



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**MARCAÇÃO DO PEPTÍDEO INTESTINAL VASOATIVO (VIP)  
E DO FRAGMENTO VIP10-28 COM RADIOIODO POR  
MÉTODO DIRETO. ESTUDO COMPARATIVO DA CINÉTICA  
DE BIODISTRIBUIÇÃO E DA AFINIDADE POR  
CÉLULAS DE TUMOR NEUROENDÓCRINO**

**MARIA TEREZA COLTURATO**

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

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

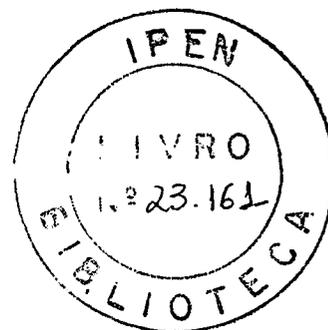
**São Paulo  
2005**

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**

**Autarquia associada à Universidade de São Paulo**

**MARCAÇÃO DO PEPTÍDEO INTESTINAL VASOATIVO (VIP)  
E DO FRAGMENTO VIP10-28 COM RADIOIODO POR  
MÉTODO DIRETO. ESTUDO COMPARATIVO DA CINÉTICA  
DE BIODISTRIBUIÇÃO E DA AFINIDADE POR  
CÉLULAS DE TUMOR NEUROENDÓCRINO**

**MARIA TEREZA COLTURATO**



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

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

**SÃO PAULO**

**2005**

*Aos Pais Celestes  
pelo Amor e Doação Universal*

*Aos Pais Terrenos  
pela oportunidade da Vida, Aprendizado e Conduta*

*Aos Irmãos, Cunhados e Sobrinhos  
pelo Carinho e Torcida,*

*À Sonia e Elaine,  
pela Amizade e Fortaleza*

## AGRADECIMENTOS

- ❖ Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN) nas pessoas do Superintendente Dr. Claudio Rodrigues e Dr. Edson Roman Diretor de Projetos Especiais.
- ❖ À Dra. Constanca Pagano Gonçalves da Silva, assessora técnica do Superintendente, quando gerente do Centro de Radiofarmácia, pela oportunidade concedida.
- ❖ Ao Msc. Jair Mengatti, gerente do Centro de Radiofarmácia (CR), pela oportunidade e facilidades concedidas.
- ❖ À Dra. Elaine Bortoleti de Araújo, gerente adjunta para Garantia da Qualidade do CR, pela orientação, apoio e sugestões no decorrer desta tese.
- ❖ Ao Dr. João Alberto Osso Junior, chefe da Divisão de Produção do CR, pelo apoio e sugestões dadas na elaboração das análises realizadas com os produtos.
- ❖ À farmacêutica Neuza Taeko Okasaki Fukumori, chefe da Divisão de Controle da Qualidade do CR, pelas facilidades oferecidas.
- ❖ À Dra. Emiko Muramoto, pelo apoio e colaboração fornecida na realização da distribuição biológica dos produtos e, sugestões dadas na fase de narração deste trabalho.
- ❖ Às pesquisadoras e técnicos do grupo de Moléculas Marcadas da Divisão de Produção do CR, pela colaboração no transcorrer deste trabalho.
- ❖ Ao técnico Renato Brito, funcionário do grupo de Sistema da Qualidade do CR, pelo apoio na obtenção das figuras deste trabalho.

- ❖ Aos demais pesquisadores, técnicos, bolsistas e secretárias do Centro de Radiofarmácia que apoiaram durante a realização deste trabalho.
- ❖ À Dra. Nilda Petrona Sosa de Pereira, quando chefe da Divisão de Garantia da Qualidade do CR, pelas facilidades oferecidas.
- ❖ Ao Centro de Medicina Nuclear (CMN), na pessoa da pesquisadora Miriam Roseli Yoshie Okamoto, pela colaboração prestada na realização das imagens cintilográficas deste trabalho.
- ❖ À técnica, Neide Ferreira Mascarenhas, funcionária do Biotério do Centro de Biologia Molecular (CBM), à colaboração realizada com o fornecimento dos animais de laboratório utilizados no decorrer deste trabalho.
- ❖ À Dra. Kayo Okazaki e Msc. Miriam Fussa Suzuki, funcionárias do Laboratório de Cultura Celular do CBM, pela manutenção das células de adenocarcinoma de cólon retal humano (HT-29) e contribuição na elaboração deste trabalho.
- ❖ Ao Prof. Dr. José Alexandre M. Barbuto do Laboratório de Imunologia de Tumores do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da USP e equipe, pelos esforços realizados com a manutenção das células de adenocarcinoma de cólon retal humano (HT-29).
- ❖ A Divisão de Ensino do IPEN pela atenção e dedicação na operacionalização da documentação necessária deste trabalho.

**MARCAÇÃO DO PEPTÍDEO INTESTINAL VASOATIVO (VIP) E DO  
FRAGMENTO VIP10-28 COM RADIOIODO POR MÉTODO DIRETO.  
ESTUDO COMPARATIVO DA CINÉTICA DE BIODISTRIBUIÇÃO E DA  
AFINIDADE POR CÉLULAS DE TUMOR NEUROENDÓCRINO**

**Maria Tereza Colturato**

**RESUMO**

Com o avanço da Medicina Nuclear, inúmeros radiofármacos baseados em proteínas vem sendo desenvolvido nos últimos anos primeiramente com o uso de anticorpos monoclonais e, mais recentemente, com o emprego de peptídeos naturais biologicamente ativos ou análogos sintéticos destes peptídeos. Na busca por agentes com especificidade pelo tecido alvo, na detecção de tumores, verificou-se que seqüências pequenas de aminoácidos podem ligar-se a sítios seletivos distribuindo-se mais uniformemente, penetrando mais rapidamente nos tecidos e clareando mais rapidamente da circulação que os anticorpos. Dentre os peptídeos destinados ao diagnóstico de tumores o Peptídeo Intestinal Vasoativo (VIP) tem sido estudado. O VIP marcado com iodo-123 é utilizado na obtenção de imagens e localização de adenocarcinomas intestinais e tumores endócrinos. A molécula de VIP contém dois resíduos de tirosina, nas posições 10 e 22 que são, teoricamente, igualmente susceptíveis à radioiodação por método direto. O objetivo deste trabalho é a obtenção do VIP marcado com radioiodo (iodo-123), de modo a oferecer à classe médica brasileira este radiofármaco de interesse para o diagnóstico e estadiamento de tumores que expressam receptores específicos. De forma inédita, o trabalho pretendeu ainda marcar e comparar a cinética de distribuição de um fragmento do VIP (VIP10-28) e verificar seu potencial como radiofármaco na identificação de tumores que expressam receptores para VIP. Após a escolha da técnica adequada para marcação do VIP e VIP10-28 com radioiodo, que utilizou Cloramina T como agente oxidante e

metabissulfato de sódio com o agente redutor, foram realizados os controles de qualidade (método eletroforético e cromatografia líquida de alta eficiência, CLAE) para determinação da pureza radioquímica como também da separação das espécies radioquímicas obtidas nas marcações. As técnicas empregadas tanto para a marcação como para o controle de qualidade, demonstraram ser eficientes e precisas. O VIP-<sup>131</sup>I e VIP10-28-<sup>131</sup>I foram obtidos com alta pureza radioquímica (> 95%). Os estudos de purificação para separação do radioiodo livre na marcação (purificação simples) e para obtenção de um radiofármaco com alta atividade específica (purificação composta e CLAE), demonstraram eficiência na separação das espécies envolvidas em cada ensaio, comprovadas pelos métodos de controle de qualidade. Estudos de distribuição biológica foram realizados, injetando-se os radiofármacos por via endovenosa em animais de laboratório: estudo de biodistribuição do VIP-<sup>131</sup>I e VIP10-28-<sup>131</sup>I em camundongos *Swiss* normais, do VIP-<sup>131</sup>I não purificado e purificado em camundongos *Swiss* com tumor e do VIP-<sup>131</sup>I e do VIP10-28-<sup>131</sup>I em camundongos *Nude* com tumor, cintilografia do VIP-<sup>131/123</sup>I e do VIP10-28-<sup>123</sup>I em camundongos *Swiss* e *Nude* e ratos *Wistar* com tumor. Foram realizados estudos *in vitro* para determinação da porcentagem de ligação do VIP-<sup>131</sup>I e VIP10-28-<sup>131</sup>I às proteínas plasmáticas, estudo da determinação da estabilidade do VIP-<sup>131</sup>I e VIP10-28-<sup>131</sup>I em plasma humano e ensaio de internalização do VIP-<sup>131</sup>I e VIP10-28-<sup>131</sup>I com células de adenocarcinoma de cólon retal humano (HT-29). Todos os estudos de distribuição biológica demonstraram que tanto o VIP-<sup>131/123</sup>I como o VIP10-28-<sup>131/123</sup>I apresentaram clareamento sanguíneo rápido, baixa captação renal e hepática, relativa captação na tireóide mostrando dehalogenação *in vivo* e boa captação tumoral. Comparando-se a distribuição biológica dos radiofármacos conclui-se que ambos apresentaram elevada captação no estômago. O fragmento, por apresentar clareamento sanguíneo mais lento do que o peptídeo íntegro, apresentou deficiência na visualização da massa tumoral. Os radiofármacos, VIP-<sup>123</sup>I e VIP10-28-<sup>123</sup>I, foram obtidos com alta pureza radioquímica, porém o rendimento de marcação ficou muito abaixo dos rendimentos obtidos quando marcados com iodo-131. Os ensaios de controle de qualidade realizados com o Na<sup>123</sup>I pareceram indicar que a presença de contaminantes radioquímicos e radionuclídicos influenciou na marcação.

**LABELING OF VASOACTIVE INTESTINAL PEPTIDE (VIP) AND  
VIP10-28 FRAGMENT WITH RADIODINE BY DIRECT METHOD.  
COMPARATIVE STUDY OF THE KINETICS BIODISTRIBUTION  
AND AFFINITY FOR NEUROENDOCRINE TUMOR CELLS**

**Maria Tereza Colturato**

**ABSTRACT**

In the progress of the Nuclear Medicine, many protein based radiopharmaceuticals have been developed in the last years using antibodies and, more recently, biologically active natural peptides or similar synthetic peptides. In the search for agents with specificity for the target tissue in tumors detection, it was verified that small sequences of amino acids may interact with selective sites, with homogenous distribution, fast accumulation in tissues and fast blood clearance when compared to the antibodies. Among the peptides used in the diagnosis of tumors, Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) has been studied. VIP labeled with iodine-123 is applied in the images of intestinal adenocarcinoma and endocrine tumors. The molecule of VIP contains two tyrosine residues, in the positions 10 and 22 that are, theoretically, equally susceptible to radiodination for direct method. The objective of this work was to produce VIP labeled with radiodine (iodine-123), in order to introduce to the brazilian medical class this radiopharmaceutical of interest for the diagnosis and recurrence of tumors that express specific receptors. In an unpublished way, the work studied the labeling and the kinetic distribution of the VIP fragment (VIP10-28) and verified its potential as radiopharmaceutical applied in the identification of tumors that express VIP receptors. After the choice of the appropriated technique for labeling VIP and VIP10-28 with radiodine, using Cloramina T as oxidant agent and sodium metabisulfite as reducing agent, the quality control procedures were accomplished (electrophoresis and high performance

liquid chromatography, HPLC) for radiochemical purity determination as well as the separation of the radiochemical species obtained. Labeling and quality control procedures applied were efficient and accurate. [ $^{131}\text{I}$ ]VIP and [ $^{131}\text{I}$ ]VIP10-28 were obtained with high radiochemical purity (> 95%). The purification studies to remove free radiiodine in the labeling mixture (simple purification) and to produce the radiopharmaceutical with high specific activity (complex purification and HPLC), were both efficient in the separation of the species in the reaction mixtures, as demonstrated by quality control procedures. Biological distribution studies were accomplished by venous administration of the radiopharmaceuticals in laboratory animals: biodistribution study of [ $^{131}\text{I}$ ]VIP and [ $^{131}\text{I}$ ]VIP10-28 in normal *Swiss* mice, [ $^{131}\text{I}$ ]VIP not purified and purified in *Swiss* mice with tumor and [ $^{131}\text{I}$ ]VIP and [ $^{131}\text{I}$ ]VIP10-28 in *Nude* mice with tumor, scintigraphic images of [ $^{131/123}\text{I}$ ]VIP and [ $^{123}\text{I}$ ]VIP10-28 in *Swiss* and *Nude* mice and *Wistar* rats with tumor. *In vitro* studies were accomplished to determine the percentage of [ $^{131}\text{I}$ ]VIP and [ $^{131}\text{I}$ ]VIP10-28 bound to plasma proteins, stability study of [ $^{131}\text{I}$ ]VIP and [ $^{131}\text{I}$ ]VIP10-28 in human plasma and the affinity and internalization of [ $^{131}\text{I}$ ]VIP and [ $^{131}\text{I}$ ]VIP10-28 by tumour adenocarcinoma cells of human rectal colon (HT-29). All biological distribution studies demonstrated that both [ $^{131/123}\text{I}$ ]VIP and [ $^{131/123}\text{I}$ ]VIP10-28 showed fast blood clearance, low renal and liver uptake, relative uptake in thyroid, showing *in vivo* dehalogenation and good uptake in tumour. Comparative biological distribution of the radiopharmaceuticals showed high uptake in the stomach for both peptides. The blood clearance of the fragment was slower, and influences the visualization of the tumour mass. The radiopharmaceuticals, [ $^{123}\text{I}$ ]VIP and [ $^{123}\text{I}$ ]VIP10-28, were obtained with high radiochemical purity, but with low radiochemical yield when comparing with labeling procedures using iodine-131. Quality control assays of [ $^{123}\text{I}$ ]Na indicated that the presence of radiochemical and radionuclide impurities influenced on labeling results.

# SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1 - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
1.1- Radiofármacos de proteínas .....	18
1.2 - Peptídeos marcados para imagens de tumores .....	20
1.3 - Iodo .....	23
1.4 - Radioiodação de proteínas .....	25
Cloramina T .....	26
Iodogen .....	26
<b>2 - OBJETIVO .....</b>	<b>28</b>
<b>3 - MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
3.1 - MATERIAIS .....	29
3.1.1 - Reagentes e Soluções .....	29
3.1.2 - Equipamentos .....	30
3.1.3 - Outros .....	31
3.1.4 - Animais .....	31

	<b>Página</b>
3.2 - MÉTODOS .....	31
3.2.1 - Marcação do VIP e VIP10-28 com Na <sup>131</sup> I e Na <sup>123</sup> I.....	32
3.2.2 - Ensaio de controle da pureza radioquímica .....	34
a) Método eletroforético .....	34
b) Método de CLAE .....	34
3.2.3 - Análise da pureza radionuclídica do Na <sup>123</sup> I em detector Germânio Hiper Puro (Ge-HP) .....	34
3.2.4 - Purificação dos radiofármacos .....	35
a) Purificação por CLAE do VIP- <sup>131</sup> I .....	35
b) Purificação por coluna compactada do VIP- <sup>131/123</sup> I e VIP10-28- <sup>131/123</sup> I .....	35
Purificação simples .....	35
Purificação composta .....	35
3.2.5 - Purificação do Na <sup>123</sup> I por colunas compactadas .....	36
a) Coluna compactada Oasis <sup>®</sup> MCX .....	36
b) Coluna compactada Sep-Pak Plus de alumina N .....	36
c) Coluna compactada Sep-Pak Plus de alumina A .....	37
3.2.6 - Cultivo das células de adenocarcinoma de cólon retal humano (HT-29) .....	37

	<b>Página</b>
3.2.7 - Estudo da distribuição biológica do VIP- <sup>131/123</sup> I e VIP10-28- <sup>131/123</sup> I em animais de laboratório .....	37
a) Método invasivo .....	37
b) Estudos cintilográficos .....	39
3.2.8 - Estudos <i>in vitro</i> .....	40
a) Estudo para determinação da porcentagem de ligação do VIP- <sup>131</sup> I e VIP10-28- <sup>131</sup> I às proteínas plasmáticas .....	40
3.2.9 - Estudo da determinação da estabilidade do VIP- <sup>131</sup> I e VIP10-28- <sup>131</sup> I em plasma humano .....	40
3.2.10 - Ensaio de ligação e internalização do VIP- <sup>131</sup> I e VIP10-28- <sup>131</sup> I nas células de adenocarcinoma de cólon retal humano (HT-29) .....	41
<b>4 - RESULTADOS</b> .....	43
4.1 - ESTUDOS DE MARCAÇÃO, AVALIAÇÃO DA PUREZA RADIOQUÍMICA E MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO .....	43
4.1.1 - Perfil eletroforético do radioiodo e misturas de marcação .....	43
4.1.2 - Estudo dos parâmetros de marcação .....	44
4.1.3 - Perfis de CLAE do radioiodo e misturas de marcação .....	47
4.1.4 - Análise do Na <sup>123</sup> I em detector Germânio Hiper Puro (Ge-HP) ...	50
4.1.5 - Purificação do Na <sup>123</sup> I por colunas compactadas e influência no rendimento de marcação do VIP e VIP10-28 .....	51
4.1.6 - Purificações realizadas nos radiofármacos .....	58

	<b>Página</b>
a) Purificação por CLAE-isocrática do VIP- <sup>131</sup> I .....	58
b) Purificação simples por coluna compactada dos VIP- <sup>131/123</sup> I e VIP10-28- <sup>131/123</sup> I .....	59
c) Purificação composta por coluna compactada do VIP- <sup>131</sup> I e VIP10-28- <sup>131</sup> I .....	59
<b>4.2 - ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA DO VIP-<sup>131/123</sup>I E VIP10-28-<sup>131/123</sup>I EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO .....</b>	<b>62</b>
4.2.1 - Biodistribuição do VIP- <sup>131</sup> I e VIP10-28- <sup>131</sup> I em camundongos <i>Swiss</i> normais .....	62
4.2.2 - Biodistribuição do VIP- <sup>131</sup> I com purificação simples e composta em camundongos <i>Swiss</i> com tumor .....	64
4.2.3 - Biodistribuição do VIP- <sup>131</sup> I e VIP10-28- <sup>131</sup> I em camundongos <i>Nude</i> com tumor .....	65
4.2.4 - Estudos cintilográficos .....	67
a) Cintilografia do VIP- <sup>131/123</sup> I com purificação simples em camundongo <i>Swiss</i> normal e com tumor e rato <i>Wistar</i> com tumor .....	67
b) Cintilografia do VIP- <sup>123</sup> I e VIP10-28- <sup>123</sup> I com purificação simples em camundongos <i>Nude</i> com tumor .....	69
<b>4.3 - ESTUDOS <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>71</b>
4.3.1 - Determinação da porcentagem de ligação do VIP- <sup>131</sup> I e VIP10-28- <sup>131</sup> I às proteínas plasmáticas .....	71
4.3.2 - Estudo da determinação da estabilidade do VIP- <sup>131</sup> I e VIP10-28- <sup>131</sup> I em plasma humano .....	72

	<b>Página</b>
4.3.3 - Ensaio de ligação e internalização do VIP- <sup>131</sup> I e VIP10-28- <sup>131</sup> I nas células de adenocarcinoma de cólon retal humano (HT-29) .....	72
<b>5 - DISCUSSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>6 - CONCLUSÕES .....</b>	<b>83</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>85</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>		<b>Página</b>
1	Peptídeos ligantes dos receptores de VIP.....	23
2	Propriedades físicas dos isótopos do iodo .....	23
3	Marcação do VIP com Na <sup>131</sup> I: estudo dos parâmetros de marcação	44
4	Marcação do VIP10-28 com Na <sup>131</sup> I: estudo dos parâmetros de marcação .....	45
5	Pureza radioquímica do estudo da relação atividade do Na <sup>131</sup> I/massa do peptídeo (MBq/μg) .....	45
6	Estudo dos parâmetros de marcação do VIP (25 μg) com Na <sup>123</sup> I e purificação simples (fração 60/40).....	46
7	Estudo dos parâmetros de marcação do VIP (50 μg) com Na <sup>123</sup> I e purificação simples (fração 60/40) .....	47
8	Análise de espectrometria gama do Na <sup>123</sup> I em detector Germânio Hiper Puro .....	51
9	Análise de espectrometria gama da coluna compactada Sep-Pak Plus alumina A em detector Germânio Hiper Puro após filtração de uma amostra de Na <sup>123</sup> I depois de treze dias da filtração .....	51
10	Análises eletroforéticas do Na <sup>123</sup> I filtrado por diferentes colunas compactadas e das marcações do VIP com o radioiodo obtido de cada coluna antes e após purificação .....	52
11	Análises eletroforéticas de diferentes lotes de Na <sup>123</sup> I filtrados por coluna compactada Sep-Pak Plus alumina A e das marcações do VIP com o radioiodo obtido de cada filtração .....	53

**Tabela****Página**

12	Análises eletroforéticas de diferentes lotes de Na <sup>123</sup> I filtrados por coluna compactada Sep-Pak Plus Alumina A e das marcações do VIP10-28 com o radioiodo obtido de cada filtração .....	54
13	Porcentagens dose/órgão e dose/grama do VIP- <sup>131</sup> I sem purificação administrado em camundongos <i>Swiss</i> normais .....	63
14	Porcentagens dose/órgão e dose/grama do VIP10-28- <sup>131</sup> I sem purificação administrado em camundongos <i>Swiss</i> normais .....	63
15	Porcentagens dose/órgão e dose/grama do VIP- <sup>131</sup> I com purificação simples administrado em camundongos <i>Swiss</i> com tumor .....	64
16	Porcentagens dose/órgão e dose/grama do VIP- <sup>131</sup> I com purificação composta administrado em camundongos <i>Swiss</i> com tumor .....	65
17	Porcentagens dose/órgão e dose/grama do VIP- <sup>131</sup> I sem purificação administrado em camundongos <i>Nude</i> com tumor .....	66
18	Porcentagens dose/órgão e dose/grama do VIP10-28- <sup>131</sup> I sem purificação administrado em camundongos <i>Nude</i> com tumor .....	66
19	Relação tumor/sangue (% dose/g tumor / % dose sangue) nos diferentes tempos após administração dos radiofármacos .....	67
20	Porcentagens da relação da contagem da bexiga pela contagem de corpo inteiro (C.I.) das imagens cintilográficas do VIP- <sup>123</sup> I e VIP10-28- <sup>123</sup> I .....	71
21	Análises eletroforéticas dos plasmas humanos incubados com o VIP- <sup>131</sup> I e VIP10-28- <sup>131</sup> I .....	72
22	Porcentagem da ligação e internalização nas células HT-29 do VIP- <sup>131</sup> I e VIP10-28- <sup>131</sup> I .....	72

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
11	Atividade das frações do VIP- <sup>131</sup> I coletada após aplicação em CLAE-isocrática .....	58
12	Perfil de CLAE-isocrática da fração 11 do VIP- <sup>131</sup> I em detector UV-visível-CG (230 nm) .....	59
13	Atividade das frações coletadas após purificação composta do VIP- <sup>131</sup> I por coluna compactada Sep-Pak lighth C <sub>18</sub> .....	59
14	Atividade das frações do Na <sup>131</sup> I coletada após purificação composta por coluna compactada Sep-Pak lighth C <sub>18</sub> .....	60
15	Perfis de análise eletroforética das frações 20/80, 27/73 e 60/40 da amostra de VIP- <sup>131</sup> I (a) e da fração 1 (10/90) da amostra de Na <sup>131</sup> I (b) após purificação por coluna compactada Sep-Pak light C <sub>18</sub> .....	61
16	Atividade das frações do VIP10-28- <sup>131</sup> I coletada após purificação composta por coluna compactada Sep-Pak lighth C <sub>18</sub> .....	62
17	Imagem cintilográfica do VIP- <sup>131</sup> I com purificação composta em camundongo <i>Swiss</i> com tumor após 155 minutos da injeção .....	68
18	Imagem cintilográfica do VIP- <sup>131</sup> I com purificação composta em rato <i>Wistar</i> com tumor após 170 minutos da injeção .....	68
19	Imagem cintilográfica do VIP- <sup>131</sup> I com purificação composta em camundongo <i>Swiss</i> normal após 150 minutos da injeção .....	68
20	Imagens cintilográficas do VIP10-28- <sup>123</sup> I após purificação simples em camundongos <i>Nude</i> com tumor após 60 (a) e 150 (b) minutos da injeção. Os animais à esquerda receberam 60 minutos antes da administração do radiofármaco, 200 µg/100 µL do antagonista do VIP, intraperitonal .....	69
21	Imagens cintilográficas do VIP- <sup>123</sup> I após purificação simples em camundongos <i>Nude</i> com tumor após 90 (a), 180 (b) e 240 (c) minutos da injeção. Os animais à esquerda receberam 60 minutos antes da administração do radiofármaco, 200µg/100 µL do antagonista do VIP, intraperitonal .....	70

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Radiodinação eletrofilica do resíduo tirosina de uma proteína, anticorpo monoclonal ou peptídeo .....	25
2	N-cloro 4-metil benzeno sulfonamida trihidratado sal sódico, (Cloramina T) .....	26
3	1,3,4,6-tetracloro-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -difenilglicouril (Iodogen) .....	27
4	Perfis eletroforéticos do VIP- <sup>131</sup> I, VIP10-28- <sup>131</sup> I e Na <sup>131</sup> I (a) e do VIP- <sup>123</sup> I, VIP10-28- <sup>123</sup> I e Na <sup>123</sup> I (b) .....	43
5	Perfis de CLAE-isocrática das espécies do VIP- <sup>131</sup> I utilizando-se 25 $\mu$ g de VIP/12 $\mu$ g de Iodogen suspensão (a), Cloramina T com 25 $\mu$ g de VIP/1 minuto de reação (b) e do Na <sup>131</sup> I (c) .....	48
6	Perfis de CLAE-gradiente das espécies do VIP10-28- <sup>131</sup> I utilizando-se 12 $\mu$ g de Iodogen em suspensão/ 25 $\mu$ g de VIP10-28 (a) e Cloramina T com 25 $\mu$ g de VIP10-28/2 minutos de reação (b) e do Na <sup>131</sup> I (c) .....	49
7	Perfis de CLAE-gradiente das espécies do VIP- <sup>123</sup> I utilizando-se Cloramina T como agente oxidante e 25 $\mu$ g de VIP/1 minuto de reação (a) e do Na <sup>123</sup> I (b) .....	50
8	Perfis de CLAE-gradiente do Na <sup>123</sup> I antes (a) e após (b) a filtração por coluna compactada Sep-Pak Plus Alumina A .....	55
9	Perfis de CLAE-gradiente do VIP- <sup>123</sup> I não purificado (a) e após purificação simples, frações 60/40 (b) e 10/90 (c). Marcação realizada com o Na <sup>123</sup> I filtrado por coluna compactada Sep-Pak Plus Alumina A .....	56
10	Perfis de CLAE-gradiente do VIP10-28- <sup>123</sup> I não purificado (a) e após purificação simples, frações 60/40 (b) e 10/90 (c). Marcação realizada com o Na <sup>123</sup> I filtrado por coluna compactada Sep-Pak Plus Alumina A .....	57

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1- Radiofármacos de proteínas

Nas últimas décadas, inúmeras moléculas têm sido desenvolvidas como radiotraçadores para imagens de tumores específicos, sendo de grande interesse para diagnóstico e terapia em Medicina Nuclear.

