

**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA**

**ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA**

**“COMPOSTOS DE DEXTRANO-MANOSE MARCADOS COM O  
 $^{67}\text{Ga}$  PARA A DETEÇÃO DO GÂNGLIO SENTINELA”**

Filipa Antónia Drumond Gonçalves

Dr<sup>a</sup> Maria Paula Cordeiro Crespo Cabral Campello Aboim de Barros, IST/ITN,  
Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa

Mestrado em Medicina Nuclear  
Área de Especialização em Radiofarmácia

Lisboa, 2012

**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA  
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA**

**“COMPOSTOS DE DEXTRANO-MANOSE MARCADOS COM O  
<sup>67</sup>Ga PARA A DETEÇÃO DO GÂNGLIO SENTINELA”**

Filipa Antónia Drumond Gonçalves

Doutora Maria Paula Cordeiro Crespo Cabral Campello Aboim de Barros,  
IST/ITN, Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa

Doutor António Rocha Paulo

Doutor João Domingos Galamba Correia

Mestrado em Medicina Nuclear  
Área de Especialização em Radiofarmácia

(esta versão inclui as críticas e sugestões feitas pelo júri)

Lisboa, 2012

Esta dissertação – Compostos de Dextrano-Manose marcados com o <sup>67</sup>Ga para a deteção do Gânglio Sentinela – foi realizada no âmbito do Mestrado em Medicina Nuclear, Área de Especialização em Radiofármacos, organizado pela Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa.

O trabalho experimental apresentado nesta dissertação foi realizado no Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas da Unidade de Ciências Químicas e Radifarmacêuticas do IST/ITN - Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, sob orientação da Doutora Maria Paula Cabral Campello.

Este trabalho não foi financiado por nenhum organismo, nem teve o suporte financeiro de nenhuma bolsa.

A Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor e que tal não viole nenhuma restrição imposta por artigos publicados que estejam incluídos neste trabalho.



## Agradecimentos

---

À minha orientadora, Doutora Maria Paula Cabral Campello, agradeço, antes de mais, o fato de ter aceite ser minha orientadora, o rigor científico como me orientou e a forma exemplar, disponível e cuidada como me apoiou a realização deste trabalho, tendo contribuído para o processo de aprendizagem. Quero expressar o meu sincero e profundo reconhecimento e a minha grande satisfação por ter participado neste trabalho.

À Doutora Isabel Rego dos Santos agradeço o fato de ter permitido a minha inserção no Grupo de Química Inorgânica e Radiofarmacêutica, demonstrando o seu empenho e dedicação com que o coordena.

À Doutora Célia Fernandes, à Doutora Lurdes Gano, ao Doutor António Paulo e ao Doutor João Galamba pela simpatia e boa disposição demonstradas, o que facilitou a minha integração no grupo.

Ao Mestre Maurício Morais agradeço toda a ajuda e apoio demonstrados, disponibilidade, simpatia, dedicação e conhecimentos demonstrados e transmitidos ao longo da execução deste trabalho.

Quero agradecer ao Grupo Ciências Radiofarmacêuticas onde me inseri. À sua maneira, cada um contribuiu para o desenvolvimento do meu trabalho de uma forma direta ou indireta, quer pela amizade, ajuda e boa disposição.

Ao Instituto Tecnológico e Nuclear agradeço o acolhimento e à Fundação para a Ciência e Tecnologia o financiamento deste trabalho.

Agradeço à minha família e a todos os meus amigos por me encorajarem ao longo deste percurso. Quero agradecer à Sónia, à Susete, à Lu, à Catarina e ao Paulo e a outros tantos pelo apoio e companheirismo.

Finalmente, não posso deixar de agradecer aos meus pais pelo apoio e incentivo fundamentais à realização deste trabalho, o esforço que fizeram para me permitirem chegar até aqui. Nunca esquecerei o encorajamento na luta pelos meus objetivos, o apoio em todas as decisões tomadas e as palavras certas na hora certa.

**Filipa Gonçalves**



## Resumo

---

O Gânglio Sentinela (GS) é o primeiro gânglio a receber a drenagem do sistema linfático sendo, por isso, de extrema importância a sua detecção, para que o clínico possa estabelecer a terapia a adotar.

O presente trabalho teve como principal objetivo o desenvolvimento de compostos potencialmente úteis para a visualização do GS, nomeadamente macromoléculas poliméricas, do tipo dextrano-amina-manose, marcados com  $^{67}\text{Ga}$ , de forma a ultrapassar alguns inconvenientes associados ao uso do  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .

