

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

**AVALIAÇÃO DA RADIOMARCAÇÃO DA ANEXINA A5 COM TECNÉCIO-
99m: INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE MARCAÇÃO NAS PROPRIEDADES
FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DO COMPOSTO**

JOSEFINA DA SILVA SANTOS

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

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

SÃO PAULO
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao Senhor meu Deus

Por ter me dado o Dom mais precioso do Universo - a Vida;

Por ter estado e continuar sempre ao meu lado.....

Dedico este trabalho também à minha família, razão de tudo

Mãe, agradeço a cada dia por estar comigo, este trabalho é também fruto do seu esforço e dedicação incondicional.

Filha, agradeço pela sua existência, este trabalho é também fruto da sua maturidade e dedicação em entender a minha ausência.

Irmã, agradeço pelo apoio, este trabalho é também fruto do seu entusiasmo muitas vezes maior que o meu e dedicação afetiva.

Pai, obrigada.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Elaine, minha orientadora, pela confiança e compreensão diante às minhas inúmeras dificuldades, pela paciência e amizade em todo este tempo de convivência e pelo tempo que ainda há de vir;

À Dra. Kayo pela autorização e orientação para utilização do microscópio;

À Miriam Suzuki pelas horas incansáveis de contribuição que foram essenciais à realização deste trabalho;

À Elizabeth Somessari e Carlos Gaia do Centro de Tecnologia das Radiações e ao Dr. Patrick do Centro de Biotecnologia pela disposição e disponibilidade em nos ajudar;

À Dra. Emiko pelo apoio e ensinamentos que perdurarão para sempre;

À Msc. Marycel Figolz de Barbosa e à Dra. Maria Tereza Colturato pelo incentivo constante levando-me a esperança e vontade de vencer;

À Dra. Áurea pelo vasto conhecimento transmitido, pela amizade e apoio;

À Márcia e Renata pela solidariedade, companheirismo e amizade que em muitos momentos foram o meu alicerce durante o percurso do meu doutorado;

À Lílian, Carlos, Rosalina e Sara pelo apoio, ajuda, carinho e paciência durante este tempo, obrigada pela amizade;

Às Msc. Aline e Priscilla não só pelo exemplo de profissionalismo, mas também pelos momentos de prazer e descontração mesmo diante das responsabilidades exigidas em diversas situações, obrigada pela amizade;

À Adriana Ferreira, Ana Cristina, Gleide Alencar, Márcia Cristina, Sandra Mara, pois existem pessoas que mesmo à distância emitem energia, apoio e amizade;

Aos meus irmãos científicos Laura, Adriana, Akin, Kátia, Rose, Tati e Érika (adotiva), pela agradável convivência e solidariedade, obrigada pela amizade;

Ao Dr. José Caldeira pelo convívio, apoio e força nos momentos de dificuldade, obrigada pela amizade;

À Rosana Herreiras pelas horas que com seu sorriso me fez voltar a acreditar que valia a pena continuar;

À Patrícia pelo incentivo contagiante, sempre;

À toda equipe da DIRF, em especial aos servidores do Controle de Qualidade, pelas conversas e risadas, pela assistência e presteza com que sempre me atenderam;

Ao Serviço de Moradia da COSEAS, no papel das assistentes sociais em especial a Eliane, da Dra. Ideko, do Robson, do Thiago, do "Seu" Renato, meu mais sincero obrigada pela ajuda, compreensão e ouvidos;

Às pessoas que passaram ou ainda estão no CRUSP, Carla, Cássia, Dami, Karina, Mari, Mônica, D. Rosa, Alex, obrigada pela companhia, pelas gargalhadas pelo carinho, enfim por me aturarem;

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho, seja com uma palavra de incentivo, um sorriso ou pelo simples fato de acreditarem que eu seria capaz;

Ao CNPq pelo apoio financeiro concedido.

Muito obrigada!!!

*"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."*

Martin Luther King

AVALIAÇÃO DA RADIOMARCAÇÃO DA ANEXINA A5 COM TECNÉCIO-^{99m}: INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE MARCAÇÃO NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DO COMPOSTO

Josefina da Silva Santos

RESUMO

Anexina A5 (ANXA5) é uma proteína intracelular humana de 36kDa com alta afinidade pela fosfatidilserina que é seletivamente externalizada na superfície de células apoptóticas. A apoptose apresenta um papel importante na fisiologia normal e em numerosos estados patológicos. A aplicação clínica da ANXA5 em imagem da apoptose tem sido desenvolvida em oncologia, transplante de órgãos e doenças cardiovasculares. Várias estratégias para radiomarcagem da proteína têm sido descritas, incluindo marcação direta, derivatização com quelante bifuncional (BFC), produção de proteína mutante ou peptídeos análogos. Muitas técnicas de marcação com ^{99m}Tc têm sido descritas utilizando diferentes núcleos, tais como [Tc=O]⁺³, [^{99m}Tc]HYNIC, [Tc≡N]⁺² e [Tc(CO₃)]⁺¹. Neste estudo, avaliamos a influência do núcleo de ^{99m}Tc no comportamento biológico e propriedades físico-químicas da anexina radiomarcada. A radiomarcagem utilizando o núcleo [Tc≡N]⁺² foi realizada em duas etapas incluindo a reação do ^{99m}TcO₄⁻ com SDH na presença de SnCl₂ e PDTA para obter o intermediário ^{99m}TcN-SDH, seguida da adição de ANXA5. Os resultados obtidos não estão em acordo com a literatura, apesar da alta eficiência na produção do intermediário. O núcleo [Tc=O]⁺³ foi produzido usando a etilenodicitosina

(EC) como BFC. Para derivatização empregou-se o TSTU para obter o éster succinato correspondente. Diferentes razões de ANXA5:EC foram estudadas e todas as condições de marcação resultaram em alta pureza radioquímica, porém diferenças foram observadas na lipofilicidade, estabilidade, distribuição biológica e afinidade por células apoptóticas. A ANXA5-HYNIC também produziu a proteína radiomarcada com alta pureza radioquímica. A estabilidade das ANXA5 radiomarcadas foi avaliada após incubação à temperatura ambiente, a 2–8°C e em incubação em soro humano a 37°C. A análise destes resultados demonstrou que a ANXA5-EC-^{99m}Tc (razão 10⁻²) foi o composto mais estável em todas as condições estudadas. O ensaio de coeficiente de partição demonstrou que os compostos do EC apresentam uma menor lipossolubilidade em relação a ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc. A atividade biológica das anexinas radiomarcadas foi avaliada em células PC-3 com apoptose radioinduzida demonstrando que a ANXA5-EC-^{99m}Tc (razão 10⁻²) foi a proteína com maior porcentagem de ligação específica. A biodistribuição *in vivo* das anexinas radiomarcadas demonstrou uma alta captação na região abdominal, especialmente para a ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc. Os resultados indicam que ANXA5-EC-^{99m}Tc (razão 10⁻²) pode ser uma alternativa atrativa para o uso da ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc em imagem de receptores de fosfatidilserina.

EVALUATION OF RADIOLABELING OF ANNEXIN A5 WITH TECHNETIUM-99m: INFLUENCE OF THE LABELING METHODS ON PHYSICO-CHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE COMPOUNDS

Josefina da Silva Santos

ABSTRACT

Annexin A5 (ANXA5) is an intracellular human protein of 36 kDa with high affinity for membrane-bound phosphatidylserine that is selectively exposed on the surface of cells undergoing apoptosis. Apoptosis is important in normal physiology and in numerous pathologic states. Clinical applications for ANXA5 imaging are being developed in oncology, organ transplantation and cardiovascular diseases. Many strategies to radiolabel the protein have been described, including direct labeling, derivatization through a bifunctional chelating agent (BFC), production of mutated protein or peptide analogs. Several ^{99m}Tc -labeling techniques have been reported using different cores, including $[\text{Tc}=\text{O}]^{+3}$, $[\text{Tc}]\text{HYNIC}$, $[\text{Tc}\equiv\text{N}]^{+2}$ and $[\text{Tc}(\text{CO}_3)]^{+1}$. In this study, we evaluated the influence of ^{99m}Tc cores on biological behavior and physico-chemical properties of radiolabeled annexin. Radiolabeling procedure using $[\text{Tc}\equiv\text{N}]^{+2}$ core was a two-step procedure including the reaction of $^{99m}\text{TcO}_4^-$ with SDH in the presence of SnCl_2 and PDTA to obtain the intermediate $^{99m}\text{TcN-SDH}$, and successive addition of ANXA5. The results obtained were not satisfactory, despite the high efficiency in the production of the intermediate. The $[\text{Tc}=\text{O}]^{+3}$ core was produced using the ethylenedicysteine (EC) as BFC. TSTU was

employed in the derivatization to produce the corresponding hydroxysuccinimide ester. Different ANXA5:EC ratios were studied and all labeling conditions resulted in high radiochemical yield but with differences in lipophilicity, stability, biological distribution and affinity for apoptotic cells. The HYNIC-ANXA5 also produced the labeled protein with high radiochemical yield. The stability of the radiolabeled ANXA5 was evaluated after storing at room temperature, at 2 - 8° C and in human serum at 37° C. The analysis of these results showed that the ^{99m}Tc -EC-ANXA5 (ratio 10^{-2}) was the most stable compound in all the studied conditions. Partition coefficient assay resulted in lower lipophilicity for EC-complexes than ^{99m}Tc -HYNIC-ANXA5. The biological activity of radiolabeled annexins was studied in PC-3 cells with radiation induced apoptosis showing that ^{99m}Tc -EC-ANXA5 (ratio 10^{-2}) was the protein with higher percentage of specific binding. *In vivo* biodistribution of the radiolabeled annexins showed a high uptake in the abdominal region, especially for the HYNIC compound. The results indicated that ^{99m}Tc -EC-ANXA5 (10^{-2}) may be an attractive alternative to ^{99m}Tc -HYNIC-ANXA5 for the *in vivo* imaging of phosphatidylserine receptors.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	Alterações celulares no processo de apoptose	32
FIGURA 2:	Sequência de aminoácidos (A) e estrutura tridimensional (B) da proteína ANXA5.....	38
FIGURA 3:	Estrutura da ANXA5 radiomarcada com ^{64}Cu ou $^{67}\text{Ga}/^{68}\text{Ga}$ ($^{\text{A}}\text{X}$) utilizando o quelante DOTA.....	43
FIGURA 4:	Estrutura do Tecnécio ligado a diferentes quelantes....	58
FIGURA 5:	Estrutura dos núcleos comumente utilizados na radiomarcagem de biomoléculas com tecnécio.....	60
FIGURA 6:	Complexos com núcleo $[\text{Tc} = \text{O}]^{3+}$: (A) $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO-}d,l\text{-HMPAO}]^0$, (B) $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO-L,L-EC}]$, (C) $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO(MAG}_3\text{)}]^-$, (D) $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO(glucoheptonato)}_2]^-$	61
FIGURA 7:	Complexos de tecnécio utilizando o núcleo $[\text{Tc} \equiv \text{N}]^{2+}$: (A) $[\text{TcN(Ph}_2\text{PCH}_2\text{CH}_2\text{S)}_2]^0$, (B) $[\text{TcN(S}_2\text{CNEt}_2)_2]^{-2}$, (C) heterocomplexo assimétrico da forma $[\text{TcN(PXP)(XY)}]$, (D) $[\text{TcN(Ferroceneditiocarboxilato)}_2]^+$	62
FIGURA 8:	Esquema de obtenção do núcleo tecnécio tricarbonila..	63
FIGURA 9:	Reação de redução do MTS a formazan.....	78
FIGURA 10:	Sequência do ensaio de ligação de ANXA5- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ às células apoptóticas.....	81
FIGURA 11:	Efeito da concentração do estanho e do tempo de reação na obtenção do intermediário $^{99\text{m}}\text{TcN}^{+2}$	87

FIGURA 12:	Perfil de CLAE (radioativo) do $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (A) e $^{99m}\text{TcN-SDH}$ (B); coluna: C-18 4,6 x 250 mm, 5 μm ; solventes gradiente de 0 - 50% até 3 minutos e de 50 - 70% até 13 minutos de metanol em água; Fluxo: 1,0 mL min^{-1}	89
FIGURA 13:	Perfil de CLAE (radioativo) do $^{99m}\text{TcN-SDH}$ (A) e da mistura de marcação supostamente contendo ANXA5-SDH- ^{99m}TcN (B); coluna: ultrahidrogel 7,8 X 30 cm; Tampão fosfato de sódio 0,05M, NaCl 0,15M e N_3Na 1mM (sistema isocrático); Fluxo: 0,5mL min^{-1}	91
FIGURA 14:	Perfil esquemático da cromatografia em ITLC-SG da ANXA5-HYNIC- ^{99m}Tc e possíveis impurezas da reação utilizando diferentes solventes.....	93
FIGURA 15:	Perfil de CLAE (radioativo) da Anexina A5-HYNIC- ^{99m}Tc ; coluna: ultrahidrogel 7,8 X 30 cm; Tampão fosfato de sódio 0,05M, NaCl 0,15M e N_3Na 1mM (sistema isocrático); Fluxo: 0,5mL min^{-1}	94
FIGURA 16:	Perfil de CLAE (radioativo) do $^{99m}\text{TcO}_4^-$; coluna: ultrahidrogel 7,8 X 30 cm; Tampão fosfato de sódio 0,05M, NaCl 0,15M e N_3Na 1mM (sistema isocrático); Fluxo: 1mL min^{-1}	95
FIGURA 17:	Esquema de obtenção da ANXA5-EC- ^{99m}Tc	96
FIGURA 18:	Perfil esquemático da cromatografia em ITLC-SG da ANXA5-EC- ^{99m}Tc e possíveis impurezas da reação utilizando diferentes solventes.....	100
FIGURA 19:	Perfil de CLAE (radioativo) da ANXA5-EC- ^{99m}Tc nas relações molares estudadas 10^{-2} (A); 10^{-4} (B); 10^{-5} (C); utilizando coluna de exclusão molecular ultrahidrogel (7,8 X 30 cm); Tampão fosfato de sódio 0,05M, NaCl 0,15M e N_3Na 1mM (sistema isocrático);	

	fluxo 0,5mL min ⁻¹	103
FIGURA 20:	Estabilidade da ANXA5-HYNIC- ^{99m} Tc, ANXA5-EC- ^{99m} Tc (10 ⁻²) e ANXA5-EC- ^{99m} Tc (10 ⁻⁵) em temperatura ambiente.....	105
FIGURA 21:	Perfil de migração da ANXA5-EC- ^{99m} Tc (10 ⁻⁵) em ITLC-SG e etanol 85% a temperatura ambiente.....	106
FIGURA 22:	Estabilidade da ANXA5-HYNIC- ^{99m} Tc, ANXA5-EC- ^{99m} Tc (10 ⁻²) e ANXA5-EC- ^{99m} Tc (10 ⁻⁵) após incubação à temperatura de 2 - 8° C.....	107
FIGURA 23:	Estabilidade em soro humano da ANXA5-HYNIC- ^{99m} Tc, ANXA5-EC- ^{99m} Tc (10 ⁻²) e ANXA5-EC- ^{99m} Tc (10 ⁻⁵).....	108
FIGURA 24:	Viabilidade metabólica das células PC-3 48 horas após a irradiação com 6 Gy. A viabilidade metabólica foi medida pelo teste com o MTS.....	111
FIGURA 25:	Curva de ligação da ANXA5-EC- ^{99m} Tc (10 ⁻²) nas células PC-3 irradiadas (2,2 x 10 ⁴ células por tubo)....	113
FIGURA 26:	Curva do clareamento sanguíneo da ANXA5-HYNIC- ^{99m} Tc, ANXA5-EC- ^{99m} Tc (10 ⁻²) e ANXA5-EC- ^{99m} Tc(10 ⁻⁵)	127

LISTA DE TABELAS

TABELA 1:	Relação da apoptose com algumas doenças.....	33
TABELA 2:	Áreas da medicina para aplicação da imagem cintilográfica de apoptose.....	35
TABELA 3:	Vantagens e desvantagens das diferentes metodologias de radiomarcção da ANXA5.....	51
TABELA 4:	Complexos de tecnício com diferentes estados de oxidação.....	55
TABELA 5:	Massa de EC, TSTU, ANXA5 e relações molares ANXA5:EC utilizadas na derivatização da ANXA5 com o EC.....	72
TABELA 6:	Sistemas de CCD utilizados para análise da pureza radioquímica das diferentes técnicas de radiomarcção da ANXA5 com ^{99m}Tc	74
TABELA 7:	Efeito da variação da massa de PDTA sobre a formação do intermediário $^{99m}\text{TcN-SDH}$	88
TABELA 8:	Tempos de retenção em CLAE (detetor UV, 220 nm) das ANXA5-EC derivatizadas utilizando diferentes relações proteína:quelante em coluna C4 e gradiente linear de 0 a 100% de TFA:acetonitrila em TFA:água como fase móvel por 20 minutos.....	97

TABELA 9:	Avaliação por ITLC-SG da ANXA5 radiomarcada pelo método do EC, utilizando as diferentes relações molares ANXA5:EC - porcentagem das diferentes espécies radioquímicas identificadas para os diferentes solventes.....	98
TABELA 10:	Coeficiente de partição (CP) n-octanol:água da ANXA5- ^{99m} Tc radiomarcada pelas diferentes metodologias.....	109
TABELA 11:	Viabilidade das células PC-3 48 horas após a exposição a diferentes doses de irradiação.....	110
TABELA 12:	Porcentagem da atividade da ANXA5- ^{99m} Tc radiomarcada pelas diferentes metodologias ligada às células PC-3 irradiadas (ligação específica) e não irradiada (ligação inespecífica).....	114
TABELA 13:	Biodistribuição do composto ANXA5-HYNIC- ^{99m} Tc em camundongos Swiss sadios (% Atividade administrada/Tecido).....	115
TABELA 14:	Biodistribuição do composto ANXA5-HYNIC- ^{99m} Tc em camundongos Swiss sadios (% Atividade administrada/grama).....	116
TABELA 15:	Biodistribuição do composto ANXA5-EC- ^{99m} Tc (10 ⁻⁵) em camundongos Swiss sadios (% Atividade administrada/Tecido).....	117
TABELA 16:	Biodistribuição do composto ANXA5-EC- ^{99m} Tc (10 ⁻⁵) em camundongos Swiss sadios (% Atividade administrada/grama).....	118
TABELA 17:	Biodistribuição do composto ANXA5-EC- ^{99m} Tc (10 ⁻²) em camundongos Swiss sadios (% Atividade administrada/Tecido).....	119
TABELA 18:	Biodistribuição do composto ANXA5-EC- ^{99m} Tc (10 ⁻²)	

	em camundongos Swiss sadios (% Atividade administrada/grama).....	120
TABELA 19:	Captação da atividade nas patas dos animais com foco de inflamação aguda, após 1,5 horas da injeção do radiofármaco.....	124
TABELA 20:	Relações entre captação da atividade da ANXA5 radiomarcadas pelas diferentes metodologias nas patas dos animais com foco de inflamação aguda e sangue circulante.....	125
TABELA 21	Parâmetros farmacocinéticos da ANXA5-HYNIC- ^{99m} Tc, ANXA5-EC- ^{99m} Tc (10 ⁻⁵) e ANXA5-EC- ^{99m} Tc (10 ⁻²) calculados pelo programa Biexp.....	129

LISTA DE ABREVIATURAS

ACD	Tampão citrato dextrose pH 5
AIDS	Síndrome de deficiência imunológica adquirida
AIF	Fator indutor de apoptose
Ala	Alamina
ANXA5	Anexina A5
ATP	Trifosfato de adenosina
BFC	Quelante bifuncional
BE	Brometo de etídio
BFC	Quelante bifuncional
BM	Biomolécula
Bq	Bequerel
BTAP	4,5-bis(tioacetamido)pentanoil
CB	Centro de Biotecnologia
CCD	Cromatografia em camada delgada
CH₃CN	Acetonitrila
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CP	Coefficiente de Partição
Cys	cisteína
DIRF	Diretoria de Radiofarmácia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOTA	Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetracético
DTPA	Ácido dietilenotriaminopentacético
EC	Etilenodicisteína
EDDA	Ácido etilenodiamino-N,N'-diacético

EDC	1-etil-3-(3-dietilaminopropil) carbodiimida-HCl
Fas	Membro da família dos receptores TNF
× g	Força centrífuga
Gly	Glicina
Gy	Gray
His	Histidina
HYNIC	Hidrazinonicotinamida
iodogen	1,3,4,6-tetracloro-3 α 6 α -difenilglicouril
IL-1	Interleucina 1
IPEN	Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares
K₁₀	Constante de transferência do espaço vascular para o sistema excretor
K₁₂	Constante de transferência do espaço vascular para o extravascular
K₂₁	Constante de transferência do espaço extravascular para o vascular
K_{ss}	Constante de eliminação
kDa	quilodalton
MAG₃	Ácido mercaptoacetiltriglicina
MTS	3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)2H-tetrazolina
NaCl	Cloreto de sódio
nm	nanômetro
PBS	Tampão fosfato-salino pH 7,4
PC-3	Linhagem celular de adenocarcinoma de próstata humano
PDTA	Ácido propilenodiaminotetraacético
PET	Tomografia por Emissão de Pósitron
PET-CT	Tomografia por Emissão de Pósitron - Tomografia Computadorizada

pH	Potencial hidrogênico
PnAO	Propileno amina oxima
PS	Fosfatidilserina
PSR	Receptores para fosfatidilserina
R_f	Fator de retenção
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minutos
SAv	Biotina-estreptavidina
SBCAL	Sociedade Brasileira de ciência em animais de Laboratório
SDH	Dihidrazida succínica
Ser	Serina
SFB	Soro fetal bovino
SIB	Benzoato de iodo succinimidila
SPECT	Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único
Sulfo-NHS	N-hidroxisulfosuccinimida
TFA	Ácido trifluoracético
TNF	Fator de necrose tumoral
TR	Tempo de retenção
TSTU	Tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
T_{1/2}	Tempo de meia-vida física
%	Porcentagem
%AI/g	Porcentagem da atividade injetada em um grama de um determinado tecido
%AI/mL	Porcentagem da atividade injetada em um mililitro
%AI	Porcentagem de atividade injetada em um determinado tecido

SUMÁRIO

	Página
1	INTRODUÇÃO..... 23
2	OBJETIVOS..... 27
2.1	Objetivo geral..... 27
2.2	Objetivos específicos..... 27
3	REVISÃO DA LITERATURA..... 29
3.1	Medicina Nuclear..... 29
3.2	Apoptose..... 30
3.2.1	Fosfotidilserina..... 33
3.2.2	Imagem de apoptose..... 34
3.3	Anexina..... 36
3.4	Radiomarcção da anexina A5..... 39
3.4.1	Anexina A5 Radioiodada..... 40
3.4.2	Anexina A5 marcada com Flúor-18..... 41
3.4.3	Anexina A5 marcada com cobre-64..... 41
3.4.4	Anexina A5 marcada com gálio..... 42
3.4.5	Anexina A5 marcada com tecnécio-99m..... 43
3.5	Tecnécio..... 53
3.5.1	Núcleos de tecnécio..... 59
3.5.1.1	Núcleo óxido de tecnécio - $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}=\text{O}]^{3+}$ 60
3.5.1.2	Núcleo tecnécio nitrido - $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}\equiv\text{N}]^{2+}$ 61
3.5.1.3	Núcleo $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ 62
3.5.1.4	Núcleo $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC}]$ 63
3.6	Controle Radioquímico..... 64
4	MATERIAS E MÉTODOS..... 66
4.1	Infraestrutura..... 66

4.2	Materiais.....	66
4.2.1	Reagentes e Soluções.....	66
4.2.2	Materiais, equipamentos e sistemas.....	67
4.2.3	Outros.....	68
4.2.4	Animais.....	69
4.2.5	Células PC-3 derivadas de adenocarcinoma de próstata humano.....	69
4.3	Métodos	69
4.3.1	Radiomarcção da ANXA5.....	69
4.3.1.1	Técnica de radiomarcção direta utilizando-se dihidrazida succínica (SDH).....	70
4.3.1.2	Técnica de radiomarcção indireta utilizando etilenodicitseína (EC).....	71
4.3.1.3	Radiomarcção do reagente de ANXA5-HYNIC com ^{99m} Tc.....	72
4.3.2	Controle de pureza radioquímica das marcações.....	73
4.3.3	Análise da Estabilidade.....	74
4.3.3.1	Análise da estabilidade após armazenamento à temperatura ambiente ou à 2-8° C.....	74
4.3.3.2	Análise da estabilidade em soro humano.....	75
4.3.4	Determinação do coeficiente de partição experimental (CP).....	75
4.3.5	Estudos de ligação <i>in vitro</i>	75
4.3.5.1	Produção de apoptose radioinduzida em células PC-3	76
4.3.5.2	Estudo de ligação.....	79
4.3.6	Estudos <i>in vivo</i>	82
4.3.6. 1	Estudos de biodistribuição.....	82
4.6.3.2	Estudos farmacocinéticos em camundongos <i>Swiss</i> sadios.....	83
4.6.4	Análise Estatística.....	85
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	86
5.1	Técnica de radiomarcção da anexina A5 utilizando a	

	SDH.....	86
5.1.1	Obtenção do intermediário ^{99m} TcN-SDH.....	86
5.1.2	Acoplamento do ^{99m} TcN-SDH à proteína.....	90
5.2	Técnica de radiomarcção da anexina A5 utilizando reagente formulado de HYNIC-ANX A5.....	92
5.3.	Técnica de radiomarcção utilizando o EC.....	95
5.3.1	Obtenção do éster succinato e derivatização da ANXA5 com o EC.....	95
5.3.1	Radiomarcção da ANXA5-EC com ^{99m} Tc.....	97
5.4	Análise da Estabilidade.....	104
5.4.1	Análise da estabilidade após armazenamento à temperatura ambiente.....	104
5.4.2	Análise da estabilidade após armazenamento à 2-8° C.....	107
5.4.3	Análise da estabilidade em soro humano.....	108
5.5	Determinação do coeficiente de partição (CP).....	109
5.6	Estudos de ligação <i>in vitro</i>	109
5.6.1	Produção de apoptose radioinduzida nas células PC-3.....	109
5.6.2	Estudos de ligação.....	112
5.7	Estudos <i>in vivo</i>	114
5.7.1	Estudos de biodistribuição.....	114
5.7.2	Estudos farmacocinéticos em camundongos <i>Swiss</i> sadios.	126
6	Conclusão	131
6.1	Radiomarcção da ANXA5 pelas diferentes metodologias..	131
6.1.1	Radiomarcção da anexina A5 utilizando o SDH.....	131
6.1.2	Radiomarcção da anexina A5 utilizando o quelante bifuncional HYNIC.....	131
6.1.3	Radiomarcção da anexina A5 utilizando o quelante bifuncional EC.....	131

6.2	Análise da Estabilidade da ANXA5 radiomarcada pelas diferentes metodologias.....	132
6.3	Análise da lipossolubilidade da Anexina A5 radiomarcada com tecnécio-99m pelas diferentes metodologias.....	132
6.4	Detecção e quantificação da apoptose radioinduzida	132
6.5	Análise da ligação da Anexina A5 radiomarcada com tecnécio-99m pelas diferentes metodologias às células apoptóticas.....	132
6.6	Comparação da biodistribuição da Anexina A5 radiomarcada com tecnécio-99m pelas diferentes metodologias.....	132
6.7	Comparação da farmacocinética da Anexina A5 radiomarcada com tecnécio-99m pelas diferentes metodologias.....	133
6.8	Considerações finais.....	133
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135

1 – INTRODUÇÃO

A Medicina Nuclear pode ser definida como a especialidade médica que utiliza as propriedades nucleares de compostos radioativos para realizar avaliações das condições anatômicas e/ou fisiológicas, diagnóstico e tratamento de doenças e pesquisas médicas (Kowalsy e Perry, 1987). O composto radioativo ou radiofármaco corresponde a toda substância que, por sua forma farmacêutica, quantidade e qualidade da radiação emitida pode ser aplicada no diagnóstico e no tratamento das enfermidades dos seres vivos, independente da via de administração empregada.

Na Medicina Nuclear a imagem do corpo é obtida de dentro para fora. Os radiotraçadores, geralmente na forma de radiofármacos complexos, são comumente administrados por via endovenosa. A inferência diagnóstica é obtida observando-se a distribuição do material radioativo tanto no tempo quanto no espaço. A farmacocinética dos radiofármacos e a captação seletiva pelos tecidos formam as bases da utilidade diagnóstica (Thrall e Ziessman, 2003).

Atualmente, as técnicas diagnósticas em Medicina Nuclear incluem a Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único (SPECT), a Tomografia por Emissão de Pósitron (PET) e a combinação da Tomografia por Emissão de Pósitron com a Tomografia Computadorizada (PET-CT), este último utilizado para melhorar a correlação anatômica da técnica PET (Imam, 2005).

A evolução dos exames em Medicina Nuclear se deve, em grande parte, ao aparecimento de radiofármacos cada vez mais específicos com menor radiação de fundo (que corresponde ao material radioativo na corrente sanguínea ou concentrado em órgãos não específicos), proporcionando imagens de melhor qualidade (Thrall e Ziessman, 2003; Imam, 2005).

No desenvolvimento de novos radiofármacos alguns fatores devem ser considerados para proporcionar sua aplicabilidade clínica, tais como: (i) o novo radiofármaco deve demonstrar eficácia biológica (alta captação pelas células alvo, alta razão alvo/radiação de fundo e farmacocinética favorável); (ii) alta pureza radioquímica (geralmente superior a 95%), evitando processos de purificação indesejáveis e alta estabilidade em solução; (iii) preparo rápido e preferencialmente à temperatura ambiente (Liu et al., 1997).

Dentre os radioisótopos empregados na composição de radiofármacos para diagnóstico por SPECT, o tecnécio-99m (^{99m}Tc) é o radioisótopo de escolha devido às suas propriedades nucleares ótimas, tais como emissão de radiação gama (γ) abundante (88%) e de baixa energia (140 keV), tempo de meia-vida física ($T_{1/2}$) de 6 horas, além de baixo custo e fácil disponibilidade (Yang et al., 2003).

O substrato utilizado na composição do radiofármaco pode ser escolhido por sua especificidade por determinado órgão, sistema ou processo patológico, caracterizando-o como radiofármaco receptor-específico ou processo-relacionado. Esse conceito tem estimulado um grande número de estudos em medicina nuclear, os quais avaliam a ligação *in vivo* e *in vitro* de radiofármacos receptor-específicos a células e tecidos que superexpressam seus receptores, tais como células tumorais, inflamatórias ou apoptóticas (Dijkgraaf et al., 2007).

No contexto da apoptose, diversas doenças envolvem alterações na taxa de morte celular, o que a torna um alvo atraente para imagem molecular. Nos últimos anos vários estudos têm sido realizados a fim de se estabelecer a real utilidade da imagem da apoptose e a proteína anexina A5 (ANXA5) tem sido extensivamente aplicada para essa finalidade tanto em animais como em humanos. A ANXA5 é uma proteína de 320 aminoácidos que se liga aos resíduos de fosfatidilserina, um fosfolípido externalizado pela membrana celular na fase inicial da apoptose (Kemerink, et al, 2001; Belhocine et al, 2002; Boersma et al, 2003; Pétilot et al, 2007).

Na área da oncologia, a anexina A5 tem se destacado como um promissor marcador na detecção precoce da resposta tumoral à quimioterapia. Na área da neurologia, diversos estudos têm demonstrado a eficácia desta proteína radiomarcada na detecção de isquemia da artéria cerebral média. Já na área da cardiologia, a ANXA5 tem se mostrado um marcador vantajoso na detecção de isquemia do miocárdio, avaliação de rejeição cardíaca em transplantados, bem como na caracterização de placa de ateroma (Boersma et al., 2005).

A marcação de proteínas com elementos metálicos como o ^{99m}Tc pode ser realizada utilizando-se quelantes bifuncionais que funcionam como uma ponte de ligação entre a proteína e o elemento radioativo. A natureza do quelante bifuncional utilizado para complexar radiometais à proteína/peptídeos pode alterar as suas propriedades de biodistribuição, bem como a rota de eliminação (Anderson, 1995). Desta forma, a escolha do agente quelante bifuncional demanda o estudo das propriedades de biodistribuição do complexo radiomarcado e verificação de seu potencial para identificação do processo biológico ou patológico conforme inicialmente planejado.

A ANXA5 tem sido radiomarcada com diversos radioisótopos e utilizando-se diferentes metodologias. Entretanto, a principal experiência clínica envolve a proteína radiomarcada com tecnécio-99m utilizando-se a hidrazinonicotinamida (HYNIC) como agente quelante bifuncional (Cauchon et al., 2007). Outras metodologias de obtenção da ANXA5 radiomarcada com ^{99m}Tc foram avaliadas e o quelante bifuncional etilenodiciesteína (EC) surgiu como uma opção à utilização do HYNIC.

2 - OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi comparar, quanto ao comportamento *in vitro* e *in vivo*, bem como quanto à capacidade de detecção da apoptose, a proteína anexina A5 radiomarcada com tecnécio-99m, obtida por um método inédito de conjugação ao EC, à ANXA5 radiomarcada com tecnécio-99m pelo método direto, utilizando-se o dihidrazida succínica (SDH), e pelo método indireto, utilizando-se o quelante bifuncional HYNIC, disponível sob a forma de reagente formulado.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Obtenção do intermediário $^{99m}\text{TcN-SDH}$;
- ✓ Radiomarcção da Anexina A5 com o núcleo $[^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}]^{+2}$;
- ✓ Radiomarcção da Anexina A5 com tecnécio-99m via quelante bifuncional HYNIC;
- ✓ Radiomarcção da Anexina A5 com tecnécio-99m via quelante bifuncional EC;
- ✓ Analisar a estabilidade da Anexina A5 radiomarcada com tecnécio-99m pelas diferentes metodologias;
- ✓ Analisar a lipossolubilidade da Anexina A5 radiomarcada com tecnécio-99m pelas diferentes metodologias;
- ✓ Detectar e quantificar a apoptose radioinduzida em células PC-3;
- ✓ Analisar a ligação da Anexina A5 radiomarcada com tecnécio-99m pelas diferentes metodologias às células apoptóticas;

- ✓ Comparar a biodistribuição da Anexina A5 radiomarcada com tecnécio-99m pelas diferentes metodologias;
- ✓ Comparar a farmacocinética da Anexina A5 radiomarcada com tecnécio-99m pelas diferentes metodologias.

3 - REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Medicina Nuclear

A imagem médica é baseada na interação da energia das radiações com os tecidos biológicos. A natureza da informação disponível em cada modalidade é determinada pela natureza dessas interações. A imagem convencional com os raios X permite a distinção do ar, água, gordura e osso devido ao coeficiente de absorção diferente para cada meio. Na ultrassonografia, a transmissão de uma onda ultra-sônica e sua reflexão, ao atingir uma interface entre meios de diferentes impedâncias, serve de base para a construção da imagem. Nas imagens de ressonância magnética é a diferença de quantidade de hidrogênio existente no meio, além da química e física do núcleo de hidrogênio, que fornecem as bases para distinguir os tecidos (Thrall e Ziessman, 2003).