Após o desenvolvimento da metodologia para produção de anticorpos monoclonais (AcM) houve grande expectativa no estudo de radiofármacos baseados em AcM marcados com radioisótopos de interesse concentrando-se, especialmente, no desenvolvimento de marcadores tumorais. Os AcM apresentam propriedades de alta especificidade e afinidade e, como seu uso baseia-se na interação do anticorpo marcado com os sítios de ligação específicos contendo o antígeno correspondente, formam um complexo antígeno-anticorpo. Estudos clínicos, entretanto, demonstraram ligação limitada destes compostos marcados ao sítio alvo, clareamento sangüíneo relativamente lento e taxas alvo/radiação de fundo pequenas (Knight, 2003).

Além disto, AcM intactos apresentam alto peso molecular que limita a difusão e localização requerendo longos intervalos de tempo entre a administração do radiofármaco e a aquisição de imagens cintilográficas (Yokota et al., 1992a e 1992b; Milenic et al.,1991). Tais problemas foram, em parte, superados com a utilização de fragmentos de AcM que apresentam clareamento sangüíneo e acúmulo no tumor mais rápido do que os AcM integros (Knight, 2003).

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.

Peptídeos são elementos necessários em muitos processos biológicos fundamentais e, quando marcados, clareiam do plasma mais rapidamente e apresentam alta concentração no tecido alvo (McAfee et al., 1996 e Knight, 2003). A busca por agentes com especificidade pelo tecido alvo tem levado à síntese de uma variedade de

moléculas, particularmente de peptídeos, análogos sintéticos de peptídeos naturais biologicamente ativos (Blok et al., 1999).

Os peptídeos são compostos constituídos por aminoácidos unidos entre si por ligações peptídicas (ligação covalente amídica). Muitos peptídeos são sintetizados no tecido neuronal, linfático e no sistema endócrino. Os neuropeptídeos altamente potentes exibem um largo espectro de ação e regulam processos biológicos essenciais (Blok et al., 1999).

Peptídeos menores podem ser sintetizados quimicamente enquanto que as proteínas geralmente são obtidas por derivação de uma fonte biológica, como da cavidade de tumores ou utilizando-se técnica de ácido desoxiribonucleico (DNA) recombinante. Quando o peso molecular encontra-se inferior a 7000 Dalton (Da) são denominados peptídeos ou oligopeptídeos e entre 7000-10000 Da são denominados polipeptídios (Blok et al., 1999).

Para a detecção de tumores o radiofármaco deve promover acúmulo rápido, alta concentração no tecido alvo e em geral, os peptídeos pequenos distribuem-se mais uniformemente, penetram mais rapidamente nos tecidos e clareiam mais rapidamente da circulação que os anticorpos e seus fragmentos. Sabe-se que uma seqüência de aminoácidos pequena pode ligar-se a sítios de ligação altamente seletivos (Blok et al., 1999).

A radiomarcagem pode originar importantes alterações de lipofilicidade e carga, com conseqüentes alterações na cinética de distribuição do peptídeo (Blok et al., 1999).

A propriedade de hidrofiliicidade aumenta o clareamento renal do peptídeo, enquanto que peptídeos lipofílicos mostram excreção hepatobiliar substancial que pode prejudicar o emprego do peptídeo marcado como radiofármaco em função da dosimetria hepática bem como da dificuldade de visualização de massas tumorais abdominais, devido à alta captação no fígado e intestinos (Blok et al., 1999).

Quanto a especificidade do peptídeo pela célula tumoral, o ideal é obter-se peptídeo que possa ser marcado por radionuclídeo utilizado para estudos de imagem, para identificação do tumor primário e metástases e depois o mesmo peptídeo ser utilizado no tratamento terapêutico (Knight, 2003).

Inúmeros trabalhos vêm sendo publicados na literatura nos últimos anos, relatando estudos de marcação de diferentes peptídeos, utilizando radionuclídeos tais como o tecnécio-99m, índio-111, iodo-123/131, ítrio-90/86, gálio-67/68, cobre-67, flúor-18 lutécio-177 e rênio-188 destinados ao diagnóstico e/ou terapia de tumores específicos, bem

como ao diagnóstico de focos de infecção (peptídeos quimiotáticos, antimicrobianos ou citocinas), ou na detecção de trombos (glicoproteína IIb/IIIa) (Nedelman et al., 1993; Lister-James et al., 1996; Hnatowich et al., 1998; Laken-Van der et al., 1998; Heppeler et al., 2000 e Knight, 2003).

## 1.2 - Peptídeos marcados para geração de imagens de tumores

Dentre os peptídeos destinados ao diagnóstico de tumores, os derivados da somatostatina têm sido intensamente estudados. O peptídeo natural somatostatina é um peptídeo cíclico com 14 aminoácidos com um largo espectro de atividade biológica, especialmente inibitória, em inúmeros órgãos. A estrutura cíclica e os resíduos 7 a 11 parecem ser essenciais para interação com o receptor. Somatostatina-14 tem um tempo de meia-vida biológica de alguns minutos, impedindo acúmulo significativo no receptor e a aquisição de imagem em Medicina Nuclear diagnóstica. O desenvolvimento de análogos sintéticos permitiu a redução da degradação por peptidases. No octapeptídeo octreotídeo, com um tempo de meia-vida de aproximadamente 90 a 120 minutos, um aminoácido *D* no *N-terminal*, (*D*-Phe) e um amino-álcool no *C-terminal* (Thr-ol), protege a molécula contra a degradação enzimática (Fischman et al., 1993 e Blok et al., 1999).

Uma das aplicações clínicas mais importantes descritas por Bakker (1990), relata a localização de tumores endócrinos utilizando-se um análogo radioiodado da somatostatina, [Tyr<sup>3</sup>]-octreotídeo. Por incorporação de um quelante de ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) no sítio *N-terminal*, a molécula de octreotídeo pode ser marcada com índio-111 (octreotídeo-<sup>111</sup>In-DTPA, OctreoScan) (Bakker et al., 1991). Este radiofármaco já é utilizado rotineiramente em Medicina Nuclear, no diagnóstico e estadiamento de tumores neuroendócrinos e linfomas, permitindo a aquisição de imagens de tecidos tumorais que expressam receptores para somatostatina (Knight, 2003).

Foram estudados análogos do octreotídeo para marcação com <sup>99m</sup>Tc utilizando-se marcações diretas e com agentes quelantes bifuncionais, como derivados aminotiólicos ou <sup>99m</sup>Tc-HYNIC (6-Hidrazinonicotínico) utilizando-se coligantes como tricina e EDDA (Ácido Etilenodiamino-N, N'-diacético). Derivados de somatostatina também foram marcados com outros radio-metais como índio-111 (<sup>111</sup>In-DOTA-Ianreotídeo, <sup>111</sup>In-DTPA-[Tyr<sup>3</sup>]-octreotídeo, <sup>111</sup>In-DTPA-[Tyr<sup>3</sup>]-octreotateo), cobre-64 (<sup>64</sup>Cu-TETA-[Tyr<sup>3</sup>]-octreotídeo), utilizando-se sempre agentes quelantes macrocíclicos (Knight, 2003).

Dentre os análogos do octreotídeo sintetizados, o depreotídeo (P829) complexa-se com o tecnécio obtendo-se o radiofármaco P829-<sup>99m</sup>Tc que se encontra aprovado em rotina clínica.

Outro peptídeo investigado para detecção de tumores é o peptídeo intestinal vasoativo, VIP (TAB. 1). O VIP foi descoberto e caracterizado em 1970 por Said e Mut. É um peptídeo pertencente à família de peptídeos como o glucagon, secretina, peptídeo histidina isoleucina amida (PHI), fator de crescimento hormonal (GRF), polipeptídeo inibitório gástrico (GIP), peptídeo de ativação pituitária adenilato ciclase (PACAP), entre outros. Geralmente, apresenta-se como neuropeptídeo, possuindo uma grande variedade de atividade biológica (Mutt et al., 1988; Virgolini et al., 1996; Refai et al., 1999; Reubi, 2003 e Knight, 2003).

Particularmente, o VIP tem importantes ações farmacológicas como vasodilatador na síndrome diarréica aquosa em pacientes com tumores que secretam VIP, como estimulante da secreção de vários hormônios, modulador da resposta auto-imune e estimulante também do crescimento e proliferação de células normais e malignas. Estas ações são mediadas pela ligação do VIP aos receptores superficiais das células que fazem parte de muitos tecidos, incluindo o trato respiratório, trato gastrointestinal, rins e células do tecido sanguíneo. Muitos tumores expressam alta concentração dos receptores VIP tanto em tecidos normais como células sanguíneas, permitindo a detecção cintilográfica destes tumores pelo VIP radiomarcado (Virgolini et al., 1995; Virgolini et al., 1996 e Knight, 2003).

São dois os tipos de receptores do VIP, VPAC<sub>1</sub> e VPAC<sub>2</sub>, ambos com alta afinidade pelo VIP e PACAP e com distintas ações farmacológicas. Esses receptores não se encontram apenas no cérebro, mas na grande maioria dos tecidos epiteliais humanos. O VPAC<sub>1</sub> encontra-se expresso na maior parte destes tecidos normais, como, por exemplo, nos hepatócitos, mucosa gastrointestinal, ductos e lóbulos mamários, folículos da glândula tireóide, bexiga e ureter e pulmão. Alguns outros tecidos, entretanto, expressam predominantemente o receptor VPAC<sub>1</sub> como a medula adrenal, várias áreas do cérebro e pituitária. A musculatura lisa expressa preferencialmente os receptores VPAC<sub>2</sub>, ao invés do VPAC<sub>1</sub>, conforme descrito por Reubi (2003). Tal receptor VPAC<sub>2</sub>, na musculatura lisa, encontra-se presente no trato gastrointestinal (estômago) ou na vesícula seminal. Além disso, no sistema vascular, os vasos sanguíneos, artérias mais que veias, também expressam os receptores VPAC<sub>2</sub> (Reubi, 2003; Harmar et al., 2004).

As células tumorais humanas derivadas de tecidos normais que expressam frequentemente receptores de VIP, também expressam os mesmos receptores, como por exemplo, os tumores primários epiteliais neoplásicos tais como cânceres de pulmão, estômago, cólon, reto, mama, próstata, ductos pancreáticos, fígado e bexiga (Hassan et al., 1994; Virgolini et al., 1996; Kurtaran et al., 1997; Raderer et al., 1998a e 1998b; Moody et al., 1998; Reubi et al., 1999; Eisenhut et al., 2000; Hassenius et al., 2000 e Rao et al., 2001).

A atividade intrínseca do peptídeo VIP encontra-se na porção amino-terminal (*N-terminal*) e a responsabilidade pela ligação aos receptores VIP é obtida pela porção *C-terminal*. Em consequência, para obterem-se imagens com VIP e análogos, a marcação da molécula não pode alterar a porção *C-terminal* para que não ocorra a diminuição do potencial de ligação ao receptor. (Blok et al., 1999).

A eliminação da seqüência *N-terminal* do VIP reduz a afinidade do peptídeo pelos receptores e progressivamente reduz sua eficácia, por exemplo, os fragmentos VIP2-28, VIP3-28 e VIP4-28 são agonistas parciais com progressiva diminuição da atividade intrínseca, ao passo que, o fragmento VIP10-28 (TAB. 1) é considerado um antagonista. Provavelmente o tipo de receptor que expressa o VIP10-28 corresponde ao VPAC<sub>1</sub>, pois provoca inibição do efeito VIP em células de carcinoma de cólon tipo HT-29, sendo estas expressas pelo receptor VPAC<sub>1</sub>, mas não inibe células de linfoma humano tipo SUP-T<sub>1</sub>, sendo por sua vez expressas pelo receptor VPAC<sub>2</sub> (Gourlet et al., 1997).

Estudos *in vitro*, utilizando VIP-<sup>125</sup>I, foram realizados por Virgolini (1994a e b) e Reubi (1995) e demonstraram a presença de receptores VIP em uma variedade de tumores humanos (células de tumores primários e metástases) e linhagens de células tumorais.

Dando continuidade, Virgolini (1996, 1997 e 1998) e Raderer (1998a e b) utilizando VIP-<sup>123</sup>I realizaram estudos *in vivo*, obtendo imagens cintilográficas demonstrando alta sensibilidade do radiofármaco para tumores endócrinos e adenocarcinomas intestinais.

A molécula do VIP contém dois resíduos de tirosina, nas posições 10 e 22, que são, teoricamente, igualmente susceptíveis a radioiodação por método direto. Na adição de radioiodo, cada resíduo de tirosina pode ligar-se a um ou dois átomos de iodo formando monoiodotirosina ou diiodotirosina, respectivamente (Martin et al., 1986). Da mesma maneira o fragmento VIP10-28 apresenta dois resíduos de tirosina, nas posições 1 e 13, podendo também ser radioiodados.

Estudos recentes vêm sendo realizados, com análogos do VIP, na espera de obter-se um antagonista marcado para obtenção de imagens cintilográficas na detecção de pequenas massas tumorais (Knight, 2003).

Na TAB. 1 podem ser observados os peptídeos VIP e seus análogos antagonistas, o VIP10-28 utilizado nos estudos para comparar a cinética de distribuição com o VIP íntegro e o antagonista VIP injetado nos animais para competir com os produtos radiomarcados e conseqüente obtenção de imagens.

TABELA 1 - Peptídeos ligantes dos receptores de VIP

Nome	Seqüência	Número de aminoácidos
VIP	<i>His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-NH<sub>2</sub></i>	28
VIP10-28	<i>Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-NH<sub>2</sub></i>	19
Antagonista do VIP	<i>H-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Thr-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-NH<sub>2</sub></i>	27

### 1.3 - Iodo

Os radioisótopos do iodo mais utilizados em medicina nuclear são iodo-123, iodo-125 e iodo-131, cujas propriedades físicas podem ser observadas na TAB. 2 (Kowalsky et al., 2004).

Pelo fato do <sup>125</sup>I apresentar fótons gama de energia baixa (35 keV), pode ser aplicado em braquiterapia para tratamento de tumores *in situ* como também para testes *in vitro* tal como radioimunoensaio (Lever, 1995 e Kowalsky et al., 2004).

Os radioisótopos <sup>123</sup>I e <sup>131</sup>I são utilizados nos estudos de diagnóstico e tratamento de tumores, respectivamente. O iodo-123 é adequado à aplicação diagnóstica devido a energia do fóton gama (159 keV) ser abundante e eficientemente detectada por cristal de iodeto de sódio das câmaras de cintilação e meia vida física (13,2 horas) ligeiramente curta (Saya, 1997 e Kowalsky et al., 2004).

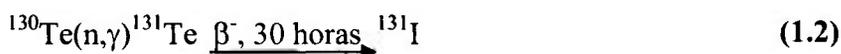
TABELA 2 - Propriedades físicas dos isótopos do iodo

Radionuclídeo	Meia vida física	Tipo de decaimento / produto final	Energia do fóton (keV)	Abundância do fóton (%)
<b>Iodo-123</b>	13,2 horas	EC / $^{123}\text{Te}$	159 (gama) 27 (Te raio-X)	83 71
<b>Iodo-125</b>	60,14 dias	EC / $^{125}\text{Te}$	35 (gama) 27 (Te raio-X)	7 114
<b>Iodo-131</b>	8,04 dias	$\beta^-$ / $^{131}\text{Xe}$	364 (gama) 637 (gama)	81 7

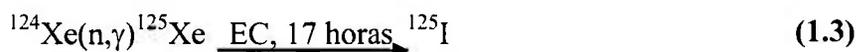
EC=Captura eletrônica;  $\beta^-$ =Negatron; de acordo com Kowalsky et al., 2004

O  $^{131}\text{I}$  possui fóton gama de energia alta (364 keV) que para ser detectado por cristal de iodeto de sódio é necessário colimação com redução da sensibilidade. Entretanto, sua emissão beta é utilizada em tratamentos tais como hipertiroidismo e câncer da tireóide na forma de iodeto de sódio, bem como na forma de molécula marcada, como por exemplo, o tositumomabe (anticorpo monoclonal anti CD-20 para tratamento de linfoma não Hodgkin) ou a MIBG (meta iodo benzilguanidina) utilizada no tratamento de feocromocitoma e neuroblastoma (Kowalsky et al., 2004).

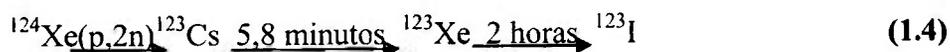
O iodo-131 pode ser obtido como subproduto da fissão do urânio bem como por ativação de neutrônica do telúrio-130 (Kowalsky et al., 2004).



O iodo-125 pode ser obtido indiretamente pela seguinte reação nuclear (Kowalsky et al., 2004):



O iodo-123 pode ser obtido por vários processos de irradiação em ciclotron. Atualmente, o ciclotron Cyclone-30 do IPEN produz  $^{123}\text{I}$  pelo bombardeamento do alvo  $^{124}\text{Xe}$  com prótons (Kowalsky et al., 2004).



Os radioiodos são obtidos em solução de hidróxido de sódio na forma de iodeto de sódio e quando utilizados em marcações de moléculas, devem apresentar-se livres de redutor e carregador (Seevers et al., 1982 e Stocklin et al., 1995).

#### 1.4 - Radioiodação de proteínas

Os radiofármacos de iodo podem ser preparados por diversos métodos de radioiodação incluindo, entre eles, a substituição eletrofílica aromática (Kowalsky et al., 2004).

A reação de substituição eletrofílica aromática é particularmente utilizada para radioiodação de proteína. Nesta reação, o íon  $\text{I}^+$  substitui um átomo de hidrogênio de um composto aromático rico em elétrons. Esta substituição é favorecida por fortes grupos doadores de elétron, como por exemplo, o grupo OH ou  $\text{NH}_2$ . Por este motivo, o resíduo de tirosina existente nas proteínas, anticorpos monoclonais ou peptídeos representam o sítio preferencial de ligação do radioiodo empregando-se substituição eletrofílica aromática e ocorre na posição *orto* em relação à hidroxila do anel aromático (FIG. 1) (Lever, 1995, Kowalsky et al., 2004).

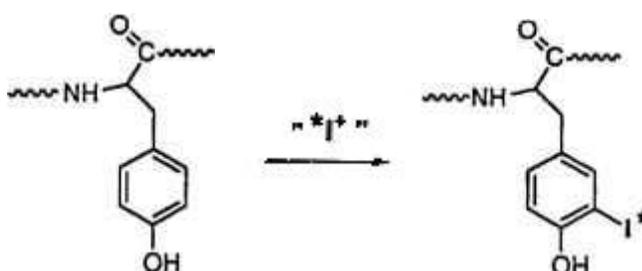


FIGURA 1 - Radiodação eletrofílica do resíduo tirosina de uma proteína, anticorpo monoclonal ou peptídeo (Lever, 1995)

O método de radiodação por substituição eletrofílica aromática envolve a utilização de agente oxidante para promover a oxidação do iodeto. Os agentes oxidantes mais utilizados são os clorados como Cloramina T e Iodogen e ambos promovem a ligação

covalente do iodo catiônico ao núcleo aromático do resíduo de tirosina da proteína. Podem se obter por este método bons rendimentos de marcação e produto com alta atividade específica (Lever, 1995 e Kowalsky et al., 2004).

### ➤ Cloramina-T

A Cloramina T é o sal sódico derivado do N-cloro 4-metil benzeno sulfonamida trihidratado (FIG. 2) como agente oxidante (Lever, 1995).

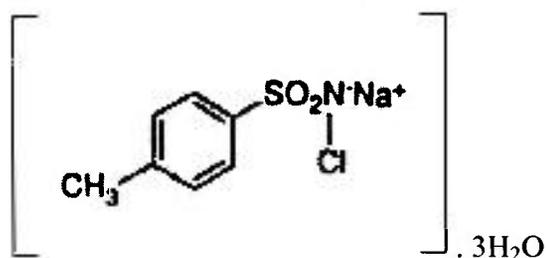
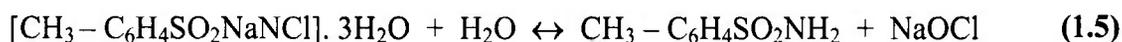


FIGURA 2 - N-cloro 4-metil benzeno sulfonamida trihidratado sal sódico (Cloramina T)

A Cloramina T sofre hidrólise no pH entre 7 e 8, liberando hipoclorito de sódio que oxida o radioiodo para ácido iodoso conforme demonstrado na reação a seguir (Kowalsky et al., 2004).



É uma técnica relativamente barata e fácil de realizar, geralmente compreendendo o tamponamento do composto e radioiodo, seguido da adição de uma solução fresca de Cloramina T. Após o período de reação, adiciona-se um agente redutor para interromper a reação.

Obtem-se altos rendimentos de marcações, mas a condição de marcação exige um controle cuidadoso, pelo fato da Cloramina T ser um forte agente oxidante e poder provocar danos nas proteínas (Lever, 1995).

### ➤ Iodogen

O Iodogen é o 1,3,4,6-tetracloro-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -difenilglicouril (FIG. 3) (Lever, 1995).

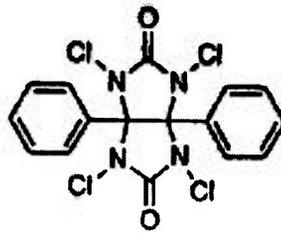


FIGURA 3 - 1,3,4,6-tetracloro-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -difenilglicouril (Iodogen)

O Iodogen é um oxidante que se apresenta em fase sólida, permanecendo em fase sólida durante a reação de iodação, enquanto o produto difundido no meio pode ser separado pela simples remoção. A preparação deste agente oxidante envolve sua dissolução em solvente orgânico e distribuição em tubos de reação. A remoção do solvente por evaporação, resulta na formação de um filme fino (película) na base do tubo. Os tubos de reação assim revestidos podem ser preparados com antecedência e estocados a temperaturas baixas.

A reação ocorre com a adição do produto tamponado e radioiodo ao tubo contendo o Iodogen na forma de película, ocorrendo a oxidação do iodo pelo Iodogen presente e conseqüente substituição eletrofílica do iodo radioativo no produto. O término da reação ocorre pela remoção do produto marcado do tubo de reação (Krummeich et al., 1996).

A técnica de radioiodação por fase sólida é utilizada na necessidade de promover oxidações brandas em proteínas quando comparada à Cloramina T e não requer adição de agente redutor para o término da reação (Lever, 1995 e Kowalsky et al., 2004).

## **2 - OBJETIVO**

O objetivo deste trabalho é a marcação do peptídeo intestinal vasoativo (VIP) com iodo-123, de modo a oferecer à classe médica brasileira este radiofármaco de interesse para o diagnóstico e estadiamento de tumores que expressam receptores específicos.

Sendo o fragmento VIP10-28 uma molécula de peso molecular menor que o peptídeo íntegro, como também preservando os resíduos de tirosina para marcação com radioiodo, o presente trabalho, de forma inédita, pretende estudar a marcação do fragmento com isótopos de iodo, comparar sua cinética de distribuição do fragmento com o VIP e verificar o potencial do fragmento radiomarcado na identificação de tumores que expressam receptores para VIP.

