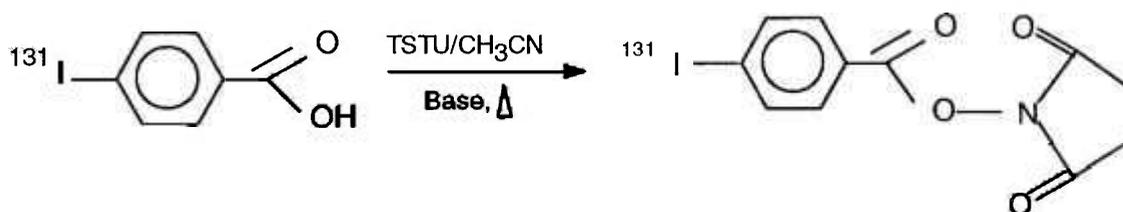
(b) foi realizada conforme descrito por Pozzi<sup>31</sup>. A amostra foi aplicada na coluna e lavada com água destilada (15 mL). Após esgotar e levar à secura com passagem de corrente de nitrogênio, procedeu-se à eluição com 5 mL de acetonitrila, a um fluxo de 10 mL/min. O radioiodo livre é removido na fração aquosa e o ácido p-radioiodobenzóico nos primeiros 2 mL de acetonitrila.

Tanto na purificação (a) como na (b), a fração de acetonitrila é concentrada até cerca de 400-600  $\mu$ L utilizando-se corrente de nitrogênio.

## FASE II

### ✓ Reação do ácido p-radioiodobenzóico ( $^{131}\text{I}$ ) com TSTU

A reação foi realizada em frasco de vidro de fundo cônico para marcação adicionando-se ao ácido p-radioiodobenzóico purificado, dissolvido em acetonitrila (400-600  $\mu\text{L}$ ) a solução 0,2 M de TSTU (tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-N,N,N'-tetrametiluronio) devidamente preparada em acetonitrila (100  $\mu\text{L}$ ). A reação foi conduzida em meio alcalino, sob aquecimento de  $60^\circ\text{C}$  por 2-30 minutos (Figura 6).



**Figura 6 – Fase II: Formação do grupo prostético Benzoato de Iodo Succinimidila (SIB)**

A condição de alcalinidade foi obtida utilizando-se 10  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de NaOH 1-2 N, adicionada ao meio reacional. Alternativamente, 10  $\mu\text{L}$  da

solução de NaOH 2 N foi adicionada ao ácido p-radioiodobenzóico purificado sendo a mistura evaporada à secura antes da introdução do TSTU.

Nesta etapa de reação foram estudados os seguintes parâmetros:

- Tempo de reação
- Concentração de NaOH
- Presença de água no meio reacional.

#### ✓ Controle radioquímico da reação

Para análise da pureza radioquímica do grupo prostético radioiodado, foi utilizado o seguinte sistema cromatográfico em CLAE, conforme descrito em literatura<sup>51</sup>:

Coluna Partisil 10, sílica, 10  $\mu$ m, 4,6  $\times$  250 mm

Mistura de solvente: hexano: acetato de etila:ácido acético (70:30:0,2)

Comprimento de onda: 254 nm

Fluxo: 1 mL/min

### ✓ Purificação do grupo prostético radioiodado

O composto formado foi purificado empregando-se mini-coluna compactada de sílica (Sep-Pack-sílica), previamente saturada com hexano e a amostra aplicada com auxílio de  $3 \times 100 \mu\text{L}$  de hexano. A coluna foi percolada com 40 mL de hexano seguida de  $3 \times 10 \text{ mL}$  de mistura hexano:acetato de etila (70:30) com um fluxo de 10 mL/min. O produto foi recolhido na primeira fração da mistura hexano:acetato de etila (70:30)<sup>51</sup>.

## FASE II:

### ✓ Estudo de marcação da proteína

Foi utilizada a Imunoglobulina G humana (IgG) (Novartis Pharma) nos estudos de marcação de proteína com radioiodo por método direto e indireto.

## ✓ Marcação do IgG por método direto utilizando técnica de Iodogen

### Preparação dos tubos de Iodogen

Os tubos de Iodogen foram preparados como descrito por Salacinski e col.<sup>35</sup>: Iodogen (1 mg) foi dissolvido em diclorometano (1 mL) e deste, 10 a 50  $\mu\text{L}$  foi introduzido em tubos cônicos de polipropileno e evaporados à secura em corrente de nitrogênio à temperatura ambiente. Após secura os tubos foram acondicionados em temperatura inferior a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , onde mantiveram-se estáveis por cerca de 6 meses.

### Procedimento de marcação utilizando Iodogen como agente oxidante

Utilizou-se solução de  $^{131}\text{I}$  em  $\text{NaOH } 10^{-3}\text{ M}$   $\text{pH} \geq 11$  (3,7 MBq, 30-50  $\mu\text{L}$ ). A solução de IgG foi preparada em tampão fosfato  $\text{pH } 7,5$ ,  $0,5\text{ M}$  (100  $\mu\text{g}/10\mu\text{L}$ ).

A solução de IgG foi adicionada ao tubo de iodação (contendo 10, 20 ou 50  $\mu\text{g}$  de Iodogen), seguido da solução de  $\text{Na}^{131}\text{I}$ . A mistura foi agitada por 30 minutos em temperatura ambiente e transferida para outro tubo com a finalidade de interromper a reação.

### ✓ Marcação do IgG por método indireto utilizando grupo prostético radioiodado

A fração de hexano:acetato de etila (70:30) contendo o grupo prostético radioiodado purificado foi evaporada a aproximadamente 1,0 mL, utilizando-se corrente de N<sub>2</sub><sup>46</sup>.

Este volume foi transferido para um tubo de polipropileno de fundo cônico e evaporado à secura em corrente de nitrogênio. A este, adicionou-se a solução de IgG humano (200-1000 µg/50 µL) dissolvida em tampão borato 0,1 M pH 8,5 e a mistura foi agitada em temperatura ambiente por 30-60 minutos. Posteriormente, a reação foi interrompida com a introdução de solução de glicina 0,2 M em tampão borato (300 µL) seguida de incubação por 5 minutos.

Algumas investigações foram realizadas utilizando-se a solução de IgG preparada em tampão borato:DMF:acetonitrila (4:3:3) e tampão borato:acetonitrila (2:1).

Alternativamente, a temperatura da reação foi conduzida em banho de gelo ou com ligeiro aquecimento (60 °C).

Nesta marcação indireta, foram estudados os seguintes parâmetros:

- massa da proteína
- solvente para dissolução da proteína
- condição térmica da reação

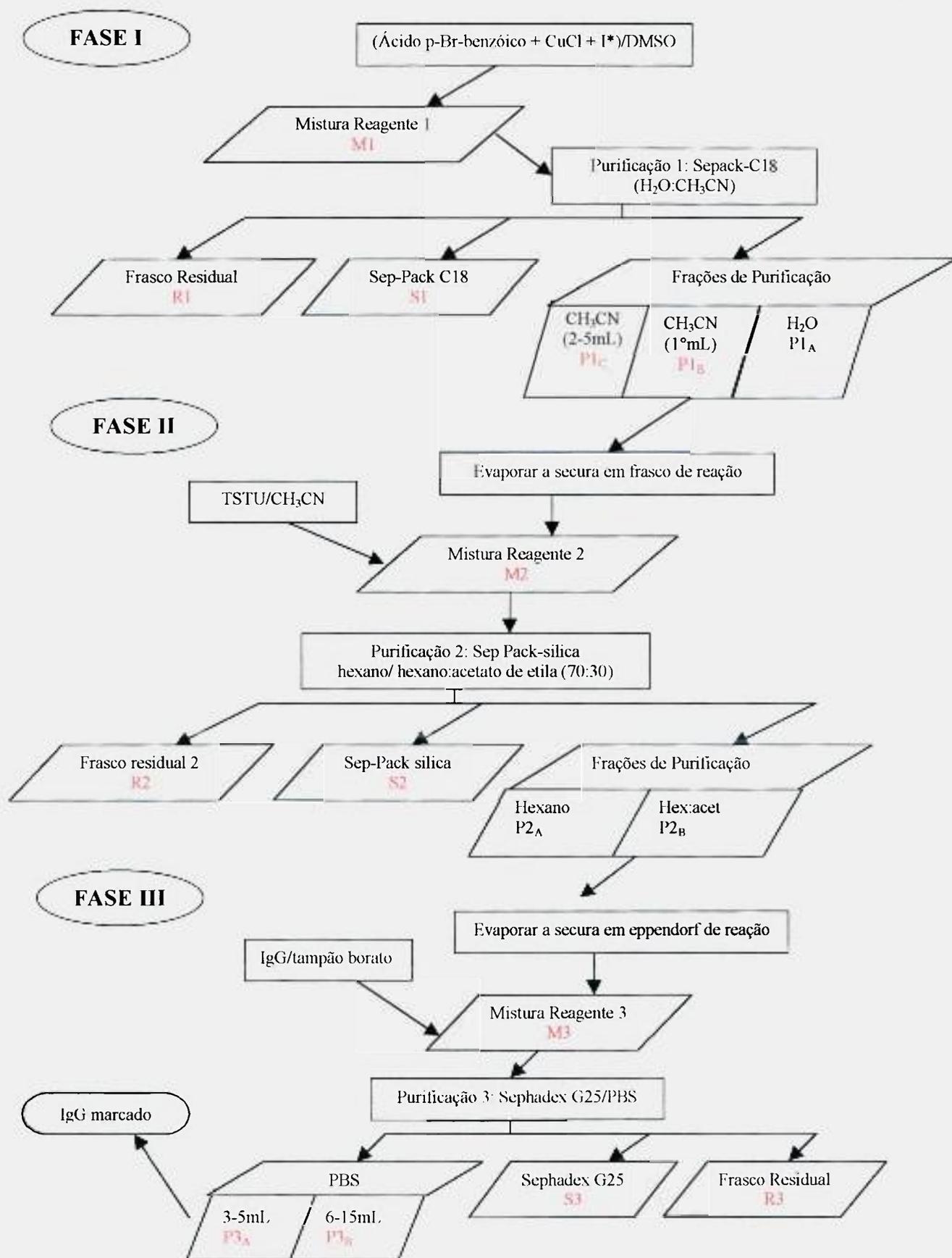
### ✓ Pureza radioquímica e purificação da proteína marcada

A pureza radioquímica para ambos os tipos de marcação foi determinada por cromatografia em camada delgada utilizando-se tiras de fibra de vidro impregnadas com sílica gel (ITLC-SG) e metanol 85% como fase móvel (Rf do IgG iodado = 0, Rf do  $^{131}\text{I}$  livre e do grupo prostético radioiodado = 1).

A separação do composto IgG marcado das impurezas (iodo livre e SIB) foi realizada em coluna de gel filtração Sephadex G 25 (5×1 cm) utilizando-se PBS como eluente (mistura de partes iguais de tampão fosfato pH 7,5 e NaCl 0,9%) e coletando-se frações de 1 mL <sup>51</sup>.

Os perfis de eluição do IgG e do  $\text{Na}^{131}\text{I}$  foram previamente determinados, utilizando, no primeiro caso, a medida de absorvância das frações eluídas que foram identificadas em Espectrofotômetro-UV (280 nm) e para o  $^{131}\text{I}$  as frações foram analisadas em contator gama tipo poço.

O fluxograma representado na Figura 7 ilustra as diferentes fases da marcação do IgG por via indireta.



