



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**“ AVALIAÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* DO DOTA-LANREOTIDEO  
RADIOMARCADO COM GÁLIO-67 ”**

**ELIANE BERNARDES ALDEGHERI**

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

**Orientador:  
Dr. João Alberto Osso Junior**

**São Paulo  
2005**

**Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares *ipen***  
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**" AVALIAÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* DO DOTA-LANREOTIDEO  
RADIOMARCADO COM GÁLIO-67 "**

**Eliane Bernardes Aldegheri**



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

**Orientador:  
Dr. João Alberto Osso Junior**

**São Paulo  
2005**

A  
Deus  
Fonte de sabedoria

Ao meu pai ("in memoriam")  
Pelo caminho escolhido...

A minha mãe  
pelo amor e incentivo  
em todas as etapas  
da minha vida...

Ao meu marido  
e ao meu filho  
Pelo amor, carinho e paciência

## AGRADECIMENTOS

- ✧ Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN/CNEN/SP, nas pessoas do Superintendente Dr Cláudio Rodrigues e Dr Edson Roman Diretor de Projetos Especiais.
- ✧ À Dra Constância 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, pela oportunidade e facilidades concedidas.
- ✧ À farmacêutica Neuza Taeko Okasaki Fukumori, chefe da Divisão de Controle da Qualidade, pelas facilidades oferecidas.
- ✧ À Dra Elaine Bortoleti de Araújo, gerente adjunta para Garantia da Qualidade, amizade, sugestões e colaboração fornecida.
- ✧ Ao Dr João Alberto Osso Jr., Chefe da Produção, pela orientação, pela amizade, apoio, sugestões, compreensão e confiança a mim depositada.
- ✧ À Dra Bluma L Faintuch pela orientação e sugestões no início desta tese.
- ✧ À Dra Emiko Muramoto, pela amizade, apoio, sugestões e colaboração fornecida.
- ✧ Aos funcionários Ana Lucia Vilela Pinheiro Lima e Luis Alberto L Dias, da Divisão de Produção, pelo auxílio técnico prestado e colaboração no transcorrer deste trabalho.
- ✧ Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.
- ✧ À Dra Nilda P S de Pereira, quando chefe da Divisão da Garantia, pela amizade e facilidades oferecidas.
- ✧ Aos amigos do laboratório: Akinkumi Aranji, Áurea B. Geraldo, Dulcila Maria Lessa Bernardes, Edson Vieira Alves, Guilherme L. Carvalho, José Caldeiras, Josefina Santos, Laura Ueda, Kátia Susi Silveira, Marycel B.Figols, M<sup>a</sup>Tereza Coulturato, Patrícia A Martins, Renata Martinussi, Tatiana Lavinias, Wagner Nieto.

- ✧ Aos demais pesquisadores, técnicos e estagiários pela agradável e profícuo convívio durante a realização deste trabalho.
- ✧ Ao Centro de Medicina Nuclear (CMN), na pessoa da pesquisadora Miriam Roseli Yoshie Okamoto, pela colaboração prestada na realização das imagens cintilográficas deste estudo.
- ✧ À técnica Neide Ferreira Mascarenhas, do Biotério do Centro de Biologia Molecular, pela colaboração realizada com o fornecimento dos animais de laboratório utilizados.
- ✧ À técnica Miriam Fussaé Suzuki, do Centro de Biologia Molecular, pela colaboração realizada com a preparação das culturas de células.
- ✧ Aos meus familiares e todos aqueles que contribuíram de alguma maneira pelo carinho e confiança em mim depositada, tornando possível este trabalho.

## **AVALIAÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* DO DOTA-LANREOTIDEO RADIOMARCADO COM GÁLIO-67**

Eliane Bernardes Aldegheri

### **RESUMO**

Um dos refinamentos em medicina nuclear, da atual geração, consiste na capacidade de prover imagens dinâmicas e cinéticas do radiofármaco administrado, retratando fielmente o seu mecanismo de transporte, sítios de ação, ligação a receptores, e a rota de excreção. Com o contínuo avanço tecnológico, novos radiofármacos têm sido desenvolvidos de forma a expressar maior especificidade e, portanto, com maiores caracteres de afinidade receptores/complexo. Um radiofármaco é formado por reagente ou biomolécula que tem agregado à sua estrutura um radionuclídeo, cujo objetivo é direcioná-lo aos órgãos de afinidade ou a um processo tumoral benigno ou maligno. A somatostatina inibe o crescimento e a proliferação de várias células tumorais. Análogos da somatostatina se ligam aos receptores somatostáticos que se expressam em distintos tipos de neoplasias. O DOTA-LANREOTIDEO (DOTALAN) é um octapeptídeo cíclico análogo da somatostatina. O interesse em marcar o bioconjugado com gálio-67 em medicina nuclear vem das propriedades físicas, químicas e biológicas do radionuclídeo. Além das radiações gama ( $\gamma$ ), de grande valia no diagnóstico de focos de inflamação e infecção, possui emissão de elétrons Auger (0,1-8keV) e elétrons de conversão (80-90keV), tornando-o um isótopo atrativo para radioterapia interna, se os vetores usados para conduzir o radionuclídeo até a célula tumoral são internalizados. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia de marcação do peptídeo

DOTA-LANREOTIDEO com  $^{67}\text{Ga}$ , otimizando os parâmetros de marcação e determinando a metodologia do controle de qualidade. O aspecto inédito foi a comparação entre a marcação com o  $^{67}\text{Ga}$  importado e nacional, na sua forma original e purificada. A purificação do  $^{67}\text{Ga}$  foi essencial para alcançar rendimentos maiores que 90%. Os peptídeos bioconjugados radiomarcados devem estar livres de contaminantes metálicos, que possam competir no processo da marcação. O seguinte procedimento foi estabelecido após os parâmetros de marcação estudados: massa do peptídeo de  $10\mu\text{g}$  ( $6\text{nmol}$ ), pH 5, volume final da reação de  $170\mu\text{L}$  do marcado e uma atividade de  $^{67}\text{Ga}$  de  $222\text{MBq}$  ( $6\text{mCi}$ ). O DOTALAN- $^{67}\text{Ga}$  preservado à temperatura ambiente manteve-se inalterado durante 144 horas ( $94,95 \pm 0,63\%$ ) e uma boa estabilidade no plasma humano durante 24 horas ( $96,75 \pm 1,06\%$ ), sustentou sua integridade. A distribuição biológica apresentou a predominância da excreção do radiofármaco pelo sistema renal e baixo acúmulo da radioatividade nos órgãos, em animais saudáveis. O longo tempo de residência do radiofármaco DOTALAN- $^{67}\text{Ga}$  em tecidos de animais de experimentação, ricos em receptores de somatostatina, está relacionado à internalização dos ligantes e conseqüentemente entrada na célula tumoral HT-29.

**THE *IN VIVO* AND *IN VITRO* EVALUATION OF DOTA-LANREOTIDE  
RADIOLABELLED WITH GALLIUM-67**

Eliane Bernardes Aldegheri

**ABSTRACT**

One of the refinements of modern Nuclear Medicine is the capacity of providing dynamic and kinetics images of the administered radiopharmaceutical, reproducing its transport mechanism, action sites, receptor binding and excretion route. With the continuous technological advances new radiopharmaceuticals have been developed in order to express higher specificity and with higher characters of affinity between receptor/complex. One radiopharmaceutical is formed by a reagent or biomolecule that has in its structure a radioisotope, that has the objectives of carrying it to the organs of affinity or to benign or malign tumoral process. Somatostatine inhibits the growing and proliferation of several tumoral cells. Somatostatine analogs bind to somatostatic receptors that are expressed in different kind of neoplasies DOTA-LANREOTIDE (DOTALAN) is an octapeptide analog to somatostatine. The interest of labeling the bioconjugate with gallium-67 in Nuclear Medicine comes from its physical, chemical and biological properties. Besides its gamma radiation, useful in the diagnosis of inflammation and infection foci,  $^{67}\text{Ga}$  emits Auger electrons (0.1 - 8 keV) and conversion electrons (80 - 90 keV), making it attractive to internal radiotherapy if the vectors used to lead the



radionuclide to the tumoral cell are internalized. The objective of this work was to develop a methodology of labelling DOTA-LANREOTIDE with  $^{67}\text{Ga}$ , optimizing the labelling variables and its quality control. The novelty aspect was the comparison between labeling with national and imported  $^{67}\text{Ga}$ , in its original and purified forms. The purification of  $^{67}\text{Ga}$  was essential to reach yields higher than 90%. The radiolabelled bioconjugate peptides must be free of metallic contaminants that could compete in the labeling process. The following procedure was established after studying the labeling parameters: mass of peptide of 10  $\mu\text{g}$  (6nmol), pH5, final reaction volume of 170 $\mu\text{L}$  of the labelled and  $^{67}\text{Ga}$  activity of 222 MBq (6mCi). DOTALAN- $^{67}\text{Ga}$  was stable for 144 hours ( $94,95 \pm 0.63\%$ ) at room temperature, and when incubated in human plasma the stability lasted for 24 hours ( $96.75 \pm 1.06\%$ ). The biological distribution showed a predominant excretion of the radiopharmaceutical by the kidney system and accumulation in the organs in healthy animals. The long residence time of DOTALAN- $^{67}\text{Ga}$  in the tissues of animals, rich in somatostatine receptors, is related to the internalisation of the ligands and subsequently entrance in the tumoral cell HT-29.

## SUMÁRIO

Página

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>1.1. Agentes quelantes bifuncionais para o <sup>67</sup>Ga</b>	<b>19</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>25</b>
<b>2.1. Gálio</b>	<b>25</b>
<b>2.1.1. Propriedades nucleares e químicas do <sup>67</sup>Ga</b>	<b>25</b>
<b>2.1.2. Histórico</b>	<b>27</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>31</b>
<b>4.1. MATERIAIS</b>	<b>31</b>
<b>4.1.1. Reagentes</b>	<b>31</b>
<b>4.1.2. Equipamentos</b>	<b>32</b>
<b>4.1.3. Outros</b>	<b>33</b>
<b>4.1.4. Animais</b>	<b>33</b>
<b>4.2. Métodos</b>	<b>34</b>
<b>4.3.1. Amostras de <sup>67</sup>Ga</b>	<b>34</b>
<b>4.3.2. Purificação do <sup>67</sup>Ga para Eliminação de Metais (Zn, Fe, Cu e Ni)</b>	<b>35</b>
<b>4.3.3. Preparação do acetato de <sup>67</sup>Ga</b>	<b>36</b>
<b>4.4. Análise dos metais</b>	<b>36</b>
<b>4.5. Preparação do peptídeo DOTALAN</b>	<b>37</b>
<b>4.6. Marcação do DOTALAN com <sup>67</sup>Ga</b>	<b>37</b>
<b>4.7. Análise da pureza radioquímica</b>	<b>37</b>
<b>4.8. Otimização dos parâmetros de marcação</b>	<b>38</b>
<b>a. Variação da massa e da atividade do produto marcado</b>	<b>38</b>
<b>b. Variação do pH do acetato de <sup>67</sup>Ga</b>	<b>39</b>
<b>c. Variação do volume do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga</b>	<b>39</b>
<b>d. Variação da atividade do <sup>67</sup>Ga</b>	<b>39</b>
<b>4.9.a Estabilidade do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga <i>in vitro</i></b>	<b>39</b>
<b>4.9.b. Estabilidade do marcado no plasma sanguíneo</b>	<b>39</b>

<b>4.10. Estudos biológicos</b>	<b>40</b>
<b>4.10.1. Cultivos de células de adenocarcinoma de cólon retal humano (HT-29)</b>	<b>40</b>
<b>4.11. Biodistribuição do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga em camundongos <i>Swiss</i> sadios e camundongos <i>Swiss</i> inoculados com células de adenocarcinoma de cólon-retal humano (HT-29)</b>	<b>41</b>
<b>4.13. Ensaio de Perfusão</b>	<b>43</b>
<b>4.14. Estudos Cintilográficos</b>	<b>43</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>46</b>
<b>5.1. Análise de metais</b>	<b>46</b>
<b>5.8.1a. Biodistribuição do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga em camundongos <i>Swiss</i> sadios</b>	<b>57</b>
<b>5.2. Identificação e pureza radioquímica</b>	<b>50</b>
<b>5.3. Massa do bioconjugado</b>	<b>51</b>
<b>5.4. Variação do pH do acetato de <sup>67</sup>Ga</b>	<b>53</b>
<b>5.5. Variação do volume do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga</b>	<b>54</b>
<b>5.6. Variação da atividade do <sup>67</sup>Ga</b>	<b>54</b>
<b>5.7. Estabilidade do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga</b>	<b>55</b>
<b>5.7.1. Estabilidade da marcação no plasma sanguíneo</b>	<b>56</b>
<b>5.8. Estudos in vivo</b>	<b>56</b>
<b>5.1.1. Marcação do DOTALAN com <sup>67</sup>Ga antes e após a extração por solventes</b>	<b>48</b>

<b>5.8.1b. Biodistribuição do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga em camundongos <i>Swiss</i> inoculados com células HT-29</b>	<b>60</b>
<b>5.8.1c. Biodistribuição do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga em camundongos <i>Nudes</i> inoculados com células HT-29</b>	<b>62</b>
<b>5.9. Estudos de perfusão</b>	<b>66</b>
<b>5.10. Biodistribuição do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga através de imagens cintilográficas em camundongos <i>Swiss</i> com células HT-29</b>	<b>66</b>
<b>5.11. Biodistribuição do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga por meio de imagens cintilográficas em camundongos <i>Swiss</i> inoculados com células HT-29</b>	<b>68</b>
<b>5.12. Biodistribuição do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga por meio de imagens cintilográficas em camundongos <i>Nudes</i> inoculados com células AR4-2J</b>	<b>70</b>
<b>5.13. Ensaio de internalização <i>in vitro</i> do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga nas células de adenocarcinoma de cólon-retal humano (HT-29)</b>	<b>72</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>74</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>75</b>

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>Página</b>
<b>FIGURA 1-</b> Estrutura dos análogos da somatostatina conjugados com o agente quelante bifuncional DOTA	<b>21</b>
<b>FIGURA 2-</b> Síntese do DOTA-LANREOTIDEO	<b>23</b>
<b>FIGURA 3-</b> Extração por solventes para purificação do $^{67}\text{Ga}$	<b>36</b>
<b>FIGURA 4-</b> Presença de metais em amostras do $^{67}\text{GaCl}_3$ antes e após a purificação	<b>46</b>
<b>FIGURA 5 (a - d)-</b> Curvas de calibração do zinco, ferro, cobre e níquel obtidas no espectrofotômetro de absorção atômico (EAA)	<b>47</b>
<b>FIGURA 6-</b> Marcação do DOTALAN com $^{67}\text{Ga}$ (antes da purificação e após a extração com solventes)	<b>49</b>
<b>FIGURA 7-</b> Coluna de fase reversa $\text{C}_{18}$ (RP- $\text{C}_{18}$ ) em um sistema isocrático, com um fluxo de 1,0mL/ min acoplado a um detector de radiação: a) CLAE do DOTALAN- $^{67}\text{Ga}$ (tempo de retenção do EDTA- $^{67}\text{Ga}$ = 2,0min e do DOTALAN- $^{67}\text{Ga}$ =3,9 min) e b) CLAE do EDTA- $^{67}\text{Ga}$	<b>52</b>
<b>FIGURA 8-</b> marcação do DOTALAN (massa de 20 $\mu\text{g}$ e 50 $\mu\text{g}$ ) em acetato de gálio-67, com variação do pH (3 e 5)	<b>53</b>
<b>FIGURA 9-</b> Variação do volume (100 ,150, 170 e 290 $\mu\text{L}$ ) do DOTALAN (massa do peptídeo de 10 $\mu\text{g}$ ) com $^{67}\text{Ga}$	<b>54</b>
<b>FIGURA 10 -</b> Variação a atividade de marcação de 185, 259 e 592 MBq (5, 7 e 16mCi)	<b>55</b>
<b>FIGURA 11-</b> Imagens obtidas em uma mini - câmara gama portátil colimada para gálio-67: a)animal com células HT-29 na pata direita (com uma blindagem na região abdominal); b) animal com células HT-29 no dorso; e c) animal sadio (normal) com uma blindagem na região abdominal.	<b>67</b>
<b>FIGURA 12-</b> Imagens cintilográficas de camundongos <i>Swiss</i> inoculados com células HT-29, na região abdominal. Imagens após a administração do produto: a) 3 horas; b) 4 horas e c) 24 horas	<b>69</b>
<b>FIGURA 13-</b> Imagens cintilográficas de camundongos <i>Nude</i> inoculados com células AR42J, na região abdominal. Imagens após a administração do produto: a) 4 horas e b) 24 horas	<b>71</b>

<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>Página</b>
<b>TABELA 1</b> – Redução de contaminantes metálicos do $^{67}\text{GaCl}_3$ após a extração por solventes (n=10)	<b>48</b>
<b>TABELA 2</b> - Distância de migração relativa ( $R_f$ ) do DOTALAN- $^{67}\text{Ga}$ , observada nas diferentes condições solventes	<b>50</b>
<b>TABELA 3</b> - Pureza radioquímica da marcação do DOTALAN- $^{67}\text{Ga}$ , realizada em colunas de fase reversa de Sep Pak $\text{C}_{18}$ , variando a massa do peptídeo (10 a $50\mu\text{g}$ )	<b>51</b>
<b>TABELA 4a-</b> Biodistribuição do DOTALAN- $^{67}\text{Ga}$ , em camundongos Swiss sadios. %ATIVIDADE/ ÓRGÃOS	<b>58</b>
<b>TABELA 4b-</b> Biodistribuição do DOTALAN- $^{67}\text{Ga}$ , em camundongos Swiss sadios. % ATIVIDADE /GRAMA	<b>59</b>
<b>TABELA 5a-</b> Biodistribuição do DOTALAN- $^{67}\text{Ga}$ , em camundongos Swiss inoculados com células HT-29. % ATIVIDADE / ÓRGÃOS	<b>61</b>
<b>TABELA 5b-</b> Biodistribuição do DOTALAN- $^{67}\text{Ga}$ , em camundongos Swiss inoculados com células HT-29. % ATIVIDADE /GRAMA	<b>62</b>
<b>TABELA 6a-</b> Biodistribuição do DOTALAN $^{67}\text{Ga}$ , em camundongos <i>NUDE</i> com células HT-29. % ATIVIDADE/ Órgão	<b>63</b>
<b>TABELA 6b-</b> Biodistribuição do DOTALAN $^{67}\text{Ga}$ , em <i>NUDE</i> inoculados com células HT-29. % ATIVIDADE / Grama	<b>64</b>
<b>TABELA 7-</b> Biodistribuição do DOTALAN- $^{67}\text{Ga}$ em camundongos, visto sob o prisma das imagens cintilográficas	<b>70</b>
<b>TABELA 8-</b> % de DOTALAN- $^{67}\text{Ga}$ ligada e internalizada às células de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29)	<b>72</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Um dos refinamentos em medicina nuclear, da atual geração, consiste na capacidade de prover imagens dinâmicas e cinéticas do radiofármaco administrado, retratando fielmente o seu mecanismo de transporte, sítios de ação, ligação a receptores, e a rota de excreção.

Um radiofármaco é formado por complexo de reagente ou biomolécula que tem agregado a sua estrutura um radionuclídeo, cujo objetivo é direcioná-lo a órgãos de afinidade ou a um processo tumoral benigno ou maligno.