Para se alcançar este objetivo sintetizou-se e caracterizou-se a macromolécula dextrano-amina-dota-manose. Este composto contém unidades de manose (15 unidades/mol dextrano) para o alvejamento *in vivo* dos receptores de manose e a unidade quelante dota para a estabilização do radiometal.

O conjugado sintetizado permitiu preparar o composto radioativo  $^{67}\text{Ga}$ -dextrano-amina-dota-manose, obtido com elevado rendimento de marcação após aquecimento a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

Estudos de estabilidade mostraram que o radiocomposto de  $^{67}\text{Ga}$ -dextrano-amina-dota-manose é estável *in vitro*, apresentando, após 24h, uma pureza radioquímica superior a 95% na mistura reacional. Quanto aos estudos de estabilidade, na presença dos aminoácidos glutationa (2h) e apotransferrina (24h) a  $37^{\circ}\text{C}$ , nada se pode concluir.



## Abstract

---

The Sentinel Ganglion (GS) is the first ganglion to receive lymphatic drainage and, therefore, it is extremely important to perform its early detection in order to avoid the lymphatic spread and to establish the adequate therapy.

This study aimed to contribute for the development of compounds potentially useful for detection of sentinel lymph node, based on polymeric dextran-amine-mannose derivatives labeled with  $^{67}\text{Ga}$ , in order to overcome some drawbacks associated with the use of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .

To achieve the proposed goal a new dextran-amine-dota-mannose derivative has been synthesized and characterized. This compound contains mannose units (15 units/ dextran mol) for *in vivo* targeting of mannose receptors and a dota chelating unit to stabilize the radiometal.

The new dextran bioconjugate allowed the synthesis of the radioactive compound  $^{67}\text{Ga}$ -dextran-amine-dota-mannose, which has been obtained in high radiochemical yield after labeling at  $100^{\circ}\text{C}$  for 15 minutes.

Stability studies showed that  $^{67}\text{Ga}$ -dextran-amine-dota-mannose is stable *in vitro*, presenting a radiochemical purity > 95% after 24h. Relatively stability studies, in the presence of the amino acids glutathione (2h) and apotransferrine (24h) at  $37^{\circ}\text{C}$ , nothing can be concluded.