**Figura 7 - Fluxograma ilustrativo das diferentes fases de marcação do IgG por via indireta**

## Fase IV

### ✓ Avaliação *in vivo* da proteína marcada

A biodistribuição da proteína (IgG) marcada por ambos os métodos foi realizada em camundongos *Swiss* (fêmeas adultas, pesando entre 20-30 g) normais e com foco de infecção experimental.

Os animais com foco de infecção foram obtidos, promovendo-se lesão inflamatória química provocada pela inoculação de 0,1 mL de terebentina no subcutâneo da pata traseira, à direita do operador.

O estudo foi realizado utilizando-se método invasivo. Após a administração de 0,37 – 1,11 MBq (10 – 30  $\mu$ Ci) do IgG-<sup>131</sup>I, na veia caudal lateral, os animais, em respectivos tempos pré fixados (t = 1, 4, 16 e 24 horas) foram puncionados na veia do sinus orbital, com capilar de vidro heparinizado especial para coleta de 100  $\mu$ L da alíquota sangüínea e imediatamente sacrificados para retirada dos órgãos que, depois de pesados, tiveram a radioatividade determinada em um contador tipo poço, calibrado para o radionuclídeo <sup>131</sup>I.

Nesse estudo, além da amostra sanguínea foram retirados os seguintes órgãos considerados de interesse: coração, pulmão, rins, fígado, baço, intestinos, estômago e tireóide. Ademais, foi extirpada a pata direita posterior dos camundongos normais e ambas, nos camundongos com foco infeccioso, sendo que na determinação da concentração radioativa, um servirá de contraprova para o outro (lesado × não lesado). Calculou-se a porcentagem de dose presente em cada órgão de interesse frente a um padrão da dose administrada (equações 1 e 2).

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

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

cpm= contagem por minuto

A porcentagem dose presente no sangue dos animais foi determinada de acordo com a equação 3<sup>1</sup>.

$$\%Dose \text{ sangue} = \frac{\text{cpm } 0,1 \text{ mL de sangue}}{\text{cpm padrão}} \times \text{volemia} \quad (\text{equação 3})$$

A volemia de cada animal foi calculada de acordo com a equação 4<sup>1</sup>.

$$\text{Volemia} = \text{Peso do animal (g)} \times 0,0778 \text{ (mL/g)} \quad (\text{equação 4})$$

## 4. Resultados

A influência do tempo de reação na obtenção do ácido p-radioiodo benzóico a partir do ácido p-bromobenzóico (Fase I) pode ser observada nas Tabelas 4.1 e 4.2.

Tabela 4.1: Variação da porcentagem do ácido p-radioiodobenzóico em função do tempo de reação

Tempo de reação (minutos)	% ácido p-radioiodobenzóico	%radioiodo livre	% outras impurezas
15	49,78 ± 8,16	10,37 ± 2,09	39,85 ± 6,07
30	71,61 ± 4,69	10,26 ± 1,91	18,11 ± 6,18
45	45,92 ± 2,07	37,62 ± 3,54	16,45 ± 2,29
60	37,33 ± 8,82	42,68 ± 7,69	19,99 ± 4,07

N = 3

T = 175 °C

CuCl: 100 µL solução 0,1 M /DMSO

Ácido p-bromobenzóico – 50 µL solução 0,2 M /DMSO

5 µL <sup>131</sup>I – 0,37 MBq (100 µCi)

Tabela 4.2 – Variação da porcentagem do ácido p-radioiodobenzoico em função do tempo de reação

Tempo de reação(minutos)	% ácido p-radioiodobenzoico	% radioiodo livre	% outras impurezas
30	68,28 ± 0,26	24,01 ± 0,08	7,68 ± 0,14
45	72,94 ± 3,49	19,69 ± 2,43	7,37 ± 1,06
60	79,48 ± 5,03	20,52 ± 5,03	0

N = 3

T = 165 °C

CuCl: 100 µL solução 0,1 M /DMSO

Ácido p-bromobenzoico– 50 µL solução 0,2 M /DMSO

5 µL <sup>131</sup>I – 0,37 MBq (100 µCi)

Os resultados demonstrados nas Tabelas 4.1 e 4.2 foram obtidos por sistema cromatográfico por partição em papel Whatmann 3MM e clorofórmio:ácido acético (9:1).

Neste sistema os valores do fator de retenção (Rf) obtidos foram: (i) Iodo livre = 0,0; (ii) Ácido p-radioiodobenzoico = 1,0.

A espécie radioquímica identificada como “outras impurezas”, corresponde a um pico no radiocromatograma com Rf de aproximadamente 0,5 observado para certas condições de marcação.

Nas Tabela 4.3 e 4.4 encontram-se os resultados obtidos utilizando-se diferentes concentrações de cloreto de cobre (CuCl). Os perfis da CLAE foram determinados utilizando-se coluna C18 e gradiente metanol:água destilada.

Tabela 4.3 – Efeito da concentração de CuCl na reação de substituição de bromo por iodo

100 $\mu$ L CuCl	Porcentagem dos picos obtidos em cromatograma de CLAE			
	1	2	3	4
0,3 M	2,58	46,50	41,92	9,0
0,2 M	8,30	19,89	67,01	4,7
0,1 M	0	7,37	72,94	19,69
0,01 M	0	0	86,27	13,74
0,005 M	0	0	80,37	19,64
0,001 M	0	0	8,25	91,74

1 – Rt = 2,3 minutos; 2 – Rt = 2,7 minutos; 3 – Rt = 3,2 minutos; 4 – Rt = 3,8 minutos

T = 165 °C

t = 45 minutos

ácido p-bromobenzóico – 50  $\mu$ L 0,2 M solução em DMSO

5  $\mu$ L  $^{131}$ I - 0,37 MBq (100  $\mu$ Ci)

Os picos com Rt = 3,2 minutos e Rt = 3,8 minutos correspondem ao ácido radioiodobenzóico e radioiodo livre respectivamente.

Tabela 4.4 – Efeito da concentração de CuCl na reação de substituição do bromo por iodo

100 $\mu\text{L}$ CuCl	Porcentagem dos picos obtidos em cromatograma de CLAE			
	1	2	3	4
0,2 M	0	20,70	70,30	9,00
0,1 M	5,9	10,23	78,92	4,89
0,01 M	0	0	94,36	5,64
0,005 M	0	0	91,76	8,24

1 – Rt = 2,3 minutos; 2 – Rt = 2,7 minutos; 3 – Rt = 3,2 minutos; 4 – Rt = 3,8 minutos

T = 165 °C

t = 60 minutos

ácido p-bromobenzóico – 50  $\mu\text{L}$  0,2 M solução/DMSO

5  $\mu\text{L}$   $^{131}\text{I}$  - 0,37 MBq (100  $\mu\text{Ci}$ )

Os resultados também podem ser expressos em forma da razão molar de CuCl/ácido p-bromobenzóico (Tabela 4.5).

Tabela 4.5 – Porcentagem da pureza radioquímica do ácido p-radioiodobenzóico utilizando-se diferentes razões molares de CuCl/ ácido p-bromobenzóico

CuCl/ ácido p-bromobenzóico	% ácido p-radioiodobenzóico
$10^{-1}$	82,57 $\pm$ 2,25
$10^{-2}$	92,73 $\pm$ 1,51
$10^{-3}$	8,25 $\pm$ 1,41

N = 6

T = 165 °C

t = 60 minutos

5  $\mu\text{L}$   $^{131}\text{I}$  - 0,37 MBq (100  $\mu\text{Ci}$ )

Na Tabela 4.6 encontram-se os resultados obtidos para diferentes temperaturas de reação utilizando-se o sistema cromatográfico em papel, descrito anteriormente.

Tabela 4.6 – Influência da temperatura na reação de iododebrominação

Temperatura (°C)	% ácido p-radioiodobenzóico	% iodo livre	% outras impurezas
155	81,59 ± 1,26	11,65 ± 1,14	6,75 ± 0,13
165	79,48 ± 5,03	20,52 ± 5,03	0
175	37,33 ± 8,82	42,68 ± 7,69	19,99 ± 4,07

N=3

CuCl: 100 µL 0,1 M  
 Ácido p-bromobenzóico – 50 µL solução 0,2 M /DMSO  
 5 µL <sup>131</sup>I – 0,37 MBq (100 µCi)  
 t = 60 minutos

O cromatograma de CLAE da solução de ácido p-iodobenzóico purificado, em Sep Pack C-18, retrata um único pico de Rt = 5,15 minutos (Figura 8).

Das técnicas de purificação empregadas, a que utiliza Sep Pack C 18, conforme descrita por Pozzi<sup>31</sup>, permite a obtenção do produto purificado em um

volume de solvente menor, reduzindo custos e principalmente, o tempo empregado na evaporação do solvente em corrente de nitrogênio. A purificação por precipitação introduzida neste trabalho representa uma alternativa mais econômica porém com maior perda de produto nos resíduos de purificação.

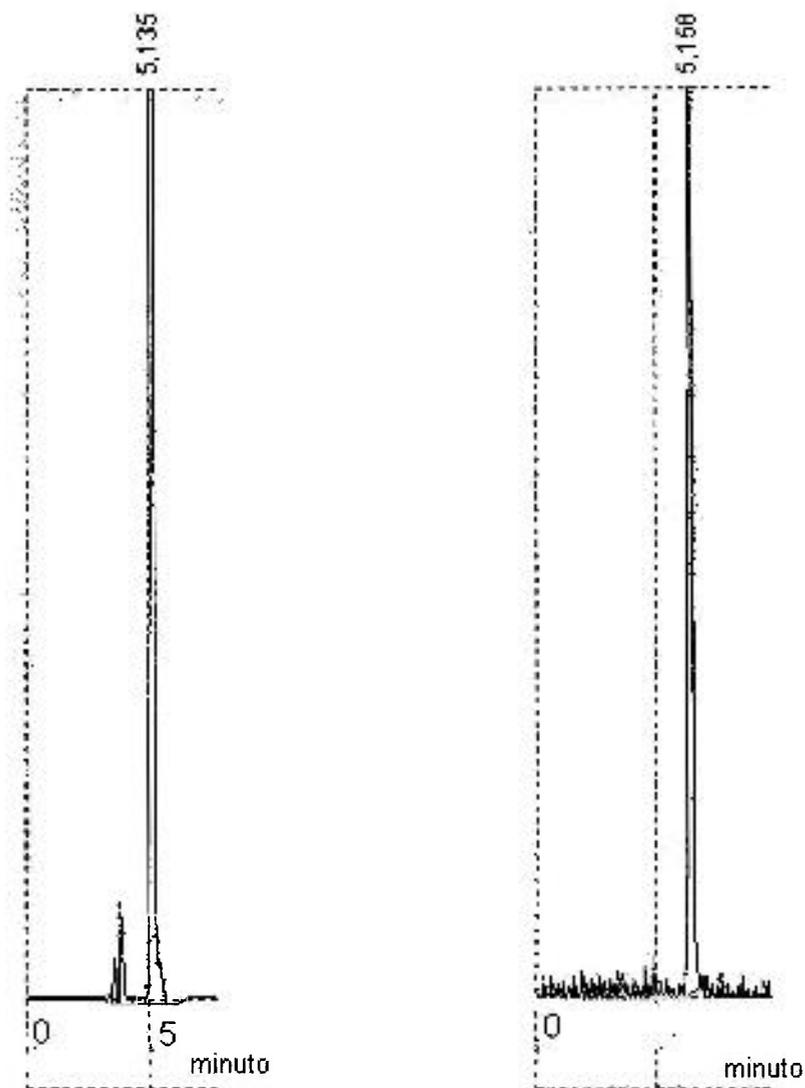
Com relação à Fase II da reação, o grupo prostético radioiodado SIB foi obtido com pureza radioquímica de  $87,52 \pm 2,47\%$  (N=6) avaliada em CLAE quando se utilizou 100  $\mu\text{L}$  de solução de TSTU em acetonitrila e 10  $\mu\text{L}$  de hidróxido de sódio 2 N. Esta porcentagem foi de  $69,34 \pm 9,5\%$  (N=3), quando a concentração do hidróxido de sódio utilizada foi de 1 N. Tais resultados foram obtidos com 15 minutos de reação acrescentando-se a solução de hidróxido de sódio ao frasco contendo o ácido p-radioiodobenzóico, cujo solvente fora anteriormente evaporado com corrente de nitrogênio, seguido da solução de TSTU.