A Medicina Nuclear permite caracterizar parâmetros funcionais e metabólicos *in vivo* e de forma não invasiva. Os radiofármacos em sua grande maioria são administrados por via endovenosa, aguardando-se a concentração no tecido-alvo antes de adquirir as imagens. A inferência diagnóstica é obtida gravando-se a distribuição do material radioativo tanto no tempo quanto no espaço (Sapienza e Buchpiguel, 2004; Thrall e Ziessman, 2003).

A riqueza das aplicações da Medicina Nuclear reside na diversidade de radiofármacos disponíveis. A maioria dos radiofármacos é a combinação de um radioisótopo que permite a detecção externa e uma porção biologicamente ativa ou um componente de fármaco (substrato), que é responsável pela biodistribuição. Para alguns agentes, tais como os gases inertes radioativos, os radioiodos (^{131}I , ^{123}I) na forma de solução de

iodeto de sódio, o gálio-67 (^{67}Ga) na forma de citrato e o tálio-201 (^{201}Tl) na forma de cloreto, são os átomos em sua forma química adequada que possuem as propriedades desejadas para a localização, dispensando assim um componente químico maior (Thrall e Ziessman, 2003).

Certas características são desejáveis a um radiofármaco. O tipo, a energia e a meia-vida efetiva da emissão radioativa devem ser compatíveis com a aplicação desejada. A atividade específica, ou seja, a radioatividade por unidade de massa deve ser elevada. Olhando pela perspectiva do fármaco, as características ideais incluem biodistribuição adequada para atingir o tecido alvo, ausência de toxicidade e efeitos secundários. Os radiofármacos não devem sofrer dissociação *in vitro* nem *in vivo*, devem estar facilmente disponíveis, fáceis de produzir e apresentar um custo razoável (Thrall e Ziessman, 2003).

3.2 Apoptose

Apoptose ou morte celular programada é um tipo de "autodestruição celular" que requer energia e síntese protéica para a sua execução. Está relacionada com a homeostase na regulação fisiológica do tamanho dos tecidos (Sarastea e Pulkic, 2000; Vasconcelos e Vasconcelos, 1995). O termo apoptose é derivado do grego *apóptôsis*, que se refere à queda das folhas das árvores no outono, e foi adotado pela primeira vez por Kerr e colaboradores, na década de 70. Porém, somente no início da década de 90 o processo começou a ser intensamente investigado (Parolin e Reason, 2001).

A apoptose é um fenômeno em que a célula é estimulada a acionar mecanismos que culminam com sua morte. Diferentemente da necrose, contudo, a célula em apoptose não sofre autólise: ao contrário, ela é fragmentada, e seus fragmentos são endocitados por células vizinhas, sem desencadear quimiotatismo nem ativação de células fagocitárias (Sarastea e Pulkic, 2000; Brasileiro Filho, 1998).

A ativação da apoptose se dá por meio de duas vias principais: (a) via extrínseca, que é mediada pela ativação de receptores de morte celular localizados na membrana citoplasmática, sendo o Fas e o fator de necrose tumoral (TNF) os mais conhecidos; (b) a via intrínseca que é dependente da participação da mitocôndria, onde há liberação de fatores apoptogênicos como citocromo c, o fator indutor de apoptose (AIF), trifosfato de adenosina (ATP) e proteínas de choque térmico. Como resultado final, em ambas as vias ocorre ativação das caspases, proteases que quebram proteínas celulares específicas e estão associadas à degradação do DNA. Embora diferentes em suas fases iniciais, tem sido demonstrada uma correlação significativa entre as vias intrínseca e extrínseca como, por exemplo, a capacidade de induzir alterações na membrana celular (Geske e Gerschenson, 2001).

A apoptose atinge células individualmente, razão pela qual ela não é facilmente reconhecida nos exames microscópicos rotineiros. A célula em apoptose se encolhe e o citoplasma fica mais denso, a cromatina se torna condensada e disposta em grumos acolados à carioteca, criando imagens descritas ao microscópio óptico como núcleos em meia-lua, em pata de cavalo, em lança. Em seguida, o núcleo se fragmenta (cariorrexe), ao mesmo tempo em que a membrana citoplasmática emite projeções e forma brotamentos ("*blebs*"), que contêm fragmentos do núcleo. O brotamento termina com a fragmentação da célula em múltiplos brotos, que passam a constituir os corpos apoptóticos, os quais são rapidamente fagocitados por macrófagos ou por células fagocitárias vizinhas, sem desencadear uma resposta inflamatória (Sarastea e Pulkkic, 2000).

A apoptose é um processo ativo e progressivo que envolve a substituição e eliminação de células danificadas indesejáveis, incluindo aquelas que podem eventualmente escapar do controle de divisão celular (Blank et al., 1997; Fraser e James, 1998). Na FIG. 1 apresenta-se um esquema das alterações celulares na apoptose.

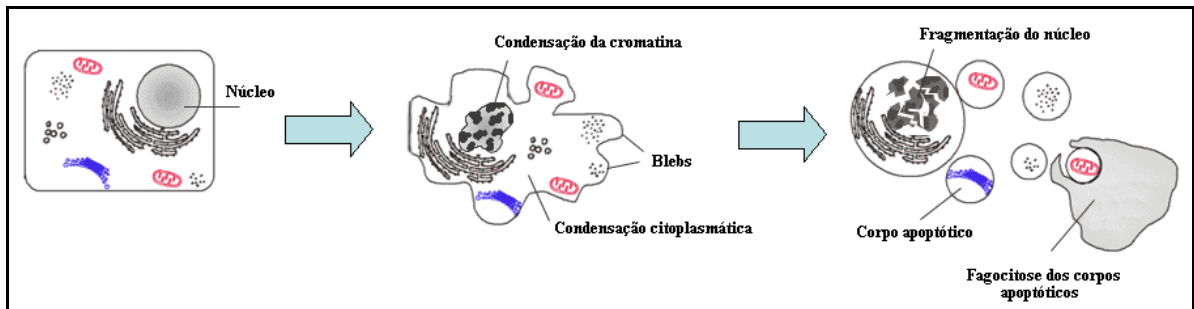


Figura 1- Alterações celulares no processo de apoptose (adaptado de Apoptose, 2009).

A apoptose é uma modalidade de morte celular muito frequente, tanto em estados fisiológicos como patológicos. Em condições normais é um mecanismo importante na remodelação de órgãos durante a embriogênese e na vida pós-natal; além disso, participa no controle da proliferação e diferenciação celular, fazendo com que uma célula estimulada a se diferenciar possa ser eliminada após ter cumprido sua função, sem causar transtorno para as demais células do tecido ou órgão. A apoptose que ocorre em condições patológicas é desencadeada por inúmeros agentes, tais como vírus, substâncias químicas, agressão imunitária, radiação ionizante, dentre outros. Apresenta um papel crucial na patogenia de diversas desordens incluindo Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e outras doenças virais, isquemia cerebral e do miocárdio, doenças autoimunes e neurodegenerativas, rejeição à transplante de órgãos e da medula óssea e resposta tumoral à quimioterapia e à radioterapia. Desta forma, a detecção e a quantificação da apoptose *in vivo* apresenta valor clínico significativo para o diagnóstico e estadiamento de diversas patologias (Geske e Gerschenson, 2001; Vasconcelos e Vasconcelos, 1995).

A TAB. 1 apresenta um resumo da participação da apoptose em algumas patologias humanas (Lichtenfels et al., 1999; Blankenberg et al., 1998).

Tabela 1 – Relação da apoptose com algumas doenças.

Doenças associadas com a inibição da apoptose	Doenças associadas com o aumento da apoptose
<p>Câncer</p> <ul style="list-style-type: none"> • Linfomas foliculares • Carcinomas com mutação no cromossomo p53 • Tumores hormônio dependentes 	<p>Doenças neurodegenerativas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Doença de Alzheimer • Doença de Parkinson • Esclerose lateral amiotrófica • Retinite pigmentosa • Degeneração cerebral
<p>Doenças autoimunes</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lupus eritematoso sistêmico • Glomerulonefrite 	<p>Injúria isquêmica</p> <ul style="list-style-type: none"> • Infarto do miocárdio • Acidente vascular cerebral • Injúria por reperfusão
Outras doenças	
<ul style="list-style-type: none"> • Herpes viral • Adenovírus • Leishmaniose 	<ul style="list-style-type: none"> • AIDS • Hepatite tóxica • Doenças de Chagas

3.2.1 Fosfatidilserina

A Fosfatidilserina (PS) é um fosfolípídeo aniônico simples da superfície celular que normalmente está restringido ao folíolo interior da membrana plasmática. Foi isolado e caracterizado primeiramente em 1942 por Jordi Folch (Blankenberg et al.,2000; Fadok et al.,1998).

A fosfatidilserina pertence aos aminofosfolípídeos e carrega um grupo de fosfoerina, que confere a este fosfolípídeo uma carga negativa

em pH 7,4. Estruturalmente, a PS é composta por três diferentes partes: um esqueleto glicerol, uma cabeça polar e duas caudas hidrofóbicas (Reutelingsperger e Heerde, 1997; Lahorte et al., 2004).

Ao menos dois sistemas de enzimas dependentes de energia do ATP, a flofase e a translocase, mantêm a PS no lado interno da membrana celular. Acredita-se que a externalização deste fosfolípido é resultante da inativação da flofase e da translocase e da ativação de uma terceira enzima, a escramblase. Este fenômeno é uma característica geral da apoptose e ocorre antes da deformação da membrana e da degradação do DNA (Reutelingsperger e Heerde, 1997; Blankenberg et al. 1999).

Os mecanismos de reconhecimento das células apoptóticas pelas células fagocitárias não estão ainda totalmente bem caracterizados. No entanto, um mecanismo que parece ser de fundamental importância para esse reconhecimento é a interação da PS com seus receptores (PSR) presentes na membrana de células fagocitárias, como o macrófago (Fadok et al., 1998; Schlegel e Williamson, 2001).

A ANXA5 se liga seletivamente à PS. Como resultado desta propriedade, a anexina A5 se liga às células apoptóticas *in vitro* e *in vivo* (Kemerink et al., 2001). Esta ligação envolve oito moléculas de anexina para cada resíduo de fosfatidilserina exposto. A afinidade da ANX A5 por PS é comparável a muitos sistemas ligante-receptor (Blankenberg e Strauss, 2001).

3.2.2 Imagem de apoptose

O papel clínico da imagem cintilográfica de apoptose baseia-se no fato de que a apoptose é o mecanismo dos efeitos cito-redutivos de vários agentes citotóxicos e da radioterapia, da rejeição a órgãos transplantados, dos danos celulares em desordens vasculares e da morte celular devido a danos hipóxi-isquêmicos em infarto do miocárdio e neonatais (Vannier,

2002). Assim sendo, a imagem de apoptose pode ser empregada em várias áreas da medicina, conforme demonstrado na TAB. 2.

TABELA 2 – Áreas da medicina para aplicação da imagem cintilográfica de apoptose.

Área da Medicina	Condição patológica ou aplicação médica
Oncologia	Quimioterapia; monitoramento da apoptose induzida por terapia; detecção de tumores (apoptose espontânea); predizer resposta terapêutica.
Cardiologia	Rejeição aguda a transplante cardíaco; infarto agudo do miocárdio; cardiotoxicidade induzida por antraciclina; apoptose do músculo esquelético; aterosclerose; miocardites; crescimento de tumor intracardíaco; disfunção e isquemia do miocárdio.
Transplantes	Rejeição a transplante de fígado, pulmão e coração.
Infectologia	Infecções virais e bacterianas; síndrome de disfunção de múltiplos órgãos; choque séptico.
Neurologia	Isquemia cerebral; danos de reperfusão (derrame); doenças neurodegenerativas; trauma (dano na medula ou cérebro).
Doenças metabólicas	Diabetes tipo 1.
Doenças autoimunes	Anexipatias; artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico; doença inflamatória intestinal.
Doenças ósseas	Osteoartrite
Doenças renais	Insuficiência renal aguda; atrofia renal crônica; fibrose renal; dano glomerular; doença renal policística

Adaptado de Lahorte e colaboradores, 2004.

Desta forma, uma aplicação potencial da imagem de apoptose é a avaliação da progressão ou regressão de doenças, bem como o monitoramento da quimioterapia ou radioterapia no tratamento de câncer. Outra aplicação importante é na identificação de rejeição aguda a transplante de fígado, coração e pulmão e avaliação da eficácia da terapia antirrejeição (Kemerink et al., 2001; Blankenberg et al., 1998). Uma outra aplicação seria na avaliação da apoptose de osteoclastos e de alterações na massa mineral óssea, mais precocemente do que as técnicas convencionais como o ultrassom e o raio X (Blankenberg e Strauss, 2001).

A técnica de imagem de apoptose requer a identificação de um marcador único que ocorra durante o processo e que seja preferencialmente expresso logo após o início da cascata apoptótica. Eventos iniciais na cascata apoptótica incluem: (a) a ativação de proteases de cisteína, tais como a enzima convertora de interleucina 1 (IL-1); (b) ativação de esfingomielinases resultando na produção de ceramidas, um importante sinal da presença de várias proteínas quinase; (c) a exposição de fosfatidilserina (PS) na superfície celular (Blankenberg et al. 1999). Em geral, a expressão de PS é o evento de escolha como processo alvo para identificação de células apoptóticas (Blankenberg et al. 1999).

3.3 Anexina

As anexinas formam uma família de multiproteínas com mais de 160 proteínas, inicialmente descoberta no final dos anos 70. Por definição, estas proteínas são solúveis em água, possuidoras de superfície hidrofílica e capazes de se ligarem a fosfolipídios carregados negativamente na presença de Ca^{+2} (Gerke e Moss, 2002; Vannier, 2002).

A anexina A5 (ANXA5) é uma proteína relativamente pequena, que apresenta uma cadeia de 320 aminoácidos e um peso molecular de 35 – 36 kDa. Esta proteína é dobrada em um arranjo cíclico planar com uma única região N-terminal, seguida por quatro sequências homólogas de

aproximadamente 70 aminoácidos, cada qual composta por cinco segmentos alfa hélices (FIG. 2). Além disso, a estrutura 3D da anexina A5 é caracterizada por um lado côncavo e outro convexo. A superfície côncava da proteína abriga a cauda amino-terminal e a cauda carboxi-terminal, enquanto que o lado convexo abriga os sítios de ligação ao cálcio situados dentro da sequência curva da proteína (Lahorte et al., 2001; Lahorte et al., 2004; Gerke e Moss, 2002; Vannier, 2002).

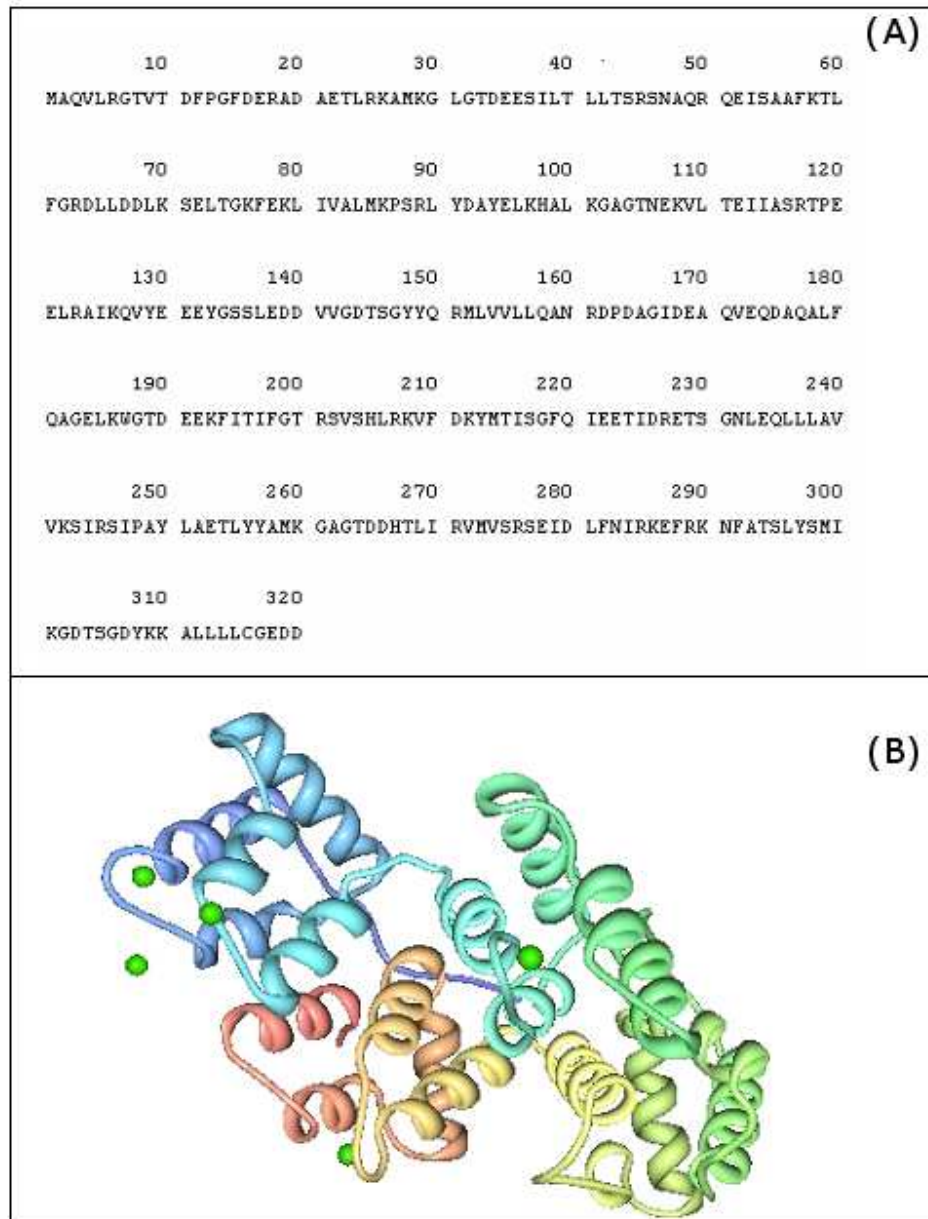


FIGURA 2 – Sequência de aminoácidos (A) e estrutura tridimensional (B) da proteína ANXA5 (adaptado de Estrutura da ANXA5, 2009).

A ANXA5 é uma proteína cálcio-dependente que possui alta afinidade pela fosfatidilserina (PS). A região bioespecífica da ANXA5 de ligação à PS é uma cadeia de 13 aminoácidos presente na região N-terminal (Mukherjee et al, 2006). Esta proteína apresenta várias funções

tais como atividade anticoagulante, ação anti-inflamatória e atividade em canais de cálcio. A ANXA5 está amplamente presente em organismos eucariotos e é encontrada intracelularmente no citosol da membrana plasmática e em concentrações muito baixas (1 - 6 ng mL⁻¹) no compartimento sanguíneo, plasma seminal e líquido amniótico de humanos saudáveis. Além disso, esta proteína é expressa numa variedade de tipos celulares, incluindo cardiomiócito, endotélio vascular, eritrócitos, trombócitos, linfócitos, células da glia, astrócitos, oligodendrócitos, células de Schwann, músculo esquelético, hepatócitos, brônquios, condrócitos e osteoblastos (Lahorte, 2004; Reutelingsperger e Heerde, 1997).

A ideia de utilizar a anexina A5 como marcador molecular do processo de morte celular em vários tipos de células não é recente. A ANXA5 conjugada à fluoresceína (ANXA5-FITC) para a detecção de células apoptóticas é extensivamente utilizada em estudos *in vitro* de biologia celular e patologia (Belhocine et al, 2004). Além disso, métodos *in vitro* utilizando a ANXA5 têm sido desenvolvidos para detectar apoptose em células hematopoiéticas, neurônios, fibroblastos, células endoteliais, células musculares estomacais, carcinomas, linfomas, células embrionárias murínicas e células de plantas e insetos. A ANXA5 também tem sido sugerida como um agente de imagem para detectar trombose *in vivo* (Blankenberg et al., 1999).

3.4 Radiomarcagem da anexina A5

Devido ao tamanho e estrutura protéica da ANXA5, várias estratégias de radiomarcagem são possíveis. Este peptídeo tem sido radiomarcado com os mais diversos radioisótopos, tais como iodo (¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I), gálio (⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga), flúor-18 e tecnécio-99m.

3.4.1 Anexina A5 Radioiodada

A anexina A5 tem sido radioiodada tanto com técnicas de marcação diretas como indiretas. Na metodologia direta, o radioiodo é adicionado diretamente ao resíduo de tirosina. Os agentes oxidantes utilizados para este propósito incluem o iodogen (1,3,4,6-tetracloro-3 α 6 α -difenilglicouril) e a cloramina-T. As metodologias de marcação indiretas utilizadas para a marcação da ANXA5 se baseiam na N-acetilação da lisina com reagentes pré-marcados. Dos grupos prostéticos radioiodados utilizados destacam-se o reagente de Bolton-Hunter (N-Hidroxisuccinimida iodo-p-hidroxifenil propionato) e o SIB (benzoato de iodo succinimidila) (Van de Wiele et al., 2004).

A anexina A5 foi radioiodada com ^{123}I para estudos de ligação *in vitro* com plaquetas sanguíneas. Estes estudos demonstraram que a técnica utilizando-se o iodogen é um método não agressivo, no que diz respeito à atividade biológica do substrato (Lahorte et al., 2001).

Russel e colaboradores (2002) radiomarcaram a ANXA5 com ^{125}I pelas técnicas do "iodo-Beads" (forma imobilizada da cloramina T), iodogen e reagente de Bolton-Hunter e demonstraram que a anexina não perde sua atividade biológica *in vivo*.

Glaser e colaboradores (2003) radiomarcaram a ANXA5 com o radioisótopo de iodo emissor de pósitron ^{124}I , tanto por método direto (cloramina T) como indireto (SIB). Estes autores demonstraram a superioridade da ANXA5 marcada via indireta em relação ao método direto em estudos de ligação *in vitro* com células HL-60 (leucemia).

Pétillot e colaboradores (2007) investigaram a aplicabilidade da anexina A5 radioiodada (^{125}I e ^{123}I) para detectar apoptose induzida por lipopolisacarídeo no miocárdio. A anexina foi radiomarcada com iodo-123 e iodo-125, utilizando-se o Iodogen. O procedimento de radiomarcagem com o iodo-123 foi realizado com 20 μg de ANXA5 e 35 a 47 MBq de iodo-123, com rendimento radioquímico superior 70% e pureza radioquímica

superior 98%. Para os estudos de autoradiografia, 1 mg desta proteína foi radiomarcada com até 481 MBq de iodo-125, obtendo-se um rendimento radioquímico de 87% e pureza radioquímica superior a 98%. Estes autores observaram que a anexina A5 radiomarcada tanto com o iodo-123 como o iodo-125 pode ser utilizada para avaliar a apoptose em coração séptico.

Desta forma, pode-se observar que a ANXA5 pode ser facilmente radiomarcada com os radioisótopos de iodo tanto por metodologia direta como indireta, sem perder a sua atividade biológica.

3.4.2 Anexina A5 marcada com Flúor-18

A maioria das metodologias utilizadas para a marcação da ANXA5 com flúor-18 baseia-se no método de Wester e colaboradores (1996), utilizando etil-4-[¹⁸F]fluorobenzoato, ácido 4-[¹⁸F]fluorbenzóico e N-succinimidil-4-[¹⁸F]fluorobenzoato ([¹⁸F]SFB) como intermediários. Diferentes reagentes, condições de reação e métodos de purificação foram aplicados em algumas etapas da síntese, resultando em rendimentos radioquímicos diferentes, embora o mesmo produto intermediário de reação seja gerado.

Murakami e colaboradores (2004) foram os primeiros a avaliar a anexina A5 radiomarcada com fluor-18 *in vivo* utilizando modelo de isquemia de reperfusão do miocárdio em ratos. Estes autores compararam os resultados de acúmulo da ANXA5 radiomarcada com flúor-18 e tecnécio-99m na área infartada e observaram um aumento similar da captação de ambos radiofármacos em relação à área não infartada. Os autores ressaltaram ainda a menor captação da ANXA5-¹⁸F no fígado, baço e rins quando comparada com a ANXA5-^{99m}Tc.

3.4.3 Anexina A5 marcada com cobre-64

McQuade e colaboradores (2003) descreveram a radiomarcação da anexina-V conjugada ao quelante bifuncional DOTA (ácido 1,4,7,10-

tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetracético) (FIG. 3) com ^{64}Cu como uma alternativa de radioisótopo para aplicação em PET. A proteína foi radiomarcada com uma alta atividade específica ($106 - 132 \text{ GBq } \mu\text{mol}^{-1}$) e pureza radioquímica superior a 90%.

Cauchon e colaboradores (2007) desenvolveram um protocolo de imagem utilizando o complexo biotina-estreptavidina (SAv). Este protocolo envolveu a radiomarcagem da ANXA5-biotina *in vivo* com o SAV-biotina-DOTA- ^{64}Cu . A obtenção do SAV-biotina-DOTA- ^{64}Cu deu-se num curto intervalo de tempo em duas etapas de reação e duas de purificação. Esta metodologia, quando comparada com a radiomarcagem direta da anexina A5, apresenta maior rendimento (maior que 70%, baseado na incorporação do ^{64}Cu) e atividade específica adequada ($\sim 11 \text{ GBq/mmol}$), para imagem em PET. Estes autores observaram que apesar das propriedades de radiação do ^{64}Cu não serem apropriadas para aplicações diagnósticas em humanos, a substituição do ^{64}Cu pelo ^{60}Cu ou ^{61}Cu proporcionará um radiofármaco conveniente para aquisição de imagens PET em humanos para avaliar apoptose no tratamento do câncer e de muitas outras condições médicas.

3.4.4 Anexina A5 marcada com gálio

Smith-Jones e colaboradores (2003), simultaneamente ao desenvolvimento da ANXA5-DOTA- ^{64}Cu , desenvolveram um estudo de marcação da anexina A5 com ^{67}Ga e ^{68}Ga utilizando a mesma metodologia (FIG. 3). A ativação do quelante DOTA com 1-etil-3-(3-dietilaminopropil) carbodiimida-HCl (EDC) e N-hidroxissulfosuccinimida (sulfo-NHS) foi semelhante, resultando numa taxa de conjugação de 3,7 moléculas de DOTA por molécula de anexina. Os autores relataram que em estudos de imunoreatividade a ANXA5-DOTA- ^{67}Ga revelou atividade biológica comparável com a ANXA5-HYNIC- $^{99\text{m}}\text{Tc}$, sugerindo que a ANXA5-DOTA- ^{67}Ga é uma boa alternativa para imagem de apoptose em SPECT. Em

estudos com ANXA5-⁶⁸Ga realizados em ratos tratados com anti-Fas para induzir apoptose hepática observaram um aumento na captação do fígado de um fator de 4,4 quando comparado com os animais controles não tratados.

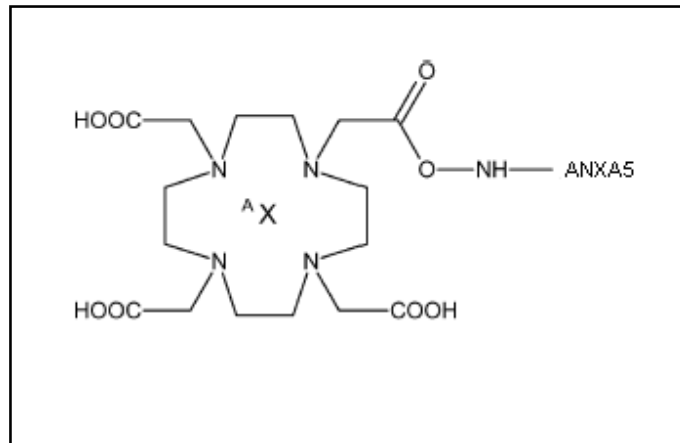


Figura 3 – Estrutura da ANXA5 radiomarcada com ⁶⁴Cu ou ⁶⁷Ga/⁶⁸Ga (^AX) utilizando o quelante DOTA (adaptado de Lahorte, 2004).

3.4.5 Anexina A5 marcada com tecnécio-99m

O tecnécio-99m pode ser acoplado à anexina A5 diretamente, utilizando-se estanho como agente redutor (Sn^{+2}), após modificação da proteína, com introdução de uma sequência de aminoácidos quelante (ANXA5 mutante), ou indiretamente, utilizando-se quelantes bifuncionais.

Diversos quelantes bifuncionais já foram utilizados na marcação da ANXA5 com tecnécio-99m, tais como 4,5-bis(tioacetamido)pentanoil (ANXA5-BTAP-^{99m}Tc), n-1-imino-4-mercaptobutil (ANXA5-i-^{99m}Tc), hidrazinonicotinamida (ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc), etilenodicisteína (ANXA5-EC-^{99m}Tc) e hidrazina succínica (ANXA5-SDH-^{99m}Tc) (Blankenberg et al., 1998; Stratton et al., 1995; Kemerink et al., 2001; Yang et al., 2001; Subbarayan et al., 2003, respectivamente). O elevado interesse na radiomarcagem da ANXA5 com tecnécio-99m ao longo dos últimos anos se deve em parte às vantagens do ^{99m}Tc quando comparado à outros

radioisótopos para diagnóstico. A anexina A5 radiomarcada com ^{99m}Tc apresenta excelentes propriedades de imagens e permite a visualização de apoptose em diferentes modelos de doença.

Straton e colaboradores (1995), em um estudo realizado com a ANXA5 radiomarcada com iodo-125 e tecnécio-99m, demonstraram a captação seletiva da ANXA5 radiomarcada pelo trombo intracardíaco induzido em porcos. O produto iodado foi radiomarcado via Iodogen enquanto que a radiomarcagem com tecnécio se deu via dimercapto de diamida, um quelante do tipo N_2S_2 . Os autores observaram que não há diferenças na razão média entre o trombo atrial esquerdo e o sangue para a ANXA5- ^{125}I e a ANXA5- N_2S_2 - ^{99m}Tc , mostrando que as duas anexinas produzidas são efetivas para a aplicação proposta.

Blankenberg e colaboradores (1999), em estudos realizados com ANXA5-HYNIC- ^{99m}Tc em células Jurkat (linfoblastos) com apoptose induzida por doxorubicina ou anti-Fas e necrose induzida por aquecimento sugeriram que a proteína pode ser utilizada para quantificar células apoptóticas em cultura e suspensão de células *in vitro* e também para localizar áreas de necrose. Neste trabalho os autores também mostraram a biodistribuição após uma hora de injeção da ANXA5-HYNIC- ^{99m}Tc em camundongos *Balb-c* normais e com apoptose induzida por anti-Fas, onde foi observado que a captação hepática da ANXA5-HYNIC- ^{99m}Tc subiu de $12,8 \pm 2,4\%$ DI/órgão nos animais normais para $52,0 \pm 10,8\%$ DI/órgão nos animais tratados, sugerindo o potencial da ANXA5-HYNIC- ^{99m}Tc para imagem de sítios apoptóticos *in vivo*.

Hofstra e colaboradores (2000) radiomarcaram com ^{99m}Tc a anexina derivatizada com n-1-imino-4-mercaptobutil e obtiveram uma pureza radioquímica de 79,4%. Estes autores demonstraram, num estudo com sete pacientes com diferentes localização de infarto, que a morte celular em coração humano pode ser monitorada, não invasivamente, utilizando a ANXA5-(n-1-imino-4-mercaptobutil)- ^{99m}Tc (i-anxA5).

Yang e colaboradores (2001) radiomarcaram a ANXA5 com tecnécio-99m utilizando o etilenodisuccinato (EC) como quelante bifuncional. A ativação do ácido carboxílico do EC num éster succinimato foi realizada com o sulfo-NHS (*N*-hidroxisulfosuccinimida) e EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida-HCl) em quantidade equimolares. Após a radiomarcagem, fez-se necessária uma etapa de purificação em coluna de gel de Sephadex (PD-10) e o rendimento final de obtenção da ANXA5-EC-^{99m}Tc foi de 70%. Esses autores induziram apoptose em linhagem de câncer de mama via radiação e via tratamento com paclitaxel, e observaram um aumento na captação celular *in vitro* da ANXA5-EC-^{99m}Tc pelas células apoptóticas em relação às células normais. Os estudos de biodistribuição em ratos com tumor mamário mostraram aumento significativo da captação hepática e tumoral da ANXA5-EC-^{99m}Tc quando comparada ao EC-^{99m}Tc, 30 minutos após a administração. Em um outro estudo, os mesmos autores, utilizando um modelo em ratos, observaram que a ANXA5-EC-^{99m}Tc apresentou uma menor captação renal quando comparada com a ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc (entre 10 e 180 minutos) e um clearance sanguíneo mais lento. Em um estudo clínico utilizando-se o mesmo radiofármaco, com dez pacientes com câncer de mama primário esses autores detectaram em todos os casos captação na área palpável da doença invasiva (Yang et al, 2005).

Belhocine e colaboradores (2002) radiomarcaram a ANXA5 utilizando o reagente formulado Apomate (Theseus Imaging Corporation), baseado na metodologia de radiomarcagem descrita por Kasina e colaboradores (1991). A ANXA5-N₂S₂-^{99m}Tc apresentou pureza radioquímica maior do que 85%. A análise *in vivo* foi realizada numa população de 15 pacientes com linfoma, carcinoma metastático de mama ou carcinoma de pulmão que sofreram quimioterapia primária. Os autores demonstraram que a imagem com ANXA5-^{99m}Tc é uma técnica factível e segura para avaliar resposta dos pacientes ao tratamento antitumoral.

Subbarayan e colaboradores (2003) propuseram um método simplificado para a radiomarcção da anexina A5 com tecnécio-99m, em que primeiramente ocorre a formação do complexo $(^{99m}\text{TcN})^{+2}$ via SDH e subsequente conjugação à ANXA5, e avaliaram sua atividade biológica *in vivo* após terapia fotodinâmica. A ANXA5-SDH- ^{99m}Tc foi obtida com rendimento radioquímico maior do que 95% e permaneceu estável tanto em salina como em plasma por até 24 horas. Os estudos de imagem *in vivo* demonstraram concentração significativa da radioatividade na região abdominal, predominantemente no intestino, fígado e rins.

A anexina A5 marcada com ^{99m}Tc após derivatização com HYNIC com atividade específica de 3 MBq/ μg foi avaliada por Mochizuki e colaboradores (2003) em um modelo tumoral *in vivo* em ratos de hepatoma alogênico tratado com ciclofosfamida. Os valores de captação nos órgãos, nos estudos de biodistribuição após 6 horas de injeção, mostraram captação da ANXA5-HYNIC- ^{99m}Tc de $9,50 \pm 1,12$ % da atividade administrada (AI) nos rins e razões tumor/músculo e tumor/sangue de $5,6 \pm 0,9$ e $1,33 \pm 0,20$, respectivamente, para os animais com tumor induzido e não tratados com o quimioterápico. Para os animais tratados estes valores foram de $7,53 \pm 1,06$ e $2,14 \pm 0,31$, respectivamente, demonstrando que a captação pelo tumor da ANXA5-HYNIC- ^{99m}Tc aumenta significativamente após tratamento com ciclofosfamida.