Os radiofármacos com finalidades diagnósticas, utilizados na obtenção de imagens, com auxílio de tomografia computadorizada por emissão de fóton único - SPECT (*Single Photon Emission Computed Tomograph*), devem ser, preferencialmente emissores de radiação gama, de energia entre 100-300 keV e com tempo de meia vida ( $T_{1/2}$ ) relativamente curto (horas a poucos dias). São exemplos de radioisótopos utilizados em radiofármacos para diagnóstico o Tecnécio-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ), Iodo-123 ( $^{123}\text{I}$ ), Gálio-67 ( $^{67}\text{Ga}$ ), Tálcio-201 ( $^{201}\text{Tl}$ ), Índio-111 ( $^{111}\text{In}$ ), entre outros <sup>1</sup>.

Já os radiofármacos destinados à terapia de tumores malignos, devem possuir radiação  $\beta^-$  associado a uma energia relativamente alta e com tempo de meia vida ( $T_{1/2}$ ) maior, utilizando-se radionuclídeos tais como: Iodo-131 ( $^{131}\text{I}$ ), Samário-153 ( $^{153}\text{Sm}$ ), Rênio-166 ( $^{166}\text{Re}$ ), entre outros <sup>2</sup>. O  $^{67}\text{Ga}$  também pode ser aplicado à terapia de tumores apresentando emissão de elétrons Auger (0,1-8 keV) e elétrons de conversão (80-90keV) de baixa energia.

Os radionuclídeos emissores de pósitrons (partículas  $\beta^+$ ), como Flúor-18 ( $^{18}\text{F}$ ), Carbono-11 ( $^{11}\text{C}$ ), Nitrogênio-13 ( $^{13}\text{N}$ ), Oxigênio-15 ( $^{15}\text{O}$ ), Gálio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ), entre outros, promovem imagens por meio de tomografia de emissão de pósitrons - PET (*Positrons Emission Tomography*)<sup>2</sup>.

Em 1975, Kohler e Milstein<sup>3</sup> desenvolveram a técnica do hibridoma (fusão celular) para a produção de anticorpos monoclonais com um alto grau de pureza, especificidade além de mais reativos. Como provêm de um único conglomerado celular, são quimicamente homogêneos e de aproximadamente 150000 daltons (ou 150000 u.m.a). Por ação enzimática podem ser fragmentados em unidades menores, porém, preservando a sua propriedade biológica ativa.

Os radiofármacos preparados a partir de anticorpos monoclonais surgiram, com o sucesso do advento do radioimunoensaio, no qual um dos componentes, antígeno ou anticorpo marcado serve como radiotraçador.

Na Medicina Nuclear diagnóstica, essas biomoléculas marcadas com radioelementos compatíveis com a sua estrutura, fornecem subsídios importantes nas investigações de diversas doenças e na terapia por irradiação.

Em vista da sua especificidade e diversidade, esses radiofármacos demonstraram ser agentes promissores para uma variedade de desordens sejam elas, benignas ou malignas<sup>4</sup>, sendo a imunocintilografia classificada como provável instrumento de diagnóstico na oncologia clínica.

Em 1993, a FDA (*Food and Drug Administration - USA*) aprovou o primeiro anticorpo monoclonal murino (rato) para diagnóstico do câncer recorrente de ovário e coloretal (OncoScint, 1992). Subseqüentemente, mais três produtos foram liberados e utilizados para diagnósticos. Entretanto, anos de pesquisa têm demonstrado a ocorrência de efeitos adversos à saúde pelo uso sucessivo desses radiofármacos, como reações decorrentes da imunogenicidade. Além de apresentar lenta depuração sanguínea, o que requer aos pacientes espera em dias para a obtenção das imagens cintilográficas<sup>5, 6</sup>.



Bruce Merrifield descreveu, na década de sessenta a setenta, a síntese de peptídeos radiomarcados; entretanto, o interesse para o emprego diagnóstico e terapia foi somente há uma década atrás <sup>6,7</sup>.

O termo peptídeo é convencionalmente usado para se referir a moléculas com menos de 50 aminoácidos, ou cerca de 5500 daltons em peso molecular, enquanto que as proteínas são constituídas por mais de 100 aminoácidos <sup>5,7</sup>. Os peptídeos pequenos se referem a menos de 30 aminoácidos ou cerca de 3500 daltons em peso molecular <sup>8</sup>.

Esses pequenos peptídeos podem ser classificados como sendo altamente lipofílicos ou hidrofílicos e o efeito farmacocinético deve corresponder a sua característica física.

Os fragmentos de peptídeos e de anticorpos apresentam certas vantagens em comparação a forma íntegra, tais como, depuração sangüínea mais rápida permitindo melhor definição em relação ao órgão de interesse<sup>9</sup>. Os peptídeos solicitam técnicas menos sofisticadas de preparo e um custo mais acessível quando equiparado aos anticorpos <sup>10,11</sup>

Recentemente, o peptídeo tem sido identificado pela alta afinidade às células tumorais que expressam nas suas membranas plasmáticas uma grande quantidade de receptores de proteínas. Em adição, há mais de 850 peptídeos endógenos bem caracterizados, dos quais um peptídeo efetivo ou seu análogo pode ser escolhido para uma futura aplicação<sup>12</sup>. O sucesso dependerá da relação de captação tumor/não tumor, da depuração, da biodistribuição, assim como da radiotoxicidade relacionada com os agentes terapêuticos.

Para estudos de receptores, a relação quelante / metal, Luy e Katzenellenbogen (2002)<sup>13</sup> desenvolveram métodos para marcação de biomoléculas (peptídeos e proteínas) com metais, cujos perfis dos isótopos obedecem às seguintes características: a) ligação com alta estabilidade cinética; b) ter sítio de quelação identificável por espectroscopia; e c) possuir propriedade bifuncional que permita o seu acoplamento a uma variedade de biomoléculas.

Muitos peptídeos endógenos têm uma meia vida biológica muito curta, inviabilizando o seu emprego como radiofármacos terapêuticos e diagnósticos. Isto é usualmente devido à rápida proteólise na circulação, o qual tem um caminho para ajustar a influência *in vivo* destes agentes, por exemplo a somatostatina<sup>14, 15</sup>.

A somatostatina natural foi descoberta no final da década de 1960. É um peptídeo cíclico com 14 aminoácidos que age como neurotransmissor ou como hormônio dependendo do sítio de ação e do tipo de célula alvo. Possui um papel regulatório no trato gastrointestinal e sistema pancreático. Inibe a secreção glandular, a contratilidade do músculo liso e a função de células imunes ativadas.

A somatostatina inibe o crescimento e a proliferação de várias células tumorais.<sup>16</sup> Pela razão das células tumorais expressarem um grande número de receptores somatostáticos tornou-se um instrumento básico para o uso do bioconjugado radiomarcado na localização *in vivo* de tumores endócrinos<sup>17, 18</sup>.

A somatostatina natural é susceptível a degradação enzimática rápida (a meia vida biológica no sangue é 2 a 4 minutos), por isto, inapropriada para aplicação *in vivo*. Foram desenvolvidos análogos sintéticos da somatostatina estáveis: octreotideo [(D)Phe-Cys-Phe-(D)Trp-Lys-Thr-Cys-Thr(ol)]; vapreotideo → [(D)Phe-Cys-Tyr-(D)Trp-Lys-Val-Cys-Trp-NH<sub>2</sub>], lanreotideo → (D)βNal-Cys-Tyr-(D)Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH<sub>2</sub> e outros<sup>17</sup>.

Os análogos da somatostatina se ligam aos receptores somatostáticos que se expressam em distintos tipos de neoplasias. Após esta etapa uma fração destes complexos se internaliza. Os receptores de somatostatina humanos são expressos em 5 subtipos (SST<sub>1</sub>, SST<sub>2</sub>, SST<sub>3</sub>, SST<sub>4</sub> e SST<sub>5</sub>), parcialmente caracterizados<sup>19</sup>. A recente clonagem de vários genes receptores de somatostatina tem ampliado o conhecimento da estrutura e a função destes receptores<sup>17</sup>.

Os receptores de somatostatina (SST) são expressos na maioria dos tumores neuroendócrinos e em neuroblastomas, carcinoma medular de tireóide, próstata, feocromocitomas e pequenas células de pulmão, peptídeos intestinais entre vários outros, como adenocarcinomas, linfomas, astrocitomas, glioblastos e meningiomas <sup>20</sup>. Tumores de mama expressam receptores de calcitonina <sup>21</sup>.

O <sup>111</sup>In-DTPA-Octreotideo conhecido comercialmente como OctreoScan®, e lanreotideo são octapeptídeos cíclicos análogos da somatostatina. No octreotideo a substituição da fenilalanina na posição 3 (Phe<sup>3</sup>) pela posição tirosina (Tyr) permitem aumento na hidrofiliabilidade, conhecido na forma abreviada de TOC [(Tyr) octreotideo D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys-Thr(ol)] <sup>22</sup>.

O OctreoScan® foi o primeiro peptídeo usado para imagens de pacientes com tumores que apresentam receptores de somatostatina (SSTR) , após serem radiomarcados com o <sup>111</sup>In <sup>23</sup>.

Pequenas modificações estruturais dos análogos da somatostatina, incluindo a introdução de um metal na estrutura quelante, podem afetar as propriedades de ligação dos análogos aos vários subtipos SST de receptores.

### 1.1. Agentes quelantes bifuncionais para o <sup>67</sup>Ga

Muitas biomoléculas não podem se ligar diretamente aos radioisótopos, sendo necessária a utilização de agentes quelantes que sirvam de ligação entre a molécula e o radioisótopo. Primeiramente, eles são conjugados com a molécula, e ambos devem estar protegidos para que a conjugação ocorra no local adequado da molécula e que, outros sítios estejam disponíveis para a ligação com o radioisótopo.

Os três sítios principais são os grupos amino da lisina, tiol da cisteína e a carboxila da cadeia lateral. Após a conjugação é necessário passar por uma etapa de purificação para remover o quelante livre antes da adição do radioisótopo <sup>28, 29, 30</sup>.

Alguns radioisótopos como  $^{111}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{67}\text{Ga}$  só conseguem complexar com as proteínas por meio de agentes bifuncionais<sup>24, 25, 26</sup>.

Vários quelantes para o  $^{67}\text{Ga}$  têm sido desenvolvidos. Suas propriedades biológicas dependem da estrutura, carga e lipofilicidade dos complexos formados. Quelantes bifuncionais do gálio têm tido uso limitado na marcação de anticorpos<sup>27</sup>.

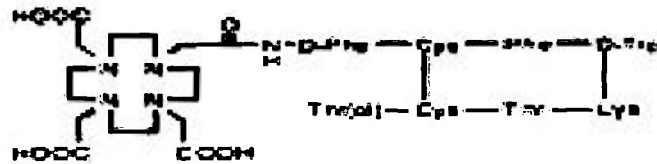
O primeiro agente bifuncional foi o ácido poliaminocarboxílico introduzido por Sundberg e Meares<sup>28</sup>. Os ácidos poliaminocarboxílicos são ácido dietilenotriamino pentacético (DTPA) e o ácido etilenodiamino tetracético (EDTA). Estes compostos de ácidos policarboxílicos tem sido muito usados em radiofarmácia e formam quelantes estáveis com  $^{111}\text{In}$  e outros metais trivalentes como  $^{67}\text{Ga}$  e  $^{90}\text{Y}$ .

Porém, em alguns estudos realizados por Hnatowich<sup>29</sup>, com  $^{90}\text{Y}$  e anticorpos monoclonais conjugados com DTPA pelo método da anidrina, a quelação resultou em toxicidade hematopoiética *in vivo* e o  $^{90}\text{Y}$  se desligou do complexo e foi absorvido pelo esqueleto.

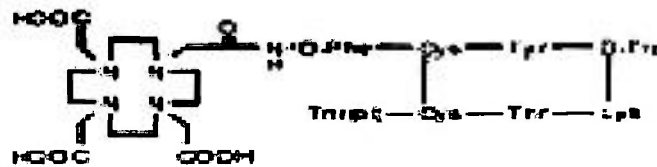
Outros agentes quelantes surgiram no final da década de 90 que são os compostos macrocíclicos conhecidos como NOTA, DOTA e TETA<sup>30, 31</sup>.

O composto macrocíclico DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetracético) é um agente quelante bifuncional, utilizado como intermediário na ligação de moléculas, como radioisótopos emissores de fótons, exemplo,  $^{111}\text{In}$  e  $^{67}\text{Ga}$ , radioisótopos emissores de pósitrons, exemplos:  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$  e  $^{64}\text{Cu}$  ou o  $^{90}\text{Y}$  emissor de partícula beta<sup>32</sup>.

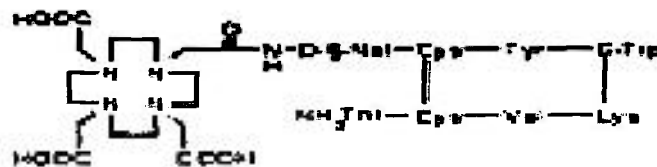
O DOTA tem sido conjugado com vários peptídeos<sup>33</sup>: Phe<sup>1</sup>-octreotideo (DOTAOC), Phe<sup>1</sup>-Tyr<sup>3</sup>-octreotideo (DOTATOC), (D) $\beta$ NaI<sup>1</sup>-lanreotideo (DOTALAN), (D) Phe<sup>1</sup>-vaporeotideo (DOTAVAP), como apresentado na FIG 1.



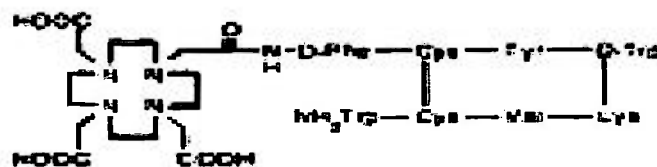
**DOTA<sup>0</sup>-[(D)Phe<sup>1</sup>-octreotide (DOTAOC)**



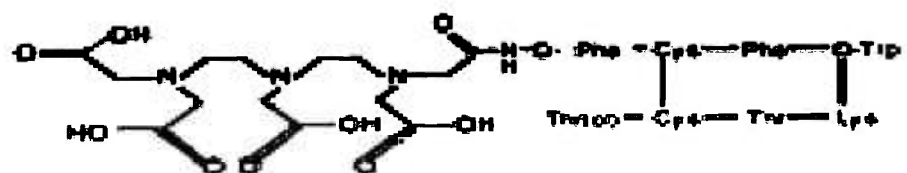
**DOTA<sup>0</sup>-[(D)Phe<sup>1</sup>-Tyr<sup>2</sup>-octreotide (DOTATOC)**



**DOTA<sup>0</sup>-[(D)BNAI<sup>1</sup>-octreotide (DOTALan)**



**DOTA<sup>0</sup>-[(D)Phe<sup>1</sup>-vaptreotide (DOTAVap)**



**DTPA-[(D)Phe<sup>1</sup>-octreotide (OctreoScan)**

**FIGURA 1-** estrutura dos análogos da somatotina conjugados com o agente quelante bifuncional DOTA

O lanreotideo é um octapeptídeo cíclico análogo da somatostatina, que se liga aos receptores somatostáticos com alta afinidade. O DOTA conjugado ao lanreotideo (DOTA-LANREOTIDEO) não interfere com a ligação ao receptor, assim a afinidade de ligação aos receptores de somatostatina permanece <sup>34</sup>. O DOTALAN reconhece os receptores somatostáticos e se liga a uma variedade de tumores humanos *in vitro* <sup>35, 40</sup>.

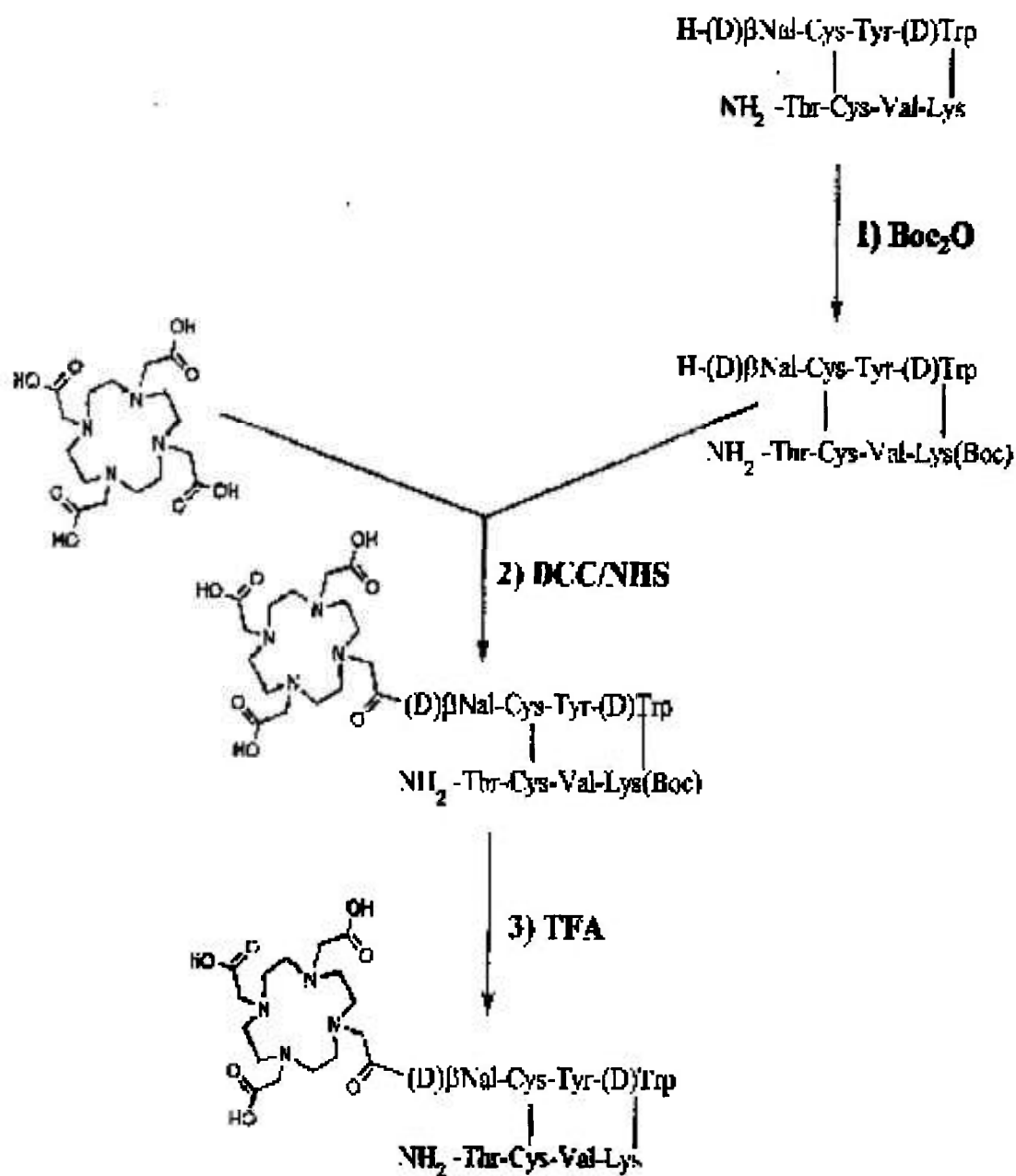
O DOTALAN liga-se a todos os receptores de somatostatina (hsst): alta afinidade aos receptores do subtipo 2, 3, 4 e 5 (hsst<sub>2-5</sub>) e baixa afinidade ao subtipo1 (hsst<sub>1</sub>) ligando-se a um amplo range de células tumorais.