Resultados diferentes de pureza radioquímica foram obtidos ao acrescentar-se a solução de NaOH (10  $\mu\text{L}$ , 2 N) ao frasco de reação contendo a solução de ácido p-radioiodobenzóico e procedendo-se à evaporação também da solução de NaOH para, em seguida, acrescentar-se a solução de TSTU. Neste caso, a porcentagem de pureza radioquímica do SIB, analisada por CLAE, foi de  $98,19 \pm 1,41\%$  (N=5).

O estudo da cinética de reação da Fase II demonstrou que com 2 minutos de reação o cromatograma de CLAE da mistura de reação ainda não

evidenciava a formação do grupo prostético radioiodado. Entretanto, de 5 a 30 minutos, o percentual correspondente ao grupo prostético permaneceu constante em torno de 80%. Este estudo foi realizado utilizando-se NaOH na forma líquida, não evaporada.

As misturas de reação correspondentes à Fase II foram analisadas em CLAE como descrito anteriormente. No cromatograma, dois picos foram observados, um correspondente ao ácido *p*-iodobenzóico ( $R_t = 5,15$  minutos) e outro, com  $R_t = 10,6$  minutos, relacionado ao grupo prostético radioiodado. Após processo de purificação para remoção do contaminante ácido *p*-radioiodobenzóico, a fração de purificação de Hexano:Acetato de Etila (70:30) foi analisada em CLAE e apresentou apenas o pico de 10,6 minutos (Figura 9). Tais picos foram observados em misturas reagentes nas quais utilizou-se NaOH na forma líquida. As misturas empregando NaOH com solvente evaporado antes da introdução do TSTU indicaram pureza radioquímica de cerca de 98% na análise de CLAE (Figura 10).



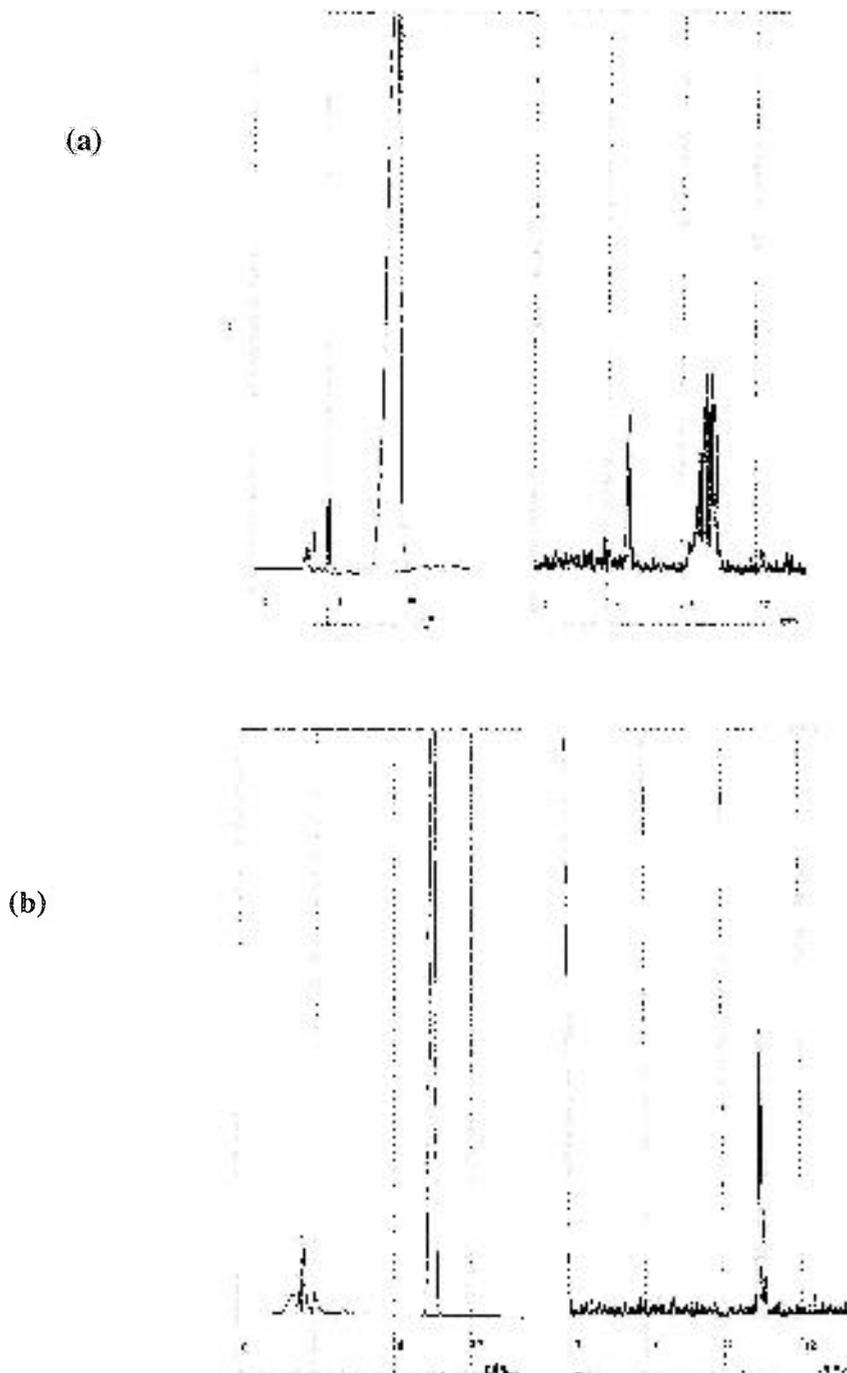
**Figura 8 – Cromatograma de CLAE da solução de ácido p-iodo(<sup>131</sup>I)benzóico após purificação: UV (esquerda) e radioativo (direita)**

Coluna Partisil 10, sílica, 10  $\mu$ m, 4,6  $\times$  250 mm

Mistura de solvente: hexano: acetato de etila:ácido acético (70:30:0,2)

Comprimento de onda: 254 nm

Fluxo: 1 mL/min



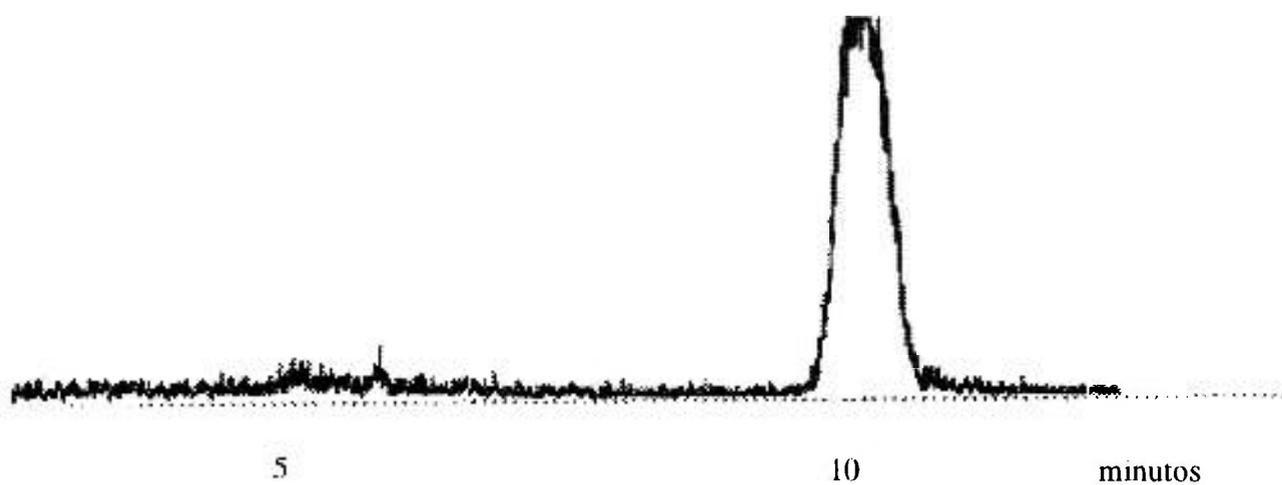
**Figura 9 – Cromatograma de CLAE do SIB obtido utilizando-se NaOH líquido antes (a) e após purificação (b): UV (esquerda) e radioativo (direita)**

Coluna Partisil 10, sílica, 10  $\mu$ m, 4,6  $\times$  250 mm

Mistura de solvente: hexano: acetato de etila:ácido acético (70:30:0,2)

Comprimento de onda: 254 nm

Fluxo: 1 mL/min



**Figura 10– Cromatograma de CLAE (radioativo), do SIB obtido evaporando-se NaOH, sem purificação**

Coluna Partisil 10, sílica, 10  $\mu\text{m}$ , 4,6  $\times$  250 mm  
Mistura de solvente: hexano: acetato de etila:ácido acético (70:30:0,2)  
Comprimento de onda: 254 nm  
Fluxo: 1 mL/min

As Tabelas de 4.7 a 4.9 mostram os rendimentos obtidos nas diferentes fases do processamento, para algumas marcações, considerando-se as várias etapas e frações de purificação, conforme esquematizadas no fluxograma representado na Figura 7.

As porcentagens foram calculadas considerando-se a medida de atividade em calibrador de doses das frações de purificação para diferentes marcações. As porcentagens calculadas para a Fase II foram obtidas de reações utilizando-se NaOH na forma líquida.

Tabela 4.7 – Porcentagem da radioatividade presente nas frações de reação Fase I

Frações	% radioatividade obtida em diferentes marcações								% média
M1	100	100	100	100	100	100	100	100	100
S1	0,24	0,20	0,80	0,60	0,30	0,33	1,36	1,31	0,64 ± 0,44
P1 <sub>A</sub>	28,3	31,3	20,0	25,5	25,3	31,5	38,7	29,4	28,75 ± 5,15
<b>P1<sub>B</sub></b>	<b>67,9</b>	<b>60,7</b>	<b>63,5</b>	<b>67,8</b>	<b>72,2</b>	<b>66,7</b>	<b>55,8</b>	<b>67,4</b>	<b>65,25 ± 4,76</b>
R1	1,0	2,1	2,5	0,7	1,8	1,6	3,8	2,2	1,96 ± 0,90

Tabela 4.8 – Rendimentos da Fase II: considerando-se % da radioatividade inicial (M2) real, advindo da Fase I (Rendimentos acumulados das Fases I e II)

Frações da Fase II	% radioatividade obtida em diferentes marcações (Rendimento)				% média
M2	60,7	63,5	67,8	72,2	66,05 ± 4,36
S2	2,8	7,3	10,5	5,9	6,62 ± 2,76
P2 <sub>A</sub>	0,4	0,46	2,4	0,9	1,04 ± 0,80
<b>P2<sub>B</sub></b>	<b>30,7</b>	<b>37,68</b>	<b>33,8</b>	<b>37,6</b>	<b>34,94±2,91</b>
R2	22,1	17,52	18,6	21,3	19,88±1,88

Tabela 4.9 – Rendimentos da Fase II considerando-se % da radioatividade inicial (M2) igual a 100%

Frações da Fase II	% radioatividade obtida em diferentes marcações (Rendimento)				% média
M2	100	100	100	100	100
S2	4,7	12,1	15,6	9,8	10,55 ± 3,95
P2 <sub>A</sub>	0,6	0,8	3,5	0,7	1,40 ± 1,21
<b>P2<sub>B</sub></b>	<b>50,6</b>	<b>59,4</b>	<b>49,9</b>	<b>52,1</b>	<b>53,00 ± 3,78</b>
R2	36,4	27,7	27,4	29,5	30,25 ± 3,64

A Tabela 4.10 demonstra os resultados da pureza radioquímica do IgG marcado pelo método direto utilizando-se diferentes razões de Iodogen/proteína.