## Palavras Chaves

---

Dextrano-manose

dota

Gálio-67

Gânglio Sentinela

Radiofármacos

## Key words

---

Dextran-mannose

dota

Gallium-67

Radiopharmaceuticals

Sentinel lymph node



## Índice Geral

---

|  |    |
|--|----|
| 1. Introdução  | 1  |
| 1.1 Considerações gerais sobre a Medicina Nuclear  | 1  |
| 1.1.1 Radiofármaco   | 2  |
| 1.1.2 $^{67}\text{Ga}$ – Radionuclídeo de diagnóstico  | 4  |
| 1.1.3 Ligandos para o gálio  | 5  |
| 1.1.3.1 Ligando bifuncional – dota   | 7  |
| 1.1.4 Radiofármacos de gálio-67  | 8  |
| 1.2 Algumas considerações sobre o Gânglio Sentinela (GS)   | 8  |
| 1.2.1 Técnicas utilizadas para a detecção do GS  | 10 |
| 1.2.1.1 Corantes orgânicos usados como co-adjuvantes na detecção do GS   | 11 |
| 1.2.2 Radiofármacos usados na detecção do GS   | 12 |
| 1.2.2.1 Propriedades dos radiofármacos   | 12 |
| 1.2.2.2 Radiofármacos em uso clínico   | 13 |
| 1.2.3 Novos radiofármacos para a detecção do GS  | 16 |
| 1.2.3.1 Conceitos gerais   | 16 |
| 1.2.3.2 Dextrano   | 18 |
| 1.2.3.3 Conjugados $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Dextrano-Manose   | 19 |
| 1.3 Objetivo do trabalho   | 22 |
| 2. Resultados e discussão  | 23 |
| 2.1 Considerações Gerais   | 23 |
| 2.2 Síntese e Caraterização do Dextrano-amina  | 25 |
| 2.2.1 Síntese e caraterização do dextrano-alilo  | 25 |
| 2.2.2 Síntese do dextrano-amina  | 26 |
| 2.3 Síntese e Caraterização do Conjugado Dextrano-amina-dota-tris(tBu)ester  | 27 |
| 2.3.1 Síntese de Ativação do dota-tris(tBu)ester [ácido 2-(4,7,10-tris(2-(terbutoxi-2-oxoetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-il) acético] | 27 |
| 2.3.2 Síntese do conjugado dextrano-amina-do <sub>3</sub> <sup>t</sup> ButCOOH   | 28 |
| 2.4 Síntese e Caraterização do Conjugado Dextrano-amina-do <sub>3</sub> <sup>t</sup> But-manose  | 30 |
| 2.4.1 Síntese da 2-(imino-metoxietil)-1-tio-manopiranosose   | 31 |
| 2.4.2 Síntese do conjugado dextrano-amina-do <sub>3</sub> <sup>t</sup> But-manose  | 32 |
| 2.5 Síntese e Caraterização do Conjugado Dextrano-amina-dota-manose  | 35 |
| 2.6 Síntese radioquímica do conjugado polimérico radioactivo $^{67}\text{Ga}$ -[dextrano-amina-dota-manose]                                  | 37 |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 2.6.1   | Síntese do $^{67}\text{GaCl}_3$  | 37 |
| 2.6.2   | Preparação do conjugado polimérico radioativo de $^{67}\text{GaCl}_3$  | 38 |