O bioconjugado apresenta longo tempo de residência biológica, permitindo sua internalização nas células que expressam receptores de somatostatina. O peptídeo apresenta um clareamento sanguíneo rápido, baixa retenção renal e aumento no fígado quando comparado a outros ligantes octapeptídeos, como o <sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe<sup>1</sup>-OCT, refletindo a natureza mais lipofílica do DOTALAN.

O DOTALAN conhecido como MAURITIUS (Multicenter Analysis of Universal Receptor and Imaging and Treatment Initiative: a European Study) <sup>35, 36</sup> é um ligante receptor de somatostatina. Sua fórmula molecular é descrita como C<sub>70</sub>H<sub>95</sub>N<sub>15</sub>O<sub>17</sub>S<sub>2</sub> e seu peso é de 1482,73g.

O DOTALAN foi sintetizado em três etapas, segundo Smith-Jones e col, 1999 <sup>35</sup> :

1. Proteção do grupo amino-ε do Lanreotideo com o uso do reagente (Boc<sub>2</sub>O) para produzir o ε-Boc Lanreotide;
2. Conjugação do DOTA e ε-Boc Lanreotideo, usando carvão ativado com dextran/ soro humano (DCC/ NHS);
3. Desproteção do Boc com o ácido trifluoracético (TFA) para formar o peptídeo conjugado DOTALAN.



**FIGURA 2-** Síntese do DOTALANREOTIDEO

Moléculas baseadas em leves modificações do octreotideo, tais como a substituição de Thr (ol) por apenas Thr deram origem ao octreotate, que tem sido estudado conjugado tanto ao agente bifuncional DTPA como ao DOTA para marcação com  $^{90}\text{Y}$  e  $^{67}\text{Ga}$ , mostrando-se mais efetivo na visualização de tumores do que o OctreoScan<sup>37</sup>.

O DOTA–Tyr-Octreotideo- $^{67}\text{Ga}$  tem sido sugerido recentemente como uma alternativa ao Octreoscan<sup>38</sup>. O DOTATOC modificado com o agente quelante foi complexado com os radiometais  $^{67}\text{Ga}^{3+}$ ,  $^{111}\text{In}^{3+}$  e  $^{90}\text{Y}^{3+}$  com alta atividade específica. Estes três radiopeptídeos apresentaram alta estabilidade no soro humano, e alta afinidade aos receptores de somatostatina<sup>26,27</sup>.

O DOTATOC radiomarcado como  $^{67}\text{Ga}$  apresentou maior captação no tumor e baixa captação nos rins em modelos animais, quando comparados com outros bioconjugados radiomarcados, assim como  $^{111}\text{In}$ -DTPA-Octreotide,  $^{111}\text{In}$ -DOTATOC e  $^{90}\text{Y}$ -DOTATOC<sup>26, 27,39</sup>.

A escolha do DOTALAN para marcação com  $^{67}\text{Ga}$  aparentou ser uma proposição interessante para suprir as deficiências citadas em razão das propriedades físicas, químicas e biológicas. Além das radiações gama ( $\gamma$ ), de grande valia no diagnóstico de focos de inflamação e infecção, possui emissão de elétrons Auger (0,1-8 keV) e elétrons de conversão (80-90 keV), tornando-o um isótopo atrativo para radioterapia interna, se os vetores usados para conduzir o radionuclídeo até a célula tumoral são internalizados<sup>41</sup>.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia de marcação do peptídeo DOTALAN com  $^{67}\text{Ga}$ , otimizando os parâmetros de marcação e determinando a metodologia do controle de qualidade.



## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. GÁLIO

#### 2.1.1. PROPRIEDADES NUCLEARES E QUÍMICAS

O gálio é um metal do grupo IIIA da tabela periódica e apresenta três elétrons na última camada. O gálio elementar é um sólido com ponto de fusão baixo ( $30^{\circ}\text{C}$ )<sup>40</sup>. Em meio aquoso, pode existir nos diferentes estados de oxidação como +1, +2 e +3, sendo este último o mais estável. Em pH neutro, seus sais mais comuns são insolúveis e se estiverem na forma iônica ( $\text{Ga}^{+3}$ ) quando adicionados à água, hidrolisam-se facilmente. Para que sejam estabilizados, são complexados a ligantes como citrato.

A meia vida física do  $^{67}\text{Ga}$  é 3,26 dias e radiação gama seguida de reações de captura eletrônica tornando-se favorável como traçador. O estado de oxidação é Ga (III), a química de coordenação semelhante ao Fe (III), alta carga e pequeno raio iônico (0,62Å), classificando-o como ácido forte de Lewis<sup>41, 42, 43, 44</sup>, portanto, com predominâncias pelas bases fortes, tais como, oxigênio e nitrogênio para coordenação. Em solução aquosa, o íon Ga (III) hidratado é estável somente em condições ácidas. O  $^{67}\text{Ga}$  livre de carregador pode existir em solução em pH fisiológico sem precipitação de  $\text{Ga}(\text{OH})_3$ .

Existem três radionuclídeos de gálio<sup>42, 45</sup> com características de decaimento adequados para obtenção de imagens cintilográficas: emissores gama e de pósitrons, apropriados para radiodiagnóstico e para terapia mediada por receptores.

O  $^{68}\text{Ga}$  é um emissor de pósitrons com meia vida de 67,6 minutos (decaimento 89%  $\beta^+$ ) que pode ser obtido do gerador de germânio-68 ( $^{68}\text{Ge}$ ) ou diretamente por ciclotron <sup>42,45</sup>.

O  $^{66}\text{Ga}$  é também um emissor de pósitrons de meia vida de 9,5 horas, já foi utilizado na rotina médica, em função da sua meia vida intermediária. É processado no ciclotron e emite pósitron com uma abundância de 56% e energia de 1,7 MeV <sup>42,45</sup>.

O  $^{67}\text{Ga}$  é o produto da reação  $^{68}\text{Zn} (p, 2n)$ , desenvolvido em ciclotron, e está disponível comercialmente na forma de cloreto ou de citrato. Tem uma meia vida de 78,3 horas e decai por captura eletrônica emitindo três raios gama principais de 93keV (38%), 185keV (24%) e 300keV (16%) e tendo como produto final de decaimento o  $^{67}\text{Zn}$ . É usado em cintilografia planar e tomografia por emissão de fóton único (SPECT) <sup>42,45</sup>.

Na forma de citrato de  $^{67}\text{Ga}$ , é um importante radiofármaco em medicina nuclear para a detecção e localização de tumores e processos inflamatórios <sup>47</sup>. Quando administrado intravenosamente liga-se a transferrina do sangue e subseqüentemente é transportado para o tecido tumoral ou focos inflamatórios, em razão do aumento da permeabilidade vascular <sup>45, 46</sup>.

Acredita-se que o isótopo do Ga apresenta um transporte mediado por transferrina, lactoferrina (LF), ferritina e proteínas sideróforas e o mecanismo envolvido seja, provavelmente o de deslocar a transferrina. Esta proteína está presente nos grânulos secundários dos leucócitos polimorfonucleados e é expulsa quando ocorre um ataque bacteriano. A lactoferrina presente no foco pode se ligar a receptores LF nos monócitos ou macrófagos e seguir até a ferritina intracelular, a qual tem grande afinidade pelo Ga. Os microrganismos patogênicos presentes num abscesso purulento são provavelmente o fator mais importante para o acúmulo do Ga, devido a sua afeição pelo metal. Acredita-se que as proteínas

sideróforas estejam envolvidas nesta captura, uma vez que são sintetizadas e secretadas por bactérias que seqüestram o ferro ( $\text{Fe}^{+3}$ ). As proteínas sideróforas são moléculas pequenas (500-1000 Da) que apresentam extrema afinidade pelo íon  $\text{Fe}^{+3}$ , conseqüentemente pelo  $^{67}\text{Ga}$ . Em função da similaridade, o gálio é capturado para o interior dos microrganismos por meio de um mecanismo de saturação e energia dependente<sup>47</sup>.

Sabe-se que a química do gálio é semelhante a do Fe (III), sendo que a maior diferença entre o Ga e o Fe (III) é a inabilidade da redução do gálio "in vivo", enquanto o Fe (III) pode facilmente ser reduzido e interagir. O gálio fica ligado às proteínas, que transportam o ferro (Fe III). Esta diferença explica em grande parte porque a despeito de outras semelhanças físicas o comportamento biológico do gálio e do Fe (III) diferem<sup>47</sup>.

No esquema da distribuição biológica, o citrato de  $^{67}\text{Ga}$ , em condição fisiológica, mostra afinidade pelo sistema hepato-intestinal e estrutura óssea e sendo excretado parcialmente, pelas vias renais e trato-gastrointestinal nas primeiras 24 horas após a injeção da dose. Esse mecanismo cinético do traçador compromete a sua especificidade, apesar da sua concentração em focos infecciosos, inflamatórios e em tumores benignos ou malignos<sup>48</sup>.

Esse padrão que limita o emprego do citrato de  $^{67}\text{Ga}$  têm incentivado vários pesquisadores a projetar novos radiofármacos, cuja especificidade permita classificá-los dependendo do quadro de patogenicidade.

### 2.1.2. HISTÓRICO

Dudley e Maddox<sup>46</sup> após a obtenção de lactato de  $^{72}\text{Ga}$  de baixa atividade específica injetaram em seres humanos com tumores ósseos avançados e concluíram que o poder de concentração nas lesões era 20 vezes maior quando comparados com tecidos normais.

Bruner e colaboradores (1953)<sup>49</sup>, demonstraram que o uso do isótopo de  $^{67}\text{Ga}$  poderia ser melhor que o isótopo de  $^{72}\text{Ga}$ , em função curta da meia vida de 14 horas e a disponibilidade com baixa atividade específica. Os autores utilizaram  $^{67}\text{Ga}$ , que apresentava  $t_{1/2}$  de 78,3 horas, livre de carregadores. Contudo, equipamentos dessa época não possuíam suportes suficientemente qualificados para obter imagens de boa resolução para estudos clínicos com este radioisótopo.

Em 1955, a Comissão de Energia Nuclear dos Estados Unidos aprovou a comercialização do radionuclídeo e dos reagentes derivados da marcação pelos laboratórios especializados em âmbito mundial. Quando, seguindo a evolução, Gruverman e Kruger<sup>50</sup> desenvolveram métodos para processamento de vários radioisótopos em ciclotron, dentre eles o  $^{67}\text{Ga}$ .

Hartman e Hayes<sup>51</sup> defenderam a teoria de que o citrato de gálio-67 era um agente de imagem óssea. Para comprovar este fato os pesquisadores estudaram a influência do carregador de gálio, e concluíram que o depósito do radionuclídeo na estrutura estava diretamente relacionado à saturação no plasma.

A comprovação foi elaborada com o citrato de  $^{67}\text{Ga}$  livre de carregador. Durante as investigações, os autores descobriram acidentalmente a afinidade do radionuclídeo pelos tumores de tecidos moles. Esta descoberta acidental em 1969, possibilitou criar uma nova era na história do  $^{67}\text{Ga}$ , tornando-a uma das principais ferramentas de investigação na Medicina Nuclear, ganhando reputação como agente de localização da desordem em tecidos moles.

O desenvolvimento de um gerador  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ , no final da década de 60, reacendeu o interesse no Ga para a localização de tumor ósseo. Porém, logo foi descartado, em função da toxicidade na quantidade de carregador de gálio que na época era adicionado para a separação do  $^{68}\text{Ge}$ <sup>40</sup>.

No início dos anos 70, ressurgiu o  $^{67}\text{Ga}$  com suas características ajustadas para obtenção de imagens de tumores ósseos<sup>40</sup>. Finalmente, poucos anos depois, em processos inflamatórios<sup>52</sup>.

Em 1971, Brown<sup>53</sup> desenvolveu e testou um método de separação química por técnica de extração por solventes para a obtenção de  $^{67}\text{Ga}$  de alta pureza química, e reduzindo o tempo de processamento.

Outras formas de complexos marcados com  $^{67}\text{Ga}$  foram utilizadas como o cloreto de  $^{67}\text{Ga}$ , etilenodiaminotetracetato de gálio (EDTA-Ga), etilenodiaminotetrametileno fosfato de gálio (EDTMP-Ga), embora não tão comum como o citrato de  $^{67}\text{Ga}$ .

Anteriormente ao período de 2002 o  $^{67}\text{Ga}$  era disponibilizado por importação (Nordion-Canada) e a sua distribuição feita pelo Centro de Radiofarmácia do IPEN/CNEN-SP a fim de atender a demanda semanal de 800 mCi e com crescimento médio de 6% ao ano.

Atualmente, devido ao programa de nacionalização da produção de radiofármacos implantado no Instituto com a finalidade de afirmar a capacidade tecnológica do Brasil na área nuclear e atender a demanda do mercado nacional em radiofármacos, foi adquirido um novo ciclotron de 30 MeV de prótons destinado à produção de  $^{18}\text{F}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{123}\text{I}$  e  $^{201}\text{Tl}$ .

### 3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia de marcação do peptídeo DOTA-LANREOTIDEO com  $^{67}\text{Ga}$ , otimizando os parâmetros de marcação e determinando a metodologia do controle de qualidade.

O aspecto inédito foi a marcação com o  $^{67}\text{Ga}$  na sua forma original e purificada averiguando o efeito deletério que pode ser causado pelos contaminantes metálicos presentes na solução de gálio no desenvolvimento de marcação do DOTALAN.

Foi ainda importante estudar a biodistribuição e a interação do radiofármaco DOTALAN- $^{67}\text{Ga}$  com receptores tumorais.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAIS

#### 4.1.1. REAGENTES

- Acetato de amônio, p.a., Merck, EUA;
- Acetato de sódio, p.a., Sigma, EUA;
- Acetonitrila, grau de pureza de 99,9 %, Carlo Erba e Mallinckrodt;
- Ácido acético glacial, grau de pureza p.a., Merck, EUA;
- Ácido clorídrico fumegante 37% (HCl), grau de pureza p.a., Merck, EUA;
- Ácido etilenodiamino tetra acético (EDTA) sal dissódico, grau de pureza p.a., Micro-Bioquímica;
- Ácido gentísico, Sigma, EUA;
- Ácido trifluoracético, grau de pureza p.a., Merck, EUA;
- Cloreto de sódio, Merck, EUA;
- Éter diisopropílico, grau de pureza p.a., Merck; EUA;
- Fosfato di-sódico anidro, grau de pureza p.a., Carlo Erba, EUA;
- Fosfato monohidratado, grau de pureza p.a., Nuclear, Brasil;
- Glicina, Sigma, EUA;
- Heparina sódica (Liquemine) 50000UI/5mL, Roche, Brasil;
- Hidróxido de sódio, grau de pureza p.a., Merck, EUA;
- Meio F12K, Gibco, EUA;
- Meio RPMI 1640, Cultilab, Campinas/SP;
- Metanol (MeOH), grau de pureza p.a., Merck, EUA;
- Nitrogênio gasoso, White Martins, Brasil;
- Padrões de Zinco (Zn), Ferro (Fe), Cobre (Cu) e Níquel (Ni)-ASSURANCE - calibrados a partir de 1000mg/L ou 1000ppm.
- Peptídeo DOTA-LANREOTIDE (DOTALAN)- DOTA (D) $\beta$ Nal-Cys-Tyr-(D)Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH<sub>2</sub> [PICHEM- Austria ];

- Resina Chellex-100 (100-200mesh), Bio-Rad;
- Solução de cloreto de gálio-67 ( $^{67}\text{GaCl}_3$ ) – produzida no Centro de Aceleradores (CAC) do IPEN-CNEN, Brasil;
- Solução de cloreto de gálio-67 ( $^{67}\text{GaCl}_3$ ) – MDS Nordion, Canadá, processada no Centro de Radiofarmácia;
- Soro albumina bovina (SAB), Sigma, EUA;
- Soro fetal bovino, Cultilab, Brasil;
- Uretana, grau de pureza p.a., Merck, Brasil.

#### 4.1.2. EQUIPAMENTOS

- Agitador de tubos Vortex, VWR- Scientific, Brasil;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), composto pelos seguintes módulos:
  - ◊ Detector UV/visível (lâmpada  $\text{D}_2$ ), modelo CG-435-B Instrumentos Científicos CG Ltda - Brasil
  - ◊ Injetor manual e bomba de solventes, modelo CG-480-C, Instrumentos Científicos CG Ltda – Brasil
  - ◊ Integrador modelo C-R4A Chromatopac, Shimadzu, EUA e o detector de radiação tipo poço, modelo Nuclear Spectrometer LB 2040, Berthold – Alemanha
  - ◊ Estabilizador de voltagem, Instrumentos Científicos CG Ltda - Brasil; Aparelho espectrofotômetro na região do ultravioleta (UV) visível, modelo DMS-80, Perkin Elmer, Alemanha;
- Balança analítica, modelo M-220, Denver Instruments, EUA;
- Calibrador de doses modelo CRM<sup>TM</sup>-35R, com câmara de ionização modelo CRC<sup>®</sup>, Carpintec, EUA;
- Centrífuga, Hitachi, modelo Himac CF7D2, Japão;
- Contador automático tipo poço, com cristal NaI (TI), modelo E5002, cobra II, auto-gamma, A. Packard, Camberra, EUA;
- Capela com sistema de exaustão, Equipamentos para Laboratório Ltda, BRASLAB, Brasil;
- Espectrofotômetro de absorção atômica, modelo Z-5300-HITACHI-Japão;



- Micropipetas: 5,0 - 10,0  $\mu$ L; 10,0 - 100,0  $\mu$ L; Gilson, EUA e 100,0 - 1000,0  $\mu$ L, Brand, Brasil;
- Sistema purificador de água Ellix, acoplado a um sistema de purificação Milli-Q, Millipore, EUA;
- Ultrafreezer (temperatura de  $-70$  °C), modelo A8513USA, Revco Scientific Inc. (WWR Scientific), Asheville, N.C., EUA.
- Gama Câmaras ( $\gamma$ ): a) Gamma Nuclear Hungria, portátil com cristal de NaI(Tl), acoplado a um sistema informatizado tipo Commodora (4000/030) com programa microsegans - Centro de Radiofarmácia (CR) do IPEN-CNEN/SP; b) Siemens LEM, portátil com cristal de NaI(Tl), colimador pinhole, computador de aquisição de imagens compatível IBM/ PC Intel Pentium 133, software de aquisição de imagens PIP - Centro de Medicina Nuclear (CMN) da Faculdade de Medicina da USP

#### 4.1.3. Outros

- Células de adenocarcinoma de cólon retal humano (HT-29), Banco de Células do Rio de Janeiro (RJCB), Brasil;
- Células de adenocarcinoma pancreático (AR2-4J), ATCC, EUA;
- Coluna para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), Symmetry<sup>®</sup>C<sub>18</sub> (RP-C<sub>18</sub>) 4,6 x 250 mm, 5  $\mu$ m, Waters, EUA;
- Colunas compactadas SepPak light C<sub>18</sub>, Waters, EUA;
- Filtros descartáveis de 0,22  $\mu$ m e 0,45  $\mu$ m de poro, Millipore, EUA;
- Fitas de cromatografia de camada delgada revestidas de sílica gel (ITLC-SG/13x1,5cm); fitas de alumínio impregnadas com sílica gel (TLC-SG/ 13x1,5cm); papel Whatman n<sup>o</sup>1 e Whatman 3MM;
- Caixa de luvas, Glove box, IPEN/CNEN, Brasil
- Material plástico descartável em geral seringas, ponteiras, tubos, etc.;
- Vidraria em geral.