Tabela 4.10 – Porcentagem da pureza radioquímica do IgG marcado via Iodogen

Iodogen( $\mu\text{g}$ )/100 $\mu\text{g}$ IgG	Pureza radioquímica (%)
10	88,14 $\pm$ 1,55
20	84,37 $\pm$ 0,81
50	83,47 $\pm$ 0,29

N=3

A pureza radioquímica observada após 24 horas, utilizando-se 10  $\mu\text{g}$  de Iodogen foi de 85,02  $\pm$  1,19%.

A marcação de IgG por método indireto, utilizando-se o grupo prostético resultou em uma pureza radioquímica de 15,5  $\pm$  5,3% (N=5) e rendimento inferior a 10%, após purificação em coluna Sephadex G25 (Fase III), utilizando-se 500  $\mu\text{g}$  de IgG/50  $\mu\text{L}$  de tampão borato 0,1 M pH 8,5, 30 minutos de reação à temperatura ambiente.

Tais porcentagens permaneceram praticamente inalteradas quando foram avaliados diversos parâmetros de marcação tais como tempo de reação,

condição térmica da reação, massa da proteína e meio reacional (solvente de preparo da proteína).

Em todas as condições de marcação utilizadas, praticamente toda a radioatividade equivalente ao grupo prostético (M3 do fluxograma) permaneceu aderida ao frasco de reação (R3 do fluxograma). Da porcentagem do grupo prostético que passou para o meio reacional, cerca de 50-60% incorporou-se à proteína, conforme determinado em teste de pureza radioquímica por técnica de separação em ITLC-SG e com solvente de desenvolvimento metanol 85%.

Na purificação em coluna Sephadex G 25 da IgG marcada por via direta o volume de eluição da proteína foi de 4 a 6 mL e do iodo livre de 11 a 13 mL. Entretanto, quando a proteína foi marcada por via indireta o volume de eluição da proteína permaneceu constante e do SIB foi de 7 a 15 mL.

Os resultados obtidos nos estudos de biodistribuição da IgG marcada por Iodogen em camundongos normais estão demonstrados nas Tabelas 4.11 e 4.12 e dos animais com foco de infecção nas Tabelas 4.13 e 4.14.

Tabela 4.11 – Porcentagem da dose administrada/órgão de IgG marcada via método direto em camundongos normais

ÓRGÃO	% DOSE ADMINISTRADA/ÓRGÃO			
	1 hora	4 horas	16 horas	24 horas
Sangue total	77,34 ± 6,96	62,77 ± 3,45	36,92 ± 4,71	35,38 ± 2,36
Coração	1,07 ± 0,18	0,96 ± 0,14	0,34 ± 0,01	0,47 ± 0,06
Pulmão	4,63 ± 1,02	4,24 ± 0,15	1,89 ± 0,39	1,95 ± 0,12
Estômago	5,00 ± 0,26	10,80 ± 1,97	1,84 ± 0,17	3,37 ± 0,39
Baço	0,80 ± 0,07	0,64 ± 0,02	0,24 ± 0,02	0,31 ± 0,02
Fígado	14,91 ± 2,07	11,07 ± 0,89	4,83 ± 0,39	6,15 ± 0,76
Rins	2,82 ± 0,13	2,74 ± 0,19	1,12 ± 0,04	1,41 ± 0,08
Intestino	8,59 ± 1,06	12,53 ± 1,45	4,90 ± 0,56	6,56 ± 0,86
Tireóide	1,77±0,62	3,94 ± 0,66	2,48 ± 0,37	7,47±1,15
Pata D	2,98 ± 0,31	4,04 ± 0,49	2,75 ± 0,44	3,54 ± 0,40

N = 10

Tabela 4.12 – Porcentagem da dose administrada/grama de tecido de IgG marcada via método direto em camundongos normais

ÓRGÃO	% DOSE ADMINISTRADA/GRAMA			
	1 hora	4 horas	16 horas	24 horas
Coração	6,89 ± 0,45	6,30 ± 1,00	2,60 ± 0,16	4,16 ± 0,04
Pulmão	13,89 ± 0,03	13,75 ± 1,60	5,51 ± 0,15	8,31 ± 1,10
Estômago	11,46 ± 0,54	22,38 ± 0,79	1,92 ± 0,55	3,40 ± 0,53
Baço	7,47 ± 0,71	6,61 ± 0,77	2,10 ± 0,11	3,06 ± 0,68
Fígado	10,12 ± 0,36	8,05 ± 1,43	2,90 ± 0,19	4,53 ± 0,32
Rins	9,40 ± 1,11	8,26 ± 1,03	2,81 ± 0,30	4,17 ± 0,40
Intestino	2,22 ± 0,15	3,39 ± 0,52	0,98 ± 0,10	1,64 ± 0,28
Pata D	1,65 ± 0,11	2,52 ± 0,47	1,32 ± 0,12	2,22 ± 0,19

N = 10

Tabela 4.13 – Porcentagem da dose administrada/órgão de IgG marcada via método direto em camundongos com foco de infecção

ÓRGÃO	% DOSE ADMINISTRADA/ÓRGÃO			
	1 hora	4 horas	16 horas	24 horas
Sangue total	55,40 ± 9,20	40,07 ± 11,19	36,61 ± 1,39	8,34 ± 0,51
Coração	0,40 ± 0,11	0,46 ± 0,07	0,58 ± 0,06	0,06 ± 0,01
Pulmão	3,58 ± 0,30	2,91 ± 0,79	1,59 ± 0,10	0,22 ± 0,05
Estômago	6,83 ± 1,16	11,93 ± 2,27	2,09 ± 0,32	0,69 ± 0,11
Baço	1,19 ± 0,14	0,61 ± 0,01	0,50 ± 0,08	0,20 ± 0,04
Fígado	22,66 ± 1,94	14,89 ± 1,19	6,83 ± 0,90	5,26 ± 0,19
Rins	2,52 ± 0,11	2,18 ± 0,13	1,38 ± 0,20	0,46 ± 0,03
Intestino	7,47 ± 0,92	11,14 ± 1,38	6,07 ± 0,88	1,60 ± 0,30
Tireóide	0,37 ± 0,05	4,66 ± 0,54	1,63 ± 0,43	7,76 ± 1,57
Pata D	6,27 ± 0,96	12,80 ± 2,34	16,86 ± 2,10	2,89 ± 0,39
Pata E	2,28 ± 0,19	3,15 ± 0,32	3,33 ± 0,35	0,71 ± 0,16

N = 10

Tabela 4.14 – Porcentagem da dose administrada/grama de tecido de IgG marcada via método direto em camundongos com foco de infecção

ÓRGÃO	% DOSE ADMINISTRADA/GRAMA			
	1 hora	4 horas	16 horas	24 horas
Coração	2,43 ± 0,21	2,63 ± 0,26	3,33 ± 0,25	0,42 ± 0,08
Pulmão	8,19 ± 0,71	7,41 ± 1,44	6,46 ± 0,51	1,06 ± 0,14
Estômago	15,89 ± 1,77	28,10 ± 4,45	4,41 ± 0,63	0,57 ± 0,23
Baço	5,13 ± 0,89	4,19 ± 0,69	2,78 ± 0,44	0,60 ± 0,12
Fígado	10,93 ± 1,57	8,47 ± 1,00	4,18 ± 0,16	2,61 ± 0,25
Rins	5,48 ± 0,95	4,29 ± 0,21	3,80 ± 0,76	0,92 ± 0,03
Intestino	2,25 ± 0,25	3,06 ± 0,27	1,83 ± 0,19	0,33 ± 0,09
Pata D	2,58 ± 0,30	5,15 ± 0,57	5,71 ± 0,57	1,23 ± 0,09
Pata E	1,27 ± 0,11	1,68 ± 0,29	2,04 ± 0,29	0,50 ± 0,13

N = 10

Os resultados obtidos nos estudos de biodistribuição da IgG marcada com grupo prostético radioiodado em camundongos normais estão representados nas Tabelas 4.15 e 4.16 e em camundongos com foco de infecção, nas Tabelas 4.17 e 4.18.

Tabela 4.15 – Porcentagem da dose administrada/órgão de IgG radioiodada por método indireto em camundongos normais

ÓRGÃO	% DOSE ADMINISTRADA/ÓRGÃO			
	1 hora	4 horas	16 horas	24 horas
Sangue Total	5,40 ± 1,00	3,18 ± 0,57	5,77 ± 0,38	1,43 ± 0,72
Coração	0,23 ± 0,05	0,06 ± 0,01	0,50 ± 0,19	0,09 ± 0,01
Pulmão	1,11 ± 0,38	0,44 ± 0,06	0,99 ± 0,26	0,23 ± 0,03
Estômago	0,29 ± 0,05	0,22 ± 0,02	0,62 ± 0,28	0,11 ± 0,03
Baço	1,76 ± 0,33	0,66 ± 0,22	0,48 ± 0,08	0,06 ± 0,01
Fígado	52,34 ± 6,73	12,99 ± 1,71	1,73 ± 0,68	0,68 ± 0,15
Rins	5,21 ± 1,46	2,71 ± 0,05	0,70 ± 0,07	0,37 ± 0,12
Intestino	5,96 ± 1,11	16,57 ± 1,95	1,63 ± 0,58	0,62 ± 0,19
Tireóide	0,56 ± 0,14	0,09 ± 0,04	0,18 ± 0,01	0,16 ± 0,06
Pata D	0,95 ± 0,11	0,39 ± 0,18	0,46 ± 0,09	0,15 ± 0,02

N = 10

Tabela 4.16 – Porcentagem da dose administrada/grama de tecido de IgG radioiodada por método indireto em camundongos normais

ÓRGÃO	% DOSE ADMINISTRADA/GRAMA			
	1 hora	4 horas	16 horas	24 horas
Coração	1,89 ± 0,69	0,43 ± 0,01	2,82 ± 0,48	0,61 ± 0,17
Pulmão	4,02 ± 1,33	1,65 ± 0,70	2,70 ± 0,40	0,87 ± 0,17
Estômago	0,74 ± 0,17	0,62 ± 0,19	1,09 ± 0,40	0,36 ± 0,18
Baço	17,94 ± 3,47	4,84 ± 0,26	3,88 ± 0,45	0,26 ± 0,08
Fígado	45,21 ± 3,06	4,90 ± 0,75	0,83 ± 0,10	0,23 ± 0,03
Rins	15,44 ± 4,21	8,06 ± 0,16	2,35 ± 0,92	1,23 ± 0,24
Intestino	2,31 ± 0,43	13,43 ± 2,50	1,10 ± 0,32	0,45 ± 0,17
Pata D	0,69 ± 0,14	0,27 ± 0,12	0,36 ± 0,11	0,08 ± 0,01