### 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 - MATERIAIS

##### 3.1.1 - Reagentes e Soluções

- 1,3,4,6-tetracloro-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -difenilglicouril (Iodogen), Sigma, EUA;
- Acetona, grau de pureza HPLC, Sigma, EUA;
- Acetonitrila, grau de pureza HPLC, Carlo Erba e Mallinckrodt, EUA;
- Ácido clorídrico fumegante 37 %, grau de pureza p.a., Merck, EUA;
- Ácido trifluoracético (TFA), grau de pureza p.a., Merck, EUA;
- Antagonista do Peptídeo Intestinal Vasoativo (antagonista do VIP), AnaSpec, Inc., EUA;
- Cloreto de sódio, Merck, EUA;
- Diclorometano, grau de pureza p.a., Merck, Brasil;
- Dietilbarbiturato de sódio, grau de pureza p.a., QEEL, Brasil;
- Fosfato de sódio monohidratado, grau de pureza p.a., Nuclear, Brasil;
- Fosfato di-sódico anidro, grau de pureza p.a., Carlo Erba, EUA;
- Fragmento do Peptídeo Intestinal Vasoativo (VIP10-28), Sigma, EUA e AnaSpec, Inc., EUA;
- Glicina, Sigma, EUA;
- Heparina sódica (Liquemine) 50000 UI/5 mL, Roche, Brasil;
- Hidróxido de sódio, grau de pureza p.a., Merck, Brasil;
- Iodo metálico, grau de pureza p.a., Merck, Brasil;
- Meio F12K, Gibco, EUA;
- Metabissulfito de sódio, grau de pureza p.a., Merck, Brasil;
- Metanol, grau de pureza p.a., Merck, Brasil;
- Nitrogênio gasoso, White Martins, Brasil;
- Peptídeo Intestinal Vasoativo (VIP), Sigma, EUA e AnaSpec, Inc., EUA;
- N-cloro 4-metil benzeno sulfonamida trihidratado sal sódico (Cloramina T), grau de pureza p.a., Merck, Brasil;

- Solução de Na<sup>131</sup>I, MS Nordion, Canadá, processado no Centro de Radiofarmácia;
- Solução de Na<sup>123</sup>I, IPEN/CNEN, Brasil, processado no Centro de Radiofarmácia;
- Soro Albumina Bovino (SAB), Sigma, EUA;
- Soro Fetal Bovino (SFB), Cultilab, Brasil;
- Uretana, grau de pureza p.a., Merck, Brasil;

### 3.1.2 - Equipamentos

- Agitador de tubos tipo *Vortex*, VWR-Scientific, Brasil;
- Aparelho espectrofotômetro na região do ultravioleta (UV) visível, modelo DMS-80, Perkin Elmer, Alemanha e modelo U-2010, Hitachi Instruments, Inc., Japão;
- Aparelho para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), Waters, EUA, composto pelos seguintes módulos:
  - ◆ Detector UV-visível, modelo 486;
  - ◆ Injetor manual, modelo 600 e bomba de solventes, modelo 600 com degaseificador;
  - ◆ Integrador, modelo 746;
  - ◆ Acoplado ao aparelho Waters, detetor de radiação beta e gama, modelo Radiomatic, Packard A Camberra Company, EUA;
- Aparelho para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), Instrumentos Científicos CG Ltda, Brasil, composto pelos seguintes módulos:
  - ◆ Detector UV-visível, modelo CG-435-B;
  - ◆ Injetor manual e bomba de solventes, modelo CG-480-C;
  - ◆ Acoplado ao aparelho CG, integrador modelo C-R4A Chromatopac, Shimadzu, EUA e detetor de radiação tipo poço, modelo Nuclear Spectrometer LB 2040, Berthold, Alemanha;
- Aparelho para Eletroforese com fonte de alta tensão estabilizada, modelo Amersham-Pharmacia, Brasil;
- Balança analítica, modelo M-220, Denver Instruments, EUA;
- Bomba de vácuo, modelo 825T, Fisatom, Brasil;
- Caixa com luvas, *Glove box*, IPEN/CNEN, Brasil;
- Calibrador de doses, modelo CRM<sup>TM</sup>-35R com câmara de ionização modelo CRC<sup>®</sup>-35R1, Capintec, EUA;
- Centrifuga, Hitachi, modelo Himaç CF7D2, Japão;

- Contador automático tipo poço, com cristal NaI(Tl), modelo E5002, cobra II, auto-gamma, A. Packard, Camberra, EUA;
- Detector de radiação gama de Germânio (Ge) Hiper Puro (HP), modelo GX1518, Camberra, EUA;
- Micropipeta de 0-20  $\mu\text{L}$ , Gilson, EUA e de 0,5-10  $\mu\text{L}$ , 10-100  $\mu\text{L}$  e 200-1000  $\mu\text{L}$ , Brand, Brasil;
- Sistema purificador de água, modelo Milli-RX 45, Millipore, EUA;

### 3.1.3 - Outros

- Células de adenocarcinoma de cólon retal humano (HT-29), Banco de Células do Rio de Janeiro (RJCB), Brasil;
- Coluna para CLAE, Symmetry<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (RP-C<sub>18</sub>) 4,6 x 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Waters, EUA;
- Colunas compactadas: Oasis<sup>®</sup> MCX 1cc, Sep-Pak light C<sub>18</sub>, Sep-Pak<sup>®</sup> Plus Alumina N (Neutra), Sep-Pak<sup>®</sup> Plus Alumina A (Ácida), Waters, EUA;
- Filtros descartáveis de 0,22  $\mu\text{m}$  e 0,45  $\mu\text{m}$  de poro, Millipore, EUA;
- Membrana filtrante GV (durapore) em PDVF (hidrofilica), 0,45  $\mu\text{m}$  de poro, 4 e 13 mm de diâmetro, Millipore, EUA;
- Papel Whatman n<sup>o</sup>. 1, Watman, Brasil;
- Vidraria e material de laboratório em geral

### 3.1.4 - Animais

- Camundongo adulto da linhagem *Nude*, Biotério do IPEN/CNEN;
- Camundongo adulto da linhagem *Swiss*, Biotério do IPEN/CNEN;
- Rato adulto da linhagem *Wistar*, Biotério do IPEN/CNEN.

## 3.2 - MÉTODOS

As atividades experimentais foram desenvolvidas no Centro de Radiofarmácia (CR) do IPEN/CNEN que possui instalações apropriadas para manipulação de amostras radioativas não seladas.

Os peptídeos VIP e VIP10-28 foram preparados dissolvendo-se 1000 µg em 800 µL de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,5. Esta solução foi fracionada em volume de 20 µL em tubos de fundo cônico, correspondendo a 25 µg de VIP e de VIP10-28 e conservados à -10 a -25°C. Para o preparo do antagonista do VIP, a 1000 µg de peptídeo adicionou-se 500 µL de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,5 e a solução foi fracionada em volume de 100 µL em tubos de fundo cônico, correspondendo a 200 µg de antagonista do VIP, conservados entre -10 e -25°C.

### 3.2.1 - Marcação do VIP e VIP10-28 com Na<sup>131</sup>I e Na<sup>123</sup>I

Os estudos de otimização das condições de marcação do VIP e VIP10-28 com radioiodo foram realizados com Na<sup>131</sup>I, para minimizar custos e facilitar a manipulação, já que este isótopo possui tempo de meia-vida mais longo ( $t_{1/2}$ =8,04 dias) que o iodo-123 ( $t_{1/2}$ =13,2 horas) e custo inferior.

Foram realizadas marcações utilizando-se como agente oxidante Iodogen e Cloramina T, sendo que para o Iodogen foram realizados dois procedimentos diferentes. No primeiro, o Iodogen foi utilizado na forma de filme fino (película), impregnado ao frasco de reação. Para preparo destes tubos o Iodogen foi dissolvido em diclorometano (1mg/mL) e de 5-20 µL desta solução, correspondentes a 5, 10, 15 ou 20 µg de Iodogen, foram transferidos para tubos de fundo cônico tipo *ependorf* e evaporados até *secura* com nitrogênio gasoso e depois conservados à -10 a -25°C. No segundo procedimento, o Iodogen foi utilizado na forma de suspensão, preparada em mistura de acetona e tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,5 (0,1/4,9 mL), para as massas de 3, 6 e 12 µg de Iodogen.

Em ambos os procedimentos, adicionou-se ao frasco contendo VIP ou VIP10-28 (25 µg/20 µL de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,5), 10 µL de solução de Na<sup>131</sup>I (29,6-37 MBq), 5 µL de KI (0,10 nmol), 5 µL da solução de Iodogen na forma e massa desejada e de 40-50 µL de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,5. As reações de iodação foram conduzidas por 30 minutos à temperatura ambiente sob agitação suave (Virgolini et al., 1994a).

Outro procedimento de marcação empregou a Cloramina T como agente oxidante. Ao peptídeo VIP ou VIP10-28 (25 µg/20 µL e 12,5 µg /10 µL de tampão fosfato de sódio 0,2M pH 7,5) foram adicionados 10 µL de solução de Na<sup>131</sup>I (29,6-37 MBq), 5 µL de solução de Cloramina T (1 mg/mL de água destilada) e nos tempos de 5, 15 e 30 segundos, 1, 2 e 3 minutos as reações foram interrompidas com adição de 5 µL de

metabissulfito de sódio (2 mg/mL de água destilada) e de 40-50  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio 0,2M pH 7,5. Durante o tempo de reação os frascos foram mantidos à temperatura ambiente sob agitação suave (Marie et al., 1984).

Foram realizados estudos da relação atividade do  $\text{Na}^{131}\text{I}$  / massa do peptídeo (MBq/ $\mu\text{g}$ ). As relações atividade/massa estudadas foram 23,6; 11,8 e 5,9. À 1,57; 3,13 e 6,25  $\mu\text{g}$  de VIP ou VIP10-28/20  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio 0,2M pH 7,5 foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{Na}^{131}\text{I}$  (29,6-37 MBq), 5  $\mu\text{L}$  de solução de Cloramina T (1 mg/mL de água destilada) e no tempo de 1 minuto (VIP) e 2 minutos (VIP10-28) as reações foram interrompidas com adição de 5  $\mu\text{L}$  de metabissulfito de sódio (2 mg/mL de água destilada) e 40-50  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio 0,2M pH 7,5. Os frascos foram mantidos à temperatura ambiente e sob agitação suave no decorrer da reação.

Realizou-se marcações utilizando-se 100  $\mu\text{g}$  de VIP ou VIP10-28/80  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio 0,2M pH 7,5 com alta atividade de  $\text{Na}^{131}\text{I}$ , 688 e 707 MBq, (relação atividade/massa 6,9 e 7,1), respectivamente. A técnica utilizada para ambas as marcações foi a mesma descrita para o estudo da relação atividade/massa.

As amostras de  $\text{Na}^{123}\text{I}$  utilizadas nos estudos de marcação, apresentaram volumes demasiadamente altos para marcação necessitando serem evaporados com aquecimento até volume aproximado de 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$   $10^{-2}\text{M}$ . As marcações do VIP com  $\text{Na}^{123}\text{I}$  (37-55,5 MBq) foram realizadas utilizando-se Cloramina T como agente oxidante e estudados alguns parâmetros da marcação:

- ◆ massa do peptídeo VIP de 25  $\mu\text{g}$ /20  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,5, tempo de reação de 1 e 5 minutos e pH de reação de 6,0; 6,5 e 7,5 e 50  $\mu\text{g}$ /40  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,5 e tempo de reação de 1 e 3 minutos;
- ◆ massa do peptídeo VIP10-28 de 25-50  $\mu\text{g}$ /20-40  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,5 e tempo de reação de 2 e 5 minutos.

Foram realizadas marcações do VIP e VIP10-28 com o radioisótopo iodo-123 purificado pelas diferentes colunas compactadas conforme item 3.2.5.

Para todos os procedimentos de marcação, as soluções foram filtradas por membrana com porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$  antes da realização dos ensaios de controle de qualidade.

### 3.2.2 - Ensaios de controle da pureza radioquímica

#### a) Método eletroforético

A pureza radioquímica das marcações foi avaliada por meio de eletroforese (Virgolini et al., 1994) utilizando-se fitas de papel Whatman nº 1 (38 x 2 cm), tampão barbiturato de sódio 0,05 M pH 8,6, 300 V e 40 minutos de corrida.

Amostras de Na<sup>131</sup>I e Na<sup>123</sup>I também foram avaliadas nas mesmas condições.

#### b) Método de CLAE

Amostras de VIP (25 µg/500 µL de tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,5), Na<sup>131</sup>I (0,19-0,37 MBq/20 µL) e VIP-<sup>131</sup>I (0,74-1,11 MBq/20 µL) foram analisadas por CLAE em equipamento CG utilizando-se coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (RP-C<sub>18</sub>), 5 µm, 4,6 x 250 mm, eluída isocraticamente com a mistura de solventes acetonitrila/solução aquosa de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (27/73) sob um fluxo de 0,5 mL/minuto e tempo de 20-30 minutos. Foram utilizados detector ultravioleta (UV, 230 nm) e de radiação (Berthold).

Os perfis cromatográficos para os produtos VIP e VIP10-28 (25 µg/500 µL com tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,5), Na<sup>131/123</sup>I (0,07-0,19 MBq/20 µL), VIP-<sup>123</sup>I e VIP10-28-<sup>131/123</sup>I (0,19-0,37 MBq/20 µL) foram determinados por CLAE em equipamento Waters, utilizando-se a mesma coluna descrita acima, eluída com gradiente de TFA 0,1% / acetonitrila: t=0, 90/10, t=1 minuto 80/20, t=36 minutos 62/38 e t=40 minutos 90/10 (Hessenius et al., 2000). Utilizou-se também detector UV (230 nm) e de radiação (Packard).

### 3.2.3 - Análise da pureza radionuclídica do Na<sup>123</sup>I em detector Germânio Hiper Puro (Ge-HP)

Amostra de Na<sup>123</sup>I (2 mL/1,9 MBq), antes da purificação, foi submetida à análise de espectrometria gama, por 7200 segundos, em detector de radiação gama de Ge-HP, Camberra, com resolução de 1,8 keV.

Também foi submetido à análise de espectrometria gama nas condições acima citadas, uma coluna compactada Sep-Pak Plus alumina ácida (A) após treze dias da filtração de uma amostra de Na<sup>123</sup>I (300 µL/3600 MBq).

### 3.2.4 - Purificação dos radiofármacos

#### a) Purificação por CLAE do VIP-<sup>131</sup>I

Injetou-se no sistema CLAE-isocrática (descrito no item 3.2.2-b) uma amostra de 435,81 MBq/100 µL de VIP-<sup>131</sup>I. Aliquotas foram coletadas a cada 30 segundos, totalizando 60 tubos em 30 minutos de corrida.

As frações que continham as espécies de VIP-<sup>131</sup>I, foram reunidas e submetidas à evaporação com N<sub>2</sub> gasoso. As amostras obtidas foram submetidas aos ensaios de controle de qualidade (eletroforese e CLAE-isocrática).

#### b) Purificação por coluna compactada do VIP-<sup>131/123</sup>I e VIP10-28-<sup>131/123</sup>I

Foi utilizada coluna compactada, Sep-Pak light C<sub>18</sub>, para purificar as misturas de VIP-<sup>131/123</sup>I e VIP10-28-<sup>131/123</sup>I, após ativação da coluna que foi realizada com 5 mL de metanol e 1 mL da mistura acetonitrila/TFA 0,1% (10/90).

#### ➤ Purificação simples

O sistema foi utilizado para retirada do radioiodo livre (<sup>131/123</sup>I) das marcações (Marie et al., 1984 e 1985). Foram aplicadas amostras da mistura de VIP-<sup>131/123</sup>I e VIP10-28-<sup>131/123</sup>I (29,6-37 MBq/100 µL) nas colunas compactadas Sep-Pak light C<sub>18</sub> que foram posteriormente eluídas com 2 mL da mistura acetonitrila/TFA 0,1% (10/90) e 2 mL da mistura acetonitrila/TFA 0,1% (60/40). As frações 10/90 e 60/40 (2 mL) foram coletadas e submetidas à análise da pureza radioquímica por técnica eletroforética e CLAE-gradiente.

#### ➤ Purificação composta

O sistema foi utilizado para retirar o <sup>131/123</sup>I e o excedente de peptídeo não marcado (VIP ou VIP10-28 não marcado). Foram analisadas três amostras: VIP ou VIP10-28 (amostra 1), Na<sup>131</sup>I (amostra 2) e VIP-<sup>131</sup>I ou VIP10-28-<sup>131</sup>I (amostra 3). As amostras foram eluídas com quatro frações de 0,5 mL da mistura acetonitrila/TFA 0,1% (10/90), seis frações de 0,5 mL da mistura acetonitrila/TFA 0,1% (20/80), seis frações de 0,5 mL da mistura acetonitrila/TFA 0,1% (27/73) e quatro frações de 0,5 mL da mistura acetonitrila/TFA 0,1% (60/40). Todas as frações foram coletadas em frascos de vidro e identificadas devidamente.

Determinou-se a atividade (MBq) de cada fração das amostras 2 e 3 em calibrador de doses (Capintec) e, para as frações que apresentaram as maiores atividades,

foram realizadas análises eletroforéticas, a saber: a primeira fração da mistura de solventes 10/90 da amostra de Na<sup>131</sup>I (15,13 MBq/0,5 mL), a segunda fração 10/90 (1,38 MBq/0,5 mL), segunda fração 27/73 (6,36 MBq/0,5 mL) e primeira fração 60/40 (23,51 MBq/0,5 mL) das amostras de VIP-<sup>131</sup>I e a primeira fração 10/90 (8,54 MBq/0,5 mL), primeira fração 20/80 (1,33 MBq/0,5 mL), segunda fração 27/73 (31,90 MBq/0,5 mL) e primeira fração 60/40 (13,02 MBq/0,5 mL) do VIP10-28-<sup>131</sup>I.

As frações das amostras 1 foram avaliadas em espectrofotômetro UV-visível (190-400 nm) juntamente com amostras das misturas de solventes 10/90, 20/80, 27/73 e 60/40 (branco).

### 3.2.5 - Purificação do Na<sup>123</sup>I por colunas compactadas

Para realizar a purificação do Na<sup>123</sup>I foram utilizados três tipos de colunas compactadas da Waters: Oasis<sup>®</sup> MCX, Sep-Pak Plus de alumina N (neutra) e Sep-Pak Plus de alumina A (ácida).

#### a) Coluna compactada Oasis<sup>®</sup> MCX

Uma amostra de 649 MBq/200 µL de Na<sup>123</sup>I foi aplicada na coluna sem prévia ativação. A coluna foi eluída com seis frações de 0,5 mL de água destilada, coletadas em frascos tipo penicilina. Após determinação das atividades contidas nos frascos, as frações de 1 a 3 (maiores atividades) foram reunidas em um único frasco, compondo 343 MBq/1,5 mL de iodo-123 em água. O frasco foi submetido a aquecimento para redução do volume, obtendo-se 325 MBq/100 µL de iodo-123.

#### b) Coluna compactada Sep-Pak Plus de alumina N

A ativação da coluna foi realizada com três frações de 10 mL de água destilada seguidas de secagem com ar. Após ativação aplicou-se uma amostra de 455 MBq/100 µL de Na<sup>123</sup>I, eluída com sete frações de 0,5 mL de NaOH 10<sup>-2</sup>M coletadas individualmente em frascos tipo penicilina. Após determinação das atividades, as frações de 3 a 7 (maiores atividades) foram reunidas em um frasco e o volume reduzido por evaporação obtendo-se 359 MBq/120 µL de Na<sup>123</sup>I.

### **c) Coluna compactada Sep-Pak Plus de alumina A**

Não foi necessário ativar a coluna. A ela foi aplicada amostra entre 118-3611 MBq/100-300  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}^{123}\text{I}$ , seguida de eluição com cinco frações de 1 mL de solução de NaCl 0,9% e após determinação das atividades de cada frasco, os volumes dos frascos 2 e 3 foram reunidos, levado à secura e retomado com NaOH  $10^{-2}\text{M}$  (74-2201 MBq/100-150  $\mu\text{L}$  de NaOH  $10^{-2}\text{M}$ ).

### **3.2.6 - Cultivo das células de adenocarcinoma de cólon retal humano (HT-29)**

A linhagem de células HT-29 foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas no Laboratório de Cultura Celular do Centro de Biologia Molecular (CBM) do IPEN/CNEN em meio RPMI 1640 (Cultilab), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (penicilina e estreptomicina, Cultilab). Para inoculação em camundongos, as células foram injetadas intradermicamente no dorso do animal na concentração de  $5 \times 10^5$  células em 100  $\mu\text{L}$  de PBS (Marie et al. 1984 e 1985; Virgolini et al., 1994; Liu et al., 1996 e 2002).

### **3.2.7 - Estudo da distribuição biológica do VIP- $^{131/123}\text{I}$ e VIP10-28- $^{131/123}\text{I}$ em animais de laboratório**

#### **a) Método invasivo**

Todos os animais utilizados nos estudos de distribuição biológica foram obtidos no Biotério do Centro de Biologia Molecular do IPEN/CNEN.

Este procedimento foi aplicado a todos os experimentos realizados com camundongos *Nude* e *Swiss* normais e com tumores (N=5-6), utilizados nos estudos de biodistribuição do VIP- $^{131}\text{I}$  e VIP10-28- $^{131}\text{I}$ . Os animais receberam injeção do radiofármaco (0,45-0,66 MBq/100  $\mu\text{L}$ ) na veia caudal e após 1, 4 e 24 horas foram sacrificados por decaptação e retirados os tecidos/órgãos: cérebro, tireóide, pulmão, coração, baço, fígado, estômago (vazio), músculo (amostra da pata traseira), rins, intestinos delgado e grosso com conteúdo, tumor e cauda. Amostras de 100  $\mu\text{L}$  de sangue foram coletadas com capilar heparinizado da veia sinus orbital antes do sacrifício do animal. Os tecidos/órgãos foram retirados, lavados, colocados em tubos apropriados e submetidos à contagem em contador gama tipo poço (Packard). Aliquotas, correspondentes à dose

injetada, serviram de padrão de referência para calcular a porcentagem da radioatividade incorporada em cada espécime biológica (Araújo, 1995).

Para os estudos de biodistribuição os animais não passaram por tratamento de bloqueio da glândula tireóide, como também não foram anestesiados.

As % dose nos cálculos em questão correspondem às porcentagens das atividades administradas do radiofármaco.

Os cálculos foram realizados conforme descrito abaixo:

$$\% \text{ dose/órgão} = \text{cpm órgão} / \text{cpm padrão} \times 100 \quad (3.1)$$

$$\% \text{ dose/grama} = \% \text{dose/órgão} / \text{peso do órgão correspondente} \quad (3.2)$$

$$\text{volemia (mL)} = \text{peso corpóreo animal (g)} \times 0,07 \text{ (mL/g)} \quad (3.3)$$

$$\% \text{ dose/sangue total} = \text{volemia (mL)} \times \text{cpm sangue} / \text{cpm padrão} \times 100 \quad (3.4)$$

$$\% \text{ dose/grama músculo} = \text{cpm músculo} / \text{peso músculo (g)} \times \text{cpm padrão} \times 100 \quad (3.5)$$

$$\% \text{ dose músculo total} = 0,4 \text{ peso corpóreo animal (g)} \times \% \text{dose/g músculo} \quad (3.6)$$

onde: cpm = contagem por minuto

Foi determinada a pureza radioquímica por análise eletroforética de todas as marcações utilizadas nos estudos de biodistribuição.

Os estudos de biodistribuição realizados foram:

- VIP-<sup>131</sup>I e VIP10-28-<sup>131</sup>I sem purificação, injetados em camundongos *Swiss* normais;
- VIP-<sup>131</sup>I com purificação simples e composta, injetado em camundongos *Swiss* com tumor;
- VIP-<sup>131</sup>I e VIP10-28-<sup>131</sup>I sem purificação, injetados em camundongos *Nude* com tumor;

## **b) Estudos cintilográficos**

As imagens foram obtidas no Centro de Medicina Nuclear (CMN) da Faculdade de Medicina da USP, em câmara gama Siemens LEM, portátil, analógica com campo de visão circular pequeno, analisador multicanal de espectro entre 15 keV e 510 keV e janela de energia para iodo-131/123, colimador pinhole, computador de aquisição de imagens compatível IBM/PC Intel Pentium 133, sistema operacional Windows 98, software de aquisição de imagens PIP, placa de aquisição de dados IMAGAMMA e equipado com software ImageJ para processamento de imagens.

Doses de 22,94 MBq/100  $\mu$ L de VIP-<sup>131</sup>I com purificação composta foram administradas intravenosamente em camundongo *Swiss* e rato *Wistar* com tumor e camundongo *Swiss* normal (controle). Os animais utilizados neste experimento foram tratados com solução de iodeto de potássio (KI) 10% via oral durante dois dias antes da administração do radiofármaco para bloqueio da tireóide e, mantidos em condições *ad libitum* com livre acesso a água. Momentos antes da obtenção das imagens foram anestesiados com solução de uretana (100 mg/100 g do peso corpóreo do animal). Todos os animais foram posicionados em decúbito dorsal.

Um segundo estudo cintilográfico foi realizado com VIP-<sup>123</sup>I e VIP10-28-<sup>123</sup>I após purificação simples. Doses de 5,37 MBq/250  $\mu$ L de VIP-<sup>123</sup>I e 3,52 MBq/250  $\mu$ L de VIP10-28-<sup>123</sup>I foram administradas intravenosamente em camundongos *Nude* com tumor. Os animais utilizados neste experimento foram mantidos em condições *ad libitum* com livre acesso a água e 60 minutos antes da injeção dos radiofármacos em dois camundongos *Nude* com tumor, foi administrada intraperitonal, uma dose de 200  $\mu$ g/100  $\mu$ L do antagonista do VIP (TAB. 1). Nenhum outro tipo de tratamento foi realizado com este grupo de animais e momentos antes da obtenção das imagens foram anestesiados com solução de uretana (100 mg/100 g do peso corpóreo do animal). As imagens foram adquiridas com os animais em posição lateral. Realizou-se cálculo da quantificação (porcentagem) da bexiga como área de interesse. Para o cálculo em questão utilizou-se a relação da contagem da bexiga pela contagem do corpo inteiro (cpm bexiga / cpm C.I.) para todos os animais e tempos estudados.

### 3.2.8 - Estudos *in vitro*

#### a) Estudo para determinação da porcentagem de ligação do VIP-<sup>131</sup>I e VIP10-28-<sup>131</sup>I às proteínas plasmáticas

A porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas foi avaliada pelo método de precipitação protéica com ácido tricloroacético (TCA) 10%.

Para este estudo utilizou-se um grupo de doze camundongos *Swiss* normais, correspondendo a seis animais para cada radiofármaco injetado. Foram administradas doses de 1,85 MBq/100 µL do VIP-<sup>131</sup>I e 1,55 MBq/100 µL do VIP10-28-<sup>131</sup>I por via intravenosa e após 60 minutos da aplicação, amostras sanguíneas foram coletadas da veia sinus orbital e centrifugadas a 3500 rpm por 10 minutos à temperatura de 20°C. Uma alíquota de 100 µL de plasma humano de doadores saudáveis (inicial) de cada amostra foi precipitada com a adição de 1 mL de TCA 10%. Após agitação por um minuto em *vortex* procedeu-se a centrifugação nas mesmas condições. A operação foi repetida por mais duas vezes com TCA 10%. As amostras de plasma (inicial) e precipitado (pptado) foram contadas em contador gama e a porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas calculadas a partir das amostras de plasma inicial.

$$\% \text{ de lig. do radiofármaco às proteínas plasmáticas} = (\text{cpm pptado} / \text{cpm } 100 \mu\text{L plasma inicial}) \times 100 \quad (3.7)$$

#### 3.2.9 - Estudo da determinação da estabilidade do VIP-<sup>131</sup>I e VIP10-28-<sup>131</sup>I em plasma humano

Neste estudo foi avaliada a estabilidade dos radiofármacos em plasma pelo método *in vitro* incubando-se VIP-<sup>131</sup>I e VIP10-28-<sup>131</sup>I em amostras de plasma humano.

Uma amostra de 10 mL de sangue humano heparinizado (100 µL de heparina), foi centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm à temperatura ambiente para separação do plasma. Foram amostrados 2 mL de plasma em tubos apropriados, adicionados 5,55 MBq/100 µL do VIP-<sup>131</sup>I ou VIP10-28-<sup>131</sup>I e incubados em banho-maria à 37 °C por 24 horas. Realizou-se duplicata para cada produto e nos tempos de 1, 4 e 24 horas foram retiradas alíquotas para determinação da pureza radioquímica por análise eletroforética, para avaliar a estabilidade dos radiofármacos no meio plasmático.

### 3.2.10 - Ensaio de ligação e internalização do VIP-<sup>131</sup>I e VIP10-28-<sup>131</sup>I nas células de adenocarcinoma de cólon retal humano (HT-29)

Aos tubos cônicos contendo 1 mL de tampão de internalização (soro fetal bovino-SFB e meio de cultura F12K) foram adicionados  $1 \times 10^6$  células. Para cada radiofármaco estudado, foram preparadas triplicatas para a série específica e não específica.