| 2.7     | Estudos de estabilidade <i>in vitro</i> do conjugado polimérico radioativo de $^{67}\text{Ga}$   | 40 |
| 2.7.1   | Estabilidade nas soluções de reação  | 40 |
| 2.7.2   | Estabilidade na presença de apotransferrina e glutatona  | 41 |
| 3.      | Conclusões e Perspetivas   | 43 |
| 4.      | Procedimento Experimental  | 43 |
| 4.1     | Material   | 45 |
| 4.1.1   | Material utilizado em reações químicas   | 45 |
| 4.1.2   | Material utilizado nas marcações radioquímicas   | 45 |
| 4.2     | Reagentes e Solventes  | 46 |
| 4.3     | Métodos  | 47 |
| 4.3.1   | Técnica de Purificação   | 47 |
| 4.3.1.1 | Diálise  | 47 |
| 4.3.2   | Técnicas de caracterização   | 48 |
| 4.3.2.1 | Espectroscopia de Ressonância Magnética e Nuclear (RMN)  | 48 |
| 4.3.2.2 | Cromatografia em Camada Fina (TLC)   | 49 |
| 4.3.2.3 | Medição da Atividade das soluções radioativas  | 49 |
| 4.4     | Síntese e caracterização dos compostos descritos nesta dissertação   | 49 |
| 4.4.1   | Síntese do dextrano-amina  | 49 |
| 4.4.1.1 | Síntese do dextrano-alilo  | 49 |
| 4.4.1.2 | Síntese do dextrano-amina  | 50 |
| 4.4.2   | Síntese do conjugado dextrano-amina-dota-tris(tBu)ester  | 51 |
| 4.4.2.1 | Síntese de Ativação do dota-tris(tBu)ester [ácido 2-(4,7,10-tris(2-(terbutoxi-2-oxoetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-il) acético] | 51 |
| 4.4.2.2 | Síntese do conjugado dextrano-amina-do <sub>3</sub> <sup>t</sup> ButCOOH   | 52 |
| 4.4.3   | Síntese do conjugado dextrano-amina-do <sub>3</sub> <sup>t</sup> But-manose  | 54 |
| 4.4.3.1 | Síntese da 2-(imino-metoxietil)-1-tio-manopiranosose   | 54 |
| 4.4.3.2 | Síntese do conjugado dextrano-amina-do <sub>3</sub> <sup>t</sup> But-manose  | 54 |
| 4.4.4   | Síntese do conjugado dextrano-amina-dota-manose  | 56 |
| 4.5     | Síntese radioquímica do conjugado polimérico radioativo $^{67}\text{Ga}$ -[dextrano-amina-dota-manose]                                 | 57 |
| 4.5.1   | Síntese do $^{67}\text{GaCl}_3$  | 57 |
| 4.5.2   | Preparação do conjugado polimérico radioativo de $^{67}\text{GaCl}_3$  | 58 |
| 4.6     | Estudos de estabilidade <i>in vitro</i> do conjugado polimérico radioativo de $^{67}\text{Ga}$   | 58 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 4.6.1 | Estabilidade nas soluções de reação                     | 58 |
| 4.6.2 | Estabilidade na presença de apotransferrina e glutatona | 58 |
| 5.    | Referências Bibliográficas                              | 59 |



