

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**MARCAÇÃO DO PEPTÍDEO DOTA-TYR³-OCTREOTATO COM RADIOIODO E
ESTUDO DA BIODISTRIBUIÇÃO E AFINIDADE POR CÉLULAS DE TUMOR
NEUROENDÓCRINO AR42J EM CAMUNDONGOS.**

Lúcio Takeshi Nagamati

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

Orientadora:

Dra Elaine Bortoleti de Araújo

São Paulo

2006

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos sem os quais ele não teria sido possível: Jesus Cristo, minha orientadora Elaine, minha esposa Rosane e meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Pai de meu Senhor Jesus Cristo, aos meus entes queridos e, também, aos colegas pesquisadores e bolsistas que me ajudaram com meu trabalho, como Dra Maria Tereza Colturato, Dr José Caldeira Filho, Dra Emiko Muramoto e a Dra Kayo Okazaki.

MARCAÇÃO DO PEPTÍDEO DOTA-TYR³-OCTREOTATO COM RADIOIODO E ESTUDO DA BIODISTRIBUIÇÃO E AFINIDADE POR CÉLULAS DE TUMOR NEUROENDÓCRINO AR42J EM CAMUNDONGOS.

Lúcio Takeshi Nagamati

RESUMO

Os tumores neuroendócrinos são raros, ocorrem principalmente no trato gastrointestinal, mas outros sistemas são acometidos como pele, pulmões e sistema nervoso. São ricos em receptores de somatostatina (SM) do tipo 2 (SSTR2) e podem secretar hormônios em excesso. Peptídeos análogos sintéticos da SM são de grande utilidade por possuírem meia vida maior do que a SM e, assim, podem ser utilizados para melhora clínica destes pacientes devido sua ação inibitória tumoral. A marcação destes peptídeos com radioisótopos permite a obtenção de imagens, de boa relação custo-eficácia comprovada, e realização de terapia. O peptídeo utilizado, DOTA-Tyr³-octreotato (DOTATATO), possui afinidade ao receptor SSTR2 muito maior do que o utilizado comercialmente hoje, é facilmente radioiodado e possui biodistribuição favorável para diagnóstico e terapia devido à presença do quelante DOTA. Estudamos a influência de vários fatores na pureza radioquímica do composto marcado além da estabilidade da marcação e biodistribuição em camundongos *Swiss* e *Nude*, normais e com tumor de células AR42J, além da estimativa de dose absorvida. Observamos fácil e estável radioiodação do peptídeo à razão molar peptídeo/radioiodo (¹³¹I) de 2,73, que gerou espécie radioquímica com tempo de retenção de 22,7 minutos na cromatografia líquida de alta eficiência e que apresentou biodistribuição e dosimetria favoráveis para a realização de imagens e terapia dos pacientes com tumores neuroendócrinos, ao contrário do que dados antigos da literatura mostravam nos compostos radioativos sem quelante associado. Outras razões molares não se mostraram eficientes, com outras espécies radioquímicas e biodistribuição desfavorável. Um estudo dosimétrico em pacientes com tumores neuroendócrinos pode ser realizado num futuro próximo.

**LABELING OF THE PEPTIDE DOTA-TYR³-OCTREOTATE WITH RADIOIODINE
AND BIODISTRIBUTION AND AR42J NEUROENDOCRINE TUMOR AFFINITY
STUDY IN MICE**

Lúcio Takeshi Nagamati

ABSTRACT

Neuroendocrine tumors are rare and affect mainly the gastrointestinal tract but other systems are also affected like the skin, lungs and the nervous system. They are rich in type 2 somatostatin (SM) receptors (SSTR2) and may secrete hormones in excess. Synthetic SM derivative peptides are of great utility because presented bigger half life when compared to SM and can be used to clinical improvement of these patients due to its tumoral inhibitory action. The labeling of these peptides with radioisotopes allowed the acquisition of images with favourable cost-efficiency relationship and use in therapy. The peptide, DOTA-Tyr³-octreotate (DOTATATE), has much more affinity for the SSTR2 receptor than the peptide commercially used nowadays, is easily radioiodinated and has a favourable biodistribution for diagnosis and treatment due to the presence of the chelator DOTA. We have studied the influence of various factors on the radiochemical purity of the labeled compound as labeling stability, absorbed dose estimation and biodistribution in normal and AR42J cell tumor-bearing *Swiss* and *Nude* mice. We observed easy and stable peptide radioiodination at peptide/radioiodine (¹³¹I) ratio of 2.73 that produced a radiochemical species with retention time of 22.7 minutes at high performance liquid chromatography and presented a favourable biodistribution and dosimetry for imaging and therapy of patients with neuroendocrine tumors, just the opposite result observed the radioiodinated compounds without a chelator as described in the literature. Other molar peptide/radioiodine ratios did not showed good results, with various radiochemical species and unfavourable biodistribution. A possible dosimetric study in patients with neuroendocrine tumors may be carried out in the near future.

SUMÁRIO

	Página
1) INTRODUÇÃO	8
1.1) Terapia com análogos da somatostatina não radiomarcados.....	13
1.2) Uso diagnóstico dos análogos da somatostatina radiomarcados nos tumores neuroendócrinos.....	13
1.3) Terapia dos tumores neuroendócrinos com análogos da somatostatina radiomarcados	20
2) OBJETIVOS	24
3) MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1.1) Materiais.....	25
3.1.2) Reagentes.....	26
3.2) Métodos.....	26
3.2.1) Introdução.....	26
3.2.2) Marcação do peptídeo com ^{131}I	27
3.2.3) Determinação da pureza radioquímica e purificação.....	28
3.2.4) Estudos de estabilidade de marcação.....	29
3.2.5) Estudos de distribuição biológica.....	29
3.2.6) Estudo de dose absorvida (MIRDOSE3).....	32
4) RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1) Estudo da influência dos diferentes parâmetros de marcação na pureza radioquímica do composto marcado.....	34
4.1.1) Estudo da influência da massa do peptídeo na pureza radioquímica.....	34
4.1.2) Estudo da influência da atividade de ^{131}I na pureza radioquímica.....	35
4.1.3) Estudo da influência do tempo de reação na pureza radioquímica.....	37
4.1.4) Estudo da influência da razão molar peptídeo / radioiodo na pureza radioquímica.....	37

4.2) Marcações com Iodogen.....	42
4.2.1) Estudo da influência da atividade de ¹³¹ I e massa de Iodogen na pureza radioquímica.....	42
4.2.2) Estudo da influência da razão molar peptídeo/radioiodo na pureza radioquímica.....	43
4.3) Estudo da eficiência da purificação com Sep-Pack®	44
4.4) Resultados dos controles de CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese.....	46
4.5) Estabilidade da marcação.....	49
4.6) Estudos de biodistribuição.....	51
4.7) Estudos de dose absorvida (MIRDOSE 3).....	62
5) CONCLUSÕES.....	64
6) ANEXO A - <i>Abreviaturas utilizadas</i>.....	65
7) ANEXO B - <i>Lista de Figuras</i>.....	66
8) ANEXO C - <i>Lista de tabelas</i>.....	68
6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

1) INTRODUÇÃO

Em 1902 a descoberta por William Bayliss e Ernst Henry Starling em Londres que uma substância química de um tecido intestinal, mais precisamente o epitélio do duodeno e jejuno, era capaz de estimular a secreção das glândulas pancreáticas, revolucionou a ciência biológica provando que a função dos órgãos poderia ser regulada não só por nervos, mas também uma substância denominada por eles de secretina [1].

A palavra hormônio deriva do grego “hormon” e significa “provoco atividade”. Foi primeiramente usada em 1905 por Ernest H. Starling, após sugestão do Dr William B. Hardy, para denominar toda a classe de mensageiros químicos como a secretina [2].

Definidos etimologicamente, os hormônios são reguladores de uma série de funções do nosso corpo, sem as quais nossa vida não seria possível. Porém, quando estas substâncias agem de forma desequilibrada, ocorre uma série de agravos à saúde, incluindo risco de morte em alguns casos.

Há três tipos de hormônios:

- 1) Os esteróides, com estrutura química similar ao colesterol,
- 2) Os derivados do aminoácido tirosina; são os hormônios tireoidianos e da medula da adrenal,
- 3) Os peptídeos compõem todos os outros hormônios.

Também em 1905 o Dr Edkins descobriu a gastrina, abrindo caminho para uma maior compreensão da fisiologia digestória [2].

Talvez a mais famosa contribuição para a endocrinologia ocorreu em 1921 com a descoberta da insulina pelo Dr Frederick Banting e pelo Dr Charles Best, da Universidade de Toronto, que conduziram seus experimentos num cão tornado diabético cirurgicamente e mantido vivo com injeções periódicas de insulina [1].

Os tumores neuroendócrinos originam-se nos tecidos do corpo humano que derivam das células da crista neural, e o tipo específico da secreção endócrina de cada tumor depende de sua origem embriológica, como mostrado na FIG.1 [3].

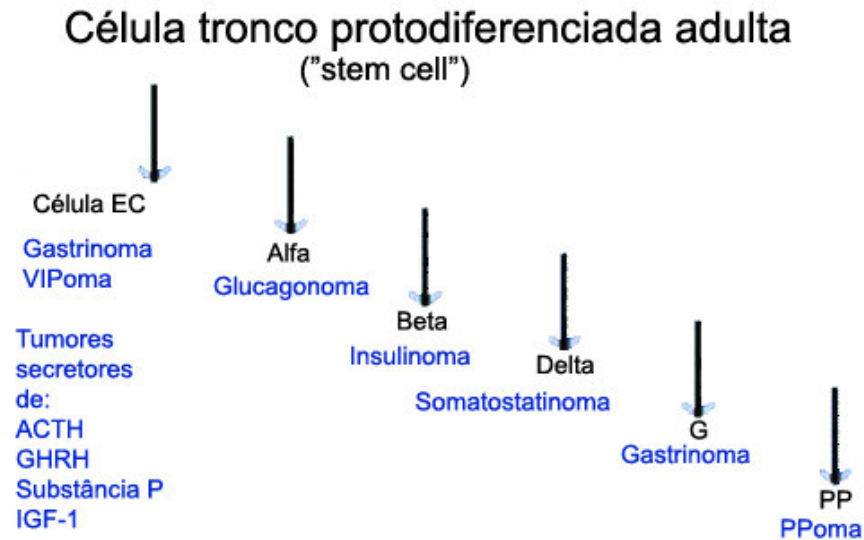


FIGURA 1 - Diferentes origens embrionárias geram preferencialmente determinados tipos de neoplasia

As células dos tumores neuroendócrinos geralmente são especializadas em secretarem seus produtos na circulação sangüínea por meio de grânulos neurosecretores (FIG.2).

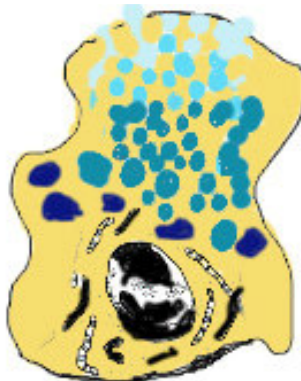


FIGURA 2 - Grânulos neurosecretores em célula acinar do pâncreas

Os tumores neuroendócrinos são raros, com incidência variando entre 2 e 8,4 / 100000 habitantes [4] e localizam-se freqüentemente no pâncreas pela conjugação de diferentes células secretoras presentes (FIG.3). Entretanto, há vários tipos de tumores neuroendócrinos, como o gastrinoma, de localização gástrica, o carcinoma medular, na tireóide, o carcinoma de células Merckel, na pele, o feocromocitoma, nas adrenais, o carcinoma de pequenas células, nos pulmões e até mesmo os tumores carcinóides de localização tipicamente no trato gastrointestinal [5].

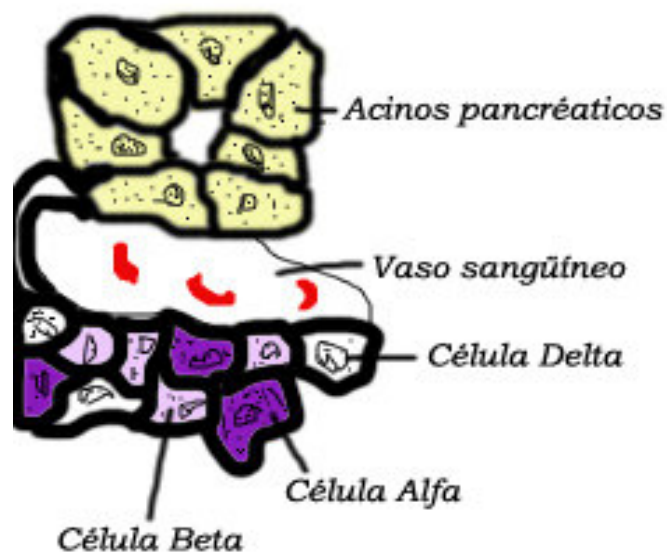


FIGURA 3 - Anatomia fisiológica do pâncreas

Os tumores neuroendócrinos foram descritos há mais de 100 anos atrás por Lubarsh mas o termo “karzinoide”, que nomeia o tumor carcinóide atualmente, só foi cunhado em 1907 por Oberndorfer [4].

Eles causam grande morbidade aos pacientes pela produção excessiva de hormônios e neurotransmissores como a somatostatina (SM), glucagon, insulina, peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e gastrina. Ao todo mais de 30 peptídeos regulatórios já foram identificados dentro das células destes tumores [5].

Os sinais e sintomas do paciente variam muito e incluem hipersecreção gástrica de ácido, fibrose mesentérica e cardíaca e necrose da pele. Alguns

pacientes podem ainda sofrer pela síndrome carcinóide, caracterizada por grave diarreia, hipotensão e eritema cutâneo [5].

Vários tumores em animais e humanos expressam receptores para SM. Cinco subtipos de receptores para SM humanos foram caracterizados e todos são proteínas acopladas à proteína G típica. Todos os membros naturais da família da SM ligam-se aos 5 subtipos de receptores com afinidade igual ou similar, mas os tumores neuroendócrinos frequentemente expressam muitos receptores do tipo 2 (SSTR2) (FIG.4) [6].

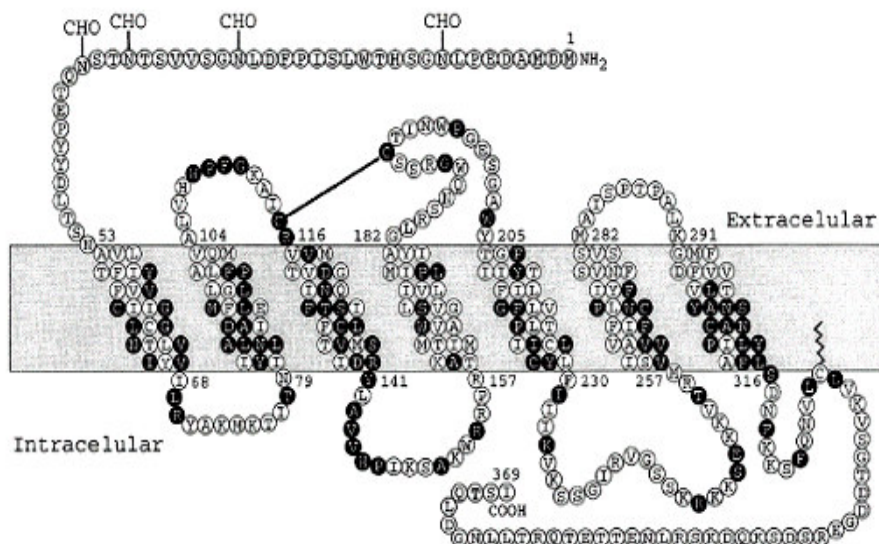


FIGURA 4 - Orientação do receptor SSTR2 na membrana plasmática [6]

O primeiro tumor neuroendócrino descrito em 1955 foi o gastrinoma, pelo Dr Zollinger e pelo Dr Ellison, que descreveram a Síndrome de Zollinger-Ellison [5].

A partir desta data, seguiram-se as descobertas do peptídeo intestinal vasoativo, ou VIP, em 1972 [7], da somatostatina em 1973 [8], dentre outros, até o uso na Medicina Nuclear dos peptídeos análogos da somatostatina em 1997 para o diagnóstico e a terapia dos tumores neuroendócrinos, sendo o DTPA-octreotídeo-¹¹¹In, ou Octreoscan®, o primeiro deles [9] (FIG.5).

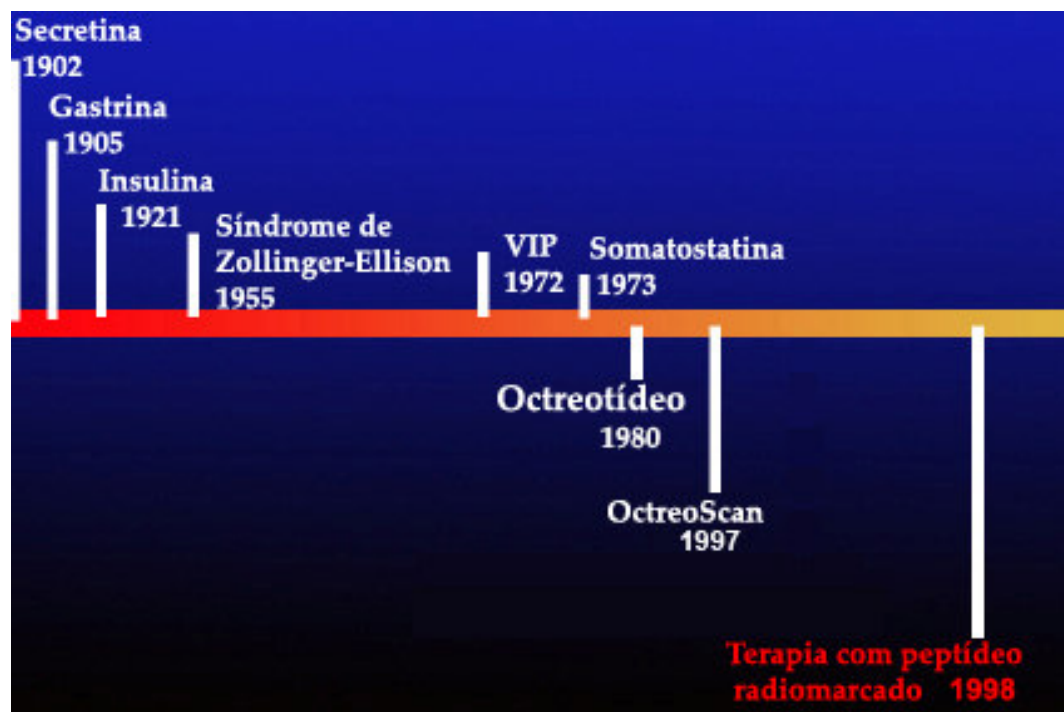


FIGURA 5 - Linha do tempo mostrando a evolução das pesquisas até o desenvolvimento da terapia com peptídeo radiomarcado em 1998

Os membros da família da SM exercem efeito inibitório em um grande espectro de funções fisiológicas, incluindo a secreção hormonal ou mitoses [5]. A somatostatina age ligando-se aos receptores de somatostatina, presentes em 80% dos tumores neuroendócrinos. A ativação destes receptores resulta na inibição da adenilciclina, menor condutância dos canais de cálcio voltagem sensíveis, ativação dos canais de potássio e estimulação da atividade da fosfatase de tirosina [4].

Após ligação em seu receptor, ocorre a inibição da liberação do hormônio de crescimento (GH), glucagon e insulina, porém mais fortemente do GH, por haver diferentes receptores da SM para cada secreção hormonal. A inibição do GH por sua vez limita a produção do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (ou IGF-1), com inibição da angiogênese e proliferação celular [10].

Utilizam-se análogos sintéticos da SM, quimicamente modificados, na terapêutica dos tumores neuroendócrinos pois o peptídeo endógeno possui meia vida plasmática muito curta, de aproximadamente 3 minutos, sendo portanto de difícil utilização. O octreotídeo é um análogo sintético da SM com meia vida

plasmática de 90 minutos que freqüentemente alivia os sintomas dos pacientes, mesmo quando o tumor não foi adequadamente controlado pela cirurgia ou ablação.