Aos tubos utilizados para a série específica foram adicionados 100  $\mu$ L VIP-<sup>131</sup>I ou VIP10-28-<sup>131</sup>I (1850 MBq) e para os tubos da série não específica, além do radiofármaco, foram adicionados 20  $\mu$ g de VIP ou VIP10-28/40  $\mu$ L de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,5. O mesmo volume (100  $\mu$ L) de cada radiofármaco foi aliquoteado em triplicata, em tubos de contagem para determinação da contagem padrão (cpm padrão).

Todos os tubos foram incubados em banho-maria à 37 °C por uma hora, depois centrifugados a 1600 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. Removeu-se o sobrenadante, adicionou-se 1 mL de PBS 0,1M pH 7,5 contendo soro albumina bovino (SAB) 0,5%, homogeneizou-se e novamente foi centrifugado a 1600 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. O procedimento foi repetido por mais uma vez. Todos os sobrenadantes foram desprezados e adicionado às células 1 mL de tampão de lavagem ácido (solução de glicina 50 mM pH 2,8/NaCl 0,1M) e os tubos foram incubados à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugados a 1600 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes foram reservados e as células lavadas com 1 mL de tampão de lavagem ácido e novamente os tubos foram centrifugados a 1600 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes foram reunidos aos anteriores em cada tubo específico e contados em contador gama tipo poço (contagens ácido - cpm H). Esta contagem representa a porcentagem de ligação do radiofármaco às células HT-29.

Aos tubos cônicos contendo o botão celular adicionou-se 1 mL de NaOH 1N e agitou-se em *vortex* até dissolução completa do botão. Todo o homogeneizado foi transferido para tubos apropriados para contagem da atividade em contador gama tipo poço (contagens alcalina - cpm OH). Esta contagem representa a porcentagem de ligação do radiofármaco que ficou internalizado nas células HT-29.

$$\% \text{ de ligação} = (\text{cpm OH} + \text{cpm H}) / \text{cpm padrão} \times 100 \quad (3.8)$$

$$\% \text{ de internalização} = \text{cpm OH} / (\text{cpm OH} + \text{cpm H}) \times 100 \quad (3.9)$$

A porcentagem de ligação às células HT-29 específica corresponde à subtração da porcentagem média obtida na série específica da porcentagem média obtida na série não específica.

## 4 - RESULTADOS

### 4.1 - ESTUDOS DE MARCAÇÃO, AVALIAÇÃO DA PUREZA RADIOQUÍMICA E MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO

#### 4.1.1 - Perfil eletroforético do radioiodo e misturas de marcação

A FIG. 4 ilustra o perfil eletroforético do VIP-<sup>131/123</sup>I, VIP10-28-<sup>131/123</sup>I e radioiodos.

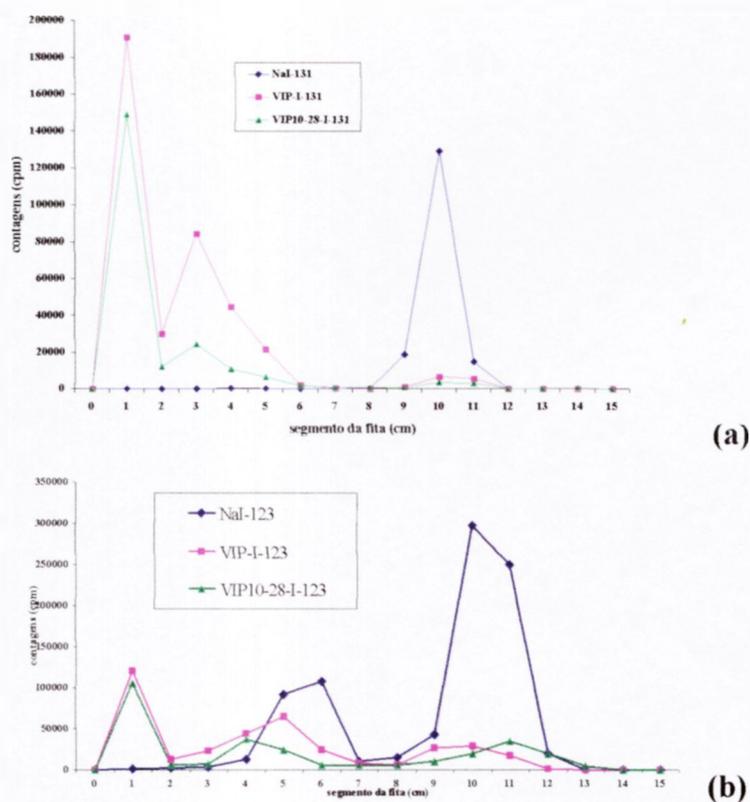


FIGURA 4 - Perfis eletroforéticos do VIP-<sup>131</sup>I, VIP10-28-<sup>131</sup>I e Na<sup>131</sup>I (a) e do VIP-<sup>123</sup>I, VIP10-28-<sup>123</sup>I e Na<sup>123</sup>I (b)

- ♦ Na<sup>131/123</sup>I: o primeiro pico com distância de migração (Rf) igual a 0,26-0,46, corresponde ao Iodato (<sup>131/123</sup>IO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e o segundo com Rf=0,60-0,80 correspondente ao Iodeto (<sup>131/123</sup>I<sup>-</sup>);

- ♦ **VIP-<sup>131/123</sup>I e VIP10-28-<sup>131/123</sup>I**: o primeiro pico com Rf=0,00-0,13 correspondente às espécies de VIP-<sup>131/123</sup>I e VIP10-28-<sup>131/123</sup>I, o segundo com Rf=0,20-0,40 correspondente as espécies de VIP-<sup>131/123</sup>I, VIP10-28-<sup>131/123</sup>I e <sup>131/123</sup>IO<sub>3</sub><sup>-</sup> e o terceiro pico com Rf=0,60-0,80 que corresponde ao <sup>131/123</sup>I<sup>-</sup>.

#### 4.1.2 - Estudo dos parâmetros de marcação

Nas TAB. 3 e 4 observam-se os resultados de análises eletroforéticas dos estudos dos parâmetros de marcação do VIP e VIP10-28 com iodo-131, respectivamente.

TABELA 3 - Marcação do VIP com Na<sup>131</sup>I: estudo dos parâmetros de marcação\*

Oxidante		Tempo de reação		Pureza radioquímica do VIP- <sup>131</sup> I (%)	Rendimento de marcação (%)	
Cloramina T	25 µg VIP / 5 µL Cl T	SEGUNDOS	30	93,56 ± 0,50	80 - 95	
			1	97,32 ± 1,50		
		MINUTO(S)	2	96,78 ± 1,95		
			3	95,35 ± 2,37		
	12,5 µg VIP / 5 µL Cl T	SEGUNDOS	5	33,87 ± 4,94	65 - 90	
			15	47,51 ± 8,54		
			30	81,44 ± 8,86		
		MINUTO(S)	1	93,58 ± 3,80		
2	96,51 ± 2,96					
3	83,75 ± 4,30					
Iodogen	suspensão	25 µg VIP	30 MINUTOS	3 µg	86,26 ± 3,21	75 - 90
				6 µg	95,47 ± 3,94	
				12 µg	98,29 ± 0,50	
	película			5 µg	91,97 ± 3,48	45 - 75
				10 µg	91,77 ± 1,72	
				15 µg	95,98 ± 0,78	

(N=3); \* resultados de análises eletroforéticas

TABELA 4 - Marcação do VIP10-28 com Na<sup>131</sup>I: estudo dos parâmetros de marcação\*

Oxidante		Tempo de reação		Pureza radioquímica do VIP10-28- <sup>131</sup> I (%)	Rendimento de marcação (%)	
Cloramina T	25 µg VIP / 5 µL Cl T	SEGUNDOS	15	91,56 ± 7,43	75 - 95	
			30	95,16 ± 1,82		
		MINUTO(S)	1	96,17 ± 1,89		
			2	96,90 ± 1,60		
	12,5 µg VIP / 5 µL Cl T	SEGUNDOS	3	96,81 ± 1,40	60 - 80	
			15	88,61 ± 9,46		
		MINUTO(S)	30	97,88 ± 1,49		
			1	98,15 ± 1,65		
Iodogen	suspensão	25 µg VIP	30 MINUTOS	2	98,08 ± 0,18	60 - 80
				3	96,72 ± 0,92	
				5	99,71 ± 0,09	
	película			3 µg	98,75 ± 0,54	40 - 70
				6 µg	99,24 ± 0,47	
				12 µg	99,11 ± 0,19	
película	5 µg	99,06 ± 0,76	40 - 70			
	10 µg	99,60 ± 0,31				
	15 µg	99,86 ± 0,08				
	20 µg	99,71 ± 0,09				

(N=3); \* resultados de análises eletroforéticas

Os resultados obtidos nos estudos da relação atividade do Na<sup>131</sup>I/massa do peptídeo (MBq/µg) podem ser visualizados na TAB. 5.

TABELA 5 - Pureza radioquímica do estudo da relação atividade do Na<sup>131</sup>I/massa do peptídeo (MBq/µg)

Relação atividade/massa (MBq/µg)	Pureza radioquímica do VIP- <sup>131</sup> I* (%)	Pureza radioquímica do VIP10-28- <sup>131</sup> I** (%)
1,5	97,32 ± 1,50	96,17 ± 1,89
2,9	93,58 ± 3,80	98,15 ± 1,65
5,9	80,32 ± 1,28	79,77 ± 4,39
6,9 - 7,1***	82,48 ± 1,20	83,70 ± 1,02
11,8	81,01 ± 4,73	76,63 ± 7,31
23,6	79,56 ± 3,84	78,23 ± 7,85

\* 5µL de Cloramina T, 1 minuto de reação (N=3)

\*\* 5µL de Cloramina T, 2 minutos de reação (N=3)

\*\*\* marcações com alta atividade (N=2)

A TAB. 6 sintetiza os resultados de marcação com iodo-123 em diferentes condições, empregando-se 25 µg do peptídeo. Para as três primeiras marcações foi utilizado o mesmo radioiodo.

TABELA 6 - Estudo dos parâmetros de marcação do VIP (25 µg) com Na<sup>123</sup>I e purificação simples (fração 60/40)

Marcações	Picos obtidos nas análises eletroforéticas	Na <sup>123</sup> I não purificado (%)	Pureza radioquímica do VIP- <sup>123</sup> I não purificado (%)	VIP- <sup>123</sup> I purificado (fração 60/40)	
				Pureza radioquímica (%)	Rendimento de marcação (%)
1 (*)	1 ( <sup>123</sup> I)	68,92 ± 3,10	27,56 ± 3,55	2,36 ± 0,32	21,82
	2 ( <sup>123</sup> IO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	26,67 ± 3,10	-	-	
	2 ( <sup>123</sup> IO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + VIP- <sup>123</sup> I)	-	58,99 ± 2,69	<u>11,33 ± 1,08</u>	
	3 (VIP- <sup>123</sup> I)	-	9,27 ± 1,14	86,40 ± 2,26	
2 (**)	1 ( <sup>123</sup> I)		27,14 ± 1,70	1,17 ± 0,15	19,34
	2 ( <sup>123</sup> IO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )		-	-	
	2 ( <sup>123</sup> IO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + VIP- <sup>123</sup> I)		63,82 ± 1,19	<u>15,65 ± 2,29</u>	
	3 (VIP- <sup>123</sup> I)		9,38 ± 0,66	83,18 ± 2,82	
3 (***)	1 ( <sup>123</sup> I)		36,30 ± 1,68	1,02 ± 0,02	35,82
	2 ( <sup>123</sup> IO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )		-	-	
	2 ( <sup>123</sup> IO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + VIP- <sup>123</sup> I)		51,68 ± 2,74	<u>8,97 ± 0,95</u>	
	3 (VIP- <sup>123</sup> I)		11,05 ± 1,63	90,01 ± 0,34	
4 (****)	1 ( <sup>123</sup> I)	97,12 ± 0,36	59,78 ± 2,35	17,94 ± 0,92	9,26
	2 ( <sup>123</sup> IO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	2,88 ± 0,36	-	-	
	2 ( <sup>123</sup> IO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + VIP- <sup>123</sup> I)	-	34,83 ± 2,83	<u>18,30 ± 1,60</u>	
	3 (VIP- <sup>123</sup> I)	-	5,40 ± 0,49	63,77 ± 2,52	

(\*) 5 minutos de reação e pH=7,5

(\*\*) 5 minutos de reação e pH=6,5

(\*\*\*) 5 minutos de reação e pH=6,0

(\*\*\*\*) 1 minuto de reação e pH=7,5

Na TAB. 7 encontram-se os resultados dos estudos de marcação do VIP com iodo-123 empregando-se 50 µg do peptídeo.

TABELA 7 - Estudo dos parâmetros de marcação do VIP (50 µg) com Na<sup>123</sup>I e purificação simples (fração 60/40)

Marcações	Picos obtidos nas análises eletroforéticas	Na <sup>123</sup> I não purificado (%)	Pureza radioquímica do VIP- <sup>123</sup> I não purificado (%)	VIP- <sup>123</sup> I purificado (fração 60/40)	
				Pureza radioquímica (%)	Rendimento de marcação (%)
1 <sup>*</sup> (*)	1 ( <sup>123</sup> I)	73,01 ± 5,73	32,77 ± 11,63	0,45 ± 0,10	46,10
	2 ( <sup>123</sup> IO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	25,19 ± 5,73	-	-	
	2 ( <sup>123</sup> IO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + VIP- <sup>123</sup> I)	-	29,89 ± 0,46	<u>30,47 ± 2,90</u>	
	3 (VIP- <sup>123</sup> I)	-	37,16 ± 12,88	68,40 ± 2,85	
2 <sup>**</sup> (**)	1 ( <sup>123</sup> I)	91,30 ± 0,34	39,63 ± 8,26	0,87 ± 0,50	30,91
	2 ( <sup>123</sup> IO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	8,02 ± 0,34	-	-	
	2 ( <sup>123</sup> IO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + VIP- <sup>123</sup> I)	-	5,73 ± 3,10	<u>28,89 ± 1,77</u>	
	3 (VIP- <sup>123</sup> I)	-	54,60 ± 4,55	69,99 ± 1,50	
3 <sup>**</sup> (**)	1 ( <sup>123</sup> I)	61,31 ± 4,38	31,46 ± 2,98	0,81 ± 0,09	28,57
	2 ( <sup>123</sup> IO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	36,66 ± 4,38	-	-	
	2 ( <sup>123</sup> IO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + VIP- <sup>123</sup> I)	-	47,23 ± 1,15	<u>34,94 ± 2,83</u>	
	3 (VIP- <sup>123</sup> I)	-	18,84 ± 4,19	62,45 ± 4,33	

(\*) 1 minuto de reação e foi realizada limpeza no porta-alvo

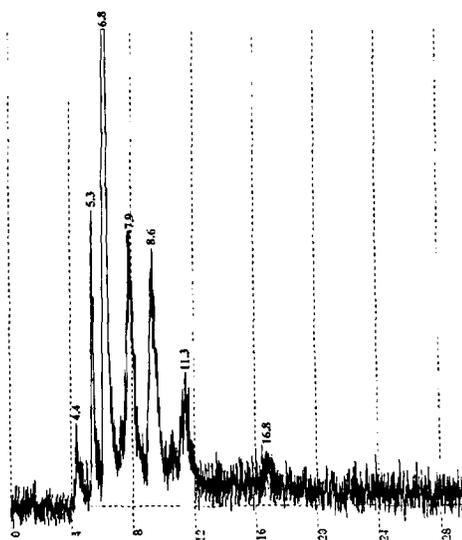
(\*\*) 3 minutos de reação

#### 4.1.3 - Perfis de CLAE do radioiodo e misturas de marcação

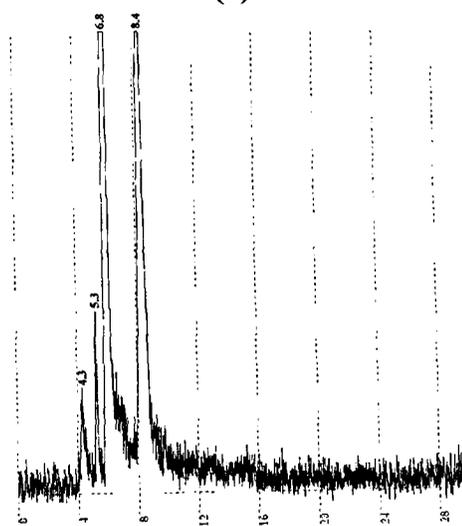
Na FIG. 5 observam-se os perfis cromatográficos de CLAE-isocrática para as espécies do VIP-<sup>131</sup>I utilizando-se como agente oxidante Iodogen (a) e Cloramina T (b) e do Na<sup>131</sup>I (c).

A FIG. 6 apresenta o perfil cromatográfico de CLAE-gradiente da marcação do VIP10-28-<sup>131</sup>I ao utilizar-se Iodogen na forma de suspensão (a) e Cloramina T (b) e do Na<sup>131</sup>I (c).

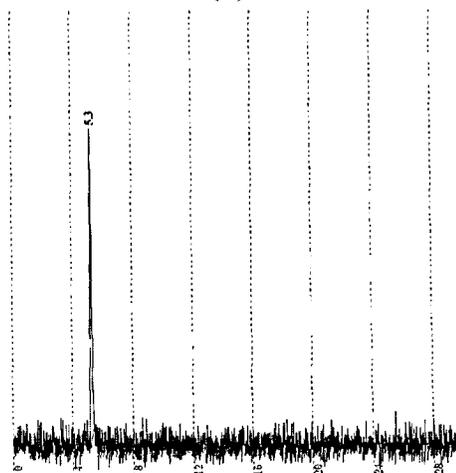
Para o Iodogen película obteve-se perfil semelhante ao da forma de suspensão para ambos os sistemas de CLAE.



(a)

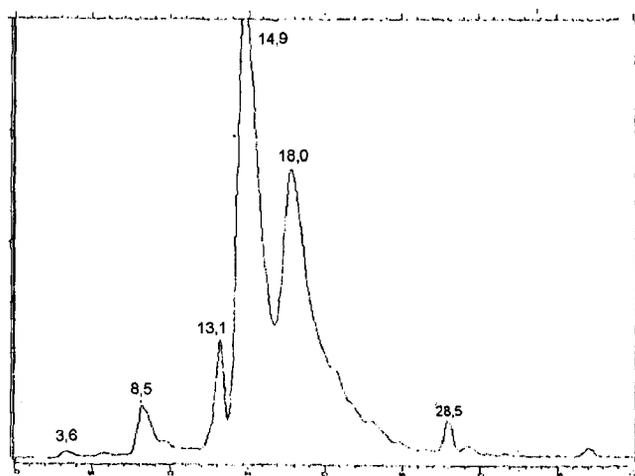


(b)

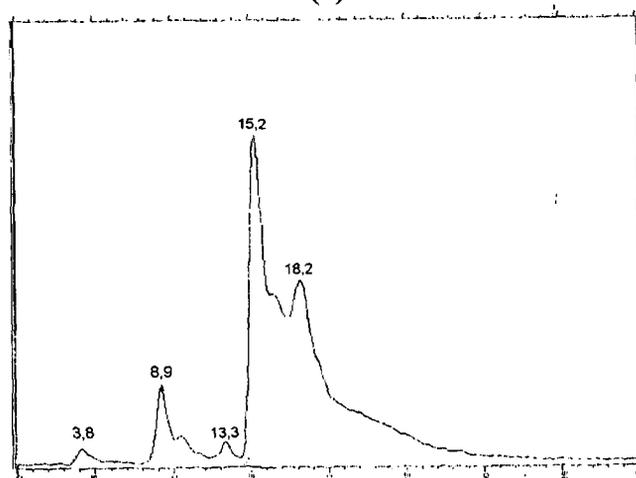


(c)

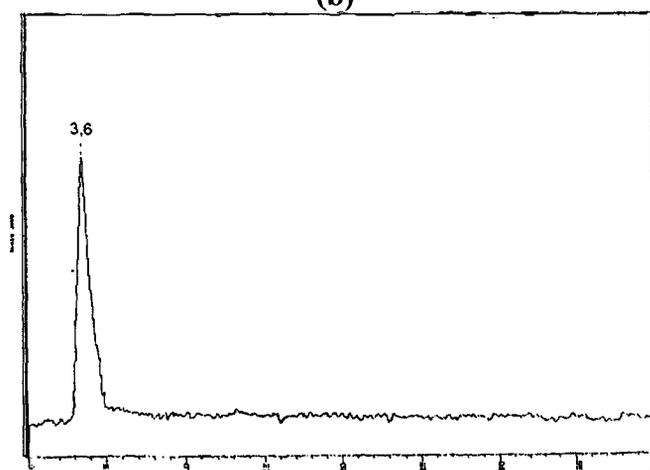
FIGURA 5 - Perfis de CLAE-isocrática das espécies do VIP- $^{131}\text{I}$  utilizando-se 25  $\mu\text{g}$  de VIP/12  $\mu\text{g}$  de Iodogen suspensão (a), Cloramina T com 25  $\mu\text{g}$  de VIP/1 minuto de reação (b) e do  $\text{Na}^{131}\text{I}$  (c)



(a)



(b)



(c)

FIGURA 6 - Perfis de CLAE-gradiente das espécies do VIP10-28- $^{131}\text{I}$  utilizando-se 12  $\mu\text{g}$  de Iodogen em suspensão/ 25  $\mu\text{g}$  de VIP10-28 (a) e Cloramina T com 25  $\mu\text{g}$  de VIP10-28/2 minutos de reação (b) e do  $\text{Na}^{131}\text{I}$  (c)

Os cromatogramas de CLAE-gradiente do VIP- $^{123}\text{I}$  (a) e  $\text{Na}^{123}\text{I}$  (b) podem ser observados na FIG. 7.

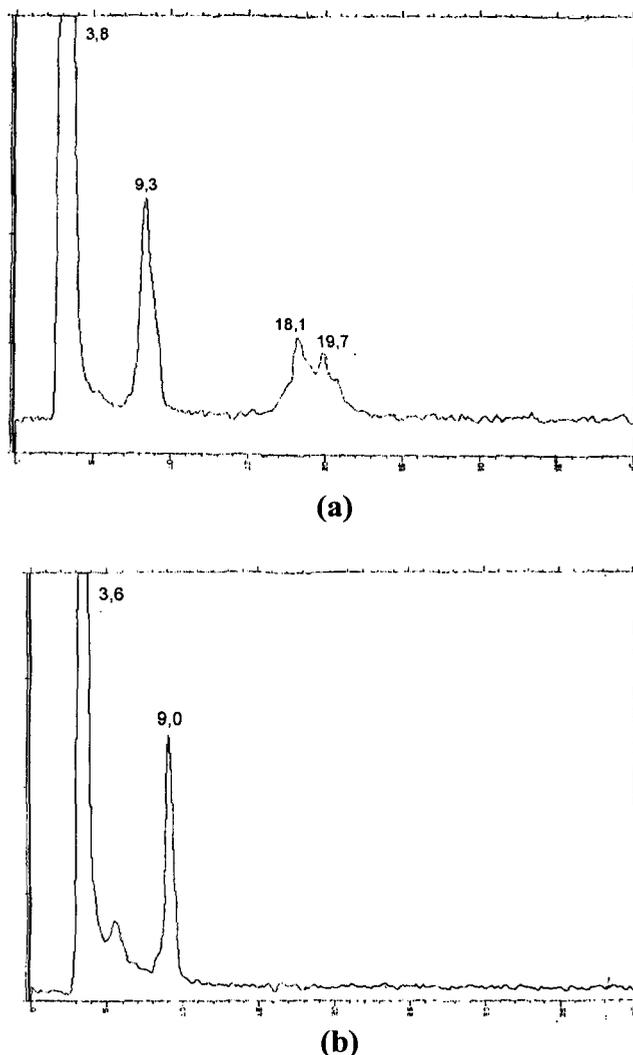


FIGURA 7 - Perfis de CLAE-gradiente das espécies do VIP- $^{123}\text{I}$  utilizando-se Cloramina T como agente oxidante, 25  $\mu\text{g}$  de VIP e 1 minuto de reação (a) e do  $\text{Na}^{123}\text{I}$  (b)

#### 4.1.4 - Análise do $\text{Na}^{123}\text{I}$ em detector Germânio Hiper Puro (Ge-HP)

Na TAB. 8 encontra-se o resultado da análise de espectrometria gama realizada no detector Ge-HP da amostra de  $\text{Na}^{123}\text{I}$ .

A análise de espectrometria gama da coluna compactada Sep-Pak Plus alumina A, após treze dias da passagem de uma amostra de  $\text{Na}^{123}\text{I}$  em detector de radiação gama de Ge-HP, evidencia-se na TAB. 9.

TABELA 8 - Análise de espectrometria gama do Na<sup>123</sup>I em detector Germânio Hiper Puro

Energia (keV)	Área correspondente à energia	Radioisótopo correspondente à energia
158,99	2,21 x 10 <sup>5</sup>	I-123
213,06	1,68 x 10 <sup>3</sup>	Te-121m
470,58	2,58 x 10 <sup>4</sup>	Te-121
507,72	2,96 x 10 <sup>5</sup>	Te-121
529,06	8,29 x 10 <sup>2</sup>	I-123
573,33	1,20 x 10 <sup>6</sup>	Te-121
778,62	4,96 x 10 <sup>3</sup>	Tc-96
813,06	3,94 x 10 <sup>3</sup>	Tc-96
850,43	4,55 x 10 <sup>3</sup>	Tc-96
1127,66	5,16 x 10 <sup>2</sup>	Tc-96
1462,03	1,29 x 10 <sup>2</sup>	K-40

TABELA 9 - Análise de espectrometria gama da coluna compactada Sep-Pak Plus alumina A em detector Germânio Hiper Puro após filtração de uma amostra de Na<sup>123</sup>I depois de treze dias da filtração

Energia (keV)	Área correspondente à energia	Radioisótopo correspondente à energia
159,00	9,30 x 10 <sup>4</sup>	Te-123m
212,74	1,01 x 10 <sup>4</sup>	Te-121m
470,46	1,64 x 10 <sup>5</sup>	Te-121
507,37	1,85 x 10 <sup>6</sup>	Te-121
572,89	7,45 x 10 <sup>6</sup>	Te-121
1460,37	1,76 x 10 <sup>2</sup>	K-40

#### 4.1.5 - Purificação do Na<sup>123</sup>I por colunas compactadas e influência no rendimento de marcação do VIP e VIP10-28

Na TAB. 10 encontram-se os resultados da pureza radioquímica obtidos nos processos de purificação do Na<sup>123</sup>I pelas diferentes colunas compactadas, assim como os resultados de pureza radioquímica do radiofármaco antes e após purificações simples. Foram utilizados diferentes lotes Na<sup>123</sup>I para cada coluna.