#### 4.1.4. Animais

- Camundongos adultos da linhagem *Nude*, Biotério do IPEN/CNEN;
- Camundongos adultos da linhagem *Swiss*, Biotério do IPEN/CNEN;

- Ratos adultos da linhagem *Wistar*, Biotério, Biotério do IPEN/CNEN.

## 4.2. MÉTODOS

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

A água utilizada em todos os procedimentos foi proveniente de um sistema Milli-Q/ Ellix. Para eliminação de metais ela foi submetida a uma purificação em resina de Chelex 100.

No início do trabalho foram utilizadas amostras de cloreto de  $^{67}\text{Ga}$  ( $^{67}\text{GaCl}_3$ ), procedente da Nordion (Canadá). A partir do segundo semestre de 2002 passou-se a usar o  $^{67}\text{Ga}$  proveniente da produção nacional do IPEN-CNEN/SP.

### 4.3.1. Amostras de $^{67}\text{Ga}$

a) O  $^{67}\text{Ga}$  produzido pela Nordion foi obtido na forma de cloreto de gálio (diluído em ácido clorídrico 0,1M), com a concentração radioativa de 335,96MBq/mL (9,08mCi/ mL). Este produto apresentava teores de metais de zinco, cobre e ferro ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+} < 1 \times 10^{-2} \mu\text{g}/ 37\text{MBq}$ ) de acordo com o certificado de análise do radionuclídeo. A quantidade de metais permitida pela farmacopéia americana<sup>58</sup> é menor que 5 $\mu\text{g}/ \text{mL}$ .

b) O  $^{67}\text{Ga}$  produzido no centro de aceleradores do IPEN/CNEN-SP, é obtido no ciclotron, modelo Ciclone 30, adquirido da empresa IBA (Ion Beam Application–Bélgica), com corrente média de 200  $\mu\text{A}$ , por um período de 8 horas, pelo bombardeamento do alvo enriquecido de  $^{68}\text{Zn}$  eletrodepositado sobre uma placa de cobre revestida com níquel (a massa do alvo eletrodepositado variou de 600 a 750 mg) com prótons de 26 MeV, pela reação  $^{68}\text{Zn} (p,2n) ^{67}\text{Ga}$ <sup>54</sup>.

Após a irradiação o  $^{67}\text{Ga}$  é transformado em cloreto de  $^{67}\text{Ga}$  pela dissolução do alvo em solução de HCl concentrado e percolado através de uma coluna de resina trocadora de íons, do tipo DOWEX 50WX8 equilibrada com uma solução de HCl 10 mol/L e, eluído com uma solução de HCl 3,5 mol/L<sup>58</sup>.

A concentração radioativa do radionuclídeo foi em média de 503,2 MBq/mL (13,6mCi/mL). As quantidades permissíveis de metais na solução de citrato gálio-67 estavam concordantes, com a recomendação da farmacopéia americana<sup>58</sup>.

Após a transformação na forma de cloreto de  $^{67}\text{Ga}$  ( $^{67}\text{GaCl}_3$ ) houve a necessidade de remover os metais utilizando-se a técnica de extração com solventes para descartar os interferentes na marcação dos peptídeos bioconjugados.

#### **4.3.2. Purificação do $^{67}\text{Ga}$ para Eliminação de Metais (Zn, Fe, Cu e Ni)**

A purificação do cloreto de  $^{67}\text{Ga}$  foi realizada por meio da extração por solventes (HCl 7 mol/L, éter diisopropílico e água)<sup>55</sup>, obedecendo a seguinte técnica:

1. Fase (eliminação dos metais) - a solução de  $^{67}\text{GaCl}_3$  obtida da produção foi evaporada e ao resíduo foram adicionados 3,5 mL de HCl 7mol/L. Após a transferência para um balão de decantação e acréscimo de 3,5 mL de éter diisopropílico, mediante agitação e repouso, procedeu-se à separação da fase aquosa (HCl) da orgânica e repetiu-se a operação por mais duas vezes. Em seqüência, determinou-se a atividade do  $^{67}\text{Ga}$  de ambas as fases em um curiômetro.
2. Fase (obtenção da atividade) - ao volume do éter obtido da primeira extração foram adicionados 10mL de água e levados ao funil de separação. A conduta subsequente foi similar ao descrito no parágrafo anterior (Fig.3).

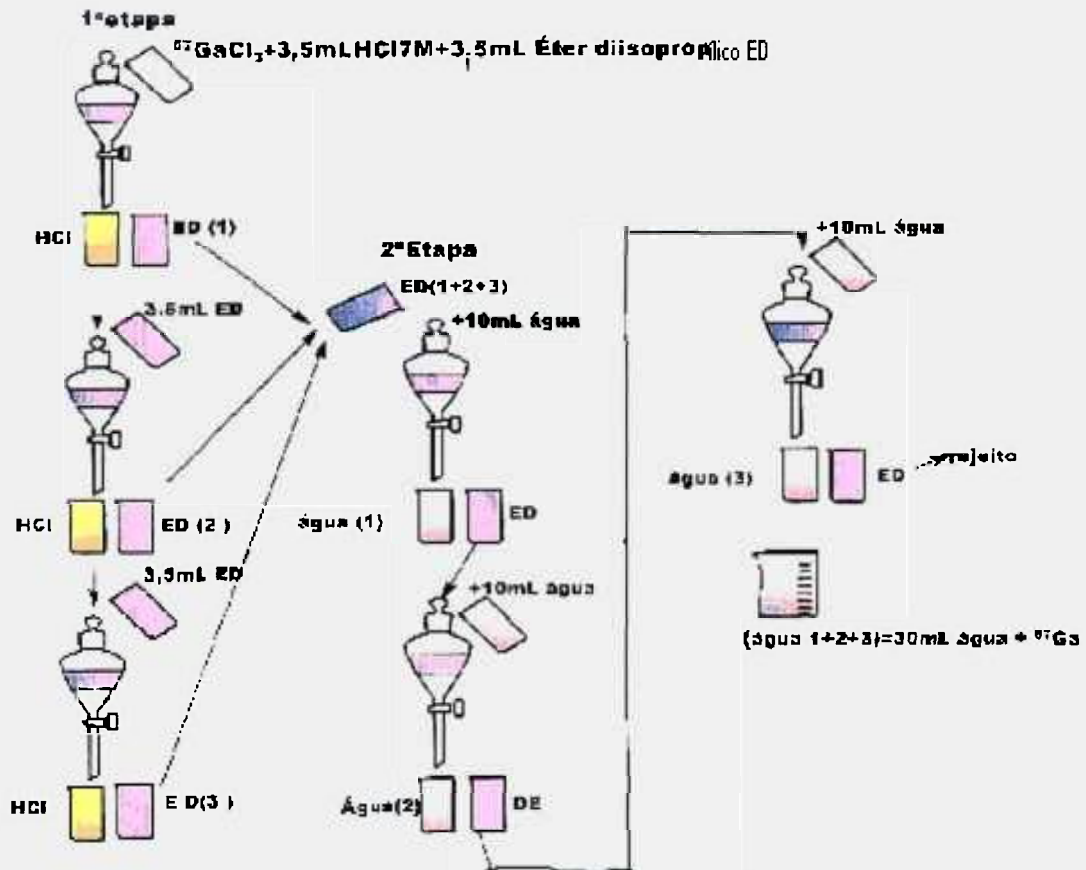


FIGURA 3- Extração por solventes para purificação do  $^{67}\text{Ga}$

#### 4.3.3. Preparação do acetato de $^{67}\text{Ga}$

Foram obtidos no processo final da separação (fase 1 e fase 2) 30 mL de solução aquosa contendo  $^{67}\text{Ga}$ . Esta solução foi evaporada por aproximadamente 4 horas, a  $90^\circ\text{C}$ , em banho-maria (BM), sob condições de nitrogênio gasoso ( $\text{N}_2$ ), e ao resíduo foram adicionados  $20\mu\text{L}$  de HCl  $0,05\text{ mol/L}$  e acetato de amônio  $0,5\text{ mol/L}$ , ajustando-se a pH5.

#### 4.4. Análise dos Metais

Determinou-se o Zn, Fe, Cu e Ni nas amostras de  $^{67}\text{GaCl}_3$  provenientes diretamente da produção do IPEN e nas amostras purificadas segundo o método descrito no item 4.3.2., por absorção atômica, em um espectrofotômetro. As

curvas de calibração desses elementos foram obtidas a partir de soluções de concentração até 10 µg/ mL.

#### **4.5. Preparação do peptídeo DOTALAN**

O DOTALAN (1mg) foi dissolvido em mistura de metanol absoluto (10µL), ácido acético (10µL) e água (430 µL) para obtenção de uma solução de 1,5 mmol/L. A solução foi distribuída em tubos cônicos (tipo “eppendorf”) contendo concentrações que variaram de 10µg a 50µg da massa do peptídeo e armazenados a -70°C, para uso posterior.

#### **4.6. Marcação do DOTALAN com <sup>67</sup>Ga**

Ao peptídeo DOTALAN foi adicionado 30µL de acetato de amônio 0,1 mol/ L e a solução de acetato de gálio (pH5), totalizando 170µL de solução. A mistura final foi aquecida em Banho-Maria a 100°C por 30 minutos e, posteriormente, foi resfriada à temperatura ambiente por 30 minutos. Antes da análise radioquímica do produto radiomarcado foram adicionados 5µL de solução de EDTA 25mmol/L. A metodologia utilizada foi realizada com modificações obtidas na literatura <sup>22, 34</sup>.

#### **4.7. Análise da Pureza Radioquímica**

O grau de pureza do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga foi avaliado utilizando-se diferentes técnicas de separação cromatográficas.

Para saber quais seriam as fases estacionárias e móveis que permitiriam a melhor definição do poder migratório das possíveis impurezas na solução do radiomarcado, diferentes sistemas foram experimentados nas determinações. Fase estacionária: ITLC-SG, TLC-SG (13,5 x 1,5cm) e Whatman n°1 e Whatman 3MM (10cm) e fase móvel: acetato de amônio (0,1 mol/L; 0,5 mol/L; 1 mol/L); EDTA (4 mmol/L, 20 mmol/L, 25 mmol/L, 250 mmol/L); citrato de sódio (0,1 mol/ L) e metanol/acetato de amônio 10% (1/1).

Após a secagem das fitas, elas foram cortadas em segmentos de 1cm, a radioatividade foi detectada em um contador gama tipo poço, para a realização do cálculo em porcentagem da pureza radioquímica.

Outras técnicas foram anexadas aos experimentos, a fim de confirmar o rendimento radioquímico, dentre elas: (a) colunas de fase reversa Sep Pak C<sub>18</sub> (Waters) e (b) coluna Symmetry<sup>®</sup>C<sub>18</sub> (RP-C<sub>18</sub>), 4,6 x 250 mm, 5 μm, Waters para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

– Na coluna de fase reversa Sep Pak C<sub>18</sub> (Waters), ativada com 5mL de metanol p.a. (MeOH), seguido de 5mL de acetato de amônio 0,1 mol/ L, foi aplicada uma alíquota do peptídeo marcado. Após a percolagem de 1,5 mL de acetato de amônio 0,1 mol/L foi separado concomitantemente as impurezas do gálio livre e, subseqüentemente, com acréscimo de 1,5mL de MeOH para a obtenção do produto marcado (DOTALAN-<sup>67</sup>Ga).

– A coluna Symmetry<sup>®</sup> C<sub>18</sub> foi utilizada para a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em sistema isocrático, acoplado a um detector de radiação. Comprimento de onda de 250 nm (UV), com um fluxo de 1,0mL/min. Como fase móvel acetato de amônio 25mmol/L / acetonitrila (65/ 35).

#### **4.8. Otimização dos parâmetros de marcação do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga**

Foram estudados os seguintes parâmetros:

##### **a. Variação da massa e da atividade do produto marcado**

Foram realizadas marcações do DOTALAN com atividades de: 370 MBq/ 10μg do peptídeo, 740 MBq/ 20μg do peptídeo, 1110 MBq/ 30μg do peptídeo, 1480 MBq/ 40μg do peptídeo e 1850 MBq/ 50μg do peptídeo. A marcação foi realizada de acordo com o descrito no item 4.6.

**b. Variação do pH do acetato de  $^{67}\text{Ga}$** 

As marcações foram realizadas com concentrações do DOTALAN de 20 $\mu\text{g}$  e 50 $\mu\text{g}$  em meio de acetato de gálio-67 (atividades de 444 MBq e 1110 MBq, respectivamente), ajustando-se o pH para 3 e posteriormente para pH5.

**c. Variação do volume do DOTALAN- $^{67}\text{Ga}$** 

As marcações foram realizadas com concentrações do bioconjugado de 10 $\mu\text{g}$ , atividade de 370MBq, variando-se o volume final da solução de 100 $\mu\text{L}$ , 150 $\mu\text{L}$ , 170 $\mu\text{L}$  e 290 $\mu\text{L}$ .

**d. Variação da atividade do  $^{67}\text{Ga}$** 

O DOTALAN (concentração do peptídeo de 10 $\mu\text{g}$ ) foi marcado com acetato de  $^{67}\text{Ga}$ , com atividades de 185 MBq (5mCi), 259 MBq (7mCi) e 592 MBq (16mCi).

**4.9. a . Estabilidade do DOTALAN- $^{67}\text{Ga}$  *in vitro***

Foram realizadas análises da pureza radioquímica do produto marcado (atividade de 259 MBq/ 10 $\mu\text{g}$ ), no período de 6 dias, em cromatografia de camada delgada (ITLC-SG/ EDTA 4mmol/L).

**4.9.b. Estabilidade do marcado no plasma sanguíneo**

O DOTALAN- $^{67}\text{Ga}$  foi avaliado no plasma humano. Em 2mL de plasma sanguíneo humano, agregaram-se 7,4 MBq (0,2 mCi)/ 100 $\mu\text{L}$  do DOTALAN- $^{67}\text{Ga}$ , mantendo-se a 37°C, em banho-maria, durante 24 horas. Nos intervalos de tempo de 1, 4 e 24 horas a estabilidade do radiofármaco foi investigada, retirando-se alíquotas para a análise da pureza radioquímica em cromatografia de camada delgada (ITLC-SG/ EDTA 4mmol/L).

#### **4.10. Estudos biológicos**

##### **4.10.1. Cultivos de 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 (RJBC). As células foram cultivadas no Laboratório de Cultura Celular do Centro de Biologia Molecular (CBM) do IPEN/CNEN em meio de RPMI 1640 (Cultilab), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibiótico (penicilina e estreptomicina, Cultilab).

Para a inoculação em camundongos, as células de HT-29 foram injetadas intradermicamente no dorso do animal *Nude* na concentração de  $5 \times 10^5$  células em 100 $\mu$ L de tampão fosfato (PBS).

Os animais foram mantidos sob condições de água e ração (*ad libitum*) e observados durante um período de 30-40 dias. Por meio de repicagens manteve-se constante lote de animais portador de células de adenocarcinoma de cólon-retal (HT-29).

##### **4.10.2. Cultivo de células tumorais de pâncreas de rato AR42J**

As células tumorais de pâncreas de rato AR42J foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC). As células foram cultivadas no laboratório, já referido, em meio F12-K (Gibco) acrescido de 10% soro fetal bovino (Cultilab) mantidos a temperatura de 37°C e atmosfera controlada de 5% CO<sub>2</sub>. Após três dias, as células foram tripsinizadas, contadas e utilizadas ou congeladas em tubos criogênicos, em ambientes com mesmo meio acrescido de 10% soro fetal bovino e 10% de dimetil sulfato (DMSO).

A inoculação nos animais foi semelhante à citada para HT-29.



#### **4.11. Biodistribuição do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga em camundongos *Swiss* sadios e camundongos *Swiss* inoculados com células de adenocarcinoma de cólon-retal humano (HT-29)**

Para os estudos de biodistribuição do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga (10µg) em camundongos *Swiss* sadios (normais), foram injetados 1,11 MBq (0,03 mCi)/ 100 µL do produto, com pureza radioquímica adequada.

Os animais injetados com o radiofármaco na veia caudal foram sacrificados por decaptação após 1, 4 e 24 horas e os seguintes órgãos foram removidos: cérebro, pulmão, coração, baço, fígado, estômago (vazio), músculo (amostra da pata traseira), rins, intestino delgado e intestino grosso (com conteúdo) e cauda. Amostras de 100 µL de sangue foram coletadas com capilar heparinizado da veia sinus orbital antes do sacrifício do animal (para o cálculo da volemia, utilizou-se a equação 3).

Procedimentos similares foram realizados para os camundongos *Swiss* e *Nude* inoculados com células HT-29, retirando-se além dos órgãos citados a massa tumoral.

Os órgãos foram retirados e lavados, pesados, posteriormente foram colocados em tubos de ensaio para determinação da atividade em curiômetro.

Uma amostra do produto marcado foi diluída, correspondendo à atividade injetada, serviu de padrão para a avaliação da atividade concentrada em cada sistema e expressa em porcentagem da atividade administrada.

O padrão real injetado (Equação 7) por animal foi obtido mediante cálculo da média das contagens (cpm) dos tubos da dose padrão administrado, descontando o valor da contagem (cpm) da cauda.

Foram utilizadas as seguintes fórmulas para os cálculos desejados:

$$A \rightarrow \%ATIVIDADE/\acute{O}RG\tilde{A}O = \frac{\text{cpm } \acute{O}rg\tilde{a}o}{\text{cpm padr\~{a}o real}} \times 100 \quad (1)$$

$$\%ATIVIDADE /GRAMA = \frac{\text{resultado de A}}{\text{peso tecido correspondente (g)}} \quad (2)$$

$$\text{Volemia} = \text{peso corp\acute{o}reo animal (g)} \times 0,07 \text{ (mL/g)} \quad (3)$$

$$B \blacktriangleright \%ATIVIDADE /\text{mL SANGUE} = \frac{\text{cpm sangue} / 0,1 \text{ (mL)} \times 10}{\text{cpm padr\~{a}o real}} \times 100 \quad (4)$$

$$\%ATIVIDADE / \text{SANGUE TOTAL} = \text{resultado de B} \times \text{volemia do animal} \quad (5)$$

$$\%ATIVIDADE / \text{GRAMA M\acute{U}SCULO} = \frac{0,4 \text{ peso corp\acute{o}reo animal (g)} \times \text{cpm m\acute{u}sculo} \times 100}{\text{peso m\acute{u}sculo (g)} \times \text{cpm padr\~{a}o real}} \quad (6)$$

$$\text{Padr\~{a}o real: m\acute{e}dia do padr\~{a}o (cpm) - cpm da cauda} \quad (7)$$

#### 4.12. Biodistribui\c{c}\~{a}o do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga em camundongos *Nude* inoculados com c\~{e}lulas de adenocarcinoma de c\~{o}lon-retal humano (HT-29) e c\~{e}lulas tumorais pancre\~{a}ticos AR42J(ratos)

Para os estudos de biodistribui\c{c}\~{a}o do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga em camundongos *Nude* foram utilizados animais portadores de n\~{o}dulos de c\~{e}lulas de adenocarcinoma HT-29 e de adenocarcinoma pancre\~{a}tico AR42J.

Todo o procedimento para avalia\c{c}\~{a}o da distribui\c{c}\~{a}o biol\~{o}gica foi similar ao descrito no item 4.11.

#### 4.13. Ensaio de Perfusão

Para aferir a potencialidade do radiofármaco na interação com seus receptores, sem contribuição dos tecidos adjacentes foi realizada a perfusão cardíaca. Por meio de solução salina 0,9%, cateter apropriado, adaptado com uma agulha hipodérmica de pequeno calibre e fluxo de 1mL/min, foi administrada atividade de 15,95MBq, durante 60-90 minutos para completa remoção da radioatividade circulante.