Thimister e colaboradores (2003) utilizaram a ANXA5-4,5-bis(tioacetamida)pentanoil- ^{99m}Tc (ANXA5-BTAP- ^{99m}Tc) para determinar a área de risco na fase aguda e subaguda do infarto do miocárdio *in vivo*. Estes autores realizaram um estudo com nove pacientes com infarto do miocárdio agudo primário e observaram um aumento da captação da ANXA5-BTAP- ^{99m}Tc em todos os pacientes, indicando a presença de cardiomiócitos com externalização de PS na área infartada.

Vanderheyden e colaboradores (2006) conjugaram a ANXA5 com o MAG_3 (mercaptoacetiltriglicina) e compararam suas propriedades farmacocinéticas com a ANXA5-HYNIC- $^{99\text{m}}\text{Tc}$. A pureza radioquímica da ANXA5- MAG_3 - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ obtida com 15 minutos de reação em $\text{pH}=8$ foi maior do que 95%, sendo que com duas horas esta pureza foi reduzida a 90%. A pureza radioquímica da ANXA5-HYNIC- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ foi de 98%, permanecendo estável por até 6 horas. Os estudos em camundongos normais mostraram que a ANXA5- MAG_3 - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ apresenta uma menor retenção de corpo inteiro, com menor captação no fígado e nos rins e maior clareamento hepatobiliar quando comparada com a ANXA5-HYNIC- $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Zhao e colaboradores (2007) realizaram um estudo comparativo entre a ANXA5-HYNIC- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e o $\text{FDG-}^{18}\text{F}$ para imagem e quantificação da progressão de lesão aterosclerótica em camundongos ApoE-/- . Estes autores radiomarcaram a anexina A5 utilizando o quelante HYNIC com uma atividade específica de $4,8 \text{ MBq}/\mu\text{g}$ e a atividade injetada por animal tanto para a ANXA5-HYNIC- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ como para a $\text{FDG-}^{18}\text{F}$ foi de $18,5 \text{ MBq}$. Os compostos radiomarcados apresentaram captação preferencial por lesões ateroscleróticas, sendo observado maior captação para a $\text{FDG-}^{18}\text{F}$. Os níveis de captação foram correlacionados com a severidade das mudanças ateroscleróticas, indicando que o acúmulo aórtico tanto da ANXA5-HYNIC- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ como da $\text{FDG-}^{18}\text{F}$ aumenta com a progressão da aterosclerose. O nível de captação absoluto superior da $\text{FDG-}^{18}\text{F}$ em tecidos aórticos oferece um radiofármaco com maior sensibilidade para a detecção da lesão enquanto que a captação preferencial da ANXA5-HYNIC- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ em lesões avançadas sugere seu potencial para avaliar a vulnerabilidade de placas arteroescleróticas.

Kartachova e colaboradores (2006) demonstraram em um estudo clínico que a cintilografia com ANXA5-HYNIC- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ permite monitorar a apoptose *in vivo* e as mudanças iniciais na captação da ANXA5 pelo tumor estão significativamente correlacionadas à eficácia da terapia.

Taki e colaboradores (2007), utilizando ANXA5-117 mutante com sítio de ligação para tecnécio, demonstraram que a proteína radiomarcada acumula-se até mesmo em áreas com isquemia severa menor, áreas estas que não apresentam necrose significativa de alterações histológicas, indicando ser um marcador sensível de danos isquêmicos ao miocárdio. Além disso, a intensidade de captação é dependente da severidade da isquemia e do tempo de reperfusão após a isquemia.

Kietselaar e colaboradores (2007) avaliaram a aplicabilidade da ANXA5 radiomarcada na detecção da apoptose em um grupo de nove pacientes com infarto do miocárdio avançado. A anexina foi radiomarcada com 1 GBq de ^{99m}Tc e 6 horas antes da imagem, 0,25 mg da anexina A5- ^{99m}Tc foi administrada aos pacientes por via endovenosa. O ^{201}Tl também foi administrado 30 minutos antes da imagem. O protocolo de imagem utilizado permitiu obter os dados destes dois radioisótopos simultaneamente. Este estudo, apesar do pequeno número de pacientes, permitiu confirmar a aplicabilidade da ANXA5 radiomarcada em pacientes com infarto do miocárdio. Observou-se uma captação predominante naqueles pacientes que apresentavam um agravamento recente na função ou classe funcional do ventrículo esquerdo.

O HYNIC é acoplado à ANXA5 em um amino grupo de um dos 21 resíduos de lisina da proteína, utilizando o *N*-succinimidil HYNIC. Esta reação é não específica, podendo ocorrer várias incorporações. Neste contexto, Fonge e colaboradores (2008) avaliaram a derivatização da ANXA5 mutante, a qual contem um resíduo de cisteína, inserido para direcionar a incorporação do HYNIC de maneira mais específica. A ANXA5-Cys é produzida por mutação sítio-específica e é derivatizada com o HYNIC numa reação de Diels-Alder com ácido 5-maleimido-2-hidrazinopiridina hidrocloreídrico. Estes autores obtiveram pureza radioquímica superior a 90% e observaram um modelo de distribuição similar ao da ANXA5-HYNIC- ^{99m}Tc não mutante em camundongos normais.

Diversos estudos têm demonstrado a aplicabilidade clínica da ANXA5 radiomarcada com tecnécio-99m na imagem de apoptose em tumores após quimioterapia. Rottey e colaboradores (2009) investigaram se a quimioterapia altera a captação da ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc a tecidos humanos normais em pacientes com câncer. Estes autores relataram que não observaram alterações significativas na captação da ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc pelo baço e medula óssea entre 5 - 7 e 40 - 44 horas após tratamento com ciclofosfamida, concluindo que a apoptose induzida por quimioterapia de células saudáveis ou a liberação de partículas de membrana devido a estimulação pró-apoptótica por quimioterápicos de células endoteliais não é suficientemente importante para influenciar a biodistribuição da anexina radiomarcada em humanos.

A fim de se obter a ANXA5 radiomarcada por métodos mais simples e de favorecer sua cinética de distribuição para a realização de imagem, tem-se estudado, nos últimos anos, a marcação de fragmentos da anexina A5. Mukherjee e colaboradores (2006) sintetizaram quatro complexos diferentes da anexina A5 contendo a sequência de 13 aminoácidos, específica para ligação à fosfatidilserina, funcionalizados com cisteína ou dicisteína e radiomarcados com um intermediário ^{99m}Tc-nitrído ou com histidina e marcado com núcleo ^{99m}Tc-carbonila. Estes autores ressaltaram a facilidade de sintetizar e funcionalizar a sequência de aminoácidos e o alto rendimento radioquímico para todos os compostos obtidos.

As diversas metodologias de radiomarcagem da ANXA5 com tecnécio-99m produzem um agente com pequenas diferenças nas propriedades de distribuição biológica. A proteína radiomarcada com tecnécio-99m por via direta apresenta captação hepática relativamente alta, sugerindo a formação de algum composto desnaturado no curso da marcação. A proteína marcada utilizando-se o quelante bifuncional do tipo N₂S₂ é excretada, em parte, pelos intestinos, após uma hora da

administração. O material acoplado ao HYNIC parece não apresentar excreção intestinal e uma captação hepática menor, além de alta captação renal. Todos os compostos, entretanto, independente da forma de marcação, apresentam uma distribuição típica de proteína difundindo predominantemente pelo fígado, baço e uma alta captação nos rins (Blankenberg et al., 2000; Belhocine et al, 2004; Mukherjee et al, 2006).

Desde as primeiras pesquisas em radiofarmácia com a anexina A5 para imagem de apoptose, várias metodologias de marcação foram desenvolvidas e a ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc tem se mostrado ser o mais promissor traçador, estando seu estudo na fase clínica II/III (Cauchon et al., 2007).

A TAB. 3 discrimina algumas vantagens e desvantagens associadas à radiomarcção da ANXA5 com diferentes radioisótopos, incluindo as radiomarcções com ^{99m}Tc envolvendo diferentes grupos quelantes bifuncionais.

TABELA 3 - Vantagens e desvantagens das diferentes metodologias de radiomarcção da ANXA5.

Emissão/ Energia	T_{1/2} física	Vantagens (V) e Desvantagens (D)
ANXA5-^{99m}Tc (geral)		
γ, 140 keV	6,02 h	V: ^{99m} Tc obtido facilmente; baixo custo; excelente propriedades de imagem D: Rq complicada, biodistribuição influenciada pelo método de conjugação
ANXA5-imino-^{99m}Tc		
γ, 140 keV	6,02 h	V: marcação realizada facilmente D: PRq ≈ 80%, alta captação no fígado, rins e pulmão; T _{1/2} biológica longa
ANXA5-BTAP-^{99m}Tc		
γ, 140 keV	6,02 h	V: PRq maior do que 93%; T _{1/2} biológica curta D: método de marcação trabalhoso; alta captação no fígado, rins, pulmão e abdômen; baixa Rq
ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc		
γ, 140 keV	6,02 h	V: método de marcação bem estabelecido; formulação de reagente para radiomarcção D: alta captação no fígado e rins; T _{1/2} biológica longa
ANXA5-EC-^{99m}Tc		
γ, 140 keV	6,02 h	V: formulação de reagente liofilizado para radiomarcção D: necessidade de mais pesquisas

Rq = Radioquímica, PRq = pureza radioquímica, CE = captura eletrônica, T_{1/2}=tempo de meia vida (Adaptado de: Boersma et al., 2005).

Tabela 3 – Continuação.

Emissão/ Energia	T_{1/2} física	Vantagens (V) e Desvantagens (D)
ANXA5-^{94m}Tc (geral)		
β^+ , 2,5 MeV	53 min	V: Forma mais simples de transformar SPECT em PET, marcação pode ser realizada facilmente D: caro e de difícil obtenção
ANXA5-¹²⁵I		
CE, 35 keV	60 d	V: T _{1/2} física longa; D: não possibilita imagem
ANXA5-¹²³I		
γ , 2,5 MeV	13 h	V: não apresenta captação no fígado/rins após 12 h; melhores condições de imagem na região abdominal quando comparado com compostos a base do ^{99m} Tc; alta PRq D: método de marcação trabalhoso; mais caro do que o ^{99m} Tc
ANXA5-¹²⁴I		
β^+ 1,53 e 2,14 MeV; γ	4,2 d	V: PET com longa T _{1/2} ; adequado para estudos em animal e humanos em estado terminal; PRq > 95% D: método de marcação trabalhoso

Rq = Radioquímica, PRq = pureza radioquímica, CE = captura eletrônica, T_{1/2}=tempo de meia vida (Adaptado de: Boersma et al., 2005).

Tabela 3 – Continuação.

Emissão/ Energia	T_{1/2} física	Vantagens (V) e Desvantagens (D)
AnxA5-¹¹¹In		
γ, 173 e 247 keV;CE	2,8 d	V: T _{1/2} física mais longa D: Rq difícil, biod. influenciada pelo marcação; alta taxa de radiação em pacientes
AnxA5-¹⁸F		
β ⁺ , 633 keV	110 min	V: PET com ótima meia vida para imagem; D: necessário mais pesquisas para estabelecer uso em pacientes; método de marcação não padronizado

Rq = Radioquímica, PRq = pureza radioquímica, CE = captura eletrônica, T_{1/2}=tempo de meia vida (Adaptado de: Boersma et al., 2005).

3.5 Tecnécio

O tecnécio apresenta número atômico 43 e foi previsto por Mendeleev na organização da tabela periódica dos elementos em 1869. Atualmente, são conhecidos mais de 20 isótopos deste elemento que vão desde o ⁹¹Tc ao ¹¹⁰Tc. O primeiro isótopo a ser descoberto foi o Tc-99 em 1937 por Perrier e Segrè. Em 1938 Segrè e Seaborg, estudando a isomeria nuclear deste isótopo, encontraram o ^{99m}Tc, seu isômero nuclear metaestável (Dilworth e Parrott, 1998).

O primeiro uso do tecnécio para imagens médicas foi em 1961 com o pertecnetato (^{99m}TcO₄⁻) para imagem da tireóide, baseado presumivelmente no princípio que o ânion pertecnetato apresenta uma similaridade com o iodo, sendo ativamente captado pela tireóide (Abram e

Alberto, 2006; Dilworth e Parrott, 1998). Apesar desta similaridade o $^{99m}\text{TcO}_4^-$ não é organificado pela tireóide após captado pela mesma.

Atualmente, aproximadamente 50 anos após a primeira aplicação do tecnécio-99m, cerca de 90% de todos os protocolos de diagnósticos em Medicina Nuclear envolvem este radioisótopo.

O tecnécio pode apresentar estados de oxidação entre -I a +VII. Em consequência desta variedade, o tecnécio apresenta uma química de coordenação diversa, possibilitando formar complexos de coordenação com diferentes agentes quelantes. Os ligantes unem-se ao tecnécio por ligações covalente-coordenadas, formando complexos ou compostos de coordenação que adquirem arranjo geométrico (poliedro de coordenação) definido pelos átomos coordenados ao metal, para um dado número de coordenação. Na TAB. 4 pode-se observar vários estados de oxidação do tecnécio e suas respectivas geometrias.

TABELA 4 – Complexos de tecnécio com diferentes estados de oxidação.

Número de oxidação	Exemplo	Geometria de coordenação	Número de coordenação
+7(d ⁰)	[TcH ₉] ²⁻	Prisma triangular	9
	TcO ₄ ⁻	Tetraedro	4
+6(d ¹)	TcO ₄ ²⁻	Tetraedro	4
+5(d ²)	[Tc(NCS) ₆] ⁻	Octaedro	6
	[Tc(Diars) ₂ Cl ₄] ²⁻	Dodecaedro	8
	TcOCl ₄ ⁻	Pirâmide quadrada	5
	[TcO(I,I-ECD)]	Pirâmide quadrada	5
	[TcO(d,I-HMPAO)]	Pirâmide quadrada	5
	[TcO ₂ (tetrosfosmina)] ⁺	Octaedro	6
+4(d ³)	[TcCl ₆] ²⁻	Octaedro	6
+3(d ⁴)	[Tc(Diars) ₂ Cl ₂] ⁺	Octaedro	6
+2(d ⁵)	[TcCl ₃ (PhP(OEt) ₂) ₄]	Octaedro	6
+1(d ⁶)	[Tc(CNC(CH ₃) ₃) ₆] ⁺	Octaedro	6
0(d ⁷)	[Tc ₂ (CO) ₁₀]	Octaedro	6
-1(d ⁸)	[Tc(CO) ₅] ⁻	Bipirâmide triangular	5

Adaptado de Liu, 2008.

Na forma de pertecnetato de sódio, o tecnécio apresenta estado de oxidação +7, bastante estável em solução aquosa. Apesar dessa estabilidade, nesse estado de oxidação o tecnécio não se liga às moléculas de forma a constituir radiofármacos de interesse. O tecnécio reduzido é muito instável e tende a formar espécies coloidais, Tc(IV)O₂, ou a voltar ao seu estado de oxidação máxima Tc(VII). Portanto, este radioisótopo deve ser reduzido na presença de um ligante adequado no intuito de estabilizar o tecnécio reduzido.

Até o momento, um grande número de complexos de tecnécio caracterizado estruturalmente contém este metal no estado de oxidação +5. Isto se deve à alta estabilidade dos núcleos oxo, nitro e imido, podendo envolver uma grande variedade de sistemas de ligantes (Braband et al., 2005).

Os radiofármacos de ^{99m}Tc podem ser divididos em duas categorias: os radiofármacos essenciais e os de segunda geração. Os radiofármacos essenciais são aqueles cuja biodistribuição está baseada nas propriedades físicas do complexo (carga, tamanho, lipofilicidade, etc.). Já os radiofármacos de segunda geração são formados por um complexo de ^{99m}Tc unido, via um quelante bifuncional (BFC), a uma molécula com atividade biológica que confere aos complexos propriedades distintas.

Uma grande variedade de técnicas de radiomarcagem de proteínas com tecnécio vem sendo desenvolvidas. Estas técnicas podem ser classificadas em três grandes categorias: marcação direta, pré-marcação e pós-marcação (Eckelman, 1995; Banerjee et al, 2005).

Na abordagem direta utiliza-se um agente redutor para converter as pontes dissulfeto da biomolécula em tióis livres, que ficam disponíveis para se ligarem ao Tc-99m muito eficientemente. A vantagem desta abordagem é que é fácil de ser realizada. Entretanto, muito pouco se conhece sobre a química de coordenação do Tc. Existe pouco controle sobre a estabilidade do complexo de ^{99m}Tc ou sobre a ligação não específica. Além disso, este método aplica-se somente à proteínas ou seus fragmentos, pois vários pequenos peptídeos não apresentam pontes dissulfeto, ou, em alguns casos, esta ligação é crítica para manter a propriedade biológica do peptídeo para ser reduzida.

A metodologia de pré-marcação envolve primeiramente a formação de um complexo do ^{99m}Tc com um quelante bifuncional (BFC) e subsequente conjugação do complexo BFC- ^{99m}Tc ao substrato. Neste método, o estado de oxidação do radiometal está bem definido e o

peptídeo ou proteína não é exposto às condições drásticas, algumas vezes aplicadas à preparação do complexo. Todavia, a síntese em várias etapas limita sua aplicação clínica, uma vez que demanda tempo de produção e uma etapa final de purificação.

Na metodologia de pós-marcação, um BFC é primeiramente ligado à biomolécula para formar um conjugado BFC-biomolécula e então o radioisótopo é acoplado ao grupo quelante livre do BFC. A marcação pode ser realizada por redução direta do $^{99m}\text{TcO}_4^-$ na presença do conjugado BFC-biomolécula ou pela transquelação com um complexo intermediário de ^{99m}Tc , tal como glucoheptonato- ^{99m}Tc . Esta metodologia combina a facilidade da marcação direta com a química melhor definida da metodologia que envolve o uso de quelantes. Por isso, a metodologia de pós-marcação é a mais utilizada na prática no desenvolvimento de radiofármacos que têm peptídeos como substrato (Liu, 2008; Liu e Edwards, 1999).

A escolha do BFC é uma etapa importante para o sucesso do processo de radiomarkação. O BFC pode ser ligado ao C-terminal ou N-terminal da proteína via um espaçador, se necessário. Também pode ser ligado à cadeia lateral do peptídeo ou incorporado no corpo do mesmo (Liu et al, 1998).

Um BFC ideal é aquele que é capaz de formar um complexo estável com alto rendimento a uma concentração muito baixa do conjugado BFC-biomolécula. Para que isto aconteça, o quelante bifuncional deve estabilizar seletivamente um estado de oxidação intermediário ou mais baixo do tecnécio, de modo que o complexo formado não esteja sujeito às reações de oxido-redução. As mudanças de estado de oxidação *in vivo* são acompanhadas frequentemente de transquelação do ^{99m}Tc de um complexo biomolécula-BFC- ^{99m}Tc para ligantes ou quelantes naturais presentes nos sistemas biológicos. O BFC deve formar um complexo de ^{99m}Tc que tenha a estabilidade termodinâmica e inércia cinética no que diz

respeito à dissociação ou à liberação de ^{99m}Tc . O quelante bifuncional deve formar complexo de ^{99m}Tc com um número mínimo de isômeros, uma vez que formas isoméricas diferentes do quelante- ^{99m}Tc podem conduzir à propriedades biológicas e farmacocinéticas significativamente diferentes do complexo biomolécula - $\text{BFC-}^{99m}\text{Tc}$ (Liu, 2008).

Vários compostos têm sido utilizados como quelantes bifuncionais na marcação de moléculas biologicamente ativas com ^{99m}Tc e alguns deles são apresentados na FIG. 4. Estes incluem DTPA, compostos do tipo N_2S_2 (diamidatiol, monoamidamonoaminaditiol, diaminaditiol), triamidatiol, (N_3S), SDH, propileno amina oxima (PnAO), tetraaminas e HYNIC (Liu, 2008; Radiofármacos receptor-específico, 2005; Liu et al, 1998).

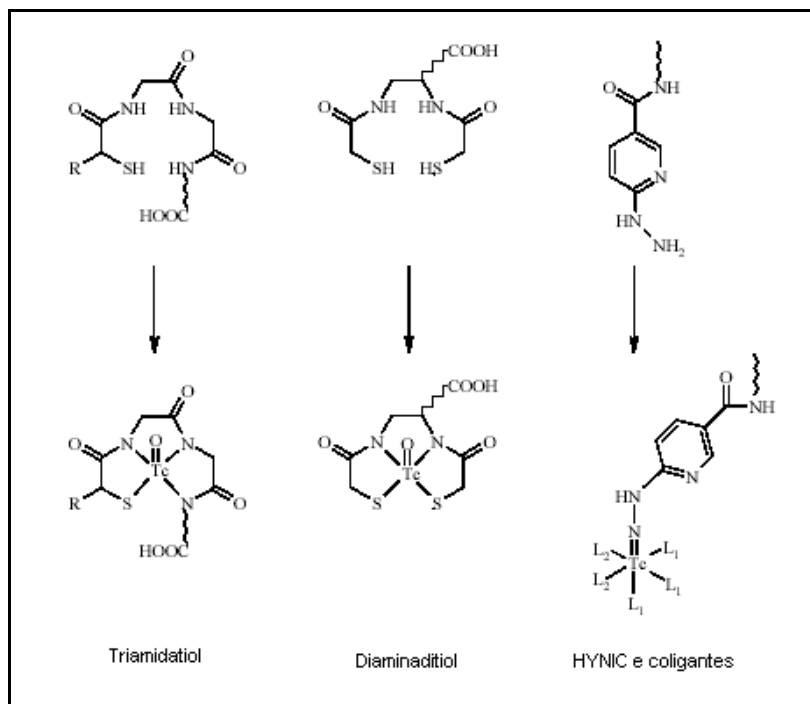


Figura 4 – Estrutura do Tecnécio ligado a diferentes quelantes (adaptado de Radiofármacos receptor-específico, 2005).

A maior parte destes quelantes requerem condições drásticas de radiomarcção, tais como pH e temperatura elevados e, como consequência, eles não podem ser aplicados na marcação de polipeptídios e proteínas. Dentre estes BFCs, o HYNIC apresenta interesse particular, pois apresenta alta eficiência de marcação e resulta em complexos com alta estabilidade (Liu et al, 1998).

O Etilenodicisteína (EC) é o exemplo de sucesso mais recente de quelante do tipo diaminaditiol e tem sido amplamente estudado. Além do tecnécio, este quelante pode ser utilizado em marcações com outros radiometais, tais como índio e gálio. O EC, quando radiomarcado com ^{99m}Tc em pH alto, forma um quelato estável, que é rapidamente excretado pelos rins, apresentando baixa retenção renal e hepática (Verbruggen et al., 1992). Proteínas acopladas ao EC podem ser facilmente radiomarcadas com ^{99m}Tc com alta pureza radioquímica e estabilidade (Yang et al, 2006; Verbeke et al, 2002; Anderson et al, 1995).

3.5.1 Núcleos de tecnécio

Diferentes núcleos de tecnécio têm sido utilizados para radiomarcção de biomoléculas, tais como anticorpos, fragmentos de anticorpos, peptídeos e ligantes receptor-específicos não peptídicos (Liu, 2008). Na FIG. 5 observam-se as estruturas dos núcleos mais utilizados na radiomarcção de biomoléculas com tecnécio. Esses núcleos são representados pelo óxido de tecnécio (III), pelo tecnécio nitrido (III), pelo tecnécio tricarbonila e pelo HYNIC- ^{99m}Tc .

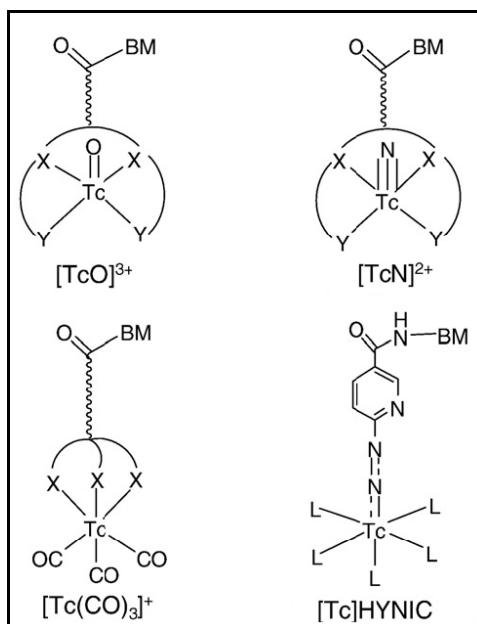


Figura 5 – Estrutura dos núcleos comumente utilizados na radiomarcagem de biomoléculas com tecnécio (adaptado de Liu, 2008).

3.5.1.1 Núcleo óxido de tecnécio - $[^{99m}Tc=O]^{3+}$

A maior parte das biomoléculas radiomarcadas com tecnécio apresenta este núcleo, que é altamente estável na presença de um quelante bifuncional adequado em solução aquosa. Diversos BFCs têm sido utilizados na obtenção deste núcleo, observando-se diferentes geometrias de coordenação, tais como: MAG_3 , EC, PnAO, diaminodeditiol (DADS), monoamidamonoaminaditiol (MAMA), além das sequências peptídicas Gly-Ala-Gly-Gly e Gly-Ser-Cys. Estes BFCs se ligam ao $^{99m}TcO_4^-$ reduzido rapidamente e formam o núcleo $[Tc=O]^{3+}$, porém apresentam o inconveniente de formarem isômeros múltiplos quando utilizados ligantes do tipo $N_xS_{(4-x)}$, o que pode acarretar em alterações nas propriedades farmacocinéticas do radiofármaco. Na FIG. 6 observam-se as estruturas de alguns complexos que apresentam o núcleo $[Tc=O]^{3+}$ (Liu, 2008).

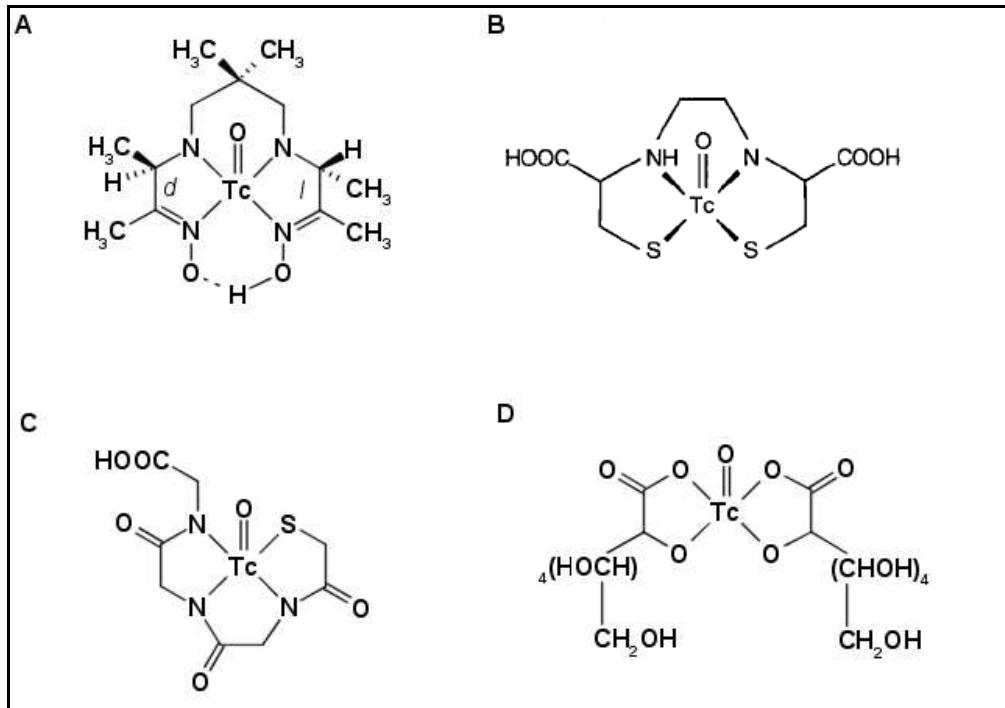


Figura 6 – Complexos com núcleo $[Tc = O]^{3+}$: (A) $[^{99m}TcO-d,l-HMPAO]^0$, (B) $[^{99m}TcO-L,L-EC]$, (C) $[^{99m}TcO(MAG_3)]^-$, (D) $[^{99m}TcO(glucoheptonato)_2]^-$ (adaptado de Liu, 2008 e Verbeke et al., 2002).

3.5.1.2 Núcleo tecnécio nitrido - $[^{99m}Tc \equiv N]^{2+}$

O ligante nitrido é um poderoso doador de elétrons π e apresenta uma alta capacidade para estabilizar o átomo de tecnécio em altos estados de oxidação. Quando o tecnécio apresenta o estado +V o núcleo formado é isoeletrônico com o núcleo $[Tc=O]^{3+}$. O núcleo $[Tc \equiv N]^{2+}$ forma complexos Tc(V)-nitrido com vários quelantes, tais como SDH e o DTCZ (N-metil,S-metil-ditiocarbazonato). Para formar este núcleo, o íon Tc(V) se liga ao átomo de nitrogênio (N^{-3}) com ligação tripla, o que confere alta estabilidade química frente a variações de pH, por exemplo. Na FIG. 7 pode-se observar a estrutura de alguns complexos que apresentam o núcleo $[Tc \equiv N]^{2+}$ (Liu, 2008; Zhang e Wang, 2001).

O forte poder doador de elétrons π do grupo $Tc \equiv N$ quando comparado ao $Tc=O$ é devido ao: (i) menor comprimento de ligação $Tc \equiv N$

em relação à ligação Tc=O; (ii) efeito trans labilizante mais forte causado pelo núcleo [Tc≡N], que resulta em complexos penta-coordenados ao invés de hexa-coordenados, como no caso dos complexos Tc-oxo; (iii) ligante terminal nitrido exerce maior efeito estérico produzindo ângulos N≡Tc-L geralmente menores do que o O=Tc-L e a (iiii) ligações Tc-L mais longas para o complexo nitrido, quando os estados de oxidação e ligantes são os mesmos (Tisato et al., 1994).

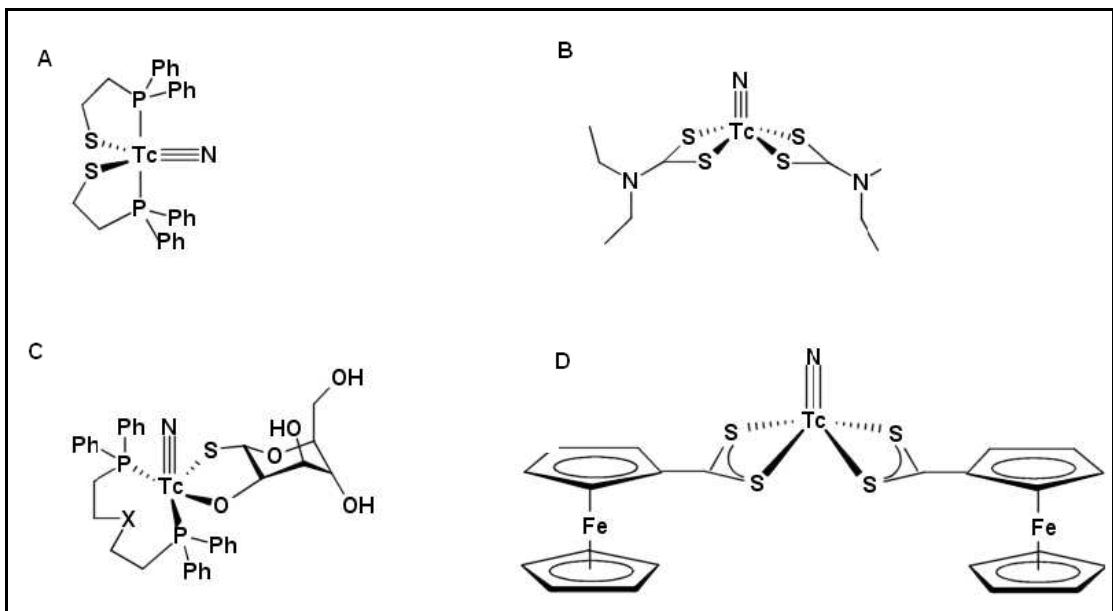


Figura 7 – Complexos de tecnécio utilizando o núcleo $[Tc \equiv N]^{2+}$: (A) $[TcN(Ph_2PCH_2CH_2S)_2]^0$, (B) $[TcN(S_2CNET_2)_2]^{-2}$, (C) heterocomplexo assimétrico da forma $[TcN(PXP)(XY)]$, (D) $[TcN(\text{Ferroceneditiocarboxilato})_2]^+$

3.5.1.3 Núcleo $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$

Alberto e colaboradores (1998) foram os primeiros a descrever a síntese do complexo $[Tc(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ por redução direta do TcO_4^- com borohidreto de sódio em solução aquosa (FIG. 8). Neste núcleo organometálico o tecnécio apresenta estado de oxidação +I com uma

variável química de coordenação. Diversos quelantes podem ser utilizados na formação deste núcleo, entretanto quelantes monodentados e bidentados geram complexos com baixa estabilidade em solução, o que resulta em alta ligação às proteínas e alta radiação de fundo, quando presentes na circulação sanguínea. Em contrapartida, quelantes tridentados formam complexos com alta estabilidade e rápido clareamento sanguíneo e nos outros órgãos principais (Liu, 2008; Psimadas et al., 2006).

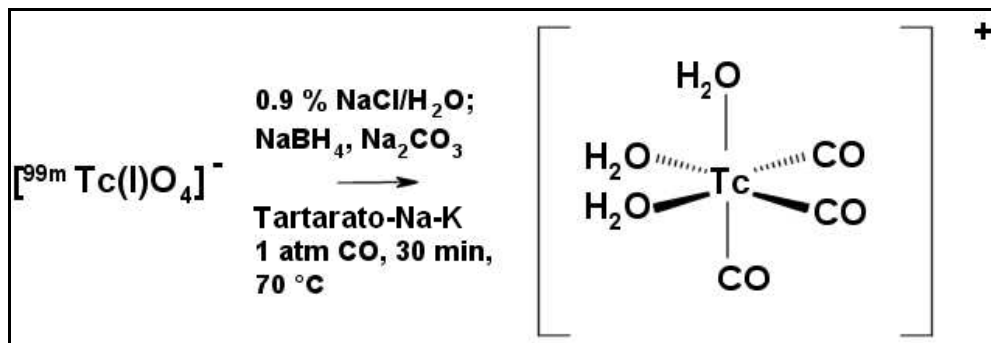


Figura 8 – Esquema de obtenção do núcleo tecnécio tricarbonila.

3.5.1.4 Núcleo [^{99m}Tc-HYNIC]

Este núcleo foi primeiramente descrito por Abrans e colaboradores em 1990 e desde então vários métodos para acoplar o HYNIC às proteínas foram descritos na literatura. Visto que o HYNIC serve como um ligante monodentado ou bidentado, um coligante é necessário para completar a esfera da coordenação do ^{99m}Tc(V). Vários coligantes tais como o glucoheptonato, tricina, EDDA, e combinações como tricina/fosfina, tricina/piridina têm sido utilizados. (Liu et al., 2002). Babich e Fischamn (1995) foram os primeiros a demonstrar que o coligante apresenta um papel importante na biodistribuição do peptídeo radiomarcado e que, variando-se o coligante, ocorrem mudanças significativas na hidrofiliicidade e farmacocinética do radiofármaco.