Nas TAB. 11 e 12 observam-se as purificações realizadas por coluna compactada Sep-Pak Plus Alumina A com três amostras de  $\text{Na}^{123}\text{I}$  e marcações de VIP e VIP10-28, respectivamente.

TABELA 10 - Análises eletroforéticas do  $\text{Na}^{123}\text{I}$  filtrado por diferentes colunas compactadas e das marcações\* do VIP com o radioiodo obtido de cada coluna antes e após purificação simples

Coluna compactada	Picos obtidos nas análises eletroforéticas	$\text{Na}^{123}\text{I}$ após filtração (%)	Pureza radioquímica do VIP- $^{123}\text{I}$ * não purificado (%)	Purificação simples	
				Pureza radioquímica fração 60/40 (%)	Rendimento de marcação fração 60/40 (%)
Oasis <sup>®</sup> MCX	1 ( $^{123}\text{I}^-$ )	93,49 ± 0,49	67,19 ± 5,01	2,63 ± 0,43	11,2
	2 ( $^{123}\text{IO}_3^-$ )	3,22 ± 0,49	-	-	
	2 ( $^{123}\text{IO}_3^- + \text{VIP-}^{123}\text{I}$ )	-	25,63 ± 4,70	24,31 ± 0,27	
	3 (VIP- $^{123}\text{I}$ )	-	6,59 ± 1,35	69,83 ± 0,58	
Sep-Pak Plus Alumina N	1 ( $^{123}\text{I}^-$ )	87,92 ± 4,99	31,16 ± 1,35	1,30 ± 0,05	42,2
	2 ( $^{123}\text{IO}_3^-$ )	12,09 ± 4,99	-	-	
	2 ( $^{123}\text{IO}_3^- + \text{VIP-}^{123}\text{I}$ )	-	38,24 ± 0,34	21,81 ± 5,52	
	3 (VIP- $^{123}\text{I}$ )	-	30,16 ± 1,68	76,89 ± 5,52	
Sep-Pak Plus** Alumina A	1 ( $^{123}\text{I}^-$ )	76,80 ± 3,10	27,99 ± 5,46	5,01 ± 1,01	65,2
	2 ( $^{123}\text{IO}_3^-$ )	23,21 ± 3,10	-	-	
	2 ( $^{123}\text{IO}_3^- + \text{VIP-}^{123}\text{I}$ )	-	10,28 ± 0,99	28,98 ± 2,22	
	3 (VIP- $^{123}\text{I}$ )	-	61,74 ± 6,46	65,95 ± 3,09	

(\*) 25 µg de VIP e 1 minuto de reação

(\*\*) foi realizada limpeza no porta-alvo

TABELA 11 - Análises eletroforéticas de diferentes lotes de Na<sup>123</sup>I filtrados por coluna compactada Sep-Pak Plus alumina A e das marcações do VIP com o radioiodo obtido de cada filtração

Coluna compactada Sep-Pak Plus Alumina A	Picos obtidos nas análises eletroforéticas	Na <sup>123</sup> I após filtração (%)	Pureza radioquímica do VIP- <sup>123</sup> I não purificado (%)	Purificação simples	
				Pureza radioquímica fração 60/40 (%)	Rendimento de marcação fração 60/40 (%)
1 <sup>a</sup> *	1 ( <sup>123</sup> I)	73,46 ± 1,46	4,20 ± 0,81	8,18 ± 1,51	53,3
	2 ( <sup>123</sup> IO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	26,54 ± 1,46	-	-	
	2 ( <sup>123</sup> IO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + VIP- <sup>123</sup> I)	-	49,00 ± 2,55	<u>24,39 ± 3,44</u>	
	3 (VIP- <sup>123</sup> I)	-	46,80 ± 1,74	67,43 ± 1,94	
2 <sup>a</sup> **	1 ( <sup>123</sup> I)	87,55 ± 1,31	24,48 ± 3,13	1,90 ± 0,16	57,3
	2 ( <sup>123</sup> IO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	12,46 ± 1,31	-	-	
	2 ( <sup>123</sup> IO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + VIP- <sup>123</sup> I)	-	15,58 ± 0,81	<u>26,07 ± 2,71</u>	
	3 (VIP- <sup>123</sup> I)	-	59,95 ± 3,94	72,04 ± 2,88	
3 <sup>a</sup> ***	1 ( <sup>123</sup> I)	70,87 ± 1,22	50,35 ± 0,25	2,41 ± 0,13	36,0
	2 ( <sup>123</sup> IO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	29,14 ± 1,22	-	-	
	2 ( <sup>123</sup> IO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + VIP- <sup>123</sup> I)	-	10,98 ± 1,39	<u>14,09 ± 0,69</u>	
	3 (VIP- <sup>123</sup> I)	-	38,67 ± 1,13	83,50 ± 0,81	

(\*) 50 µg de VIP e 3 minutos de reação

(\*\*) 50 µg de VIP e 5 minutos de reação

(\*\*\*) 25 µg de VIP e 5 minutos de reação, produto utilizado na obtenção de imagem cintilográfica

TABELA 12 - Análises eletroforéticas de diferentes lotes de Na<sup>123</sup>I filtrados por coluna compactada Sep-Pak Plus Alumina A e das marcações do VIP10-28 com o radioiodo obtido de cada filtração

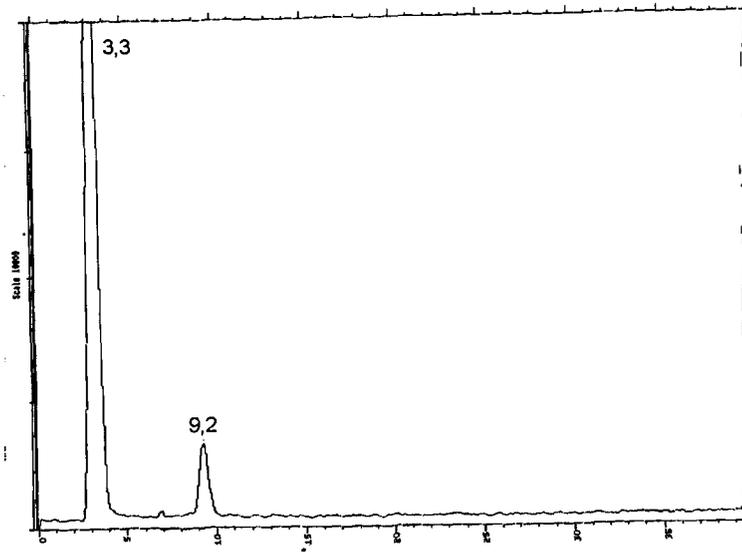
Coluna compactada Sep-Pak Plus Alumina A	Picos obtidos nas análises eletroforéticas	Na <sup>123</sup> I após filtração (%)	Pureza radioquímica do VIP10-28- <sup>123</sup> I não purificado (%)	Purificação simples	
				Pureza radioquímica fração 60/40 (%)	Rendimento de marcação fração 60/40 (%)
1 <sup>a</sup> .*	1 ( <sup>123</sup> I)	73,46 ± 1,46	38,35 ± 2,81	9,60 ± 2,53	40,3
	2 ( <sup>123</sup> IO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	26,54 ± 1,46	-	-	
	2 ( <sup>123</sup> IO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + VIP10-28- <sup>123</sup> I)	-	16,03 ± 0,59	8,43 ± 1,22	
	3 (VIP10-28- <sup>123</sup> I)	-	45,63 ± 2,22	81,96 ± 1,32	
2 <sup>a</sup> .**	1 ( <sup>123</sup> I)	87,55 ± 1,31	37,84 ± 1,75	3,16 ± 0,89	58,2
	2 ( <sup>123</sup> IO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	12,46 ± 1,31	-	-	
	2 ( <sup>123</sup> IO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + VIP10-28- <sup>123</sup> I)	-	48,80 ± 4,05	39,89 ± 0,83	
	3 (VIP10-28- <sup>123</sup> I)	-	13,37 ± 2,30	56,96 ± 1,72	
3 <sup>a</sup> .***	1 ( <sup>123</sup> I)	70,87 ± 1,22	46,59 ± 2,98	2,76 ± 0,30	31,0
	2 ( <sup>123</sup> IO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	29,14 ± 1,22	-	-	
	2 ( <sup>123</sup> IO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + VIP10-28- <sup>123</sup> I)	-	21,53 ± 2,16	22,04 ± 2,88	
	3 (VIP10-28- <sup>123</sup> I)	-	31,90 ± 0,85	75,20 ± 2,59	

(\*) 25 µg de VIP10-28 e 2 minutos de reação

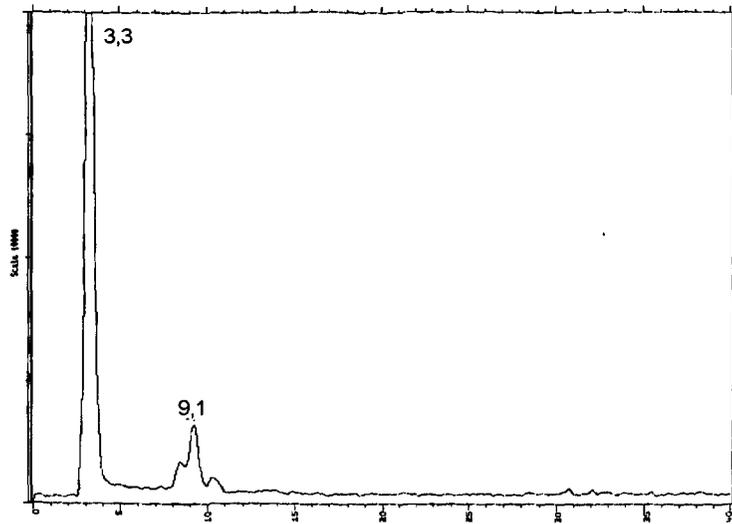
(\*\*) 50 µg de VIP10-28 e 5 minutos de reação

(\*\*\*) 25 µg de VIP10-28 e 5 minutos de reação, produto utilizado na obtenção de imagem cintilográfica

Os cromatogramas de CLAE-gradiente do Na<sup>123</sup>I antes e após filtração por coluna compactada Sep-Pak Plus Alumina A podem ser observados na FIG. 8. Os perfis de CLAE dos radiofármacos (VIP-<sup>123</sup>I e VIP10-28-<sup>123</sup>I), antes e após purificação simples, utilizando-se o radioiodo filtrado encontram-se nas FIG. 9 e 10, respectivamente.



(a)



(b)

FIGURA 8 - Perfis de CLAE-gradiente do  $\text{Na}^{123}\text{I}$  antes (a) e após (b) a filtração por coluna compactada Sep-Pak Plus Alumina A

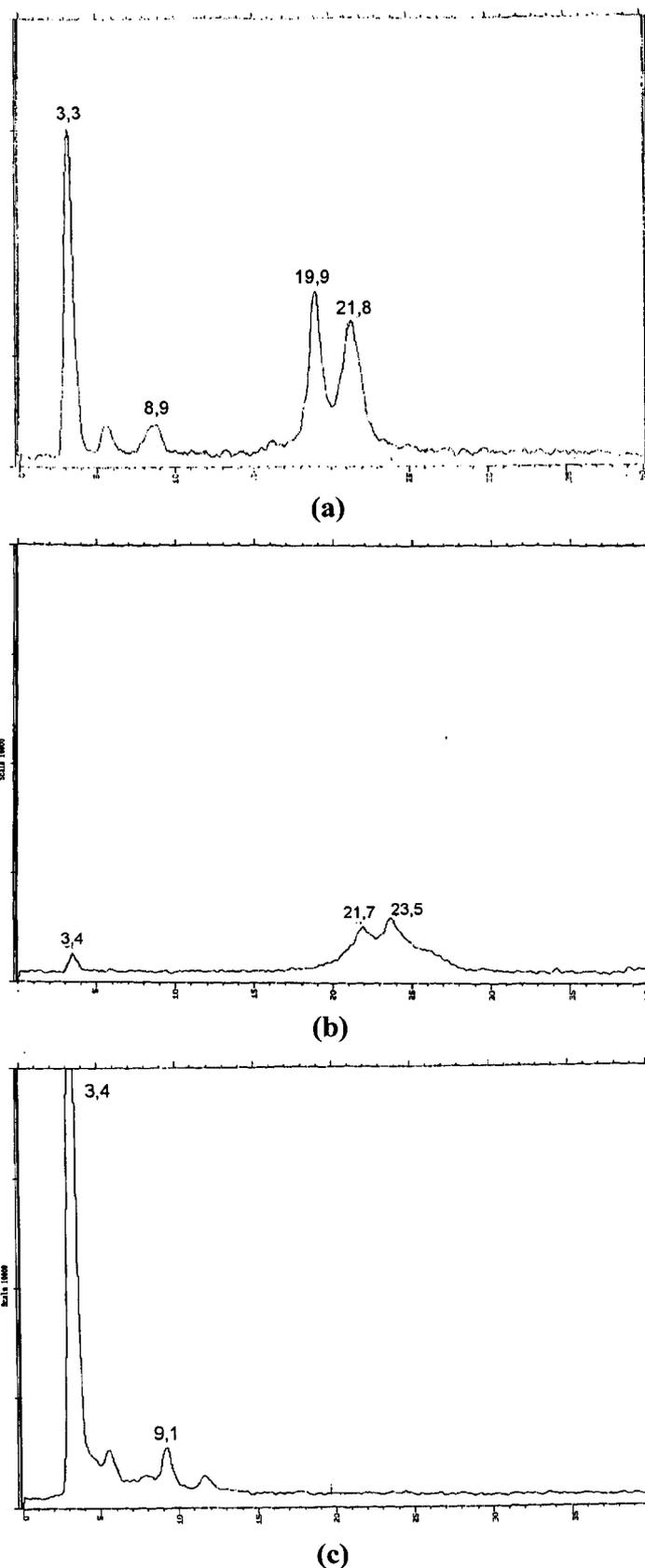
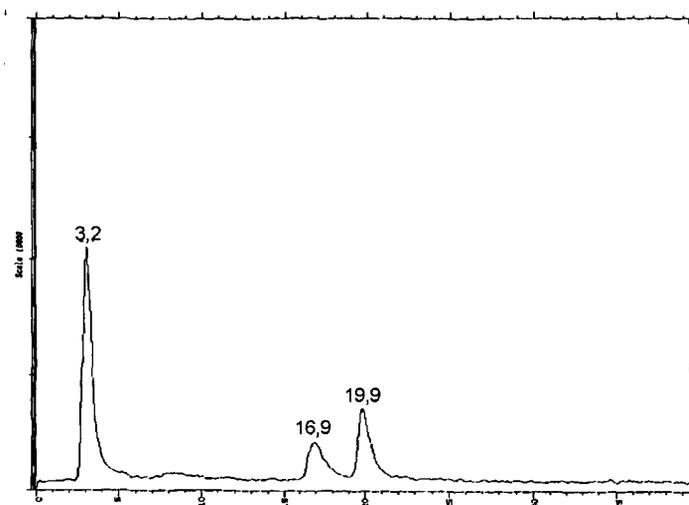
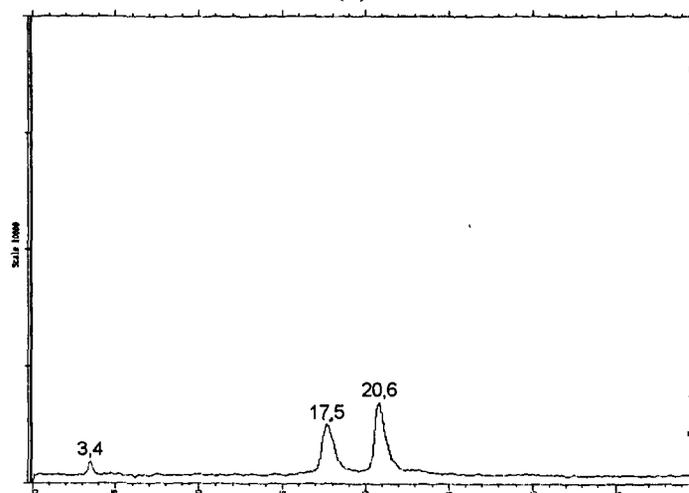


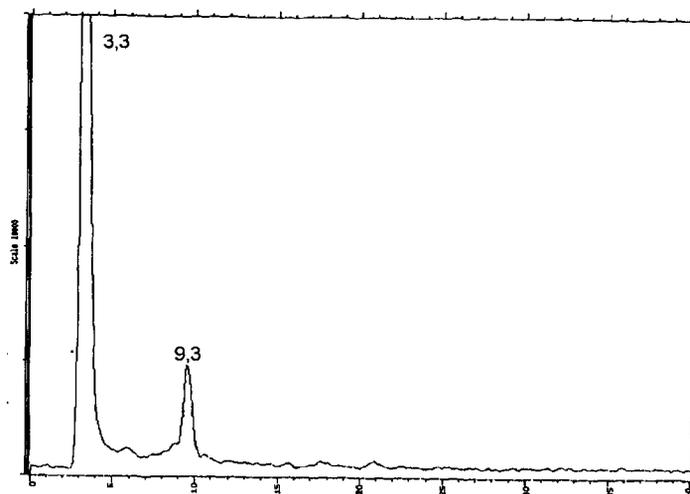
FIGURA 9 - Perfis de CLAE-gradiente do VIP-<sup>123</sup>I não purificado (a) e após purificação simples, frações 60/40 (b) e 10/90 (c). Marcação realizada com o Na<sup>123</sup>I filtrado por coluna compactada Sep-Pak Plus Alumina A



(a)



(b)



(c)

FIGURA 10 - Perfis de CLAE-gradiente do VIP10-28-<sup>123</sup>I não purificado (a) e após purificação simples, frações 60/40 (b) e 10/90 (c). Marcação realizada com o Na<sup>123</sup>I filtrado por coluna compactada Sep-Pak Plus Alumina A

#### 4.1.6 - Purificações realizadas nos radiofármacos

##### a) Purificação por CLAE-isocrática do VIP-<sup>131</sup>I

Para o radiofármaco utilizado neste estudo obteve-se pureza radioquímica determinada por eletroforese de  $85,69 \pm 0,55\%$  de VIP-<sup>131</sup>I.

O sistema cromatográfico de CLAE-isocrática utilizado possibilitou a purificação do VIP-<sup>131</sup>I, separando-o do radioiodo livre do VIP não marcado residual identificados nas diferentes frações coletadas (FIG. 11 e 12). As frações 11 (9,62 MBq), 17 (6,29 MBq), 23 (1,78 MBq), 29 (2,15 MBq) e 44 (1 MBq) corresponderam às maiores atividades e suas purezas radioquímicas foram:

- ◆ **Fração 11** =  $79,02 \pm 1,22\%$  de VIP-<sup>131</sup>I,
- ◆ **Fração 17** =  $97,19 \pm 1,66\%$  de VIP-<sup>131</sup>I,
- ◆ **Fração 23** =  $96,78 \pm 0,94\%$  de VIP-<sup>131</sup>I,
- ◆ **Fração 29** =  $97,41 \pm 0,44\%$  de VIP-<sup>131</sup>I,
- ◆ **Fração 44** =  $96,86 \pm 1,39\%$  de VIP-<sup>131</sup>I

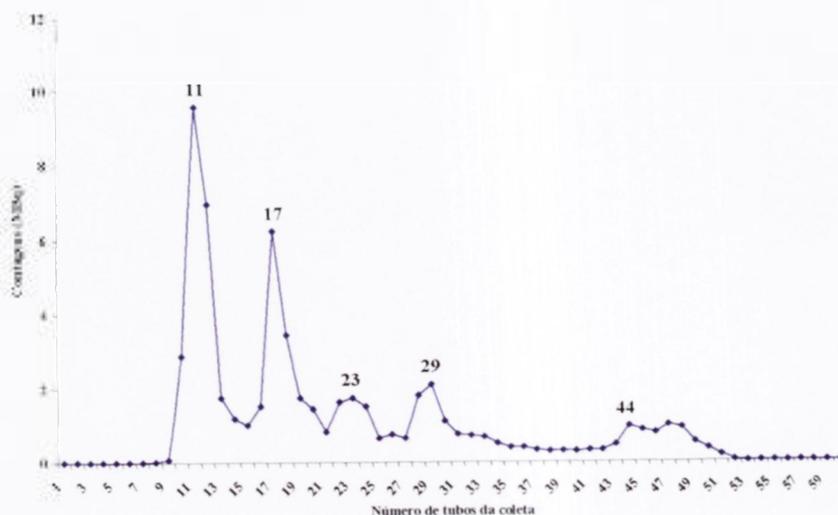


FIGURA 11 - Atividade das frações do VIP-<sup>131</sup>I coletada após aplicação em CLAE-isocrática

Na fração 11 foi detectado VIP não marcado em CLAE-isocrática (230 nm), apresentando um pico com  $R_t=5,65$  (FIG. 12) e para as frações 17, 23, 29 e 44 não foram identificados pico na região correspondente. Portanto, as frações 17, 23, 29 e 44 foram reunidas em um frasco tipo penicilina e sua pureza radioquímica correspondeu a  $97,06 \pm 2,05\%$  de VIP-<sup>131</sup>I. O rendimento de marcação inicial (antes da purificação) foi de 86% e após purificação com CLAE-isocrática ficou em 4,7%.

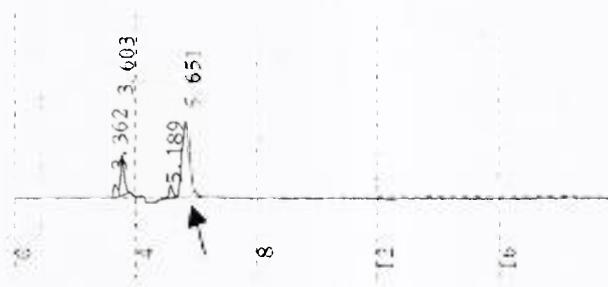


FIGURA 12 - Perfil de CLAE-isocrática da fração 11 do VIP-<sup>131</sup>I em detector UV-visível-CG (230 nm)

**b) Purificação simples por coluna compactada do VIP-<sup>131/123</sup>I e VIP10-28-<sup>131/123</sup>I**

Análises eletroforéticas das frações 10/90 e 60/40 (acetonitrila/TFA 0,1%), obtidas pela purificação simples (coluna compactada Sep-Pak light C<sub>18</sub>) do VIP-<sup>131/123</sup>I e VIP10-28-<sup>131/123</sup>I, comprovaram que a maior porcentagem de <sup>131/123</sup>I encontra-se na fração 10/90 e que a fração 60/40 detém a maior porcentagem dos peptídeos marcados, conforme visualiza-se nas FIG. 9 e 10.

**c) Purificação composta por coluna compactada do VIP-<sup>131</sup>I e VIP10-28-<sup>131</sup>I**

A pureza radioquímica do produto aplicado à coluna compactada Sep-Pak light C<sub>18</sub> correspondeu a 84,18 ± 2,44% de VIP-<sup>131</sup>I.

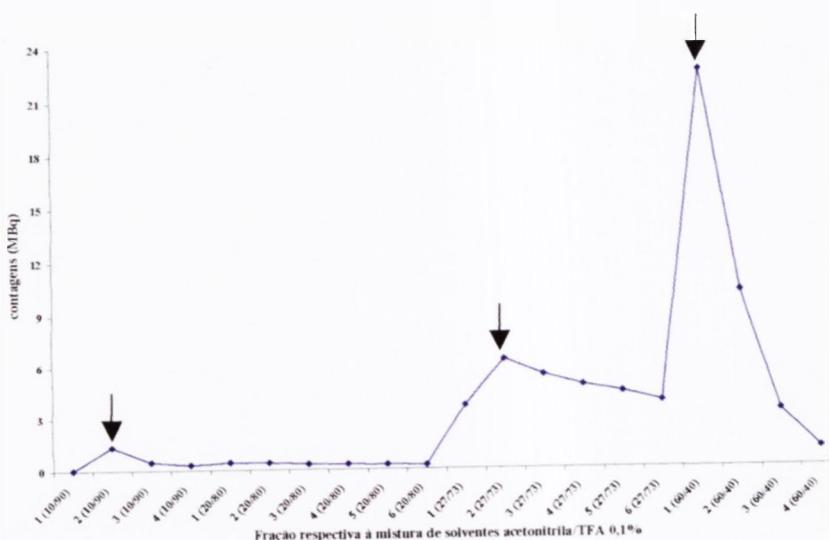


FIGURA 13 - Atividade das frações coletadas após purificação composta do VIP-<sup>131</sup>I por coluna compactada Sep-Pak light C<sub>18</sub>

As FIG. 13 (VIP-<sup>131</sup>I) e 14 (Na<sup>131</sup>I) expressam as atividades (MBq) de cada fração coletada na purificação.

As amostras com maior atividade da purificação do VIP- $^{131}\text{I}$  (FIG. 13), ou seja a segunda fração 10/90 (1,38 MBq/0,5 mL), a segunda fração 27/73 (6,36 MBq/0,5 mL) e a primeira fração 60/40 (82,51 MBq/0,5 mL) foram escolhidas para realização da eletroforese.

Para a amostra de  $\text{Na}^{131}\text{I}$  (FIG 14), a primeira fração da mistura de solventes 10/90 (15,13 MBq/0,5 mL) também foi analisada.