#### 4.14. Estudos Cintilográficos

Imagens em ratos, foram obtidas no Centro de Radiofarmácia (CR) do IPEN. Atividades de 18,5 MBq/100  $\mu$ L de DOTALAN-<sup>67</sup>Ga foram administradas intravenosamente na veia caudal em dois ratos *Wistar* inoculados intradermicamente com células HT-29 na região dorsal e dois camundongos *Swiss* foram inoculados com células HT-29 na pata direita.

Os demais estudos cintilográficos foram realizados no Centro de Medicina Nuclear (CMN) da Faculdade de Medicina da USP. Foram administradas atividades de 37MBq/100  $\mu$ L de DOTALAN-<sup>67</sup>Ga, intravenosamente na veia caudal de camundongos *Nude* inoculados com células tumorais (células HT-29 e células AR42J).

Momentos antes da obtenção das imagens cintilográficas, no Centro de Radiofarmácia (CR) do IPEN e no Centro de Medicina Nuclear (CMN) da Faculdade de Medicina da USP, os animais foram previamente anestesiados com 0,2 mL de solução de uretana (0,67 mg/ grama de peso corpóreo do animal).

#### 4.15. Ensaio de internalização *in vitro* do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga nas células de adenocarcinoma de cólon-retal humano (HT-29)

Foram preparados:

- a. Tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1mol/L pH7,5
- b. Tampão PBS 0,1mol/L pH 7,5 com BSA (soro albumina bovina) 0,5%

c. Tampão de lavagem ácida (glicina-50mM, pH 2,8 NaCl 0,1M)

Tampão de internalização:

Meio de cultura F12K enriquecido com soro albumina bovina (BSA)

Foram adicionados ao meio de cultura F12K 5mL de BSA e completou-se o volume a 50mL. As células de HT-29 ( $1 \times 10^6$ / 100 $\mu$ L) foram homogeneizadas em 4 mL do mesmo meio, de onde 130 $\mu$ L da suspensão das células ( $32,5 \times 10^3$  células) foram distribuídas em tubos de ensaio, nas quais acrescentou-se 1,0 mL do tampão de internalização.

Dois parâmetros foram analisados:

a. Ligação Específica (1mL de tampão mais 130 $\mu$ L da suspensão das células mais 100 $\mu$ L do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga)

b. Ligação Não Específica (1mL da solução tampão mais 130 $\mu$ L da suspensão das células mais 100 $\mu$ L do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga, mais 20 $\mu$ g do DOTALAN)

Após a incubação a 37°C por 60 minutos realizou-se a centrifugação a 1600 rpm durante 10 minutos, em temperatura ambiente, para remoção do sobrenadante. Na seqüência, procedeu-se as duas lavagens com 1mL de tampão PBS/BSA 0,5% pH 7,5 sendo a centrifugação feita na mesma condição descrita acima.

O "pellet das células" (botão celular) foi incubado a 10 minutos, com 1,0 mL de tampão ácido (glicina) e homogeneizado, posteriormente submetido à centrifugação. Repetiu-se a operação com tampão gelado. Em ambas, os sobrenadantes foram reservados em um único recipiente para a determinação da radioatividade resultante.

O cálculo descrito na Fórmula 9, realizado após a contagem representou a porcentagem do radiofármaco que se ligou às células, porém não foi internalizado.

Aos frascos cônicos contendo o botão celular foi adicionado 1,0 mL de NaOH 1 mol/L, para que as membranas das células fossem rompidas. O líquido homogêneo foi transferido para um tubo de contagem e atividade foi medida no curiômetro e o frasco, novamente, lavado com a mesma solução para completa remoção celular.

Após as contagens das atividades das frações o percentual do radiofármaco internalizado foi calculado a partir da Equação 10.

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

$$\text{padrão} = \text{cpm do radiofármaco DOTALAN-}^{67}\text{Ga utilizado} \quad (8)$$

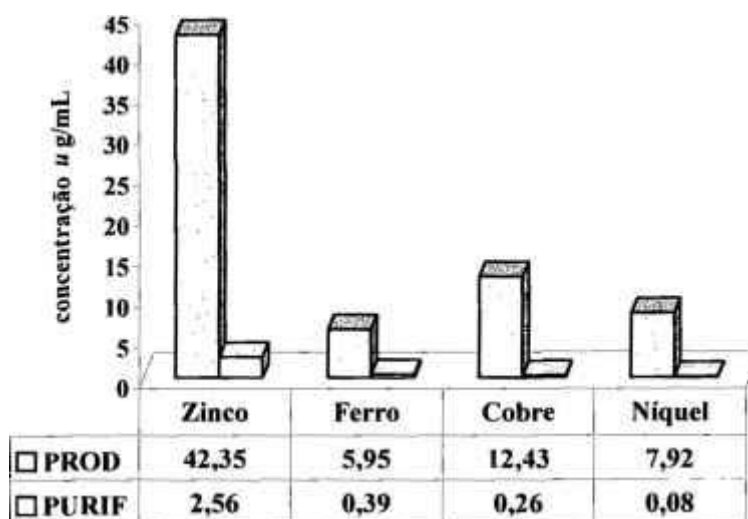
$$\% \text{ de ligação} = \frac{\sum [\text{fase ácida (cpm H)} + \text{fase básica (cpm OH)}]}{\text{padrão (cpm)}} \times 100 \quad (9)$$

$$\% \text{ de internalização} = \frac{\text{fase básica (cpm OH)}}{\sum [\text{fase ácida (cpm H)} + \text{fase básica (cpm OH)}]} \times 100 \quad (10)$$

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

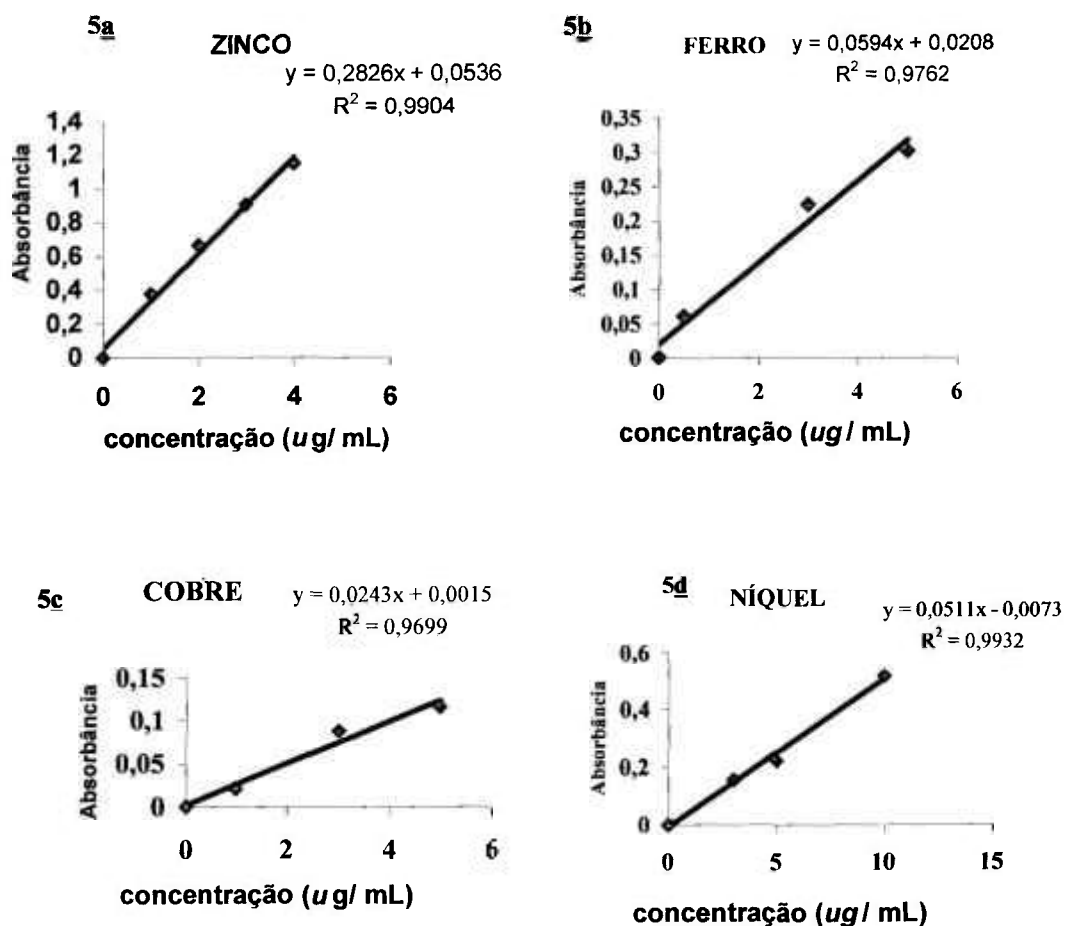
### 5.1. Análise dos Metais

Com auxílio do espectrofotômetro de absorção atômica (EAA) analisou-se a presença dos metais em amostras do gálio-67 antes e depois da purificação, exemplo FIG.4.



**FIGURA 4-** Presença de metais em amostras do  $^{67}\text{GaCl}_3$  antes e após a purificação

Dos valores das curvas de calibração de cada elemento (zinco, ferro, cobre e níquel) foram extrapolados numericamente os dados de cada contaminante existente na amostra de  $^{67}\text{Ga}$  (FIG.5a a 5d).



**FIGURA 5(a - d)** – curvas de calibração do zinco, ferro, cobre e níquel obtidas no espectrofotômetro de absorção atômica (EAA)

Apesar dos metais de Zn, Fe, Cu e Ni estarem envolvidos na produção de  $^{67}\text{GaCl}_3$  do IPEN/CNEN, os valores destes contaminantes químicos estão abaixo dos níveis permitidos na farmacopéia. Quando utilizado na forma de citrato de  $^{67}\text{Ga}$ , não compromete o seu uso clínico para diagnóstico de infecção e inflamação. Sabe-se, entretanto, que existe comprometimento de contaminantes metálicos frente a pureza radioquímica do radionuclídeo na eficácia da marcação de uma molécula.

O Zinco é o alvo e o produto de decaimento do  $^{67}\text{Ga}$ , assim como um forte competidor na incorporação do radionuclídeo na quelação do DOTA. Para diminuir esta competição dos metais e permitir uma boa marcação, realizou-se a purificação do  $^{67}\text{Ga}$ , por meio de extração por solventes, TAB.1.

**TABELA 1** – Redução de contaminantes metálicos do  $^{67}\text{GaCl}_3$  após a extração por solventes (n=10)

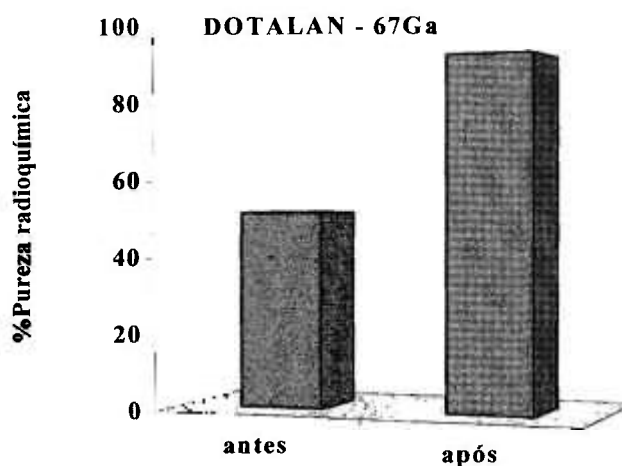
<b>METAIS</b>	<b>MÉDIA (%)</b>	<b>DESVIO (<math>\pm</math>)</b>
Zinco	90,7	5,8
Ferro	86,3	6,1
Cobre	95,9	3,1
Níquel	98,6	0,5

Embora as concentrações de metais se encontrassem em níveis de  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , testes de marcações foram feitos em concomitância para conhecer o grau de interferência dos metais e a importância do tratamento prévio do  $^{67}\text{GaCl}_3$ .

#### **5.1.1. Marcação do DOTALAN com $^{67}\text{Ga}$ antes e após a extração por solventes**

A eficiência das marcações do DOTALAN realizadas com amostras de  $^{67}\text{Ga}$ , na sua forma original foi de  $51,4 \pm 0,8\%$ . Comparativamente, para o bioconjugado marcado com o  $^{67}\text{Ga}$  purificado, a pureza radioquímica elevou-se para  $92,0 \pm 2,3\%$ , evidenciando-se a interferência dos metais na marcação, FIG. 6 (n=2).





**FIGURA 6-** Marcação do DOTALAN com  $^{67}\text{Ga}$  (antes da purificação e após a extração com solventes)

A existência de contaminantes metálicos pode advir, naturalmente no decaimento de certos radionuclídeos. Como por exemplo pode-se citar o Cádmiu ( $\text{Cd}^{2+}$ ) que é o alvo e o subproduto de decaimento do Índio-111 ( $^{111}\text{In}$ ) e, é considerado um forte competidor do radiomarcado na conjugação com o DOTA. Em contraste, o Zircônio ( $\text{Zr}^{4+}$ ) e Háfnio ( $\text{Hf}^{4+}$ ) que são produtos de decaimento do Ítrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ) e do Lutécio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ), respectivamente, não interferem na incorporação desses radionuclídeos com o DOTA<sup>56</sup>.

Neste trabalho os metais foram provenientes dos alvos de Zn eletropositado em cobre niquelado.

Stimmel e cols (1995)<sup>57</sup>, estudaram o papel do íon ferro, zinco e cálcio na eficiência da incorporação do  $^{90}\text{Y}$  na bioconjugação de moléculas. Suas análises sugerem que a quelação do  $^{90}\text{Y}$  é mais sensível na presença de traços de zinco, e em menor extensão, na presença de íons ferro e cálcio.

## 5.2. Identificação e Pureza Radioquímica

Para identificação e avaliação da pureza radioquímica do produto radiomarcado, foram realizadas análises cromatográficas, com diferentes suportes e solventes (TAB.2).

**TABELA 2** - Distância de migração relativa ( $R_f$ ) do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga, observada nas diferentes condições solventes

FASE MÓVEL	$R_f$ =DOTALAN- <sup>67</sup> Ga	$R_f$ = <sup>67</sup> Ga -EDTA
EDTA (4mM, 20mM, 25 mM, 250 mM)	0-0,2	0,9-1,0
citrato de sódio acetonitrila metanol/ acetato de amônio 10%	Não houve definição (arraste ao longo da fita)	****

As melhores resoluções foram observadas em ITLC-SG, e TLC-SG empregando como fase móvel soluções de EDTA. Para a determinação da pureza radioquímica do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga acrescida de 5 $\mu$ L de solução de EDTA 25mM, não foi evidenciado o deslocamento do produto no desenvolvimento cromatográfico ( $R_f=0$ ), em contraposição, o complexo EDTA-<sup>67</sup>Ga ( $R_f=1$ ) migrou juntamente com o solvente, como mostrado na TAB.2. Resultados similares foram descritos por Ugur O e cols (2002)<sup>34</sup>, com a marcação do DOTALAN com cloreto de Índio-111 (<sup>111</sup>InCl<sub>3</sub>).

### 5.3. Massa do Bioconjugado

A marcação do DOTALAN com  $^{67}\text{Ga}$  foi realizada variando-se as concentrações do peptídeo bioconjugado de 10 a 50 $\mu\text{g}$ , e com atividade específica de 37 MBq/ $\mu\text{g}$  do  $^{67}\text{Ga}$ . A eficiência das marcações foi superior a 90%, obtidas em fitas de ITLC-SG/EDTA 4mmol e, quando investigado em colunas de fase reversa de Sep Pak C<sub>18</sub>, as purezas radioquímicas foram maiores que 93%, TAB.3.

**TABELA 3** - Pureza radioquímica da marcação do DOTALAN- $^{67}\text{Ga}$ , realizada em colunas de fase reversa de Sep Pak C<sub>18</sub>, variando a massa do peptídeo (10 a 50 $\mu\text{g}$ )

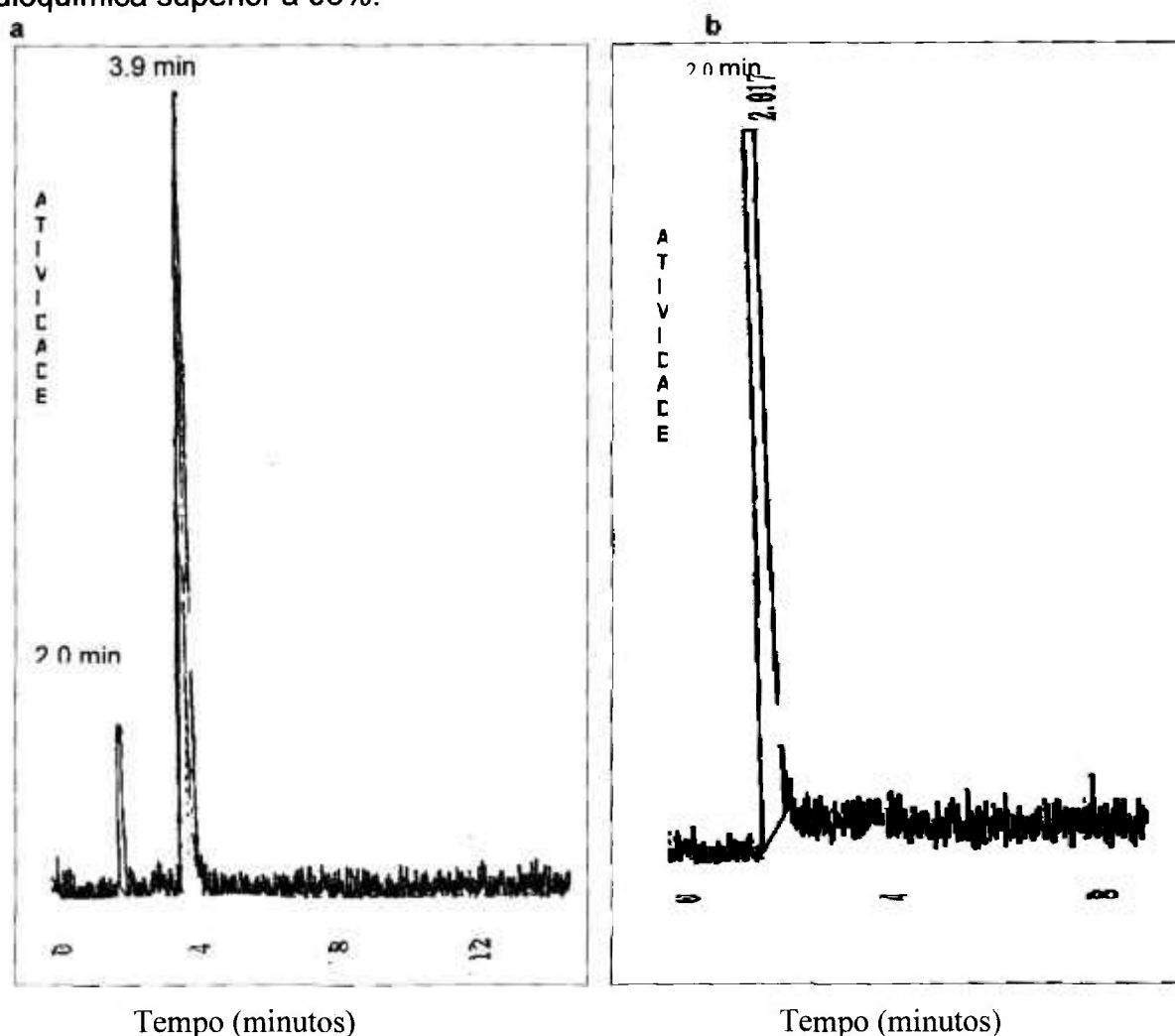
Massa do peptídeo ( $\mu\text{g}$ )	% Pureza Radioquímica
	DOTALAN- $^{67}\text{Ga}$
10	93,50 $\pm$ 0,71
20	98,25 $\pm$ 0,35
30	96,54 $\pm$ 0,33
40	97,25 $\pm$ 0,35
50	93,25 $\pm$ 0,35

Os resultados obtidos na marcação do DOTA-LANREOTIDEO com  $^{67}\text{Ga}$  foram semelhantes aos realizados pelos pesquisadores do grupo do Ugur e cols<sup>34</sup>, que marcaram DOTATOC (DOTA-Dphe<sup>1</sup>-Tyr<sup>3</sup>-octreotide) com  $^{66}\text{Ga}$ , e também foram similares a outros peptídeos marcados com  $^{111}\text{In}$  e  $^{90}\text{Y}$ <sup>22</sup>.