N = 10

Tabela 4.17 – Porcentagem da dose administrada/órgão de IgG radioiodada por método indireto em camundongos com foco de infecção

ÓRGÃO	% DOSE ADMINISTRADA/ÓRGÃO			
	1 hora	4 horas	16 horas	24 horas
Sangue Total	3,92 ± 0,89	1,35 ± 0,29	0,19 ± 0,05	0,24 ± 0,14
Coração	0,05 ± 0,02	0,37 ± 0,15	0,08 ± 0,04	0,06 ± 0,02
Pulmão	0,91 ± 0,18	0,69 ± 0,25	0,22 ± 0,07	0,10 ± 0,05
Estômago	0,21 ± 0,03	0,50 ± 0,14	0,04 ± 0,01	0,08 ± 0,01
Baço	1,67 ± 0,17	0,20 ± 0,05	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Fígado	37,13 ± 1,27	3,96 ± 0,94	0,54 ± 0,06	0,48 ± 0,03
Rins	12,13 ± 3,35	2,02 ± 0,53	0,30 ± 0,09	0,22 ± 0,19
Intestino	14,02 ± 2,24	18,51 ± 4,30	0,45 ± 0,17	0,32 ± 0,02
Tireóide	0,03 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,04	0,13 ± 0,05
Pata D	2,10 ± 0,27	5,04 ± 3,18	0,34 ± 0,12	0,18 ± 0,05
Pata E	0,55 ± 0,02	0,63 ± 0,14	0,17 ± 0,02	0,14 ± 0,03

N = 10

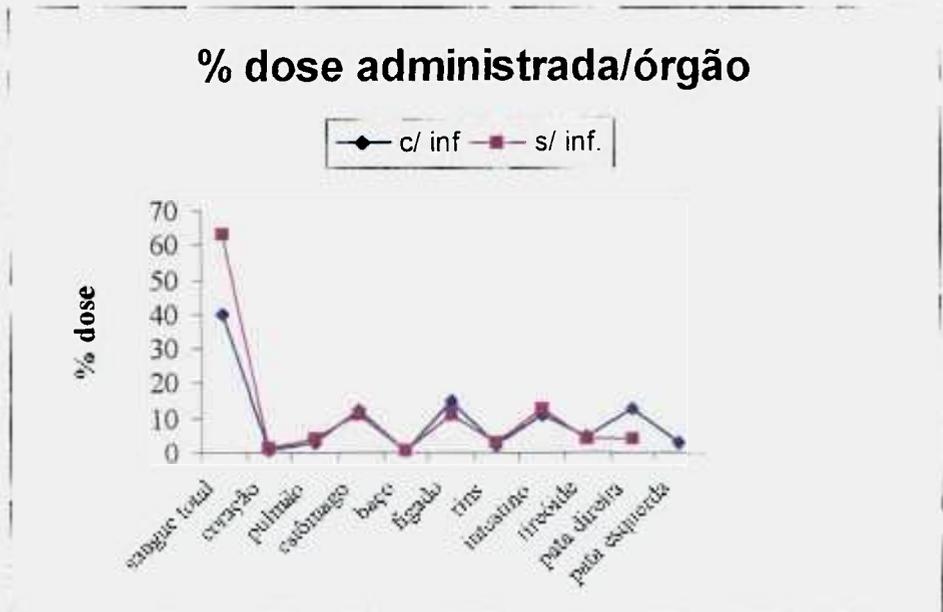
Tabela 4.18 – Porcentagem da dose administrada/grama de tecido de IgG radioiodada por método indireto em camundongos com foco de infecção

ÓRGÃO	% DOSE ADMINISTRADA/GRAMA			
	1 hora	4 horas	16 horas	24 horas
Coração	0,30 ± 0,12	3,21 ± 1,49	0,59 ± 0,21	0,14 ± 0,10
Pulmão	2,66 ± 0,66	3,97 ± 0,88	0,86 ± 0,16	0,40 ± 0,27
Estômago	0,34 ± 0,05	1,17 ± 0,13	0,07 ± 0,02	0,20 ± 0,01
Baço	11,54 ± 2,95	1,76 ± 0,60	0,27 ± 0,10	0,13 ± 0,08
Fígado	19,34 ± 3,12	8,19 ± 2,63	0,35 ± 0,04	0,40 ± 0,05
Rins	27,59 ± 8,43	7,39 ± 0,29	0,95 ± 0,28	0,41 ± 0,04
Intestino	3,74 ± 0,65	3,27 ± 0,91	0,15 ± 0,06	0,15 ± 0,01
Pata D	1,05 ± 0,12	2,60 ± 1,70	0,16 ± 0,03	0,09 ± 0,01
Pata E	0,30 ± 0,03	0,65 ± 0,19	0,17 ± 0,02	0,19 ± 0,01

N = 10

Os gráficos a seguir permitem comparar os resultados obtidos para os dois grupos de animais para um dado método de marcação (Figuras 11 e 12) bem como comparar os resultados obtidos para os dois métodos considerando-se animais com foco de infecção (Figura 13).

(a)



(b)



Figura 11 - % dose administrada/órgão para animais com e sem foco de infecção com IgG marcada por via direta: (a) 4 horas (b) 24 horas

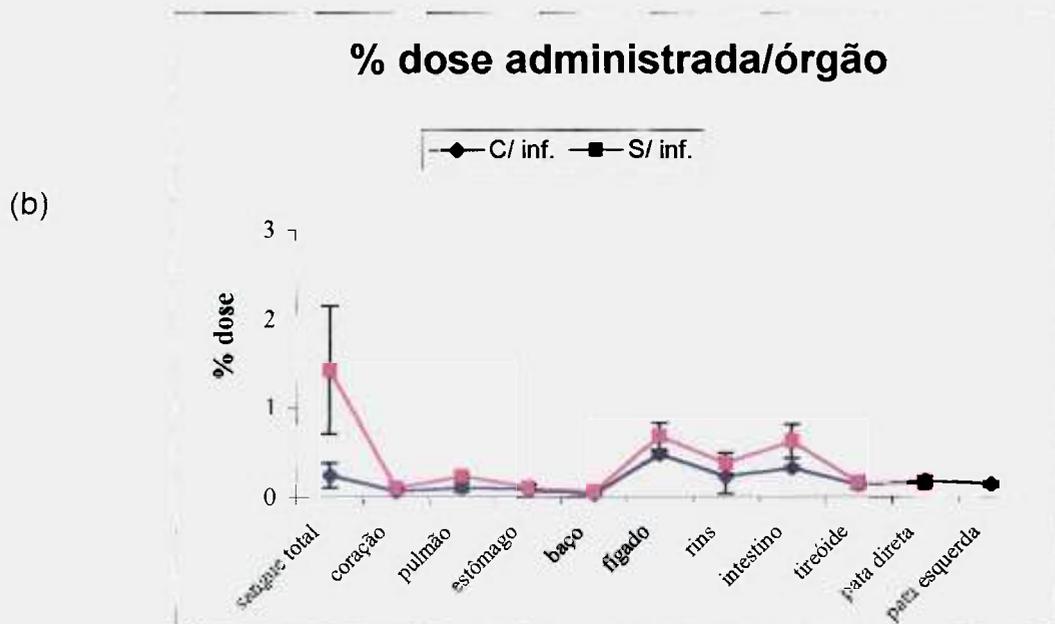
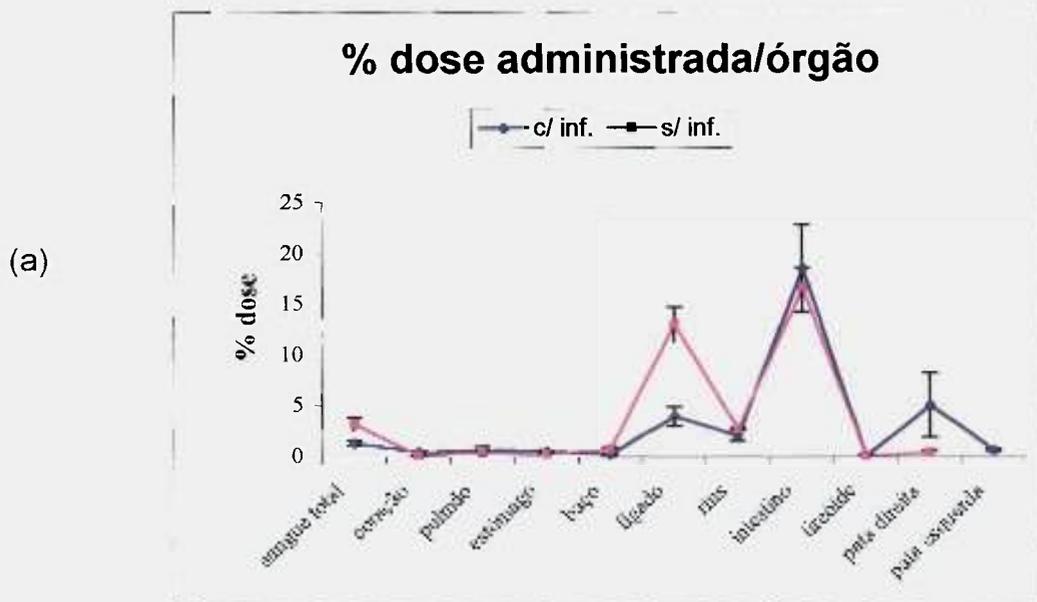
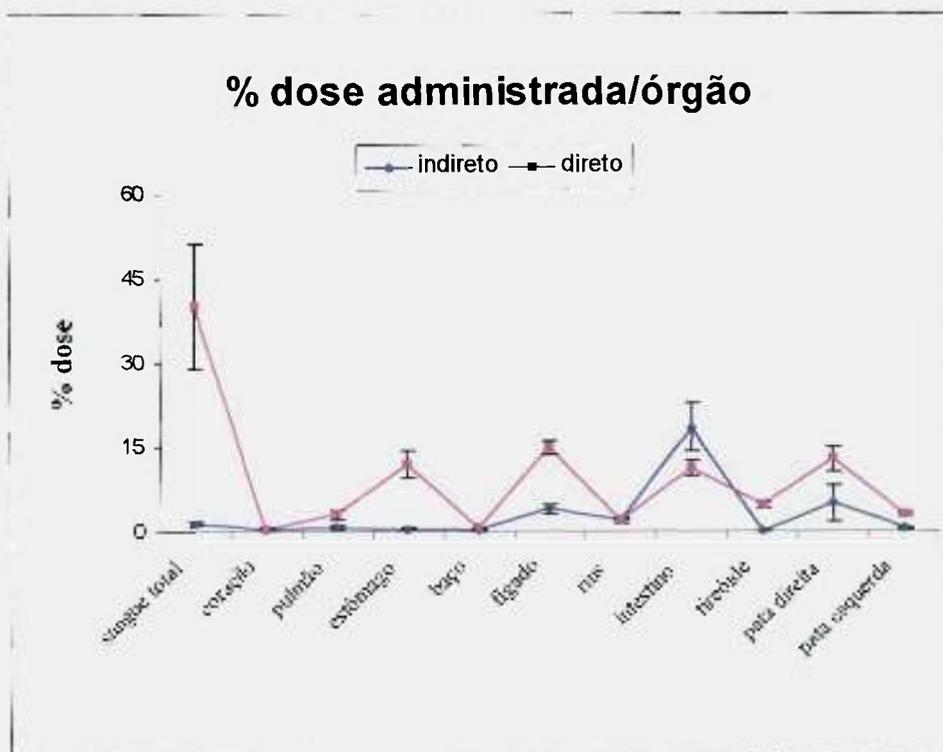
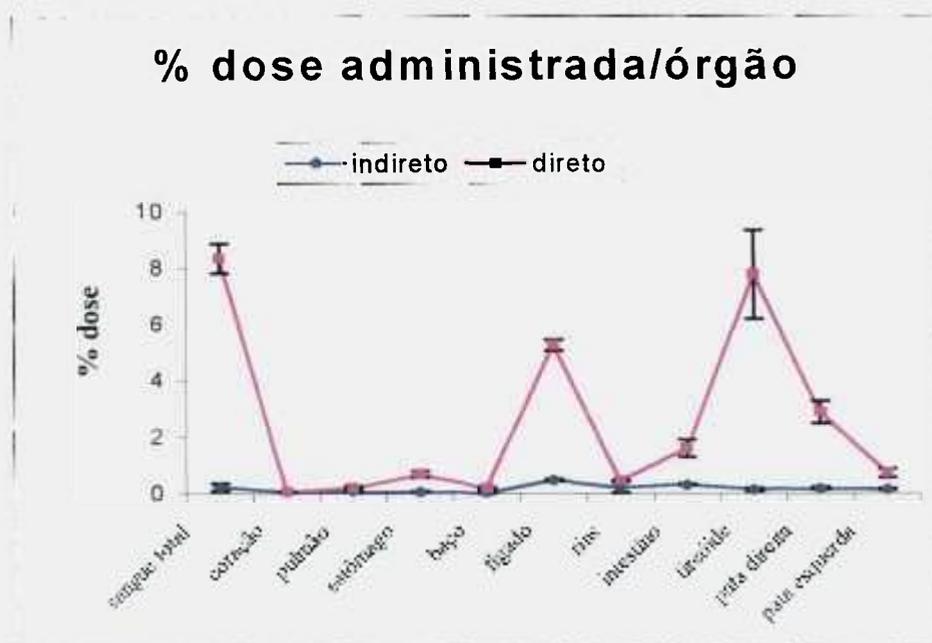