A tricina tem sido o coligante mais amplamente utilizado para radiomarcagem de proteínas com HYNIC. Conforme Liu e Edwards (1999), o HYNIC requer duas moléculas de tricina para completar a esfera de coordenação do tecnécio. Neste caminho, conjugados biomolécula-HYNIC- ^{99m}Tc têm sido gerados com alto rendimento radioquímico e alta atividade específica em curto tempo de reação. Porém, o uso da tricina como coligante único acarreta, principalmente, em dois inconvenientes: instabilidade em solução do complexo $^{99m}\text{Tc}(\text{HYNIC-BM})(\text{tricina})_2$ e a presença de espécies múltiplas em solução devido às diferentes modalidades de ligação entre o HYNIC e o coligante.

3.6 Controle Radioquímico

O controle radioquímico é a análise qualitativa e quantitativa das espécies radioativas presentes na amostra. Consiste na determinação da porcentagem da radioatividade presente na forma radioquímica desejada. Um radiofármaco deve ter pureza radioquímica superior a 90%, pois a administração de espécies químicas indesejadas de tecnécio-99m aumentaria a captação da radioatividade nos órgãos não-alvo, comprometendo a aquisição da imagem (Liu, 2008).

As impurezas radioquímicas são determinadas, em geral, por métodos cromatográficos. A cromatografia é um método físico-químico que tem a capacidade de separar componentes de uma amostra, realizada pela distribuição destes componentes entre duas fases. Uma das fases está fixa (fase estacionária), enquanto a outra passa através dela (fase móvel). Durante a passagem da fase móvel através da fase estacionária (líquida ou sólida), os componentes da amostra são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em uma migração diferencial que promove a separação (Collins et al., 2006).

Os radiofármacos marcados com ^{99m}Tc podem apresentar como impurezas radioquímicas o pertecnetato de sódio ($^{99m}\text{TcO}_4^-$), o tecnécio reduzido e/ou hidrolisado ($^{99m}\text{TcO}_2$ e $^{99m}\text{Tc}(\text{OH})_3$, respectivamente) e o tecnécio ligado à subprodutos gerados no processo de radiomarcção.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Infraestrutura

O presente projeto foi desenvolvido nos laboratórios de Pesquisa e Desenvolvimento de Radiofármacos da Diretoria de Radiofarmácia (DIRF), no laboratório de Cultivo Celular, laboratório de Radiobiologia e no Biotério do Centro de Biotecnologia (CB), no Irradiador do Centro de Tecnologia das Radiações (CTR), todos situados nas dependências do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). Todas as instalações dispunham da infraestrutura necessária para o desenvolvimento dos experimentos, contando com laboratórios equipados para a realização da síntese química, manipulação e irradiação de células, bem como das técnicas de radiomarcagem e manipulação de animais.

4.2 Materiais

4.2.1 Reagentes e Soluções

- ✓ [3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolina] - MTS, Promega Corp. (EUA);
- ✓ Ácido nicotínico, Aldrich (EUA);
- ✓ Ácido propilenodiaminotetraacético – PDTA, Aldrich (EUA);
- ✓ Água Milli-Q - Purificador Milli-RX 45, Millipore (EUA);
- ✓ Anexina A5 humana, Bender MedSystems (EUA);
- ✓ Anexina A5-HYNIC, National Cancer Institute-Frederick (EUA);
- ✓ Brometo de etídio, Sigma (EUA);
- ✓ Células PC-3 de adenocarcinoma de próstata humano, Hemocentro da UNICAMP (Brasil);

- ✓ Cloreto de estanho, Carlo Erba (Itália);
- ✓ Diisopropiletinamina – DIPEA, Sigma (EUA);
- ✓ Dihidrazida succínica – SDH, Sigma-Aldrich (EUA);
- ✓ Etilenodicisteína – EC, ABX (EUA);
- ✓ Laranja de acridina, FLUKA (EUA);
- ✓ Meio de cultura RPMI 1640, Cultilab (Brasil);
- ✓ Meosulfato de fenazina, Sigma (EUA);
- ✓ Penicilina:estreptomicina, Gibco-Invitrogen (EUA);
- ✓ Solventes diversos – grau analítico e grau HPLC, Merck (Brasil);
- ✓ Soro fetal bovino, Cultilab (Brasil);
- ✓ Tampão citrato dextrose pH 5 (ACD);
- ✓ Tampão de ligação (Hepes 10 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM; KCl 5 mM; MgCl₂ 1mM e CaCl₂ 18 mM);
- ✓ Tampão fosfato/salina pH 7,5 (PBS);
- ✓ Tampão para CLAE (Tampão fosfato de sódio 0,05 M, NaCl 0,15 M e N₃Na 1 mM);
- ✓ Tecnécio-99m – eluído do gerador IPEN-TEC na forma de solução de pertecnetato de sódio, IPEN-CNEN, (Brasil);
- ✓ Tetrafluoroborato de O-(N-succinimidil)-N,N,N',N'-tetrametilurônio – TSTU, FLUKA (EUA);
- ✓ Tricina, Sigma (EUA);
- ✓ tripsina bovina, Cultilab (Brasil).

4.2.2 Materiais, equipamentos e sistemas

- ✓ Agitador com aquecimento para tubos tipo eppendorf - Confort eppendorf 1,5 mL, Eppendorf (EUA);
- ✓ Agitador de tubos tipo vortex – Vertex (Brasil);
- ✓ Agitador magnético com aquecimento - 725A Fisatom (Brasil);
- ✓ Balança analítica - M-220 Denver Instrument (EUA);
- ✓ Centrífuga - CF 7D2, Himac Hitachi (Japão);

- ✓ Contador automático tipo poço, com cristal NaI(Tl) - D5002 Cobra II, Packard-Camberra (EUA);
- ✓ Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) composto por sistema modulado constituído por bomba LC-10 ATvp, controlador automático de gradiente FCV-10 AL, degaseificador DGU-20A5, injetor automático de amostras SIL-10ADvp, detector UV SPD-10A e forno CTO-10 Avp. Shimadzu (Japão);
- ✓ Detector radioativo (câmara de cintilação - NaI) do sistema CLAE - Shell Jr. 1000/2000, Shell-usa (EUA);
- ✓ Curiômetro - CRC-15R, Capintec (EUA);
- ✓ pHmetro - Tecnopon (Brasil);
- ✓ Irradiador de Co-60 - Yoshizawa Kiko (Japão);
- ✓ Microscópio ótico - E100, Nikon (Japão);
- ✓ Microscópio de fluorescência - Carl Zeiss (EUA);
- ✓ Leitor de microplacas - Dynatec, Model MR4000, (EUA);
- ✓ Programa Biexp (México).

4.2.3 Outros

- ✓ Coluna Symmetry (RP-C₁₈) para cromatografia líquida de alta eficiência 250 x 4,6 mm, 5 µm, Waters (Irlanda);
- ✓ Coluna ultrahidrogel 120 para cromatografia líquida de alta eficiência 300 X 7,8 mm, Waters (Japão);
- ✓ Coluna (RP-C₄) para cromatografia líquida de alta eficiência 250 x 4,6 mm, 5 µm, Vydak (EUA);
- ✓ Instrumentos cirúrgicos;
- ✓ Membrana filtrante de poro 0,22 µm - Millipore (EUA);
- ✓ Micropipetas;
- ✓ Nitrogênio gasoso - White Martins (Brasil);
- ✓ Papel cromatográfico Whatman 1MM, Whatman (Brasil);

- ✓ Suporte cromatográfico de sílica gel 60 em fibra de vidro (ITLC-SG), Pall Corporation (EUA);
- ✓ Suporte cromatográfico de sílica gel 60 em placa de alumina (TLC-SG), Merck (Brasil);
- ✓ Vidraria e material plástico em geral.

4.2.4 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss*, machos, adultos sadios (8 a 12 semanas), pesando entre 25 e 35g (Biotério do IPEN-CNEN/SP). O protocolo experimental foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IPEN e realizado de acordo com as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

4.2.5 Células PC-3 derivadas de adenocarcinoma de próstata humano

As células PC-3, derivadas de adenocarcinoma de próstata humano, foram cultivadas a 37° C e 5% de CO₂ em meio de cultura RPMI 1640, enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (penicilina:streptomicina). Ao atingirem 80% de confluência na placa de cultura, as células foram tripsinizadas e ressuspensas em solução e concentração variadas, conforme o ensaio realizado.

4.3 Métodos

4.3.1 Radiomarcção da ANXA5

A ANXA5 foi radiomarcada com tecnécio-99m via grupamento quelante do tipo SDH (Subbarayan et al, 2003), via grupamento quelante bifuncional EC, utilizando uma metodologia inédita de derivatização (Yang et al., 2001 modificado) e posterior marcação conforme descrito por Yang e colaboradores (2001). Os resultados foram comparados com os obtidos

para a marcação da ANXA5 utilizando-se o reagente formulado de ANXA5-HYNIC obtido por doação do "National Cancer Institute-Frederick" (EUA). Neste trabalho avaliou-se comparativamente a viabilidade e a facilidade das técnicas, de modo a escolher a metodologia de marcação mais adequada a uma rotina de produção de anexina A5 radiomarcada, para atender ao interesse da classe médica nuclear brasileira.

4.3.1.1 Técnica de radiomarcção utilizando-se dihidrazida succínica (SDH)

A um tubo tipo eppendorf adicionou-se 4,0 mg de dihidrazida succínica (SDH), 4,0 mg de ácido propilenodiaminotetraacético (PDTA), 20,0 mg de tricina e 2,0 mg de ácido nicotínico. Após uma suave agitação, adicionou-se 50 µg de cloreto de estanho diluído em ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ e 185 – 259 MBq (5 – 7 mCi) de solução de pertecnetato de sódio (^{99m}TcO₄⁻) recém eluído e a reação prosseguiu por 10 a 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 40µg de ANXA5 em solução salina (NaCl 0,9%). A reação permaneceu sob aquecimento de 90° C por mais 15 a 30 minutos (Subbarayan et al., 2003). A análise da pureza radioquímica das marcações foi realizada conforme descrito no item 4.3.2.

Nesta fase estudaram-se os parâmetros que interferem na reação, tais como concentração do estanho, tempo de reação, massa do PDTA, ordem de adição do coligante (tricina) e ligante ternário (ácido nicotínico) e massa da proteína.

A radiomarcção da ANXA5 por esta via envolve a obtenção do intermediário ^{99m}TcN-SDH, na primeira fase da reação. A porcentagem de obtenção deste intermediário foi avaliada por dois sistemas cromatográficos. O primeiro deles foi a cromatografia ascendente, utilizando solução NaCl 0,9% como fase móvel e papel Whatman n° 1 como fase estacionária e acetona como fase móvel e suporte de sílica gel

(TLC-SG) como fase estacionária. O segundo sistema utilizado foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando uma coluna de fase reversa C-18 com um sistema de solvente gradiente de 0 - 50% até 3 minutos e de 50 - 70% até 13 minutos de metanol em água, com fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

4.3.1.2 Técnica de radiomarcção utilizando etilenodicisteína (EC)

a. Obtenção do éster etilenodicisteína succinato

A ativação do EC pode ser realizada por esterificação do seu ácido carboxílico por reação com Sulfo-NHS (*N*-hidroxisulfosuccinimida) e EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida), conforme descrito por Yang e colaboradores (2001).

Neste trabalho, a ativação do EC foi realizada por reação com tetrafluoroborato de *O*-(*N*-succinimidil)-*N,N,N',N'*-tetrametilurônio (TSTU) em meio básico, metodologia inédita para a derivatização da ANXA5 com EC e adaptada conforme os trabalhos de Davies e colaboradores (1995), Oswald e colaboradores (1999).

A uma solução aquosa de EC (pH 9,0) adicionou-se TSTU, previamente dissolvido em acetonitrila, conforme as proporções demonstradas na TAB. 5. Deixou-se reagir por 30 minutos a 60° C , sob agitação. A mistura foi então resfriada à temperatura ambiente e, em seguida, adicionou-se a ANXA5 (TAB. 5). A reação de derivatização procedeu-se sob agitação, por 24 horas a $2 - 8^\circ \text{ C}$, em geladeira. Após este período, a mistura foi dialisada por 48 horas a $2 - 8^\circ \text{ C}$, primeiramente com tampão fosfato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,5 nas primeiras 24 horas (2 trocas) e depois com tampão fosfato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7 nas 24 horas seguintes (2 trocas). A proteína derivatizada foi aliquoteada em frações de $40 \text{ }\mu\text{g}$, desconsiderando-se as perdas durante o processo de diálise, e foi analisada por cromatografia líquida de alta

eficiência, utilizando uma coluna de fase reversa C4 e um gradiente linear de 0 a 100% de TFA 0,05% em acetonitrila como fase móvel por 30 minutos a um fluxo de 1 mL min⁻¹.

As diferentes relações molares de ANXA5:EC utilizadas nas reações são apresentadas na TAB. 5.

TABELA 5 – Massa de EC, TSTU, ANXA5 e relações molares ANXA5:EC utilizadas na derivatização da ANXA5 com o EC.

Massa de EC	Massa de TSTU	Massa de ANXA5	Relação molar ANXA5:EC
13,45 µg	30,10 µg	80 µg	$4,6 \times 10^{-2}$
13,45 mg	30,10 mg	300 µg	$1,71 \times 10^{-4}$
13,45 mg	30,10 mg	80 µg	$4,6 \times 10^{-5}$

b. Radiomarcção do conjugado ANXA5-EC com ^{99m}Tc

Ao frasco contendo a ANXA5-EC (40 µg) adicionou-se 0,5 mL de solução de ^{99m}Tc-pertecnetato (185 – 259 MBq) e 50 µL de solução de cloreto de estanho (100 µg) preparado em HCl (0,1mol L⁻¹). Agitou-se suavemente e incubou-se por 30 minutos à temperatura ambiente. A análise da pureza radioquímica das marcações foi realizada conforme descrito no item 4.3.2.

4.3.1.3 Radiomarcção do reagente de ANXA5-HYNIC com ^{99m}Tc

O reagente de ANXA5-HYNIC é composto por dois frascos, um contendo solução de ANXA5-HYNIC e outro a mistura tricina/estanho, ambos armazenados à -20° C.

Retirou-se o reagente do freezer e esperou-se atingir a temperatura ambiente para começar a radiomarcção. Adicionou-se 0,5 mL de solução de pertecnetato de sódio (1,11 a 1,85 GBq) ao frasco do

ANXA5-HYNIC e agitou-se suavemente. Paralelamente, reconstituiu-se o frasco de tricina/estanho com 3,0 mL de NaCl 0,9%. Coletou-se 30 μ L da solução de tricina/estanho e adicionou-se ao frasco do pertecnetato/ANXA5-HYNIC. Agitou-se suavemente e incubou-se por 15 minutos à temperatura ambiente. Este procedimento de marcação foi baseado em procedimento descrito por Vanderrheyden (2007) e a análise da pureza radioquímica das marcações foi realizada conforme descrito no item 4.3.2.

4.3.2 Controle de pureza radioquímica das marcações

A análise da pureza radioquímica da ANXA5 radiomarcada com ^{99m}Tc foi realizada por cromatografia ascendente, utilizando-se diferentes sistemas cromatográficos (TAB. 6), e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando como fase estacionária uma coluna ultra-hidrogel (7,8 \times 30 cm) e como fase móvel tampão citrato dextrose (tampão ACD) pH 5, por 30 minutos a um fluxo de 0,5 mL min^{-1} .

TABELA 6 – Sistemas de CCD utilizados para análise da pureza radioquímica das diferentes técnicas de radiomarcção da ANXA5 com ^{99m}Tc .

Técnica de radiomarcção	Suporte	Solvente	R_f da ANXA5-^{99m}Tc	Referência
SDH	ITLC-SG	Salina	0,0	Subbarayan et al. (2003)
	ITLC-SG	Etanol 85%	1,0	
EC	TLC-SG	Acetato de amônia	NI	Yang et al. (2001)
		1M:metanol (4:1)		
HYNIC	ITLC-SG	Tampão ACD	0,0	Vanderrheyden (2007)

NI=não informado

4.3.3 Análise da Estabilidade

A estabilidade das ANXA5 radiomarcadas pelos diferentes métodos foi analisada após armazenamento à temperatura ambiente, a 2-8° C em geladeira e incubação a 37° C em soro humano.

4.3.3.1 Análise da estabilidade após armazenamento à temperatura ambiente ou à 2-8° C

Incubou-se as misturas de radiomarcção à temperatura ambiente ou a 2-8° C em geladeira por até 6 horas, retirando-se uma alíquota após 30 minutos, 1, 2, 4 e 6 horas para análise da pureza radioquímica por cromatografia em camada delgada, conforme descrito anteriormente. Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.3.3.2 Análise da estabilidade em soro humano

Uma amostra de 10 mL de sangue humano colhido sem anticoagulante foi centrifugada a $1372 \times g$ por 10 minutos e homogeneizada para liberação de coágulo de fibrina. Centrifugou-se novamente por 10 minutos para separação do soro. A 1 mL de soro adicionou-se então 100 μL da ANXA5- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ radiomarcada pelos diferentes métodos e após diferentes tempos de incubação a 37°C (1, 2, 4 e 6 horas) realizou-se o controle cromatográfico em cromatografia em camada delgada. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.3.4 Determinação do coeficiente de partição experimental (CP)

O coeficiente de partição da proteína radiomarcada pelos diferentes métodos foi determinado conforme descrito por Durkan e colaboradores (2007). Adicionou-se 25 μL (6,4 MBq) da ANXA5 radiomarcada a um tubo contendo 3 mL de n-octanol e 3 mL de água destilada, pré-saturados por 24 horas. Agitou-se o tubo por uma hora e, após a separação das fases aquosa e oleosa, coletou-se 10 μL da fase aquosa e 100 μL da fase oleosa para contagem em contador automático tipo poço. O coeficiente de partição foi determinado pela equação:

$$\text{CP} = \log_{10} \left[\frac{\text{cpm fase oleosa}}{\text{cpm fase aquosa} \times 10} \right] \quad (1)$$

4.3.5 Estudos de ligação *in vitro*

A atividade biológica da ANX A5 radiomarcada pelos diferentes métodos foi avaliada através de estudos de ligação em células de tumor de próstata humano (PC-3) com apoptose radioinduzida.

As células PC-3 foram cultivadas a 37° C e 5% de CO₂ em meio de cultura RPMI 1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (penicilina:estreptomicina). Ao atingirem 80% de confluência na placa de cultura, as células foram tripsinizadas e ressuspensas em solução de 10⁶ células mL⁻¹ de PBS em tubo tipo eppendorf.

4.3.5.1 Produção de apoptose radioinduzida em células PC-3

Para a obtenção de apoptose, as células PC-3 (10⁶ células mL⁻¹ de PBS, em tubo cônico tipo eppendorf) foram irradiadas no Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do IPEN, utilizando-se radiação gama proveniente de um irradiador de Cobalto-60 cuja taxa de exposição foi de 82,2 Gy h⁻¹, no período em que as amostras foram irradiadas, utilizando-se diferentes tempos de irradiação de forma a variar a dose absorvida (0 – 10 Gy), a fim de verificar a influência da dose na produção de apoptose. Após a irradiação, as células foram imediatamente transferidas para um banho de gelo e, após 30 minutos, reincubadas em placas de cultura a 37° C e 5% de CO₂ em meio de cultura RPMI 1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina:estreptomicina por mais 48 horas. Decorrido o tempo, foram realizados estudos para confirmar a produção de apoptose nas células irradiadas, tais como coloração diferencial por brometo de etídio/laranja de acridina e teste de viabilidade celular utilizando-se o MTS ([3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolina]), descritos a seguir.

A) Coloração diferencial por brometo de etídio/laranja de acridina

O método de coloração pelo brometo de etídio/laranja de acridina (McGahon et al., 1995) permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose através da coloração diferencial por fluorescência. Este método baseia-se na revelação das células com a coloração do núcleo por brometo de etídio (BE) e laranja de

acridina (LA). A laranja de acridina intercala-se ao DNA, conferindo aparência verde ao núcleo celular, sendo capaz de atravessar membranas intactas. O brometo de etídio é incorporado majoritariamente por células não viáveis (com instabilidade de membrana), intercalando-se ao DNA corando-o de laranja e ligando-se fracamente ao RNA, que se mostrará com uma coloração vermelha. As células viáveis com membrana intacta apresentam núcleo uniformemente corado de verde pela LA. Por outro lado, o BE marca muito fracamente ou muitas vezes não marca, pois não atravessa a membrana íntegra. As células em apoptose inicial (membrana ainda intacta) apresentam manchas verdes brilhantes no núcleo (condensação da cromatina) e não são marcadas pelo BE; morfológicamente observam-se alterações da membrana em decorrência da formação de corpúsculos apoptóticos. Já as células em necrose (lesão de membrana) apresentam um padrão de coloração uniforme, laranja-avermelhada e não há formação de corpos apoptóticos. Possivelmente, as membranas plasmáticas permaneçam intactas durante o fenômeno apoptótico até os últimos estágios, quando se tornam permeáveis aos solutos normalmente retidos (Takahashi et. al., 2004).

As células PC-3 irradiadas e reincubadas foram tripsinizadas, ressuspendidas conforme descrito no item 4.3.5 e procedeu-se à coloração. A técnica de coloração diferencial constituiu em adicionar 10 µL de uma mistura dos corantes fluorescentes laranja de acridina e brometo e etídio (1:1), à 250 µL da suspensão celular (10^6 células mL⁻¹ em PBS). Este procedimento foi realizado para as células irradiadas nas diferentes doses (3 - 10 Gy) e não irradiadas. As células coradas foram então imediatamente colocadas sobre lâminas de microscopia, previamente lavadas e identificadas e, após montagem com lamínulas, foram analisadas por meio de teste cego, em microscópio de epifluorescência com filtro triplo de excitação (DAPI/FITC/Texas red) e de barreira (TBP).

B) Teste de viabilidade celular com o MTS

A fim de avaliar a viabilidade metabólica das células com apoptose radioinduzida, realizou-se o ensaio com o MTS. O MTS é um sal de coloração amarela capaz de captar elétrons em uma reação de oxirredução, formando um produto de coloração roxa, solúvel em água (formazan) na presença de fenazina meosulfato (FIG. 9). O Formazan, por sua vez, apresenta pico de absorção em 490 nm. Na presença de células metabolicamente ativas, o MTS é capaz de captar elétrons da cadeia transportadora de elétrons, dentre outras reações de oxirredução celulares. A medida da absorvância é uma medida do metabolismo e da proliferação celular, sendo as duas grandezas diretamente proporcionais. Uma vez sendo a apoptose um processo ativo, espera-se que a redução na viabilidade metabólica celular seja proporcionalmente menor do que o número de células apoptóticas visualizadas após coloração com laranja de acridina/brometo de etídio.

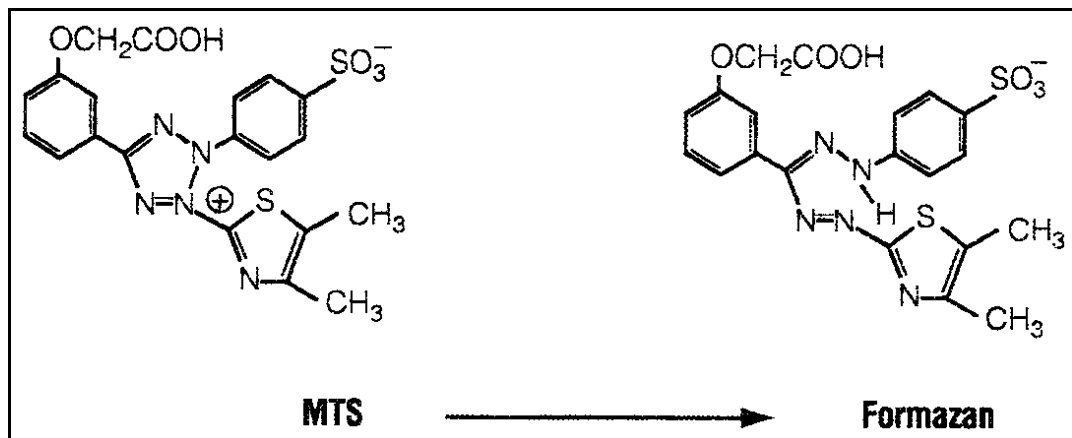


FIGURA 9 – Reação de redução do MTS a formazan.

As células PC-3 irradiadas, utilizando-se a dose previamente determinada (6 Gy) nos estudos descritos no item A de 4.3.5.1, foram ressuspensas conforme descrito no item 4.3.5 e distribuídas em placa de 96 poços (10⁴ células/poço, 200 µL). Após 48 horas de incubação a 37° C

e 5% de CO₂, o número de células viáveis foi avaliado por coloração com MTS (Malich et al., 1997). O MTS (2 mg mL⁻¹ em PBS) foi misturado na proporção de 20:1 (v/v) com fenazina meosulfato (0,92 mg mL⁻¹ em PBS). Adicionou-se 20 µL dessa solução a cada poço da placa e após 1 hora de incubação a 37° C fez-se a leitura da absorvância no comprimento de onda de 490 nm utilizando-se o leitor de microplacas.

4.3.5.2 Estudo de ligação

O estudo de ligação foi realizado para avaliar se a metodologia de radiomarcagem implicou em perda da capacidade da ANXA5 de reconhecer células apoptóticas, ou seja, de se ligar aos resíduos de fosfatidilserina expostos na membrana das células apoptóticas. Após a irradiação, utilizando-se a dose previamente determinada como ideal (6 Gy) pelo item A de 4.3.5.1, as células foram ressuspensas de acordo com o descrito no item 4.3.5 e reincubadas por 48 horas. Decorrido este período, as células foram tripsinizadas, ressuspensas e aliqüotadas em tubo cônico tipo eppendorf (2,2 × 10⁵ células em 0,5 mL de PBS por tubo). Realizaram-se os ensaios de ligação com as ANXA5-^{99m}Tc radiomarcadas pelas diferentes metodologias.

A) Obtenção da curva de saturação

Os tubos cônicos contendo as células irradiadas foram centrifugados a 1372 × g por 5 minutos. Desprezou-se o sobrenadante, lavou-se com 0,5 mL de PBS e centrifugou-se novamente, desprezando o sobrenadante. Em seguida, adicionou-se, uma solução de tampão de ligação contendo diferentes concentrações da ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁶-10⁹ cpm/200 µL). O ensaio foi realizado em triplicata para cada concentração. Incubou-se a 25° C por uma hora e então se centrifugou três vezes a 1397 × g por 5 minutos, desprezando-se e lavando-se novamente com 0,5 mL de PBS a cada centrifugação. Ao final, os botões de células foram contados

em um contador gama tipo poço e a curva de porcentagem de radioatividade incorporada em função da atividade adicionada foi construída, a fim de se determinar a concentração da radioatividade da anexina radiomarcada ótima para realização dos experimentos.

B) Ensaio de ligação

As células PC-3 irradiadas e não irradiadas ($2,2 \times 10^5$ células em 0,5 mL de PBS por tubo) foram centrifugadas a $1372 \times g$ por 5 minutos. Desprezou-se o sobrenadante, lavou-se com 0,5 mL de PBS e centrifugou-se novamente, desprezando-se o sobrenadante. Em seguida, adicionou-se, em triplicata, uma solução de tampão de ligação contendo 10^8 cpm em 200 μ L da ANXA5- ^{99m}Tc radiomarcada pelas diferentes metodologias. Incubou-se a 25°C por uma hora e, ao final da incubação, centrifugou-se três vezes a $1372 \times g$ (3000 rpm) por 5 minutos, desprezando-se e lavando-se novamente com 0,5 mL de PBS a cada centrifugação. Os botões de células foram contados em um contador gama tipo poço e a porcentagem de ligação específica (células irradiadas) e não-específica (células não-irradiadas) foram calculadas para cada uma das ANXA5- ^{99m}Tc .

A FIG. 10 representa um esquema do ensaio de ligação de ANXA5- ^{99m}Tc às células apoptóticas.

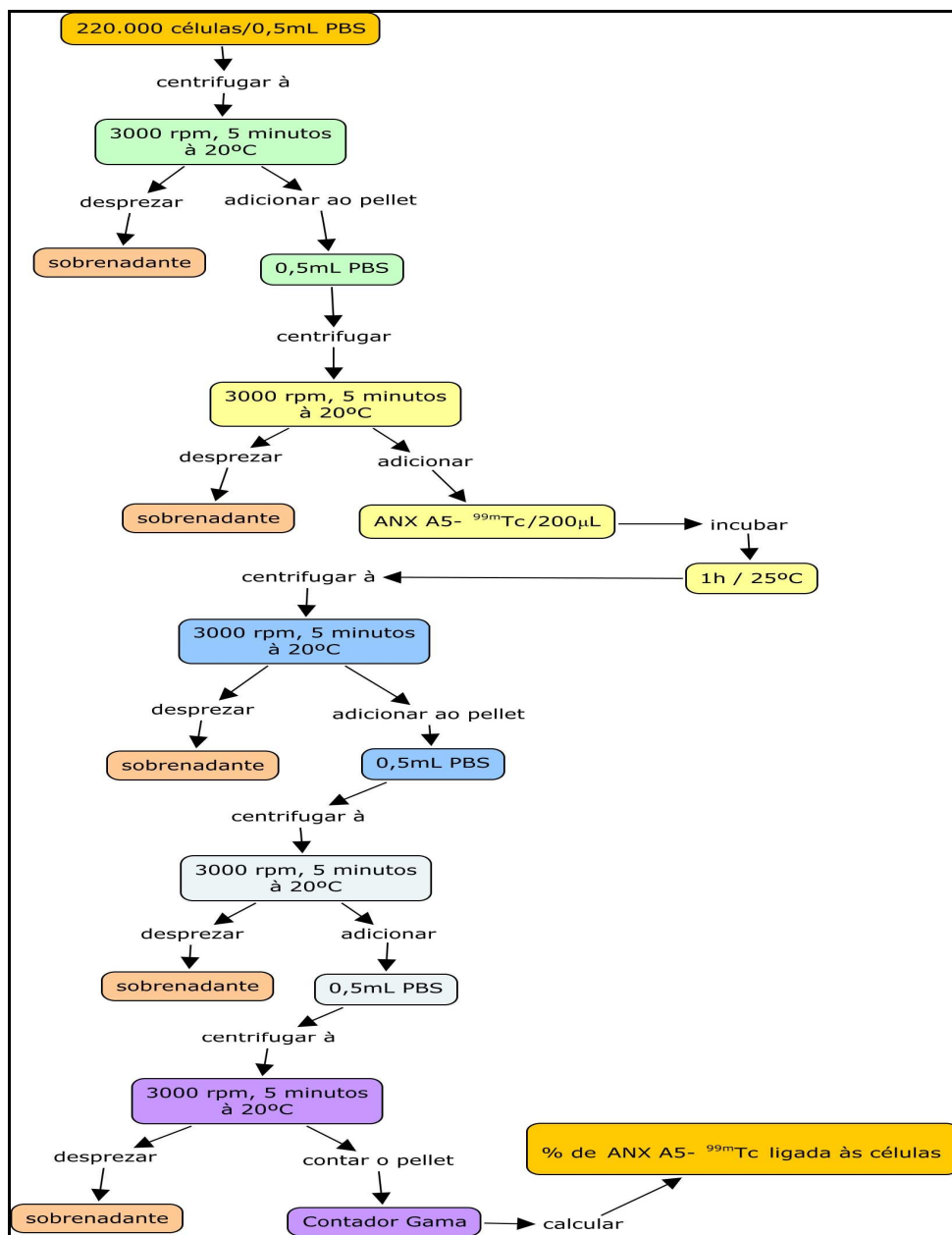


Figura. 10 - Sequência do ensaio de ligação de ANXA5-^{99m}Tc às células apoptóticas.

4.3.6 Estudos *in vivo*

4.3.6.1 Estudos de biodistribuição

A biodistribuição da proteína radiomarcada pelas diferentes técnicas propostas foi avaliada em camundongos *Swiss* sadios e com foco de inflamação experimental.

A) Biodistribuição em camundongos *Swiss* sadios

Os estudos de biodistribuição foram realizados utilizando o método invasivo. Injetou-se por via endovenosa caudal 0,37 MBq (100 μ Ci) das ANXA5-^{99m}Tc radiomarcadas pelas diferentes metodologias e diluídas em 100 μ L de solução salina 0,9%. Após 30 minutos, 1 ou 2 horas os animais foram sacrificados por decapitação, os principais órgãos foram retirados, lavados e pesados e avaliou-se a radioatividade em um contador gama tipo poço. Calcularam-se as porcentagens da atividade injetada por órgão (% AI, EQ. 2) e por grama de órgão (% AI/g, EQ. 3) utilizando-se a média das contagens da triplicata de um padrão da atividade administrada. Os ensaios foram realizados em quintuplicata.

$$\% \text{ AI} = \frac{\text{cpm órgão}}{\text{cpm padrão}} \times 100 \quad (2)$$

$$\% \text{ AI/g} = \frac{\text{cpm órgão}}{\text{peso órgão (g)} \times \text{cpm padrão}} \times 100 \quad (3)$$

Para cálculo da porcentagem de atividade injetada nos músculos dos animais (% AI/músculo), retirou-se uma fração do músculo da coxa dos camundongos, calculou-se a porcentagem de atividade por grama e

assumiu-se o peso dos músculos como 40% (EQ. 4) do peso corpóreo do camundongo (Jiménez, 2007).

$$\% \text{ AI/músculo} = \frac{\text{cpm músculo} \times 40 \times \text{peso do camundongo (g)}}{\text{peso do músculo (g)} \times \text{cpm padrão}} \quad (4)$$

B) Biodistribuição em camundongos com foco de inflamação

Os animais com foco de inflamação foram obtidos promovendo-se lesão inflamatória química pela inoculação de 0,1 mL de terebentina no subcutâneo da coxa traseira direita do animal, uma hora antes da administração do radiofármaco. Injetou-se por via endovenosa caudal 0,37 MBq (100 μ Ci) das ANXA5-^{99m}Tc radiomarcadas pelas diferentes metodologias e diluídas em 100 μ L de solução salina 0,9%. Após 1,5 horas os animais foram sacrificados por decapitação, coletou-se o sangue e as patas normal e inflamada foram retiradas e analisadas quanto à radioatividade em um contador gama tipo poço. Calcularam-se as razões entre a captação na pata inflamada e pata normal e entre captação na pata inflamada e sangue dos animais para as diferentes ANXA5-^{99m}Tc.