As purezas radioquímicas dos produtos marcados foram também analisadas em cromatografia líquida de alta eficiência, como observados nas FIG. 7a e 7b, com 20 $\mu\text{g}$  do DOTALAN- $^{67}\text{Ga}$ . A FIG.7a apresenta dois picos distintos. Sendo o primeiro com o tempo de retenção de 2,0 minutos correspondente ao EDTA- $^{67}\text{Ga}$ , e o segundo com o tempo de retenção de

3,9 minutos correspondente ao DOTALAN-<sup>67</sup>Ga, com pureza radioquímica superior a 95%. A FIG.7b representa o pico correspondente ao complexo EDTA - <sup>67</sup>Ga .

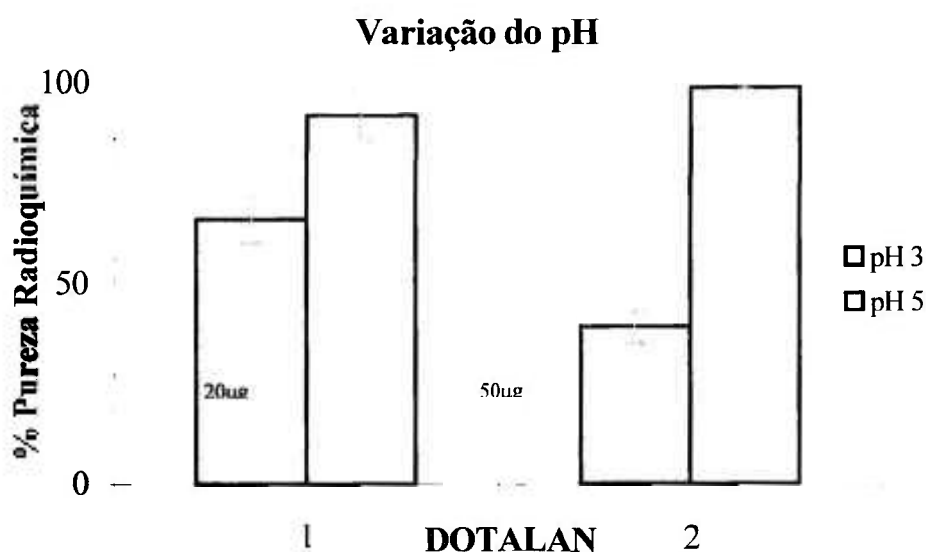
Perfis semelhantes foram observados com as concentrações de 10µg, 30µg, 40µg e 50µg de DOTALAN marcados com gálio-67, com pureza radioquímica superior a 93%.



**FIGURA 7** – Coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (RP-C<sub>18</sub>) em um sistema isocrático, com um fluxo de 1,0 mL/ min acoplado a um detector de radiação. a) CLAE do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga (tempo de retenção do EDTA-<sup>67</sup>Ga = 2,0min e do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga =3,9 min) e b) CLAE do EDTA-<sup>67</sup>Ga

#### 5.4. Variação do pH do acetato de $^{67}\text{Ga}$

As marcações com massas do DOTALAN de  $20\mu\text{g}$  e  $50\mu\text{g}$  foram realizadas em meio de acetato de gálio-67 (atividades de 444 MBq e 1110 MBq, respectivamente), ajustando-se o pH para 3. A eficiência do radiomarcado foi menor que 70%. Porém, ao elevar para pH 5, a pureza radioquímica foi superior a 90%, como pode ser observado na figura 8, corroborando com outras pesquisas<sup>58</sup>.

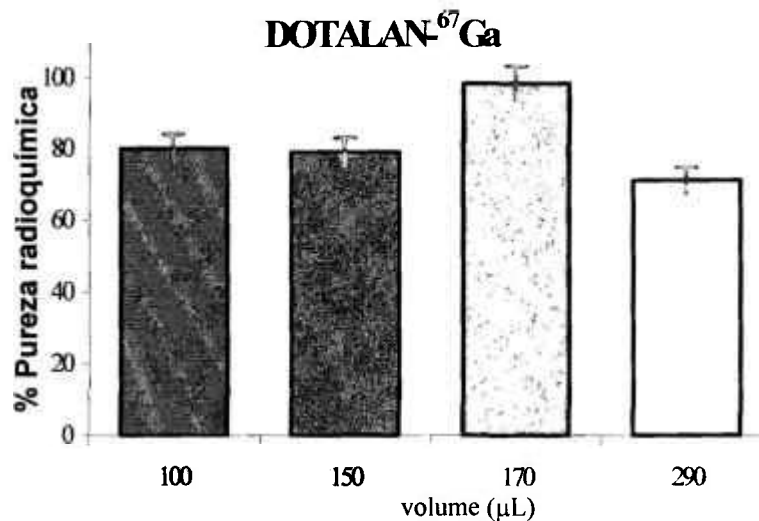


**FIGURA 8** – marcação do DOTALAN (massa de  $20\mu\text{g}$  e  $50\mu\text{g}$ ) em acetato de gálio-67, com variação do pH (3 e 5)

É descrito na literatura<sup>56</sup> que a variação do pH é um parâmetro importante na obtenção de biomoléculas marcadas com metais  $^{67}\text{Ga}^{3+}$ ,  $^{111}\text{In}^{3+}$  e  $^{90}\text{Y}^{3+}$ . O pH ideal na marcação de peptídeos bioconjugados com radiometais encontra-se na faixa de 4,5-5. Breeman e cols (2003)<sup>56</sup> descreveram este pH, na reação cinética como sendo ótima, enquanto, para o  $\text{pH} \leq 3$ , a cinética da reação diminui drasticamente. Para pH acima de 5, a solubilidade do radionuclídeo varia tornando-se incerto o resultado, devido à formação rápida de hidróxidos.

### 5.5. Variação do volume do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga

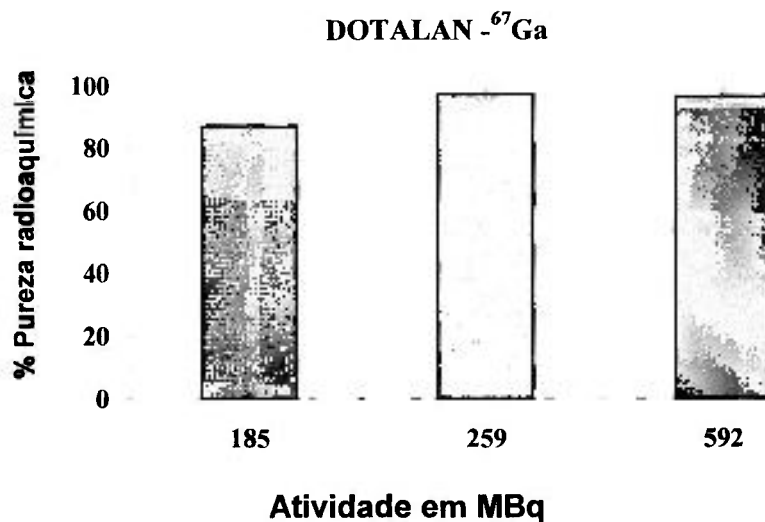
A variação do volume final da solução (100, 150, 170 e 290  $\mu$ L) do radiofármaco, preservando-se a massa de 10  $\mu$ g, pH 5 e a atividade 370 MBq (10 mCi). De acordo com os resultados obtidos, o volume final de 170  $\mu$ L apresentou uma pureza radioquímica superior a 95% (FIG 9). Entretanto, para volumes menores ou maiores de 170  $\mu$ L a pureza radioquímica da marcação mostrou-se reduzida, inferior a 90%. Contudo, Heppeler e cols (1999)<sup>22</sup> utilizando volume de 190  $\mu$ L, com DOTATOC marcado com <sup>67</sup>Ga, <sup>111</sup>In e <sup>90</sup>Y, obtiveram pureza radioquímica do marcado superior a 95%.



**Figura 9** – Marcação de 10  $\mu$ g de DOTALAN com <sup>67</sup>Ga, variando-se o volume final da solução (100, 150, 170 e 290  $\mu$ L), pH 5 e atividade de 370 MBq

### 5.6. Variação da atividade do <sup>67</sup>Ga

As purezas radioquímicas foram superiores a 85%, quando 10  $\mu$ g DOTALAN foi marcado com atividades de 185 MBq (5 mCi), 259 MBq (7 mCi) e 592 MBq (16 mCi), observados na FIG 10, corroborando com trabalhos realizados por Macke HR e cols, 1999<sup>58</sup>, com <sup>111</sup>In e <sup>90</sup>Y. Estes pesquisadores, descreveram algumas radiomarcações com <sup>67</sup>GaCl<sub>3</sub>, <sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> e <sup>90</sup>YCl<sub>3</sub> com DTPA<sup>0</sup>-D-Phe<sup>1</sup>-octreotide e DOTATOC com atividade específica acima de 29,6 GBq/  $\mu$ mol, obtiveram pureza radioquímica superior a 90%.



**Figura 10** – Variação a atividade de marcação de 185, 259 e 592 MBq

Pelos parâmetros estudados certificou-se que as características ideais para o desenvolvimento da marcação do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga devem obedecer a seguinte formulação, e em situações descritas nos materiais e métodos:

- Radionuclídeo com baixo teor de contaminantes metálicos (purificação por extração de solventes)
- Massa do DOTALAN de 10 $\mu$ g (6nmol)
- pH 5 da marcação
- Volume final do marcado de 170 $\mu$ L
- Atividade do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga de 222 MBq/10 $\mu$ g (6mCi/ 6nmol)

### 5.7. Estabilidade do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga

O produto marcado apresentou uma boa estabilidade nos intervalos de uma hora ( $95,75 \pm 0,35\%$ ), 72 horas ( $95,85 \pm 0,63\%$ ) e 144 horas ( $94,95 \pm 0,63\%$ ), com alta pureza radioquímica

### 5.7.1. Estabilidade da marcação no plasma sanguíneo

O bioconjugado DOTALAN-<sup>67</sup>Ga apresentou-se estável nos estudos *in vitro*, incubado a 37°, com o plasma humano após as análises das purezas radioquímicas feitas nos intervalos de uma hora (96,5% ± 0,70), quatro horas (97,13 ± 1,16%) e 24 horas (96,75 ± 1,06%).

### 5.8. Estudos *in vivo*

A marcação das moléculas de peptídeos de cadeia curta tem-se tornado um atrativo no desenvolvimento de novos radiofármacos.

A especificidade na capacidade de ligação com sítios de afinidade, tem sido conceituada como fontes de investigações para diferentes patologias, conduzindo-os a cada geração, características inovadoras de seletividade e afinidade, assim como de rápida depuração do organismo, de modo que, o radiofármaco resultante possa causar menos efeitos ou danos da radiação aos órgãos normais adjacentes.

Com esse objetivo traçou-se o protocolo de marcação do DOTALAN marcado com <sup>67</sup>Ga que atinge dois propósitos convenientes para o radiofármaco: diagnóstico e terapia.

Desde a descoberta dos receptores peptídeos e da síntese de pequenos peptídeos biologicamente ativos, tem sido reconhecido que estas moléculas podem fornecer novas abordagens para a seletividade de radionuclídeos alvos. Após o sucesso do uso do *Octreoscan* na localização de tumores humanos, que possuem receptores de somatostatina, pesquisas para melhoria dos radiofármacos têm levado a ligações mais estáveis de peptídeos com radionuclídeos e baixo acúmulo em órgãos normais.



Com aquisição de um produto radioquimicamente puro, verificou-se uma depuração do organismo, essencialmente pelas vias renais, que correspondem ao objetivo primário do reagente de nova geração, mostrando algumas regiões de afinidade, porém em baixa concentração radioativa, inclusive as que circundam as áreas tumorais.

Para alcançar o propósito de se obter um radiofármaco com essa categoria, entretanto, obedecendo à regra da última geração foi esquematizado o perfil do comportamento biológico do produto radiomarcado; a capacidade de interação com as células específicas de tumores malignos enxertados em camundongos *Swiss* e *Nude*; a dinâmica funcional frente a essa situação e em relação aos órgãos normais.

#### **5.8.1a. Biodistribuição do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga em camundongos *Swiss* sadios**

Os dados da biodistribuição do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga em animais sadios injetados com 1,11 MBq/ 0,1mL, com uma pureza radioquímica de  $95,5 \pm 0,7\%$ ; estão representados na TAB 4a - % ATIVIDADE/ ÓRGÃOS e TAB 4b - % ATIVIDADE / GRAMA (n=6).

A tendência no desenvolvimento de um radiofármaco específico para discriminada enfermidade é torná-lo mais hidrofílico possível, pela ação metabólica "in vivo" para reduzir o seu tempo de permanência no organismo. Ou seja, que a fração não ligada a receptores seja rapidamente eliminada pelas vias renais na primeira fase da distribuição, a fim de minimizar a radiação dos órgãos não comprometidos.

O DOTALAN-<sup>67</sup>Ga também apresenta essa característica na eliminação renal na proporção de aproximadamente 2,697 %Atividade/ Grama de tecido em 24horas (TAB 4b) e um clareamento sanguíneo rápido. A captação do radiofármaco no fígado e no baço pode estar relacionado a presença de receptores de somatostatina ou mesmo a presença de <sup>67</sup>Ga livre.

**TABELA 4a** - Biodistribuição do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga, em camundongos Swiss sadios. %ATIVIDADE/ ÓRGÃOS

ÓRGÃOS/ TECIDOS	% ATIVIDADE/ ÓRGÃOS					
	1 h		4 hs		24 hs	
	Média	Desvio ±	Média	Desvio ±	Média	Desvio ±
CÉREBRO	0,037	0,012	0,018	0,012	0,010	0,006
PULMÃO	0,137	0,040	0,082	0,024	0,062	0,029
CORAÇÃO	0,090	0,027	0,054	0,034	0,046	0,048
BAÇO	0,210	0,039	0,251	0,052	0,127	0,048
FÍGADO	1,281	0,471	1,080	0,170	0,880	0,101
ESTÔMAGO	0,065	0,012	0,070	0,036	0,049	0,035
MÚSCULO	1,348	0,696	0,375	0,050	0,411	0,035
RINS	0,555	0,051	0,636	0,196	0,666	0,393
I. DELGADO	0,467	0,121	0,295	0,132	0,424	0,256
I.GROSSO	0,103	0,018	0,158	0,089	0,169	0,119
SANGUE TOTAL/mL	3,594	0,310	4,328	0,261	4,363	0,273

**TABELA 4b - Biodistribuição do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga, em camundongos Swiss sadios. % ATIVIDADE /GRAMA**

ÓRGÃOS/TECIDOS	%ATIVIDADE/GRAMA					
	1 h		4 hs		24 hs	
	Média	Desvio ±	Média	Desvio ±	Média	Desvio ±
CÉREBRO	0,081	0,023	0,039	0,025	0,028	0,017
PULMÃO	0,469	0,108	0,287	0,053	0,178	0,082
CORAÇÃO	0,591	0,157	0,447	0,030	0,190	0,082
BAÇO	1,496	0,060	1,323	0,026	1,238	0,029
FÍGADO	0,766	0,224	0,708	0,031	0,646	0,027
ESTÔMAGO	0,223	0,039	0,302	0,053	0,172	0,113
MÚSCULO	0,103	0,050	0,073	0,064	0,031	0,001
RINS	0,998	0,347	1,515	0,448	2,697	0,646
I. DELGADO	0,328	0,331	0,421	0,754	0,191	0,106
I.GROSSO	0,265	0,360	0,202	0,098	0,251	0,196
SANGUE TOTAL/ mL	1,611	0,058	1,667	0,042	1,936	0,030

### **5.8.1b. Biodistribuição do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga em camundongos Swiss inoculados com células HT-29**

As biodistribuições do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga em Swiss inoculados com células HT-29, injetados com atividade de 1,11 MBq/ 0,1mL, e com pureza radioquímica de  $96 \pm 1,4\%$ , estão demonstradas na TAB 5a - % ATIVIDADE/ ÓRGÃOS e TAB 5b - ATIVIDADE /GRAMA (n=6).

As tabelas 5a e 5b expressam a afinidade do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga com as células malignas xenoinplantadas em camundongos, mantendo-se praticamente inalterada durante todo o experimento.

De acordo com a Tabela 5b (Atividade /Grama) houve um clareamento sangüíneo mais lento, baixa eliminação renal, e uma captação no tumor em 24 horas de  $1,665 \pm 0,030$ , corroborando com os dados de literatura<sup>34</sup>, com estudos do DOTATOC-<sup>68</sup>Ga, indicando alta estabilidade do radioligante.

Segundo a literatura<sup>23,33</sup> radiofármacos DOTATOC-<sup>67</sup>Ga, <sup>111</sup>In e <sup>90</sup>Y, têm mostrado uma clara vantagem sobre o radiofármaco já estabelecido comercialmente Octreoscan®, com alta captação tumoral.