## Índice de Tabelas

---

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 2.1:</b> Valores de Pureza Radioquímica da marcação do conjugado polimérico radioativo $^{67}\text{Ga}$ -[dextrano-amina-dota-manose] à temperatura ambiente, aos 30 e 60 minutos, e a 100°C, aos 5, 15 e 30 minutos | 38 |
| <b>Tabela 4.1:</b> Reagentes e solventes utilizados no trabalho realizado  | 46 |



## Índice de Figuras

---

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.1:</b> Estrutura com indicação dos locais de ligação dos grupos substituintes do DFO: NH <sub>2</sub>  | 6  |
| <b>Figura 1.2:</b> Estrutura dos macrociclos nota (1,4,7-triazaciclononano-N,N',N''-triacetato) (esquerda) e dota (1,4,7,10-tetraazaciclododecano, N,N',N'',N'''-tetraacetato) (direita)   | 7  |
| <b>Figura 1.3:</b> Concetualização esquemática do gânglio sentinela: <b>a</b> – artéria, <b>b</b> – veia, <b>c</b> – canal linfático, <b>d</b> – gânglio sentinela, <b>e</b> – segundo gânglio linfático, <b>f</b> – terceiro gânglio linfático  | 10 |
| <b>Figura 1.4:</b> Biópsia radioguiada ao GS   | 11 |
| <b>Figura 1.5:</b> Representação esquemática do colóide de albumina (nanocoll) radiomarcados com <sup>99m</sup> Tc e marcação fluorescente com ICG: <b>a</b> – Nanocoll (agregados de albumina serosa humana); <b>b</b> – <sup>99m</sup> Tc, <b>c</b> – <sup>99m</sup> Tc-Nanocoll; <b>d</b> – ICG; <b>e</b> – Complexo multimodal (ICG- <sup>99m</sup> Tc-Nanocoll) | 15 |
| <b>Figura 1.6:</b> Diagrama da estrutura de domínios no recetor de manose. FNII: domínio do tipo fibronetina II, DLTC: domínio de letina tipo-C, C: domínio citoplasmático   | 16 |
| <b>Figura 1.7:</b> [ <sup>99m</sup> Tc]MAG <sub>3</sub> -manosil-dextran, dextrano consistiu de 21 unidades de manose e 3 unidades de MAG <sub>3</sub> por dextrano. O peso molecular foi de 19,389 g/mol  | 20 |
| <b>Figura 2.1:</b> Síntese do dextrano-alilo   | 25 |
| <b>Figura 2.2:</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN em D <sub>2</sub> O do dextrano-alilo  | 26 |
| <b>Figura 2.3:</b> Síntese do dextrano-amina   | 26 |
| <b>Figura 2.4:</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN em D <sub>2</sub> O do dextrano-amina  | 27 |
| <b>Figura 2.5:</b> Síntese de ativação do éster do <sub>3</sub> <sup>t</sup> ButCOOH   | 28 |
| <b>Figura 2.6:</b> Síntese do Dextrano-amina-do <sub>3</sub> <sup>t</sup> ButCOOH  | 28 |
| <b>Figura 2.7:</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN em D <sub>2</sub> O do dextrano-amina-do <sub>3</sub> <sup>t</sup> ButCOOH   | 29 |
| <b>Figura 2.8:</b> Espectro de <sup>13</sup> C-RMN em D <sub>2</sub> O do dextrano-amina-do <sub>3</sub> <sup>t</sup> ButCOOH  | 30 |
| <b>Figura 2.9:</b> Síntese do 2-(imino-metoxietil)-1-tio-manopiranosose  | 31 |
| <b>Figura 2.10:</b> Síntese do Dextrano-amina-do <sub>3</sub> <sup>t</sup> But-manose  | 32 |
| <b>Figura 2.11:</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN em D <sub>2</sub> O do dextrano-amina-do <sub>3</sub> <sup>t</sup> But-manose   | 33 |
| <b>Figura 2.12</b> – Espectro de <sup>13</sup> C-RMN em D <sub>2</sub> O do dextrano-amina-do <sub>3</sub> <sup>t</sup> But-manose   | 34 |
| <b>Figura 2.13:</b> Síntese do Dextrano-amina-dota-manose  | 35 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 2.14</b> – Espectro de $^1\text{H}$ -RMN em $\text{D}_2\text{O}$ do dextrano-amina-dota-manose   | 36 |
| <b>Figura 2.15</b> – Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN em $\text{D}_2\text{O}$ do dextrano-amina-dota-manose  | 36 |
| <b>Figura 2.16:</b> Cromatograma analítico obtido na radiosíntese do $^{67}\text{GaCl}_3$  | 37 |
| <b>Figura 2.17:</b> Cromatograma analítico obtido para a marcação do conjugado polimérico radioativo ( $^{67}\text{Ga}$ -dextrano-amina-dota-manose) a $100^\circ\text{C}$ aos 30 minutos                                  | 39 |
| <b>Figura 2.18:</b> Cromatograma analítico obtido para o estudo de estabilidade do conjugado polimérico radioativo ( $^{67}\text{Ga}$ -dextrano-amina-dota-manose) às 24 horas após a marcação                             | 40 |
| <b>Figura 2.19:</b> Cromatograma analítico obtido para o estudo de estabilidade do conjugado polimérico radioativo ( $^{67}\text{Ga}$ -dextrano-amina-dota-manose) após 2 horas, na solução em excesso de glutatona        | 41 |
| <b>Figura 2.20:</b> Cromatograma analítico obtido para o estudo de estabilidade do conjugado polimérico radioativo ( $^{67}\text{Ga}$ -dextrano-amina-dota-manose) após 24 horas, na solução em excesso de apotransferrina | 42 |
| <b>Figura 4.1:</b> Síntese do Dextrano-alilo   | 50 |
| <b>Figura 4.2:</b> Síntese do Dextrano-amina   | 50 |
| <b>Figura 4.3:</b> Síntese de ativação do éster do $^1\text{ButCOOH}$  | 51 |
| <b>Figura 4.4:</b> Síntese do Dextrano-amina-do $^1\text{ButCOOH}$   | 53 |
| <b>Figura 4.5:</b> Síntese do 2-(imino-metoxietil)-1-tio-manopiranosose  | 54 |
| <b>Figura 4.6:</b> Síntese do Dextrano-amina-do $^1\text{ButCOOH}$ -manose   | 55 |
| <b>Figura 4.7:</b> Síntese do Dextrano-amina-dota-manose   | 56 |