Figura 12 - % dose administrada/órgão para animais com e sem foco de infecção com IgG marcada por via indireta: (a) 4 horas (b) 24 horas

(a)



(b)



**Figura 13 - % dose administrada/órgão para animais com foco de infecção com IgG marcada por via direta e indireta (a) 4 horas (b) 24 horas**

## 5. DISCUSSÃO

Os estudos de marcação do ácido para-bromobenzóico com Iodo-131 (Fase I) foram baseados no trabalho de Moerlein<sup>28</sup> que investigou o uso da reação de substituição de bromo por iodo catalisada por cloreto de cobre, Cu (I), como técnica de radioiodação, originando produtos isentos de carregadores. Os autores desenvolveram a marcação de bromobenzeno e outros substratos bromados aromáticos de estrutura simples, para-bromo substituídos e otimizaram as condições de radiohalogenação considerando o tempo de reação, temperatura e concentração de CuCl. Avaliaram também o grau de ativação/desativação eletrônica de diferentes substituintes do anel.

De forma similar, no presente trabalho, foram otimizadas as condições de radioiodação para o ácido p-bromobenzóico em meio de DMSO utilizando-se <sup>131</sup>I.

Baseando-se nos resultados obtidos por Moerlien<sup>28</sup> que evidenciou uma relação sigmoideal crescente entre o aumento da temperatura e a porcentagem de iododebrominação obtida, foram estudadas três condições de temperaturas

empregando-se 60 minutos de reação e os melhores resultados foram obtidos utilizando-se 165 °C (Tabela 4.6). Com aquecimento de 175 °C, o rendimento da espécie de interesse decaiu significativamente, ao contrário do citado nos trabalhos de Moerlien<sup>28</sup> que observou apenas um declínio discreto, em 30 minutos de reação.

Como vários fatores influenciaram, de forma conjunta, no rendimento da reação, optou-se em analisar uma variável de cada vez, do protocolo de marcação e observar o grau de interferência do referido parâmetro no rendimento das marcações.

A interdependência entre os fatores foi identificada, quando se estudou a cinética de reação. Utilizando-se 175 °C, observou-se os melhores resultados após 30 minutos de reação, com queda expressiva no rendimento a partir de 45 minutos (Tabela 4.1). Entretanto, em temperatura de 165 °C, as melhores respostas são obtidas aos 60 minutos de reação (Tabela 4.2).

A influência da massa de cloreto de cobre no rendimento da reação também foi evidenciada. Moerlin<sup>28</sup> determinou uma relação ótima de CuCl/ácido p-bromobenzóico da ordem de  $10^{-2}$ , em reações conduzidas a 140 °C por 30 minutos. A mesma relação foi observada ao se utilizar a temperatura de 165 °C e 60 minutos de reação (Tabela 4.5). Convém ressaltar que, nestas condições, o rendimento radioquímico foi superior a 90% enquanto que nos estudos de Moerlin<sup>28</sup>, foi de cerca de 50% para a mesma relação de CuCl/ ácido p-bromobenzóico.

O rendimento radioquímico aumentou com o tempo de reação (Tabelas 4.3 e 4.4), para uma dada concentração de CuCl, sendo que os melhores valores foram observados quando utilizou-se 100  $\mu$ L de CuCl 0,01 M, e 60 minutos de reação a 165 °C (Tabela 4.4).

A análise dos perfis obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência das misturas reagentes em diferentes concentrações de CuCl evidenciaram a presença de espécies radioquímicas diversas, das quais a espécie com  $R_t = 3,8$  minutos foi identificada como sendo o radioiodo livre e a espécie radioquímica de interesse, o ácido p-radioiodobenzóico com  $R_t = 3,2$  minutos. Dois outros picos foram observados nos cromatogramas sob certas condições de marcação. Desta forma, o pico com  $R_t = 2,7$  minutos parece possuir correlação com o CuCl utilizado, presente somente em marcações com concentrações mais elevadas de CuCl. Quando o substrato de marcação (ácido p-bromobenzóico) foi omitido do meio reacional, o cromatograma de CLAE apresentou um pico bastante expressivo com  $R_t = 2,7$  minutos e outro com  $R_t = 3,8$  minutos.

Na Fase II da reação, que envolveu a conversão do ácido p-radioiodobenzóico no grupamento prostético do tipo benzoato de [ $^{131}$ I]iodo de N-succinimidila (SIB), a formação do éster desenvolveu-se de forma simples e rápida, utilizando-se TSTU em meio alcalino. A reação, entretanto, envolve o processo de purificação do ácido p-radioiodobenzóico. Pelo método de precipitação, o ácido p-radioiodobenzóico mostrou grau de pureza similar àquela observada em CLAE do

produto purificado em Sep-Pack. O método representa uma alternativa mais econômica, eliminando os custos envolvidos na aquisição de colunas de purificação e reduzindo o volume de solvente orgânico utilizado.

Por outro lado, a técnica que utiliza Sep-Pack conforme descrita por Pozzi<sup>31</sup> é a que promove menor perda do produto nos resíduos de purificação.

Na reação de formação do éster, originalmente empregada para obtenção do grupamento prostético marcado com  $^{18}\text{F}$ <sup>44,45</sup>, o rendimento radioquímico da espécie SIB foi garantido otimizando-se a concentração de NaOH empregada, sendo que os melhores resultados foram obtidos evaporando-se a solução de NaOH adicionada ao frasco de reação, antes da introdução do reagente TSTU permitindo supor que, a presença de água no meio reacional possa interferir de forma negativa no rendimento de formação do éster.

A utilização desta reação em procedimentos de obtenção do grupamento prostético fluorado<sup>44,45</sup> empregou tempo de reação de 2 minutos. O estudo da cinética da reação, de obtenção do derivado iodado demonstrou que um tempo superior a 5 minutos foi necessário para garantir um rendimento superior de formação do derivado radioiodado.

A purificação do grupo prostético radioiodado, utilizando-se coluna Sep-Pack de sílica eluída com mistura de hexano e acetato de etila, mostrou ser um método prático e eficaz de separação do ácido p-radioiodobenzóico remanescente

na mistura de reação, não havendo a necessidade de utilização de CLAE para promover a purificação (Figura 9).

Por outro lado, quando as reações foram conduzidas com ausência de água no meio reacional, a alta pureza radioquímica obtida para a espécie SIB permitiu a realização da fase subsequente de reação de acilação da proteína eliminando-se a etapa de purificação (Figura 10).

A Tabela 4.7 ilustra o rendimento de obtenção do ácido p-radioiodobenzóico purificado em vários procedimentos experimentais. Cerca de 65% do marcado foi obtido na forma pura (P1<sub>B</sub>), considerando-se o primeiro mL de acetonitrila utilizado na eluição da coluna. Cerca de 28% foi removido na fase aquosa, correspondendo esta fase, basicamente, ao radioiodo livre (P1<sub>A</sub>). A quantidade de radioatividade retida na coluna de purificação foi mínima (S1) bem como a quantidade aderida ao frasco de reação (R1), que não chegou a atingir 2% da radioatividade total. Na Fase I, como a pureza radioquímica, determinada por cromatografia em papel, foi da ordem de 80-90%, acredita-se que parte da radioatividade do ácido p-radioiodobenzóico tenha sido eluída na fração aquosa, juntamente com o radioiodo livre já que a estabilidade *in vitro* do composto foi atestada em estudos de CLAE realizados até 24 horas após a marcação.

Um estudo minucioso de CLAE realizado em microfrações de eluição da fase aquosa poderia estabelecer o volume ideal de água para eluição do radioiodo remanescente sem arraste significativo do ácido p-radioiodobenzóico.

A Tabela 4.8 sumariza o resultado de diversas marcações, considerando o rendimento da Fase II acumulado, ou seja, atribuindo a atividade inicial da Fase I (M1) igual a 100%. Tais resultados foram obtidos ao utilizar-se a solução de NaOH sem evaporação (meio aquoso) na mistura reacional.

Neste caso, conseguiu-se resgatar na fração de eluição P2<sub>B</sub>, cerca de 35% da atividade inicial na forma de SIB purificado. Em termos de rendimento da própria Fase II, esta porcentagem representa cerca de 53% (Tabela 4.9). O rendimento de recuperação da espécie é relativamente baixo, devido a perdas no processo de purificação identificadas, principalmente, no frasco residual (R2). A fração remanescente na coluna de purificação (S2), relaciona-se ao ácido p-radioiodobenzóico residual. Consideradas todas as perdas advindas dos dois processos de purificação, o rendimento líquido de obtenção do SIB ficou em torno de 35% da atividade inicial.

Ao evaporar-se a solução de NaOH do meio de reação, antes da introdução do TSTU na Fase II, o rendimento da espécie SIB passou para cerca de 98%, dispensando a etapa de purificação. Neste caso, o rendimento líquido final foi considerado próximo ao obtido na primeira fase de purificação, ou seja, cerca de 65% da atividade inicial M1, com uma pequena perda, devido a aderência final ao frasco de reação.

De qualquer forma, o método envolve várias etapas de transferências da mistura reagente, acarretando em perdas da atividade inicial. Entretanto, em um

sistema automatizado para transferência das fases as perdas talvez pudessem ser minimizadas.