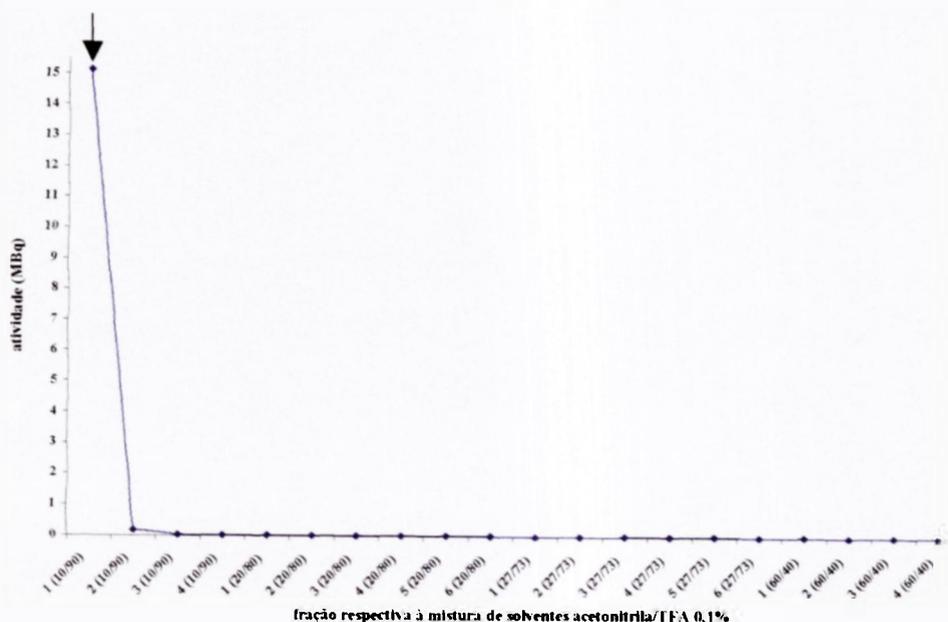
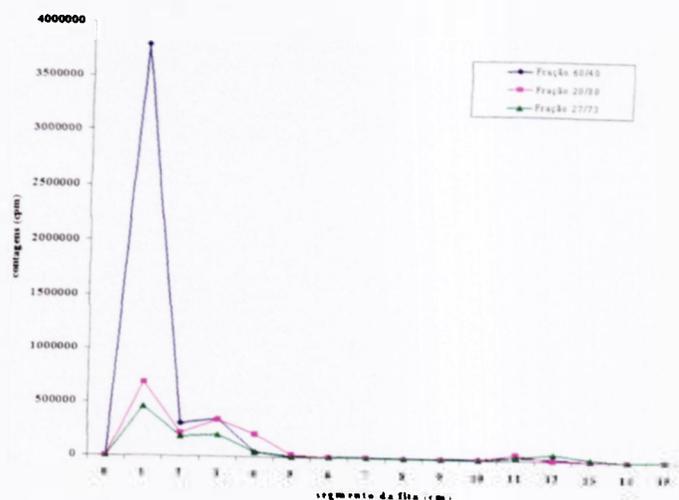


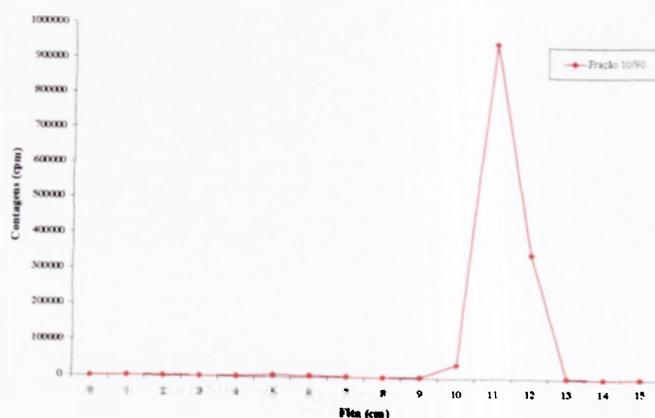
FIGURA 14 - Atividade das frações do  $\text{Na}^{131}\text{I}$  coletada após purificação composta por coluna compactada Sep-Pak ligh C<sub>18</sub>

Nas análises eletroforéticas (FIG. 15) ficaram evidenciadas que todas as frações correspondentes ao VIP- $^{131}\text{I}$  contêm três picos (FIG. 15-a) e a fração do  $\text{Na}^{131}\text{I}$  (FIG. 15-b) apenas um. Os primeiros picos, do VIP- $^{131}\text{I}$ , com  $R_f=0,00-0,40$  correspondem às espécies de VIP- $^{131}\text{I}$  e o terceiro com  $R_f=0,66-0,86$  corresponde ao  $^{131}\text{I}^-$ . A fração que traz presente a maior porcentagem das espécies de VIP- $^{131}\text{I}$  corresponde a primeira fração 60/40 ( $97,47 \pm 0,23\%$ ), observando-se também que a porcentagem de radioiodo livre em maior quantidade encontra-se na fração 10/90 ( $94,17 \pm 1,16\% \text{Na}^{131}\text{I}$ ).

O espectro de varredura obtido em espectrofotômetro UV-visível do VIP não marcado, mostrou que não houve absorbância a partir da fração 5 da mistura 27/73.



(a)



(b)

FIGURA 15 - Perfis de análise eletroforética das frações 20/80, 27/73 e 60/40 da amostra de VIP-<sup>131</sup>I (a) e da fração 1 (10/90) da amostra de Na<sup>131</sup>I (b) após purificação por coluna compactada Sep-Pak light C<sub>18</sub>

O perfil de purificação do VIP10-28-<sup>131</sup>I em coluna compactada Sep-Pak light C<sub>18</sub> (amostra 3) pode ser observado na FIG. 16. Resultados semelhantes ao do VIP-<sup>131</sup>I foram encontrados para as análises eletroforéticas das quatro frações com maiores atividades do VIP10-28-<sup>131</sup>I. As frações que apresentaram a maior porcentagem das espécies de VIP10-28-<sup>131</sup>I correspondem a segunda fração 27/73 (98,24 ± 0,30%) e primeira fração 60/40 (97,06 ± 1,23%), sendo que a porcentagem de radioiodo livre em maior quantidade encontra-se na primeira fração 10/90 (96,39 ± 0,37% de Na<sup>131</sup>I).

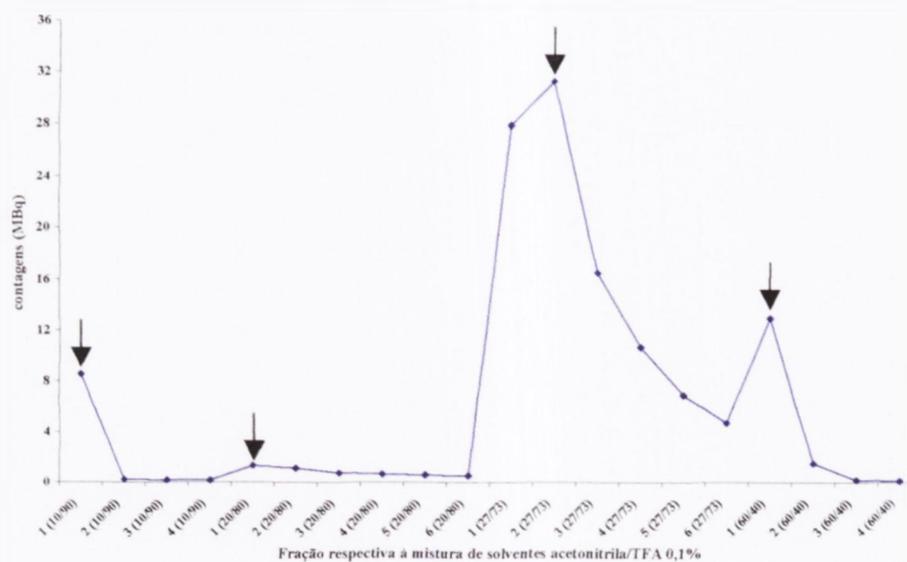


FIGURA 16 - Atividade das frações do VIP10-28-<sup>131</sup>I coletada após purificação composta por coluna compactada Sep-Pak ligh C<sub>18</sub>

A varredura em espectrofotômetro UV-visível de todas as frações da amostra de VIP10-28 não marcado (amostra 1) mostrou absorção na região entre 205-245 nm da fração 4 da mistura de solventes 10/90 até a fração 4 da mistura 20/80.

## 4.2 - ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA DO VIP-<sup>131/123</sup>I E VIP10-28-<sup>131/123</sup>I EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO

### 4.2.1 - Biodistribuição do VIP-<sup>131</sup>I e VIP10-28-<sup>131</sup>I sem purificação em camundongos *Swiss* normais

As purezas radioquímicas das marcações utilizadas nos estudos de biodistribuição corresponderam a  $95,94 \pm 1,54\%$  e  $96,61 \pm 1,41\%$  para o VIP-<sup>131</sup>I e VIP10-28-<sup>131</sup>I, respectivamente.

As TAB. 13 (VIP-<sup>131</sup>I sem purificação) e 14 (VIP10-28-<sup>131</sup>I sem purificação) correspondem a % dose/órgão e % dose/grama dos radiofármacos marcados com Cloramina T e injetados em camundongos *Swiss* normais.

TABELA 13 - Porcentagens dose/órgão e dose/grama do VIP-<sup>131</sup>I sem purificação administrado em camundongos *Swiss* normais

Órgãos / Tecidos	% dose/órgão			% dose/grama		
	Tempo (horas)					
	01	04	24	01	04	24
Cérebro	0,17 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,46 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Tireóide	3,03 ± 0,16	4,46 ± 0,15	9,24 ± 0,97	-	-	-
Pulmão	1,66 ± 0,29	0,14 ± 0,02	0,03 ± 0,01	5,89 ± 0,29	0,53 ± 0,05	0,12 ± 0,04
Coração	0,30 ± 0,05	0,04 ± 0,01	0,01 ± 0,00	2,64 ± 0,13	0,30 ± 0,03	0,05 ± 0,01
Baço	0,33 ± 0,03	0,07 ± 0,01	0,01 ± 0,00	4,31 ± 0,19	0,47 ± 0,08	0,11 ± 0,02
Fígado	3,59 ± 0,19	1,81 ± 0,18	0,10 ± 0,01	2,88 ± 0,18	1,56 ± 0,09	0,14 ± 0,05
Estômago	2,69 ± 0,87	1,45 ± 0,29	0,03 ± 0,01	6,97 ± 0,82	3,64 ± 0,02	0,12 ± 0,02
Músculo	14,79 ± 1,66	2,12 ± 0,61	0,26 ± 0,05	1,58 ± 0,01	0,27 ± 0,05	0,03 ± 0,01
Rins	1,82 ± 0,18	0,26 ± 0,02	0,04 ± 0,01	6,27 ± 0,50	0,83 ± 0,02	0,12 ± 0,01
Int. delgado	8,55 ± 0,94	2,29 ± 0,35	0,10 ± 0,01	5,28 ± 0,14	1,60 ± 0,27	0,05 ± 0,01
Int. grosso	4,27 ± 0,25	3,05 ± 0,39	0,26 ± 0,01	6,72 ± 0,52	5,42 ± 0,47	0,10 ± 0,01
Sangue total	11,63 ± 1,00	4,54 ± 0,21	0,11 ± 0,02	-	-	-

N=6

TABELA 14 - Porcentagens dose/órgão e dose/grama do VIP10-28-<sup>131</sup>I sem purificação administrado em camundongos *Swiss* normais

Órgãos / Tecidos	% dose/órgão			% dose/grama		
	Tempo (horas)					
	01	04	24	01	04	24
Cérebro	0,22 ± 0,04	0,17 ± 0,04	0,03 ± 0,01	0,58 ± 0,08	0,39 ± 0,05	0,05 ± 0,01
Tireóide	7,75 ± 0,87	11,19 ± 0,62	14,59 ± 1,23	-	-	-
Pulmão	2,18 ± 0,16	1,31 ± 0,05	0,11 ± 0,01	5,72 ± 0,35	4,32 ± 0,23	0,49 ± 0,03
Coração	0,49 ± 0,04	0,36 ± 0,04	0,04 ± 0,01	3,27 ± 0,35	1,74 ± 0,22	0,17 ± 0,03
Baço	1,08 ± 0,10	0,39 ± 0,06	0,03 ± 0,01	4,98 ± 0,43	3,38 ± 0,40	0,25 ± 0,03
Fígado	5,06 ± 0,43	4,11 ± 0,08	0,32 ± 0,05	3,17 ± 0,05	2,63 ± 0,26	0,21 ± 0,02
Estômago	13,22 ± 1,03	6,29 ± 0,62	0,44 ± 0,06	39,13 ± 1,65	31,95 ± 1,14	1,32 ± 0,22
Músculo	20,69 ± 0,78	11,89 ± 1,04	1,44 ± 0,36	1,71 ± 0,11	1,60 ± 0,16	0,10 ± 0,01
Rins	2,59 ± 0,19	1,70 ± 0,16	0,11 ± 0,01	5,91 ± 0,61	4,04 ± 0,30	0,30 ± 0,01
Int. delgado	8,03 ± 0,39	7,05 ± 0,86	1,01 ± 0,02	4,92 ± 0,37	4,42 ± 0,53	0,25 ± 0,03
Int. grosso	2,60 ± 0,53	3,80 ± 0,09	0,35 ± 0,04	2,91 ± 0,08	3,42 ± 0,27	0,55 ± 0,02
Sangue total	17,57 ± 0,37	11,35 ± 0,17	0,83 ± 0,04	-	-	-

N=5

#### 4.2.2 - Biodistribuição do VIP-<sup>131</sup>I com purificação simples e composta em camundongos *Swiss* com tumor

As purezas radioquímicas determinadas por análise eletroforética para as marcações foram de  $98,40 \pm 0,02\%$  de VIP-<sup>131</sup>I com purificação simples e  $98,64 \pm 0,49\%$  de VIP-<sup>131</sup>I com purificação composta, utilizadas nos estudos de biodistribuição descritos nas TAB. 15 e 16, respectivamente.

TABELA 15 - Porcentagens dose/órgão e dose/grama do VIP-<sup>131</sup>I com purificação simples administrado em camundongos *Swiss* com tumor

Órgãos / Tecidos	% dose/órgão			% dose/grama		
	Tempo (horas)					
	01	04	24	01	04	24
<b>Cérebro</b>	0,12 ± 0,09	0,09 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,26 ± 0,05	0,03 ± 0,01
<b>Tireóide</b>	5,64 ± 0,54	9,98 ± 0,77	13,21 ± 0,21	-	-	-
<b>Pulmão</b>	1,72 ± 0,18	0,73 ± 0,05	0,04 ± 0,01	3,92 ± 0,28	3,09 ± 0,16	0,08 ± 0,01
<b>Coração</b>	0,28 ± 0,03	0,24 ± 0,01	0,01 ± 0,00	1,56 ± 0,19	1,32 ± 0,14	0,05 ± 0,01
<b>Baço</b>	0,85 ± 0,15	0,68 ± 0,01	0,01 ± 0,00	2,56 ± 0,18	2,08 ± 0,10	0,05 ± 0,01
<b>Fígado</b>	4,43 ± 0,31	2,80 ± 0,06	0,13 ± 0,05	2,45 ± 0,12	1,58 ± 0,20	0,06 ± 0,01
<b>Estômago</b>	6,27 ± 0,49	3,50 ± 0,30	0,03 ± 0,01	20,57 ± 0,30	15,23 ± 3,14	0,09 ± 0,01
<b>Músculo</b>	17,54 ± 1,39	7,06 ± 0,61	0,24 ± 0,03	0,92 ± 0,08	0,44 ± 0,01	0,02 ± 0,01
<b>Rins</b>	2,42 ± 0,18	1,16 ± 0,04	0,06 ± 0,01	4,74 ± 0,19	2,93 ± 0,01	0,20 ± 0,00
<b>Int. delgado</b>	4,86 ± 0,61	4,41 ± 0,16	0,09 ± 0,01	4,02 ± 0,51	2,33 ± 0,15	0,05 ± 0,01
<b>Int. grosso</b>	1,97 ± 0,32	2,16 ± 0,19	0,07 ± 0,01	1,93 ± 0,10	2,55 ± 0,24	0,06 ± 0,01
<b>Sangue total</b>	9,80 ± 1,04	5,80 ± 0,86	0,17 ± 0,01	-	-	-
<b>Tumor</b>	3,53 ± 0,04	1,21 ± 0,08	0,23 ± 0,02	3,85 ± 0,87	2,47 ± 0,32	0,34 ± 0,01

N=5

TABELA 16 - Porcentagens dose/órgão e dose/grama do VIP-<sup>131</sup>I com purificação composta administrado em camundongos Swiss com tumor

Órgãos / Tecidos	% dose/órgão			% dose/grama		
	Tempo (horas)					
	01	04	24	01	04	24
Cérebro	0,12 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,23 ± 0,04	0,19 ± 0,03	0,03 ± 0,01
Tireóide	1,85 ± 0,08	5,70 ± 0,31	5,01 ± 0,16	-	-	-
Pulmão	0,86 ± 0,05	1,30 ± 0,12	0,04 ± 0,01	2,75 ± 0,35	3,38 ± 0,05	0,18 ± 0,01
Coração	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,01 ± 0,00	1,30 ± 0,03	0,96 ± 0,08	0,07 ± 0,01
Baço	0,86 ± 0,05	0,54 ± 0,09	0,04 ± 0,01	4,39 ± 0,18	2,47 ± 0,28	0,41 ± 0,02
Fígado	12,78 ± 1,10	8,56 ± 0,61	2,47 ± 0,43	7,26 ± 0,19	5,03 ± 0,62	1,64 ± 0,04
Estômago	6,51 ± 0,95	2,92 ± 0,52	0,05 ± 0,01	11,17 ± 1,60	9,54 ± 0,94	0,18 ± 0,01
Músculo	11,33 ± 1,31	5,26 ± 0,40	0,49 ± 0,01	0,65 ± 0,09	0,42 ± 0,04	0,03 ± 0,01
Rins	6,29 ± 0,05	3,23 ± 0,06	1,36 ± 0,18	14,32 ± 0,83	7,67 ± 0,34	2,32 ± 0,20
Int. delgado	8,21 ± 0,67	5,27 ± 0,47	0,15 ± 0,02	5,18 ± 0,05	2,88 ± 0,40	0,08 ± 0,01
Int. grosso	1,47 ± 0,08	5,35 ± 0,43	0,19 ± 0,02	1,56 ± 0,17	6,81 ± 0,36	0,19 ± 0,01
Sangue total	7,32 ± 0,70	4,73 ± 0,61	0,34 ± 0,09	-	-	-
Tumor	2,30 ± 0,04	1,51 ± 0,20	0,15 ± 0,02	1,65 ± 0,18	2,98 ± 0,11	0,12 ± 0,02

N=5

#### 4.2.3 - Biodistribuição do VIP-<sup>131</sup>I e VIP10-28-<sup>131</sup>I sem purificação em camundongos *Nude* com tumor

Os radiofármacos, VIP-<sup>131</sup>I e VIP10-28-<sup>131</sup>I, injetados nos camundongos após análise eletroforética apresentaram pureza radioquímica de  $97,02 \pm 0,58\%$  e  $98,61 \pm 1,41\%$ , respectivamente.

As TAB. 17 e 18 do VIP-<sup>131</sup>I e VIP10-28-<sup>131</sup>I sem purificação, respectivamente, correspondem a % dose/órgão e % dose/grama dos radiofármacos, injetados em camundongos *Nude* com tumor.

TABELA 17 - Porcentagens dose/órgão e dose/grama do VIP-<sup>131</sup>I sem purificação administrado em camundongos *Nude* com tumor

Órgãos / Tecidos	% dose/órgão			% dose/grama		
	Tempo (horas)					
	01	04	24	01	04	24
Cérebro	0,13 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,25 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,09 ± 0,02
Tireóide	3,37 ± 0,35	5,63 ± 0,72	7,04 ± 0,84	-	-	-
Pulmão	0,56 ± 0,08	0,21 ± 0,07	0,08 ± 0,01	4,11 ± 0,69	0,76 ± 0,07	0,27 ± 0,01
Coração	0,21 ± 0,05	0,05 ± 0,01	0,02 ± 0,01	1,53 ± 0,32	0,53 ± 0,03	0,07 ± 0,01
Baço	0,29 ± 0,03	0,08 ± 0,01	0,03 ± 0,01	2,04 ± 0,27	0,59 ± 0,02	0,34 ± 0,01
Fígado	2,32 ± 0,15	0,08 ± 0,01	0,14 ± 0,02	1,54 ± 0,01	0,67 ± 0,01	0,10 ± 0,02
Estômago	2,83 ± 0,11	1,26 ± 0,17	0,03 ± 0,01	12,24 ± 0,20	5,53 ± 0,06	0,16 ± 0,04
Músculo	4,14 ± 0,36	1,78 ± 0,02	1,34 ± 0,24	0,41 ± 0,04	0,22 ± 0,01	0,10 ± 0,02
Rins	2,25 ± 0,51	0,72 ± 0,09	0,13 ± 0,03	5,95 ± 0,78	2,52 ± 0,14	0,37 ± 0,03
Int. delgado	6,39 ± 0,85	2,35 ± 0,45	0,20 ± 0,04	2,46 ± 0,26	1,81 ± 0,14	0,13 ± 0,02
Int. grosso	2,72 ± 0,39	2,07 ± 0,11	0,13 ± 0,02	2,70 ± 0,41	1,81 ± 0,12	0,09 ± 0,01
Sangue total	6,22 ± 0,98	1,77 ± 0,06	0,33 ± 0,05	-	-	-
Tumor	2,34 ± 0,05	1,59 ± 0,09	0,04 ± 0,01	2,71 ± 0,27	0,63 ± 0,04	0,11 ± 0,02

N=5

TABELA 18 - Porcentagens dose/órgão e dose/grama do VIP10-28-<sup>131</sup>I sem purificação administrado em camundongos *Nude* com tumor

Órgãos / Tecidos	% dose/órgão			% dose/grama		
	Tempo (horas)					
	01	04	24	01	04	24
Cérebro	0,31 ± 0,04	0,21 ± 0,05	0,01 ± 0,00	0,72 ± 0,05	0,41 ± 0,08	0,03 ± 0,01
Tireóide	3,53 ± 0,62	6,53 ± 0,71	6,41 ± 0,54	-	-	-
Pulmão	1,42 ± 0,30	1,56 ± 0,45	0,02 ± 0,00	10,91 ± 0,06	5,78 ± 0,39	0,16 ± 0,03
Coração	0,33 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,01 ± 0,00	4,54 ± 0,94	3,03 ± 0,41	0,14 ± 0,01
Baço	0,37 ± 0,07	0,24 ± 0,03	0,01 ± 0,00	8,67 ± 0,33	6,05 ± 0,98	0,24 ± 0,01
Fígado	4,50 ± 0,20	3,40 ± 0,33	0,09 ± 0,01	4,71 ± 0,30	3,90 ± 0,55	0,07 ± 0,00
Estômago	4,90 ± 0,01	2,37 ± 0,01	0,03 ± 0,01	36,53 ± 1,34	19,84 ± 0,18	0,17 ± 0,01
Músculo	18,13 ± 0,94	14,41 ± 0,52	0,47 ± 0,03	3,41 ± 0,76	2,15 ± 0,03	0,08 ± 0,01
Rins	1,66 ± 0,29	1,55 ± 0,06	0,03 ± 0,01	7,16 ± 0,58	6,08 ± 0,57	0,22 ± 0,01
Int. delgado	7,86 ± 0,03	8,24 ± 0,40	0,13 ± 0,01	7,81 ± 0,82	8,62 ± 0,21	0,15 ± 0,01
Int. grosso	3,68 ± 0,14	2,95 ± 0,76	0,06 ± 0,01	5,36 ± 0,28	4,75 ± 0,01	0,09 ± 0,01
Sangue total	15,69 ± 0,25	9,05 ± 0,78	0,19 ± 0,01	-	-	-
Tumor	4,04 ± 0,73	2,11 ± 0,01	0,01 ± 0,00	11,37 ± 0,76	4,51 ± 0,25	0,05 ± 0,01

N=5

A TAB. 19 apresenta a relação tumor/sangue expressas em % dose/g tumor / % dose sangue calculadas a partir dos resultados obtidos nas TAB. 17 e 18 para o VIP-<sup>131</sup>I e VIP10-28-<sup>131</sup>I em animais *Nude* com tumor.

TABELA 19 - Relação tumor/sangue (% dose/g tumor / % dose sangue) nos diferentes tempos após administração dos radiofármacos

Tempo (horas)	% dose/g tumor / % dose sangue	
	VIP- <sup>131</sup> I	VIP10-28- <sup>131</sup> I
1	0,44	0,72
4	0,36	0,50
24	0,33	0,26

#### 4.2.4 - Estudos cintilográficos

##### a) Cintilografia do VIP-<sup>131</sup>I com purificação composta em camundongo *Swiss* normal e com tumor e rato *Wistar* com tumor

O VIP-<sup>131</sup>I injetado em camundongos *Swiss* normal e com tumor para realização do estudo cintilográfico, apresentou pureza radioquímica de  $97,84 \pm 0,21\%$  após purificação composta.

As imagens cintilográficas podem ser observadas nas FIG. 17, 18 e 19 e correspondem, respectivamente, a 155 minutos da injeção do VIP-<sup>131</sup>I em camundongo *Swiss* com tumor no abdômen, lateralizado próximo a coxa direita; a 170 minutos após injeção do radiofármaco em rato *Wistar* com tumor localizado na região da coxa direita; a imagem correspondendo ao camundongo *Swiss* normal, obtida após 150 minutos da injeção do radiofármaco.