1.1) Terapia com análogos da somatostatina não radiomarcados

Após a administração do octreotídeo observa-se regressão tumoral em alguns pacientes. Como exemplos de aplicações do octreotídeo na terapia de tumores são citados o glucagonoma, insulinoma, gastrinoma e tumor carcinóide [5].

Os análogos da somatostatina são altamente eficazes em aliviar os sintomas dos tumores carcinóides, ocorrendo melhora dos sintomas em até 88% dos casos [4].

Pacientes com acromegalia têm sido beneficiados mais com o octreotídeo do que com somente a bromocriptina, um inibidor da secreção da prolactina. O tamanho tumoral por vezes chega a diminuir à metade com o octreotídeo, que é particularmente eficaz para melhorar a cefaléia nestes casos [10].

O octreotídeo também controla a secreção hormonal em alguns pacientes com adenomas de hipófise secretores de corticotrofina e, em pacientes aidéticos com diarréia crônica, há 19% de resposta objetiva na redução do volume fecal e qualidade de vida [10].

Finalmente, o octreotídeo é muito eficaz nos casos de sangramento de varizes esofágicas e, juntamente com a SM, é a única modalidade terapêutica tão eficaz quanto a escleroterapia, mas que confere maior sobrevida aos pacientes [11].

1.2) Uso dos análogos da somatostatina radiomarcados no diagnóstico de tumores neuroendócrinos

A medicina nuclear utiliza como ferramenta traçadores radioativos para a aquisição de imagens cintilográficas planares em câmara-gama ou por tomografia computadorizada por emissão de fóton único ("Single Photon Emission

Computed Tomography” - SPECT) ou ainda por emissão de pósitrons (“Positron emission tomography – PET”). Moléculas marcadas com radionuclídeos específicos constituem-se em radiofármacos que possibilitam a visualização de órgãos e sistemas do organismo, oferecendo informações anatômicas e funcionais. Em muitos cânceres observa-se um aumento da expressão de receptores celulares, sendo estes alvos atrativos para imagem de tumores.

No desenvolvimento de radiofármacos para diagnóstico e terapia, baseados na interação com receptores de somatostatina, vários análogos de somatostatina foram avaliados.

Os primeiros estudos utilizaram octreotídeo-Tyr-¹²³I e foram observadas algumas desvantagens: era rapidamente extraído da circulação sanguínea pelo fígado, o que diminuía a biodisponibilidade do traçador para os receptores tumorais e prejudicava a detecção de tumores no fígado ou próximos a ele [12].

Bakker e colaboradores demonstraram também que após 3 horas da injeção ocorria degradação progressiva do octreotídeo-Tyr-¹²³I, dificultando muito sua utilização [13].

A partir daí, o uso diagnóstico de análogos da SM radioiodados foi demonstrado em alguns pacientes com carcinoma de pequenas células [14], porém sem maior aprofundamento de sua utilidade pois já em 1992 um estudo comparativo entre o octreotídeo-Tyr-¹²³I e o octreotídeo acoplado com o quelante DTPA e marcado com o isótopo ¹¹¹In, revelou a superioridade deste, relacionada à facilidade de marcação e estabilidade *in vivo* [15].

Por outro lado, a presença do resíduo de tirosina (Tyr) no Tyr³-octreotídeo garante a possibilidade de incorporação do radioiodo ao peptídeo por via direta, ou seja, introdução do radioiodo no anel fenólico do resíduo de tirosina, utilizando-se procedimentos rápidos de marcação.

Para a obtenção de moléculas marcadas com um radioiodo podem ser utilizadas várias técnicas:

- 1) Troca isotópica ou substituição nucleofílica: em solvente, em fusão, catalisada por cobre, por troca com bromo. Muitas destas técnicas não são usadas hoje em dia.

2) Substituição eletrofílica aromática: constitui-se em um dos melhores métodos de radioiodação. Há a necessidade de um agente oxidante, como a Cloramina T, o Iodogen ou enzimas oxidativas. Este foi o método escolhido para o trabalho atual por propiciar bons resultados em proteínas com resíduos anelares, histidina ou tirosina.

3) Iodação indireta: utiliza grupos prostéticos para radioiodação de proteínas sem resíduos anelares, histidina ou tirosina.

Dentre os isótopos radioativos de iodo, o ^{123}I é adequado para uso em diagnósticos, possibilitando aquisição de imagens tomográficas do tipo SPECT, já que é um isótopo emissor gama com energia de 159 keV. Por outro lado, o ^{131}I pode ser usado tanto para diagnóstico quanto terapia. Entretanto, a utilidade terapêutica de análogos da SM radioiodados têm sido limitada porque vários estudos foram realizados com peptídeos radioiodados que apresentaram biocinética ruim, com deiodação *in vivo* e dosimetria resultante desfavorável. Os mesmo estudos relatam que a radioiodação de análogos de SM freqüentemente envolve múltiplos passos de marcação e necessidade de purificação do produto final [16,17].

Assim, um progresso adicional no campo dos análogos da SM está no desenvolvimento de quelantes que possibilitaram a marcação dos derivados da SM com radionuclídeos metálicos ou lantanídeos como ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e ^{90}Y . Dentre os quelantes macrocíclicos propostos, o anidrido cíclico do ácido dietilenotriamino pentaacético (cDTPA), e o ácido 1,4,7,10 tetraazacidodecano-N,N',N'',N''', tetraacético (DOTA) vêm sendo bastante utilizados para marcação do octreotídeo e outros peptídeos derivados da SM [6,15,18,19].

Vários derivados da SM, como o Vapreotídeo (RC-160), o lanretídeo e o octreotídeo (TAB.1) [20], já foram marcados com diferentes radionuclídeos utilizando-se diferentes quelantes, verificando-se diferentes especificidades para os diversos subtipos de receptores para SM (TAB.2) [6, 15, 17].

TABELA 1: Estruturas de análogos sintéticos da somatostatina

Peptídeo	Estrutura de aminoácidos
Octreotídeo	D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr(ol)
Lanreotídeo	β -Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH ₂
RC-160	D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Trp- NH ₂
Tyr ³ -octreotato	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr(OH)

Tais derivados, apesar de apresentarem diferenças sutis na estrutura de aminoácidos, apresentam afinidade distinta por diferentes subtipos de receptores para SM. A natureza do agente quelante, bem como o elemento radioativo utilizado, parecem interferir no coeficiente de afinidade (TAB.2), e no perfil geral de biodistribuição biológica, apresentando diferença, particularmente, na captação hepática e renal [15, 17,19].

Assim, por exemplo, o peptídeo DOTA-Tyr³-octreotato (DOTATATO) apresenta afinidade aproximadamente 14 vezes maior pelo receptor SSTR2 do que o já consagrado DTPA-octreotídeo-¹¹¹In (TAB.2) [18]. É notório também que a associação do quelante DOTA ao Tyr³-octreotato confere vantajosa afinidade pelo SSTR2 em relação ao DTPA-Tyr³-octreotato (TAB.2).

TABELA 2: Afinidade de análogos da somatostatina pelo receptor SSTR2

Peptídeos	Perfis de afinidade (IC ₅₀) para o receptor SSTR2
Somatostatina-28	2,7 ± 0,3
Octreotídeo	2,0 ± 0,7
DTPA-octreotídeo	12,0 ± 2,0
DTPA-octreotídeo- ¹¹¹ In	22,0 ± 4,0
DOTA-octreotídeo	14,0 ± 3,0
DTPA-Tyr ³ -octreotato	3,9 ± 1,0
DOTA-Tyr ³ -octreotídeo	14,0 ± 3,0
DOTA-Tyr ³ -octreotato	1,5 ± 0,4
DOTA-Tyr ³ -octreotato- ⁹⁰ Y	1,6 ± 0,4

Outro estudo comparativo entre o Tyr³-octreotídeo-¹²³I e o DTPA-octreotídeo-¹¹¹In mostrou que 60% do peptídeo radioiodado é eliminado intacto nas vias biliares, ao passo que somente 2% do DTPA-octreotídeo-¹¹¹In foi eliminado na bile [19]. Porém, este estudo comparou o octreotídeo radioiodado sem associação com um quelante com o octreotídeo ligado ao DTPA.

Na aplicação de derivados da SM para o desenvolvimento de radiofármacos destinados ao diagnóstico e tratamento de tumores, o peptídeo sintético octreotídeo foi inicialmente modificado com a introdução de um resíduo de tirosina (Tyr) para marcação com radioiodo. Mas foi o peptídeo marcado com o ¹¹¹In, e associado ao DTPA, que resultou em características de distribuição biológicas mais interessantes para o diagnóstico de tumores do tipo neuroendócrino [20].

O radiofármaco DTPA-octreotídeo-¹¹¹In (Octreoscan[®], Mallinckrodt) foi oficialmente introduzido em 1992 e seu uso para visualizar vários tumores e

tecidos com receptores para SM está perfeitamente aceito [9]. Inúmeros tipos de tumores e doenças têm sido estudados com cintilografia com Octreoscan® e estudos intensos têm sido realizados nos tumores neuroendócrinos gastroenteropancreáticos [21,22,23,24], mas também em outros tumores como os cerebrais [25], melanomas [26], pulmão [27] e mama [28].

Já está descrito que o Octreoscan® pode visualizar praticamente todos os paragangliomas, diagnosticando 36% mais lesões do que a radiologia convencional, sendo portanto técnica mais abrangente do que esta no manejo de paciente com este tipo de tumor [29].

Kwekkeboom e colaboradores demonstraram a relação custo-eficácia favorável da cintilografia com Octreoscan® num estudo com 150 pacientes com tumores neuroendócrinos e concluíram que somente nos pacientes com carcinoma medular da tireóide seu uso não é vantajoso. Em todos os outros tumores estudados uma boa relação custo-eficácia foi demonstrada, com variação no benefício de acordo com o tipo histológico: nos tumores carcinóides a associação da cintilografia com análogos da SM com a radiologia convencional resultou em maior sensibilidade, mostrando lesões antes não detectadas; nos paragangliomas a cintilografia novamente demonstrou uma multicentricidade de lesões antes ignoradas pela tomografia computadorizada (TC); nos gastrinomas, a maior sensibilidade foi obtida com a associação da tomografia computadorizada e a cintilografia; já em pacientes com insulinoma, seu uso só se justificou quando a TC falhou em demonstrar o tumor [30].

Um grupo de pesquisadores na França também averiguou a utilidade da cintilografia com análogos da SM em 160 pacientes com tumores gastroenteropancreáticos e concluiu que o estadiamento mudou em 38% dos casos e a estratégia cirúrgica mudou em 40% dos casos devendo a técnica ser adotada sistematicamente para o estadiamento e decisão terapêutica [31].

Outra utilidade do Octreoscan® é seu uso intra-operatório para detecção de lesões tumorais pequenas, através de sonda de detecção (“gamma probe”), pois muitas lesões passam despercebidas do cirurgião, que detectou somente 44% delas. A sonda de detecção mostrou lesões não palpadas pelo cirurgião de até 5 mm, no caso uma metástase linfonodal [32].

Num trabalho mais completo e recente, realizado nos Institutos Nacionais de Saúde dos Estados Unidos da América, comparou-se o uso da TC, ressonância magnética, angiografia e ultrassom com a cintilografia para receptores de SM e concluiu-se que esta deve ser a modalidade diagnóstica de escolha inicial nos tumores gastroenteropancreáticos neuroendócrinos devido ao impacto na condução clínica dos casos [33].

O fator prognóstico mais importante nos tumores gastroenteropancreáticos é a presença de metástases hepáticas. O diagnóstico destas lesões pode ser feito com maior sensibilidade utilizando-se imagens tomográficas, tipo SPECT, da cintilografia para receptores de somatostatina do que com a radiologia convencional: 92,3% contra 80%, respectivamente. Além disso, em 9% dos casos somente as imagens SPECT demonstraram lesões hepáticas e em 19% dos casos mudaram a classificação e manejo dos pacientes [34].

Contudo, é interessante mencionar que gradativamente descobriram-se casos de falsos positivos da cintilografia para receptores de somatostatina: doenças tireoidianas, mamárias e granulomatosas, cistos renais, baço acessório e cicatrizes cirúrgicas [35].

Porém, devido às características físicas e econômicas desfavoráveis do ^{111}In em relação ao $^{99\text{m}}\text{Tc}$ para a realização de imagens, desenvolveram-se vários radiofármacos com este radioisótopo. Os peptídeos desenvolvidos inicialmente para este fim, P587 e P829, tiveram captação no tumor de células AR42J, em %dose/grama, mais de 40% maior do que o Octreoscan[®], isto é, 4,1% e 4,9% dose/grama, respectivamente, contra 2,9% dose/grama [36].

Obviamente, a captação dos peptídeos varia de acordo com a concentração de receptores de SM no tumor. Fazendo-se a média dos valores reportados por Breeman e colaboradores têm-se aproximadamente 97% dos gastrinomas, 85% dos tumores carcinóides e 93% dos insulinomas expressando o SSTR2. Porém, em mais ou menos 50% dos casos de insulinoma, muitos receptores não se ligam ao DTPA-octreotídeo- ^{111}In , podendo os estudos serem desapontadores em alguns pacientes [10, 37].

Para o diagnóstico de tumores neuroendócrinos uma comparação entre o DTPA-octreotídeo-¹¹¹In e o hidrazinonicotinil-Tyr³-octreotídeo-^{99m}Tc (HYNIC-Tyr³-octreotídeo-^{99m}Tc) mostrou ser este último superior, com valor preditivo positivo de 65,9%, contra 51,2%, valor preditivo negativo de 78,1%, contra 63,4% [38].

Por outro lado, o ¹³¹I é um radioisótopo produzido e/ou processado no Brasil há mais de 30 anos, com boa aceitação mercadológica, distribuição bem implantada em nível nacional e que possui características físicas favoráveis para uso tanto terapêutico quanto diagnóstico. Sua utilização na marcação de um peptídeo derivado da SM ligado a quelante, como o DOTA, além de supostamente conferir maior afinidade pelo receptor SSTR2, poderia favorecer a excreção via renal do radiofármaco e melhorar sua biodistribuição, possibilitando características favoráveis para a obtenção de imagens e realização de terapia de tumores neuroendócrinos. Outro isótopo de iodo, o ¹²³I, também pode ser utilizado na marcação de peptídeos, apresentando características físicas desejáveis para aplicação diagnóstica.

Podemos lembrar também que há 60 anos o ¹³¹I é utilizado eficazmente na terapia de pacientes com câncer de tireóide, sendo o primeiro tratamento realizado no estado do Missouri nos EUA [39].

Finalmente, não há na literatura científica pesquisada trabalhos mostrando a marcação do peptídeo DOTA-Tyr³-octreotato com o ¹³¹I.

1.3) Terapia dos tumores neuroendócrinos com análogos da somatostatina radiomarcados

Nos casos em que há somente um tumor neuroendócrino e operável a terapia de escolha é a cirurgia.

Porém, como já acordado no tópico sobre diagnóstico com análogos da somatostatina radiomarcados, algumas vezes ocorre a multicentricidade de tumores. Em alguns casos, nem todos são ressecáveis ou o são mas de maneira muito difícil de ser feita eficientemente, pela localização anatômica, por exemplo.

Assim, nestes casos há indicação clara para a terapia dos tumores neuroendócrinos com análogos da somatostatina radiomarcados.

Inicialmente, demonstrou-se a viabilidade do uso terapêutico dos análogos da SM por meio de um estudo *in vitro* da internalização do derivado marcado com ^{111}In por células de tumores neuroendócrinos. Após a incubação das células tumorais com Octreoscan[®] demonstrou-se que até 6 horas aproximadamente 50% de sua atividade intracelular foi mantida e a atividade intratumoral do ^{111}In diminuiu muito pouco até 42 horas [40].

Um estudo realizado num paciente com tumor carcinóide ileal, que recebeu o Octreoscan[®], revelou ótima relação de atividade tumor/fundo: 150 para o tumor primário e de 400 a 650 para as metástases hepáticas. Após tratamento com Octreoscan[®] houve melhora sintomática e redução de 31% dos níveis séricos do marcador tumoral ácido 5-hidroxiindoleacético (5-HIAA), contudo não ocorreu diminuição do tamanho tumoral [41].

Em 1998 foi anunciado outro radiofármaco com vistas à terapia: o DOTA-*lanreotídeo*- ^{111}In , que apresentou dose absorvida tumoral significativamente maior do que o Octreoscan[®] [42].

Contudo, peptídeos marcados com ^{111}In não são ideais para radioterapia receptora por causa dos elétrons Auger e elétrons de conversão interna, que possuem alcance de 0,02 a 10 μm e 200 a 500 μm , respectivamente, tendo assim penetração tecidual muito pequena [43].

O uso terapêutico de emissores beta de energia inferior a 1 MeV, como o ^{177}Lu , ^{153}Sm e ^{131}I tem sido postulado, já que possuem energia suficiente para matar a célula tumoral alvo, não sendo tão danosos aos tecidos não alvo.

O isótopo radioativo ^{90}Y , com energia β^- de 2,3 MeV e meia vida de 64 horas, também tem sido postulado para este propósito. Estudos realizados com o derivado DTPA-*octreotídeo*- ^{90}Y demonstraram que o composto não é estável, resultando em toxicidade hematopoiética *in vivo* à medida que o ^{90}Y é liberado do complexo e captado pelo esqueleto.

Portanto, para o desenvolvimento de um peptídeo conjugado a um quelante para marcação com radiotraçador, é crucial que o radiometal possa ligar-se ao quelante e apresentar alta estabilidade *in vitro* e *in vivo*, para reduzir a toxicidade hematopoiética devido à irradiação da medula.

De forma geral, os análogos da SM conjugados ao DTPA ou DOTA apresentam características de ligação e biodistribuição favoráveis, com alta captação e retenção nos órgãos alvo e são candidatos promissores para terapia radionuclídica baseada em receptores para peptídeos [44,45,46].

Assim, um análogo da SM foi desenvolvido, DOTA-Tyr³-octreotídeo (DOTATOC), que pode ser marcado de forma estável com o radionuclídeo para diagnóstico ¹¹¹In e para terapia ⁹⁰Y [46].

Estudos utilizando DOTATOC-⁹⁰Y no tratamento de pacientes com tumores neuroendócrinos revelaram-se convincentes em termos de eficácia da terapia, mas a toxicidade renal e mielossupressão deste radiofármaco são dose-limitantes e observadas em alguns pacientes que receberam altas doses cumulativas (maiores que 7400 MBq/m²) [46,47]. Além disso, o alcance de penetração tecidual do ⁹⁰Y (aproximadamente 12 mm) não é muito favorável para tumores pequenos e disseminados, para os quais a maior parte da dose de radiação do ⁹⁰Y será transferida para os tecidos sadios adjacentes [46].

A superioridade clínica do DOTA-Tyr³-octreotato, comparado com o Octreoscan[®], foi também demonstrada por Kwekkeboom e colaboradores: o DOTA-Tyr³-octreotato-¹⁷⁷Lu apresentou captação tumoral quatro vezes superior [48].

Medidas para reduzir especialmente a toxicidade renal vêm sendo estudadas, como a utilização de infusões de aminoácidos, minutos antes da administração do radiofármaco [49,50]. De fato, a remissão completa de tumores poderia ser obtida com um grande número de agentes terapêuticos se os efeitos colaterais dose-dependentes pudessem ser negligenciados. O conhecimento da reabsorção tubular de peptídeos e, conseqüentemente, da radiotoxicidade renal na terapia com radiopeptídeos não é novidade, obrigando a adoção de medidas para proteção dos rins [51,52,53].