A fase mais crítica, relacionada ao rendimento de marcação, referiu-se à reação de acilação entre o grupamento prostético radioiodado e a proteína (IgG humano).

Estudos preliminares utilizando-se grupamento prostético do tipo SIB na marcação de proteínas apontaram como fatores importantes da marcação o pH, que deve estar em torno de 8,5, e a massa de proteína (entre 200 e 1000  $\mu\text{g}$ )<sup>51</sup>.

No presente estudo de marcação de IgG utilizando-se SIB radioiodado, não obstante a análise de todos os parâmetros envolvidos, a pureza radioquímica da proteína marcada não foi superior a cerca de 20%. Após purificação em coluna Sephadex, os rendimentos em relação a radioatividade inicial ficaram em torno de 10%.

Os estudos relatam rendimentos variando de 33 a aproximadamente 60% para marcação de anticorpos utilizando-se grupamento SIB radioiodado advindo da radioiodação do derivado butil estanilado (ATE)<sup>51</sup>.

No experimento, a maior parte da radioatividade de SIB ficou retida no frasco de reação. Partindo-se da premissa, de disponibilizar o reagente aderido ao

tubo de reação, supondo-se ser este o motivo do baixo rendimento, utilizou-se várias misturas de solventes e, em nenhum dos casos, ocorreu melhora significativa do rendimento de marcação.

Foram feitas algumas marcações, não descritas no corpo deste trabalho, utilizando-se amostras do peptídeo Octreotide (Sandoz) derivado da Somatostatina. Os estudos demonstraram o deslocamento do grupo SIB da matriz de polietileno do tubo e subsequente incorporação na molécula de peptídeo, com pureza radioquímica atestada em CLAE da ordem de 87%.

Tais resultados permitem supor que o grupamento prostético do tipo SIB preparado parece ser mais efetivo para marcação de peptídeos. Talvez a estrutura tridimensional do anticorpo dificulte a reação de acilação que ocorre entre o grupamento éster do SIB e amino grupos livres da proteína.

Mesmo não sendo a proteína IgG, o modelo ideal para se estudar o acoplamento com o grupamento prostético SIB, o propósito do trabalho utilizando-se esta via alternativa foi alcançado, conforme demonstrado pelos resultados obtidos nas Fases I e II da marcação.

Com a proteína marcada pelo método indireto, ainda que com baixo rendimento, tornou-se possível realizar os estudos de distribuição biológica em animais de laboratório, de modo a estabelecer comparações com o método direto.

Os resultados dos estudos de distribuição biológica da IgG marcada permitiram analisar, de forma comparativa, as vantagens relacionadas à radioiodação da proteína utilizando-se grupamento prostético. Nos dados apresentados, observou-se que a proteína radiomarcada por via indireta apresenta clareamento sangüíneo mais rápido, assim como pico de acúmulo mais rápido no local de infecção, além de captação desprezível pela glândula tireóide, o órgão com maior avidéz pelo radioiodo livre<sup>13,51</sup> particularmente nos tempos mais tardios.

Para os animais normais que receberam IgG marcada por via direta, os estudos demonstraram que após 24 horas da administração da dose, cerca de 35% da mesma ainda permanecia no sangue circulante. Tal fato, associado às captações observadas na glândula tireóide, estômago e fígado, sugerem a liberação de radioiodo da molécula de IgG com subsequente incorporação pela glândula tireóide.

Paralelamente, observa-se captação expressiva pelo fígado e trato gastrointestinal nos animais normais e lesados até 16 horas.

A marcação de proteínas por via direta, com incorporação do radioiodo nos resíduos de tirosina das proteínas favorece a ação de enzimas dehalogenadoras que agem, provavelmente, em função da similaridade apresentada entre o resíduo de tirosina radioiodado e o hormônio da tireóide<sup>51</sup>. A captação máxima no foco de infecção foi observada no tempo de 16 horas, atingindo cerca de 16% da dose administrada (Tabela 4.13). Ao analisar-se este valor, aparentemente alto, deve-se levar em conta a alta captação sangüínea residual de cerca de 36% da dose

administrada para o mesmo tempo considerado. A relação entre órgão alvo/sangue é, neste caso de 0,46 (16,86/36,61).

A afinidade do radiofármaco pela lesão pode ser verificada pela diferença de radioatividade entre as patas. Na primeira hora, a captação da pata lesada acha-se 2,7 vezes superior à pata normal. Esta razão aumenta para cerca de 5,0 após 16 horas.

A marcação utilizando-se grupamento prostético SIB, com incorporação do radioiodo no resíduo de lisina, melhora as características de estabilidade *in vivo* da proteína, (Tabelas 4.15 e 4.17) . Desta forma, a captação na glândula tireóide e no estômago são significativamente menor que no método direto ( $P < 0,01$ ) e o clareamento sangüíneo do composto é mais rápido, sendo cerca de 1,4% da dose administrada após 24 horas. A porcentagem máxima no foco de infecção foi de cerca de 5% observada após 4 horas da administração da dose. A captação no foco de infecção comprova que as propriedades da proteína foram preservadas após a marcação, pelo menos em parte. Além disso, quando esta captação, aparentemente baixa é convertida em razão órgão alvo/sangue ( $5,04/1,36 = 3,70$ ) demonstra apresentar melhores qualidades para aquisição de imagens cintilográficas e a um tempo mais curto após a administração da dose, se comparado à IgG marcada por via direta.

Apesar da captação da lesão ser superior no método direto quando comparada ao indireto para o tempo de 16 horas, neste último caso, acha-se livre

dos interferentes adjacentes, excetuando-se o intestino que ocupa uma área relativamente grande do abdome, com nível elevado da dose em 4 horas ( $18,51 \pm 4,30\%$ ). Entretanto, existe uma faixa de 12 horas entre 4 e 16 horas, intervalo suficiente para a radiação do intestino tornar-se praticamente nula.

A diferença de radioatividade entre as patas pode ser identificada, sendo que a captação na pata lesada é 8 vezes maior que na pata normal para o tempo de 4 horas.

O clareamento sangüíneo mais rápido, associado à depuração mais rápida de todos os órgãos avaliados, colabora ainda para melhorar as características de dosimetria, já que órgãos importantes como fígado e rins, além dos já mencionados como tireóide e estômago recebem menor porcentagem da atividade e, conseqüentemente, menor dose de radiação.

Os gráficos apresentados nas Figuras 11 e 12 (direto, com e sem foco infeção e indireto com e sem foco), demonstram que para um dado método de marcação, os perfis de distribuição dos dois grupos de animais são similares.

No gráfico que compara o perfil de distribuição do método direto e indireto para animais com foco de infecção (Figura 13), destacam-se as captações do fígado e intestino para o tempo de 4 horas no método indireto sendo que todos os órgãos apresentaram captação baixa para o tempo de 24 horas. No caso dos

animais que receberam IgG marcada por via direta, as captações mais significativas correspondem ao estômago, fígado, intestino e tireóide para o tempo de 4 horas com valores ainda consideráveis para o tempo de 24 horas.

A proposta final deste trabalho consistiu em avaliar a possibilidade de obtenção do grupamento prostético radioiodado benzoato de [ $^{131}\text{I}$ ]iodo de N-succinimidila (SIB) para marcação de proteínas, utilizando-se, para tanto, método alternativo que não empregasse a síntese de derivados butil estanosos. Todos os objetivos do protocolo de marcação foram detalhadamente investigados.

A rota alternativa proposta, foi desenvolvida na própria instalação de Radiofarmácia. Já o método de obtenção do SIB a partir de derivados tributil estanosos <sup>51</sup>, prevê a síntese do derivado com várias etapas de reação, necessitando de infra-estrutura apropriada para síntese química, purificação e caracterização final do composto sintetizado. Além disso, o derivado butil estanilado apresenta estabilidade reduzida devendo ser acondicionado à baixa temperatura (<- 20 °C) e atmosfera de gás inerte.

A marcação do grupamento prostético butil estanilado com radioiodo e seu acoplamento à proteína também envolve etapas de purificação imprescindíveis para obtenção da proteína radiomarcada isenta de impurezas radioquímicas e com alta atividade específica<sup>51</sup>.

O método alternativo empregado neste trabalho representa a possibilidade de produção do grupamento prostético SIB radioiodado para marcação de proteína, no momento de sua utilização. O emprego deste método na rotina de obtenção de proteínas marcadas com radioiodo, particularmente utilizando-se  $^{123}\text{I}$ , está condicionado à melhoria da fase de purificação que deverá ser planejada de modo a facilitar as transferências, economizando tempo do processo e minimizando perdas.

Além disso, um aspecto também importante a ser considerado na marcação de um peptídeo de interesse é a obtenção de um produto com alta atividade específica. Para tanto, estudos adicionais envolvendo a determinação da massa ideal do peptídeo a ser utilizado bem como o método ideal de purificação da proteína marcada deverão ser realizados para o peptídeo em questão.

A metodologia empregada de marcação de proteínas por método indireto parece representar uma alternativa interessante para marcação de proteínas, particularmente de peptídeos, representando não somente a possibilidade de radioiodação de moléculas proteicas que não apresentam resíduos de tirosina, mas também, uma alternativa viável para a obtenção de proteínas radioiodadas com estabilidade *in vivo*.

## 6. CONCLUSÕES

1. O presente trabalho promoveu a síntese radioquímica do grupamento prostético radioiodado do tipo Benzoato de Iodo de Succinimidila (SIB).
2. A primeira fase da reação possibilitou a obtenção do ácido p-radioiodobenzóico com alta pureza radioquímica após a investigação de diferentes parâmetros de marcação.
3. A segunda fase da reação foi quantitativa, produzindo o derivado SIB com rendimento satisfatório.
4. Apesar da incorporação do grupo SIB radioiodado à IgG humana apresentar baixo rendimento, o modelo proteico escolhido permitiu estudar características de viabilidade e estabilidade *in vivo* da proteína radiomarcada pelo método indireto.
5. Comparativamente à proteína marcada por método direto, a proteína radiomarcada utilizando SIB apresentou depuração sangüínea mais rápida e captação na glândula tireóide e estômago significativamente menores ( $P < 0,01$ ),

indicando estabilidade *in vivo* frente a processos de desalogenação enzimática. A proteína radiomarcada aparentemente preservou a afinidade pelo foco de infecção.

6. O método estudado apresenta potencialidade para uso na marcação futura de peptídeos de interesse sendo que, estudos adicionais deverão ser conduzidos, para automatização das etapas de purificação e transferência envolvidas, de modo a minimizar perdas da radioatividade nos resíduos de purificação das diferentes etapas e reduzir o tempo de processo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALTMAN, P.; DITTIMER, D. Blood and other body fluids. ***Biological Hand Books***. Federation of American Society for Experimental Biology, Washington, D.C., p. 1-19 apud ARAÚJO, E.B. ***Conjuntos de reativos liofilizados de compostos diaminoditiólicos para marcação com tecnecio-99m. Estudos farmacocinético e elaboração de modelos compartimentalizados dos respectivos complexos***. 1995. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
2. ARANO, Y.; WAKISAKA, K.; MUKAI, T.; UEZONO, T.; MOTONARI, H.; AKIZAWA, H.; KAIRIYAMA, C.; OHMOMO, Y.; TANAKA, C.; ISHIYAMA, M.; SAKAHARA, H.; KONISHI, J.; YOKOYAMA, A. Stability of a metabolizable ester bond in radioimmunoconjugates. ***Nucl. Med. Biol.***, v. 23, p. 129-136, 1996.
3. ARCAL XV. Producción y control de calidad de radiofármacos. ***Manual de buenas prácticas radiopharmacéuticas***. OIEA, 1999.
4. BAILEY, G.S. Proteins. In SLATER, R.J. ***Radioisotopes in biology***. New York, N.Y.: Oxford – Univ. Pr., 1990. p. 191-202.
5. BEHR, T. M.; JENNER, N.; BÉHÉ, M.; ANGERTEINS, C.; GRATZ, S.; RAUE, F.; BECKER, W. Radiolabeled peptides for targeting cholecystokinin-B/gastrin receptor-expressing tumors. ***J. Nucl. Med.***, v.40, p. 1029-1044, 1999.
6. BILLINGTON, D.; JAYSON, G. G.; MALTBY, P.J. ***Radioisotopes***. Oxford-BIOS Scientific, 1992, p. 123.