4.6.3.2 Estudos farmacocinéticos em camundongos Swiss sadios

Denomina-se farmacocinética a relação entre a administração de um fármaco, sua distribuição no decorrer do tempo e a concentração alcançada nas diferentes partes do organismo (Wilkinson, 2003). A farmacocinética estabelece relações muito estreitas com a farmacodinâmica. Esta, fundamentalmente, estuda os mecanismos de ação dos fármacos e seus efeitos farmacológicos. O conhecimento farmacocinético de um fármaco determina, entre outros, dados importantes como: (a) condições para seu uso adequado; (b) previsão de outros efeitos em potencial, como, por exemplo, efeitos adversos, especialmente no caso de acúmulo do fármaco em um determinado

compartimento; (c) determinação dos mais importantes sítios de biotransformação; (d) determinação das vias de eliminação (Lara, 1985).

No estudo farmacocinético é de grande importância o conceito de compartimento, que tem conotação puramente matemática e nem sempre corresponde a espaço orgânico definido. Exemplo disto é a distribuição, após determinado tempo, de um fármaco na água total do corpo. Como a água é constituinte de todos os elementos orgânicos, o compartimento da água total do organismo é enorme e supera numericamente os valores definidos do volume plasmático ou do volume sanguíneo (Lara, 1985).

A análise da farmacocinética das ANXA5 radiomarcadas pelas diferentes metodologias foi realizada por método não invasivo. Injetou-se por via endovenosa caudal 0,37 MBq (100 μ Ci) das ANXA5-^{99m}Tc diluídas em 100 μ L de solução salina 0,9% e, após diferentes tempos (5, 10, 30, 60 e 120 minutos), coletou-se 60 μ L de sangue pelo plexo orbital dos camundongos utilizando um tubo capilar heparinizado. A radioatividade no sangue foi determinada utilizando-se a média das contagens da triplicata de um padrão da atividade administrada e foi expressa em porcentagem da atividade injetada por mililitro de sangue (% AI/mL sangue, EQ. 5) e em porcentagem da atividade injetada no sangue total (% AI/sangue, EQ. 6). Os ensaios foram realizados em quintuplicata.

$$\% \text{ AI/mL sangue} = \frac{\text{cpm sangue coletado}}{\text{cpm padrão} \times 0,06} \times 100 \quad (5)$$

$$\% \text{ AI/sangue} = \frac{\text{cpm sangue coletado}}{\text{cpm padrão} \times 0,06} \times \text{Volemia} \times 100 \quad (6)$$

O volume total de sangue (volemia) do camundongo foi assumido como 7,78% do seu peso corpóreo (EQ. 7) (Jiménez, 2007).

$$\boxed{\text{Volemia (mL)} = \text{Peso do camundongo (g)} \times 0,0778 \text{ (mL g}^{-1}\text{)}} \quad (7)$$

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados utilizando-se o programa Biexp (Murphy e Tonantzintla, 1991). Este programa é útil para modelar dados experimentais de decaimento radioativo, por meio de um modelo matemático de distribuição bicompartimental, que aproxima o clareamento sanguíneo para um modelo com duas exponenciais, uma de decaimento rápido e outra de decaimento lento. Esta decomposição fornece uma série de dados que traduzem a cinética do radiofármaco, como as constantes de transferência entre compartimentos ($k_{1,2}$ e $k_{2,1}$), a constante de eliminação (k_{ss}), e a de meia-vida nas fases rápida ($T_{1/2\alpha}$) e lenta ($T_{1/2\beta}$).

4.6.4 Análise Estatística

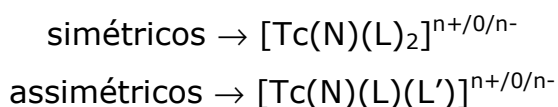
Para a análise dos dados obtidos neste trabalho foi utilizada estatística descritiva e os resultados expressos em média \pm desvio padrão. Para a comparação entre as médias foi utilizado o teste t de Student, teste paramétrico para a comparação de dois grupos independentes. Nas análises as diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o software ORIGIN 7.5.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Técnica de radiomarcção da anexina A5 utilizando a SDH

5.1.1 Obtenção do intermediário $^{99m}\text{TcN-SDH}$

A obtenção do núcleo $^{99m}\text{TcN}^{+2}$ baseia-se na reação do $^{99m}\text{TcO}_4^-$ com SDH, na presença de cloreto de estanho como agente redutor, formando o complexo intermediário $^{99m}\text{TcN-SDH}$, que libera prontamente o núcleo $[\text{}^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}]^{+2}$ para um ligante apropriado (no caso a ANXA5) numa reação de substituição. A SDH é um eficiente doador de átomos de nitrogênio na forma N^{3-} . Para ligar este núcleo a uma biomolécula é necessária a utilização de um sistema tetradentado, a fim de preencher os sítios de ligação do $^{99m}\text{Tc(V)}$. Desta forma, o núcleo $[\text{}^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}]$ coordenado a um sistema de coligantes é capaz de conjugar-se à biomolécula. Uma ampla classe destes complexos é formada por dois ligantes bidentados ligados ao núcleo $[\text{}^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}]$, podendo resultar em complexos simétricos ou assimétricos. Estes complexos podem ser representados pelas fórmulas a seguir:



onde:

L e L' são ligantes bidentados diferentes

n é um integrador

Nesta reação, estudou-se o efeito da concentração do estanho e do tempo de reação na obtenção do intermediário $^{99m}\text{TcN}^{+2}$ e os resultados encontram-se resumidos na FIG. 11. As reações foram realizadas na

presença de 4 mg de SDH, 4 mg de PDTA, 20 mg de tricina e 2 mg de ácido nicotínico, onde se observa que a porcentagem de obtenção do intermediário foi significativamente maior quando o tempo de reação foi 20 minutos, sendo que entre 25 e 500 μg de SnCl_2 as diferenças entre as porcentagens não foram significativas.

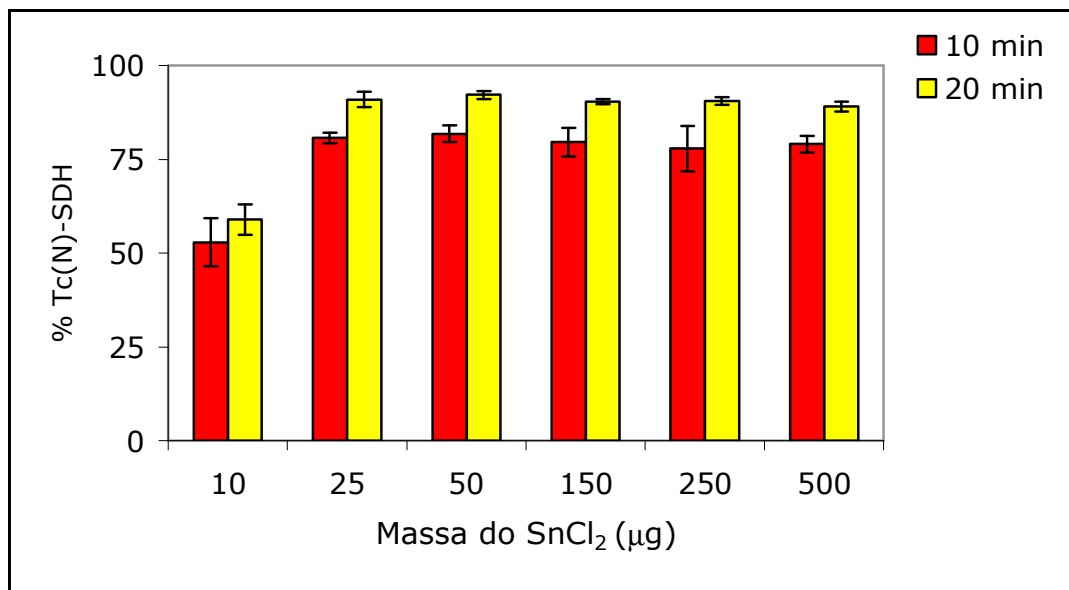


FIGURA 11 - Efeito da concentração do estanho e do tempo de reação na obtenção do intermediário $^{99\text{m}}\text{TcN}^{+2}$ ($n=6$).

Avaliou-se também o efeito da variação na massa do PDTA sobre o rendimento da obtenção do intermediário $^{99\text{m}}\text{Tc-SDH}$, mantendo-se constantes a massa de SDH (4 mg), de SnCl_2 (250 μg), de tricina (20 mg) e de ácido nicotínico (2 mg). O PDTA é utilizado para prevenir a precipitação dos íons de estanho na forma de sais insolúveis (Mang'era et al, 1996). Os resultados da análise de variação da massa do PDTA na porcentagem de formação do intermediário encontram-se na TAB. 7. Pode-se observar que na ausência de PDTA há uma menor formação do intermediário, possivelmente devido à maior formação de espécies coloidais de tecnécio-99m. A condição que conferiu uma maior

porcentagem de formação de $^{99m}\text{Tc-SDH}$ foi aquela em que se reagiu 4 mg de PDTA com as massas dos reagentes citados anteriormente por 20 minutos. A massa de 4 mg de PDTA foi originalmente utilizada por Subbarayan e colaboradores (2003) em seus experimentos para marcação da ANXA5 com ^{99m}Tc utilizando o núcleo [$^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}$].

TABELA 7 - Efeito da variação na massa de PDTA sobre a formação do intermediário $^{99m}\text{TcN-SDH}$.

Massa de PDTA (mg)	% Atividade do Intermediário $^{99m}\text{TcN-SDH}$	
	10 minutos de reação	20 minutos de reação
0	26,55 ± 7,27	24,69 ± 4,59
4	79,20 ± 6,57	95,45 ± 2,37
8	73,75 ± 9,86	81,41 ± 7,04

n=4

Subbarayan e colaboradores (2003) utilizaram a tricina e o ácido nicotínico como coligante e ligante ternário, respectivamente, na radiomarcagem da ANXA5 com o núcleo $^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N}$. Estes autores introduziram estes reagentes na fase de obtenção do intermediário. Entretanto, diversos autores (Lu et al, 2007; Zhang et al 2002; Zhang et al 2001) não descreveram a utilização de coligantes e ligantes ternários na formação deste núcleo, introduzindo estas espécies, quando necessário, na fase de acoplamento do intermediário ao substrato. Sendo assim, no presente estudo, avaliou-se também o efeito da ausência da tricina e do ácido nicotínico sobre a formação do $^{99m}\text{TcN-SDH}$. Não se observou diferença significativa ($p = 0,09$), obtendo-se um rendimento radioquímico do intermediário de $98,23 \pm 0,33\%$ na ausência desses reagentes e $95,45 \pm 2,37\%$ na presença deles ($n = 4$).

O perfil de CLAE do intermediário formado na condição em que se reagiu 4 mg SDH, 4 mg de PDTA, 250 μg de SnCl_2 , 20 mg de tricina e 2 mg de ácido nicotínico é apresentado na FIG. 12. O resultado confirmou o alto rendimento de obtenção do intermediário. Além disso, o $^{99\text{m}}\text{TcN-SDH}$ foi facilmente separado do $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ devido às diferenças entre seus tempos de retenção (TR).

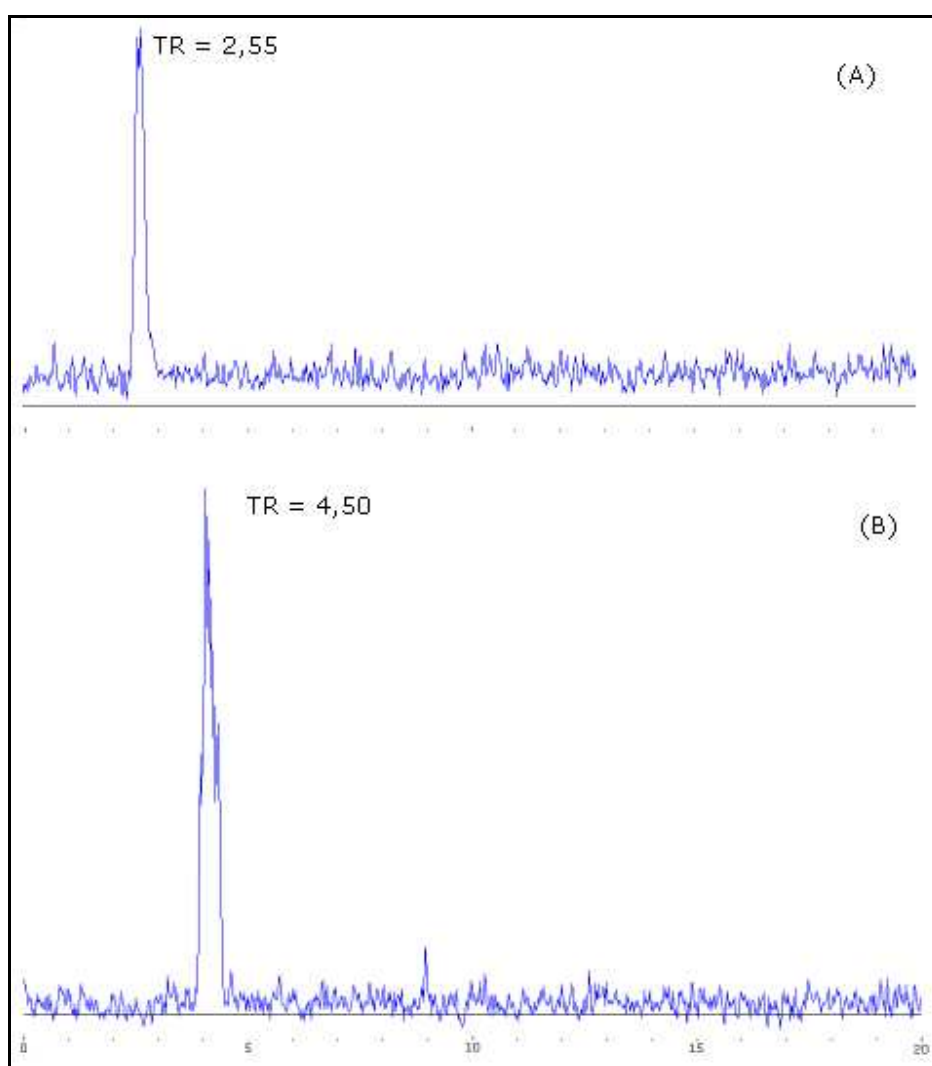


FIGURA 12 – Perfil de CLAE (radioativo) do $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ (A) e $^{99\text{m}}\text{TcN-SDH}$ (B); coluna: C-18 4,6 x 250 mm, 5 μm ; solventes gradiente de 0 - 50% até 3 minutos e de 50 - 70% até 13 minutos de metanol em água; Fluxo: 1,0 mL min $^{-1}$.

5.1.2 Acoplamento do $^{99m}\text{TcN-SDH}$ à proteína

Nesta fase de acoplamento do intermediário à proteína algumas variáveis foram estudadas, dentre elas o tempo de reação, a massa, a ordem de adição do coligante e do ligante ternário e a procedência da proteína. Entretanto, os rendimentos de marcação obtidos foram desprezíveis. Portanto, não se obteve sucesso na fase de acoplamento do intermediário à proteína. Apesar de comprovada a formação do intermediário utilizando-se metodologia de cromatografia em camada delgada (Tab. 7) e CLAE (FIG. 12), com rendimento superior a 95%, o rendimento de incorporação do intermediário à proteína foi desprezível, conforme pode ser observado na FIG. 13. Nesta figura, não se observa diferença nos perfis obtidos para o intermediário e para a proteína radiomarcada, utilizando-se 80 μg da ANXA5 e 30 minutos de reação, indicando que a marcação da proteína não ocorreu, restando apenas o próprio intermediário no meio de reação.

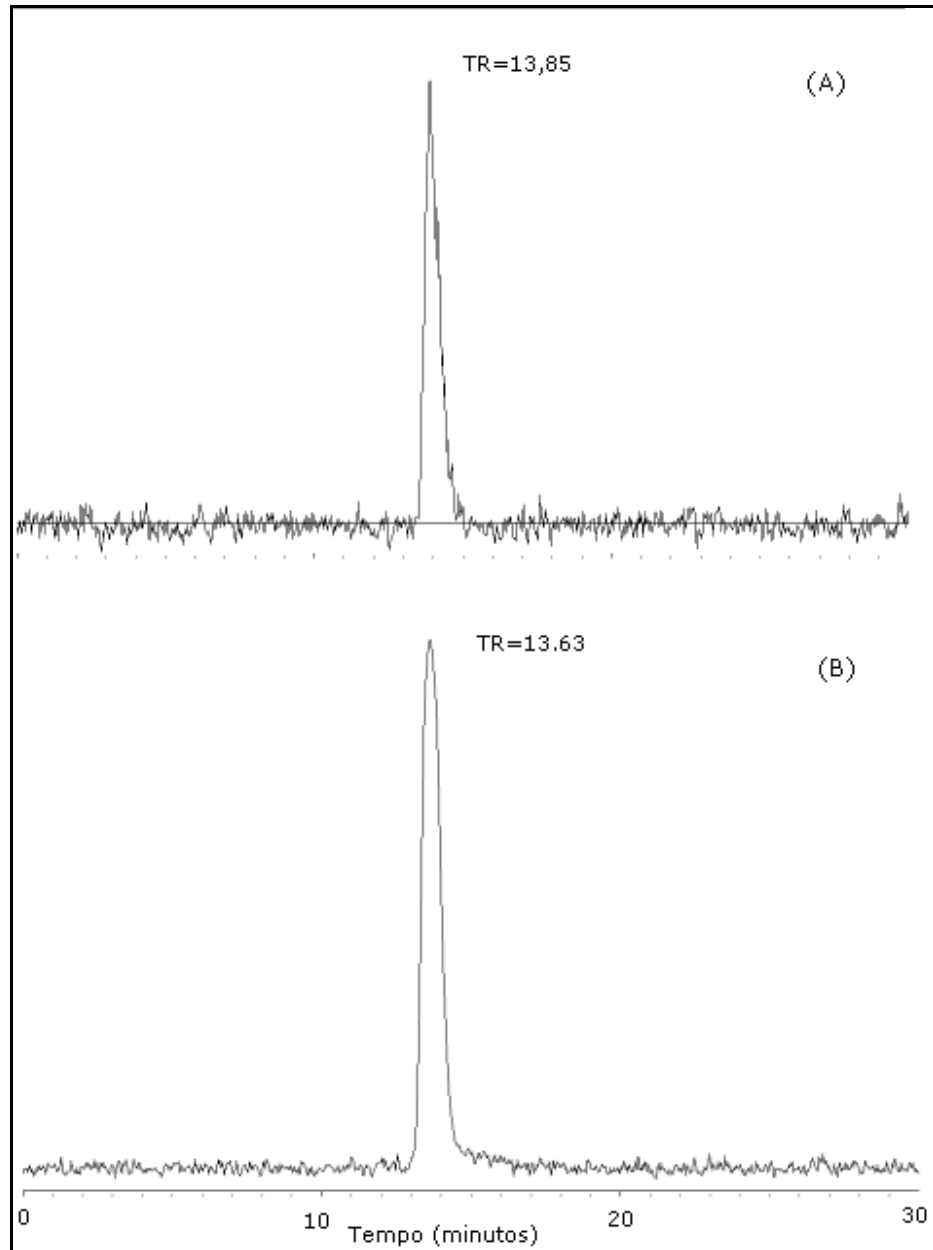


FIGURA 13 – Perfil de CLAE (radioativo) do $^{99m}\text{TcN-SDH}$ (A) e da mistura de marcação supostamente contendo $\text{ANXA5-SDH-}^{99m}\text{TcN}$ (B); coluna: ultrahidrogel 7,8 X 30 cm; Tampão fosfato de sódio 0,05M, NaCl 0,15M e N_3Na 1mM (sistema isocrático); Fluxo: $0,5\text{mL min}^{-1}$.

Conforme previamente descrito, a anexina A5 é uma proteína sensível a temperaturas elevadas, nas quais se observa desnaturação progressiva e subsequente perda da sua atividade biológica (Reutelingsperger et al., 2004; Lahorte et al., 2004). O aquecimento a 90°C por 15 a 30 minutos pode ter provocado alterações estruturais na proteína que inviabilizaram a sua ligação ao intermediário, afetando os sítios protéicos responsáveis pela ligação.

Segundo Subbarayan e colaboradores (2003), no presente método o núcleo $^{99m}\text{TcN}^{+2}$ se liga à ANXA5 via resíduos de cisteína ou histidina. A molécula desta proteína apresenta apenas um resíduo de cisteína e dois de histidina, o que pode ter dificultado a interação do núcleo $^{99m}\text{TcN}^{+2}$ com a proteína. O método talvez lograsse maior sucesso para marcação de fragmentos de proteínas modificadas, contendo resíduos de Cys ou His introduzidos para facilitar a complexação com tecnécio-99m na radiomarcação, conforme descrito por Mukherjee e colaboradores (2006).

5.2 Técnica de radiomarcação da anexina A5 utilizando reagente formulado de HYNIC-ANX A5

A ANXA5 radiomarcada utilizando o reagente formulado foi obtida em um curto tempo de marcação (15 minutos) e com alta pureza radioquímica de $92,66 \pm 0,56\%$. O experimento foi realizado em triplicata. Na FIG. 14 apresenta-se o perfil esquemático das cromatografias em ITLC-SG, nas quais a ANXA5-HYNIC- ^{99m}Tc apresenta R_f 0,0.

Desta forma, ao analisar os perfis cromatográficos em camada delgada da ANXA5-HYNIC- ^{99m}Tc , observa-se, conforme descrito por Vanderrheyden (2007), que a proteína radiomarcada apresenta R_f 0,0 no solvente ACD. A ANXA5-HYNIC- ^{99m}Tc também permaneceu no ponto de aplicação da amostra na fita cromatográfica para o solvente etanol 85%. Entretanto, este mesmo sistema, quando utilizado por Subbarayan e

colaboradores (2003) na marcação da ANXA5 pelo método do SDH, apresentou R_f 1,0 para a proteína radiomarcada. A diferença observada no desenvolvimento cromatográfico das ANXA5 marcadas pelos diferentes métodos sugere que o método de marcação pode resultar em diferenças significativas na polaridade da proteína e conseqüente afinidade pela fase móvel utilizada.

No sistema cromatográfico empregando o acetato de amônio:metanol (4:1), a ANXA5-HYNIC- ^{99m}Tc também apresentou R_f 0,0. Este sistema cromatográfico foi utilizado por Yang e colaboradores (2001) na marcação da ANXA5 pelo método do EC. Os autores, entretanto, não informaram o R_f das espécies radioquímicas presente na mistura de reação.

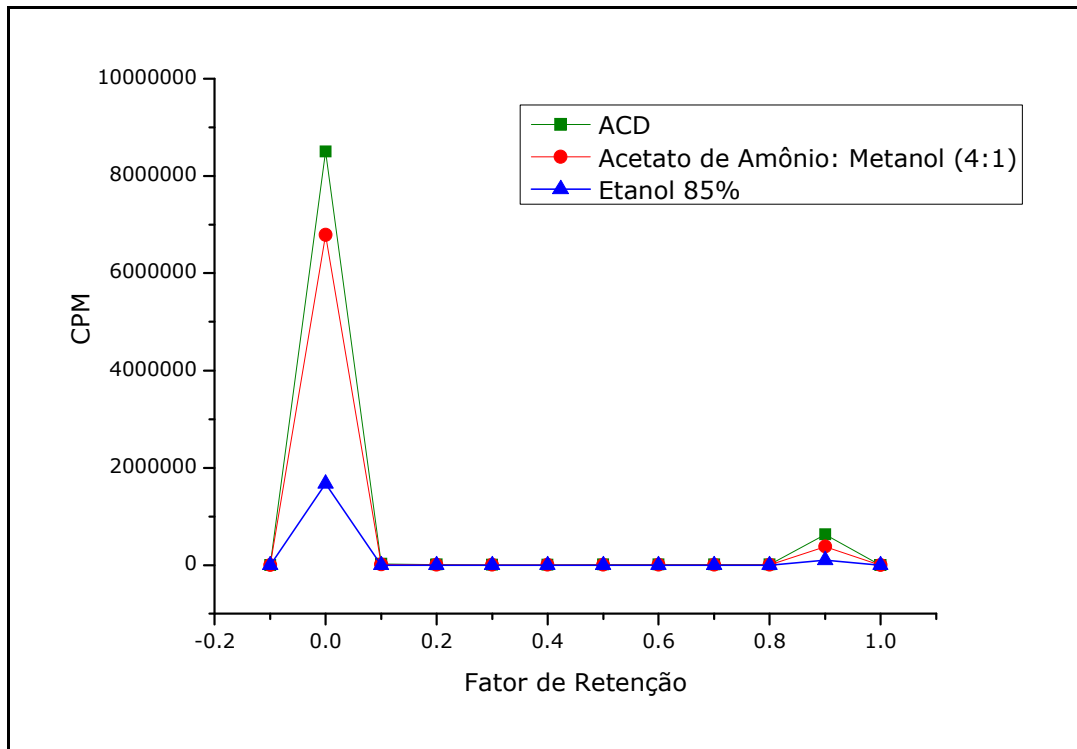


FIGURA 14 – Perfil esquemático da cromatografia em ITLC-SG da ANXA5-HYNIC- ^{99m}Tc e possíveis impurezas da reação utilizando diferentes solventes.

O perfil de CLAE da ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc pode ser observado na FIG. 15. O cromatograma obtido utilizando o detector de radioatividade demonstrou um pico principal, correspondente à espécie radioquímica ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc (TR=11,45 min) e comprovou a alta eficiência de marcação evidenciada em ITLC-SG. Neste mesmo sistema cromatográfico, porém empregando-se fluxo de solvente 1,0 mL/min, a espécie ^{99m}TcO₄⁻ apresentou tempo de retenção 71,73 minutos (FIG 16). O fluxo foi alterado devido à alta interação desta espécie com a coluna, o que pode ser observado por seu alto tempo de retenção.

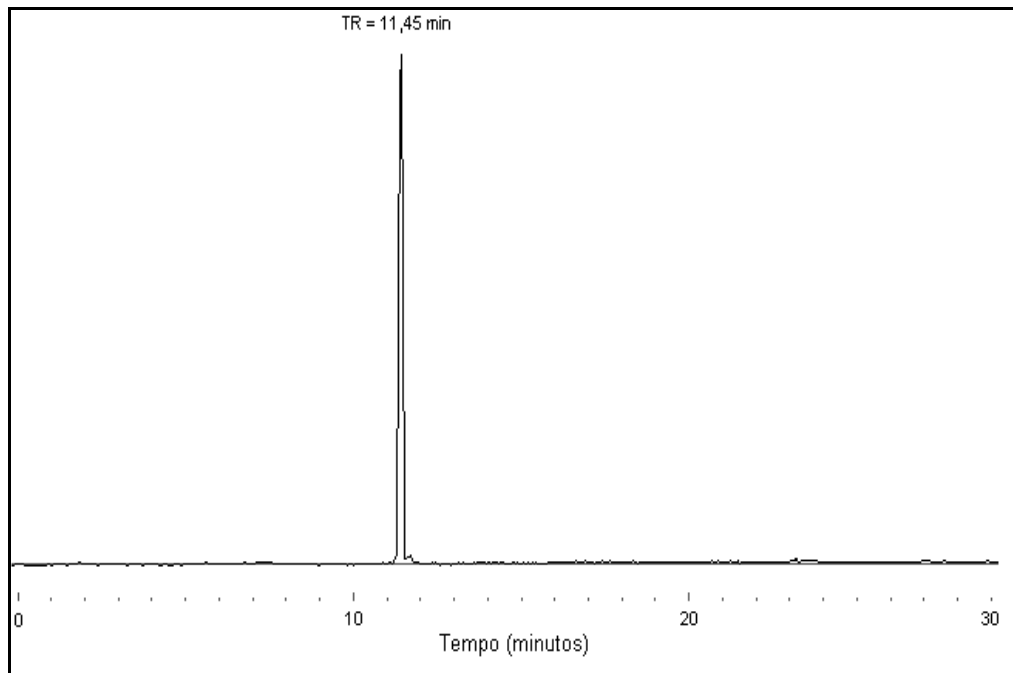


FIGURA 15 – Perfil de CLAE (radioativo) da Anexina A5-HYNIC-^{99m}Tc; coluna: ultrahidrogel 7,8 X 30 cm; Tampão fosfato de sódio 0,05M, NaCl 0,15M e N₃Na 1mM (sistema isocrático); Fluxo: 0,5mL min⁻¹.

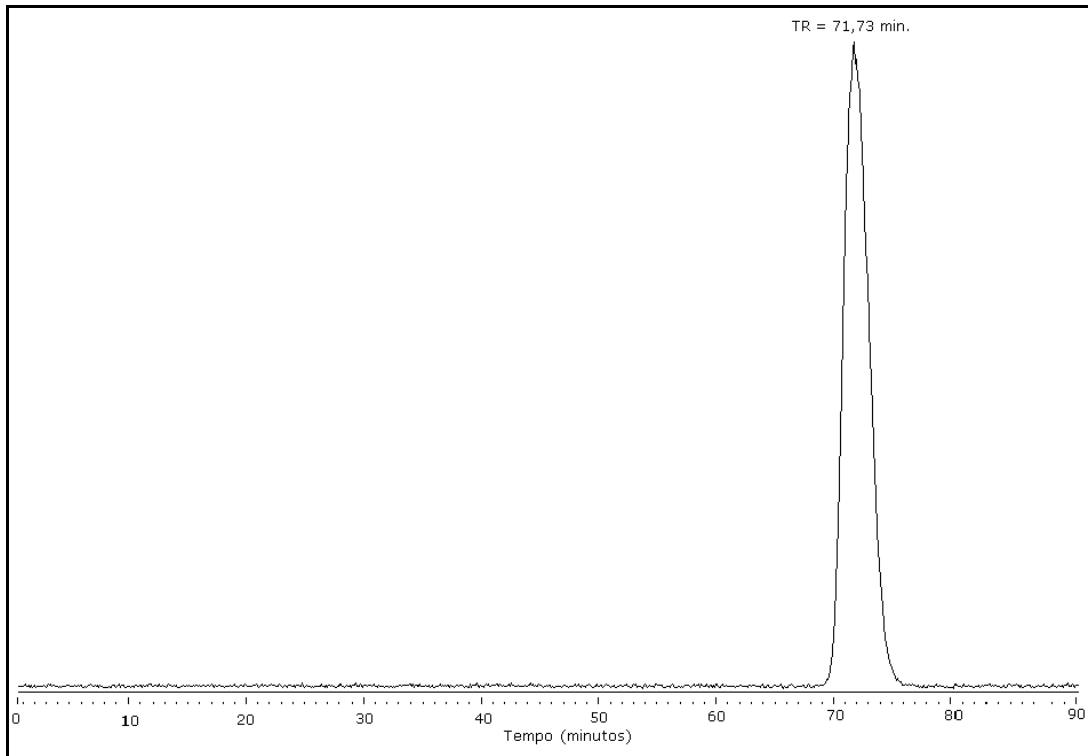


FIGURA 16 - Perfil de CLAE (radioativo) do $^{99m}\text{TcO}_4^-$; coluna: ultrahidrogel 7,8 X 30 cm; Tampão fosfato de sódio 0,05M, NaCl 0,15M e N_3Na 1mM (sistema isocrático); Fluxo: 1mL min^{-1} .

5.3 Técnica de radiomarcção utilizando o EC

5.3.1 Obtenção do éster succinato e derivatização da ANXA5 com o EC

O composto etilenodicisteína (EC) foi convertido em seu éster succinato por tratamento com TSTU em meio básico (pH 9,0). O TSTU e outros sais de urânio têm sido utilizados para formar ésteres NHS de moléculas de baixo peso molecular em sistemas de solventes orgânico/aquoso. O solvente utilizado para dissolver o TSTU foi a acetonitrila, que é um solvente aprótico e não nucleofílico. A reação

converteu o ácido carboxílico do EC em seu éster succinato, que pode ligar-se covalentemente à grupos amino livres (FIG. 17).

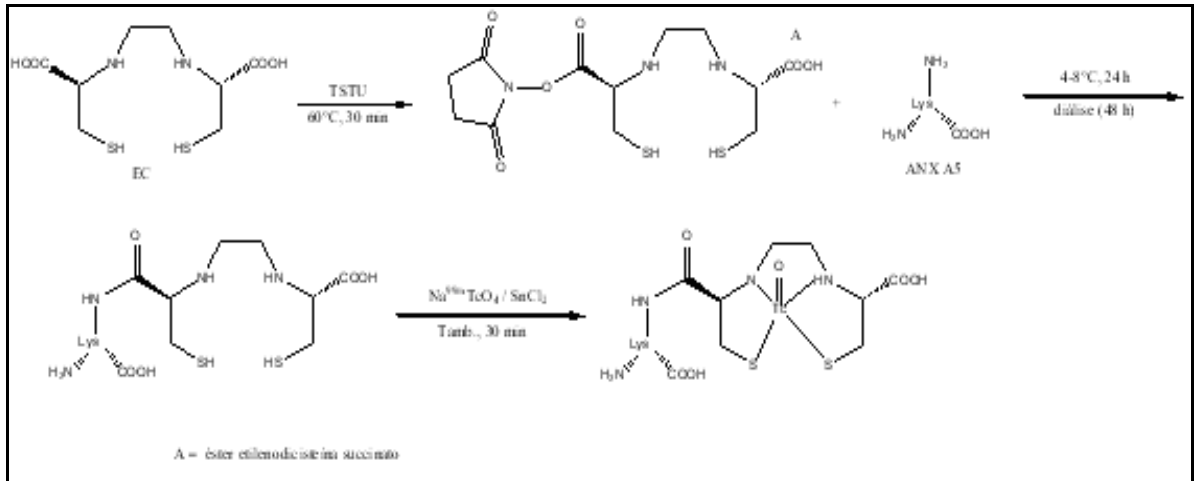


FIGURA 17 – Esquema de obtenção da ANXA5-EC-^{99m}Tc.

A ANXA5 possui 21 resíduos de lisinas livres, nas quais pode ocorrer a incorporação do EC. A conjugação do éster succinato de EC a esta proteína se dá via resíduos de lisina ou grupos amino livres (Biechlin et al, 2008; Yang et al, 2001). Nesta etapa de derivatização, estudou-se a influência da massa da proteína sob o produto formado na reação de conjugação, utilizando-se 3 relações molares de proteína:quelante. Os tempos de retenção em cromatografia líquida de alta eficiência observados para as ANXA5-EC obtidas em duas das três relações molares utilizadas, bem como para a anexina não derivatizada, são apresentados na TAB. 8. No sistema utilizado, observou-se diferença de polaridade entre as ANXA5-EC produzidas nas diferentes relações proteína:quelante analisadas.

TABELA 8 – Tempos de retenção em CLAE (detetor UV, 220 nm) das ANXA5-EC derivatizadas utilizando diferentes relações proteína:quelante em coluna C₄ e gradiente linear de 0 a 100% de TFA:acetonitrila 0,05% em TFA:água 0,05% como fase móvel por 20 minutos.