Outros pesquisadores<sup>39</sup> utilizaram peptídeo bioconjugado frio (não marcado), bloqueando os tecidos ricos em receptores de somatostatina, tais como fígado e pâncreas, diminuindo a captação do radioligante nestes órgãos

**TABELA 5a- Biodistribuição do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga, em camundongos Swiss inoculados com células HT-29. % ATIVIDADE / ÓRGÃOS**

ÓRGÃOS/TECIDOS	% ATIVIDADE/ ÓRGÃOS					
	1 h		4 hs		24 hs	
	Média	Desvio ±	Média	Desvio ±	Média	Desvio ±
CÉREBRO	0,003	0,002	0,006	0,003	0,006	0,007
PULMÃO	0,043	0,051	0,051	0,017	0,090	0,041
CORAÇÃO	0,007	0,007	0,017	0,008	0,008	0,005
BAÇO	0,036	0,042	0,109	0,068	0,093	0,062
FÍGADO	0,826	0,096	1,151	0,108	0,922	0,282
ESTÔMAGO	0,012	0,020	0,023	0,014	0,023	0,021
MÚSCULO	0,052	0,019	0,390	0,129	0,308	0,275
RINS	0,119	0,019	0,142	0,017	0,113	0,022
I. DELGADO	0,059	0,048	0,115	0,017	0,127	0,140
I.GROSSO	0,017	0,020	0,041	0,019	0,026	0,019
TUMOR	1,370	0,366	1,052	0,237	1,140	0,233
SANGUE TOTAL/mL	0,856	0,098	0,945	0,093	1,063	0,077

**TABELA 5b- Biodistribuição do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga, em camundongos Swiss inoculados com células HT-29. % ATIVIDADE /GRAMA**

ÓRGÃOS/ TECIDOS	% ATIVIDADE/ GRAMA					
	1 h		4 hs		24 hs	
	Média	Desvio ±	Média	Desvio ±	Média	Desvio ±
<b>CÉREBRO</b>	<b>0,006</b>	0,005	<b>0,014</b>	0,008	<b>0,012</b>	0,014
<b>PULMÃO</b>	<b>0,155</b>	0,195	<b>0,234</b>	0,166	<b>0,312</b>	0,085
<b>CORAÇÃO</b>	<b>0,044</b>	0,045	<b>0,130</b>	0,064	<b>0,053</b>	0,031
<b>BAÇO</b>	<b>0,252</b>	0,302	<b>0,531</b>	0,174	<b>1,205</b>	0,398
<b>FÍGADO</b>	<b>0,638</b>	0,134	<b>0,484</b>	0,141	<b>0,423</b>	0,165
<b>ESTÔMAGO</b>	<b>0,045</b>	0,076	<b>0,070</b>	0,049	<b>0,068</b>	0,061
<b>MÚSCULO</b>	<b>0,011</b>	0,013	<b>0,030</b>	0,017	<b>0,029</b>	0,028
<b>RINS</b>	<b>0,377</b>	0,109	<b>0,346</b>	0,031	<b>0,287</b>	0,036
<b>I. DELGADO</b>	<b>0,046</b>	0,043	<b>0,049</b>	0,026	<b>0,030</b>	0,022
<b>I.GROSSO</b>	<b>0,032</b>	0,039	<b>0,050</b>	0,027	<b>0,024</b>	0,019
<b>TUMOR</b>	<b>1,767</b>	0,011	<b>1,703</b>	0,005	<b>1,665</b>	0,030
<b>SANGUE TOTAL/ mL</b>	<b>0,451</b>	0,030	<b>0,473</b>	0,019	<b>0,546</b>	0,015

**5.8.1c. Biodistribuição do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga em camundongos *Nude* inoculados com células HT-29**

As biodistribuições do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga em animais (n=5) inoculados com células HT-29 injetados com atividade de 1,11 MBq/ 0,1mL, e com pureza radioquímica de 94 ± 0,7% (Tabelas 6a e 6b).

Os animais apresentaram boa captação nas células tumorais, depuração sanguínea mais rápida e maior eliminação renal, quando os animais são comparados com camundongos Swiss.

**TABELA 6a-** Biodistribuição do DOTALAN -<sup>67</sup>Ga, em camundongos NUDE com células HT-29. % ATIVIDADE/ Órgão

ORGÃOS/ TECIDOS	% ATIVIDADE/ ÓRGÃOS					
	1 h		4 hs		24 hs	
	Média	Desvio ±	Média	Desvio ±	Média	Desvio ±
CÉREBRO	0,018	0,008	0,013	0,007	0,008	0,002
PULMÃO	0,112	0,028	0,117	0,106	0,125	0,032
CORAÇÃO	0,027	0,010	0,025	0,004	0,014	0,003
BAÇO	0,043	0,007	0,054	0,018	0,048	0,011
FÍGADO	0,997	0,194	1,035	0,363	0,710	0,060
ESTÔMAGO	0,028	0,017	0,038	0,011	0,023	0,016
MÚSCULO	0,433	0,059	0,570	0,178	0,467	0,092
RINS	0,369	0,099	0,451	0,060	0,631	0,084
I. DELGADO	0,141	0,085	0,177	0,021	0,291	0,036
I.GROSSO	0,037	0,015	0,110	0,031	0,274	0,072
TUMOR	0,415	0,223	0,609	0,574	0,372	0,161
SANGUE TOTAL/mL	1,651	0,218	0,943	0,121	0,290	0,044

**TABELA 6b-** Biodistribuição do DOTALAN  $^{67}\text{Ga}$ , em *NUDE* inoculados com células HT-29. % ATIVIDADE / Grama

ORGÃOS/ TECIDOS	% ATIVIDADE/ GRAMA					
	1 h		4 hs		24 hs	
	Média	Desvio $\pm$	Média	Desvio $\pm$	Média	Desvio $\pm$
CÉREBRO	0,057	0,021	0,036	0,018	0,017	0,003
PULMÃO	0,719	0,052	0,323	0,064	0,907	0,847
CORAÇÃO	0,503	0,094	0,360	0,096	0,162	0,017
BAÇO	0,849	0,023	0,933	0,024	1,021	0,092
FÍGADO	1,129	0,091	1,146	0,126	1,038	0,009
ESTÔMAGO	0,193	0,095	0,293	0,114	0,132	0,167
MÚSCULO	0,070	0,008	0,078	0,012	0,074	0,015
RINS	1,605	0,004	2,411	0,124	2,571	0,227
I. DELGADO	0,203	0,136	0,223	0,072	0,357	0,056
I.GROSSO	0,082	0,033	0,249	0,142	0,714	0,006
TUMOR	0,605	0,013	1,281	0,054	1,761	0,076
SANGUE TOTAL/mL	0,942	0,335	0,776	0,167	0,287	0,030

Estudos de biodistribuição foram realizados com camundongos *NUDE*, que apresentam melhores viabilidades em aceitar a xenoinplantação de células tumorais (ex.tumor pancreático AR4-2J e adenocarcinoma de cólon HT-29) que expressam os receptores de somatostatina.



Apesar do DOTALAN reconhecer vários subtipos receptores de somatostatina, ele exibe, no estudo da biodistribuição em ratos normais, em comparação a outros ligantes com base no OCT, uma rápida depuração sanguínea. Isto parece indicar que a expressão dos receptores de somatostatina ( $ssr_{2-5}$ ) é baixa em tecidos normais. Diferentemente do Octreoscan®, que também localiza-se no fígado, demonstrou maior captação nesse órgão e redução da atividade renal, podendo refletir a natureza mais lipofílica do peptídeo DOTALAN, assim como menor radiação nesse órgão, quando administrado em humanos<sup>23,33</sup>. Apresentaram boa captação nas células tumorais, depuração sanguínea mais rápida e maior eliminação renal, quando os animais são comparados com camundongos Swiss.

Evidentemente, as diversificações na coordenação química dos metais causam mudanças no comportamento biológico. Na verdade, um estudo cristalográfico dos complexos  $Ga^{3+}$  e do  $Y^{3+}$  no modelo do peptídeo DOTA-D-PheNH<sub>2</sub> mostraram diferenças na geometria. O complexo de gálio é hexacoordenado com uma geometria *cis* pseudoctahédrica e uma unidade macrocíclica múltipla. Em contraste, a estrutura do DOTA-D-PheNH<sub>2</sub> -Y tem oito vezes mais coordenações, incluindo o oxigênio amido carboxi. O plano equatorial do complexo de gálio é formado por dois nitrogênios do anel ciclono e dois oxigênios do grupo correspondente carboxilato. As duas posições axiais são formadas pelo anel dos átomos de nitrogênio. O oxigênio amido carboxi não se liga ao metal e o grupo carboxilato livre, é desprotonado a pH fisiológico, e provavelmente contribui favoravelmente no tratamento com radiopeptídeos sem comprometer os rins e a eliminação renal<sup>22</sup>.

A razão dessa preocupação é conseqüente dos rins serem os órgãos mais afetados e a limitação nas doses com relação à toxicidade, inerente a filtração glomerular dessa classe de peptídeos e reabsorção pelos túbulos renais com retenção parcial, que poderá causar danos a logo tempo, dependendo do tipo de radioisótopo e da energia emitida durante a terapia<sup>23</sup>.

### 5.9. Estudos de perfusão

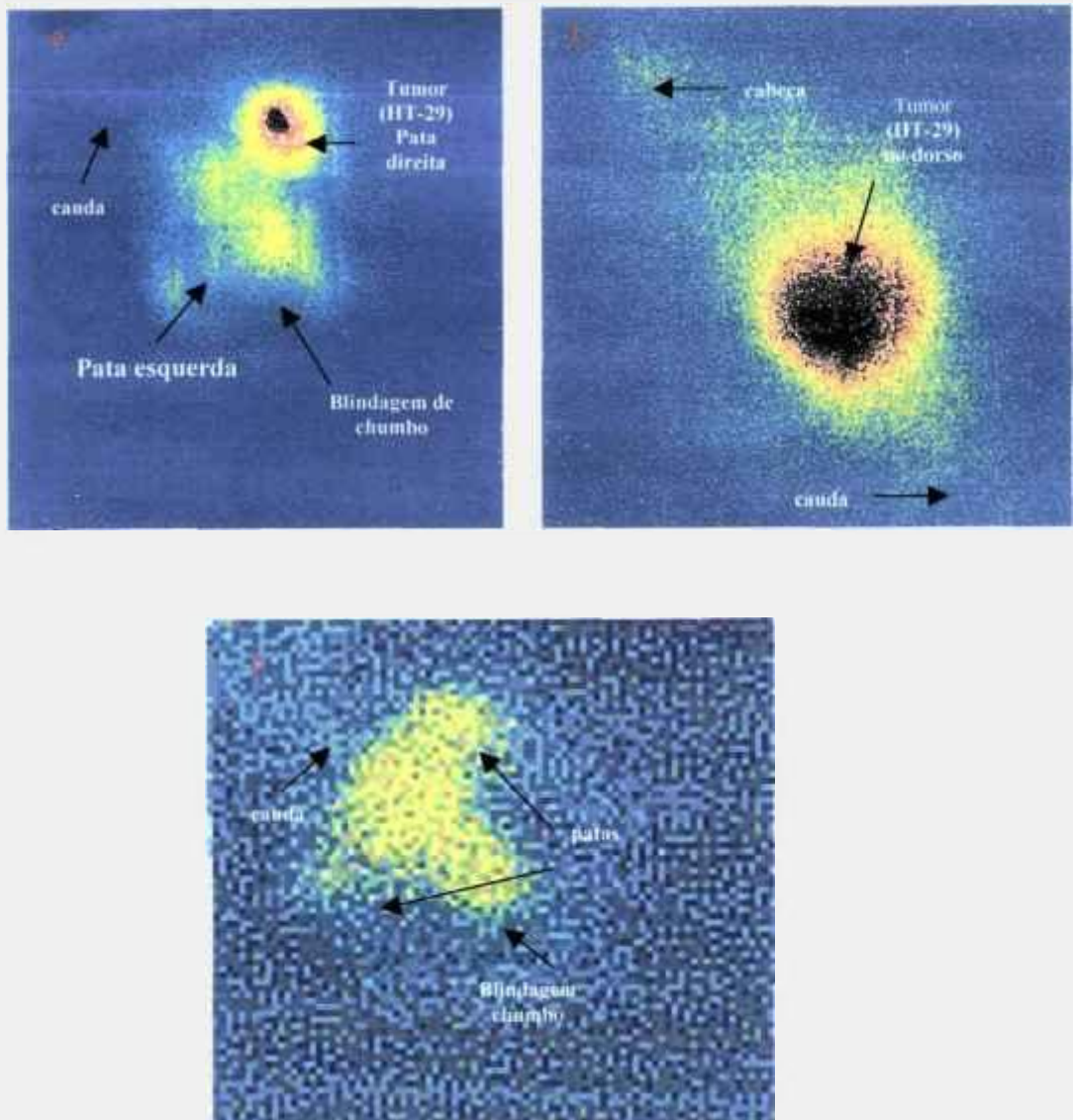
A rápida proliferação celular associada ao aumento na vascularização da área tumoral deriva dúvidas sobre a real afinidade do radiofármaco pelos receptores tumorais.

Para responder esse questionamento, mesmo com atividade circulante a volta de 1,47%DI (razão entre 2,86 e 4,22 da % atividade/ grama no tumor, em camundongos *Nude*), a perfusão foi feita com solução salina 0,9% para a remoção daquela que, supostamente, estaria promovendo o aumento da captação tumoral.

Além da confirmação da compatibilidade do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga pelas células HT-29, foi possível avaliar a eficácia da interação entre a célula tumoral e o produto, cuja potência de ligação foi preservada em níveis relativamente constantes após um tempo prolongado de perfusão (60-90 minutos).

### 5.10. Biodistribuição do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga por meio de imagens cintilográficas em ratos *Wistar* inoculados com células HT-29

As primeiras imagens foram obtidas no Centro de Radiofarmácia (CR) do IPEN, quatro horas após administração de doses de 18,5 MBq do radiofármaco DOTALAN-<sup>67</sup>Ga, com uma pureza radioquímica de  $98,5 \pm 0,7\%$ , em ratos *Wistar* conforme demonstrado nas Figuras 11a, 11b e 11c.



**FIGURA 11-** Imagens obtidas em uma mini - câmara gama portátil calibrada para  $^{67}\text{Ga}$ .

a) animal com células HT-29 na pata direita (com uma blindagem na região abdominal); b) animal com células HT-29 no dorso; c) animal sadio (normal) com uma blindagem na região abdominal.

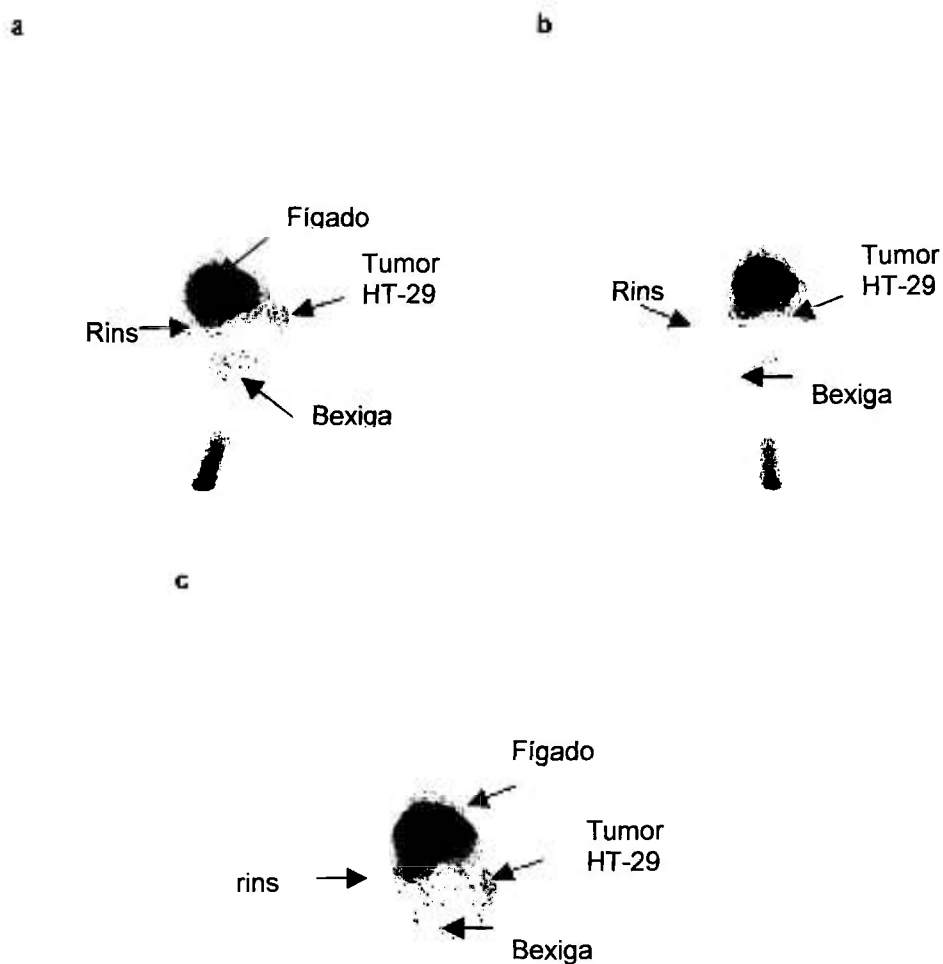
O xenoimplante em ratos foi feito por meio da repicagem das células oriundas do tumor desenvolvido em camundongos *Nude*, *Swiss* e ratos *Wistar*, portanto, pertencente a terceira geração celular.

Embora a definição das imagens em ratos mostrou-se superior, comparada com as obtidas utilizando-se camundongos (FIG 12), reproduzir roedores dessa classe *Wistar*, com tal patologia, revelou ser trabalho um tanto laborioso devido à freqüente abortamento das células. Por conseguinte, optou-se em utilizar no estudo cintilográfico, os camundongos *Swiss*, e camundongos *Nude*, apesar da pequena resolução da câmara, em virtude da massa corpórea.

A radioatividade sangüínea indica que colabora minimamente na resolução das imagens cintilográficas. Entretanto, como visto nos dados da biodistribuição da Figura 11a, quando a massa tumoral apresenta-se em forma de pequeno nódulo e como apresentado na Figura 11b, um nódulo muito grande na região dorsal, a visibilidade pode apresentar-se comprometida, conseqüente da radiação emitida das regiões hepática e renal. Para descartar esse inconveniente empregou-se um subterfúgio com blindagem de chumbo, expondo apenas na parte do dorso do animal inoculado com células HT-29, Figura 11a e procedimento semelhante foi utilizado no animal sadio, Figura 11c.

#### **5.11. Biodistribuição do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga por meio de imagens cintilográficas em camundongos *Swiss* inoculados com células HT-29**

Imagens cintilográficas obtidas (Figuras 12a, 12b e 12c) no Centro de Medicina Nuclear da Faculdade de Medicina da USP, administrada atividade de 37MBq do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga em camundongos *Swiss* inoculados com células HT-29.



**FIGURA 12-** Imagens cintilográficas de camundongos *Swiss* inoculados com células HT-29, na região abdominal. Imagens após a administração do produto: a) 3 horas; b) 4 horas e c) 24 horas

Na análise das imagens cintilográficas (provavelmente metáses hepáticas) seqüenciais Figuras 12a, 12b e 12c, nota-se a evolução no mecanismo de captação do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga pelas células patogênicas no fluir do experimento. Para que isso ocorra, imagina-se que exista um sistema de rotatividade (“turnover”) complexo do radiofármaco, no organismo, alimentado por processo de reabsorção, liberação do compartimento muscular e/ou órgãos com maior incidência de captação.

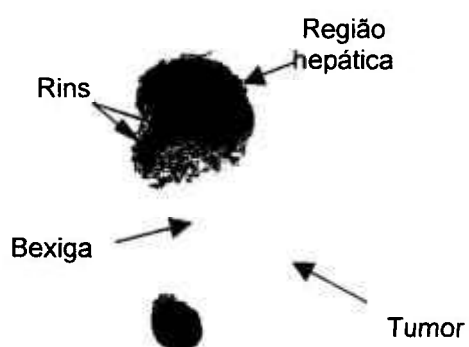
A constante de eliminação deve ser bastante reduzida, pois não foi evidenciado o acúmulo da radioatividade na bexiga no intervalo a-b da figura 12, assim como naquela retida no corpo inteiro, posterior à primeira hora (Tabela 5b -  $1,767 \pm 0,011$  % atividade/ grama).

#### **5.12. Biodistribuição do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga por meio de imagens cintilográficas em camundongos *Nudes* inoculados com células AR4-2J**

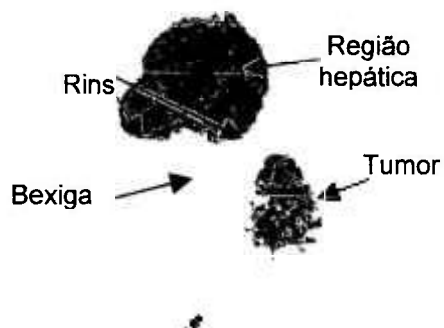
Em animais portadores de células AR4-2J devido ao estágio avançado da enfermidade, conseqüente do tempo maior de intervalo entre a inoculação e o destino final do experimento fez com que ocorresse formação de várias áreas metastática.