7. BLOK, D.; FEITSMA, R.I.J.; VERMEIJ, P.; PAUWELS, E.J.K. Peptide radiopharmaceuticals in nuclear medicine. *Eur J. Nucl Med.*, v. 26, p. 1511-1519, 1999.
8. BOERMAN, O C., LAVERMAN P., OYEN W. J. G. CORSTENS F. H. M., STORM G. Radiolabeled liposomes for scintigraphic imaging. *Progress in Lipid Research*, v. 39, p. 461-475, 2000.
9. 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.
10. CHANDRA, RAMESH. *Introductory physics of nuclear medicine*. 4<sup>Th</sup> ed. Philadelphia-Lea and Febiger 1992, p. 55-67.
11. COLE, W.C.; DeNARDO, S.J.; MEARES, C.F.; MCCALL, M.J.; DeNARDO, G.L.; EPSTEIN, A.L.; O'BRIEN, H.A.; MOI, M.K. Comparative serum stability of radiochelates for antibody radiopharmaceuticals. *J. Nucl. Med.*, v.28, p. 83-90, 1987.
12. EARLY, J.F.; KROHN, K.A.; KISHORE, R.; NELP, W. Radiochemistry of halogenated antibodies. In antibodies in radiodiagnosis and therapy. Ed. Zalutsky M.R. CRC Press, Boca Raton, FL, 1989, p.83 -102,
13. FREITAS, J.E.; GROSS, M.D.; RIPLEY, S.; SHARIPO, S. Radionuclide diagnosis and therapy of thyroid cancer: current status report. *Semin. Nucl. Med.*, v. 15, p. 106, 1985.
14. FREUD, A.; CANFI, A.; ZAFRAN, M. A convenient synthesis of N-succinimidyl-3-iodo[<sup>125</sup>I]benzoate, a reagent for protein iodination. *Nucl. Med. Biol.*, v. 19, n. 6, p. 703-704,1992

15. GARG, P.K.; SLADE, S.K.; HARRISON, C.L.; ZALUTSKY, M.R. Labeling proteins using aryl iodide acylation agents: influence of meta vs para substitution on in vivo stability. *Nucl. Med. Biol.*, v. 16, n. 7, p. 669-673, 1989.
16. GARG, P.K.; ARCHER JR.G.E.; BIGNER, D.D.; ZALUTSKY, M.R. Synthesis of radioiodinated N-succinimidyl iodobenzoate: optimization for use in antibody labelling. *Appl. Radiat. Isot.*, v. 40, n. 6, p. 485-90, 1989.
17. GARG, S.; GARG, P.K.; ZHAO, XIAO-G.; FRIEDMAN, H.S.; BIGNER, D.D.; ZALUTSKY, M.R. Radioiodination of a monoclonal antibody using N-succinimidyl 5-iodo-3pyridinecarboxylate. *Nucl. Med. Biol.*, v. 20, n. 7, p.835-842, 1993.
18. GRANIER, R.; GAMBINI, DENIS-J. *Applied radiation biology and protection*. New York: Ellis Horwood, 1990:355p.
19. KASSIS, A.I.; JONES, P.L.; MATAKA, K.Z.; ADELSTEIN, J. Antibody-dependent signal amplification in tumor xenografts after pretreatment with biotinylated monoclonal antibody and avidin or streptavidin. *J. Nucl. Med.*, v.37, p. 343-352, 1996.
20. KOWALSKY, R.J.; PERRY, J.R. *Radiopharmaceuticals in nuclear medicine practice*. Norwalk, conn: Appleton & Lange, 1987.
21. KOZIOROWSKI, J.; HENSSEN, C.; WEINREICH, R. A new convenient route to radioiodinated N-succinimidyl 3- and 4-iodobenzoate, two reagents for radioiodination of proteins. *Appl. Radiat. Isot.*, v. 49, n. 8, p. 955-959,1998.

22. 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.
23. LARSON, S.M.; CARRASQUILLO, J.A. Advantages of radioiodine over radioindium labeled monoclonal antibodies for imaging solid tumors. **Nucl. Med. Biol.**, v. 15, p. 231, 1988.
24. LARSON, S.M. Improved tumor targeting with radiolabeled, recombinant single-chain, antigen binding protein. **J Natl. Cancer Inst.**, v. 82, p. 1173-1174, 1990.
25. LINDEGREN, S.; SKARNEMARK, G.; JACOBSSON, L.; KARLSSON, B. Chloramine-T in High-Specific-Activity Radioiodination of Antibodies Using *N*-succinimidyl-3-(trimethylstannyl) benzoate as an Intermediate. **Nucl. Med. Biol.**, v. 25, p. 659-665, 1998.
26. MCAFEE, J.G.; NEUMANN, R.D. Radiolabeled Peptides and Other Ligands for Receptors Overexpressed in Tumor Cells for Imaging Neoplasms. **Nucl. Med. Biol.**, v. 23, p. 673-676, 1996.
27. MILENIC, D.E.; YOKOTA, T.; FILPULA, D.R. Construction, binding properties, metabolism and tumor penetration of a single-chain Fv derived from pancarcinoma monoclonal antibody CC49. **Cancer Res.**, v. 51, p. 6363-6371, 1991.
28. MOERLIN, S.M. Regioespecific aromatic radioiodination via n.c.a. copper (I) assisted iododebromination. **Radiochimica Acta**, v. 50, p. 55-61, 1990.

29. OKARVI, S.M. Recent developments in <sup>99</sup>Tcm-labelled peptide-based radiopharmaceuticals: An overview. **Nucl. Med. Comm.**, v. 20, p. 1093-1112, 1999.
30. OWUNWANNE, A.; PATEL, M.; SADEK, S. **The handbook of radiopharmaceuticals**. London: Chapman & Hall Medical, 1995.
31. POZZI, O R. Iodine 123 labeled Vasoactive Intestinal Peptide (VIP): Optimization of the radioiodination method, in vivo and in vitro assays. In: FINAL RESEARCH CO-ORDINATION MEETING ON OPTIMIZATION OF SYNTHESIS AND QUALITY CONTROL PROCEDURES FOR THE PREPARATION OF F-18 AND I-123 LABELED PEPTIDES, 30 october - 3 november, 2000, Shanghai. **Proceedings...** Vienna:IAEA [s.d.].
32. RADERER, M. Comparison of Iodine-123-Vasoactive intestinal peptide receptor scintigraphy and Indium-111-CYT-103 immunoscintigraphy. **J.Nucl.Med.**, v. 37, p. 1480-1487, 1996.
33. REUBI, J.C. In vitro identification of vasoactive intestinal peptide receptors in human tumors: implications for tumor imaging **J.Nucl.Med.**, v. 36, p. 1846-1853, 1995.
34. SAHA, G.B. **Fundamentals of nuclear pharmacy**. Cleveland: Springer-Verlag, Third Edition, 1992.
35. SALACINSKY, P.R.P. Iodination of proteins, glycoproteins and peptides using a solid-phase oxidizing agente, 1,3,4,6-Tetrachloro-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diphenyl glycoluril (Iodogen). **Analytical Biochemistry**, v. 117, p. 136-146, 1981.

36. SANTIMARIA, M., BLOCK, D., FEITSMA, R. I. J., MAZZI, U.; PAUWELS, E. K. J. Experiments on a new phosphine-peptide chelator for labelling of peptides with Tc-99m. **Nucl. Med. Biol.**, v. 26, p. 251-258, 1999.
37. SEEVERS, R.H.; COUNSELL, R.E. Radioiodination techniques for small organic molecules. **Chem. Rev.**, v. 82, p. 575-590, 1982.
38. SERAFINI, A.N. From monoclonal antibodies to peptides and molecular recognition units: An overview. **J. Nucl. Med.**, v. 34, p. 533-536, 1993.
39. STOCKLIN, G.; WESTER, H.J. Strategies for radioligand development I: peptides for tumor targeting. *Kluwer academic publishers*, in press.
40. ÜNAK, T. Recent advances in medical radionuclide production and future perspective of compact medical cyclotrons. **Progress Nucl. Energy.**, v. 37, n. 1-4, p. 333-337, 2000.
41. ÜNAK, T.; AKGÜN, Z.; YILDRIM, Y.; DUMAN, Y.; ERENEL, G. Self-radioiodination of iodogen. **Appl. Radiat. Isot.**, v. 54, p. 749-752, 2001.
42. VAN DER LAKEN, C.J.; BOERMAN, O.C.; OYEN, W.J.G.; VAN DE VEM, M.T.P.; VAN DER MEER, J.W.M.; CORSTENS, F.H.M. Scintigraphic detection of infection and inflammation: new developments with special emphasis on receptor interaction. **Eur J Nucl Med.**, v. 25, p. 535-546, 1998.
43. VIRGOLINI, I.; RADERER, M.; KURTARAN, A.; ANGELBERGER, P.; BANYAI, S.; WANG, Q.; SHUREN, L.; BANYAI, M.; PIDLICH, J.; NEIDERLE, B.; SCEITHAUER, W.; VALENT, P. Vasoactive intestinal peptide-receptor imaging for the localization of intestinal adenocarcinomas and endocrine tumors. **N. Engl. J. Med.** v. 331, p. 1116-1121, 1994.

44. WESTER, H.J.; KRUMMEICH, C.; FIXMANN, A. 18-F and 131-I-labeling of the octadecapeptide Apamin: a selective blocker of the Ca<sup>2+</sup> dependent K<sup>+</sup> channels. Synthesis and in vivo evaluation in NMRI mice. **J.Label.Compds.Radiopharm.**, v. 37, p. 513-515, 1995.
45. WESTER, H.J.; HAMACHER, K.; STÖCKLIN, G. A comparative study of n.c.a. fluorine-18 labeling of proteins via acylation and photochemical conjugation. **Nucl. Med. biol.**, v. 23, p. 365-372, 1996.
46. WILBUR, D.S.; HADLEY, S.W.; HYLARIDES, M.D.; ABRAMS, 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, p. 216-226, 1989.
47. 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.
48. WOOD, F.T.; WU, M.M.; GERHART, J.C. The radioactive labeling of proteins with na iodinated amidination reagent. **Anal. Biochem.**, v. 69, p. 339-349, 1975.
49. YOKOTA, T.; MILENIC, D.E.; WHITLOW, M. Rapid tumor penetration of a single chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. **Cancer Res.**, v. 52, p. 3402-3408, 1992.
50. YOKOTA, T.; MILENIC, D.E.; WHITLOW, M. Quantitative autoradiographic studies of tumor penetration of a single-chain Fv (sFv), Fab', F(ab'')<sub>2</sub>, and

intact monoclonal IgG [Abstract] *Proc. Annu. Meet. Assoc. Cancer Res.*  
V. 33, p. 2044, 1992.

51. 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.