Espécie	Relação molar ANXA5:EC da derivatização	Tempo de retenção (min)
Anexina	-	16,97
AnxA5-EC	$1,71 \times 10^{-4}$	15,05
AnxA5-EC	$4,6 \times 10^{-5}$	12,13

O EC é um quelante bifuncional que apresenta caráter fortemente polar. A incorporação de um número maior de quelantes pela proteína resultará, provavelmente, em um produto menos lipossolúvel. Ao se utilizar como fase estacionária um sistema de fase reversa com uma coluna C₄ e, considerando o mesmo gradiente de fase móvel, o produto que apresentar menor tempo de retenção (TR) será também o que apresenta um caráter mais polar. Observa-se, pelos dados contidos na TAB. 8, que a anexina que apresenta menor TR é aquela que foi derivatizada com uma menor relação molar proteína:quelante, ou seja, com proporcionalmente uma maior quantidade do éster etilenodicisteína succinato na reação, indicando ser a anexina mais polar provavelmente devido a uma maior incorporação de quelantes por proteína.

5.3.1 Radiomarcção da ANXA5-EC com ^{99m}Tc

Os radiofármacos marcados com ^{99m}Tc podem apresentar como impurezas radioquímicas o pertecnetato de sódio (^{99m}TcO₄⁻), o tecnécio

reduzido e/ou hidrolisado ($^{99m}\text{TcO}_2$ e $^{99m}\text{Tc}(\text{OH})_3$, respectivamente) e o tecnécio ligado aos subprodutos gerados no processo de radiomarcção.

O processo de radiomarcção utilizando o quelante bifuncional EC se mostrou eficiente e rápido. As porcentagens das espécies envolvidas na reação de radiomarcção, calculadas a partir de sua migração nos sistemas cromatográficos citados anteriormente, podem ser observados na TAB. 9.

TABELA 9 - Avaliação por ITLC-SG da ANXA5 radiomarcada pelo método do EC, utilizando as diferentes relações molares ANXA5:EC - porcentagem das diferentes espécies radioquímicas identificadas para os diferentes solventes.

Etanol 85%		Acetato de Amônio:Metanol (4:1)		ACD	
Rf=0,0	Rf=1,0	Rf=0,0	Rf=1,0	Rf=0,0	Rf=1,0
ANXA5-EC-^{99m}Tc (ANXA5:EC = $4,6 \times 10^{-2}$)					
98,4 ± 0,4	1,6 ± 0,4	94,5 ± 1,7	5,5 ± 1,7	5,3 ± 1,0	94,7 ± 1,0
ANXA5-EC-^{99m}Tc (ANXA5:EC = $1,71 \times 10^{-4}$)					
98,5 ± 0,8	1,5 ± 0,8	32,2 ± 11,5	67,8 ± 11,5	4,1 ± 1,6	95,9 ± 1,6
ANXA5-EC-^{99m}Tc (ANXA5:EC = $4,6 \times 10^{-5}$)					
97,9 ± 1,6	2,1 ± 1,6	2,8 ± 0,9	97,2 ± 0,9	2,0 ± 1,4	98,0 ± 1,4

Yang e colaboradores (2001) relataram pureza radioquímica para a ANXA5 radiomarcada via EC de 100%, porém a metodologia desenvolvida por estes autores envolve uma etapa de purificação, a qual não foi utilizada em nossos estudos, tendo em vista a alta pureza radioquímica observada nas radiomarcções.

Considerando-se a possibilidade de a diálise realizada não ter sido totalmente efetiva, outra impureza após a marcação, além do TcO_2 e

o TcO_4^- , poderia ser o produto da complexação do éster de EC com $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Na FIG. 18 apresenta-se o perfil esquemático das cromatografias em ITLC-SG de todas as marcações empregando razões ANXA5:EC diferentes, ressaltando o R_f das espécies radioquímicas identificadas.

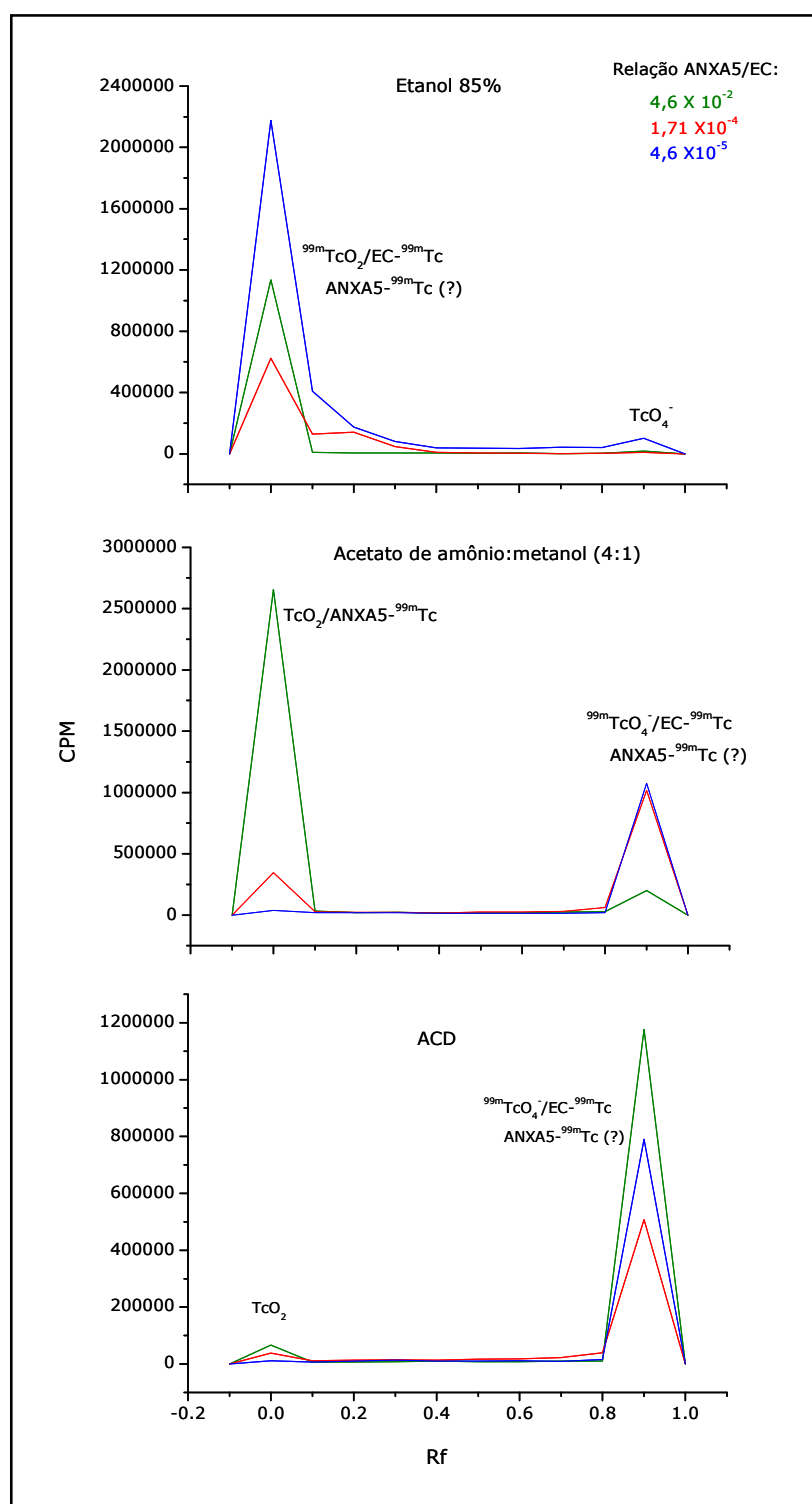


FIGURA 18 – Perfil esquemático da cromatografia em ITLC-SG da ANXA5- $\text{EC-}^{99m}\text{Tc}$ e possíveis impurezas da reação utilizando diferentes solventes.

As marcações da ANXA5 pelo método do EC, utilizando-se diferentes razões molares de proteína:quelante ($4,6 \times 10^{-2}$, $1,71 \times 10^{-4}$ e $4,6 \times 10^{-5}$) foram analisadas por CCD utilizando-se os três sistemas cromatográficos descritos na literatura (FIG. 18).

A análise dos perfis em ITLC-SG da mistura de reação da marcação da anexina A5 com ^{99m}Tc utilizando EC como quelante bifuncional empregando-se ACD e Etanol 85% como fase móvel mostrou uma inversão dos valores de R_f em relação aos descritos na literatura (TAB. 6) para a anexina A5 radiomarcada utilizando-se a metodologia do HYNIC (Vanderheyden, 2007) e SDH (Subbarayan et al., 2003), respectivamente, nas três razões molares ANXA5:EC estudadas. A inversão observada na cromatografia de camada delgada pode decorrer da diferença de polaridade das ANXA5-EC, uma vez que a lipofilicidade da amostra influencia na afinidade do produto pela fase móvel empregada. Vale a pena lembrar que a ANXA5-HYNIC- ^{99m}Tc também apresenta inversão de perfil no solvente etanol 85%, quando comparado aos resultados descritos na literatura para a proteína radiomarcada com o método do SDH (comparando-se os resultados da FIG.14 com os dados de literatura da TAB. 6).

A cromatografia em ITLC-SG utilizando acetato de amônio:metanol como fase móvel foi anteriormente utilizada por Yang e colaboradores (2001) para determinação da pureza radioquímica da radiomarcagem da anexina A5 com tecnécio-99m utilizando o éster succinato de EC como agente quelante. Os autores, entretanto, não descreveram o R_f neste sistema cromatográfico das espécies radioquímicas geradas. Neste trabalho, verificou-se que na radiomarcagem da ANXA5 de menor razão proteína:EC ($4,6 \times 10^{-5}$), a espécie radioquímica de maior porcentagem corre juntamente com a frente de solvente ($R_f=1,0$). Entretanto, o aumento na relação molar proteína:EC ($4,6 \times 10^{-2}$) provoca uma inversão no perfil em ITLC-SG, sendo que a espécie radioquímica em

maior porcentagem permaneceu na origem da fita. Considerando-se que alterações na polaridade podem promover mudanças nos perfis cromatográficos em CCD, conforme já discutido anteriormente, esses achados estão de acordo com os resultados de CLAE (UV) da ANXA5-EC obtida nas razões molares de $1,71 \times 10^{-4}$ e $4,6 \times 10^{-5}$, os quais mostraram diferença de polaridade entre as ANXA5-EC produzidas nas relações proteína:quelante analisadas. A anexina A5 apresenta 21 resíduos de lisina livres, nos quais pode ocorrer a incorporação do EC. Este quelante apresenta caráter fortemente polar, permitindo supor que a incorporação de um número maior de quelantes pela proteína provavelmente resultará em um produto menos lipossolúvel.

Diante desses resultados, foram realizadas análises cromatográficas adicionais das misturas de radiomarcção em CLAE, utilizando coluna de exclusão molecular, com o intuito de confirmar as hipóteses surgidas na análise anterior. Observou-se que, independente da relação proteína:quelante utilizada, o tempo de retenção da espécie radioquímica obtida (FIG. 19) é similar ao obtido para ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc (FIG. 15). Como se sabe, a coluna de exclusão molecular separa as espécies em função do peso molecular. Sendo assim, podemos supor que apesar da incorporação de um maior número de grupamentos EC por molécula de proteína promover alterações significativas na polaridade da molécula de anexina A5, não se observou alterações significativas no tempo de retenção da proteína no sistema cromatográfico de CLAE empregado.

Pode-se supor que a diferença no peso molecular das proteínas derivatizadas em diferentes razões proteína:quelante seja pequena, ao menos para a resolução da coluna empregada. Por outro lado, os picos de CLAE apresentaram-se alargados (FIG. 19), sugerindo ainda a presença de espécies com peso molecular diferentes, porém próximos, dentro de uma faixa não resolvida pelo sistema cromatográfico utilizado.

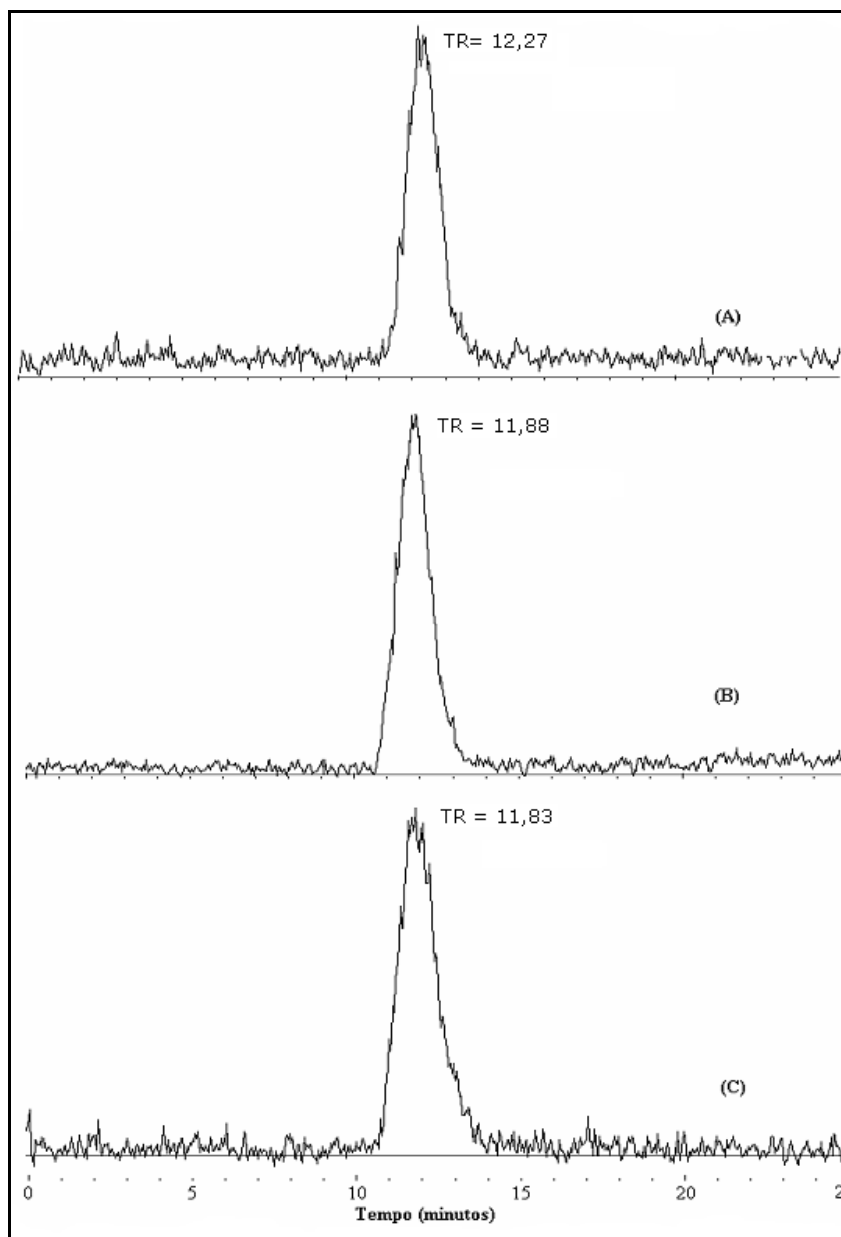


FIGURA 19 - Perfil de CLAE (radioativo) da ANXA5-EC-^{99m}Tc nas relações molares estudadas 10^{-2} (A); 10^{-4} (B); 10^{-5} (C); utilizando coluna de exclusão molecular ultrahidrogel (7,8 X 30 cm); Tampão fosfato de sódio 0,05M, NaCl 0,15M e N_3Na 1mM (sistema isocrático); fluxo $0,5\text{mL min}^{-1}$.

Os demais estudos com a ANXA5-EC foram realizados utilizando as razões molares proteína:quelante $4,6 \times 10^{-2}$ e $4,6 \times 10^{-5}$, abandonando

a relação $1,71 \times 10^{-4}$ que apresentou duas espécies radioativas de ANXA5-EC- ^{99m}Tc em CCD utilizando acetato de Amônio (1 mol L^{-1}):metanol (4:1) como solvente. Foram realizadas radiomarcações da ANXA5-EC após três meses da reação de derivatização. Os resultados mostraram que a razão molar ANXA5:EC de $4,6 \times 10^{-2}$ apresentou maior estabilidade quando estocada à $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ quando comparada a razão molar ANXA5:EC de $4,6 \times 10^{-5}$, já que apresentou pureza radioquímica de $98,66 \pm 0,76$ estatisticamente significativamente maior ($p=0,0013$) do que a ANXA5-EC- ^{99m}Tc (10^{-5}) de $86,13 \pm 4,39$.

5.4 Análise da Estabilidade

5.4.1 Análise da estabilidade após armazenamento à temperatura ambiente

A estabilidade da ANXA5-HYNIC- ^{99m}Tc , ANXA5-EC- ^{99m}Tc (10^{-2}) e ANXA5-EC- ^{99m}Tc (10^{-5}) foi avaliada em temperatura ambiente por um período de até 6 horas (FIG. 20). Dentre os compostos estudados, a ANXA5-EC- ^{99m}Tc (10^{-5}) foi a que apresentou menor estabilidade, tendo sua pureza radioquímica reduzida de $99,92 \pm 0,05 \%$ para $81,74 \pm 0,01 \%$ em apenas 30 minutos. A ANXA5-HYNIC- ^{99m}Tc apresentou pureza radioquímica superior a 90% por até 4 horas. A ANXA5 radiomarcada que apresentou maior estabilidade foi ANXA5-EC- ^{99m}Tc (10^{-2}), que apresentou pureza radioquímica superior a 99% por até 6 horas. O resultado para a ANXA5-HYNIC- ^{99m}Tc não difere do relatado por Boersma e colaboradores (2003) em um estudo comparando a farmacocinética da ANXA5 radiomarcada com tecnécio utilizando os quelantes bifuncionais BTAP e i-imino, em que os compostos obtidos se mantiveram estáveis por até 4 horas após a preparação.

Estes mesmos autores descreveram que a ANXA5 radiomarcada via HYNIC pode ser preparada rapidamente com uma maior estabilidade e pureza radioquímica quando comparada com a ANXA5 radiomarcada via BTAP e i-imino. Neste trabalho, observamos que a ANXA5-EC- ^{99m}Tc (10^{-2}) também pode ser produzida rapidamente, além de apresentar uma maior estabilidade quando comparada com a ANXA5-HYNIC- ^{99m}Tc .

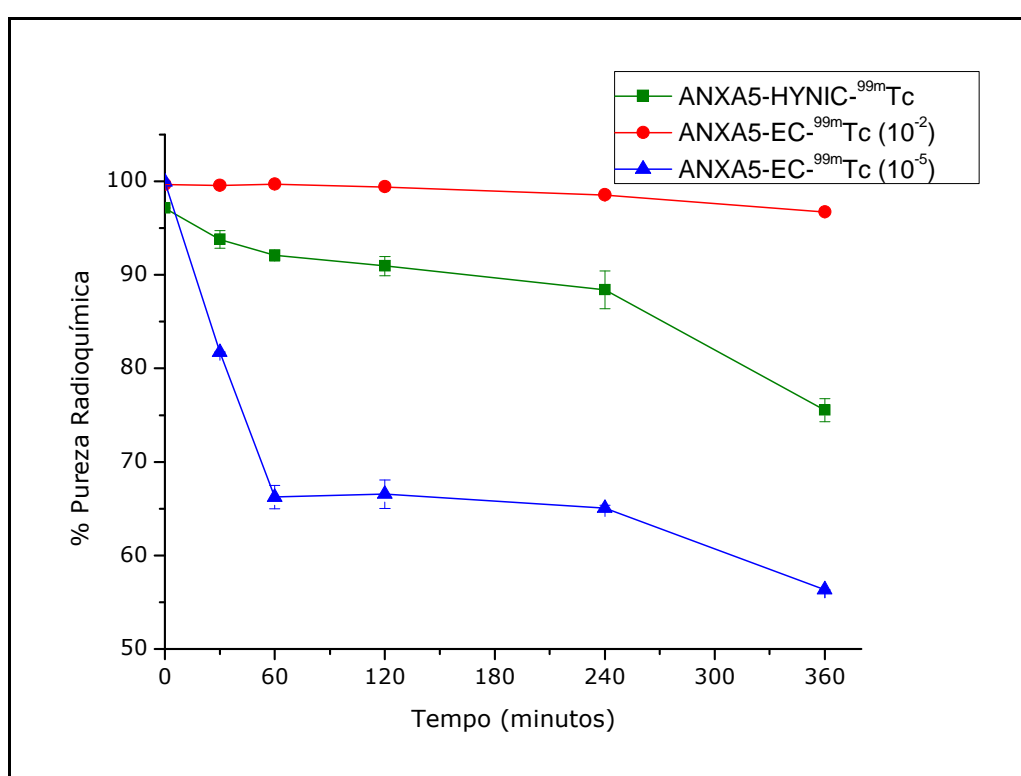


FIGURA 20 - Estabilidade da ANXA5-HYNIC- ^{99m}Tc , ANXA5-EC- ^{99m}Tc (10^{-2}) e ANXA5-EC- ^{99m}Tc (10^{-5}) em temperatura ambiente (n = 2).

Os resultados para a estabilidade da proteína radiomarcada via EC nas diferentes relações proteína:quelante sugerem que o aumento da incorporação de quelantes pela proteína reduz sua estabilidade, provavelmente por alterações conformacionais que acarretam a quebra da proteína de forma tempo-dependente. Ao analisar o perfil de migração da ANXA5-EC- ^{99m}Tc (10^{-5}) em ITLC-SG após armazenamento à temperatura

ambiente (FIG. 21) por diferentes tempos, observa-se o aparecimento de uma espécie radioativa que migra com $R_f=0,4$. O aparecimento dessa espécie é tempo dependente e pode estar relacionado com a quebra da proteína e não apenas com a descomplexação do ^{99m}Tc , visto que o radiometal migra com um perfil diferente do observado, conforme já demonstrado na TAB. 9. Nos outros sistemas cromatográficos estudados não foi observada alteração em relação ao perfil inicial (logo após a marcação).

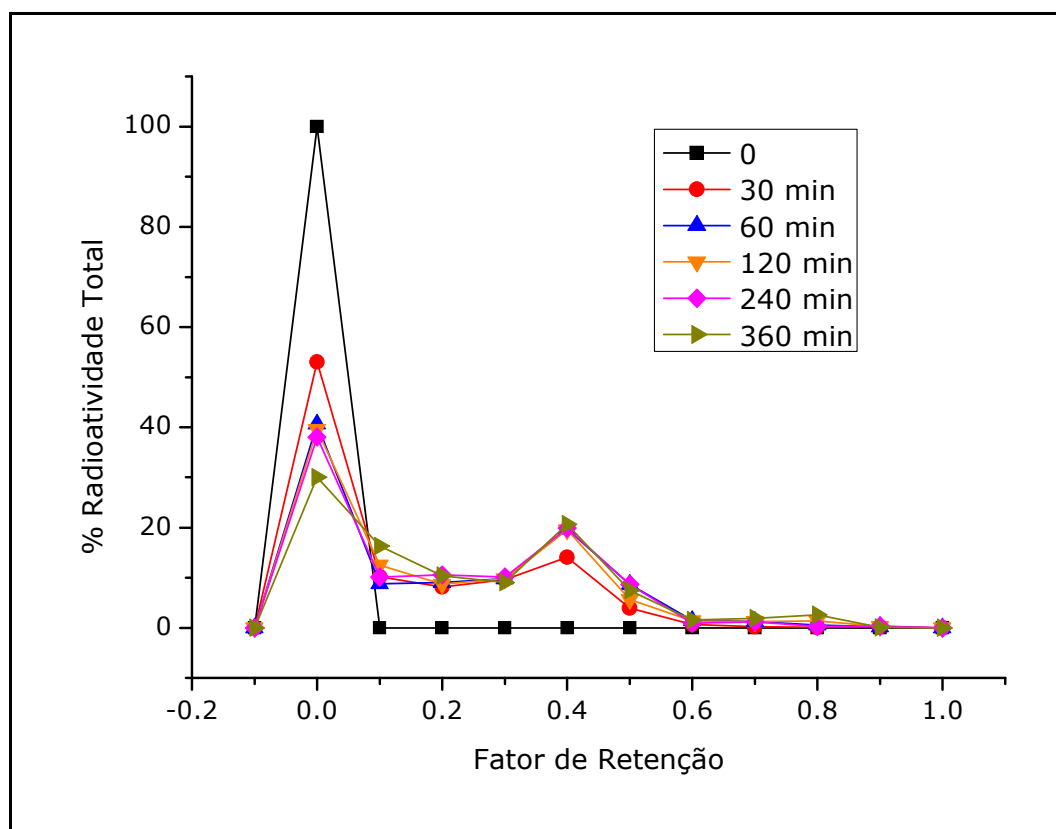


FIGURA 21 – Perfil de migração da ANXA5-EC- ^{99m}Tc (10^{-5}) em ITLC-SG e etanol 85% à temperatura ambiente.

5.4.2 Análise da estabilidade após armazenamento a 2-8° C

A estabilidade da ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc, ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻²) e ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻⁵) foi avaliada após incubação em geladeira (2-8° C) por um período de até 6 horas (FIG. 22). O armazenamento das amostras sob refrigeração não alterou sua estabilidade em relação ao armazenamento à temperatura ambiente, exceto para a ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻⁵), que teve sua estabilidade aumentada a partir de 60 minutos. Entretanto, o composto não apresentou estabilidade adequada para aplicações clínicas, visto que o radiofármaco deve apresentar pureza radioquímica superior a 90% por pelo menos quatro horas. A presença de impurezas radioquímicas em alta porcentagem promove o acúmulo da radioatividade em órgãos não alvo, contribuindo para o aumento da dosimetria e dificultando a visualização de áreas de interesse.

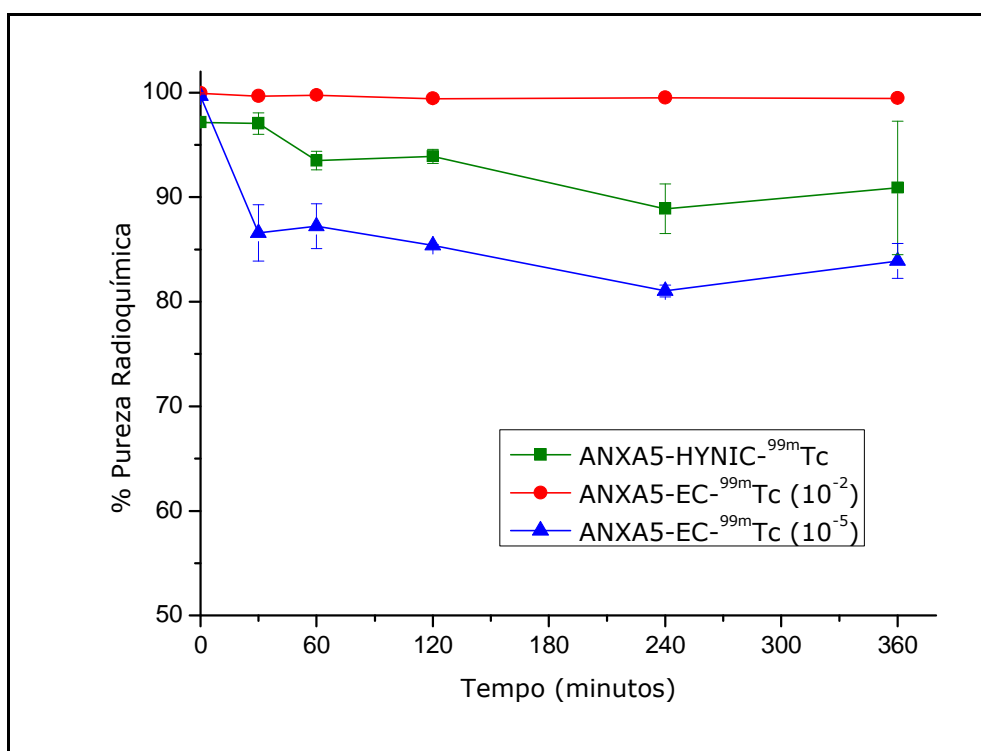


FIGURA 22 - Estabilidade da ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc, ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻²) e ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻⁵) após incubação à temperatura de 2 - 8° C (n=2).

5.4.3 Análise da estabilidade em soro humano

O estudo da estabilidade da ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc, ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻²) e ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻⁵) foi realizado entre 1 e 6 horas após incubação do radiofármaco em amostra de soro humano. A estabilidade no soro foi maior para a ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc e para a ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻²) e permaneceu praticamente constante por até 4 horas de incubação, reduzindo-se discretamente nas duas horas seguintes. Essa redução foi mais acentuada para ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc. Além disso, os resultados confirmaram a menor estabilidade da ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻⁵) também em soro humano, o que torna a ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻²) mais adequada para a viabilização de um reagente formulado para imagem de apoptose *in vivo* (FIG. 23).

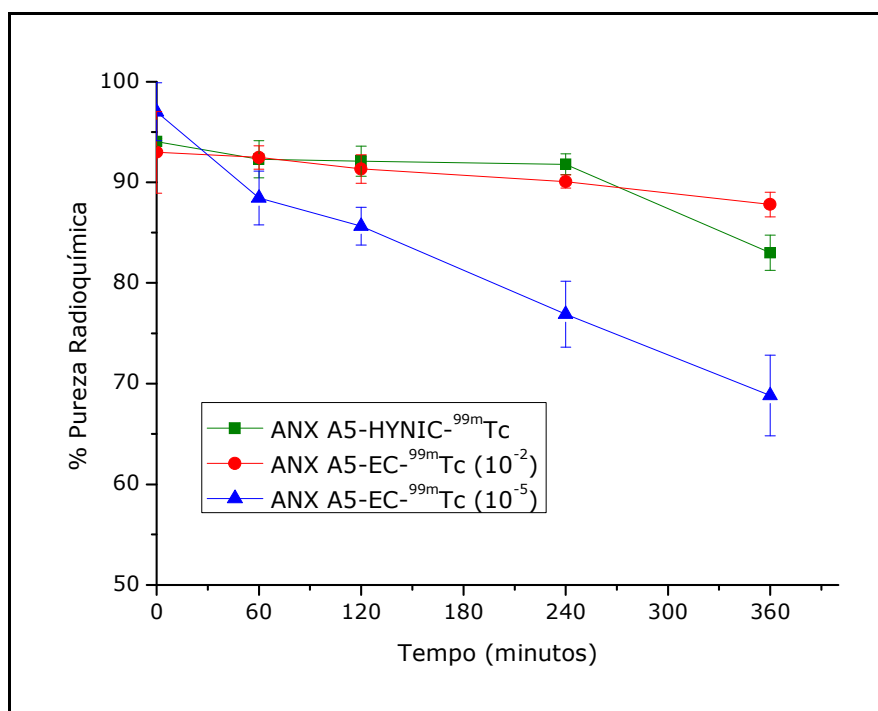


FIGURA 23 - Estabilidade em soro humano da ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc, ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻²) e ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻⁵) (n=3).

5.5. Determinação do coeficiente de partição (CP)

Os coeficientes de partição experimentais da ANXA5-^{99m}Tc radiomarcada pelas diferentes metodologias são mostrados na TAB. 10. Os resultados obtidos mostram variação da lipofilicidade dos compostos conforme o quelante bifuncional utilizado e a relação proteína:quelante durante o processo de derivatização. Os valores encontrados para a ANXA5 radiomarcada via EC demonstram que a ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻⁵) apresenta um caráter mais polar do que a ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻²), confirmando a tendência anteriormente mostrada pela análise em CLAE (TAB. 8). A ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc foi o composto menos polar, provavelmente devido à maior lipofilicidade do quelante HYNIC.

TABELA 10 – Coeficiente de partição (CP) n-octanol:água da ANX A5-^{99m}Tc radiomarcada pelas diferentes metodologias.

	ANX A5-HYNIC-^{99m}Tc	ANX A5-EC-^{99m}Tc (10⁻²)	ANX A5-EC-^{99m}Tc (10⁻⁵)
CP	-0,53 ± 0,32	-1,43 ± 0,05	-4,27 ± 0,3

5.6 Estudos de ligação *in vitro*

5.6.1 Produção de apoptose radioinduzida nas células PC-3

A indução de apoptose nas células PC-3 foi realizada por meio de radiação gama proveniente de um irradiador de Cobalto-60. Após a irradiação, as células foram cultivadas por 48 horas. Decorrido esse tempo, foram realizadas análises para detecção e quantificação de células em apoptose e/ou necrose, por meio da intercomparação dos estudos de coloração diferencial e do ensaio de viabilidade metabólica utilizando o MTS.

Os resultados da coloração diferencial por brometo de etídio/laranja de acridina são apresentados na TAB. 11. Observou-se uma diminuição do percentual de células viáveis, paralelamente ao aumento do percentual de células apoptóticas, quando a dose de irradiação foi maior ou igual a 6 Gy. Entretanto, o efeito citotóxico da radiação sobre as células PC-3 não foi observado em doses menores do que 4 Gy.

TABELA 11 – Viabilidade das células PC-3 48 horas após a exposição a diferentes doses de irradiação.

Dose (Gy)	Número de Células Analisadas	Células Viáveis		Células em apoptose		Células em necrose	
		N ^o	%	N ^o	%	N ^o	%
0	527	462	87,67	42	7,97	23	4,36
2	213	181	84,98	7	3,29	25	11,74
4	202	177	87,62	12	5,94	13	6,44
6	403	176	43,67	197	48,88	30	7,44
8	198	52	26,26	140	70,71	6	3,03
10	387	87	22,48	291	75,19	9	2,33

Li e Franklin (1998) mostraram que as células PC-3 são altamente resistentes à radiação gama, uma vez que uma dose de 20 Gy provocou apoptose em apenas 10% das células 24 horas após a irradiação. Neste trabalho observou-se que a dose de 6 Gy foi capaz de provocar apoptose em aproximadamente 50% das células PC-3 irradiadas. Essa maior porcentagem em relação aos dados da literatura pode decorrer da maior taxa de dose durante a irradiação (1,3 Gy min⁻¹ versus 0,06 Gy min⁻¹ da literatura), que provavelmente impediu mecanismos de reparo celular. Além disso, a alocação das células em gelo logo após a irradiação

e o maior tempo decorrido para análise da apoptose (48 horas versus 24 horas da literatura) pode ter impedido a ativação de mecanismos de reparo e favorecido a visualização de apoptose ativada por falha nesses mecanismos, respectivamente. A influência da taxa de dose, das condições em que as células se encontram e do tempo decorrido após a irradiação para ativação/observação do reparo celular já foram descritos por Blank e colaboradores (1997).

A dose escolhida para a irradiação das células foi 6 Gy, dose na qual se observa cerca de 50% de células apoptóticas e 50% de células viáveis, frações adequadas para realização do ensaio de ligação. Foi realizado então o ensaio do MTS para esta dose, a fim de se verificar a viabilidade metabólica das células PC-3 irradiadas e de comprovar a morte por apoptose. Os resultados são apresentados na FIG. 24.