Mesmo assim, de forma geral, tem-se mostrado grande eficiência dos análogos da somatostatina marcados na terapêutica de tumores neuroendócrinos [54,55,56,57,58], como no trabalho de Kwekkeboom e colaboradores que comparou a eficiência terapêutica do DOTA-Tyr³-octreotato-¹⁷⁷Lu, DTPA-octreotídeo-¹¹¹In e do DOTA-Tyr³-octreotídeo-⁹⁰Y em tumores neuroendócrinos e

verificou que o composto marcado com ^{111}In apresentou a menor porcentagem de respostas parciais e menor número de estabilização da doença. Já a porcentagem de pacientes que evoluíram com resposta completa ou parcial com os compostos marcados com o ^{177}Lu e o ^{90}Y é de até 33% [59].

Uma avaliação toxicológica e dosimétrica do composto DOTA-Tyr³-octreotato- ^{177}Lu foi realizada em modelo tumoral animal (células CA 20948) e determinou que o órgão dose-limitante é o pâncreas, seguido da glândula adrenal. O estudo demonstrou que o radiofármaco é um agente efetivo para a terapia em níveis que mostraram toxicidade mínima [60].

Já o radionuclídeo por nós escolhido, o ^{131}I , possui potencial terapêutico, apresentando penetração tecidual de aproximadamente 2 mm, emissões beta de 600 e 800 keV - portanto com energia semelhante a do ^{177}Lu - e tempo de meia-vida físico de cerca de 8,02 dias, também próximo ao do ^{177}Lu , que é de 6,71 dias, que já teve sua utilidade terapêutica demonstrada quando usado com análogos da somatostatina. O alcance das partículas β^- do ^{131}I pode inclusive tornar a resposta terapêutica ao DOTA-Tyr³-octreotato- ^{131}I não tão dependente de uma intensa internalização como ocorre com o DTPA-octreotide- ^{111}In [43].

O peptídeo utilizado em nosso trabalho, o DOTA-Tyr³-octreotato, pode ser marcado com o radioiodo para fins terapêuticos, ao mesmo tempo em que o agente quelante DOTA [61], parece aumentar grandemente a sensibilidade do traçador aos receptores de somatostatina [45] podendo ainda conferir menor eliminação hepática. Neste caso, o agente quelante não seria importante para a ligação do elemento radioativo, já que a reação de iodação do peptídeo ocorre por via direta, ou seja, introdução do radioiodo no anel fenólico do resíduo de tirosina.

Finalmente, confiamos no modelo de estudo murino porque foram feitas medidas de atividade do DOTA-Tyr³-octreotídeo- ^{111}In no tumor e tecidos normais observando-se biocinética semelhante nos ratos e pacientes com o tumor, o que torna o modelo animal adequado para avaliação da terapia com análogos de somatostatina [62].

2) OBJETIVO

Estudar as condições de marcação, controle de qualidade e purificação do DOTA-Tyr³-octreotato com radioiodo a fim de obter composto com alta pureza radioquímica e estabilidade de marcação e avaliar sua aplicabilidade no diagnóstico e tratamento de tumores neuroendócrinos conduzindo estudos de biodistribuição e dosimetria em camundongos com tumor AR42J.

3) MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1) Materiais

1. Glove-box – destinada às reações de radioiodação, equipada com sistema de exaustão e com instrumentos diversos.
2. Contador automático tipo poço com cristal de NaI(Tl), modelo D5002, cobra II, auto-gamma, Packard[®], EUA.
3. Agitador de tubos tipo *Vortex*, VWR-Scientific, Brasil.
4. Calibrador de doses modelo CRM-35R[®], com câmara de ionização CRC-35R1[®], Capintec[®], Inc, EUA.
5. Balança analítica, Denver Instruments[®], EUA.
6. Cromatógrafo líquido de alta eficiência, Waters[®], EUA, dotado de :
 - * Detetor UV visível, modelo 486.
 - * Detetor de radiação beta e gama, modelo Radiomatic, Packard[®], EUA.
 - * Injetor manual, modelo 600 e bomba de solventes, modelo 600 com degaseificador.
 - * Integrador, modelo 746.
7. Papel cromatográfico Whatman 1, Whatman[®], EUA.
8. Coluna C18 para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), fase reversa, Waters[®], EUA.
9. Mini colunas compactadas para purificação, Sep-Pack[®], Waters[®], EUA.
10. Vidrarias em geral.
11. Eletroforese com fonte de alta tensão estabilizada, Pharmacia[®] / Pfizer[®], EUA.
12. Sistema purificador de água, modelo Milli-RX45, Millipore[®], EUA.
13. Filtros descartáveis de 0,22 µm e 0,45 µm de poro, Millipore[®], EUA.
14. Software MIRDOSE 3, EUA.
15. Camundongos *Nude* e *Swiss* adultos – fornecidos pelo biotério do IPEN.
16. Células de tumor AR42J murino, ATCC[®], EUA.

3.1.2) Reagentes

- 1) Solventes diversos – grau analítico e grau CLAE, Sigma Aldrich[®], EUA.
- 2) Reagentes diversos – grau p.a. Sigma Aldrich, EUA.
- 3) Solução de Na¹³¹I, MDS Nordion, Canadá, processado no Centro de Radiofarmácia/IPEN.
- 4) Cloramina T (sal sódico de N-cloro 4 metil benzeno sulfonamida trihidratado), grau de pureza p.a., Merck, Brasil.
- 5) Iodogen (1,3,4,6-tetracloro-3 α ,6 α difenilglicouril), Sigma Aldrich, EUA.
- 6) Peptídeo DOTA-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH (DOTA-Tyr³-octreotato) de pureza superior a 95%, AnaSpec, EUA, e piChem, Áustria.
- 7) Metabissulfito de sódio, grau de pureza p.a., Merck, Brasil.
- 8) Metanol, grau de pureza p.a., Merck, Brasil.
- 9) Diclorometano, Merck, Brasil.
- 10) Nitrogênio gasoso, White Martins, Brasil.
- 11) Meio de cultura F12K, Gibco[®], EUA
- 12) Soro fetal bovino (SFB), Cultilab, Brasil.

3.2) Métodos

3.2.1) Introdução

A metodologia de marcação escolhida foi a substituição eletrofílica por ser método desenvolvido para marcação com proteínas e que fornece produto de marcação alta atividade específica e boa eficiência de marcação.

As condições de marcação estudadas foram escolhidas por afetarem grandemente o resultado da marcação.

Várias pesquisas de desenvolvimento de peptídeos análogos da SM mostraram que o DOTA-Tyr³-octreotato possui afinidade pelo receptor SSTR2 muito maior do que os demais (TAB. 2).

Este peptídeo, por conter o resíduo de tirosina, é substrato para fácil marcação com radioiodo que possui características físicas favoráveis tanto para diagnóstico quanto para terapia, dependendo do isótopo de iodo escolhido.

A opção pela radioiodação adveio das características físicas favoráveis à terapia do ^{131}I , mas também dos aspectos econômico e logístico pois o ^{131}I é produto de reator nuclear e tem sua distribuição já estabelecida em todo país.

3.2.2) Marcação do peptídeo com ^{131}I

Foram otimizadas as condições de marcação do peptídeo DOTA-Tyr³-octreotato com o ^{131}I utilizando-se dois agentes oxidantes, Cloramina T e Iodogen.

Foram estudados os seguintes parâmetros de marcação:

- 1) Massa do peptídeo: 1,5 µg, 10 µg, 30 µg e 50 µg.
- 2) Atividade de ^{131}I : 7,4 MBq (200 µCi), 74 MBq (2 mCi), 111 MBq (3 mCi), 370 MBq (10 mCi), 1850 MBq (50 mCi) e 2775 MBq (75 mCi). Foi utilizado sempre o menor volume possível do ^{131}I para marcação, visando a maior concentração radioativa do radioiodo. Para atividade de até 3 mCi o volume médio utilizado foi entre 5 e 10 µL; para atividades maiores o volume médio do radioiodo foi 20 µL.
- 3) Tempo de reação: 0,5, 1, 3 e 10 minutos para a Cloramina T e 30 minutos para o Iodogen.
- 4) Razão molar peptídeo/radioiodo: 0,045, 0,27, 0,54, 1,82, 2,73, 10,92 e 27,30.
- 5) Agentes oxidantes: Cloramina T e Iodogen.

A marcação do DOTATATO com o $\text{NaI-}^{131}\text{I}$ foi otimizada usando-se o método de substituição eletrofílica aromática e como oxidante para o iodeto foram utilizados a Cloramina T e o Iodogen.

Na condição de marcação padrão usando-se a Cloramina T, uma solução de 10 µg de peptídeo em 40 µL de PBS (solução salina tamponada com fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,5) foi transferida ao frasco de reação. Após a adição da solução de Cloramina T (5µg/5µL) e de 5 a 10 µL de solução de radioiodo (74 a 111 MBq) o frasco foi agitado cuidadosamente e a reação de marcação procedeu por 1 a 3 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição da solução de metabissulfito de sódio (10 µg/5 µL).

As marcações com atividades altas de $\text{NaI-}^{131}\text{I}$ foram avaliadas com 1850 MBq (50 mCi), utilizando-se massa de 50 µg do peptídeo, e com 2775 MBq (75 mCi) para 100 µg do peptídeo.

Para as marcações utilizando-se Iodogen como agente oxidante, tubos impregnados com Iodogen foram previamente preparados da seguinte forma: 1 mg de Iodogen foi dissolvido em 1 mL de diclorometano. Em vários tubos cônicos de polipropileno a mistura foi dispensada em alíquotas de 10 μ L, 30 μ L e 50 μ L que foram em seguida evaporadas à secura em corrente de gás nitrogênio à temperatura ambiente. Após a secura os tubos foram acondicionados em temperatura de aproximadamente -20°C onde mantiveram-se estáveis por 6 meses [63].

Na condição de marcação padrão com o Iodogen, uma solução de 10 μ g de peptídeo em 40 μ L de PBS foi transferida ao frasco de reação contendo 10 μ g de Iodogen preparado conforme descrito anteriormente. Após a adição de 5 a 10 μ L de solução de radioiodo (74 a 111MBq) o frasco foi agitado cuidadosamente e a reação de marcação procedeu por 30 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida retirando-se a mistura de reação do frasco.

A marcação com 370 MBq (10 mCi) também foi estudada utilizando-se 10 μ g, 30 μ g e 50 μ g de Iodogen. As mesmas massas de Iodogen também foram usadas nas marcações com 74 MBq (2 mCi).

3.2.3) Determinação da pureza radioquímica e purificação

Para determinação da pureza radioquímica das marcações foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em colunas do tipo C₁₈ (Waters[®]) - 4,2x50mm, 5 μ m –com detecção UV (230 nm) e de radioatividade (Packard[®]), fluxo de 0,5 mL/minuto com um gradiente linear de 40%-80% de metanol em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5, por 20 minutos e a composição foi mantida por outros 25 minutos. O radioiodo livre também foi determinado por eletroforese horizontal (Pharmacia[®]) utilizando-se papel Whatman 1, tampão barbital 0,05M pH 8,6 e corrente de 300V por 40 minutos.

A purificação do peptídeo marcado foi estudada utilizando-se mini colunas compactadas de matriz C18 (Sep-Pack[®]).

Primeiramente, a coluna C18 foi ativada com uma sequência de solventes: 5 mL de etanol 70%, 5 mL de 2-propanol, e 5 mL de água destilada. Após a aplicação da água retira-se o excedente desta com um pouco de ar

corrente para então colocar-se mais ou menos 100 µL da amostra do produto de marcação.

Para proceder-se à purificação propriamente dita, a coluna C18 foi eluída com 10 mL de água destilada de forma a recolher-se o radioiodo livre num frasco. Posteriormente, o produto de marcação foi eluído com 5 mL de etanol 96% obtendo-se o peptídeo DOTA-Tyr³-octreotídeo-¹³¹I purificado.

3.2.4) Estudos de estabilidade de marcação

Foi estudada a estabilidade da marcação com e sem purificação até 48 horas, para marcações realizadas com as seguintes atividades de ¹³¹I: 74 MBq (2 mCi), 340 MBq (10 mCi) e 1110 MBq (30 mCi), armazenadas à temperatura de 2 a 8° C, realizando-se ensaio de eletroforese.

A estabilidade também foi avaliada mediante incubação em plasma humano de amostras de produtos obtidos utilizando-se condição padrão de marcação para a Cloramina T. Foi avaliada a estabilidade da marcação em três amostras de plasma humano, separado por centrifugação da série vermelha sangüínea.

3.2.5) Estudos de distribuição biológica

Os estudos de distribuição biológica foram realizados de acordo com as normas do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

Foram utilizados 91 camundongos do biotério do IPEN *Swiss* normais e camundongos *Nude* com modelo tumoral, para realização dos estudos de distribuição biológica.

Os animais utilizados eram adultos, pesando aproximadamente 30 g, no caso dos *Swiss*, e 20 g no caso dos *Nude*, sem distinção de sexo. Os animais foram mantidos com água e alimentação à vontade durante a realização dos experimentos.

Nos estudos de biodistribuição não foram utilizados anestésicos e os animais foram sacrificados após decaptação. Amostras de sangue foram recolhidas do plexo orbital utilizando-se capilares volumétricos heparinizados.

Foram realizados estudos de biodistribuição utilizando-se o DOTA-Tyr³-octreotato-¹³¹I marcado pelo método da Cloramina T com as razões molares peptídeo/radioiodo de 0,54 e de 2,73.

Administrou-se 1,11 MBq/0,1 mL (30 µCi/0,1 mL) do radiofármaco na veia caudal de cada animal e após intervalos de 1 hora, 4 horas, 24 horas, 48 horas e 7 dias após a injeção os animais foram sacrificados para retirada dos órgãos de interesse e determinação da contagem correspondente utilizando-se um contador gama do tipo poço (Packard[®]). A porcentagem de captação da dose administrada nos diferentes órgãos foi calculada em função da contagem de um padrão diluído da dose administrada. A dose padrão foi recolhida em seringa, à semelhança das doses administradas nos animais, e adicionada a um balão volumétrico de 10 mL. O volume do balão foi completado com água destilada e 3 alíquotas de 1 mL recolhidas em tubos para determinação da contagem média correspondente.

Células de tumor pancreático de ratos (AR42J) foram utilizadas para desenvolvimento de um modelo tumoral em camundongos *Nude* para estudo da captação do radiofármaco no tecido tumoral.

As células AR42J foram obtidas do ATCC[®], EUA, e cultivadas no meio de cultura F12K suplementado com soro bovino fetal a 10% (v/v), glutamina 1mM, penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100µg/mL em ar humidificado contendo 5% CO₂ a 37°C. Subcultura foi executada empregando-se uma solução de tripsina/EDTA (0,05%,0,02%).

A cultura de células tumoral foi mantida no Centro de Biotecnologia do IPEN sob os cuidados da Dra Kayo Okazaki.

Foram injetadas 3,00 X 10⁶ células na região lombar de cada camundongo e esperou-se o tempo necessário para que o tumor chegasse ao volume aproximado de 1 cm³. Em aproximadamente 1 mês obtínhamos o volume tumoral necessário.

Foi realizado estudo anátomo-patológico com amostras do tumor retirado dos camundongos *Nude* comprovando a presença de células neuroendócrinas com características malignas: arquitetura tecidual anômala,

relação núcleo-citoplasma alterada e abundantes figuras de mitose e apoptose (FIG. 6 e 7).

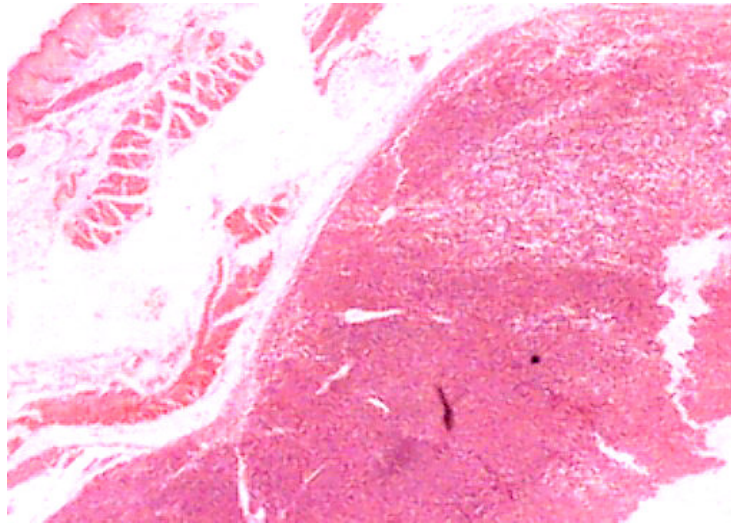


FIGURA 6: Fotografia da lâmina do exame anátomo-patológico mostrando a pele, tecido muscular estriado e o tumor de células AR42J. Nota-se a arquitetura tecidual anômala no tecido tumoral. (Aumento óptico de 60X)

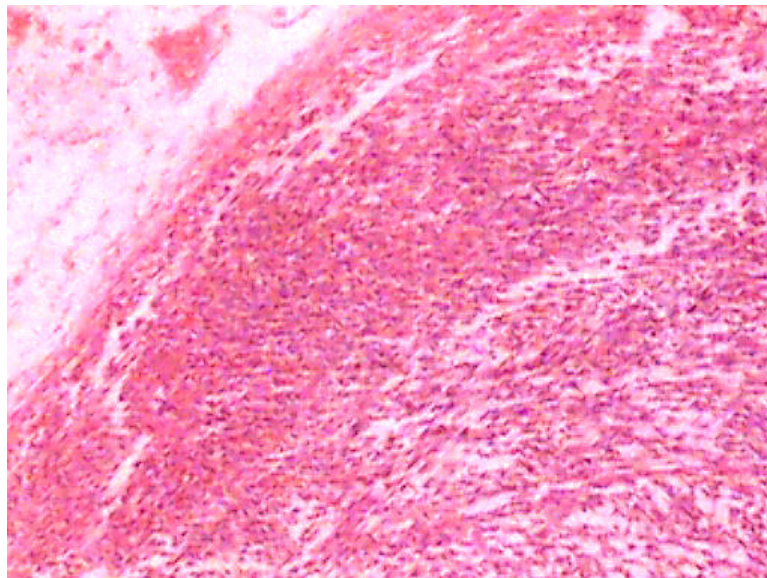


FIGURA 7: Fotografia da lâmina do exame anátomo-patológico mostrando o tumor de células AR42J. Nota-se a arquitetura tecidual anômala no tecido tumoral e relação núcleo-citoplasma alterada. (Aumento óptico de 200X)

Foi calculada a porcentagem dose/órgão dos seguintes órgãos: cérebro, pulmão, coração, baço, fígado, estômago, músculo, rins, tumor, intestinos delgado e grosso, adrenais, pâncreas, sangue total e tireóide. Já para a porcentagem dose/grama não se utilizaram a tireóide e adrenais.

Foram utilizadas as seguintes fórmulas matemáticas para:

1) Cálculo do volume do sangue total (VST) do camundongo (em mL):

$$\text{VST} = \text{peso do camundongo (em gramas)} \times 0,07$$

2) Cálculo do peso da massa muscular total (MT) (em gramas):

$$\text{MT} = \text{peso do camundongo} \times 0,4$$

3) Cálculo da contagem do sangue total (CST) do camundongo (em contagens/minuto (CPM)):

$$\text{CST} = \text{CPM de 1 mL de sangue} \times \text{VST}$$

4) Cálculo da contagem do músculo total (CMT) do camundongo (em CPM)

$$\text{CMT} = \text{CPM de uma amostra de músculo estriado} \times \left(\frac{\text{MT}}{\text{peso da amostra de músculo estriado}} \right)$$

5) Cálculo do padrão real do animal (PR):

$$\text{PR} = \left[\left(\frac{\sum \text{CPM amostras de padrões diluídos}}{\text{número amostras}} \right) \times 10 \right] - \text{CPM do rabo do camundongo}$$

6) Cálculo da porcentagem da dose radioativa do DOTA-Tyr³-octreotato-¹³¹I injetada por órgão (%dose/órgão) do camundongo:

$$\% \text{dose/órgão} = \left(\frac{\text{CPM do órgão}}{\text{PR}} \right) \times 100$$

7) Cálculo da porcentagem da dose radioativa do DOTA-Tyr³-octreotato-¹³¹I injetada por grama do órgão (%dose/grama):

$$\% \text{dose/grama} = \frac{\% \text{dose/órgão}}{\text{peso do órgão}}$$

3.2.6 Estudo de dose absorvida (MIRDOSE 3)

Foi realizada análise dos estudos de biodistribuição do DOTA-Tyr³-octreotato-¹³¹I em camundongos *Nude* com tumor AR42J para a determinação da

dose absorvida em cada órgão, com software MIRDOSE 3, para uma atividade injetada de 0,111 MBq (30 μ Ci.).

4) RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1) Estudo da influência dos diferentes parâmetros de marcação na pureza radioquímica do composto marcado

4.1.1) Estudo da influência da massa do peptídeo na pureza radioquímica

Num primeiro momento estudou-se a influência da massa do peptídeo na pureza radioquímica utilizando-se baixa atividade do ^{131}I para diferentes massas de peptídeo, constatando-se que a utilização da massa de 10 μg do peptídeo seria suficiente para os estudos dos diversos parâmetros de marcação proporcionando a melhor pureza radioquímica dentre as massa estudadas (1,5, 10 e 30 μg) e minimizando os custos relacionados à utilização do peptídeo (TAB.2). Assim, padronizou-se a massa de 10 μg como constituinte da condição padrão de marcação para os demais estudos, levando-se em conta o alto custo do DOTA-Tyr³-octreotato adquirido com grau de pureza elevado.

O estudo dos parâmetros de marcação foram realizados tendo como base as condições padrão de marcação descritas para a Cloramina T e Iodogen no item 3.2.1.

A tabela 3 apresenta o resultado do estudo da variação da massa do peptídeo, mantendo-se as demais condições de marcação.

TABELA 3: Influência da variação da massa de peptídeo na pureza radioquímica do composto marcado

Massa do peptídeo (μg)	Pureza radioquímica (%)
1,5	48,90 \pm 12,70 (n=2)
10	94,50 \pm 1,65 (n=20)
30	89,35 \pm 1,01 (n=2)

4.1.2) Estudo da influência da atividade de ^{131}I na pureza radioquímica

Após a definição da massa do peptídeo a ser utilizada, definiu-se o melhor intervalo da relação molar peptídeo/atividade de ^{131}I tomando-se como referência os resultados de pureza radioquímica.

Padronizando-se a massa do peptídeo em 10 μg , o tempo de reação em 1 minuto e massa de Cloramina T em 5 μg obtém-se com progressiva atividade de ^{131}I , pureza radioquímica decrescente com razões molares menores do que 1,82 (TAB.4).

TABELA 4: Influência da atividade do ^{131}I na pureza radioquímica do composto marcado

Atividade ^{131}I / μg peptídeo	Razão molar peptídeo/^{131}I	Pureza radioquímica (%)
0,74 MBq/ μg (20 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)	27,3	94,10 \pm 4,80 (n= 4)
1,85 MBq/ μg (50 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)	10,92	94,50 \pm 1,50 (n= 5)
7,4 MBq / μg (200 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)	2,73	94,50 \pm 1,65 (n=20)
11,1 MBq / μg (300 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)	1,82	94,75 \pm 1,85 (n=6)
37 MBq / μg (1 mCi/ μg)	0,54	92,25 \pm 6,40 (n=6)
74 MBq / μg (2 mCi/ μg)	0,27	57,9 \pm 0,90 (n=2)
444 MBq / μg (12 mCi/ μg)	0,045	2,25 \pm 0,54 (n=8)

Para obterem-se marcações com altas atividades, adequadas ao uso terapêutico, com atividade específica alta, ou seja, com razões molares peptídeo/radioiodo menores do que 2,73, foram realizados dois estudos mostrados na TAB.5: um com razão 0,54 (1850MBq/50 µg ou 50 mCi/ 50 µg de peptídeo) e outro com razão 0,728 (2775 MBq/µg ou 75 mCi/100 µg de peptídeo).

A atividade de 1850 MBq foi a escolhida, num primeiro momento, porque geralmente é a atividade inicial de Octreoscan[®] que se utiliza na terapia dos pacientes com tumores neuroendócrinos. A marcação com a razão 0,54 e alta atividade proporcionou pureza radioquímica semelhante àquela realizada com baixa atividade. Como a pureza radioquímica obtida foi 94,60% elevou-se posteriormente em 50% a atividade estudada. Contudo, esta marcação realizada com a razão molar peptídeo/radioiodo 0,728 proporcionou pureza radioquímica de aproximadamente 84% (TAB.5), contrariando os resultados obtidos nos estudos de marcação com baixa atividade. Este resultado pode ter sido causado pela radiólise devido à atividade radioativa alta de ¹³¹I e é indicativo de que atividades maiores do que 1850 MBq, provavelmente, deverão ser fracionadas para garantia de maior estabilidade da marcação.

Assim, tentativas de marcação do peptídeo com alta atividade, compatíveis com a terapia em humanos, não resultaram em boa pureza radioquímica quando a atividade do ¹³¹I foi maior que 1850 MBq (50 mCi), como visto na TAB.5, mesmo aumentando-se a massa do peptídeo de forma a manter a razão molar peptídeo/iodo adequada.

TABELA 5: Resultados das marcações utilizando-se alta atividade de iodo

Atividade	Massa peptídeo (µg)	Razão molar peptídeo/¹³¹I	Pureza radioquímica (%)
1850 MBq (50 mCi)	50	0,54	94,60 ± 0,83 (n=2)
2775 MBq (75 mCi)	100	0,728	84,00 ± 3,80 (n=2)

Nos experimentos com alta atividade, um aumento na massa do oxidante, proporcional ao aumento da atividade, foi necessário pelo risco de obtermos baixa pureza radioquímica.

4.1.3) Estudo da influência do tempo de reação na pureza radioquímica

O estudo da influência do tempo de reação na pureza radioquímica do composto marcado determinou que a marcação ocorre de forma rápida e eficiente, pois em menos de 1 minuto de reação obteve-se pureza radioquímica média de 83,40%. Porém, nota-se que a pureza radioquímica melhorou muito aumentando-se o tempo de reação para 1 minuto, sem alteração significativa desta ao se prolongar o tempo de reação para 3 ou 10 minutos (TAB.6).

A partir das condições padrão de marcação com Cloramina T (item 3.2.1) foram obtidas diferentes purezas radioquímicas a partir da variação do tempo de marcação (TAB.6).

TABELA 6: Efeito do tempo de reação na pureza radioquímica do peptídeo marcado

Tempo (min)	Pureza radioquímica (%)
0,5	83,40 ± 11,70 (n=6)
1	94,50 ± 1,65 (n=20)
3	90,50 ± 4,50 (n=6)
10	95,20 ± 3,30 (n=5)

4.1.4) Estudo qualitativo na CLAE da influência da razão molar peptídeo / radioiodo na pureza radioquímica

A definição do melhor intervalo da relação molar peptídeo/atividade de ^{131}I para uso diagnóstico e terapêutico foi obtida analisando-se os resultados tanto de forma quantitativa, pela determinação da pureza radioquímica pelo método

eletroforético, quanto qualitativamente, pela análise das espécies radioquímicas obtidas no CLAE. É notável que Bakker e colaboradores relataram que análogos da somatostatina marcados com radioiodo não seriam adequados para uso clínico pela biodistribuição desfavorável do composto e pela deiodinação *in vivo* [13]. Ainda de acordo com os autores, que estudaram a marcação do peptídeo Tyr³-octreotídeo-¹²³I, a biodistribuição desfavorável seria atribuída à formação de uma segunda espécie radioquímica, supostamente a forma di-iodada do peptídeo. Na interpretação dos autores, esta espécie di-iodada não apresentaria a mesma afinidade pelos receptores das células tumorais que a espécie monoiodada, sendo ainda mais vulnerável à deiodação. Contudo a possível presença de impurezas radioquímicas advindas da produção do ¹²³I também pode ter influenciado na instabilidade da marcação.

No presente trabalho, também foi possível observar, nos estudos de CLAE, a formação de mais de uma espécie radioquímica, condicionada à razão molar peptídeo/radioiodo utilizada.

Estudando-se o produto purificado em Sep-Pack[®] da marcação de diferentes razões molares peptídeo/radioiodo no CLAE (FIG.8 a 12), percebe-se que as espécies radioquímicas obtidas variam, sendo que apenas uma espécie radioquímica foi identificada no sistema cromatográfico utilizado, para a razão 2,73 (FIG.8), enquanto que duas espécies foram observadas para as razões de 1,82 e 0,54 (FIG.9 e 10, respectivamente). A espécie radioquímica com tempo de retenção (Rt) maior prevalece para a razão de 0,27 (FIG.11) e na razão molar de 0,045, várias espécies radioquímicas foram observadas (FIG.12).

Conforme observado no perfil de CLAE, para as razões molares 1,82 e 0,54 (FIG.9 e 10), a espécie radioquímica com tempo de retenção maior pode ser atribuída à forma di-iodada do composto, à semelhança do observado por Bakker e colaboradores [13]. A presença de dois átomos de iodo na molécula protéica aumenta o caráter lipofílico da molécula, aumentando conseqüentemente, o tempo de retenção da mesma no sistema cromatográfico utilizado, conforme observado.

Analisando-se os perfis cromatográficos do CLAE percebemos a obtenção preferencial de uma única espécie radioiodada se a razão molar

peptídeo/radioiodo de 2,73, ou a relação 200 μCi de $^{131}\text{I}/\mu\text{g}$ de peptídeo, for utilizada (FIG.8). Aumentando-se a atividade de ^{131}I na marcação, com a razão de 1,82, obtivemos duas espécies radioquímicas, sendo uma prevalente com R_t de 22,9 minutos e outra e quantidade bem menor com R_t de 24,4 minutos (FIG. 9).

Por outro lado, obtivemos praticamente a mesma proporção de duas espécies radioquímicas com a marcação feita à razão molar peptídeo/radioiodo de 0,54 (FIG.10).

Pelas características físico-químicas do ^{131}I concluímos que o peptídeo mono-iodado seria o composto no CLAE com menor R_t , e o di-iodado com R_t maior.

Para a obtenção de uma dose diagnóstica do DOTA-Tyr³-octreotato- ^{131}I os estudos de marcação com baixas atividade de ^{131}I demonstraram que a razão molar peptídeo/radioiodo de 2,73 proporciona uma única espécie radioquímica (FIG.8) com boa pureza radioquímica (TAB.4).

Devido ao alto custo do peptídeo e como qualitativamente comprovamos que razões molares peptídeo/radioiodo menores do que 2,73 não são vantajosas, optamos por limitar a amostra dos estudos da influência da massa de peptídeo na pureza radioquímica do composto marcado quando a relação molar fosse menor que 2,73 (TAB.3).

Desta forma não procedemos à análise estatística comparativa dos resultados obtidos entre as diferentes razões molares peptídeo/radioiodo porque algumas razões molares apresentaram resultados qualitativamente desfavoráveis, resultando em grande quantidade do composto di-iodado.

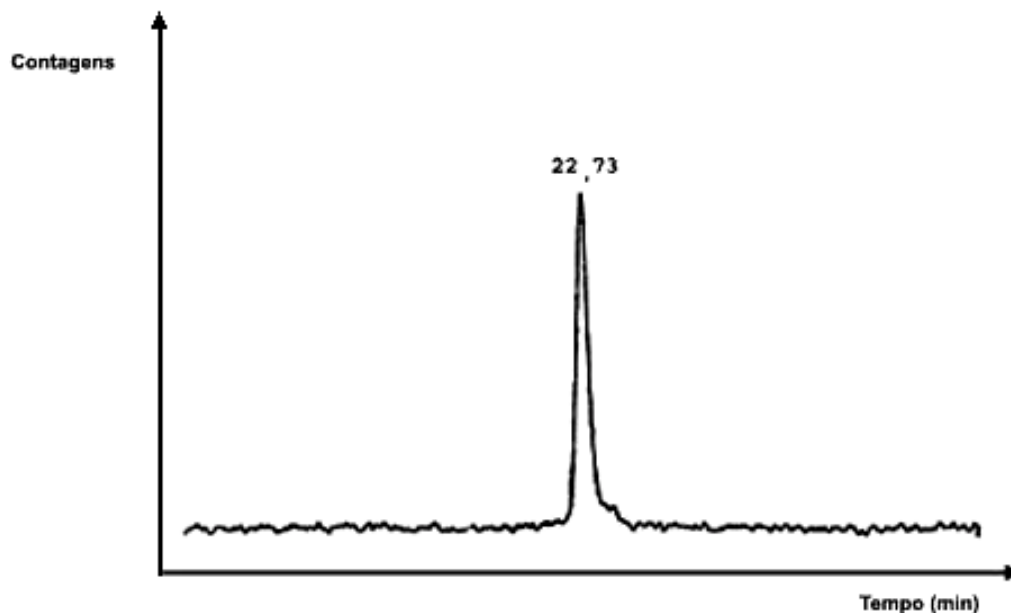


FIGURA 8: Perfil cromatográfico de CLAE do produto marcado com razão molar peptídeo/radioiodo de 2,73. (Coluna cromatográfica C18, 4,2X50 mm, 5 μ m, detetor de radioação beta e gama, fluxo 0,5 mL/min, gradiente linear de 40%-80% de metanol, tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5, corrida de 45 minutos)

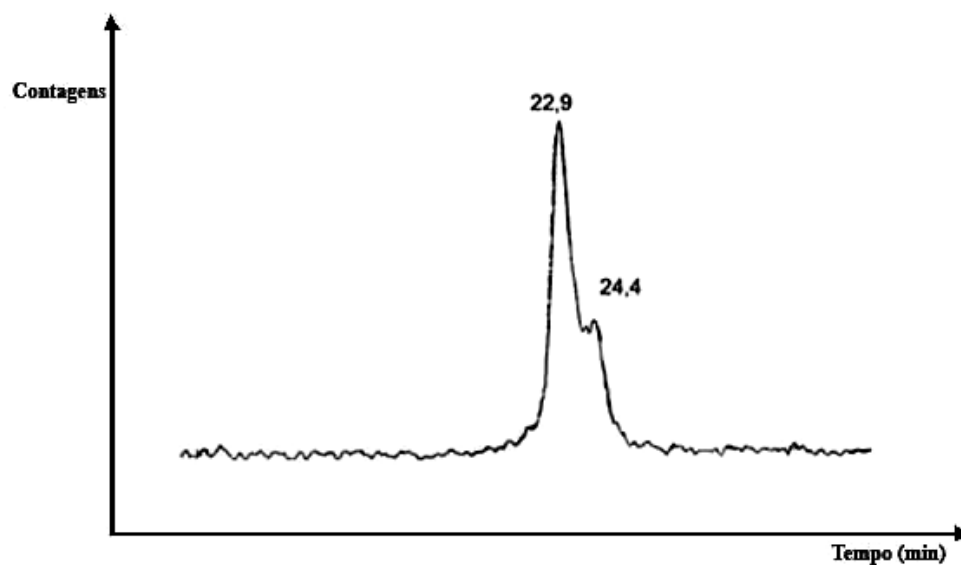


FIGURA 9: Perfil cromatográfico de CLAE do produto marcado com razão molar peptídeo/radioiodo de 1,82. (Coluna cromatográfica C18, 4,2X50 mm, 5 μ m, detetor de radioação beta e gama, fluxo 0,5 mL/min, gradiente linear de 40%-80% de metanol, tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5, corrida de 45 minutos)

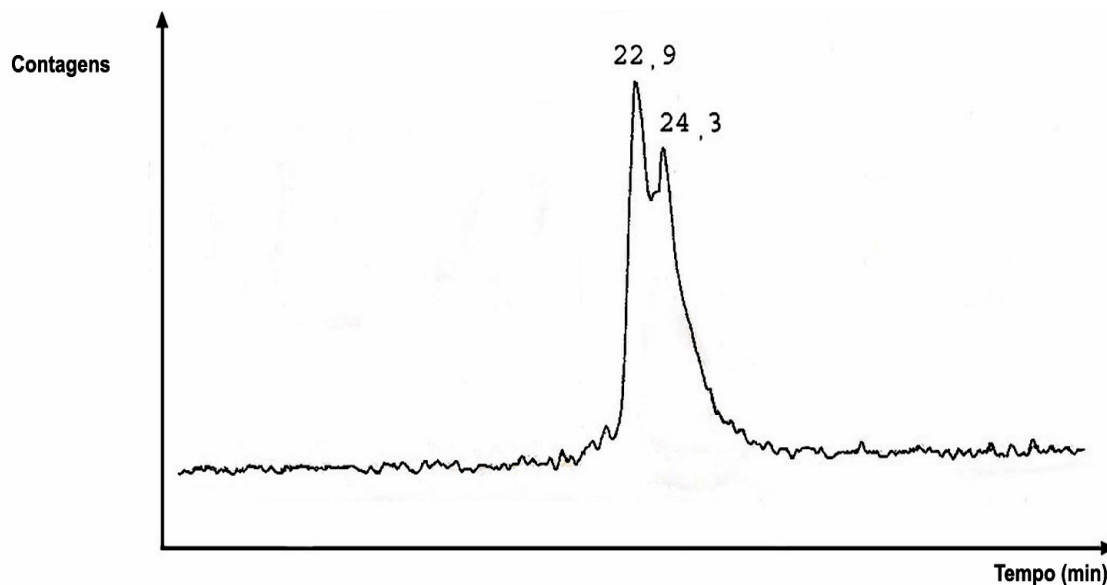


FIGURA 10: Perfil cromatográfico de CLAE do produto marcado com razão molar peptídeo/radioiodo de 0,54. (Coluna cromatográfica C18, 4,2X50 mm, 5 μ m, detetor de radiação beta e gama, fluxo 0,5 mL/min, gradiente linear de 40%-80% de metanol, tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5, corrida de 45 minutos)

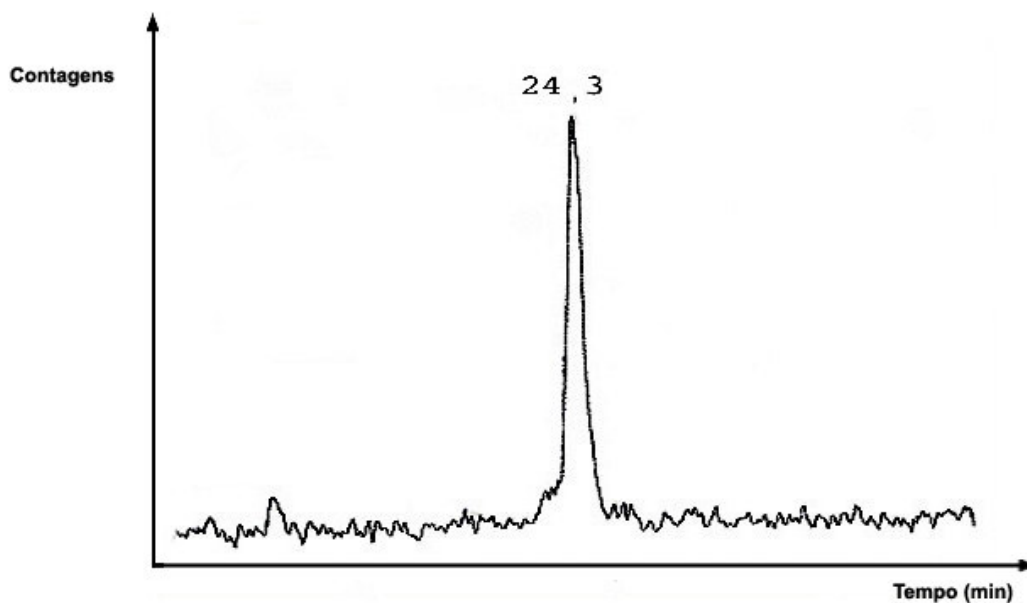


FIGURA 11: Perfil cromatográfico de CLAE do produto marcado com razão molar peptídeo/radioiodo de 0,27. (Coluna cromatográfica C18, 4,2X50 mm, 5 μ m, detetor de radiação beta e gama, fluxo 0,5 mL/min, gradiente linear de 40%-80% de metanol, tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5, corrida de 45 minutos)