## Símbolos e Abreviaturas

---

**Å** – Ångström

**ALND** – Auxilliary Lymph Node Dissection – Excisão de gânglios linfáticos auxiliares

**boc** – tert-Butoxicarbonilo

**Bq** – Becquerel

**CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>** – Diclorometano

**CyA** – Cyclosporina A

**CT** - Computed Tomographic – Tomografia Computorizada

**Da** – Dalton

**DCC** - N,N'-diciclohexilcarbodiimida

**DFO** – Desferrioxamina\_B

**DMSO** - Dimetilsulfóxido

**DNPs** – Dextrans nanoparticles

**dota** - 1,4,7,10-tetraaza-ciclododecano,N,N',N'',N'''-tetraacetato

**DTPA** – Ácido Dietilenotriaminapentaacético

**E<sub>β</sub><sup>+</sup>** - Energia do positrão

**EDC** - N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

**E<sub>v(max)</sub>** – Energia gama máxima

**GS** – Gânglio Sentinela

**HMPA** - Metacrilamida

**HYNIC** – Ácido Hidrazinonicotínico

**ICG** – Indocianina verde

**IST/ITN** – Instituto Superior Técnico/Instituto Tecnológico Nuclear

**ITLC – SG** – Instant Thin Layer Chromatography – Sylica Gel – Cromatografia Instantânea em Camada Fina em Sílica Gel

**K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** – carbonato de potássio

**keV** – kiloeletrãovolt

**kDa** – kiloDalton

**KmnO<sub>4</sub>** – Permanganato de Potássio

**KOH** – Hidróxido de sódio

**M** - Molaridade

**MAG<sub>3</sub>** – Mercaptoacetiltriglicina

**MAS** – Albumina do soro humano com unidades de manose

**MBq** - MegaBecquerel

**Me** – Metilo  
**mGy** – miliGray  
**MN** – Medicina Nuclear  
**MR** – Recetores de manose dos macrófagos  
**MRI** - Magnetic Resonance Imaging – Ressonância Magnética  
**NaOH** – Hidróxido de sódio  
**NHS** – N-hidroxisuccinimida  
**NIRF** – Fluorescência por infravermelhos  
**nm** – nanómetro  
**NMA** - Mannosly neoglycoalbumin  
**nota** - 1,4,7-triazaciclononano-N,N',N''-triacetato  
**PBS** – Tampão fosfato salino  
**PEG** - Polietinoglicol  
**PET** – Positron Emission Tomography - Tomografia por Emissão de Positrões  
**ppm** – Partes por milhão  
**PR** – Pureza Radioquímica  
**RMN** – Ressonância Magnética e Nuclear  
**SCN-nota** - 2-(*p*-inotiocianatobenzil)-1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-ácido triacético  
**SLNB** - Sentinel Lymph Node Biopsy - Biópsia radioguiada ao GS  
**SPECT** – Single Photon Emission Computed Tomography - Tomografia por Emissão de Fotão Único  
**T<sub>1/2</sub>** – Tempo de semi-desintegração  
**TFA** – Ácido Trifluoroacético  
**TLC** – Thin Layer Chromatography – Cromatografia em Camada Fina  
**TRAMP** – Transgenic Adenocarcinoma of mouse prostate - modelo de murinos com adenocarcinoma transgénico da próstata  
**WHO** – World Health Organization - Organização Mundial de Saúde

# 1. Introdução

---

## 1.1 Considerações gerais sobre a Medicina Nuclear

Em 1973 a Organização Mundial de Saúde (**World Health Organization - WHO**) definiu a medicina nuclear (MN) como sendo uma disciplina "... que engloba todas as aplicações médicas de materiais radioativos no diagnóstico, tratamento e investigação médica, à exceção do uso de fontes seladas de radiação em radioterapia"<sup>1</sup>.

A área de conhecimento da MN inclui, para além da medicina, a física, a farmácia, a biologia, a química, a matemática, a ciência computacional e todos os ramos da engenharia dedicados ao desenvolvimento de instrumentação que possibilite a aplicação das técnicas de MN.<sup>1</sup>

A MN abraça uma vasta gama de aplicações tais como as metodologias da imagem que vão desde a autoradiografia clássica, Tomografia de emissão com fotão único (**Single Photon Emission Computed Tomography - SPECT**) e à Tomografia por Emissão de Positrões (**Positron Emission Tomography - PET**) usando elementos ou moléculas radioativas. A análise e interpretação das imagens obtidas, por um especialista médico, conduzem ao diagnóstico e conseqüente terapia.<sup>1</sup>

Talvez se imponha, antes de mais, colocar uma questão: Porquê a MN? As razões são diversas e destacam-se como mais importantes as seguintes: é a melhor metodologia, dentre todas as disponíveis, para informação funcional; os métodos de deteção são os mais sensíveis (capazes de detetar massas inferiores ao picomole), permitindo a execução dos estudos em condições fisiológicas, sem interferência com os processos que se pretendem estudar; a maioria das moléculas pode ser marcada e usada como radiotraçador, tornando esta metodologia multiparamétrica, única entre todas as outras disponíveis, que só informam sobre uma propriedade ou um pequeno número de propriedades; permite obter resultados quantitativos; através das imagens dá diretamente resultados funcionais em termos relativos; os exames podem ser repetidos em períodos curtos. No entanto, devem ser destacados alguns pontos negativos das técnicas de MN, tais como, a necessidade de um ambiente não-convencional e precauções após os exames (não podemos "desligar" a radioatividade como um dispositivo de raios X); a necessidade da administração de radiofármacos com libertação de radiação ionizante; pior resolução espacial do que a generalidade das técnicas morfológicas.<sup>1</sup>

A MN experimenta atualmente desenvolvimentos importantes na maioria das áreas da sua aplicação. Novas moléculas biológicas marcadas, novas técnicas de marcação celular; novos conceitos na deteção da radiação; melhorias na instrumentação; viabilização das técnicas multimodais, sistemas de imagem que reúnem informação anatómica e molecular numa técnica, por exemplo, PET-CT (**CT = Computed Tomographic**), **SPECT-CT**, **PET-MRI (MRI = Magnetic Resonance Imaging)**; rápido crescimento nas capacidades dos métodos computacionais e uma parceria muito mais bem compreendida com as disciplinas clínicas estão a criar um novo perfil na MN. Estes desenvolvimentos estão a ter um efeito fortemente positivo em termos de melhoria na qualidade do diagnóstico em muitas situações e, é esperado um decréscimo da exposição dos pacientes à radiação ionizante.<sup>1</sup>