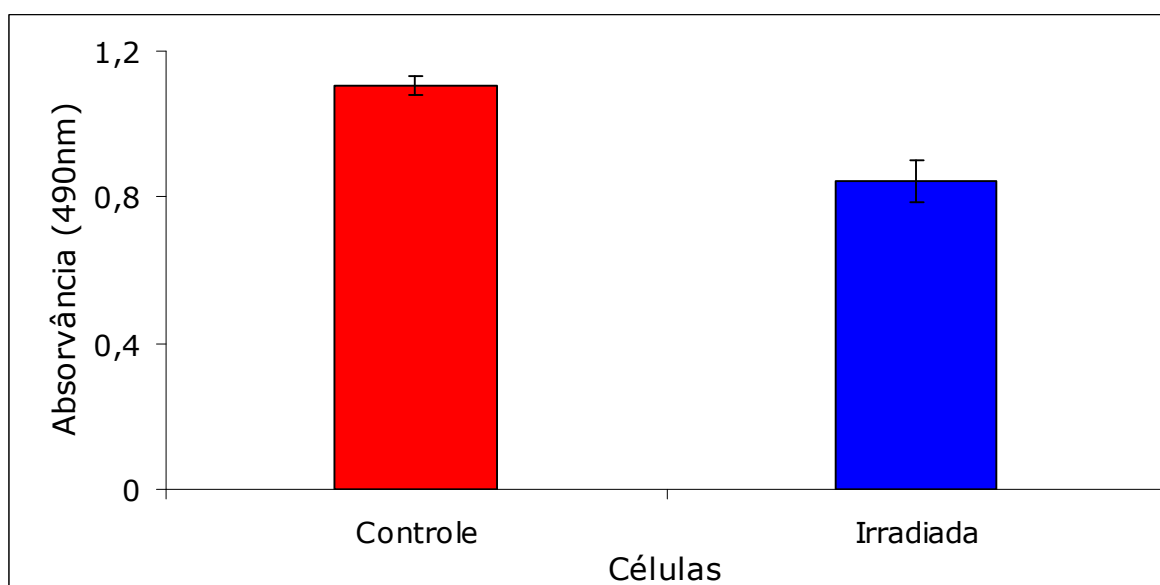


Figura 24 – Viabilidade metabólica das células PC-3 48 horas após a irradiação com 6 Gy. A viabilidade metabólica foi medida pelo teste com o MTS.

Observou-se uma redução de 23,62% na viabilidade metabólica das células irradiadas com 6 Gy, em relação às células não irradiadas, 48 horas após a irradiação. Esse resultado sugere, mais uma vez, a indução da apoptose nas células PC-3 pela radiação ionizante, uma vez que, apesar de após 48 horas apenas 43% das células permanecerem viáveis, seu metabolismo ainda corresponde à 76% do metabolismo das células não irradiadas, sugerindo morte celular por processo ativo, característico de apoptose. Portanto, a maior parte das células irradiadas e determinadas como apoptóticas pela coloração com brometo de etídio/laranja de acridina provavelmente encontram-se na fase inicial do processo, uma vez que ainda apresentam atividade metabólica.

A apoptose é um processo ativo no qual ocorre a ativação de genes, tais como p53, responsáveis pela síntese de proteases e endonucleases. Esse processo de síntese protéica envolve gasto de energia e, portanto, a manutenção e até mesmo o aumento da atividade metabólica celular, conforme observado para as células PC-3 irradiadas (Blank et al., 1997).

5.6.2 Estudos de ligação

Esta análise consistiu na avaliação da ligação da ANXA5 radiomarcada pelos diferentes métodos à fosfatidilserina, presente na membrana das células na fase inicial do processo apoptótico. A primeira etapa deste estudo foi a determinação da atividade (cpm) ideal para a realização do estudo de ligação, ou seja, a atividade de ANXA5-^{99m}Tc necessária para saturação da fosfatidilserina presente na membrana das células PC-3 irradiadas. Na FIG. 25 apresentam-se os resultados da curva de saturação da ligação ANXA5-EC-^{99m}Tc (10^{-2}) nas células PC-3 apoptóticas. Quando incubadas na presença de 10^8 cpm de ANXA5-EC-^{99m}Tc (10^{-2}), $40,09 \pm 3,56$ % do total da atividade permaneceu ligado às células e essa porcentagem não foi estatisticamente alterada ($34,38 \pm$

0,39%) quando a atividade foi aumentada para 10^9 cpm ($p=0,051$). Portanto, a atividade escolhida para os ensaios de ligação foi 10^8 cpm de ANXA5- ^{99m}Tc .

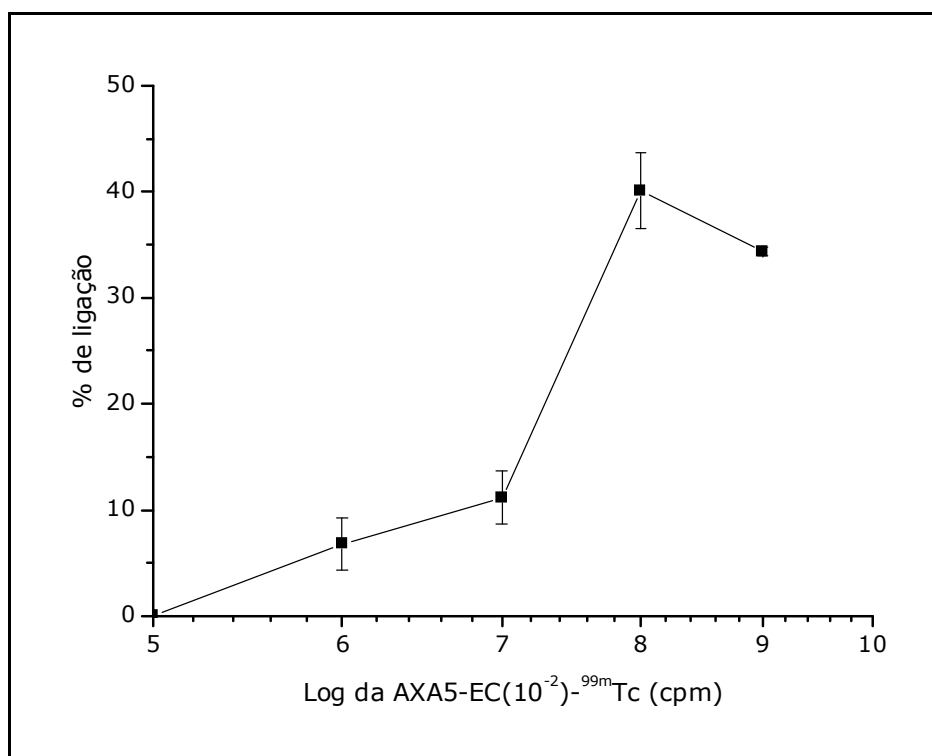


FIGURA 25 - Curva de ligação da ANXA5-EC- ^{99m}Tc (10^{-2}) nas células PC-3 irradiadas ($2,2 \times 10^4$ células por tubo).

Os resultados da ligação da ANXA5 radiomarcada com ^{99m}Tc pelas diferentes metodologias às células PC-3 irradiadas com 6 Gy são apresentados na TAB. 12. Observa-se que a ANXA5-EC- ^{99m}Tc (10^{-2}) foi a proteína radiomarcada que apresentou maior porcentagem de ligação específica (50,5%) às células PC-3 irradiadas, indicando ser esta a proteína radiomarcada com maior potencial para detecção de células apoptóticas.

TABELA 12 – Porcentagem da atividade da ANXA5-^{99m}Tc radiomarcada pelas diferentes metodologias ligada às células PC-3 irradiadas (ligação específica) e não irradiada (ligação inespecífica).

Ligação às células PC-3 Irradiadas (%)			
Células	ANXA5- EC-^{99m}Tc (10⁻²)	ANXA5- EC-^{99m}Tc (10⁻⁵)	ANXA5-HYNIC- ^{99m}Tc
Irradiadas	19,05 ± 1,68	0,52 ± 0,02	1,12 ± 0,16
Não Irradiadas	9,43 ± 0,25	0,48 ± 0,12	0,86 ± 0,24
Razão Ligação Específica:Ligação Inespecífica			
Razão	2,02	1,08	1,3
Ligação Específica			
%	50,50	7,69	23,21

n=3

Na análise desses resultados observa-se que a ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻²) foi a proteína radiomarcada que apresentou maior porcentagem de ligação específica (50,5%). Assim, além de apresentar maior estabilidade nos estudos *in vitro*, a ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻²) também apresenta superioridade em relação à ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc nos estudos de ligação às células apoptóticas *in vitro*.

5.7 Estudos *in vivo*

5.7.1 Estudos de biodistribuição

A) Biodistribuição em camundongos *Swiss* sadios

Os resultados obtidos nos estudos de biodistribuição da ANXA5 radiomarcada pelos diferentes métodos em camundongos *Swiss* sadios

estão demonstrados nas TAB. 13 a 18. Os resultados estão expressos em porcentagem da atividade administrada em função da atividade captada pelo tecido (%AI) ou por grama de tecido (%AI/g), com exceção da tireóide, para qual não se efetuou o cálculo de %AI/g devido ao seu baixo peso. Todos os compostos analisados apresentaram baixa captação na tireóide e estômago o que sugere ausência de contaminação por $^{99m}\text{TcO}_4^-$, evidenciando a alta pureza radioquímica das radiomarcações e estabilidade dos compostos radiomarcados *in vivo* frente a descomplexação do ^{99m}Tc .

TABELA 13 - Biodistribuição do composto ANXA5-HYNIC- ^{99m}Tc em camundongos *Swiss* sadios (% Atividade administrada/Tecido).

Tecidos	% Atividade administrada/Tecido		
	0,5 h.	1 h.	2 h.
Tireóide	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Fígado	1,28 ± 0,36	1,14 ± 0,14	1,11 ± 0,27
Pulmão	0,11 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,06 ± 0,01
Estômago	0,07 ± 0,04	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01
Rins	11,79 ± 1,36	11,11 ± 1,39	11,20 ± 0,49
Coração	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Baço	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,03	0,12 ± 0,05
Intestino D.	0,24 ± 0,07	0,23 ± 0,04	0,24 ± 0,03
Intestino G.	0,12 ± 0,04	0,08 ± 0,02	0,10 ± 0,02
Músculo Total	1,74 ± 0,81	1,00 ± 0,31	0,74 ± 0,06
Sangue Total	10,8 ± 0,33	7,68 ± 2,32	4,11 ± 0,24

n= 5

TABELA 14 - Biodistribuição do composto ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc em camundongos *Swiss* sadios (% Atividade administrada/grama).

Tecidos	% Atividade administrada/grama		
	0,5 h.	1 h.	2 h.
Fígado	1,09 ± 0,18	0,81 ± 0,03	0,73 ± 0,15
Pulmão	0,74 ± 0,15	0,32 ± 0,08	0,25 ± 0,04
Estômago	0,32 ± 0,06	0,20 ± 0,04	0,20 ± 0,04
Rins	32,20 ± 8,28	23,08 ± 5,59	22,24 ± 1,24
Coração	0,43 ± 0,16	0,24 ± 0,09	0,24 ± 0,04
Baço	1,81 ± 0,28	1,87 ± 0,52	1,34 ± 0,46
Intestino D.	0,27 ± 0,09	0,18 ± 0,05	0,18 ± 0,03
Intestino G.	0,12 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,09 ± 0,02
Músculo	0,14 ± 0,06	0,07 ± 0,02	0,05 ± 0,01
Sangue mL ⁻¹	4,34 ± 0,17	2,77 ± 0,67	1,58 ± 0,33

n= 5

TABELA 15 - Biodistribuição do composto ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻⁵) em camundongos *Swiss* sadios (% Atividade administrada/Tecido).

Tecidos	% Atividade administrada/Tecido		
	0,5 h.	1 h.	2 h.
Tireóide	0,04 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Fígado	1,27 ± 0,25	1,06 ± 0,15	0,82 ± 0,19
Pulmões	0,44 ± 0,06	0,25 ± 0,08	0,14 ± 0,04
Estômago	0,26 ± 0,04	0,28 ± 0,1	0,15 ± 0,04
Rins	7,83 ± 0,90	5,35 ± 0,50	4,89 ± 0,61
Coração	0,09 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,00
Baço	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,00
Intestino D.	1,62 ± 0,32	1,28 ± 0,21	1,54 ± 0,28
Intestino G.	0,27 ± 0,10	0,29 ± 0,09	0,25 ± 0,10
Músculo Total	6,53 ± 2,54	4,49 ± 1,24	3,27 ± 1,62
Sangue Total	8,77 ± 3,93	4,14 ± 0,45	2,46 ± 0,52

n= 5

TABELA 16 – Biodistribuição do composto ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻⁵) em camundongos *Swiss* sadios (% Atividade administrada/grama).

Tecidos	% Atividade administrada/grama		
	0,5 h.	1 h.	2 h.
Fígado	0,93 ± 0,21	0,76 ± 0,04	0,63 ± 0,10
Pulmão	1,35 ± 0,20	0,81 ± 0,15	0,53 ± 0,09
Estômago	1,05 ± 0,19	1,12 ± 0,38	0,60 ± 0,14
Rins	16,28 ± 2,62	14,99 ± 1,66	12,04 ± 1,67
Coração	0,86 ± 0,13	0,56 ± 0,14	0,32 ± 0,05
Baço	0,56 ± 0,21	0,48 ± 0,16	0,25 ± 0,06
Intestino D.	0,81 ± 0,18	1,01 ± 0,20	0,97 ± 0,29
Intestino G.	0,36 ± 0,08	0,36 ± 0,10	0,31 ± 0,18
Músculo	0,56 ± 0,21	0,39 ± 0,14	0,30 ± 0,17
Sangue mL ⁻¹	3,84 ± 1,81	1,85 ± 0,24	1,13 ± 0,22

n= 5

TABELA 17 - Biodistribuição do composto ANXA5-EC-^{99m}Tc (10^{-2}) em camundongos *Swiss* sadios (% Atividade administrada/Tecido).

Tecidos	% Atividade administrada/Tecido		
	0,5 h.	1 h.	2 h.
Tireóide	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Fígado	9,53 ± 0,94	7,80 ± 1,11	6,88 ± 1,07
Pulmão	0,17 ± 0,04	0,12 ± 0,03	0,13 ± 0,06
Estômago	0,17 ± 0,06	0,18 ± 0,04	0,11 ± 0,03
Rins	0,71 ± 0,15	0,60 ± 0,09	0,55 ± 0,11
Coração	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Baço	0,40 ± 0,07	0,29 ± 0,06	0,27 ± 0,08
Intestino D.	0,41 ± 0,11	0,40 ± 0,08	0,40 ± 0,07
Intestino G.	0,11 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,03
Músculo Total	1,66 ± 0,11	1,46 ± 0,30	0,98 ± 0,18
Sangue Total	20,27 ± 3,53	13,81 ± 3,38	7,82 ± 2,33

n=5

TABELA 18 – Biodistribuição do composto ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻²) em camundongos *Swiss* sadios (% Atividade administrada/grama).

Tecidos	% Atividade administrada/grama		
	0,5 h.	1 h.	2 h.
Fígado	6,52 ± 1,23	5,09 ± 0,58	4,39 ± 1,11
Pulmão	0,79 ± 0,12	0,52 ± 0,07	0,58 ± 0,27
Estômago	0,58 ± 0,12	0,54 ± 0,10	0,36 ± 0,12
Rins	1,59 ± 0,39	1,36 ± 0,17	1,14 ± 0,33
Coração	0,49 ± 0,08	0,37 ± 0,04	0,19 ± 0,04
Baço	4,79 ± 0,96	4,67 ± 0,90	2,46 ± 0,73
Intestino D.	0,23 ± 0,07	0,21 ± 0,03	0,26 ± 0,09
Intestino G.	0,12 ± 0,02	0,11 ± 0,04	0,09 ± 0,02
Músculo	0,13 ± 0,01	0,11 ± 0,03	0,07 ± 0,01
Sangue mL ⁻¹	8,15 ± 1,49	5,17 ± 1,13	2,94 ± 0,82

n=5

A natureza do quelante bifuncional utilizado para complexar o tecnécio-^{99m} à proteína influenciou na captação dos órgãos de eliminação, tais como fígado e rins. A atividade acumulada no fígado mostrou-se presente em níveis similares tanto para a ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc como a ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻⁵), sendo superior para a ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻²). Entretanto, mesmo no caso da ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻²), que apresentou captação hepática significativamente maior do que as demais, o composto parece não ser transportado para o intestino no tempo estudado, tendo em vista que a medida da atividade no intestino foi realizada sem remover o conteúdo intestinal.

Os resultados dos estudos de biodistribuição da ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc estão de acordo com a literatura com relação à excreção renal.

Observa-se uma alta captação renal para a ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc, bem como para a ANXA5-EC-^{99m}Tc (10^{-5}).

A maior captação hepática da ANXA5-EC-^{99m}Tc (10^{-2}), associada ao clareamento sanguíneo mais lento, observado por meio da captação persistente nos tempos mais tardios, são características compatíveis com a maior lipofilicidade deste composto quando comparado com a ANXA5-EC-^{99m}Tc (10^{-5}).

Entretanto, a distribuição não pode ser explicada apenas considerando-se o coeficiente de partição e as características de lipofilicidade dos compostos. Desta forma, apesar de apresentar o maior coeficiente de lipofilicidade, o composto ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc apresentou clareamento sanguíneo mais rápido e menor captação hepática que o composto ANXA5-EC-^{99m}Tc (10^{-2}). A captação hepática persistente do composto ANXA5-EC-^{99m}Tc (10^{-2}) sugere a ocorrência de processos de metabolização que poderiam retransportar este radiofármaco ao sangue, na forma de metabólitos, o que explicaria a atividade significativa no sangue em todos os tempos analisados.

Se por um lado o composto ANXA5-EC-^{99m}Tc (10^{-2}) apresentou maior captação hepática, o composto ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc apresentou maior captação renal. Ambas captações podem acarretar em imagens com uma alta radiação de fundo na região abdominal.

Vanderheyden e colaboradores (2006) observaram valores de %AI/g no fígado e nos rins superiores para a ANXA5 radiomarcada com HYNIC ($24,1 \pm 1,3$ e $44,5 \pm 1,5$ %AI/g, respectivamente) quando comparado com a ANXA5 radiomarcada via MAG₃ ($3,7 \pm 0,3$ e $15,2 \pm 1,4$, %AI/g, respectivamente) observados para o tempo de uma hora após administração em camundongos CD-1 saudáveis.

Neste trabalho, no tempo de uma hora, encontraram-se valores de captação no fígado superiores para a ANXA5-EC-^{99m}Tc (10^{-2}) ($5,09 \pm 0,58$ %AI/g), quando comparada com a ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc ($0,81 \pm$

0,03%AI/g). Já para os rins, os valores encontrados para o HYNIC ($23,08 \pm 5,59\%$ AI/g) foram significativamente superiores em relação à ANXA5-EC- ^{99m}Tc (10^{-2}) ($1,36 \pm 0,17\%$ AI/g), os quais se aproximam mais aos obtidos por Vanderheyden e colaboradores (2006) para a anexina radiomarcada com MAG_3 .

Yang e colaboradores (2001), em um estudo com a ANXA5 radiomarcada com tecnécio via EC (utilizando NHS e EDC para ativar o ácido carboxílico do EC em seu éster succinato), utilizando um modelo em ratos com câncer de mama observaram, após 30 minutos de injeção, captação renal ($6,97 \pm 0,97\%$ AI/Tecido) significativamente maior quando comparada com o fígado ($3,95 \pm 0,31\%$ AI/Tecido) e uma captação no baço de $1,32 \pm 0,05\%$ AI/Tecido. Perfil de biodistribuição semelhante foi demonstrado neste estudo para a ANXA5 radiomarcada com EC (10^{-5}), ou seja, a captação renal observada 30 min após administração foi significativamente maior que a captação hepática. Entretanto, este padrão de biodistribuição se inverte quando considerado a ANXA5 radiomarcada com EC (10^{-2}), sendo neste caso a captação hepática significativamente superior a renal.

A distribuição da ANXA5-EC- ^{99m}Tc (10^{-2}) nos rins é baixa quando comparada com a ANXA5-HYNIC- ^{99m}Tc e da ANXA5 radiomarcada com o MAG_3 e EC descritos na literatura, entretanto apresenta uma captação significativa no baço ($4,79 \pm 0,96\%$ AI/g em 30 minutos caindo para $2,46 \pm 0,73\%$ AI/g em 2 horas), não observada para a proteína radiomarcada por outros métodos.

Yang e colaboradores (2005) relataram, ao comparar a ANXA5 radiomarcada com EC com a ANXA5 radiomarcada com o HYNIC, em modelo utilizando ratos, que os rins apresentam uma maior captação entre 10 e 180 minutos após a injeção para anexina radiomarcada via HYNIC ($9,5 - 17\%$ AI/g) do que para a anexina radiomarcada com EC ($4,9 - 6,9\%$ AI/g).

Fonge e colaboradores (2008), em um estudo comparando a ANXA5 e a ANXA5-cys (produzida por mutação sítio-específica) com a ANXA5 radiomarcada via HYNIC em animais saudáveis, 60 minutos após a injeção, observaram captação renal similar para ANXA5-cys-HYNIC-^{99m}Tc ($39,1 \pm 6,9$ AI/g e $59,2 \pm 7,8$ AI/g, respectivamente) e para a ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc ($56,9 \pm 6,3$ AI/g e $72,5 \pm 8,3$ AI/g, respectivamente).

As diferenças observadas nos estudos de biodistribuição, quando comparamos os resultados deste estudo com resultados descritos na literatura, podem ser atribuídas a diversos fatores, tais como, utilização de modelos animais diferentes, diferenças no estado de hidratação dos animais e utilização ou não de anestésicos, que podem alterar a eliminação dos radiofármacos.

Além destes fatores, neste estudo podemos verificar que não somente a escolha do quelante bifuncional empregado, mas também, as condições de reação utilizadas (como a variação na relação molar proteína:quelante no processo de derivatização), podem influenciar nas características físico-químicas e, conseqüentemente, nas características de distribuição biológica dos compostos. Desta forma, a alteração na lipofilicidade interferiu diretamente nas características de clareamento sanguíneo e eliminação do composto. O número de quelantes introduzidos por molécula de proteína pode ainda influenciar na estabilidade e grau de metabolização dos compostos.

B) Biodistribuição em camundongos Swiss com foco de inflamação

O processo inflamatório pode ser definido como a reação do tecido vivo vascularizado a uma agressão local. Blankenberg e colaboradores (2001), em um estudo de imagem de macrófagos e apoptose de granulócitos utilizando a ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc, escolheram a terebentina como modelo de indução de foco de inflamação devido às

seguintes razões: (a) facilidade de uso e reprodutibilidade; (b) ausência de sepsis sistêmica e (c) um estímulo prejudicial constante, que não pode ser extinto por resposta do hospedeiro, como ocorre com estímulos provocados por bactérias. Abscessos induzidos por terebentina em tecidos moles promovem uma lesão inflamatória localizada por um extenso período de tempo, sendo, portanto, um modelo útil para estudo de radiotraçadores por meio das diferentes fases do abscesso (aguda, sub-aguda e crônica). Estes autores relataram que o foco de inflamação um dia após a injeção de terebentina apresentou alta captação da ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc e esta experiência influenciou a escolha deste modelo inflamatório para comparação das anexinas radiomarcadas neste estudo.

Os resultados para o estudo de captação da atividade nas patas dos animais com foco de inflamação aguda provocado pela administração de terebentina estão demonstrados na TAB. 19.

TABELA 19 – Captação da atividade nas patas dos animais com foco de inflamação aguda, após 1,5 horas da injeção do radiofármaco.

Produto	% de Atividade administrada/Pata	
	Pata inflamada	Pata normal
ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc	3,97 ± 0,74	1,26 ± 0,18
ANXA5-EC(10⁻²)-^{99m}Tc	4,59 ± 1,01	1,3 ± 0,20
ANXA5-EC(10⁻⁵)-^{99m}Tc	0,89 ± 0,35	0,42 ± 0,04

n=3

A análise dos resultados da captação da atividade nas patas mostrou uma captação significativamente superior para as patas com foco de inflamação agudo para ANXA5 radiomarcada HYNIC e EC, nas duas razões molares estudadas. A captação nas patas inflamadas para a

ANXA5-HYNIC- ^{99m}Tc e ANXA5-EC- ^{99m}Tc (10^{-2}) não apresentou diferença significativa ($p=0,68$). Entretanto, estes valores foram superiores quando comparados com os valores obtidos para a ANXA5-EC- ^{99m}Tc (10^{-5}). Para uma melhor análise deste estudo foram calculadas as relações pata inflamada/pata normal, pata inflamada/sangue circulante e pata normal/sangue circulante (TAB 20).

TABELA 20 – Relações entre captação da atividade da ANXA5 radiomarcadas pelas diferentes metodologias nas patas dos animais com foco de inflamação aguda e sangue circulante.

Produto	RELAÇÕES		
	pata inflamada/pata normal	pata inflamada/sangue circulante	pata normal/sangue circulante
ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc	3,18 ± 0,71	0,71 ± 0,01	0,22 ± 0,03
ANXA5-EC-^{99m}Tc (10^{-2})	3,50 ± 0,15	0,78 ± 0,21	0,22 ± 0,07
ANXA5-EC-^{99m}Tc (10^{-5})	2,09 ± 1,04	0,27 ± 0,14	0,13 ± 0,01

n=3

Na avaliação da relação pata inflamada/pata normal não se observou diferença significativa entre os valores obtidos para ANXA5-HYNIC- ^{99m}Tc e ANXA5-EC- ^{99m}Tc (10^{-2}) ($p=0,48$), ANXA5-HYNIC- ^{99m}Tc e ANXA5-EC- ^{99m}Tc (10^{-5}) ($p=0,16$) e ANXA5-EC- ^{99m}Tc (10^{-2}) e ANXA5-EC- ^{99m}Tc (10^{-5}) ($p=0,08$). Considerando a relação pata inflamada/sangue circulante não se observou diferença significativa entre ANXA5-HYNIC-

^{99m}Tc e ANXA5-EC- ^{99m}Tc (10^{-2}) ($p= 0,98$), sendo estes significativamente superiores a ANXA5-EC- ^{99m}Tc (10^{-5}).

A combinação dos resultados da captação nas patas com as relações calculadas sugere uma captação específica das ANXA5- ^{99m}Tc pelas patas inflamadas, mas seria necessário um estudo em diferentes tempos para confirmar esta hipótese.

5.7.2 Estudos farmacocinéticos em camundongos *Swiss sadios*

No desenvolvimento de radiofármacos, a farmacocinética é um dos fatores mais importantes a se considerar. A farmacocinética estuda os fenômenos envolvidos nos processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de um fármaco. No âmbito da radiofarmácia, este termo se refere à distribuição e eliminação do radiofármaco após a sua administração. Um radiofármaco deve apresentar tempo de residência sanguíneo relativamente curto, a fim de minimizar a dose no paciente. Porém, deve ser longo o suficiente para permitir que o radiofármaco se ligue aos seus receptores específicos. Uma forma de modificar a farmacocinética de um radiofármaco de tecnécio-99m, a fim de melhorar sua cinética, é utilizar quelantes bifuncionais com diferentes cargas e hidrofiliabilidade, visto que BFCs apresentam um impacto profundo nas propriedades físicas e biológicas de pequenas proteínas radiomarcadas com ^{99m}Tc . Na FIG. 26 pode-se observar o clareamento sanguíneo da ANXA5 radiomarcada com ^{99m}Tc pelas diferentes metodologias empregadas.

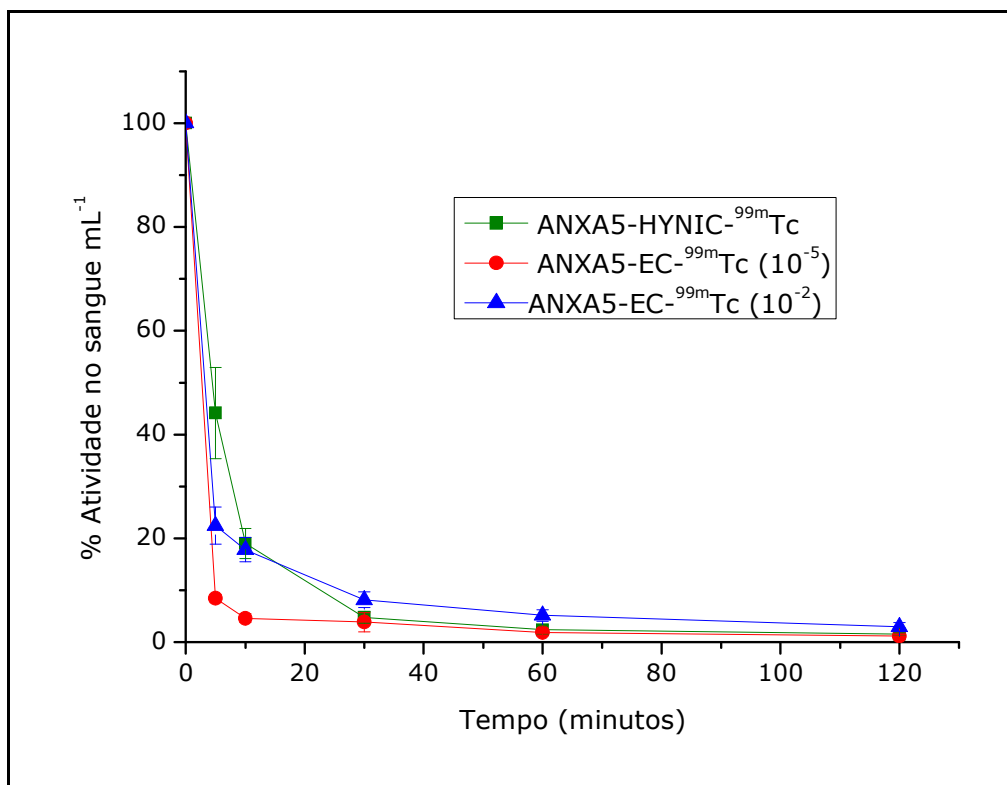


FIGURA 26 - Curva do clareamento sanguíneo da ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc, ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻²) e ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻⁵).

As curvas da FIG. 26 foram utilizadas para o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos da ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc, ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻⁵) e ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻²) utilizando-se o programa Biexp. Este programa ajusta os dados da curva de clareamento sanguíneo em um modelo bicompartimental, que consiste de um compartimento central ou vascular, representado pelo sangue e por tecidos altamente perfundidos e um compartimento periférico ou extravascular, composto por tecidos menos perfundidos (tais como músculo). Este modelo pode ser aplicado quando o radiofármaco apresenta uma distribuição para tecidos altamente perfundidos e permite a visualização de dois processos: distribuição (fase rápida) e eliminação (fase lenta).

Apesar das curvas do clareamento sanguíneo (FIG. 26) sugerirem que o modelo de distribuição das ANXA5 radiomarcadas pelas diferentes metodologias possam se ajustar a um modelo com mais de dois compartimentos, o ajuste em uma função com duas exponenciais utilizando-se o programa Biexp é útil para a realização de uma análise comparativa dos compostos.

As equações 8, 9 e 10 obtidas caracterizam a variação da concentração sanguínea (C) da ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc, ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻⁵) e ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻²) em função do tempo (t), respectivamente.

$$C(t) = 95.186,96e^{-11,06t} + 4.975,45e^{-0,58t} \quad (8)$$

$$C(t) = 68.198,67e^{-23,13t} + 3.026,69e^{-0,49t} \quad (9)$$

$$C(t) = 67.940,63e^{-13,06t} + 9.090,68e^{-0,56t} \quad (10)$$

A partir das constantes das equações biexponenciais acima, o programa Biexp calculou os parâmetros farmacocinéticos relacionados à distribuição da ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc, ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻⁵) e ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻²) (TAB. 21).

TABELA 21 – Parâmetros farmacocinéticos da ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc, ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻⁵) e ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻²) calculados pelo programa Biexp.

Parâmetros farmacocinéticos	ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc	ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻⁵)	ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻²)
T_{1/2α} (h)	0,06	0,03	0,05
T_{1/2β} (h)	1,18	1,40	1,23
K₁₂ (h⁻¹)	4,69	14,33	7,97
K₂₁ (h⁻¹)	1,11	1,46	2,04
K₁₀ (h⁻¹)	5,85	7,84	3,61
tempo de residência (h)	0,90	1,38	1,36
K_{ss} (h⁻¹)	1,12	0,72	0,74

T_{1/2α}= meia vida da fase rápida; T_{1/2β}= meia vida da fase lenta; K₁₂=constante de transferência do espaço vascular para extravascular; K₂₁= constante de transferência do espaço extravascular para vascular, K₁₀= constante de transferência do espaço vascular para sistema excretor; K_{ss} = constante de eliminação.

Os resultados de meia vida da fase rápida (T_{1/2α}) para os três compostos não diferem entre si, e refletem o rápido clareamento sanguíneo dos mesmos. O valor da T_{1/2β} não diferiu muito para os três compostos, mas sendo ligeiramente superior para o EC (10⁻⁵).

Com relação às constantes de distribuição, a constante k₁₂ representa a transferência do compartimento vascular para o extravascular. Comparativamente o composto que apresenta maior K₁₂, a ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻⁵), também foi o que apresentou menor T_{1/2α}, ou seja, a transferência do compartimento vascular para o extravascular foi mais rápida. A ANXA5-EC-^{99m}Tc (10⁻²) apresentou uma maior K₂₁ que é a constante de transferência do espaço extravascular para vascular, indicando ser o composto que apresentou maior redistribuição entre os espaços vascular e extravascular, e menor constante de transferência do espaço vascular para sistema excretor (K₁₀). Estes resultados corroboram

com os valores elevados observados de captação no sangue total deste composto e com a baixa captação renal nos tempos estudados.

O tempo de residência e a constante de eliminação (k_{ss}) para as ANXA5 radiomarcadas via EC foram similares e maiores do que para a ANXA5-HYNIC- ^{99m}Tc

Yang e colaboradores (2001) observaram que a ANXA5-HYNIC- ^{99m}Tc apresenta um clareamento sanguíneo mais rápido do que a ANXA5 radiomarcada via EC. Neste trabalho o estudo farmacocinético evidenciou que o composto com HYNIC apresenta $T_{1/2\alpha}$ maior e $T_{1/2\beta}$ menor que os componentes do EC, o que significa um clareamento sanguíneo mais lento nos primeiros minutos de distribuição, porém mais rápido nos tempos mais tardios o que resultou num menor tempo de residência e maior constante de eliminação entre os três compostos estudados.

A análise da farmacocinética é feita considerando-se apenas a atividade presente no sangue nos diferentes tempos. Portanto, a baixa instabilidade plasmática da ANXA5-EC- ^{99m}Tc (10^{-5}) pode afetar a farmacocinética da ANXA5 radiomarcada por este método.

Boersma e colaboradores (2003), comparando a farmacocinética da ANXA5 radiomarcada por meio de reagente formulado, via 1-imino-4-mercaptobutil (Mallinckrodt) e o Apomate[®] (Theseus Imaging corporation), em pacientes com algum tipo de alteração no miocárdio observaram diferenças no clareamento plasmático dos dois radiofármacos apesar das meias-vidas (da fase rápida e lenta) serem similares. Neste trabalho também se encontrou diferenças no clareamento sanguíneo apesar da similaridade das meias-vidas.

6 – CONCLUSÕES

6.1 Radiomarcção da ANXA5 pelas diferentes metodologias

6.1.1 Radiomarcção da anexina A5 utilizando o SDH

O método de obtenção da anexina A5 radiomarcada via SDH foi reproduzido conforme descrito por Subbarayan e colaboradores (2003). Apesar da obtenção do intermediário $^{99m}\text{TcN-SDH}$ com alta eficiência, não se obteve sucesso no seu acoplamento à proteína devido, provavelmente, ao número reduzido de sítios de ligação disponíveis na proteína.