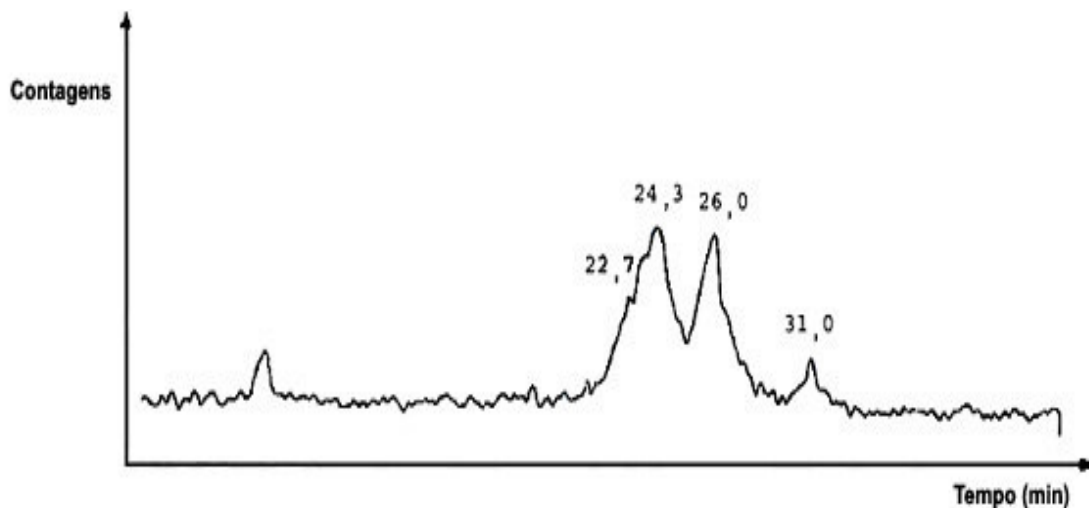


FIGURA 12: Perfil cromatográfico de CLAE do produto marcado com razão molar peptídeo/radioiodo de 0,045. (Coluna cromatográfica C18, 4,2X50 mm, 5 μ m, detetor de radioação beta e gama, fluxo 0,5 mL/min, gradiente linear de 40%-80% de metanol, tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5, corrida de 45 minutos)

4.2) Marcações com Iodogen

4.2.1) Estudo da influência da atividade de ^{131}I e massa de Iodogen na pureza radioquímica

A partir da condição padrão de marcação utilizando-se o Iodogen, como descrito no ítem 3.2.1, usando-se atividade de ^{131}I de 74 MBq (2 mCi) e tempo de 30 minutos não houve diferença aparente na pureza radioquímica com o aumento da massa de Iodogen até 50 μg (TAB.7)

Apenas o aumento da massa de Iodogen não proporcionou melhoria na pureza radioquímica quando a marcação foi realizada com maior atividade (TAB.7).

Utilizando-se o Iodogen como agente oxidativo, foram obtidas purezas radioquímicas maiores do que 96%, sem a necessidade de purificação, trabalhando-se com a condição padrão de marcação. Porém, ao se aumentar a atividade do ^{131}I para 370 MBq nem o aumento da massa do Iodogen até 5 vezes a inicial foi suficiente para melhorar satisfatoriamente o resultado da marcação (TAB.7).

TABELA 7: Pureza radioquímica média das marcações com Iodogen: estudo da variação da massa de Iodogen e atividade de marcação

Massa Iodogen (μg)	Pureza radioquímica (%)	Tempo (minutos)	Atividade do ^{131}I (MBq)
10	96,70 \pm 0,80 (n= 6)	30	74
30	96,70 \pm 0,50 (n= 6)	30	74
50	96,00 \pm 0,01 (n=2)	30	74
10	57,00 \pm 5,00 (n= 2)	30	370
30	62,00 \pm 2,00 (n= 2)	30	370
50	64,31 \pm 13,60 (n= 2)	30	370

A pureza radioquímica obtida para marcação utilizando-se atividade baixa de $\text{NaI-}^{131}\text{I}$ é equivalente à obtida nas marcações utilizando-se Cloramina T. A mesma pureza radioquímica parece decrescer com o aumento de atividade (TAB.7).

4.2.2) Estudo da influência da razão molar peptídeo/radioiodo na pureza radioquímica na marcação com Iodogen

Variando-se a razão molar peptídeo/radioiodo obtivemos variação na pureza radioquímica conforme demonstrado na TAB. 8.

Um resultado pior de pureza radioquímica foi obtido na marcação com o Iodogen alterando-se a relação molar peptídeo/radioiodo de 2,73 para 0,54 sendo a queda na pureza radioquímica mais acentuada do que aquela observada com a Cloramina T (TAB.8).

Estes resultados eram esperados porque o Iodogen é um agente oxidativo mais brando do que a Cloramina T.

TABELA 8: Pureza radioquímica média das marcações com Iodogen em função de diferentes razões molares peptídeo/radioiodo

Atividade de $^{131}\text{I}/\mu\text{g}$ peptídeo	Razão molar peptídeo/^{131}I	Pureza radioquímica (%)
7,4 MBq/ μg (200 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)	2,73	96,70 \pm 0,80 (n= 6)
37 MBq/ μg (1 mCi/ μg)	0,54	61,10 \pm 3,70 (n= 6)

4.3) Estudo da eficiência da purificação com Sep-Pack®

Após a purificação das marcações do DOTA-Tyr³-octreotato com o ^{131}I a pureza radioquímica aumentou de forma eficiente, mesmo partindo de uma pureza radioquímica muito baixa (TAB. 9).

TABELA 9: Pureza radioquímica após purificação com Sep-Pack®

Marcação	Pureza radioquímica (%) – antes da purificação	Pureza radioquímica (%) – após purificação (fração etanol 96%)	Rendimento da marcação (%)
1	40,00 (1,5 µg + 185 MBq (5 mCi))	96,70	30,0 %
2	57,90 (1,5 µg + 111 MBq (3 mCi))	98,07	32,0 %
3	86,70 (10 µg + 74 MBq (2 mCi))	99,30	50,0%
4	96,20 (10 µg + 74 MBq (2 mCi))	99,20	86,0 %
5	98,80 (10µg + 370 MBq (10 mCi))	99,70	90,0 %

Os rendimentos das marcações observados, entretanto, são proporcionais à porcentagem de produto marcado (TAB.9).

4.4) Resultados dos controles de CLAE e eletroforese

Em todas as análises com a cromatografia líquida de alta eficiência utilizando-se detetor de UV observou-se a detecção do solvente de marcação (tampão fosfato 0,2M pH 7,5) no tempo aproximado de 4 minutos, do radioiodo a quase 7 minutos no detetor radioativo (FIG.13), do peptídeo não marcado em aproximadamente 19 minutos (FIG.14), da Cloramina T em 13 minutos e do metabissulfito de sódio em 14 minutos. O perfil de CLAE do peptídeo marcado depende da relação molar peptídeo/radioiodo conforme demonstrado nas FIG.8 a 12.

Na análise eletroforética foi observada a migração do iodeto de sódio livre principalmente entre o 9º e o 11º segmentos da fita eletroforética (FIG. 15), enquanto que o peptídeo permaneceu nos primeiros segmentos da fita, próximos do local de aplicação da amostra (FIG.16).

Cada amostra foi estudada no CLAE e na eletroforese no mínimo 4 vezes.

A técnica de CLAE mostrou-se útil na separação das diferentes espécies radioquímicas sendo método fundamental para determinar as diferentes espécies radioiodadas obtidas após cada marcação com diferentes razões molares peptídeo/radioiodo (FIG.8 a 12).

A eletroforese horizontal foi método eficiente para separar o radioiodo livre (FIG.16) dos compostos marcados, porém não seria capaz de analisar qualitativamente o produto da marcação.

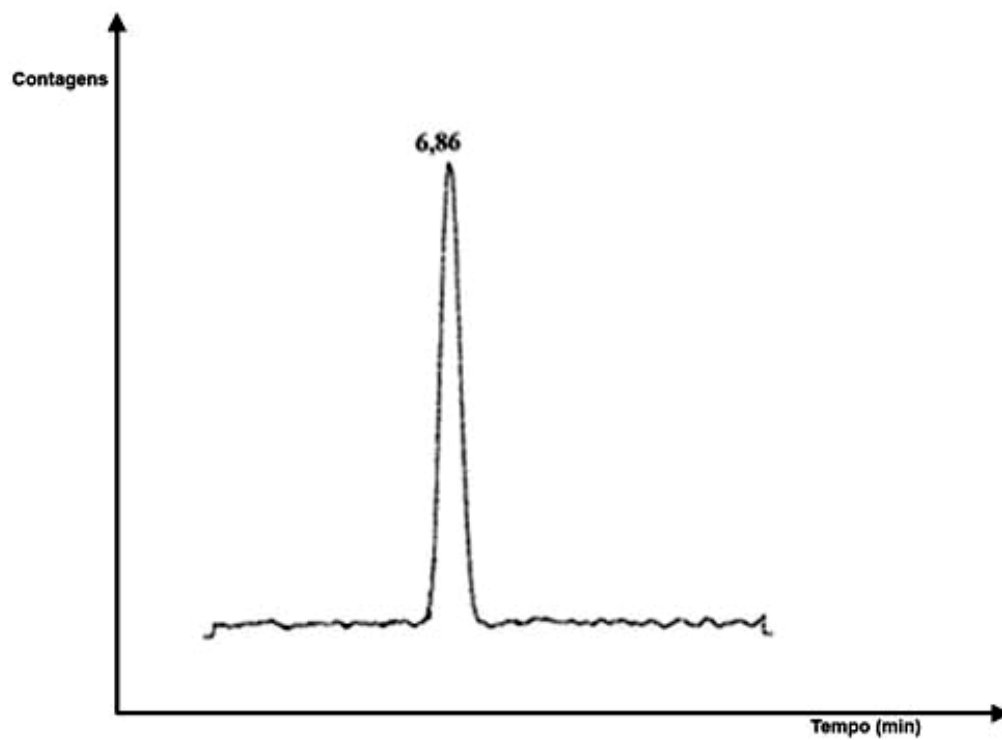


FIGURA 13: Perfil cromatográfico do NaI-¹³¹I no CLAE com detetor radioativo

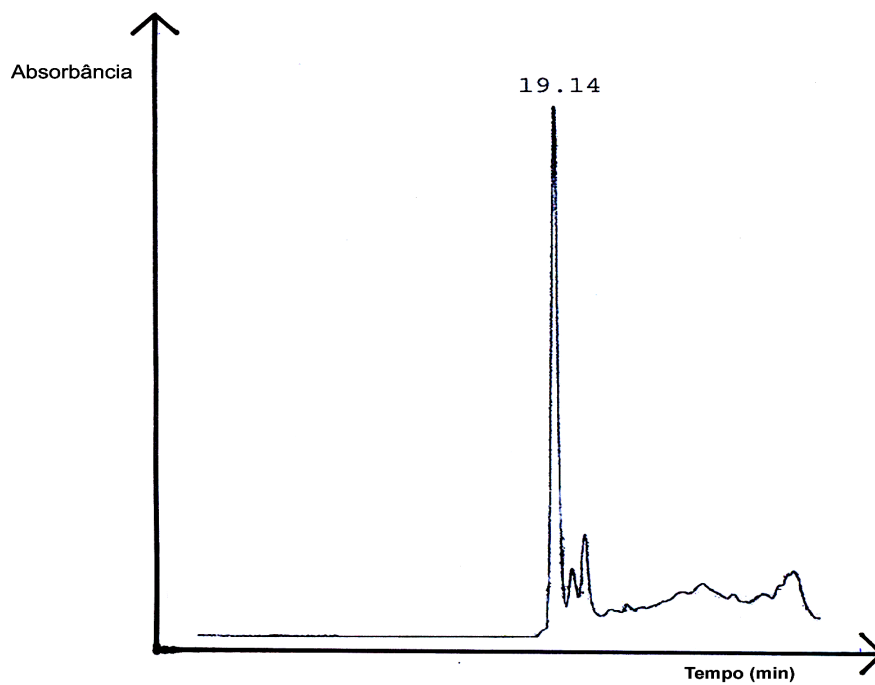
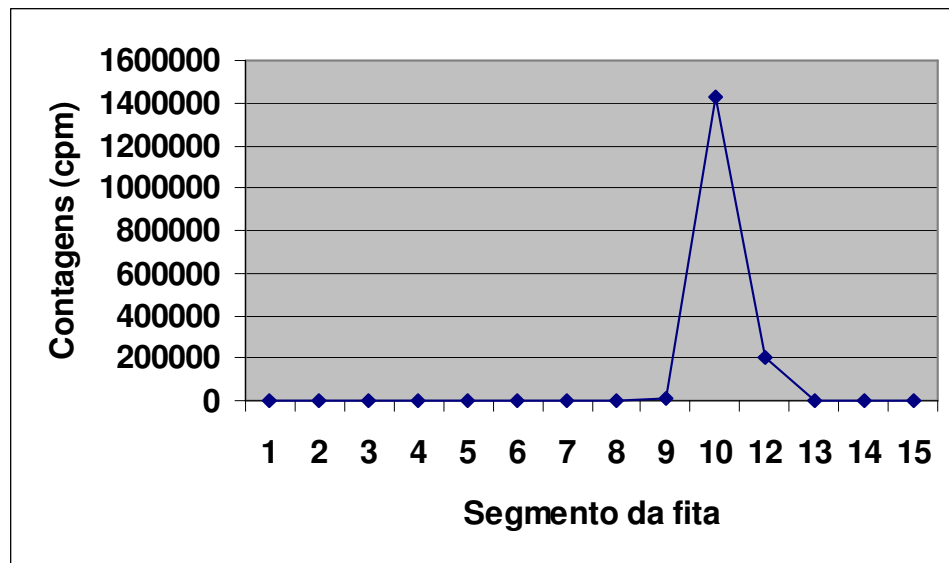
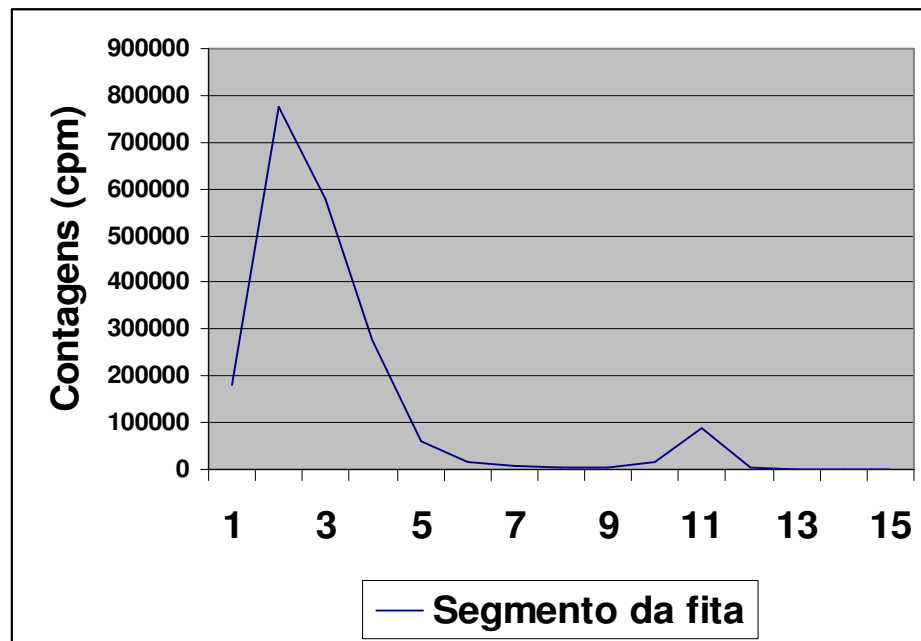


FIGURA 14: Perfil cromatográfico de CLAE em UV do DOTA-Tyr³-octreotato

FIGURA 15: Perfil eletroforético do NaI-¹³¹IFIGURA 16: Perfil eletroforético do peptídeo DOTA-Tyr³-octreotato marcado com radioiodo

4.5) Estabilidade da marcação

Há grande diferença entre a estabilidade *in vitro* do DOTA-Tyr³-octreotato-¹³¹I antes e após a purificação, sendo esta última muito superior à primeira (FIG.17 e 18). Isto pode ser explicado pelo fato de a fração purificada ser armazenada em etanol 96%. A retirada de água do meio de reação pode haver contribuído para minimizar o efeito de radiólise na estabilidade do composto, assim como a presença do etanol pode ter conferido maior estabilidade da marcação pela diminuição dos radicais livres.

Já no plasma humano a queda percentual da pureza radioquímica do DOTA-Tyr³-octreotato-¹³¹I purificado é de, na média, 13% em 24h (FIG.19). Esta deiodação *in vivo* ocorre em pequena monta apesar da ação das enzimas plasmáticas, o que, a princípio, favorece a aplicação deste peptídeo em futuros estudos em pacientes. Convém ressaltar que os estudos de estabilidade em plasma humano foram realizados com atividades baixas do peptídeo marcado, com o objetivo de simular a diluição do radiofármaco em todo o volume sanguíneo de um indivíduo adulto, avaliando-se, desta forma, o efeito da ação de enzimas plasmáticas e não o efeito de radiólise que poderia ser promovido com a utilização de atividades altas.

A estabilidade do composto marcado pode ainda ser ampliada pela adição de “quenchers” e/ou pela diluição do produto da marcação para armazenamento. Estes fatores deverão ser estudados futuramente.

Os resultados dos estudos de estabilidade são expressos nas figuras 17,18 e 19 a seguir.

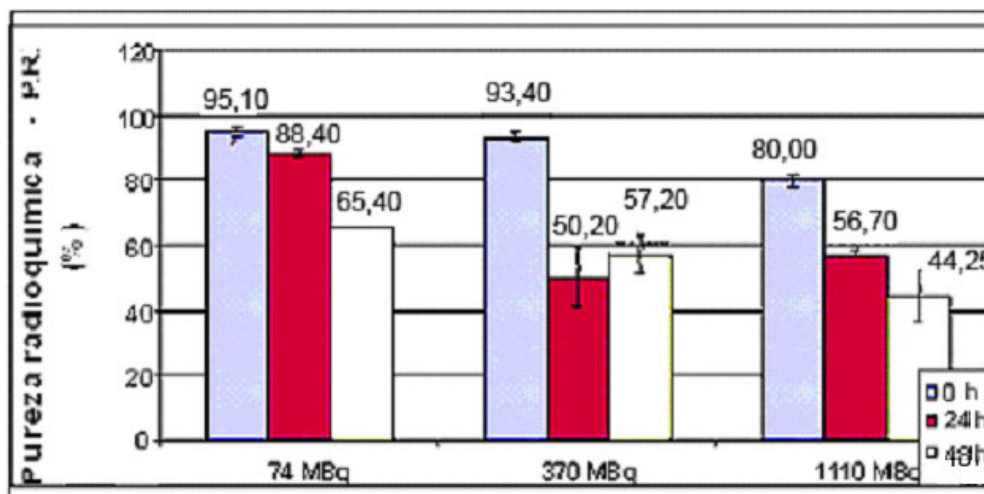


FIGURA 17: Estabilidade *in vitro* da marcação do DOTA-Tyr³-octreotato-¹³¹I sem purificação e armazenado sob refrigeração (2 a 8° C) (marcação com 74 MBq, 340 MBq e 1110 MBq respectivamente de ¹³¹I, e demais condições idênticas à condição padrão de marcação com a Cloramina T)

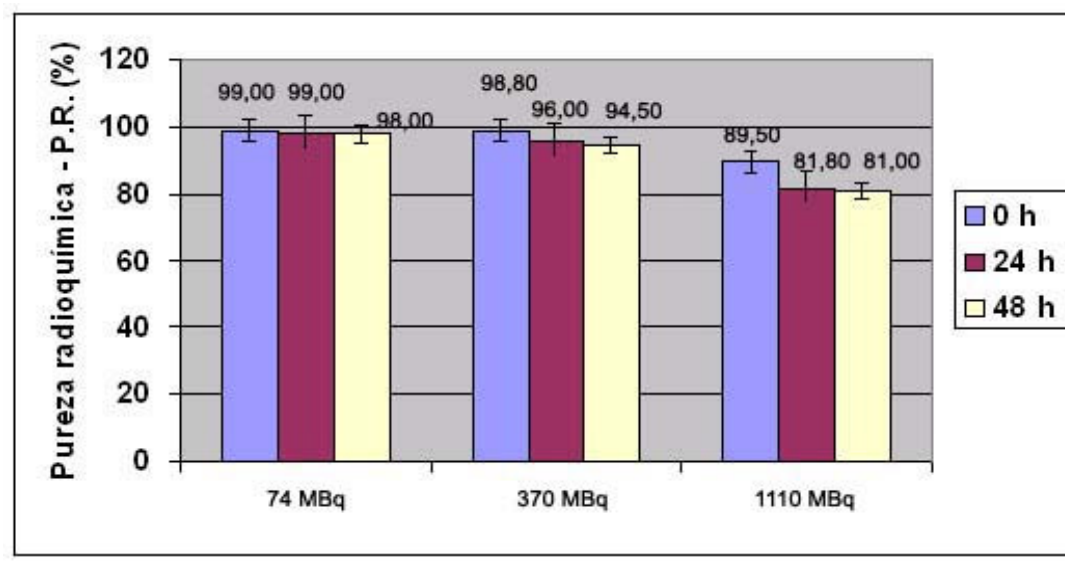


FIGURA 18: Estabilidade *in vitro* da marcação do DOTA-Tyr³-octreotato-¹³¹I com purificação e armazenado sob refrigeração (2 a 8° C) (fração de etanol 96%), marcações com 74 MBq, 340 MBq e 1110 MBq, respectivamente de ¹³¹I e demais condições padrão de marcação.