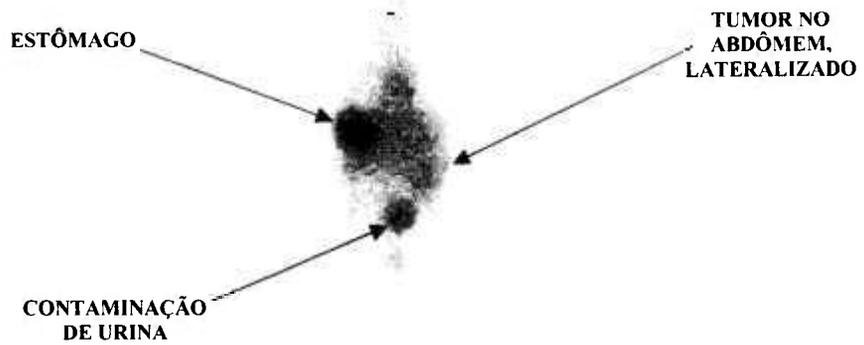


FIGURA 17 - Imagem cintilográfica do VIP- $^{131}\text{I}$  com purificação composta em camundongo *Swiss* com tumor após 155 minutos da injeção

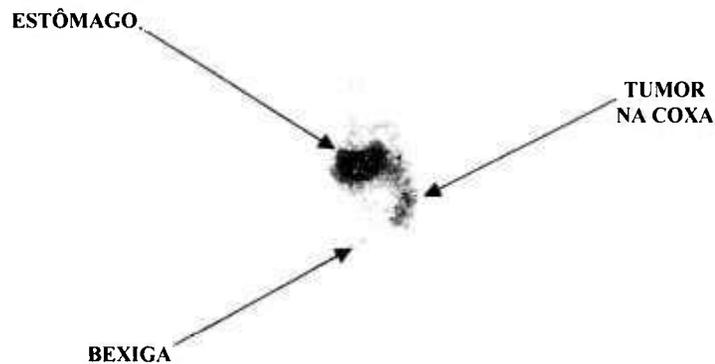


FIGURA 18 - Imagem cintilográfica do VIP- $^{131}\text{I}$  com purificação composta em rato *Wistar* com tumor após 170 minutos da injeção

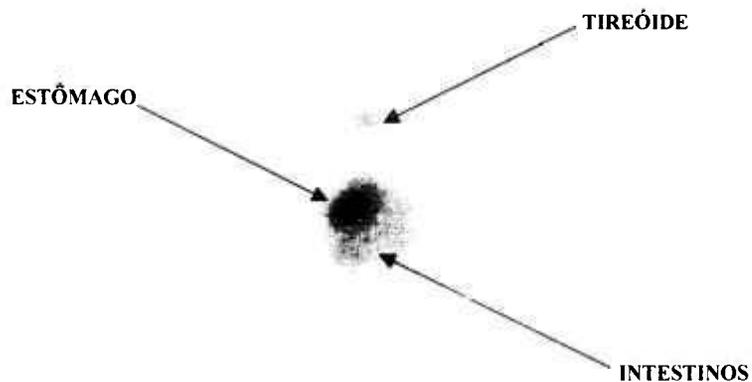


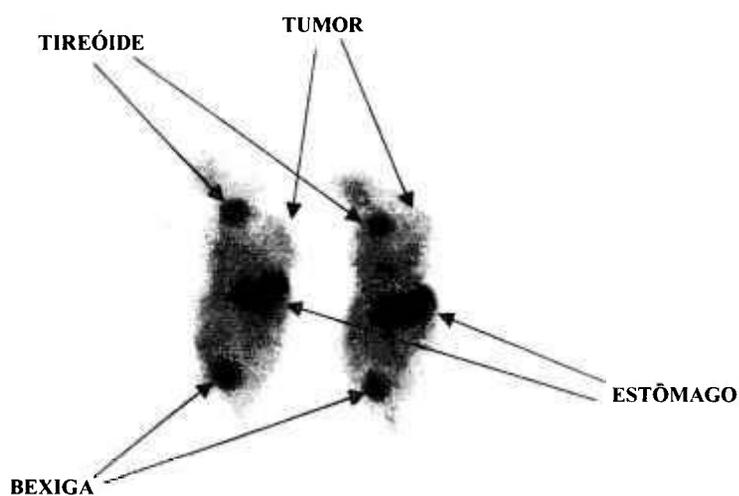
FIGURA 19 - Imagem cintilográfica do VIP- $^{131}\text{I}$  com purificação composta em camundongo *Swiss* normal após 150 minutos da injeção

**b) Cintilografia do VIP-<sup>123</sup>I e VIP10-28-<sup>123</sup>I com purificação simples em camundongos *Nude* com tumor**

O VIP-<sup>123</sup>I e VIP10-28-<sup>123</sup>I após purificação simples que foram injetados em camundongos *Nude* com tumor para realização dos estudos cintilográficos, apresentaram pureza radioquímica de  $98,59 \pm 0,13\%$  e  $97,24 \pm 0,30\%$ , respectivamente.

A FIG. 20 corresponde às imagens cintilográficas obtidas após 60 e 150 minutos da injeção do VIP10-28-<sup>123</sup>I em camundongos *Nude* com tumor na região dorsal.

As imagens cintilográficas obtidas após 90, 180 e 240 minutos da injeção do VIP-<sup>123</sup>I em camundongos *Nude* com tumor na região dorsal encontram-se na FIG. 21.



(a)



(b)

FIGURA 20 - Imagens cintilográficas do VIP10-28-<sup>123</sup>I após purificação simples em camundongos *Nude* com tumor após 60 (a) e 150 (b) minutos da injeção. Os animais à esquerda receberam 60 minutos antes da administração do radiofármaco, 200  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$  do antagonista do VIP, intraperitoneal

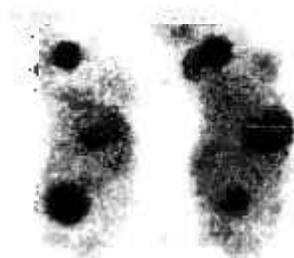
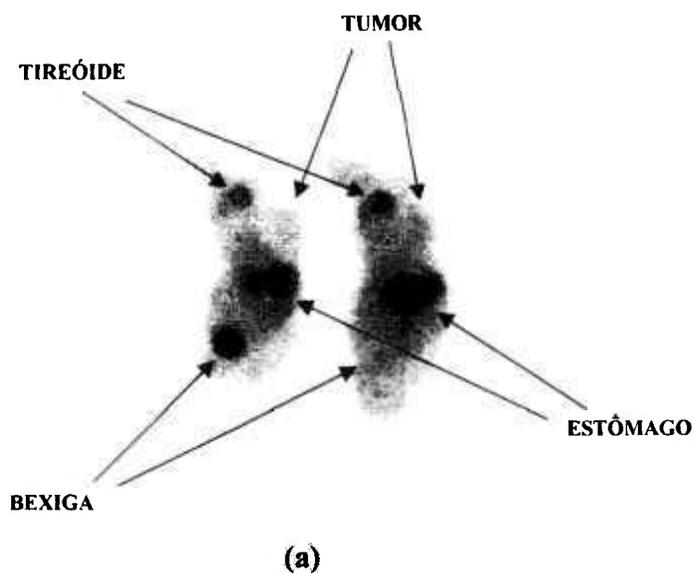


FIGURA 21 - Imagens cintilográficas do VIP-<sup>123</sup>I após purificação simples em camundongos *Nude* com tumor após 90 (a), 180 (b) e 240 (c) minutos da injeção. Os animais à esquerda receberam 60 minutos antes da administração do radiofármaco, 200 $\mu$ g/100  $\mu$ L do antagonista do VIP, intraperitoneal

Os resultados obtidos da relação cpm bexiga / cpm C.I. das imagens cintilográficas apresentadas nas FIG. 20 e 21 podem ser observados na TAB. 20.

TABELA 20 - Porcentagens da relação da contagem da bexiga pela contagem de corpo inteiro (C.I.) das imagens cintilográficas do VIP-<sup>123</sup>I e VIP10-28-<sup>123</sup>I

Tempo (minutos)	cpm bexiga / cpm C.I. do VIP- <sup>123</sup> I (%)		cpm bexiga / cpm C.I. do VIP10-28- <sup>123</sup> I (%)	
	com antagonista do VIP	sem antagonista do VIP	com antagonista do VIP	sem antagonista do VIP
60	-	-	5,58	3,18
90	10,63	1,14	-	-
150	-	-	8,70	5,44
180	13,95	2,63	-	-
240	14,16	2,66	-	-

### 4.3 - ESTUDOS *IN VITRO*

#### 4.3.1 - Determinação da porcentagem de ligação do VIP-<sup>131</sup>I e VIP10-28-<sup>131</sup>I às proteínas plasmáticas

Os radiofármacos utilizados nos estudos de determinação da porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas continham pureza radioquímica de  $95,10 \pm 0,70\%$  para o VIP-<sup>131</sup>I e de  $96,06 \pm 1,23\%$  para o VIP10-28-<sup>131</sup>I e foram injetados nos animais sem sofrer qualquer processo de purificação.

A média para os seis animais normais utilizados para o VIP-<sup>131</sup>I correspondeu a  $4,29 \pm 0,66\%$  de ligação às proteínas plasmáticas. Já a média dos seis animais normais para o VIP10-28-<sup>131</sup>I foi de  $3,16 \pm 0,62\%$  de ligação às proteínas plasmáticas.

### 4.3.2 - Estudo da determinação da estabilidade do VIP-<sup>131</sup>I e VIP10-28-<sup>131</sup>I em plasma humano

O VIP-<sup>131</sup>I e VIP10-28-<sup>131</sup>I utilizados neste estudo, apresentaram pureza radioquímica de  $97,53 \pm 0,64\%$  e  $95,44 \pm 0,17\%$ , respectivamente. Na TAB. 21 encontram-se os valores obtidos das análises eletroforéticas das amostras de plasma coletadas nos tempos de 1, 4 e 24 horas durante o período de incubação das amostras.

TABELA 21 - Análises eletroforéticas dos plasmas humanos incubados com o VIP-<sup>131</sup>I e VIP10-28-<sup>131</sup>I

Radiofármaco	Pureza radioquímica (%)		
	1 hora	4 horas	24 horas
VIP- <sup>131</sup> I	$94,21 \pm 0,07$	$92,65 \pm 1,06$	$92,13 \pm 0,53$
VIP10-28- <sup>131</sup> I	$91,02 \pm 2,17$	$90,16 \pm 3,20$	$90,57 \pm 0,45$

### 4.3.3 - Ensaio de ligação e internalização do VIP-<sup>131</sup>I e VIP10-28-<sup>131</sup>I nas células de adenocarcinoma de cólon retal humano (HT-29)

As purezas radioquímicas dos radiofármacos para este ensaio corresponderam a  $97,96 \pm 0,39\%$  de VIP-<sup>131</sup>I e  $98,50 \pm 0,24\%$  de VIP10-28-<sup>131</sup>I.

As porcentagens de ligação e de internalização dos radiofármacos nas células HT-29 podem ser observadas na TAB. 22.

TABELA 22 - Porcentagem da ligação e internalização nas células HT-29 do VIP-<sup>131</sup>I e VIP10-28-<sup>131</sup>I

Radiofármaco	Ligação específica (%)	Internalização (%)
VIP- <sup>131</sup> I	$3,09 \pm 0,36$	$11,60 \pm 0,98$
VIP10-28- <sup>131</sup> I	$2,00 \pm 0,28$	$10,55 \pm 3,30$

N=2

## 5 - DISCUSSÃO

O método de radioiodação utilizado neste estudo baseia-se no princípio de substituição eletrofílica aromática promovida após oxidação do radioiodo em presença de agente oxidante (Lever, 1995 e Kowalsky, et al., 2004). Nos estudos de otimização das condições de marcação utilizando-se iodo-131, a técnica com Cloramina T como agente oxidante, mostrou-se muito eficiente promovendo marcação com alta pureza radioquímica para ambos os peptídeos, superiores a 95% ao utilizar-se 25 µg dos peptídeos. Nesta técnica o rendimento de marcação foi de 80-95% para o VIP-<sup>131</sup>I e de 75-95% para o VIP10-28-<sup>131</sup>I, enquanto que para o Iodogen na forma de suspensão correspondeu a 75-90 e 60-80, respectivamente e para o Iodogen na forma de película 45-75 e 40-70%, respectivamente. A perda no rendimento foi grande, especialmente para o Iodogen película, uma vez que parte da atividade ficou retida no frasco de marcação, apesar da lavagem final (TAB. 3 e 4). Além disto, a marcação com Cloramina T é muito mais rápida que com Iodogen. Os melhores resultados, considerando-se pureza radioquímica e rendimento de marcação, foram obtidos utilizando-se 25 µg de peptídeo e de 1 a 3 minutos de reação para o VIP e VIP10-28 (TAB. 3 e 4).

Os estudos da relação massa/atividade para o VIP-<sup>131</sup>I e VIP10-28-<sup>131</sup>I indicaram os melhores resultados para as relações de 1,5 (37 MBq/25 µg) e 2,9 (37 MBq/12,5 µg). A pureza radioquímica diminuiu para as relações maiores que 5,9, porém mostrando ainda boa capacidade de incorporação do radioiodo. Neste caso convém ressaltar que a massa de Cloramina T foi mantida constante, apesar do aumento da atividade, o que pode ter impossibilitado a obtenção de resultados de pureza radioquímica melhores (TAB. 5).

Os perfis eletroforéticos apresentados demonstraram a eficiência do método para separação das espécies marcadas e radioiodo livre configurando-se como um método simples e barato para determinação da pureza radioquímica das marcações (FIG. 4 e 15).

A técnica de CLAE utilizando-se coluna de fase reversa C<sub>18</sub> eluída isocriticamente no caso do VIP e no modo gradiente para VIP e VIP10-28, mostrou-se

eficiente para separação das espécies radioiodadas dos peptídeos, da massa de peptídeo não radioiodada residual, bem como do radioiodo livre (FIG. 5, 6 e 7).

Com a entrada do iodo na tirosina do VIP, o peptídeo torna-se mais lipofílico (Virgolini et al., 1994 e Martin et al., 1986), o que explica o tempo de retenção maior em CLAE das espécies radioiodadas dos peptídeos quando comparadas com as espécies não iodadas. Fato este comprovado pelos espectros de CLAE em detetor UV-visível do VIP e VIP10-28 com  $R_t=5,65$  minutos e  $R_t=14,1$  minutos, respectivamente, enquanto as espécies de VIP- $^{131}\text{I}$  e VIP10-28- $^{131}\text{I}$ , marcados com Cloramina T, apresentaram  $R_t=6,8$  e  $8,4$  minutos (FIG. 5-b) e  $R_t=15,2$  e  $18,2$  minutos, (FIG. 6-b), respectivamente. Tal separação indica o potencial do procedimento para purificação dos peptídeos marcados e obtenção de radiofármacos com alta atividade específica.

Na FIG. 5-a observa-se o espectro de CLAE-isocrática para a marcação do VIP que utilizou Iodogen suspensão como agente oxidante. Quatro picos principais com tempos de retenção de 6,8, 7,9, 8,6 e 11,3 minutos (para o Iodogen película obteve-se perfil semelhante) são observados. Verificou-se que ao utilizar-se maior massa de Iodogen torna-se mais evidente um pico com  $R_t=16,8$  minutos, correspondendo, ao Iodogen radioiodado, dada confirmação realizada ao reagir-se o Iodogen com iodo-131, excluindo-se o peptídeo do meio reacional. Verifica-se no perfil de CLAE-isocrática da marcação do VIP, utilizando-se como agente oxidante Cloramina T (FIG. 5-b), dois picos principais com  $R_t=6,8$  e  $8,4$  minutos.

A variação no número de picos observados na CLAE, quando se utiliza Cloramina T e Iodogen com agentes oxidantes pode ser interpretada considerando-se as observações de diferentes autores. De acordo com Virgolini (1994) e Martin (1986), a análise de CLAE possibilita a separação das espécies de VIP radioiodadas, respectivamente, nas posições Tyr10 e Tyr22, representadas por dois picos distintos no cromatograma.

Além disso, por fazer parte da composição da molécula do VIP um resíduo do aminoácido metionina na posição 17 (Met17), o agente oxidante pode atuar sobre esta molécula oxidando-a, formando desta maneira as espécies VIPox-Tyr10 e VIPox-Tyr22 radioiodadas (Martin et al., 1986). Desta forma, de acordo com estes autores, poderiam se formar até quatro espécies radioquímicas diferentes.

Virgolini (1994) e Martin (1986) não consideraram, entretanto, em suas análises, a possibilidade de formação de espécie di-iodada do peptídeo VIP, ou seja, a incorporação do radioiodo na Tyr10 e também na Tyr22. Aliás, nos parece mais razoável

supor, considerando-se o sistema cromatográfico de CLAE utilizado, que estamos realizando a separação entre as espécies mono e di-iodada do peptídeo, oxidadas ou não na metionina-17, ao invés de supor que o sistema pudesse promover a separação da proteína radioiodada na Tyr10 e na Tyr22.

A molécula di-iodada apresenta  $R_t$  maior no sistema CLAE utilizado, devido à maior lipofilicidade atribuída à molécula quando comparada com a molécula mono-iodada.

Os resultados de distribuição biológica do VIP- $^{131}\text{I}$  e VIP10-28- $^{131}\text{I}$ , analisados de forma comparativa, corroboram ainda mais esta nossa suposição, conforme discutiremos a seguir.

Por ser a Cloramina T um agente oxidante mais potente que o Iodogen, acredita-se que os dois picos ilustrados na FIG. 5-b (6,8 e 8,4 minutos) correspondam às espécies VIPox-mono e di-iodadas.

Da mesma forma, quatro picos foram observados no perfil de CLAE da marcação do VIP10-28 utilizando-se Iodogen suspensão (FIG. 6-a) e dois picos mais pronunciados ao utilizar-se Cloramina T (FIG. 6-b).

O perfil se repetiu para a marcação do VIP com  $\text{Na}^{123}\text{I}$  utilizando-se Cloramina T como agente oxidante (FIG. 7-a). O pico com  $R_t=9,3$  minutos deve, provavelmente, corresponder à espécie de iodato.

Comparando-se o perfil eletroforético do  $\text{Na}^{123}\text{I}$  (FIG. 4-b) com o espectro de CLAE (FIG. 7-b), ambos apresentaram duas espécies radioquímicas. Em paralelo, realizou-se um experimento deixando-se o iodo-131 diluído em água por oito dias e realizou-se análise eletroforética no primeiro e oitavo dia. Obtiveram-se dois picos, o pico correspondente ao  $^{131}\text{IO}_3^-$  ( $R_f=0,26-0,46$ ) no primeiro dia encontrava-se com uma porcentagem de 0,5-1%, e no oitavo encontrava-se com 12-13% de  $^{131}\text{IO}_3^-$ . Realizou-se também CLAE-gradiente, confirmando-se dois picos com  $R_t=4,0$  e 9,5 minutos (iodeto-131 e iodato-131, respectivamente), picos estes próximos aos obtidos para o  $\text{Na}^{123}\text{I}$ , conforme mostra a FIG. 7-b ( $R_t=3,6$  e 9,0 minutos). Concluiu-se que o segundo pico que aparece tanto na análise eletroforética como no espectro de CLAE-gradiente corresponde ao  $^{131}\text{IO}_3^-$ .

O rendimento de marcação do VIP- $^{123}\text{I}$  obtido após purificação simples foi bastante baixo, ou seja, 9,26%, correspondente à fração 60/40. O restante da atividade, equivalente a 89,03% da marcação permaneceu na fração 10/90, mostrando semelhança com a porcentagem da pureza radioquímica do radiofármaco antes da purificação,  $5,40 \pm 0,49\%$  de VIP- $^{123}\text{I}$  (TAB. 6, 4ª. marcação), observada em eletroforese. A presença de  $^{123}\text{I}$

na fração 60/40 de purificação foi observada quando a porcentagem da impureza na mistura de marcação era inicialmente elevada. Na marcação com iodo-131, nas quais a porcentagem de iodo livre era reduzida, a presença de  $^{131}\text{I}^-$  não foi observada nas frações 60/40 de purificação.

Tal fato sugere que quando a análise de pureza radioquímica indicar uma porcentagem relativamente alta de iodo livre (superior a 10%), o volume da fração 10/90 utilizado no procedimento de purificação simples em Sep-Pak light C<sub>18</sub>, deverá ser aumentado para remover todo o conteúdo de iodo livre.

Após término dos estudos de otimização da marcação do VIP com iodo-131, foram utilizadas as melhores condições determinadas, para a marcação com o radioisótopo iodo-123. Porém, os resultados iniciais de pureza radioquímica e rendimento de marcação não foram satisfatórios, conforme demonstraram os perfis eletroforético (FIG. 4-b) e de CLAE-gradiente (FIG. 7).

Com a variação dos parâmetros de marcação do VIP com iodo-123 obteve-se melhora do rendimento de marcação, porém não significativa (TAB. 6 e 7).

No processo utilizado na produção do Na<sup>123</sup>I (item 1.3) utiliza-se um porta-alvo de aço inox que contém molibdênio natural em sua composição. No momento da irradiação, ocorre não apenas a irradiação do gás  $^{124}\text{Xe}$ , mas também do molibdênio natural havendo a formação do radioisótopo  $^{96}\text{Tc}$  ( $^{\text{NAT}}\text{Mo} \xrightarrow{\text{p,xn}} ^{96}\text{Tc}$ ).

Na TAB. 8 verifica-se também, que além do  $^{96}\text{Tc}$  aparecem outros radioisótopos,  $^{121}\text{Te}$ ,  $^{121\text{m}}\text{Te}$  e  $^{40}\text{K}$ . Os radioisótopos de telúrio que são subprodutos de ativação do alvo de  $^{124}\text{Xe}$ . O  $^{40}\text{K}$  é um isótopo radioativo da natureza correspondendo a radiação de fundo da contagem da amostra de Na<sup>123</sup>I.

O processo de filtração do iodo-123 por coluna compactada, particularmente a coluna Sep-Pak Plus alumina A, na tentativa de purificação, promoveu um incremento no rendimento da marcação do VIP, provavelmente por ter contribuído para remoção das impurezas radionuclídicas. Apesar do iodo-123 filtrado pela coluna alumina ácida apresentar maior porcentagem de  $^{123}\text{IO}_3^-$  (TAB. 10), obteve-se melhor rendimento de marcação (65,2%). Na coluna Oásis® MCX, apesar da porcentagem de  $^{123}\text{IO}_3^-$  ser inferior, a marcação foi muito ruim coincidindo os valores com os rendimentos de marcações obtidos nas primeiras marcações utilizando as mesmas condições para a marcação do VIP com iodo-131.

Nas TAB. 11 e 12 ficaram evidenciadas a melhora real do rendimento de marcação do VIP-<sup>123</sup>I e VIP10-28-<sup>123</sup>I, respectivamente, após a filtração do radioiodo pela

coluna alumina ácida. Observou-se também que ao se realizar a limpeza do porta-alvo houve uma melhora do rendimento de marcação, provavelmente por diminuição das impurezas radionuclídicas existentes (TAB. 7 e 10). Os estudos também indicam que a presença de  $^{123}\text{IO}_3^-$  nas amostras de iodo-123 e a relação atividade/massa do VIP também interferem na pureza radioquímica de marcação, já que os melhores resultados foram obtidos utilizando-se 50  $\mu\text{g}$  de proteína ao invés de 25  $\mu\text{g}$ .

A análise de espectrometria gama do filtro Sep-Pak Plus alumina A utilizado na purificação do iodo-123 (TAB. 9) confirmou os radioisótopos presentes na amostra de  $\text{Na}^{123}\text{I}$  demonstrando a capacidade da coluna em reter as impurezas radionuclídicas (TAB. 8). Porém, não se verificou a presença do Tc-96 pelo fato da alumina não possuir a capacidade de retê-lo, mas provavelmente reteve o molibdênio presente na amostra. Para futuros estudos de purificação deste radioiodo possa utilizar-se resina aniônica na tentativa de retirada desta impureza.

Observou-se variação no rendimento de marcação do VIP e VIP10-28 com iodo-123, conforme se verifica nas TAB. 11 e 12. Tal fato pode estar relacionado ao próprio processo de purificação, já que não se realizou nenhum tipo de ativação ou lavagem prévia da alumina, o que pode ter ocasionado liberação de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  ou cátions  $\text{Al}^{3+}$  nas frações de eluição, podendo estes interferr nas marcações. Este fato foi observado, pois exatamente na terceira marcação apresentada nas TAB. 11 e 12 utilizaram-se as três primeiras frações do iodo-123, o que não aconteceu nas duas primeiras marcações, pois as frações de filtrações que apresentaram maiores atividades foram a 2 e 3 e visualmente a primeira fração encontrava-se levemente esbranquiçada. Tal característica poderia ser considerada como possível interferência, já que os parâmetros utilizados nas três marcações não foram constantes, tornando difícil a comparação.

Os perfis de CLAE-gradiente obtidos para o VIP- $^{123}\text{I}$  (após filtração do radioiodo) e frações 60/40 e 10/90, após purificação simples, comprovam que a fração 10/90 retira o excesso de  $^{123}\text{I}^-$  e  $^{123}\text{IO}_3^-$  das marcações (FIG. 9-c).

Para o VIP10-28- $^{123}\text{I}$  os perfis de CLAE-gradiente demonstram perfeitamente os produtos obtidos no radiofármaco não purificado e após purificação (frações 60/40 e 10/90) conforme se observa na FIG. 10.

O procedimento de purificação simples utilizando-se coluna compactada Sep-Pak light  $\text{C}_{18}$  demonstrou ser um método simples e eficiente a ser utilizado na retirada do radioiodo livre do meio reacional. No entanto, observou-se que quando o radiofármaco contém uma quantidade elevada de radioiodo livre logo após a marcação, ao realizar a

purificação simples, o volume de 2 mL da mistura acetonitrila/TFA 0,1% (10/90) não é suficiente para uma retirada eficiente desta impureza.

A purificação do VIP-<sup>131</sup>I com CLAE-isocrática demonstrou ser um sistema eficiente para obtenção do radiofármaco com alta atividade específica, observadas nas FIG. 11 e 12 e resultados das análises eletroforéticas (frações com maiores atividades), porém por não possuir um sistema quantitativo torna-se inviável pelo baixo rendimento obtido (4,7%).

O método alternativo de purificação composta utilizado para obtenção dos radiofármacos com alta atividade específica, é um método simples, rápido e de baixo custo. A purificação do VIP-<sup>131</sup>I (FIG. 13) e do VIP10-28-<sup>131</sup>I (FIG. 16) e análise das frações coletadas demonstraram que as maiores atividades do Na<sup>131</sup>I encontraram-se na primeira fração da mistura acetonitrila/TFA 0,1% (10/90), do VIP-<sup>131</sup>I na primeira fração 60/40 e do VIP10-28-<sup>131</sup>I na segunda fração 27/73, fato confirmado pelas análises eletroforéticas apresentadas na FIG. 15. A análise em espectrofotômetro UV-visível demonstrou que as amostras apresentaram absorção na região de 205-245 nm até na quinta fração 27/73 no caso do VIP e o VIP10-28 apresentou absorção da fração 4 10/90 a fração 4 20/80. Em vista destes resultados pode-se concluir que este processo de purificação pode ser utilizado para obtenção de ambos os radiofármacos, livres de radioiodo livre, bem como da fração do peptídeo que não foi marcado.

Os estudos de biodistribuição do composto VIP-<sup>131</sup>I (TAB. 13) realizados em camundongos *Swiss* normais revelaram um rápido clareamento sanguíneo do composto e baixa captação renal. O composto apresentou pequena captação hepática e trânsito intestinal. Todos os órgãos avaliados apresentaram clareamento do composto nos tempos observados, com exceção da glândula tireóide, cuja captação aumentou com o tempo após administração da dose, indicando a liberação parcial de radioiodo *in vivo*.

Comparando-se com a biodistribuição do peptídeo VIP-<sup>131</sup>I após purificação simples (TAB. 15), observa-se que o processo de purificação não contribuiu para diminuir a captação da glândula tireóide, o que vem confirmar que a captação na glândula deve-se muito mais à dehalogenação *in vivo* do composto, do que à porcentagem de iodo livre presente no preparado no momento da administração.