6.1.2 Radiomarcção da anexina A5 utilizando o quelante bifuncional HYNIC

A obtenção da anexina A5 radiomarcada pelo método indireto utilizando o reagente formulado de HYNIC-ANXA5 proporcionou um alto grau de pureza radioquímica à temperatura ambiente em um curto intervalo de tempo.

6.1.3 Radiomarcção da anexina A5 utilizando o quelante bifuncional EC

A reação utilizada para converter o ácido carboxílico do EC num éster succinimato se mostrou eficiente e adequada para a derivatização da ANXA5. A radiomarcção da ANXA5-EC apresentou alto grau de pureza radioquímica à temperatura ambiente em um curto intervalo de tempo. A derivatização utilizando relação molar proteína:quelante de $4,6 \times 10^{-2}$ se mostrou estável à -20°C por um período de até três meses se mostrando adequado para obtenção de um reagente formulado.

6.2 Estabilidade da ANXA5 radiomarcada pelas diferentes metodologias

A ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc apresentou estabilidade por até quatro horas nas três condições estudadas. A ANXA5-EC-^{99m}Tc (10^{-2}) foi o composto que apresentou maior estabilidade tanto à temperatura ambiente como sob refrigeração e no plasma apresentou estabilidade similar à ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc. ANXA5-EC-^{99m}Tc (10^{-5}) foi o composto que apresentou menor estabilidade nas três condições estudadas.

6.3 Lipossolubilidade da Anexina A5 radiomarcada com tecnécio-99m pelas diferentes metodologias

Os compostos apresentaram baixa lipossolubilidade, sendo a ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc o mais lipossolúvel e a ANXA5-EC-^{99m}Tc (10^{-5}) significativamente menos lipossolúvel.

6.4 Detecção e quantificação da apoptose radioinduzida

O modelo utilizado de apoptose radioinduzida mostrou-se viável para produção de células em apoptose.

6.5 Ligação da Anexina A5 radiomarcada com tecnécio-99m pelas diferentes metodologias às células apoptóticas

Os resultados dos estudos *in vitro* das ANXA5 radiomarcadas indicaram que a ANXA5-EC-^{99m}Tc (10^{-2}) apresentou maior porcentagem de ligação específica às células PC-3 apoptóticas, apresentando uma especificidade maior do que ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc.

6.6 Comparação da biodistribuição da Anexina A5 radiomarcada com tecnécio-99m pelas diferentes metodologias

Os resultados *in vivo* mostraram alta estabilidade dos compostos frente à descomplexação do tecnécio. A ANXA5-HYNIC-^{99m}Tc e ANXA5-EC-

^{99m}Tc (10^{-5}) apresentaram modelo de distribuição similar com maior captação renal do que hepática, inversamente ao que aconteceu com a ANXA5-EC- ^{99m}Tc (10^{-2}). Os resultados mostraram alta captação na região abdominal para o composto derivatizado com HYNIC (rins) e para o composto derivatizado com EC na razão 10^{-2} (fígado), o que pode acarretar em imagens com uma alta radiação de fundo nesta região. Os resultados obtidos com os animais com foco de inflamação incluindo a combinação dos resultados da captação nas patas bem como as relações calculadas, sugerem captação específica pela pata inflamada, mas seria necessário o estudo de captação em diferentes tempos para confirmação destes resultado.

6.7 Comparação da farmacocinética da Anexina A5 radiomarcada com tecnécio-99m pelas diferentes metodologias

Os estudos farmacocinéticos indicaram que o composto ANXA5-HYNIC- ^{99m}Tc apresentou clareamento mais lento nos primeiros minutos de distribuição ($T_{1/2\alpha}$), porém mais rápido nos tempos mais tardios ($T_{1/2\beta}$), resultando em um menor tempo de residência e maior constante de eliminação que os compostos radiomarcados com EC.

6.8 Considerações Finais

Apesar dos resultados promissores obtidos neste estudo com a marcação da ANXA5 com tecnécio-99m utilizando-se como BFC o HYNIC ou o derivado éster do EC, a utilização da proteína radiomarcada no diagnóstico de apoptose em seres humanos ainda esbarra em algumas dificuldades, sendo a principal delas a de obtenção da proteína isenta de contaminantes oriundos do processo de produção em *Escherichia coli*.

Uma alternativa já sugerida na literatura é a utilização de fragmentos sintéticos da ANXA5. Vários derivados sintéticos da ANXA5 foram descritos para marcação com tecnécio-99m conjugados ao HYNIC. É o caso, por exemplo, dos fragmentos CC-ANX13 e C-ANX13 utilizados por Mukherjee e colaboradores (2006) que apresentam a sequência de aminoácidos responsáveis pelo reconhecimento da PS bem como extensão de sete aminoácidos contendo um ou dois resíduos de cisteína.

Os métodos de marcação utilizados neste estudo para a anexina íntegra poderão ser estendidos aos fragmentos de modo a viabilizar a utilização do produto radiomarcado em rotina clínica em Medicina Nuclear.

A escolha do quelante bifuncional bem como do método de marcação dependerá, neste caso, da estrutura do peptídeo sintético disponível comercialmente considerando a química de complexação com tecnécio-99m.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ABRAM, U.; ALBERTO, R. Technetium and rhenium – coordination chemistry and nuclear medical applications. **J Braz Chem Soc**, v. 17, n. 8, pp. 1486-1500, 2006.
- 2 ALBERTO, R.; SCHIBLI, R.; EGLI, A.; SCHUBIGER, A.P.; ABRAM, U.; KADEN, T.A. A novel organometallic aqua complex of Technetium for the labeling of biomolecules: synthesis of $[\text{Tc}^{99\text{m}}\text{-(OH)}_2\text{)}_3\text{(CO}_3\text{)}]^+$ from $[(\text{TcO}_4)\text{-Tc}^{99\text{m}}]^-$ in aqueous solution and its reaction with a bifunctional ligand. **J Am Chem Soc**, v. 120, pp. 7987–7988, 1998.
- 3 ANDERSON, C.J.; JOHN, C.S.; LI, Y.J.; HANCOCK, R.D.; MCCARTHY, T.J.; MARTELL, A.E.; WELCH, M.J. *N,N'*-Ethylene-di-L-cysteine (EC) complexes of Ga(III) and In(III): Molecular modeling, thermodynamic stability and *in vivo* studies. **Nuc Med Biol**, v. 22 n. 2, pp. 165-173, 1995.
- 4 APOPTOSE. Disponível em <http://wpcontent.answers.com/wikipedia/commons/8/86/Apoptosis.png>. Acesso em 06 jun 2009.
- 5 BABICH, J.W.; FISCHAMN, A.J., Effect of “co-ligand” on the biodistribution of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled hydrazino nicotinic acid derivatized chemotactic peptides. **Nucl Med Biol**, v. 22, pp. 25-30, 1995.
- 6 BANERJEE, S.; MARESCA, K.; FRANCESCONI, L.; VALLIANT, J.; BABICH, J.; ZUBIETA J. New directions in the coordination chemistry of Tc: a reflection on technetium core structures and a strategy for new chelate design. **Nucl Med Biol**, v. 32, n. 1, pp. 1-20, 2005.

- 7 BELHOCINE, T.Z.; STEINMETZ, N.; HUSTINX, R.; BARTSCH, P.; JERUSALEM, G.; SEIDEL, L.; RIGO, P.; GREEN, A. Increased Uptake of the Apoptosis-imaging Agent ^{99m}Tc Recombinant Human Annexin V in Human Tumors after One Course of Chemotherapy as a Predictor of Tumor Response and Patient Prognosis. ***Clin Cancer Res***, v. 8, pp. 2766-2774, 2002.
- 8 BELHOCINE, T.Z.; TAIT, J.F.; VANDERHEYDEN, JEAN-LUC; LI, C. AND BLANKENBERG, F.G. Nuclear Medicine in the era of genomics and proteomics: lessons from Annexin V. ***J. Proteome Res***, v. 3, pp. 345-349, 2004.
- 9 BIECHLIN, MARIE-LAURE; BONMARTINA, A.; GILLYA, FRANÇOIS-NOËL; FRAYSSEC, M.; D'HARDEMARED, A. M. Radiolabeling of annexin A5 with ^{99m}Tc : comparison of HYNIC-Tc vs. iminothiolane-Tc-tricarboxyl conjugates. ***Nuc Med Biol***, v. 35 n. 6, pp. 679-687, 2008.
- 10 BLANK, K.R.; RUDOLTZ, M.S.; KAO, G.D.; MUSCHEL, R.J.; MCKENNA, W.G. The molecular of apoptosis and implications for radiation oncology. ***Int J Radiat Biol***, v. 71, n. 5, pp. 455-466, 1997.
- 11 BLANKENBERG, F.G.; KATSIKIS, P.D.; TAIT, J.F.; DAVIS, R.E.; NAUMOVSKI, L.; OHTSUKI, K.; KOPIWODA, S.; ABRAMS, M.J.; DARKES, M.; ROBBINS, R.C.; MAECKER, H.T.; STRAUSS, H.W. *In vivo* detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death. ***Proc Natl Sci USA***, v. 95, pp. 6349-6354, 1998.
- 12 BLANKENBERG, F.G.; KATSIKIS, P.D.; TAIT, J.F.; DAVIS, R.E.; NAUMOVSKI, L.; OHTSUKI, K.; KOPIWODA, S.; ABRAMS, M.J.; STRAUSS, H.W. Imaging of apoptosis (programmed cell death) with ^{99m}Tc annexin V. ***J Nucl Med***, v. 40, n. 1, pp. 184-191, 1999.
- 13 BLANKENBERG, F.G.; TAIT, J.F.; OHTSUKI, K.; STRAUSS, H.W. Apoptosis: the importance of nuclear medicine. ***Nucl Med Commun***, v. 21, n. 3, pp. 241-250, 2000.
- 14 BLANKENBERG, F.G.; STRAUSS, H.W. Will imaging of apoptosis play a role in clinical care? A tale of mice and men. ***Apoptosis***, v. 6, pp. 117-123, 2001.

- 15 BLANKENBERG, F.G; TAIT, J.F.; BLANKENBERG, T.A.; POST, A.M.; STRAUSS, H.W. Imaging macrophages and the apoptosis of granulocytes in a rodent model of subacute and chronic abscesses with radiolabeled monocyte chemotactic peptide-1 and annexin V. ***Eur J Nucl Med***, v. 28, pp. 1384-1393, 2001.
- 16 BOERSMA, H.H.; LIEM, I.H.; KEMERINK, G.J.; THIMISTER, P.W.; HOFSTRA, L.; STOLK, L.M.; VAN HEERDE, W.L.; PAKBIERS, M.T.; JANSSEN, D.; BEYSENS, A.J.; REUTELINGSPERGER, C.P.; HEIDENDAL, G.A. Comparison between human pharmacokinetics and imaging properties of two conjugation methods for ^{99m}Tc-annexin A5. ***Br J Radiol***, v. 76, pp. 553-560, 2003.
- 17 BOERSMA, H.H.; KIETSELEAR, B.L.J.H.; STOLK, L.M.L.; BENNAGHMOUCH, A.; OFSTRA, L.; NARULA, J.; HEIDENDAL, G.A.K.; REUTELINGSPERGER, C.P.M. Past, present, and future of annexin A5: from proetin discovery to clinical applications. ***J Nucl Med***, v. 46, n. 12, pp. 2035-2050, 2005.
- 18 BRABAND, H.; KÜCKMANN, T.I.; ABRAM, U. Rhenium and technetium complexes with N-heterocyclic carbenes – A review. ***J Organomet Chem***, v.690, pp. 5421 – 5429, 2005.
- 19 BRASILEIRO FILHO, G. ***Bogliolo – Patologia Geral***. Rio de Janeiro: Guanabara, 1998. 2ª ed.
- 20 CAUCHON N.; LANGLOIS R.; ROUSSEAU J.A.; TESSIER G.; CADORETTE J.; LECOMTE R.; HUNTING D.J.; PAVAN R.A.; ZEISLER S.K.; VAN LIER, J.E. PET imaging of apoptosis with ⁶⁴Cu-labeled streptavidin following pretargeting of phosphatidylserine with biotinylated annexin-V. ***Eur J Nucl Med Mol Imaging***, v. 34, n. 2, pp. 247–258, 2007.
- 21 COLLINS, C. H. ***Fundamentos de Cromatografia***. Campinas: Unicamp, 2006. 1ª ed.
- 22 DAVIES, J.S.; HOWE, J.; Le BRETON,M. A model reaction for assessing the coupling and chiral efficiency of reagents in depside bond formation. ***J Chem Soc Oerkin Trans***, v. 2, pp. 2353–2339, 1995.

- 23 DIJKGRAAF, I.; BOERMAN, O.C.; OYEN, W.J.G.; CORSTENS, F.H.M.; GOTTHARDT, M. Development and application of peptide-based radiopharmaceuticals. ***Anticancer Agents Med Chem***, v. 7, n.5, pp. 543-551, 2007.
- 24 DILWORTH, J.R.; PARROTT, S.J. The biomedical chemistry of technetium and rhenium. ***Chemical Society Reviews***, v. 27, pp. 43-55, 1998.
- 25 Durkan, K.; Lambrecht, F.Y.; Unak, P. Radiolabeling of bombesin-like peptide with ^{99m}Tc : ^{99m}Tc -litorin and biodistribution in rats. ***Bioconjug Chem***, v. 18, pp. 1516-1520, 2007.
- 26 ECKELMAN, W.C. Radiolabeling with technetium-99m to study high-capacity and low-capacity biochemical systems ***Eur J Nucl Med***, v. 22, pp. 249-263, 1995.
- 27 Estrutura da ANXA5. Disponível em: <<http://www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/gs/86437.html>> acesso em: 13 de fevereiro de 2009.
- 28 FADOK, V.A.; BRATTON D.L.; FRASCH, S.C.; WARNER M.L.; HENSON P.M. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. ***Cell Death Differ***, v. 5, n.7, pp. 551-562, 1998.
- 29 FONGE, H.; HUBERT, M.S.; VUNCKX, K. RATTAT, D.; NUYTS, J.; BOARMANS, G. NI, Y.; REUTELINGSPERGER, C.; VERBRUGGEN, A. Preliminary *in vivo* evaluation of a novel ^{99m}Tc -labeled HYNIC-cys-annexin A5 as an apoptosis imaging agent. ***Bioorg Med Chem Lett***, v.18, pp 3794-3798, 2008.
- 30 FRASER, A.; JAMES, C. Fermenting debate: do yeast undergo apoptosis? ***Cell Biol***, v. 8, pp. 219-221, 1998.
- 31 GERKE, V.; MOSS, S.E. Annexins: From structure to function. ***Physiol Rev***, v.82, pp. 331-371, 2002.
- 32 GESKE, F.J.; GERSCHENSON, L.E. The biology of apoptosis. ***Hum Pathol***, v. 32, n. 10, pp. 1029-1038, 2001.

- 33 GLASER, M.; COLLINGRIDGE, D.R. ABOAGYE, E.O.; BOUCHIER-HAYES, L.; HUTCHINSON, O.C.; MARTIN, S.J. PRICE, P.; BRADY, F. AND LUTHRA, S. K. Iodine-124 labelled Annexin-V as a potential radiotracer to study apoptosis using positron emission tomography. **Appl Radiat Isot**, v. 58, pp. 55-62, 2003.
- 34 HOFSTRA, J.; LIEM, I.H.; DUMONT, E.A.; BOERSMA, H.H.; VAN HEERDE, W.L.; DOEVENDANS, P.A.; DEMUINCK, E.; WELLENS, H.J.J.; KEMERINK, G.J.; REUTELINGSPERGER, C.P.M.; HEIDENDAL, G.A. Visualisation of cell death *in vivo* in patients with acute myocardial infarction. **Lancet**, v. 356, pp. 209-212, 2000.
- 35 IMAM, S.K. Molecular Nuclear Imaging: the Radiopharmaceuticals. **Cancer Biother Radiopharm**, v. 20, n. 2, pp. 163-172, 2005.
- 36 JIMÉNEZ, Y.V. Dosimetria interna aplicada a farmacos marcados con ¹⁷⁷Lu. 2007. Dissertação (mestrado). Instituto Balseiro, Cuyo.
- 37 KARTACHOVA, M.S.; OLMOS, R.A.V.; HAAS, R.L.M.; HOEBERS, F.J.P.; VAN DEN BREKEL, M.W.; VAN ZANDWIJK, N.; VAN HERK, M. VERHEIJ, M. Mapping of treatment-induced apoptosis in normal structures: ^{99m}Tc-HYNIC-rh-annexin V SPECT and CT image fusion. **Eur J Med Mol Imaging**, v. 33, pp. 893-899, 2006.
- 38 KASINA, S.; RAO, T.N.; SRINIVASAN, A.; SANDERSON, J. A.; FITZNER, J.N.; RENO, J.M.; BEAUMIER, P.L.; FRITZBERG, A.R. Development and biologic evaluation of a kit for preformed chelate technetium-^{99m} radiolabeling of an antibody fab fragment using a diamide dimercaptide chelating agent. **J Nuc Med**, v. 32, pp. 1445-1451, 1991.
- 39 KEMERINK, G.J.; BOERSMA, H.H.; THIMISTER, P.W.L.; HOFSTRA, L.; LIEM, I.H.; PAKBIERS, MARIE-THÉRÈSE W.; JANSSEN, D.; REUTELINGSPERGER, C.P.M.; HEIDENDAL, G.A.K. Biodistribution and dosimetry of ^{99m}Tc-BTAP-annexin-V in humans. **Eur J Nucl Med**, v. 28, n. 9, pp. 1373-1378, 2001.
- 40 KIETSELAER, B.L.J.H.; REUTELINGSPERGER, C.P.M.; BOERSMA, H.H.; HEIDENDAL, G.A.K.; LIEM, I.H.; CRIJNS, H.J.G.M.; NARULA, J.; HOFSTRA, L. Noninvasive Detection of programmed cell loss with ^{99m}Tc-labeled annexin A5 in heart failure. **J Nucl Med**, v. 48, pp.

562-567, 2007.

- 41 KOWALSSKY, R.J.; PERRY, J.R. **Radiopharmaceutical in nuclear medicine practice**. Norwal, conn: Appleton & lange, 1987.
- 42 LAHORTE, G.; SLEGGERS, G.; PHILIPPÉ, J.; VAN DE WIELE, C.; DIERCKX, R.A. Synthesis and "in vitro" evaluation of ¹²³I-labelled human recombinat annexin V. **Biomol Eng**, v. 17, pp. 51-53. 2001.
- 43 LAHORTE, C.M.M; VANDERHEYDEN, JEAN-LUC;.STEINMETZ, N.; VAN DE WIELE, C.; DIERCKX, R.A. SLEGGERS, G. Apoptosis-detecting radioligands: current state of the art and future perspectives. **Eur J Med Mol Imaging**, v. 31, pp. 887-919, 2004.
- 44 LARA, P.F. Farmacocinética. In: ZANINI, A.C.; OGA, S. **Farmacologia aplicada**. São Paulo: Atheneu, p. 35-45, 1985.
- 45 Li, W.X.; FRANKLIN W.A. Radiation- and Heat-induced apoptosis in PC-3 prostate cancer cells. **Radiat Res**, v.150, pp. 190-194, 1998.
- 46 LICHTENFELS, P.; BARRIOS, C.H.; MOREIRA, L.F. Apoptose: Morte Celular Programada. **Acta Méd**, v. 20, n. 1, pp. 298 – 311, 1999.
- 47 LIU,G.; WESCOTT, C.; SATO, A.; WANG,Y.; LIU,N.; ZHANG, YU-MIN; RUSCKOWSKI, M.; HNATOWICH, D.J. Nitriles form mixed-coligand complexes with ^{99m}Tc-HYNIC-Peptide **Nucl Med Biol**, v.29, n.1, pp.107-113, 2002.
- 48 LIU, S.; EDWARDS, S.; BARRETT, J.A. ^{99m}Tc Labeling of Highly potent small peptides. **Bioconjug Chem**, v. 8, pp. 621-636, 1997.
- 49 LIU, S.; EDWARDS, S.; HARRIS, A.R. Novel Ternary Ligand System for ^{99m}Tc-Labeling of Hydrazino Nicotinamide-Modified Biologically Active Molecules Using Imine-N-Containing Heterocycles as Coligands **Bioconjug Chem**, v. 9, pp. 583-595, 1998.
- 50 LIU, S.; EDWARDS, S. ^{99m}Tc-labeled small peptides as diagnostic radiopharmaceuticals. **Chem Rev**, v. 99, pp. 2235-2268,1999.

- 51 LIU, S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 60, pp. 1347-1370, 2008.
- 52 LU, J.; KONG, D.; YANG, Z.; YANG, S.; FAN, W.; JIA, H.; WANG, X. Preparation of ^{99m}Tc -nitrido asymmetrical heterocomplex with 4-(cyclohexylpiperazin-1-yl)-dithioformate and its biological evaluation as a potential myocardial imaging agent. **Appl Radiat Isot**, v. 65, pp. 1134-1139, 2007.
- 53 Malich, G.; Markovic, B.; Winder, C. The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the *in vitro* cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. **Toxicology**, v. 124, pp. 179–192, 1997.
- 54 MANG'ERA, K.O.; VANBILLOEN, H.P.; BELLANDE, E.; PASQUALINI, R.; VERBRUGGEN, A.M. Influence of a ^{99}TcN core on the biological and physicochemical behavior of ^{99m}Tc complexes of L,L-EC and L,L-ECD. **Nucl Med Biol**, v. 23, pp. 987–993, 1996.
- 55 McGAHON, A. J., MARTIN, S. M., BISSONNETTE, R. P., MAHBOUBI, A., SHI, Y., MOGIL, R. J., NISHIOKA, W. K. & GREEN, D.R. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis *in vitro*. **Meth Cell Biol**, v. 46, pp.153–185, 1995.
- 56 McQUADE, P.; JONES, L.A.; VANDERHEYDEN, J.L.; WELCH, M.J. ^{94m}Tc and ^{64}Cu labeled annexin-V, positron emitting radiopharmaceuticals to study apoptosis. **J Labelled Cpd Radiopharm**, v. 46, pp. S335, 2003. In: LAHORTE, C. M.; VANDERHEYDEN, J. L.; STEINMETZ, N.; VAN DE WIELE, C.; DIERCKX, R. A.; SLEGERS, G. Apoptosis-detecting radioligands: current state of the art and future perspectives. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 31, n. 6, pp. 887-919, 2004.
- 57 MOCHIZUKI, T.; KUGE Y.; ZHAO, S.; TSUKAMOTO, E.; HOSOKAWA, M.; STRAUSS, H.W.; BLANKENBERG, F.G.; TAIT, J.F. and TAMAKI, N.J. Detection of Apoptotic Tumor Response *in Vivo* After a Single Dose of Chemotherapy with ^{99m}Tc -Annexin V **J Nucl Med**, v.44, pp. 92–97, 2003.

- 58 MUKHERJEE, A.; KOTHARI, K.; TÓTH, G.; SZEMENYEI, E.; SARMA, H.D.; KÖRNYEI, J.; VENKATESH, M. ^{99m}Tc -labeled annexin V fragments: a potential SPECT radiopharmaceutical for imaging cell death. **Nucl Med Biol**, v.33, pp. 635-643, 2006.
- 59 MURAKAMI, Y.; TAKAMATSU, H.; TAKI, J.; TATSUMI, M.; NODA, A.; ICHISE, R.; TAIT, J.F.; NISHIMURA, S. ^{18}F -labelled annexin V: a PET tracer for apoptosis imaging. **Eur J Med Mol Imaging**, v. 31, pp. 469-474, 2004.
- 60 MURPHY, R.; TONANTZITLA, I. Biexp. Puebla, México, 1991.
- 61 OSWALD, B.; PATSENKER, L.; DUSCHL, J.; SZMACINSKI, H.; WOLFBEINS, O.S.; TERPETHNIG, E. Synthesis, spectral properties, and detection limits of reactive squaraine dyes, a new class of diode laser compatible fluorescent protein labels. **Bioconjugate Chem**, v. 10, n. 6, pp. 925-931, 1999.
- 62 PAROLIN, M.B.; REASON, I.J.M. apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arq Gastroenterol**, v.38, n.2, pp.138-144, 2001.
- 63 PÉTILLOT, P.; LAHORTE, C.; BONANNO, E.; SIGNORE, A.; LANCEL, S.; MARCHETTI, P.; VALLET, B.; SLEGGERS, G.; NEVIERE, R. Annexin V detection of lipopolysaccharide-induced cardiac apoptosis. **Shock**, v. 27, n. 1, pp. 69-74, 2007.
- 64 PSIMADAS, D.; FANI, M.; ZIKOS, C.; XANTHOPOULOS, S.; ARCHIMANDRITIS, S.C.; VARVARIGOU, A.D. Study of the labeling of two novel RGD-peptidic derivatives with the precursor [$^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3$] $^+$ and evaluation for early angiogenesis detection in cancer. **Appl Radiat Isot**, v. 64, n. 2, pp. 151-159, 2006.
- 65 RADIOFÁRMACOS RECEPTOR-ESPECÍFICO. Disponível em <http://zrw.web.psi.ch/research/radiodiagnostics/peptide/Publication_s/Abschnitt1_Diss14250.pdf>. Acesso em 23 nov 2008.
- 66 REUTELINGSPERGER, C.P.M.; HEERDE, W. L. Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. **CMLS, Cell mol life sci.**, v.53,

pp.527-532, 1997.

- 67 REUTELINGSPERGER, C.P.M.; HOFASTRA, L.; NARULA, J. Cooking annexin V: A simple 1-pot procedure to destroy its phosphatidylserine-binding activity. **J Nucl Med**, v. 45, n. 6, pp. 1098-1099, 2004.
- 68 RUSSELL, J.; O'DONOGHUE, J.; FINN, R. KOZIOROWSKI, J.; RUAN, S.; HUMM, J.L. AND CLIFTON LING, C. Iodination of Annexin V for imaging apoptosis. **J Nucl Med**, v. 43, n. 5, pp. 671-677, 2002.
- 69 ROTTEY, S.; VAN DEN BOSSCHE, B.; SLEGERS, G.; VAN BELLE, S.; VAN DE WILE, C. Influence of chemotherapy on the biodistribution of [^{99m}Tc]hydrazinonicotinimide annexin V in cancer patients. **Q J Nucl Med Mol Imaging**, v. 53, pp. 127-132, 2009.
- 70 SAPIENZA, M. T.; BUCHPIEGUEL, C. A. Medicina Nuclear em oncologia. IN: GUIMARÃES, J.R.Q. **Manual de Oncologia**. São Paulo: BBS Editora, 2004. p. 675-683.
- 71 SARASTEIA, A.; PULKKIC, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc Res**, v. 45, n. 3, pp. 528-537, 2000.
- 72 SCHLEGEL, R. A.; WILLIAMSON, P. Phosphatidylserine, a death knell. **Cell Death Differ**, v. 8, pp. 551 - 563, 2001.
- 73 SMITH-JONES, P.M.; AFROZE, A.; ZANZONICO, P.; TAIT, J.; LARSON, S.M.; STRAUSS, H.W. ⁶⁸Ga labelling of annexin-V: comparison to ^{99m}Tc-annexin-V and ⁶⁷Ga-annexin [abstract]. **J Nucl Med**, v. 44, n. 5, 49P-50P, 2003. In: LAHORTE, C. M.; VANDERHEYDEN, J. L.; STEINMETZ, N.; VAN DE WIELE, C.; DIERCKX, R. A.; SLEGERS, G. Apoptosis-detecting radioligands: current state of the art and future perspectives. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 31, n. 6, pp. 887-919, 2004.
- 74 STRATTON, J.R.; DEWHURST, T.A.; KASINA, S.; RENO, J.; CERQUEIRA, M. BASKIN, D.; TAIT, J.F. Selective uptake of radiolabeled Annexin V on acute porcine left atrial thrombi. **Circulation**, v. 92, n. 10, pp. 3113-3121, 1995.

- 75 SUBBARAYAN, M. HÄFELI, U.O.; FEYES, D.K.; UNNITHAN, J.; EMANCIPATOR, S.N. AND MUKHTAR, H. A simplified method for preparation of ^{99m}Tc -annexin V and its Biologic Evaluation for "in vivo" imaging of apoptosis after photodynamic therapy. **J Nucl Med**, v. 44, n. 4, pp. 650-656, 2003.
- 76 Takahashi, A.; Matsumoto, H.; Yuki, K.; Yasumoto, J.; Kajiwara, A.; Aoki, M.; Furusawa, Y.; Ohnishi, K.; Ohnishi, T. High-LET radiation enhanced apoptosis but not necrosis regardless of p53 status. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 60, n. 2, pp. 591-597, 2004.
- 77 TAKI, J.; HIGUCHI, T.; KAWASHIMA, A.; TAIT, J.F.; MURAMORI, A.; MATSUNARI, I.; NAKAJIMA, K.; VANERHERYDEN, JEAN-LUC; STRAUSS, H.W. ^{99m}Tc -annexin V uptake in a rat model of variable ischemic severity and reperfusion time. **Circ J**, v. 71, pp. 1141-1146, 2007.
- 78 THIMISTER, P.W.L.; HOFSTRA, L.; LIEM, I.H.; BOERSMA, H.H.; KEMERINK, G.; REUTELINGSBERGER, C.P.M.; HEIDENDAL, G.A.K. *In Vivo* Detection of Cell Death in the Area at Risk in Acute Myocardial Infarction. **J Nucl Med**, v. 44, n. 3, pp. 391-396, 2003.
- 79 THRALL, J.H.; ZIESSMAN, H.A. **Medicina Nuclear**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
- 80 TISATO, F.; REFOSCO, F.; BANDOLI, G. Structural survey of the technetium complexes. **Coord Chem Rev**, v. 135/136, pp. 325 - 397, 1994.
- 81 VAN de WIELE, C.; VERMEERSCH, H.; LOOSE, D.; SIGNORE, A.; MERTENS, N.; DIERCKX, R. Radiolabeled annexin V for monitoring treatment response in oncology. **Cancer Biother Radiopharm**, v. 19, n. 2, pp. 189-194, 2004.
- 82 VANDERHEYDEN, JEAN-LUC.; LIU, G.; HE, J.; PATEL, B.; TAIT, J.F.; HNATOWICH, D.J. Evaluation of ^{99m}Tc -MAG3-annexin V: influence of the chelate on *in vitro* and *in vivo* properties in mice. **Nucl Med Biol**, v. 33, pp. 135-144, 2006.
- 83 VANDERRHEYDEN, JEAN-LUC. Hynic annexin instructions. Disponível

em:

<http://web.ncifcrf.gov/research/brb/site/hynicanneixinstructions.doc>.

Acesso em: 02 jul. 2007.

- 84 VANNIER, M.W. Imaging Apoptosis in Rheumatoid Arthritis. **J Nucl Med**, v. 43, n. 10, pp. 1366-1367, 2002.
- 85 VASCONCELOS, A.C.; VASCONCELOS, M.M.A. Apoptose ou morte celular programada – um novo conceito em patologia? **Rev Méd Minas Gerais**, v. 55, n.2, pp.103–108, 1995.
- 86 VERBEKE, K.; ROZENSKI, J.; CLEYNHENS, B.; VANBILLOEN, H.; GROOT, T.; WEYNS, N.; BORMANS, G.; VERBRUGGEN, A. Development of a conjugate of ^{99m}Tc -EC with aminomethylenediphosphonate in the search for a bone tracer with fast clearance from soft tissue. **Bioconjugate Chem**, v. 13, pp. 16-22, 2002.
- 87 VERBRUGGEN, A.M.; NOSCO, D.L.; VAN NEROM, C.G.; BORMANS, G.M.; ADRIAENS, P.J.; DE ROO, M.J. Technetium-99m-L,L-Ethylenedicysteine: A Renal Imaging Agent. I. Labeling and Evaluation in Animals. **J Nucl Med**, v. 33, n. 4, pp. 551-557, 1992.
- 88 YANG, D.J.; AZHDARINIA, A.; WU, P.; YU, DONG-FANG; TANSEY, W.; KALIMI, S.K.; KIM, E.E.; PODOLOF, D.A. *In vivo* and *in vitro* measurement of apoptosis in breast cancer cells using ^{99m}Tc -EC-Annexin V. **Cancer Biother Radiopharm**, v. 16, n.1, pp. 73-83, 2001.
- 89 YANG, D.J.; KIM, CHANG-GUHN; SCHECHTER, N.R.; AZHDARINIA, A.; YU, DONG-FANG; OH, CHANG-SOK; BRYANT, J.L.; WON, JONG-JIN; KIM, E.E.; PODOLOF, D.A. Imaging with ^{99m}Tc ECDG targeted at the multifunctional glucose transport system: Feasibility study with rodents. **Radiology**, v. 226, pp. 465-473, 2003.
- 90 YANG, D.J.; AZHDARINIA, A.; KIM, E.E. Tumor specific imaging using Tc-99m and Ga-68 labeled radiopharmaceuticals. **Curr Med Imaging Rev**, v. 1, n. 1, pp. 25-34, 2005.
- 91 YANG, D.J.; KIM, E.E.; INOUE, T. Targeted molecular imaging in

- oncology. **Annals Nucl Med**, v. 20, n. 1, pp. 1-11, 2006.
- 92 Wester, H.J.; Hammacher, K.; Stöcklin, G. A comparative study of n.c.a. fluorine-18 labeling of proteins via acylation and photochemical conjugation. **Nucl Med Biol**, v. 23, pp. 365–372, 1996. In: LAHORTE, C. M.; VANDERHEYDEN, J. L.; STEINMETZ, N.; VAN DE WIELE, C.; DIERCKX, R. A.; SLEGGERS, G. Apoptosis-detecting radioligands: current state of the art and future perspectives. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 31, n. 6, pp. 887-919, 2004.
- 93 WILKINSON, G.R. Farmacocinética: dinâmica da absorção, da distribuição e da eliminação de fármacos. IN: GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: Mc-Graw-Hill Interamericana do Brasil Ltda., 10 ed., p. 3-24, 2003.
- 94 ZHANG, J.; WANG, X. LI. Preparation of $^{99m}\text{TcN}(\text{CBDTC})_2$ and its biodistribution in mice. **Appl Radiat Isot**, v. 55, pp. 453 –456, 2001.
- 95 ZHANG, J.; WANG, X. LI, C.Y. Synthesis and biodistribution of a new ^{99m}Tc nitrido complex as a potential myocardial and cerebral imaging agent. **Appl Radiat Isot**, v. 56, pp. 857 – 861, 2002.
- 96 ZHAO, Y., KUGE, Y.; ZHAO, S.; MORITA, K.; INUBUSHI, M.; STRAUSS, H.W.; BLANKENBERG, F.G.; TAMAKI, N. Comparison of ^{99m}Tc -annexin A5 with ^{18}F -FDG for the detection of atherosclerosis in ApoE $^{-/-}$ mice. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 34, pp. 1747-1755, 2007.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)