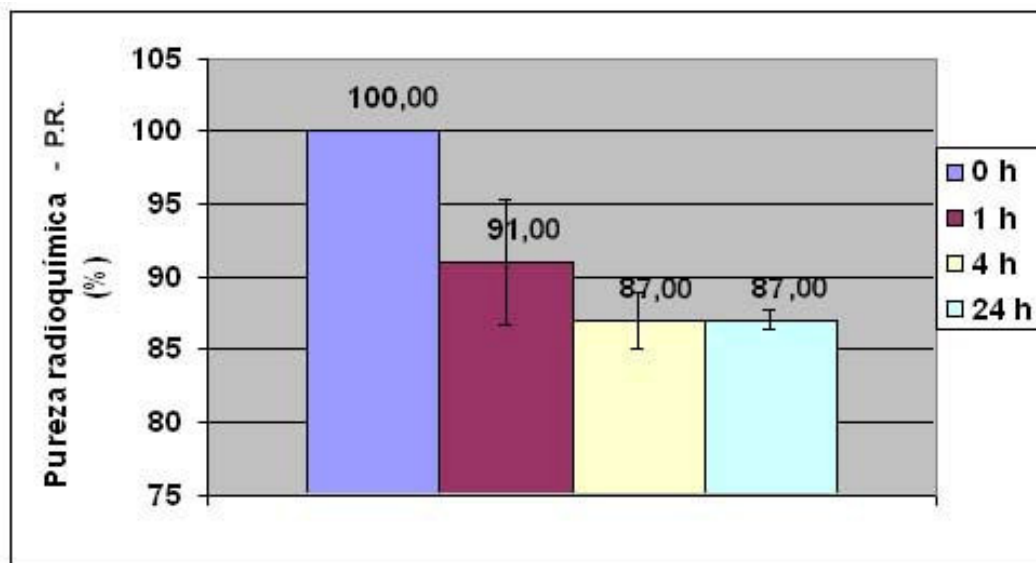


FIGURA 19: Estabilidade percentual *in vitro* em plasma humano a 37°C do DOTA-Tyr³-octreotato-¹³¹I obtido utilizando-se condição padrão de marcação com a Cloramina T

4.6) Estudos de biodistribuição

Foram realizados estudos de biodistribuição utilizando-se o DOTA-Tyr³-octreotato marcado com o ¹³¹I pelo método da Cloramina T de duas formas distintas: com razão molar peptídeo/radioiodo de 0,54 (10 µg de peptídeo, 5 µg de Cloramina T, 370 MBq de ¹³¹I e 1 minuto de tempo de reação) e de 2,73 (10 µg de peptídeo, 5 µg de Cloramina T, 74 MBq de ¹³¹I e 1 minuto de tempo de reação), para se averiguar as diferenças de biodistribuição em função das diferentes espécies radioquímicas observadas no estudo de CLAE. Os resultados do estudo biológico estão expressos nas TAB.10 a 17 e FIG.20.

Nestes estudos foi possível notar a semelhança moderada entre as duas espécies radioquímicas nos animais sem tumor, com algumas diferenças: há uma captação renal aparentemente maior com o peptídeo marcado à razão de 0,54 do que com o marcado à razão de 2,73. Assim, a %dose/grama nos rins do estudo realizado com a razão de 0,54 permaneceu elevada, aproximadamente 15% com 4 horas de estudo, ao passo que com a razão de 2,73 obtivemos mais

ou menos 15% com 30 minutos de estudo e 9,87% após 4 horas da injeção (TAB.11 e 13). O clareamento sangüíneo do composto marcado na razão 0,54 foi mais rápido que o observado para o composto marcado na razão 2,73, o que certamente deve ter contribuído para o aumento da captação renal do composto.

Estas diferenças certamente são atribuídas às diferentes espécies radioquímicas observadas nos perfis do CLAE de ambas as marcações (FIG.8 e 10).

A captação hepática dos compostos marcados com as diferentes razões molares, bem como a eliminação intestinal, foram bastante semelhantes, com uma persistência hepática discretamente maior após 4 horas, para o composto marcado na razão 0,54. Isto pode ser explicado pela natureza mais lipofílica das espécies radioquímicas formadas nesta condição de marcação. Porém é interessante lembrar que a captação hepática foi pequena, o que indica a possibilidade de obtenção de imagens de boa qualidade.

Nos estudos realizados em animais *Nude* com tumores, uma importante diferença de captação tumoral entre as razões molares 0,54 e 2,73 foi observada, sendo que o tumor captou aproximadamente o dobro em %dose/órgão e mais ou menos 15 vezes mais em %dose/grama com a razão 2,73 (TAB.14 a 17).

Estes resultados indicam a captação em órgãos sabidamente ricos em receptores para SM, como o pâncreas e adrenais, foi aparentemente maior para o composto marcado na razão 2,73, configurando-se desta forma, a perda da afinidade pelo receptor ao introduzir-se mais de um átomo de iodo na estrutura do peptídeo. Assim, um protocolo de diagnóstico ou tratamento de pacientes com tumores neuroendócrinos deverá utilizar razão molar peptídeo/radioiodo por volta de 2,73.

Os estudos de biodistribuição permitiram ainda verificar a influência da presença do quelante DOTA na estrutura do peptídeo radioiodado.

Num trabalho já apresentado por Araújo e colaboradores, num encontro da Agência Internacional de Energia Atômica em 2005, comparou-se a biodistribuição dos peptídeos octreotato-¹³¹I e DOTA-octreotato-¹³¹I e percebeu-se que a captação pelo tumor de células AR42J no peptídeo ligado ao DOTA é, na média 57% maior 1 hora após a injeção [64].

Apesar de o grupamento DOTA não ser necessário para a marcação do peptídeo DOTATATO com radioiodo, já que o radionuclídeo é incorporado no resíduo de tirosina da molécula, o quelante parece ter influenciado significativamente na biodistribuição final do composto, resultando em rápido clareamento sangüíneo e praticamente ausência de captação hepática, quando comparado com outros análogos de SM radioiodados. [13,64].

Os estudos biológicos foram o ponto mais trabalhoso do estudo, e é interessante salientar as dificuldades técnicas observadas na sua realização.

Houve demora inicial no crescimento dos tumores. As células AR42J foram primeiramente implantadas nos camundongos *Swiss*, tendo sido necessários muitos meses para se obter o material de estudo necessário. Então optou-se pelo uso de camundongos *Nude* e clones tumorais mais agressivos. Mesmo assim, o tempo médio de crescimento dos tumores foi 1 mês. Além disso, houve uma provável contaminação bacteriana de toda a cultura das células AR42J no fim do projeto.

TABELA 10: Biodistribuição do DOTA-Tyr³-octreotato marcado com o ¹³¹I na razão molar peptídeo/iodo de 2,73 (%dose/órgão) em camundongos *Swiss* normais até 24 horas

Órgão	%dose/órgão do DOTA-Tyr ³ -octreotato- ¹³¹ I					
	15 min	30 min	1h	2h	4h	24 h
Cérebro	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,001	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,002 ± 0,001
Pulmão	0,71 ± 0,13	0,44 ± 0,10	0,37 ± 0,11	0,20 ± 0,04	0,11 ± 0,01	0,02 ± 0,003
Coração	0,20 ± 0,03	0,13 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,07	0,03 ± 0,01	0,004 ± 0,002
Baço	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Fígado	1,71 ± 0,14	1,48 ± 0,15	1,04 ± 0,12	0,72 ± 0,07	0,56 ± 0,09	0,14 ± 0,02
Estômago	1,08 ± 0,39	1,09 ± 0,47	1,06 ± 0,30	1,37 ± 0,52	0,62 ± 0,23	0,05 ± 0,00
Músculo total	9,67 ± 1,94	4,32 ± 1,60	3,35 ± 0,31	3,31 ± 0,49	1,90 ± 0,58	0,44 ± 0,23
Rins	5,93 ± 0,40	6,25 ± 0,37	4,87 ± 1,39	5,62 ± 1,00	4,49 ± 0,67	1,00 ± 0,37
I.Delgado	2,28 ± 0,15	2,43 ± 0,44	2,52 ± 0,38	2,15 ± 0,66	0,91 ± 0,26	0,73 ± 0,30
I.Grosso	0,69 ± 0,05	0,42 ± 0,15	0,38 ± 0,10	0,77 ± 0,46	1,62 ± 0,20	1,27 ± 0,77
Adrenais	0,03 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,005 ± 0,01
Pâncreas	0,84 ± 0,33	0,58 ± 0,07	0,31 ± 0,05	0,23 ± 0,12	0,16 ± 0,04	0,02 ± 0,01
Sangue total	7,63 ± 0,30	4,26 ± 0,97	2,56 ± 0,32	1,67 ± 0,39	1,05 ± 0,32	0,12 ± 0,05
Tireóide	0,25 ± 0,02	0,39 ± 0,07	0,44 ± 0,25	0,67 ± 0,43	1,23 ± 0,20	0,24 ± 0,11

TABELA 11: Biodistribuição do DOTA-Tyr³-octreotato marcado com o ¹³¹I na razão peptídeo/iodo de 2,73 (%dose/grama) em camundongos *Swiss* normais até 24 horas

Órgão	%dose/grama do DOTA-Tyr ³ -octreotato- ¹³¹ I					
	15 min	30 min	1h	2h	4h	24 h
Cérebro	0,14 ± 0,02	0,09 ± 0,005	0,08 ± 0,03	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,01 ± 0,003
Pulmão	2,45 ± 0,52	1,49 ± 0,25	1,00 ± 0,57	0,56 ± 0,06	0,50 ± 0,26	0,05 ± 0,005
Coração	1,31 ± 0,16	0,74 ± 0,06	0,48 ± 0,09	0,28 ± 0,05	0,19 ± 0,05	0,02 ± 0,003
Baço	1,09 ± 0,09	0,78 ± 0,11	0,60 ± 0,06	0,41 ± 0,11	0,27 ± 0,05	0,06 ± 0,02
Fígado	1,27 ± 0,16	0,88 ± 0,11	0,70 ± 0,05	0,47 ± 0,03	0,36 ± 0,07	0,09 ± 0,02
Estômago	3,39 ± 0,23	3,22 ± 0,43	4,1 ± 1,16	4,62 ± 1,49	2,03 ± 0,68	0,19 ± 0,05
Músculo	0,75 ± 0,16	0,48 ± 0,10	0,33 ± 0,12	0,25 ± 0,06	0,14 ± 0,04	0,03 ± 0,01
Rins	13,38 ± 1,68	14,89 ± 0,78	13,00 ± 0,8	11,95 ± 2,33	9,87 ± 1,16	1,60 ± 0,22
I. Delgado	1,53 ± 0,39	1,63 ± 0,34	1,76 ± 0,28	1,22 ± 0,42	0,58 ± 0,15	0,41 ± 0,20
I.Grosso	1,16 ± 0,61	0,57 ± 0,13	0,44 ± 0,08	1,17 ± 0,85	2,19 ± 0,30	1,90 ± 1,00
Pâncreas	1,24 ± 0,17	0,88 ± 0,11	0,65 ± 0,19	0,49 ± 0,08	0,24 ± 0,06	0,02 ± 0,01
Sangue/mL	5,45 ± 0,21	3,04 ± 0,70	1,83 ± 0,27	1,2 ± 0,30	0,75 ± 0,13	0,09 ± 0,004

TABELA 12: Biodistribuição do DOTA-Tyr³-octreotato marcado com o ¹³¹I na razão peptídeo/iodo de 0,54 (%dose/órgão) em camundongos *Swiss* normais até 24 horas

%dose/órgão do DOTA-Tyr ³ -octreotato- ¹³¹ I			
Órgão	1 h	4h	24 h
Cérebro	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Pulmão	0,29 ± 0,07	0,20 ± 0,05	0,06 ± 0,02
Coração	0,09 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,04
Baço	0,10 ± 0,03	0,06 ± 0,02	0,02 ± 0,01
Fígado	1,14 ± 0,22	0,81 ± 0,09	0,30 ± 0,10
Estômago	0,95 ± 0,38	0,77 ± 0,13	0,10 ± 0,05
Músculo	0,30 ± 0,07	3,30 ± 1,00	0,70 ± 0,33
Rins	7,40 ± 0,80	6,80 ± 0,85	3,70 ± 0,70
I. Delgado	2,70 ± 0,40	1,46 ± 0,40	0,45 ± 0,25
I.Grosso	0,40 ± 0,12	1,70 ± 0,16	0,45 ± 0,13
Sangue total	3,51 ± 0,65	2,10 ± 0,30	0,20 ± 0,03
Tireóide	0,40 ± 0,1	1,40 ± 0,40	3,40 ± 1,20

TABELA 13: Biodistribuição do DOTA-Tyr³-octreotato marcado com o ¹³¹I na razão peptídeo/iodo de 0,54 (%dose/grama) em camundongos *Swiss* normais até 24 horas

%dose/grama do DOTA-Tyr ³ -octreotato- ¹³¹ I			
Órgão	1 h	4h	24 h
Cérebro	0,08 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Pulmão	1,06 ± 0,17	0,57 ± 0,04	0,16 ± 0,08
Coração	0,48 ± 0,04	0,29 ± 0,05	0,09 ± 0,02
Baço	0,67 ± 0,15	0,46 ± 0,08	0,15 ± 0,05
Fígado	0,76 ± 0,16	0,48 ± 0,05	0,0001 ± 0,00
Estômago	3,41 ± 0,91	3,69 ± 1,73	0,25 ± 0,22
Músculo	0,27 ± 0,03	0,23 ± 0,09	0,05 ± 0,02
Rins	19,20 ± 2,67	15,43 ± 0,85	7,85 ± 0,94
I. Delgado	1,61 ± 0,12	0,84 ± 0,59	0,35 ± 0,12
I.Grosso	0,57 ± 0,15	2,61 ± 0,57	0,60 ± 0,14
Sangue/mL	1,42 ± 0,27	0,79 ± 0,10	0,20 ± 0,09

TABELA 14: Biodistribuição do DOTA-Tyr³-octreotato marcado com o ¹³¹I na razão peptídeo/iodo de 2,73 (%dose/órgão) em camundongos *Nude* com tumor até 7 dias

Órgão	%dose/órgão do DOTA-Tyr ³ -octreotato- ¹³¹ I				
	1 h	4h	24 h	48 h	168 h (7 dias)
Cérebro	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,00	0
Pulmão	0,33 ± 0,054	0,17 ± 0,02	0,01 ± 0,002	0,007 ± 0,01	0,002 ± 0,001
Coração	0,06 ± 0,012	0,04 ± 0,01	0,002 ± 0,001	0,004 ± 0,002	0,001 ± 0,001
Baço	0,09 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,005 ± 0,001	0,005 ± 0,001	0,002 ± 0,001
Fígado	1,07 ± 0,13	0,07 ± 0,12	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,025 ± 0,009
Estômago	0,80 ± 0,30	0,70 ± 0,30	0,01 ± 0,007	0,010 ± 0,002	0,002 ± 0,001
Pâncreas	0,35 ± 0,11	0,21 ± 0,01	0,005 ± 0,001	0,007 ± 0,002	0,001 ± 0,001
Músculo	3,75 ± 1,07	3,18 ± 0,51	0,28 ± 0,17	0,24 ± 0,08	0,046 ± 0,014
Rins	5,00 ± 0,54	4,00 ± 0,36	0,79 ± 0,38	0,62 ± 0,07	0,12 ± 0,050
Sangue total	1,30 ± 0,30	0,75 ± 0,04	0,085 ± 0,008	0,03 ± 0,004	0,01 ± 0,009
I. Delgado	3,06 ± 0,42	1,23 ± 0,12	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,005 ± 0,003
I. Grosso	0,72 ± 0,42	3,20 ± 0,37	0,10 ± 0,04	0,10 ± 0,08	0,004 ± 0,002
Tumor	0,55 ± 0,14	0,26 ± 0,07	0,05 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,008 ± 0,006
Tireóide	0,23 ± 0,05	0,50 ± 0,20	0,30 ± 0,06	0,5 ± 0,12	0,14 ± 0,03
Adrenais	0,010 ± 0,003	0,010 ± 0,001	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,001	0

TABELA 15: Biodistribuição do DOTA-Tyr³-octreotato marcado com o ¹³¹I na razão peptídeo/iodo de 2,73 (%dose/grama) em camundongos *Nude* com tumor até 7 dias

Órgão	%dose/grama do DOTA-Tyr ³ -octreotato- ¹³¹ I				
	1 h	4h	24 h	48 h	168 h (7 dias)
Cérebro	0,09 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0	0	0
Pulmão	1,32 ± 0,13	0,79 ± 0,23	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,001
Coração	0,55 ± 0,13	0,39 ± 0,09	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0
Baço	0,50 ± 0,12	0,55 ± 0,18	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Fígado	0,70 ± 0,11	0,49 ± 0,07	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0	0,01 ± 0,001
Estômago	2,69 ± 0,46	3,60 ± 0,67	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,01 ± 0,002
Pâncreas	1,11 ± 0,52	0,73 ± 0,16	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0
Músculo	0,33 ± 0,13	0,42 ± 0,28	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Rins	12,45 ± 0,90	10,71 ± 0,85	2,30 ± 0,60	1,31 ± 0,13	0,27 ± 0,1
Sangue/mL	0,91 ± 0,20	0,53 ± 0,03	0,06 ± 0,006	0,02 ± 0,007	0,01 ± 0,0001
I. Delgado	1,63 ± 0,20	0,72 ± 0,09	0,03 ± 0,01	0,15 ± 0,08	0,20 ± 0
I. Grosso	0,76 ± 0,50	3,46 ± 0,83	0,07 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0
Tumor	1,90 ± 0,71	0,75 ± 0,98	0,22 ± 0,06	0,11 ± 0,05	0,03 ± 0,01

TABELA 16: Biodistribuição do DOTA-Tyr³-octreotato marcado com o ¹³¹I na razão peptídeo/iodo de 0,54 (%dose/órgão) em camundongos *Nude* com tumor até 24 horas