As imagens cintilográficas dos animais imunodeprimidos inoculados com células AR4-2J foram obtidas no Centro de Medicina Nuclear (CMN) da Faculdade de Medicina da USP, demonstradas nas Figuras 13 a e 13b. A imagem 24 horas após a injeção do radiofármaco demonstrou uma alta captação no tumor, e também na região do fígado e dos órgãos adjacentes, caracterizando possíveis áreas metastáticas.

a



b



**FIGURA 13-** Imagens cintilográficas de camundongos *Nudes* inoculados com células AR4-2J, na região abdominal. Imagens após a administração do produto: a) 4 horas e b) 24 horas.

### 5.13. Ensaio de internalização *in vitro* do DOTALAN-<sup>67</sup>Ga nas células de adenocarcinoma de cólon-retal humano (HT-29)

O bioconjugado DOTALAN-<sup>67</sup>Ga apresentou ser um produto capaz de se internalizar nas células tumorais HT-29.

Os resultados encontrados nos experimentos a e b demonstraram que o DOTALAN apresenta afinidade pelos receptores das células HT-29, cultivadas e capacidade de internalização TAB.8 .

**TABELA 8-** % de DOTALAN-<sup>67</sup>Ga ligada e internalizada às células de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29)

ESTUDOS	%Ligação		% Internalização	
	a	b	a	b
<b>Série Específica (SE)</b>	4,25 ±0,77	4,9 ± 0,47	82,61± 1,79	58,7 ±3,37
<b>Série não Específica (SNE)</b>	4,1± 0,69	3,4 ± 0,52	80,5 ± 2,12	53,9 ±4,75
<b>% Total Ligação (LT)</b>	0,15	1,5	-	-
<b>% Total de Internalização (TI)</b>	-	-	2,1	4,8

\*LT= SE - SNE

TI = SE -SNE

Smith-Jones e cols <sup>35</sup>, descreveram que o tempo de permanência do radiofármaco DOTALAN em tecidos de animais de experimentação, ricos em receptores de somatostatina, está relacionado a internalização dos ligantes e entrada na célula. O carácter lipofílico do octapeptideo DOTA-(M)βNal ligado ao radioisótopo sugere que é o principal metabólito celular. Estudos prévios tem



mostrado que metabólitos primários de quelantes conjugados de monoclonais e octreotídeos consistem da simples conjugação dos aminoácidos N-terminal.

Froidevaux S e cols, 2002 <sup>39</sup>, demonstraram que os elétrons *Auger* do  $^{67}\text{Ga}$ , de baixa energia (0,1-90 keV) de marcações DOTATOC- $^{67}\text{Ga}$ , comparado com o  $^{90}\text{Y}$  (radionuclídeo usado em radioterapia de tumores ricos em receptores de somatostatina, com energia máxima de 2,27 MeV), é altamente internalizado e liberado lentamente das células tumorais contribuindo para maior deposição seletiva no seu alvo. Os cientistas observaram que estudos realizados com o octapeptídeo DOTATOC marcado com  $^{111}\text{In}$  e  $^{90}\text{Y}$  apresentaram comportamento similar e que o desempenho da radiomarcagem com  $^{67}\text{Ga}$ , foi claramente superior, apresentando maior captação no tumor e baixa retenção renal, indicada pelos receptores de somatostatina do tipo 2 (SST2).

## 6. CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu concluir que:

- ✓ O cloreto de  $^{67}\text{Ga}$  deverá ser quimicamente puro, com limite de contaminantes metálicos (Zn, Cu, Fe e Ni) inferior a  $5\mu\text{g}/\text{mL}$  para marcação de peptídeos.
- ✓ Para a produção do  $^{67}\text{Ga}$ , a purificação por meio de extração por solventes deverá ser automatizada, pois na forma manual é um processo moroso, necessitando de um tempo muito grande (4 horas desde o início da purificação até a evaporação da solução de gálio).
- ✓ Para marcar bioconjugado DOTALAN com  $^{67}\text{Ga}$ , o peptídeo deverá apresentar concentração de  $10\mu\text{g}$ , o pH em torno de 5, o volume final da reação de  $170\mu\text{L}$  e atividade do  $^{67}\text{Ga}$  de 222 MBq (6mCi).
- ✓ A estabilidade do DOTALAN- $^{67}\text{Ga}$ , preservado à temperatura ambiente, manteve-se inalterada durante 144 horas ( $94,95 \pm 0,63\%$ ) e no plasma humano foi de 24 horas ( $96,75 \pm 1,06\%$ ).

Novos estudos de internalização deverão ser realizados com o DOTALAN- $^{67}\text{Ga}$  e compará-los a outros análogos da somatostina marcados, a fim de observar a capacidade de ligação aos receptores tumorais.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOERMAN OC, LAVERMAN P, OYEN W J G, CORSTENS FHM, STORM G. Radiolabeled liposomes for scintigraphic imaging. **Progress in Lipid Research**, v.39, p.461-474,2000.
2. BAKKER W H, KRENNING E P, BREEMAN W A . Receptor scintigraphy with a radiolabeled somatostatin analog: Radiolabeling, purification, biological activity and *in vivo* application in animals. **J Nucl Med.**, v31, p.1501-1509, 1990.
3. KÖHLER JGP, MILSTEIN C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predetermined specificity. **Nature.**, v256, p.495-497,1975.
4. MCGILVERY, RW. **Biochemistry: A functional Approach**, 3<sup>rd</sup> Edition. WB. Saunders, Philadelphia. 1983.
5. THAKUR ML and WEINER RE. Radiolabeled peptides in diagnosis and therapy of oncological diseases. **Applied Radiation Isotopes.**, v57, p.749-763,2002
6. THAKUR ML and WEINER RE. Radiolabeled peptides in diagnosis and therapy. **Seminars in Nuclear Medicine Vol 30,N 4**, p.296-311,2001.
7. OKARVI, SM. Recent developments in <sup>99m</sup>Tc-labelled peptide-based radiopharmaceuticals. an overview. **Nucl.Med.Comm.**, v20, p.1093-1112,1999.
8. LISTER-JAMES J, MOYER BR, DEAN T. Small peptides radiolabelled with <sup>99m</sup>Tc. **Q J Nucl Med.**, v40, p.221-233, 1996.
9. BERH T, BECKER W, BAIR HJ, KLEIN M, STUHLER CM, CIDLINSKY KP, SHEELE JR, WOF FG. Comparison of complete versus fragmented <sup>99m</sup>Tc- labelled. **J Nucl Med.**, v36, p.430-441,1995.
10. DEAN, RT, JAMES,JL, LEES,RS., et al. **Peptides in biomedical science: principles and practice**. In: Martin- Comin J, Thakur,ML, Piera,C. (Eds). Radiolabeled blood elements. Plenum Press, New York, pp.195-199,1994.

- 
11. THAKUR, ML , KOLAN, HR, RIFAT,S. Vapreotide labeled with Tc-99m for imaging tumors: prepetion and preliminary evaluation. **Int. J Oncol.**,v9, p.445 - 451, 1996.
  12. MCAFEE, JG, NEUMANN, RD. Radiolabeled peptides and other ligands for receptors overexpressed in tumor cells for imaging neoplasms. **Nucl.Med.Biol.**, v23, p. 673-676,1996.
  13. LUY T and KATZENELLENBOGEM JA. A triothilate tripodal bifuncional ligand for the radiolabeling of peptides with gallium (III). **Bioconj Chem.**, v13, p.1140-1145. 2002
  14. REUBI JC, SCHAEER JC,WASER B, MENGOD G. Expression and localization of somatostatin receptor sstr1,sstr2, and sstr3 mRNAs in primaty human tumors using in situ hybridization **Cancer Res.**, v54, p.3455-3459, 1994.
  15. REUBI JC, SCHÄR JC, WASER B, WENGER S, HEPPELER A, SCHIMIDT JS, MÄCKE HR. Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes st1-sst5 of somatostatin radiotracer seleted for sintingraphic and radiotherapeutic use. **Eur J Nucl Med.**, v27, p.273-282,2000.
  16. REISINI DE JONG M, BREEMAN WAP, BARKER WH, KOOIJ PPM, BERNARD BF, HOFLAND LJ VISSER TJ, SRINIVASAN A,SCHMIDT MA, ERION JL, BUGAJ JE, MÄCKE HR, KRENNING EP. Comparison of <sup>111</sup>In labelled somatostatin analogues for tumor scintigraphy and radionuclide therapy. **Cancer Res.**, v58, p.437-441,1998.
  17. WEINER RE and THAKUR ML. Radiolabeled peptides in the dianosis and therapy of oncological diseases. **Applied Radiation and Isotopes.**, v57, p.749-763, 2002.
  18. REUBI JC, MAURER R, VON WERDER K, TORHORST J, KLIJIN JG, LAMBERTS SW. Somatostatin receptors in human endocrine tumors. **Cancer Res.**, v47, p.551-558,1987.
  19. REISINI T, BELL GL. Molecular biology of somatostatin receptors. **Endoc Res.**, v16, p. 427- 442,1995.
  20. BOERMAN OC, OYEN WJG, and CORSTENS FHM. Radio-labeled receptor- binding peptides: A new class of radiopharmaceuticals. **Seminars in Nuclear Medicine**, v30, n3, p.195-208,2000.

- 
21. GILLESPIE MT, THOMAS RJ, PU ZY. Calcitonin receptors, bone sialoprotein and osteopontin are expressed in primary breast cancers. **Int J Cancer.**, v73, p. 812-815,1997.
22. HEPPLER A, FROIDEVAUX S, MÄCKE H R, JERMANN E, BÉHEM, POWELLP AND HENNING M Radiometal-labelled macrocyclic chelator-derivatised somatostatin analogue with superb tumour-targeting proprieties and potential for receptor-mediated internal radiotherapy. **Chem Eur J.**, v5, p. 1974-1981,1999.
23. HEPPELER A, FROIDEVAUX S, EBERLE NA, AND MÄCKE HR. Receptor for tumor localization and therapy with radiopeptides. **Cur Med Chem.**, v7, p.971-994, 2000.
24. BROAN CJ, COX JPL, CRAIG AS, KATAKY R, PARKER D, HARRISON A, RANDALL AM, FERGUSON G: Structura and solution stability of indium and gallium complexes of 1,4,7-triazacyclononanetriacetate and of yttrium complexes for use in imaging and radioimmunotherapy. X-ray molecular structura of the indium and gallium complexes of 1,4,7 – triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid. **J Chem Soc Perkin Trans.**, v2, p.87-91,1971.
25. WEINER RE, THAKUR ML, GOODMAN M, HOFFER PB: Relative stability of  $^{111}\text{In}$  and  $^{67}\text{Ga}$  desferrioxamine and human transferrin complexes: radiopharmaceuticals II. New York: **Society of Nuclear Medicine.**, p.331-340, 1979.
26. CLARKE ET, MARTELL AE: Stabilities of trivalent metal in complexes of the tetraacetate derivates of 12-13- and 14-membered tetraazamacrocycles. **Inorganica Chim Acta.**, v190, p.37-46,1991.
27. JANOKI AG, HAWIG JF, WOF: Studies on high specific activity labeling of proteins using bifuntional chelates. **Nucl Med Biol.**, v1, p.689-692, 1982.
28. SUNDBERGER M, MEARES CF, GOODWIN DA, DIAMANT DT– Chelating agents for the binding of metal ions to macromolecules. **Nature.**, v250, p.587-588, 1974.
29. HNATOVICH DJ, VIRZI F, DOHERTY PW. DTPA- coupled antibodies labelled with yttrium-90 **J Nucl Med.**, v26, p.503-509, 1985.
30. BROWN DH, BYRD BL, CARLTON JE. A quantitative study of the subcellular localization of  $^{67}\text{Ga}$ . **Cancer Res.**, p.956-963, 1976.

- 
31. CLARKE ET, MARTELL AE: Stabilities of trivalent metal in complexes of the tetraacetate derivatives of 12-13- and 14-membered tetraazamacrocycles. **Inorganica Chim Acta** ., v190, p.37-46. 1991
32. CHINOL M, PAGANELLI G, SUDATI F, MEARES C, FAZIO F. Biodistribution in the tumour-bearing mice of two <sup>90</sup>Y-labelled biotins using three step tumour targeting. **Nucl Med Commun.**, v18, p.176-182, 1997.
33. FROIDEVAUX S, HEPPELER A, EBERLE NA, MEIER AM, HAUSLER M, BEGLINGER C, BÉHÉ M, POWELL P AND MÄCKE HR. Preclinical comparison in AR4-2J tumor Bearing mice of four radiolabeled 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10- tetraacetic acid-somatostatin analogs four tumor diagnosis and internal radiotherapy. **Endocr.**, v141(9), p.3304-3312, 2000.
34. UGUR O, KOTHARI PJ, FINN R D, ZANZONICO P, RUANH G, MÄCKE HR, LARSON SM. Ga-66 labeled somatostatin analogue DOTA-Phe<sup>1</sup>-Tyr<sup>3</sup>-octreotide as a potential agent for positron emission tomography imaging and receptor mediated internal radiotherapy of somatostatin receptor positive tumors. **Nucl Med and Biol.**, v29, p.147-157, 2002.
35. SMITH-JONES PM, BICHOF C, LEIMER M, GLUDOVACZ D, ANGELBERGER P, PANGERL T, PECK-RADOSAVLJEVIC M, HAMILTON G, KASERER K, KOFLER A, SCHLAGBAUER-WADL H, TRAUB T VIRGOLINI I. DOTA-lanreotide: A novel Somatostatin analogs for tumor diagnosis and therapy. **Endo.**, v140 (11), p.5136-5148. 1999
36. VIRGOLINI I, YANG Q, LI S, ANGELBERGER P, NEUHOLD N, NEIDERLE B, SCHEITHAUER W, VALENT P. Cross-competition between Vasoactive Intestinal Peptide and Somatostatin for binding to tumor cell membrane receptors. **Cancer Res.**, v5, p.690-700, 1994.
37. DE JONG M, BREEMAN WAP, BARKER WH, KOOIJ PPM, BERNARD BF, HOFLAND LJ, VISSER TJ SRINIVASAN A, SCHMIDT MA, ERION JL, BUGAJ JE, MÄCKE HR, KRENNING EP. Comparison of <sup>111</sup>In labelled Somatostatin analogues for tumor scintigraphy and radionuclide therapy. **Cancer Res.**, v58, p.437-441, 1998.
38. HEPPELER A, BÉHÉ M, FROIDEVAUX S, HENNING M, JERMANN E, MÄCKE HR. Metal coordination chemical aspects and tumor targeting of promising somatostatin analogue. **J Nucl Med** ., v39, Suppl:63p, 1998.
39. FROIDEVAUX S, EBERLE A N, CHRISTE M, SUMAMOVSKI L, HEPPELER A, SCHMITT JS, EISENWIENER K, BEGLINGER C, MÄCKE H R. Neuroendocrine tumor targeting: Study of novel gallium-labeled

somatostatin radiopeptides in a rat pancreatic tumor model. **Int J Cancer.**, v98, 930-937, 2002.

40. WELCH MJ, REDVANLY CS (Ed.). **Handbook of Radiopharmaceuticals. Radiochemistry and Applications.** New York, NY. Wiley J & Sons Ltd, England, 2003

41. PERSON RG: Hard and soft acids and bases. **J Am Chem Soc** ., v85, p.3533-3539, 1963.

42. WEINER RE and THAKUR ML. Radiolabeled peptides in the diagnosis and therapy of oncological diseases. **Applied Radiation and Isotopes** ., v57, p.749-763, 2002.

43. GIBRIL F, REYNOLDS JC, DOPPAMN JL, CHEN CC, VENZON DJ., TERMANINI , WEBER C, STEWART CA, JENSEN RT. Somatostatin receptor scintigraphy: its sensitivity compared with that of other imaging Methods in detecting primary and metastatic gastrinomas. **Ann Inter Med.**, v125, p.26-34, 1996.

44. WEINER R E , TAKUR M L. Metallic Radionuclides: Applications in diagnostic and therapeutic nuclear medicine. **Radiochimica Acta.**, v70/71, p.273-287, 1995.

45. EISENWEINER KP; PRATA MIM; BUSCHMANN I; ZANG HW; SANTOS AC; WENGER S; REUBI JC E MÄCKE HR. NODAGATOC, a new chelator-coupled somatostatin analogue labelled with [ $^{68/67}\text{Ga}$ ] and [ $^{111}\text{In}$ ] for SPECT, PET and targeted therapeutic. Applications of somatostatin receptor (SSt2). Expressing tumors. **Bioconj Chem.**, v13, p.530-541, 2002.

46. DUDLEY HC, MADDOX GE and LA RUE HC. Studies of the metabolism of gallium. **J Pharm Exp Ther.**, v96, p.135-138, 1949.

47. CHAMMA D F. **Produção de  $^{67}\text{Ga}$  para Diagnóstico em Medicina Nuclear.** Dissertação (Mestrado). IEN/RJ, 1982.

48. PALESTRO, CJ. The current role of gallium imaging in infection. **Sem. Nucl. Med.**, v 24, n2, p.128-141, 1994.

49. BRUNER HD, HAYES RL and PERKINSON JD. Preliminary data on  $^{67}\text{Ga}$ . **Radiology.**, v61, p.602-612, 1953.

50. GRUVERMAN J, KRUGER P. **Int. Appl. Radiat. Isotopes.**, v21(5), 1959.

- 
51. HARTMAN RE, HAYES RL. Gallium binding by bloom serum. **Fed Proc .** (abst ), v26 , p.780, 1967.
52. LAVENDER JP, LOWEJ, BARKER JR. Gallium citrate scanning neoplastic and inflamatory lesions. **Br J Radiol.**, v 44, p.361-366. 1991.
53. BROWN LC. Chemical processing of cyclotron-produced  $^{67}\text{Ga}$ . **Appl Radiat Iso.**, v22, p.710-713, 1971.
54. LIMA ALVP, DIAS, LAP, BENVENUTI RA., DALL'EVEDOVE S, ZAPPAROLI,CL. MENGATTI J, SILVA C PG, PEREIRA NS.  $^{67}\text{Ga}$ -gallium citrate production. **Alasbimn Journal.**,v5(20); 2003.
55. BROWN L C Chemical Processing of Ciclotron-Produced  $^{67}\text{Ga}$ . **Int J Appl Iso.**, v22, p.710-713. 1971
56. BREEMAN W, ERIONJ L , BAKKER,W H , VISSE,T J, KRENNING, E P DE JONG M. Optimizing conditions for radiolabelling of DOTA- peptides with  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$  and  $^{177}\text{Lu}$  at high specific activities. **Eur Nuc Med.**, v30 (60), p.917-920,2003.
57. STIMMEL JB, STOCKSTILL ME, KULL FC Jr. Yttrium-90 chelation properties of tetrazatetraacetic aid macrocycles, diethylenetriaminepentaacetic acid analogues, and a novel terpyridine acyclic chelator. **Bioconjugate Chem**, v6, p.219-225,1995.
58. MÄCKE HR, HEPPELER A, NOCK B., EDS: M. NICOLINI, U. MAZZI: SGE. Somatostatin analogues labeled with different radionuclides. **Technetium, Rhenium and Others Metals in Chemistry and Nuclear Medicine.**, Editorial, Italy, p. 77-91, 1999.