Após purificação composta (TAB. 16), a captação na tireóide aumentou de 1 para 4 horas e a captação hepática e intestinal aumentaram em relação aos estudos com VIP-<sup>131</sup>I sem purificação e após purificação simples. A retirada do VIP residual após

purificação composta, parece ter favorecido a ligação do peptídeo marcado aos receptores de VIP presentes nos órgãos avaliados.

Comparando-se a captação tumoral para os VIP-<sup>131</sup>I purificados (purificação simples ou composta, TAB. 15 e 16, respectivamente) com o VIP-<sup>131</sup>I não purificado (TAB. 17), observam-se porcentagens praticamente idênticas, não importando se houve purificação ou não do radiofármaco.

Ao comparar a biodistribuição do VIP-<sup>131</sup>I e VIP10-28-<sup>131</sup>I não purificados em camundongos *Nude* com tumor (TAB.17 e 18, respectivamente) e em camundongos *Swiss* normais (TAB. 13 e 14, respectivamente) o fragmento marcado mostrou-se mais instável *in vivo* do que o VIP, conforme evidenciado pela maior captação na glândula tireóide e estômago, órgãos que normalmente concentram iodeto e outros produtos de degradação do radiofármaco presentes no organismo (Hassan et al., 1994). Parte da captação existente na glândula tireóide está relacionada à porcentagem de iodeto livre presente nas preparações (próximo de 4%), já que os radiofármacos injetados não foram purificados. O clareamento sanguíneo mais lento do VIP10-28-<sup>131</sup>I nas primeiras 4 horas, tanto para o normal como tumor, pode estar relacionado, ao menos em parte, à esta instabilidade, considerando-se a atividade de iodeto circulante. Ainda para o tempo de 4 horas há um incremento tanto na % dose no fígado como nos intestinos (grosso e delgado) no caso do fragmento marcado.

O clareamento sanguíneo mais lento do fragmento marcado, bem como a maior captação hepática e intestinal, podem também estar relacionadas à maior lipofilicidade deste composto, quando comparado com o peptídeo íntegro radioiodado.

Por ser o fragmento uma molécula menor que o peptídeo íntegro, esperar-se-ia, a princípio, que apresentasse clareamento sanguíneo mais rápido. A suposição de que o fragmento apresente lipofilicidade maior que o peptídeo íntegro poderia ser explicada se considerássemos que a marcação do fragmento com radioiodo tenha originado maior porcentagem de espécie di-iodada que é mais lipofílica que a mono. Estruturalmente, o fragmento possui a Tyr1 estericamente mais disponível (TAB. 1) para incorporação do radioiodo.

De acordo com a literatura (Virgolini et al., 1994) a espécie di-iodada apresenta menor capacidade de interação com os receptores de VIP. Os estudos de biodistribuição dos peptídeos marcados em camundongos *Nude* com tumor (TAB. 17 e 18) demonstraram captação tumoral inicialmente maior para o fragmento. Entretanto, após 4 horas, as captações praticamente se igualaram e após 24 horas foi maior para o VIP-<sup>131</sup>I, demonstrando a maior afinidade do peptídeo íntegro pelas células tumorais. A captação

tumoral maior do VIP10-28-<sup>131</sup>I em 1 hora, pode ainda estar relacionada ao clareamento sanguíneo mais lento do composto. Tanto que a relação tumor/sangue apresenta-se maior para o fragmento nos tempos mais curtos e maior para o peptídeo íntegro nos tempos mais tardios (TAB. 19).

Apesar desta diferença, a maior relação tumor/sangue foi obtida uma hora após a dose administrada para ambos os peptídeos. Apesar de dados da literatura (Blok, et al., 1999) considerarem que a interação do fragmento VIP10-28 com receptores VIP é preservada, a introdução de átomos de iodo, particularmente produzindo a forma do peptídeo di-iodado, interfere na cinética e captação tumoral do radiofármaco, conforme demonstrado em nossos estudos.

Os estudos cintilográficos do VIP-<sup>131</sup>I com purificação composta realizados em camundongos *Swiss* com tumor (FIG. 17) e rato *Wistar* com tumor (FIG. 18) demonstraram a capacidade do composto em interagir com as células tumorais, o rápido clareamento sanguíneo do composto e a ausência de captação nos demais órgãos, com exceção do estômago. Como estes animais receberam tratamento prévio com iodeto de potássio, a captação na glândula tireóide não foi observada.

De acordo com Hassan (1994), em estudos de biodistribuição do VIP-<sup>131</sup>I realizado em ratos, o composto apresenta rápido clareamento sanguíneo. Porém, neste mesmo estudo, a captação em estômago, intestino e tireóide aumentam no decorrer do tempo.

Os estudos cintilográficos com o fragmento marcado foram realizados em camundongos *Nude* com tumor (FIG. 21), utilizando-se o peptídeo marcado com iodo-123, previamente purificado para remoção do radioiodo livre. Estes animais não receberam tratamento prévio com iodeto de potássio e, por este motivo, a glândula tireóide mostrou-se bastante captante em ambos os animais. O clareamento sanguíneo mais lento, a maior captação hepática e estomacal do fragmento, além da captação na glândula tireóide, dificultaram a visualização da massa tumoral, apesar da captação tumoral, no estudo invasivo, ser numericamente maior para o VIP10-28 em comparação com o peptídeo íntegro.

A administração prévia de um antagonista de VIP (FIG. 20 e 21) teve como objetivo promover a saturação dos receptores VIP, diminuindo a ligação do peptídeo marcado às células HT-29. O animal com antagonista do VIP que recebeu o VIP-<sup>123</sup>I, evidenciou uma captação menor na região do estômago no decorrer do tempo, supondo, ter o antagonista, afinidade pelos receptores desta região, competindo com o VIP-<sup>123</sup>I. A

captação é maior na glândula tireóide e bexiga em tempos maiores e a imagem de corpo inteiro demonstra maior clareamento sanguíneo do que para o animal sem antagonista com VIP-<sup>123</sup>I. A imagem tumoral encontra-se prejudicada pela captação intensa obtida nas regiões da tireóide, estômago e bexiga, porém, observa-se nas imagens, FIG. 21 b e c, uma competição do antagonista diminuindo a captação da região tumoral.

Já na FIG. 20, pelo fato do VIP10-28-<sup>123</sup>I possuir um clareamento sanguíneo mais lento, as imagens apresentam maior nível de radiação de fundo dificultando sua análise. Entretanto, observa-se que o antagonista não é tão efetivo para os receptores do VIP10-28-<sup>123</sup>I como se mostrou para os receptores do VIP-<sup>123</sup>I.

Ainda nas imagens cintilográficas, a melhor relação alvo/radiação de fundo foi observada para o peptídeo íntegro radioiodado que promoveu um padrão de imagem melhor e compatível com o diagnóstico de massas tumorais pequenas, particularmente quando distantes da região estomacal.

O estudo realizado na relação cpm bexiga / cpm C.I. (TAB. 20) evidência uma eliminação urinária maior de ambos os radiofármacos, quando na presença do antagonista do VIP. Entretanto, a análise realizada selecionando-se nestas imagens a bexiga como área de interesse e relacionando-a à captação de corpo inteiro, observa-se que a eliminação do composto na urina é mais acentuada para o VIP e VIP10-28 na presença do antagonista. Além disso, a presença do antagonista interferiu de forma mais acentuada no clareamento e liberação do peptídeo íntegro que do fragmento. Desta forma parece ser que o antagonista utilizado interagiu mais com receptores do tipo VPAC<sub>2</sub>, sendo este um dos receptores específicos para o VIP, já que o específico para o VIP10-28 corresponde ao VPAC<sub>1</sub> (Gourlet et al., 1997).

Tanto o VIP como o fragmento marcados apresentaram pequena porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas significativamente maior para o VIP (P<0,05 teste Student t), indicando provavelmente que ambos os radiofármacos apresentam comportamento semelhante de distribuição no compartimento sanguíneo.

Os estudos de estabilidade dos radiofármacos incubados a 37 °C em plasma humano indicaram boa estabilidade de ambos os peptídeos, pois, após 24 horas de realização do ensaio, ambos encontravam-se com uma porcentagem de radiofármacos íntegros ao redor de 90% (TAB. 21).

Os resultados obtidos para o ensaio *in vitro* utilizando-se células HT-29 mostraram que o peptídeo íntegro e o fragmento apresentaram porcentagens de

internalização e ligação semelhantes sendo as diferenças observadas não significativas ( $P < 0,05$  teste Student t) (TAB. 22).

## 6 - CONCLUSÕES

**6.1** - A marcação, tanto do VIP como VIP10-28, utilizando-se como agentes oxidantes, Cloramina T ou Iodogen, possibilitou obter os radiofármacos (VIP-<sup>131</sup>I e VIP10-28-<sup>131</sup>I) com alta pureza radioquímica e rendimento de marcação variável de acordo com o agente oxidante utilizado. Optou-se pela técnica de marcação utilizando-se o agente oxidante Cloramina T, para ambos os peptídeos, por ser um procedimento rápido (curto tempo de reação) e eficiente (alto rendimento de marcação).

**6.2** - A técnica de eletroforese empregada permitiu a determinação da porcentagem de iodo livre das marcações e boa separação entre radiofármaco e Na<sup>131/123</sup>I livre.

**6.3** - Os sistemas de CLAE-isocrático e gradiente permitiram separar o VIP ou VIP10-28 não marcado, Na<sup>131/123</sup>I e as espécies radioiodadas dos peptídeos possibilitando a obtenção de radiofármacos com alta atividade específica, porém com baixo rendimento de marcação.

**6.4** - Os procedimentos de purificação simples do VIP-<sup>131</sup>I e VIP10-28-<sup>131</sup>I utilizando-se coluna compactada Sep-Pack light C<sub>18</sub> mostrou ser eficiente para retirada de iodo-131 livre e a purificação composta possibilitou inclusive a retirada do VIP e VIP10-28 não marcados, podendo também ser utilizada para obtenção de um radiofármaco com alta atividade específica e com melhor rendimento de marcação, quando comparado com a técnica de CLAE.

**6.5** - Os estudos de otimização da marcação do VIP e VIP10-28 com Na<sup>123</sup>I confirmaram a presença de contaminantes no radioiodo, obrigando a realização de procedimento de purificação do radioisótopo em questão. A marcação dos peptídeos com Na<sup>123</sup>I sofreram influência da presença de IO<sub>3</sub><sup>-</sup> e impurezas radionuclídicas, como também da razão massa do peptídeo/ radionuclídeo.

**6.6** - Os estudos de biodistribuição por método invasivo do VIP e VIP10-28 em camundongos *Swiss* normais revelaram clareamento sanguíneo mais rápido do peptídeo íntegro. Todos os órgãos avaliados apresentaram clareamento do composto nos tempos estudados, com exceção de glândula tireóide, cuja captação aumentou com o tempo após administração da dose, indicando liberação parcial do radioiodo *in vivo*.

**6.7** - Os processos de purificação, simples ou composta, dos peptídeos não contribuíram para melhorar o padrão de biodistribuição e nem interferiram na captação tumoral dos compostos.

**6.8** - Os estudos cintilográficos do VIP-<sup>131</sup>I obtidos em camundongo *Swiss* com tumor e rato *Wistar* com tumor, demonstraram afinidade boa pelos receptores da célula de adenocarcinoma de cólon-retal humano tipo HT-29, apresentando captação significativa na região tumoral, quando comparado com a imagem do camundongo *Swiss* normal. O padrão de biodistribuição do peptídeo íntegro, quando comparado ao do fragmento, mostrou-se mais adequado à aplicação no diagnóstico de tumores neuroendócrinos.

**6.9** - Em síntese, os estudos demonstraram que o peptídeo íntegro (VIP) apresenta potencial para o diagnóstico de tumores. Porém, o baixo rendimento de marcação, observado quando se utilizou iodo-123, demandará a realização de estudos adicionais, envolvendo a purificação do radionuclídeo ou mesmo a otimização do processo de produção do mesmo, de forma a viabilizar a produção em escala rotineira do radiofármaco.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, E.B. **Conjuntos de Reativos Liofilizados de Compostos Diaminoditiólicos para Marcação com Tecnécio-99m. Estudo Farmacocinético e Elaboração de Modelos Compartimentalizados dos Respetivos Complexos.** 1995. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

BAKKER, W.H.; KRENNING, E.P.; BREEMAN, W.A.; KOPER, J.W.; KOOIJ, P.P.; REUBI, J.C.; VISSER, T.J.; DOCTER, R. and LAMBERTS, S.W. Receptor scintigraphy with a radioiodinated somatostatin analogue: radiolabeling, purification, biologic activity, and in vivo application in animals. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 31, p. 1501-1509, 1990.

BAKKER, W.H.; ALBERT, R.; BRUNS, C.; BREEMAN, W.A.P.; HOFLAND, L.J.; MARBACH, P.; PLESS, J.; PRALET, D.; STOLZ, B.; KOPER, J.W.; LAMBERTS, S.W.J.; VISSER, T.J. and KRENNING, E.P. [<sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe<sub>1</sub>]-Octreotide, a potential radiopharmaceutical for imaging of somatostatin receptor-positive tumors: synthesis, radiolabeling and in vitro validation. *Life Sciences*, v. 49, p. 1583-1591, 1991.

BLOK, D.; FEITSMA, R.I.J.; VERMEIJ, P. and PAUWELS, E.J.K. Peptide radiopharmaceuticals in nuclear medicine. *European Journal of Nuclear Medicine*, v. 26, n.11, p. 1511-1519, 1999.

EISENHUT, M. and HABERKORN, U. [<sup>123</sup>I]VIP receptor scintigraphy in patients with pancreatic adenocarcinomas. *European Journal of Nuclear Medicine*, v. 27, p. 1589-1590, 2000.

FISCHMAN, A.J.; BABICH, J.W. and STRAUSS, H.W. A ticket to ride: peptide radiopharmaceuticals. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 34, n. 12, p. 2253-2262, 1993.

GOURLET, P.; NEEF, P.; CNUUDE, J.; WAELBROECK, M. and ROBBERECHT, P. *In vitro* properties of a high affinity selective antagonist of the VIP<sub>1</sub> receptor. *Peptides*, v. 18, n. 10, p. 1555-1560, 1997.

HNATOWICH, D.J.; QU, T.; CHANG, F.; LEY, A.C.; LADNER, R.C. and RUSCKOWSKI, V. Labeling Peptides with Technetium-99m Using a Bifunctional Chelator of a N-Hydroxysuccinimide Ester of Mercaptoacetyltriglycine. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 39, p. 56-64, 1998.

HARMAR, A.J.; SHEWARD, W.J.; MORRISON, C.F.; WASER, B.; GUGGER, M. and REUBI, J.C. Distribution of the VPAC<sub>2</sub> receptor in peripheral tissues of the mouse. *Endocrinology*. v. 145, n. 3, p. 1203-1210, 2004.

HASSAN, M.; REFAI, E.; ANDERSSON, M.; SCHNELL, P. and JACOBSSON, H. *In vivo* dynamical distribution of <sup>131</sup>I-VIP in the rat studied by gamma-camera. *Nuclear of Medicine and Biology*. v. 21, n. 6, p. 865-872, 1994.

HEPPELER, A.; FROIDEVAUX, S.; EBERLE, A.N. and MAECKE, H.R. Receptor targeting for tumor localization and therapy with radiopeptides. *Current Medicinal Chemistry*. v. 7, p. 971-994, 2000.

HESSENIUS, C.; BÄDER, M.; MEINHOLD, H.; BÖHMIG, M.; FAISS, S.; REUBI, J.C.; and WIEDENMANN, B. Vasoactive intestinal peptide receptor scintigraphy in patients with pancreatic adenocarcinomas or neuroendocrine tumours. *European Journal of Nuclear Medicine*. v. 27, p. 1684-1693, 2000.

HNATOWICH, D.J.; QU, T.; CHANG, F.; LEY, A.C.; LADNER, R.C. and RUSCKOWSKI, M. Labeling Peptides with Technetium-99m Using a Bifunctional Chelator of a N-Hydroxysuccinimide Ester of Mercaptoacetyltryglycine. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 39, p. 56-64, 1998.

KURTARAN, A.; RADERER, M.; MÜLLER, C.; PROKESCH, R.; KASERER, K.; EIBENBERGER, K.; KOPERMA, K.; NIERDELE, B. and VIRGOLINI, I. Vasoactive Intestinal Peptide and Somatostatin receptor scintigraphy for differential diagnosis of hepatic carcinoid metastasis. *Journal of Nuclear Medicine*. v. 38, p. 880-881, 1997.

KOWALSKY, R.J. and FALEN, S.W. *Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy and Nuclear Medicine*. Washington, DC: APhA, 2004. cap. 9, Radiopharmaceutical Chemistry. p. 235-336.

KNIGHT, L.C. Radiolabeled Peptides for Tumor Imaging. In: WELCH, M.J. and REDVANLY, C.S. (Ed.). *Handbook of Radiopharmaceuticals*. England: Wiley, 2003. cap. 23. p. 643-684.

KRUMMEICH, C.; HOLSCHBACH, M. and STOCKLIN G. Convenient direct n.c.a. electrophilic radioiodination of arenes using iodo-gen. *Appl. Radiat. Isot.*, v. 47, p. 489-495, 1996.

LAKEN-VAN DER, C.J.; BOERMAN, O.C.; OYEN, W.J.G.; VAN DE VEM, M.T.P. and VAN DER MEER, J.W.M. Corstens FHM Scintigraphic detection of infection and inflammation: new developments with special emphasis on receptor interaction. *European Journal of Nuclear Medicine*. v. 25, p. 535-546, 1998.

LEVER, J.R. Radioiodinated Compounds. In: BUCHANAN, W.S.; WAGNER, H.N. and SZABO, Z. (Ed.). *Principles of Nuclear Medicine*. Philadelphia, Pennsylvania: Saunders, 1995. cap. 11. parte 4. p. 199-213.

LISTER-JAMES, J.; MOYER, B.R. and DEAR, T. Small peptides radiolabeled with  $^{99m}\text{Tc}$ . *Q. J. Nucl. Med.*, v. 40, p. 221-233, 1996.

LIU, C.; TADAYONI, M.; BOURREAT, L.A.; MATTOCKS, K.M.; DERR, S.M.; WIDDISON, W.; KEDERSHA, N.; ARINIELLO, P.D.; GOLDMACHER, V.S.; LAMBERT, J.M.; BLÄTTLER, W.A. and CHARI, R.V.J. Eradication of large colon tumor xenografts by targeted delivery of maytansinoids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 93, p. 8618-8623, 1996.

LIU, C.; WILLINGHAM, M.; LIU, J. and GMEINER, W.H. Efficacy and safety of FdUMP[10] in treatment of HT-29 human colon cancer xenografts. *International Journal of Oncology*. v. 21, p. 303-308, 2002.

MARIE, J.C.; BOISSARD, C. and ROSSELIN, G. Purification of monoiodinated vasointestinal peptide ( $\text{M}^{125}\text{I-VIP}$ ) by high pressure liquid chromatography (HPLC). *Peptides*. v. 5, p. 179-182, 1984.

MARIE, J.C.; HOA, D.H.B.; JACKSON, R.; HEJBLUM, G. and ROSSELIN, G. The biological relevance of HPLC-purified vasoactive intestinal polypeptide monoiodinated at tyrosine 10 or tyrosine 22. *Regulatory Peptide*. v. 12, p. 113-123, 1985.

MARTIN, J.L.; ROSE, K.; HUGHES, G.J. and MAGISTRETTI, P.J. [mono- $^{125}\text{I}$ ]iodo-Tyr<sup>10</sup>,MetO]-Vasoactive Intestinal Polypeptide - preparation, characterization, and use for radioimmunoassay and receptor binding. *J.Biol.Chem.*, v. 261, n. 12, p. 5320-5327, 1986.

MCAFEE J.G. and NEUMANN R.D. Radiolabeled Peptides and Other Ligands for Receptors Overexpressed in Tumor Cells for Imaging Neoplasms. *Journal of Nuclear Medicine and Biology*. v. 23, p. 673-676, 1996.

MILENIC, D.E.; YOKOTA, T.; FILPULA, D.R. Construction, binding properties, metabolism and tumor penetration of a single-chain Fv derived from pancreatic carcinoma monoclonal antibody CC49. *Cancer Research*., v. 51, p. 6363-6371, 1991.

MOODY, T.W.; LEYTON, J.; UNSWORTH, E.; JOHN, C.; LANG, L. and ECKELMAN, W.C. (Arg<sup>15</sup>, Arg<sup>21</sup>) VIP: Evaluation of biological activity localization to breast cancer tumors. *Peptides*. v. 19, n. 3, p. 585-592, 1998.

MUTT, V. Vasoactive intestinal polypeptide and related peptides. Isolation and chemistry. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* v. 527, p. 1-19, 1988.

- NEDELMAN, M.A.; SHEALLY, D.J. and BOULIN, R. Rapid infarct imaging with technetium-99m-labeled antimyosin recombinant single-chain Fv: evaluation in a canine model of acute myocardial infarction. *Journal Nuclear Medicine*. v. 34, p. 234-241, 1993.
- RADERER, M.; KURTARAN, A.; YANG, Q.; MEGHDADI, S.; VORBECK, F.; HEJNA, M.; ANGELBERGER, P.; KORNEK, G.; PIDLICH, J.; SCHEITHAUER, W. and VIRGOLINI, I. Iodine-123-Vasoactive intestinal peptide receptor scanning in patients with pancreatic cancer. *Journal of Nuclear Medicine*. v. 39, p. 1570-1575, 1998a.
- RADERER, M.; KURTARAN, A.; HEJNA, M.; VORBECK, F.; ANGELBERGER, P.; SCHEITHAUER, W. and VIRGOLINI, I. Iodine-123-Vasoactive intestinal peptide receptor scintigraphy in patients with colorectal cancer. *British Journal of Cancer*. v. 78, n. 1, p. 1-5, 1998b.
- RAO, P.S.; THAKUR, M.L.; PALLELA, V.; PATTI, R.; REDDY, K.; LI, H.; SHARMA, S.; PHAM, H.L.; DIGGLES, L.; MINAMI, C. and MARCUS, C.S. <sup>99m</sup>Tc labeled VIP analog: evaluation for imaging colorectal cancer. *Journal of Nuclear Medicine and Biology*. v. 28, p. 445-450, 2001.
- REUBI, J.C. *In vitro* identification of vasoactive intestinal peptide receptors in human tumors: implications for tumor imaging. *Journal of Nuclear Medicine*. v. 36, p. 1846-1853, 1995.
- REUBI, J.C.; ZIMMERMANN, A.; JONAS, S.; WASER, B.; NEUHAUS, P.; LÄDERACH, U. and WIEDENMANN, B. Regulatory peptide receptors in human hepatocellular carcinomas. *Gut*. v. 45, p. 766-774, 1999.
- REUBI, J.C. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocrine Reviews*. v. 24, n. 4, p. 389-427, 2003.
- REFAI, E.; JONSSON, C.; ANDERSON, M.; JACOBSSON, H.; LARSSON, S.; KOGNER, P. and HASSAN, M. Biodistribution of liposomal [<sup>131</sup>I]VIP in rat using gamma camera. *Journal of Nuclear Medicine and Biology*. v. 26, p. 931-936, 1999.
- SAYA, G.B. **Fundamentals of Nuclear Pharmacy**. Cleveland, OH: Springer., 1997. cap. 4, Production of Radionuclides. p. 47-64.
- STÖCKLIN, G.; QAIM, S.M. and RÖSCH, F. The Impact of Radioactivity on Medicine. *Radiochemical Acta*. v. 70/71, p. 249-272, 1995.
- SEEVERS, R.H. and COUNSELL, R.E. Radioiodination Techniques for Small Organic Molecules. *Chemical Reviews*. v. 82, n. 6, p. 575-590, 1982.
- VIRGOLINI, I; RADERER, M.; KURTARAN, A.; ANGELBERGER, P.; BANYAI, S.; YANG, Q.; LI, S.; BANYAI, M.; PIDLICH, J.; NIEDERLE, B.; SCHEITHAUER, W. and

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, 1994a.

VIRGOLINI, I.; YANG, Q.; LI, S.; ANGELBERGER, P.; NEUHOULD, N.; NIEDERLE, B.; SCHEITHAUER, W. and VALENT, P. Cross competition between vasoactive intestinal peptide (VIP) and somatostatine for binding to tumor cell receptyores. *Cancer Research.* v. 54, p. 690-700, 1994b.

VIRGOLINI, I.; KURTARAN, A.; RADERER, M.; LEIMER, M.; ANGELBERGER, P.; HAVLIK, E.; SHUREN, L.; SCHEITHAUER, W.; NIEDERLE, B.; VALENT, P. and EICHLER, H.G. Vasoactive Intestinal Peptide receptor scintigraphy. *Journal of Nuclear and Medicine.* v. 36, p. 1732-1739, 1995.

VIRGOLINI, I.; RADERER, M.; KURTARAN, A.; ANGELBERGER, P.; YANG, Q.; RADOSAVLJEVIC, M.; LEIMER, M.; KASERER, K.; LI, R.; KORNEK, G.; HÜBSCH, P.; NIEDERLE, B.; PIDLICH, J.; SCHEITHAUER, W. and VALENT, P. <sup>123</sup>I-Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) receptor scanning: update of imaging results in patients with adenocarcinomas and endocrine tumors of the gastrointestinal tract. *Journal of Nuclear Medicine and Biology.* v. 23, p. 685-692, 1996.

VIRGOLINI, I. Receptor nuclear medicine: vasointestinal peptide and somastotatin receptor acintigraphy for diagnosis and treatment of tumour patients. *European Journal of Clinical Investigation.* v. 27, p. 793-800, 1997.

VIRGOLINI, I.; KURTARAN, A.; LEIMER, M.; KASERER, K.; RADOSAVLJEVIC-PECK, M.; ANGELBERGER, P. HÜBSCH, P.; DVORAK, M. VALENT, P. and NIEDERLE, B. Location of a VIPoma by iodine-123-Vasoactive Intestinal Peptide scintigraphy. *Journal of Nuclear Medicine.* v. 39, p- 1575-1579, 1998.

YOKOTA, T.; MILENIC, D.E. and WHITLOW, M. Rapid tumor penetration of a single chain Fv and comparison with other immunogloboilun forms. *Cancer Reasearch.* v. 52, p. 3402-3408, 1992a.

YOKOTA, T.; MILENIC, D.E. and 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, 1992b.