Órgão	%dose/órgão do DOTA-Tyr ³ -octreotato- ¹³¹ I		
	1 h	4h	24 h
Cérebro	0,006 ± 0,002	0,02 ± 0,01	0,002 ± 0,001
Pulmão	0,054 ± 0,030	0,06 ± 0	0,012 ± 0,002
Coração	0,010 ± 0,001	0,024 ± 0,01	0,002 ± 0,001
Baço	0,002 ± 0,005	0,03 ± 0,002	0,004 ± 0,002
Fígado	0,11 ± 0,03	0,03 ± 0,10	0,034 ± 0,01
Estômago	0,14 ± 0,02	0,03 ± 0	0,02 ± 0,01
Pâncreas	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,002	0,002 ± 0,001
Músculo	0,01 ± 0,003	0,015 ± 0,005	0,002 ± 0,001
Rins	0,07 ± 0,05	0,36 ± 0,24	0,08 ± 0,03
Sangue total	2,0 ± 0,06	0,61 ± 0	0,20 ± 0,03
I. Delgado	0,13 ± 0,10	0,27 ± 0,06	0,03 ± 0,01
I. Grosso	0,04 ± 0,03	0,55 ± 0,37	0,06 ± 0,02
Tumor	0,33 ± 0,24	0,19 ± 0,01	0,02 ± 0,006
Tireóide	0,06 ± 0,03	0,01 ± 0,08	0,80 ± 0,20
Adrenais	0,003 ± 0,002	0,001 ± 0	0,001 ± 0,0005

TABELA 17: Biodistribuição do DOTA-Tyr³-octreotato marcado com o ¹³¹I na razão peptídeo/iodo de 0,54 (%dose/grama) em camundongos *Nude* com tumor até 7 dias

Órgão	%dose/grama do DOTA-Tyr ³ -octreotato- ¹³¹ I		
	1 h	4 h	24 h
Cérebro	0,02 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,002 ± 0,001
Pulmão	0,31 ± 0,10	0,06 ± 0	0,012 ± 0,002
Coração	0,13 ± 0,06	0,25 ± 0,08	0,002 ± 0,001
Baço	0,20 ± 0,06	0,40 ± 0,06	0,004 ± 0,002
Fígado	0,13 ± 0,04	0,35 ± 0,10	0,034 ± 0,01
Estômago	1,24 ± 0,25	0,24 ± 0,08	0,02 ± 0,01
Pâncreas	0,22 ± 0,11	0,02 ± 0,01	0,002 ± 0,001
Músculo	0,10 ± 0,01	0,37 ± 0,14	0,002 ± 0,001
Rins	0,25 ± 0,16	0,40 ± 0,16	0,08 ± 0,03
Sangue 1 mL	1,45 ± 0,03	0,45 ± 0,02	0,15 ± 0,03
I. Delgado	0,13 ± 0,10	0,50 ± 0,10	0,03 ± 0,01
I. Grosso	0,09 ± 0,06	0,20 ± 0,08	0,06 ± 0,02
Tumor	0,13 ± 0,03	0,08 ± 0,01	0,02 ± 0,006

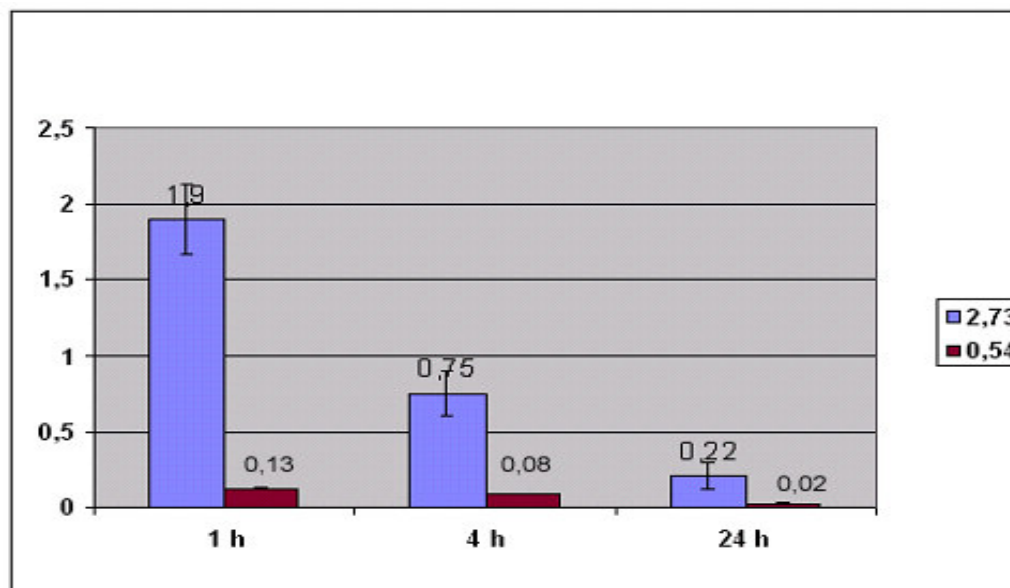


FIGURA 20: Captação tumoral do DOTA-Tyr³-octreotato marcado com ¹³¹I no tumor AR42J em camundongos *Nude* nas razões molares peptídeo/¹³¹I 2,73 e 0,54 (%dose/grama)

4.7) Estudos de dose absorvida (MIRDOSE 3)

Os estudos realizados nos camundongos *Nude* com tumor AR42J mostraram captação tumoral, em %dose/grama, maior do que a maioria dos órgãos, sendo menor somente do que a %dose/grama dos rins e estômago (TAB.15).

Considera-se este dado um bom indício da possibilidade de utilização do DOTA-Tyr³-octreotato-¹³¹I para fins terapêuticos em humanos e portanto, os estudos foram estendidos com a estimativa de dose absorvida com o programa MIRDOSE3 (TAB.18).

Os cálculos dosimétricos foram realizados para uma dose administrada de 0,111 MBq (30 mCi), com intento de determinar os órgãos críticos para dosimetria.

Agradecimentos à Dra Maria Inês Calil Curi Guimarães do Centro de Medicina Nuclear da Universidade de São Paulo pela colaboração nos estudos dosimétricos.

Este programa revelou que realmente a dose absorvida tumoral do peptídeo em questão só é menor do que a dos rins (TAB.18), sendo mais um dado que indica a possibilidade de sua futura utilização terapêutica.

Contudo o programa MIRDOSE3 foi idealizado para estudos dosimétricos em humanos, os resultados obtidos são meramente uma estimativa dos dados que podem ser obtidos num estudo do mesmo tipo em humanos.

Também observou-se captação tumoral de 1,9% dose/grama, o que pode ser suficiente para terapia pois o ^{131}I -iodeto de sódio é utilizado com sucesso no tratamento de câncer da tireóide cuja captação em dose/grama é estimada na literatura entre 0,05% e 0,2% [65].

TABELA 18: Dose Absorvida em cada órgão de interesse após administração de 0,111 MBq (30 μCi .) de DOTA-Tyr³-octreotato- ^{131}I em camundongos *Nude* com tumor de células AR42-J

Órgão	Dose absorvida (mGy/MBq)
Cérebro	$7,69 \times 10^{-6}$
Tumor	$2,64 \times 10^{-2}$
Pulmão	$1,2 \times 10^{-4}$
Coração	$2,41 \times 10^{-5}$
Baço	$3,58 \times 10^{-4}$
Fígado	$5,72 \times 10^{-4}$
Estômago	$3,15 \times 10^{-4}$
Pâncreas	$8,10 \times 10^{-4}$
Músculo Total	$1,25 \times 10^{-4}$
Rins	$3,29 \times 10^{-2}$
Sangue Total	$2,5 \times 10^{-4}$
Intestino Delgado	$1,1 \times 10^{-3}$
Intestino Grosso	$4,6 \times 10^{-3}$

5) CONCLUSÕES

1) No tocante à pureza radioquímica para baixa atividade, obteve-se alta pureza radioquímica utilizando-se razões molares peptídeo radioiodo até 0,54, ou seja, 37 MBq/ μ g do peptídeo (20 μ Ci/ μ g). Para altas atividades e razões molares peptídeo/radioiodo menores do que 0,54 obteve-se baixa pureza radioquímica. Estes resultados ocorreram tanto com a Cloramina T quanto com o Iodogen como oxidante.

2) A respeito da estabilidade da marcação observam-se melhores resultados após purificação do peptídeo marcado, que mantém boa pureza radioquímica até 24 horas com atividade até 370 MBq (10 mCi). Se a atividade utilizada na marcação for 74 MBq (2 mCi), a pureza radioquímica permanece perto de 90% até 24 horas, mesmo sem purificação.

3) A purificação com Sep-Pack[®] foi método eficiente para retirada do radioiodo livre do produto da marcação e é necessária se o peptídeo marcado com atividade de 370 MBq (10 mCi), ou mais, for armazenado por até 24 horas.

4) Quanto às espécies radioquímicas obtidas nas diferentes razões molares peptídeo/radioiodo observa-se, pelo estudos de CLAE, que há a obtenção preferencial de uma espécie radioquímica, provavelmente monoiodada, com menor tempo de retenção ao empregarmos razão molar 2,73. Com o decréscimo na razão molar peptídeo/radioiodo para 0,54 obtêm-se duas espécies radioquímicas em aproximadamente a mesma proporção: uma com o mesmo Rt da razão molar 2,73 e outra com Rt maior, provavelmente a espécie di-iodada. Já com a razão molar 0,27 observa-se uma espécie radioquímica predominante, com Rt da provável espécie di-iodada, mas com a razão 0,045 têm-se várias espécies radioquímicas.

5) A atividade biológica das espécies radioquímicas obtidas com as razões molares 2,73 e 0,54 difere nos órgãos de maior concentração de

receptores de SM tipo 2, como o tumor de células AR42J e pâncreas, sendo a razão 2,73 mais recomendada para utilização no diagnóstico e terapia dos tumores neuroendócrinos.

6) O DOTATATO-¹³¹I possui boa biodistribuição, com baixa captação hepática e rápido clareamento sanguíneo.

7) O DOTATATO-¹³¹I é radiofármaco promissor para utilização no diagnóstico e terapia de pacientes com tumores neuroendócrinos.

8) Estudos futuros sobre a dosimetria em pacientes com o DOTATATO-¹³¹I poderão ser efetuados para avaliar-se a utilização diagnóstica e terapêutica deste radiofármaco.

ANEXO A – Abreviaturas utilizadas

Palavra	Abreviatura
5-HIAA	ÁCIDO 5-HIDRÓXIINDOLEACÉTICO
CLAE	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
CNEN	COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR
CPM	CONTAGENS / MINUTO
GH	HORMÔNIO DE CRESCIMENTO
HYNIC	HIDRAZINONICOTINIL
ILGF-1	FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA-1
IPEN	INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
DOTA	ÁCIDO TETRAAZACI DODECANOTETRAACÉTICO
DOTATATO	DOTA-TYR ³ -OCTREOTATO
DTPA	ÁCIDO DIETILENOTRIAMINO PENTAACÉTICO
PET	TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE PÓSITRONS
RT	TEMPO DE RETENÇÃO
SSTR2	RECEPTOR TIPO 2 DA SOMATOSTATINA
SM	SOMATOSTATINA
SPECT	TOMOGRAFIA POR EMISSÃO DE FÓTON ÚNICO
TYR	RESÍDUO DE TIROSINA
TC	TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA
VIP	PEPTÍDEO INTESTINAL VASOATIVO

ANEXO B – Lista de Figuras

Figura	Página
1) Diferentes origens embrionárias geram preferencialmente determinados tipos de neoplasias	9
2) Grânulo neurosecretores em célula acinar do pâncreas	9
3) Anatomia fisiológica do pâncreas	10
4) Orientação do receptor SSTR2 na membrana plasmática	11
5) Linha do tempo mostrando a evolução das pesquisas até o desenvolvimento da terapia com peptídeo radiomarcado em 1992	12
6) Fotografia da lâmina do exame anátomo-patológico mostrando a pele, tecido muscular estriado e o tumor de células AR42J. Nota-se a arquitetura tecidual anômala no tecido tumoral.	31
7) Fotografia da lâmina do exame anátomo-patológico mostrando o tumor de células AR42J. Nota-se a arquitetura tecidual anômala no tecido tumoral e relação núcleo-citoplasma alterada.	31
8) Perfil cromatográfico de CLAE do produto marcado com razão molar peptídeo/radioiodo de 2,73.	40
9) Perfil cromatográfico de CLAE do produto marcado com razão molar peptídeo/radioiodo de 1,82.	40
10) Perfil cromatográfico de CLAE do produto marcado com razão molar peptídeo/radioiodo de 0,54.	41
11) Perfil cromatográfico de CLAE do produto marcado com razão molar peptídeo/radioiodo de 0,27.	41
12) Perfil cromatográfico de CLAE do produto marcado com razão molar peptídeo/radioiodo de 0,045.	42
13) Perfil cromatográfico do NaI- ¹³¹ I no CLAE com detetor radioativo	47
14) Perfil cromatográfico de CLAE em UV do DOTA-Tyr ³ -octreotato	47
15) Perfil eletroforético do NaI- ¹³¹ I	48
16) Perfil eletroforético do peptídeo DOTA-Tyr ³ -octreotato marcado com radioiodo	48

	68
417) Estabilidade <i>in vitro</i> da marcação do DOTA-Tyr ³ -octreotato- ¹³¹ I sem purificação e armazenado sob refrigeração (2 a 8° C)	50
18) Estabilidade <i>in vitro</i> da marcação do DOTA-Tyr ³ -octreotato- ¹³¹ I com purificação e armazenado sob refrigeração (2 a 8° C)	50
19) Estabilidade percentual <i>in vitro</i> em plasma humano a 37°C do DOTA-Tyr ³ -octreotato- ¹³¹ I obtido utilizando-se condição padrão de marcação com a Cloramina T	51
20) Captação tumoral do DOTA-Tyr ³ -octreotato marcado com ¹³¹ I no tumor AR42J em camundongos <i>Nude</i> (%dose/grama)	62

ANEXO C – Lista de tabelas

Número e Título	Página
1) Estruturas de análogos sintéticos da somatostatina	16
2) Afinidade de análogos da somatostatina pelo receptor SSTR2	17
3) Influência da variação da massa de peptídeo na pureza radioquímica do composto marcado	35
4) Influência da atividade do ^{131}I na pureza radioquímica do composto marcado	35
5) Resultados das marcações utilizando-se alta atividade de iodo	36
6) Efeito do tempo de reação na pureza radioquímica do peptídeo marcado	37
7) Pureza radioquímica média das marcações com Iodogen: estudo da variação da massa de Iodogen e atividade de marcação	43
8) Pureza radioquímica média das marcações com Iodogen em função de diferentes razões molares peptídeo/radioiodo	44
9) Pureza radioquímica após purificação com Sep-Pack [®]	45
10) Biodistribuição do DOTA-Tyr ³ -octreotato marcado com o ^{131}I na razão molar peptídeo/iodo de 2,73 (%dose/órgão) em camundongos <i>Swiss</i> normais até 24 horas	54
11) Biodistribuição do DOTA-Tyr ³ -octreotato marcado com o ^{131}I na razão peptídeo/iodo de 2,73 (%dose/grama) em camundongos <i>Swiss</i> normais até 24 horas	55
12) Biodistribuição do DOTA-Tyr ³ -octreotato marcado com o ^{131}I na razão peptídeo/iodo de 0,54 (%dose/órgão) em camundongos <i>Swiss</i> normais até 24 horas	56
13) Biodistribuição do DOTA-Tyr ³ -octreotato marcado com o ^{131}I na razão peptídeo/iodo de 0,54 (%dose/grama) em camundongos <i>Swiss</i> normais até 24 horas	57
14) Biodistribuição do DOTA-Tyr ³ -octreotato marcado com o ^{131}I na razão peptídeo/iodo de 2,73 (%dose/órgão) em camundongos <i>Nude</i> com tumor até 7 dias	58
15) Biodistribuição do DOTA-Tyr ³ -octreotato marcado com o ^{131}I	59

na razão peptídeo/iodo de 2,73 (%dose/grama) em camundongos *Nude* com tumor até 7 dias

16) Biodistribuição do DOTA-Tyr³-octreotato marcado com o ¹³¹I 60
na razão peptídeo/iodo de 0,54 (%dose/órgão) em camundongos *Nude* com tumor até 24 horas

17) Biodistribuição do DOTA-Tyr³-octreotato marcado com o ¹³¹I 61
na razão peptídeo/iodo de 0,54 (%dose/grama) em camundongos *Nude* com tumor até 7 dias

18) Dose Absorvida em cada órgão de interesse após administração de 63
0,111 MBq (30 µCi.) de DOTA-Tyr³-octreotato-¹³¹I em camundongos *Nude* com tumor de células AR42-J

7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) LYONS, A.S.; PETRUCELLI II, R.J. **Medicine. An illustrated history.** New York, N.Y.: Abradale Press, p. 596, 1987.
- 2) HIRST, B.H.. Secretin and the exposition of hormonal control. **J Physiol**, v.506, n.2, p. 339, 2004.
- 3) VINIK, A.. *Diffuse Hormonal Systems*. Chapter 1. Figure 2. Disponível em: <http://www.endotext.com/guthormones/guthormone1/guthormone1.htm>. Acesso em 04/02/2005.
- 4) KULKE, M.H.; MAYER, R.J.. Carcinoid tumors. **N Eng J Med**, v.340, p. 858-867, 1999.
- 5) FAUCI, A.S.; BRAUNWALD, E.; ISSELBACHER, K.J.; WILSON, J.D.; MARTIN, J.B.; KASPER, D.L.; HAUSER, S.L.; LONGO, D.L. **Harrison's Principles of Internal Medicine CD-ROM**: 14th Edition. New York, N.Y.: M^cGraw Hill, 1998.
- 6) VIRGOLINI, I; BRITTON, K.; BUSCOMBE, J.; MONCAVO, R.; PAGANELLI, G.; RIVA, P.. *In- and Y-DOTA-lanreotide: results and implications of the MAURITIUS trial.* **Semin Nucl Med**, v. 32, n.2, p. 148-155, 2002.
- 7) SAID S.I.; MUTT, V.. Isolation from porcine intestinal wall of vasoactive octacosapeptide related to secretin and to glucagons. **Eur J Biochem**, v. 28, p. 199-204, 1972.
- 8) BURGUS R.; LING, N.; BUTCHER, M.; GUILLEMIN, R.. Primary structure of somatostatin, a hypothalamic peptide that inhibits the secretion of pituitary growth hormone. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.**, v.70 (3), p.684-8, Mar, 1973.
- 9) OTTE, A.; JERMANN, E.; BEHE, M.; GOETZE, M.; BUCHER, H.C.; ROSER, H.W.; HEPPELER, A.; MUELLER-BRAND, J.; MAECKE, H.R.; DOTATOC: a powerful new tool for receptor mediated radionuclide therapy. **Eur J Nucl Med**, v.24,7, p. 792-95, 1997.
- 10) LAMBERTS, S.W.J.; LELY, A.V. D.; DE HERDER, W.W.; HOFLAND, L.J.. Drug therapy Octreotide. **N Eng J Med**, p. 246-254, Jan 1996.

- 11) BESSON, I.; INGRAND, P.; PERSON, B.; BOUTROUX, D.; HERESBACH, D.; BERNARD, P.; HOCHAIN, P.; LARRICQ, J.; GOURLAOUEN, A.; RIBARD, D.; KARA, N.M.; LEGOUX, J.L.; PILLEGAND, B.; BECKER, M.C.; CONTANZO, J. D.; METREAU, J.M.; SILVAIN, C.; BEAUCHANT, M.. Sclerotherapy with or without 1octreotide for acute variceal bleeding. ***N Engl J Med***, v. 333, p. 555-560, 1995.
- 12) BAKKER, W.H.; KRENNING, E.P.; BREEMAN, W.A.; KOPER, J.W.; KOOIJ, P.P.; REUBI, J.C.; KLIJN, J.G.; VISSER, T.J.; DOCTER, R.; LAMBERTS, S.W.. Receptor scintigraphy with a radioiodinated somatostatin analogue: radiolabeling, purification, biologic activity, and in vivo application in animals. ***J Nucl Med***, v.9, p. 1501-09, 1990.
- 13) BAKKER, W.H.; KRENNING, E.P.; BREEMAN, W.A.; KOOIJ, P.P.; REUBI, J.C.; KOPER, J.W.; DE JONG, M.; LAMERIS, J.S.; VISSER, T.J.; LAMBERTS, S.W.. In vivo use of a radioiodinated somatostatin analogue: dynamics, metabolism, and binding to somatostatin receptor-positive tumors in man. ***J Nucl Med***, v.32, p. 1184-89, 1991.
- 14) KWEKKEBOOM, D.J.; KRENNING, E.P.; BAKKER, W.H.; OEI, H.Y.; SPLINTER, T.A.; KHO, G.S.; LAMBERTS, S.W.. Radioiodinated somatostatin analog scintigraphy in small-cell lung cancer. ***J Nucl Med***, v. 32, p. 1845-48, 1991.
- 15) KRENNING, E.P.; BAKKER, W.H.; KOOIJ, P.P.; BREEMAN, W.A.; OEI, H.Y.; DE JONG, M.; REUBI, J.C.; VISSER, T.J.; BRUNS; C.; KWEKKEBOOM, D.J.. Somatostatin receptor scintigraphy with indium-111-DTPA-D-Phe-1-octreotide in man: metabolism, dosimetry and comparison with iodine-123-Tyr-3-octreotide. ***J Nucl Med***, v.33, p. 652-58, 1992.
- 16) BAKKER, W.H.; BREEMAN, W.A.; DE JONG, M.; VISSER, T.J.; KRENNING, E.P.. Iodine-131 labelled octreotide: not an option for somatostatin receptor therapy. ***Eur J Nucl Med***, v.23, p.775-781, 1996.
- 17) WESTER, H.J.; SCHOTTELIUS, M.; SCHEIDAHAUER, K.; REUBI, J.C.; WOLF, I.K.; SCHWAIGER, M.. Comparison of radioiodinated TOC, TOCA and Mtr-TOCA: the effect of carbohidration on the pharmacokinetics. ***Eur J Nucl Med***, v. 29, p. 28-38, 2002.

- 18) BREEMAN, W.A.P.; DE JONG, M.; KWEKKEBOOM, D.J.; VALKEMA, R.; BAKKER, W.H.; KOOIJ, P.P.M.; VISSER, T.J.; KRENNING, E.P.. Somatostatin receptor-mediated imaging and therapy: basic science, current knowledge, limitations and future perspectives. *Eur J Nucl Med*, v.28, n.9, p.1421-1429, 2001.

- 19) DE JONG, M.; BAKKER, W.H.; BREEMAN, W.A.; VAN DER PLUIJM, M.E.; KOOIJ, P.P.; VISSER, T.J.; DOCTER, R.; KRENNING, E.P.. Hepatobiliary handling of iodine-125-Tyr³-octreotide and indium-111-DTPA-D-Phe¹-octreotide by isolated perfused rat liver. *J Nucl Med*, v.34, p. 2025-30, 1993.

- 20) SIGNORE, A.; ANNOVAZZI, A.; CHIANELLI, M.; CORSETTI, F.; WIELE, C.V.; WATERHOUSE, R.N.; SCOPINARO, F.. Peptide radiopharmaceuticals for diagnosis and therapy. *Eur J Nucl Med*, v. 28, p.1555-1565, 2001.

- 21) ALBERT, R.; SMITH-JONES, P.; STOLZ, B.; SIMEON, C.; KNECH, H.; BRUNS, C.; PLESS, J.. Direct synthesis of [DOTA-DPhe¹]-Octreotide and [DOTA-Dphe¹, Tyr³]-Octreotide (SMT487): two conjugates for systemic delivery of radiotherapeutical nuclides to somatostatin receptor positive tumors in man. *Bioorganic Med Chem Lett*, v. 8, p. 1207-1210, 1998.

- 22) LENERS, N.; JAMAR, F.; FIASSE, R.; FERRANT, A.; PAUWELS, S.. Indium-111-pentetreotide uptake in endocrine tumors and lymphoma. *J Nucl Med*, v. 37, p. 916-922, 1996.

- 23) KRENNING, E.P.; KWEKKEBOOM, D.J.; OEI, H.Y.; DE JONG, R.J.; DOP, F.J.; REUBI, J.C.; LAMBERTS, S.W.. Somatostatin receptor scintigraphy in carcinoids, gastrinomas and Cushing's syndrome. *Digestion*, v.55 Suppl 3, p. 54-59, 1994.

- 24) VAN DE WIELE, C.; DUMONT, F.; VAN VELLE, S.; SLEGGERS, G.; PEERS, S.H.; DIERCKX, R.A.. Is there a role for agonist gastrin-releasing peptide receptor radioligands in tumour imaging? *Nucl Med Commun*, v.22, p.5-15. 2001.

- 25) MAINI, C.L.; SCIUTO, R.; TOFANI, A.; FERRAIRONI, A.; CARAPPELLA, C.M.; OCCHIPINTI, E.; MOTTOLESE, M.; CRECCO, M.. Somatostatin receptor imaging in CNS tumours using ¹¹¹In-octreotide. *Nucl Med Commun*, v.16, p.756-766, 1995.

- 26) FLETCHER, W.S.; LUM, S.S.; NANCE, R.W.; POMMIER, R.F.; O'DORISIO. The current status of somatostatin receptors in malignant melanoma. *Yale J Biol Med*, v.70, p.561-563, 1997.

- 27) BOMBARDIERI, E.; CHITI, A.; CRIPPA, F.; SEREGNI, E.; CATALDO, I.; MAFFIOLI, L.; SORESI, E.. ^{111}In -DTPA-D-Phe-1-octreotide scintigraphy of small cell lung cancer. **Q J Nucl Med**, v.39, Suppl 1, p. 104-107, 1995.
- 28) VAN EIJCK, C.H.; KWKKEBOOM, D.J.; KRENNING, E.P.. Somatostatin receptors and breast cancer. **Q J Nucl Med**, v. 42, p. 18-25, 1998.
- 29) KWEKKEBOOM, D.J.; VAN URK, H.; PAUW ,B.K.; LAMBERTS, S.W.; KOOIJ, P.P.; HOOGMA, R.P.; KRENNING, E.P.. Octreotide scintigraphy for the detection of paragangliomas. **J Nucl Med**, v.34, p. 873-78, 1993.
- 30) KWEKKEBOOM, D.J.; LAMBERTS, S.W. ; HABBEMA, J.D.; KRENNING, E.P.. Cost-effectiveness analysis of somatostatin receptor scintigraphy **J Nucl Med**, v.37, p. 886-892, 1996.
- 31) LEBTAHI, R.; CADIOT, G.; SARDA, L.; DAOU, D.; FARAGGI, M.; PETEGNIEF, Y.; MIGNON, M.; LE GULUDEC, D.. Clinical impact of somatostatin receptor scintigraphy in the management of patients with neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors. **J Nucl Med**, v.38, p. 853-858, 1997.
- 32) S ADAMS, R.P.; BAUM, A.; HERTEL, H.J.; WENISCH, E.; STAIB-SEBLER, G.; HERRMANN, A.; ENCKE; HOR, G.. Intraoperative gamma probe detection of neuroendocrine tumors. **J Nucl Med**, v. 39, p. 1155-1160, 1998.
- 33) GIBRIL, F.; JENSEN, R.T.. Diagnostic uses of radiolabelled somatostatin receptor analogues in gastroenteropancreatic endocrine tumours. **Dig Liver Dis**, v.36, Suppl 1, p.S106-20, Feb, 2004.
- 34) SCHILLACI, O.; SPANU, A.; SCOPINARO, F.; FALCHI, A.; DANIELI, R.; MARONGIU, P.; PISU, N.; MADEDDU, G.; DELLE FAVE, G.; MADEDDU, G.. Somatostatin Receptor Scintigraphy in Liver Metastasis Detection from Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. **J Nucl Med**, v. 44, p. 359-368, 2003.
- 35) GIBRIL, F.; REYNOLDS, JC; CHEN, C.C.; YU, F.; GOEBEL, S.U.; SERRANO, J.; DOPPMAN, J.L.; JENSEN, R.T.. Specificity of somatostatin receptor scintigraphy: a prospective study and effects of false-positive localizations on management in patients with gastrinomas. **J Nucl Med**, v.40, p. 539-553, 1999.
- 36) VALLABHAJOSULA, S.; MOYER, B.R.; LISTER-JAMES, J.; MCBRIDE, B.J.; LIPSZYC, H.; LEE, H.; BASTIDAS, D.; DEAN, R.T.. Preclinical evaluation of technetium-99m-labeled somatostatin receptor-binding peptides. **J Nucl Med**, v.37, p. 1016-1022, 1996.

- 37) BREEEMAN, W.A.P.; DE JONG, M.; KWEKKEBOOM, D.J.; VALKEMA, R.; BAKKER, W.H.; KOOIJ P.P.M.; VISSER, T.J.; KRENNING, E.P.. Somatostatin receptor-mediated imaging and therapy: basic science, current knowledge, limitations and future perspectives. *Eur J Nucl Med*, v.28, p. 1421-1429, 2001.
- 38) GABRIEL, M.; DECRISTOFORO, C.; DONNEMILLER, E.; ULMER, M.; WATFAH RYCHLINSKI, C.; MATHER, S.J.; MONCAYO, R.. An Inpatient Comparison of ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-TOC with ^{111}In -DTPA-Octreotide for diagnosis of Somatostatin Receptor-Expressing Tumors. *J Nucl Med*, v.44, p.708-716, 2003
- 39) CHAPMAN, E.M.. History of the discovery and early use of radioactive iodine. *JAMA*, v.250, n.15, p. 2042-44, 1983.
- 40) ANDERSSON, P.; FORSSELL-ARONSSON, E.; JOHANSON, V.; WANGBERG, B.; NILSSON, O.; JALLING, M. F.; AHLMAN, H.. Internalization of indium-111 into human neuroendocrine tumor cells after incubation with indium-111-DTPA-D-Phe1-octreotide. *J Nucl Med*, v.37, p. 2002-2006, 1996.
- 41) JALLING, M.F.; ANDERSSON, P.; FORSSELL-ARONSSON, E.; GREARSDOTTIR, J.; JOHANSSON, V.; TISELL, L.E.; WANGBERG, B.; NILSSON, O.; BERG, G.; MICHANEK, A.; LINDSTEDT, G.; AHLMAN, H.. Systemic radionuclide therapy using indium-111-DTPA-D-Phe1 octreotide in midgut carcinoid syndrome. *J Nucl Med*, v.37, p.1519-1521, 1996.
- 42) VIRGOLINI, I.; SZILVASI, I.; KURTARAN, A.; ANGELBERGER, P.; RADERER, M.; HAVLIK, E.; VORBECK, F.; BISCHOF, C.; LEIMER, M.; DORNER, G.; KLETTER, K.; NIEDERLE, B.; SCHEITHAUER, W.; SMITH-JONES P.. Indium-111-DOTA-Ianreotide: biodistribution, safety and radiation absorbed dose in tumor patients. *J Nucl Med*, v.39 p. 1928-1936, 1998.
- 43) CAPELLO, a.; KRENNING, E.P.; BREEEMAN, W.A.P.; BERNARD, B.F.; DE JONG, M.. Peptide Receptor Radionuclide Therapy In Vitro Using [^{111}In -DTPA0] Octreotide. *J Nucl Med*, v.44, p. 98-104, 2003.
- 44) PAGANELLI, G.; ZOBOLI, S.; CREMONESI, M.; BODEI, L.; FERRARI, M.; GRANA, C.; BARTOLOMEI, M.; ORSI, F.; DE CICCIO, MACKE, H.R.; CHINOL M.; DE BRAUD, F.. Receptor-mediated radiotherapy with ^{90}Y -DOTA-D-Phe1-Tyr3-octreotide. *Eur J Nucl Med*, v.28(4), p. 426-34, Apr 2001.

- 45) REUBI, J.C.; SCHAR, J.C.; WASER, B.; WENGER, S.; HEPPELER, A.; MACKE, H.R.. Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes SST1-SST5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use. **Eur J Nucl Med**, v.27(3), p. 273-82, Mar 2000.
- 46) OTTE, A.; HERRMANN, R.; HEPPELER, A.; BEHE, M.; JERMANN, E.; POWELL, P.L.; MAECKE, H.R.; MULLER, J.. Yttrium-90 DOTATOC: first clinical results. **Eur J Nucl Med**, v.26, p. 1439-1447, 1999.
- 47) OTTE, A.; MUELLER-BRAND, J.; DELLAS, S.; NITZSCHE, E.U.; HERMANN, H.R.M.. Yttrium-90-labelled somatostatin-analogue for cancer treatment. **Lancet**, v.351, p. 417-418, 1998.
- 48) KWEKKEBOOM, D.J.; BAKKER, W.H.; KOOIJ, P.P.; KONIJNENBERG, M.; SRINIVASAN, A.; ERION, J.L.; SCHMIDT, M.A.; BUGAJ, J.L.; DE JONG, M.; KRENNING, E.P.. [¹⁷⁷Lu-DOTA⁰Tyr³]octreotate comparison with [¹¹¹In DTPA]octreotide in patients. **Eur J Nucl Med**, v.28(9), p. 1319-25, 2001.
- 49) BERNARD, B.F.; KRENNING, E.P.; BREEMAN, W.A.P.; ROLLEMAN, E.J.; BAKKER, W.H.; VISSER, T.J.; MÄCKE, H.; JONG, M.. D-Lysine reduction of indium-111 octreotide and yttrium-90 octreotide renal uptake. **J Nucl Med**, v.38, p.1929-1933, 1997.
- 50) BEHR, T.M.; GOLDENBERG, D.M.; BECKER, W.. Reducing the renal uptake of radiolabeled antibody fragments and peptides for diagnosis and therapy: present status, future prospects and limitations. **Eur J Nucl Med**, v.25, p. 201-212, 1998.
- 51) SCHUMACHER, T.; WALDHERR, C.; MUELLER-BRAND, J.; MAECKE, H.. Kidney failure after treatment with ⁹⁰Y-DOTATOC. **Eur J Nucl Med**, v.29, p. 435, 2002.
- 52) BOERMAN, O.C.; OYEN, W.J.G.; CORSTENS, F.H.M.. Between the Scylla and Charybdis of peptide radionuclide therapy: hitting the tumor and saving the kidney. **Eur J Nucl Med**, v.8, p. 1447-1449, 2001.
- 53) CYBULLA, M.; WEINER, S.M.; OTTE, A.. End-stage renal disease after treatment with ⁹⁰Y-DOTATOC. **Eur J Nucl Med**, v.28, p. 1552-1554, 2001.
- 54) KWEKKEBOOM, D.J.; BREEMAN, W.A.; BAKKER, W.H.; SMITH, C.; PAUWELS, S.; KRENNING, E.P.. Somatostatin receptor-targeted radionuclide therapy of tumors: preclinical and clinical findings. **Semin Nucl Med**, v.32(2), p. 133-40, 2002.

- 55) DE JONG, M.; BREEMAN, W.A.; BERNANRD, B.F.; BAKKER, W.H.; SCHAA, M.; VAN GAMEREN, A.; BUGAJ, J.E.; ERION, J.; SCHMIDT, M.; SRINIVASAN, A.; KRENNING, E.P.. [¹⁷⁷Lu-DOTA(0),Tyr³] octreotate for somatostatin receptor-targeted radionuclide therapy. *Int J Cancer*, v.92(5), p. 628-33, 2001.
- 56) LEWIS, J.S.; LEWIS, M.R.; CUTLER, P.D.; SRINIVASAN, A.; SCHMIDT, M.A.; SCHAWARZ, S.W.; MORRIS, M.M.; MILLER, J.P.; ANDERSON, C.J.. Radiotherapy and dosimetry of ⁶⁴Cu-TETA-Tyr³-octreotate in a somatostatin receptor-positive, tumor bearing rat model. *Clin Cancer Res*, v.5(11), p. 3608-16, 1999.
- 57) WALDHERR, C.; PLESS, M.; MAECKE, H.R.; SCHUMACHER, T.; CRAZZOLARA, A.; NITZSCHE, E.U.; HALDEMANN, A.; MUELLER-BRAND.. Tumor response and clinical benefit in neuroendocrine tumors after 7.4 GBq (⁹⁰Y-DOTATOC. *J Nucl Med*, v.43(5), p. 610-6, 2002.
- 58) WALDHERR, C.; PLESS, M.; MAECKE, H.R.; HALDEMANN, A.; MUELLER-BRAND, J.. The clinical value of [⁹⁰Y-DOTA]-D-Phe1-Tyr3-octreotide (⁹⁰Y-DOTATOC) in the treatment of neuroendocrine tumours: a clinical phase II study. *Ann Oncol*, v.12(7), p. 941-5, Jul 2001.
- 59) KWEKKEBOOM, D.J.; MUELLER-BRAND, J.; PAGANELLI, G.; ANTHONY, L.B.; PAUWELS, S.; KVOLS, L.K.; O'DORISIO, T.M.; VALKEMA, R.; BODEI, L.; CHINOL, M.; MAECKE, H.R.; KRENNING, E.P.. Overview of Results of Peptide Receptor radionuclide Therapy with 3 Radiolabeled Somatostatin Analogs. *J Nucl Med*, v.46, p. 62S–66S, 2005.
- 60) LEWIS, J.S.; WANG, M.; LAFOREST, R.; WANG, F.; ERION, J.L.; BUGAJ, J.E.; SRINIVASAN, A.; ANDERSON, C.J.. Toxicity and dosimetry of Lu-177-DOTA-Y3-octreotate in a rat model. *Int J of Cancer*, v.94(6), p. 873-877, 2001.
- 61) DE JONG, M.; VALKEMA, R.; JAMAR, F.; KVOLS, L.K.; KWEKKEBOOM, D.J.; BREEMAN, W.A.; BAKKER, W.H.; SMITH, C.; PAUWELS, S.; KRENNING, E.P.. Somatostatin receptor-targeted radionuclide therapy of tumors: preclinical and clinical findings. *Semin Nucl Med*, v.32(2), p. 133-40, Apr 2002.
- 62) BERNHARDT, P.; KOLBY, L.; JOHANSON, V.; BENJEGARD, S.A.; NILSSON, O.; AHLMAN, H.; FORSSELL-ARONSSON, E.. Biokinetics of ¹¹¹In-DTPA-D-Phe(1)-octreotide in *Nude* mice transplanted with a human carcinoid tumor. *Nucl Med Biol*, v.28(1), p. 67-73, Jan 2001.

- 63) SALACINSKI, P.R.; MCLEAN, C.; SYKES, J.E.; CLEMENTE-JONES, V.V.; LOWRY, P.J.. Iodination of proteins, glycoprotein and peptides using a solid-phase oxidizing agent 1,3,4,6 tetrachloro-3 α ,6 α difenilglicoluril (Iodogen). ***Analytical Biochem***, v. 117, p 136-146, 1981.
- 64) ARAÚJO, E.B.; CALDEIRA FILHO, J.S.; NAGAMATI, L.T.; MURAMOTO, E.; COLTURATO, M.T.; COUTO, R.; OKASAKI, K.; SUZUKI, M.F.; GUIMARAES, M.I.C.C.. Comparative evaluation of therapeutic radiopharmaceuticals. ***Research Co-ordination Meeting, Vienna, 8-11 November 2005. (IAEA Research Agreement BRA-12123)***.
- 65) ARNSTEIN, N.B.; CAREY, J.E.; SPAULDING, S.A.; SISSON, J.C.. Determination of iodine-131 diagnostic dose for imaging metastatic thyroid cancer. ***J Nucl Med***, v.27, p. 1764-69, 1986.