A MN é, então, uma especialidade médica que recorre à utilização de fármacos sem ação farmacológica – radiofármacos – que incluem na sua composição um isótopo radioativo (radionuclídeo) de elementos metálicos ou não metálicos.<sup>2</sup>

Dependendo da natureza e da energia da radiação emitida, assim estes medicamentos radioativos são utilizados como agentes terapêuticos para o tratamento de determinado tipo de tumores ou como agentes de imagem para a visualização de órgãos, tecidos ou processos biológicos.<sup>1,2</sup>

### 1.1.1 Radiofármaco

O radiofármaco pode ser definido como um medicamento que contém um isótopo radioativo na sua composição, usado em Medicina Nuclear, adequado para a administração em humanos para fins de diagnóstico (aproximadamente 95%) e em terapia, e que não origina usualmente uma resposta fisiológica. Apresenta dois componentes básicos e distintos: o radionuclídeo que pode emitir fotões  $\gamma$  ou partículas  $\beta^+$ , para o diagnóstico, que são detetados no exterior do corpo, fornecendo, desta forma, as imagens dos órgãos ou tecidos dependendo da sua localização, ou emitir partículas  $\beta^-$ ,  $\alpha$ , ou eletrões de Auger, para a terapia, que poderão destruir as células tumorais; e o vetor químico, que permite a incorporação do radionuclídeo numa forma química adequada, levando, desta forma, à fixação preferencial no órgão ou sistema a estudar. A técnica PET recorre à administração de radiofármacos que contêm radionuclídeos emissores  $\beta^+$ . A obtenção de imagem baseia-se na deteção dos fotões  $\gamma$  de 511 keV, emitidos em direções opostas mas sentidos coincidentes, e que resultam da aniquilação entre o positrão ( $\beta^+$  - antipartícula do eletrão) e os

elétrões do meio (tecido). A técnica SPECT recorre à administração de radiofármacos emissores de radiação  $\gamma$ .<sup>2,3</sup>

Uma vez que os radiofármacos são administrados em seres humanos, os radiofármacos com utilidade em diagnóstico e em terapia devem apresentar características o mais próximo possível das características ideais no que diz respeito às propriedades do radionuclídeo (tempo de semi-vida efetiva, razão órgão alvo-fundo, toxicidade, disponibilidade e preço).<sup>2,3</sup>

A maior parte dos radiofármacos em utilização clínica são preparações injetáveis que deverão apresentar as seguintes características: ser estéreis, apirogênicos, isotônicos (NaCl a 0,9%) e apresentar um pH adequado.<sup>2,3</sup>

Os radionuclídeos que tornam possíveis as diferentes técnicas da MN não se encontram disponíveis na natureza, sendo necessário proceder à sua produção por meios artificiais, recorrendo a reações nucleares, tais como, a cisão nuclear, a ativação por neutrões e a irradiação com partículas carregadas. A cisão nuclear é um processo de produção geralmente desencadeado pela exposição dos nuclídeos a neutrões térmicos num reator nuclear, resultando em núcleos de número atómico menor, geralmente entre 30 a 65. Alguns dos nuclídeos assim formados podem ser separados dos outros fragmentos da cisão por processos químicos, sendo largamente utilizados em ciências biomédicas e, em particular, em MN. A cisão é o mecanismo utilizado, por exemplo, na produção do Molibdénio-99. O Molibdénio-99 é utilizado para a produção de geradores de Tecnécio-99m. No gerador, é colocado numa coluna de alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), ficando na forma de anião molibdato ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ). Pelo decaimento o Molibdénio-99 irá produzir o Tecnécio-99m.<sup>1</sup>

A ativação por captura de neutrões é também um processo de produção geralmente desencadeado num reator nuclear, fazendo uso do fluxo destas partículas aí gerado. Este processo é utilizado, por exemplo, na produção do Molibdénio-99 e Fósforo-34.<sup>1</sup>

A irradiação com partículas carregadas, levando à transmutação de nuclídeos, é o processo utilizado no ciclotrão. Um material alvo é irradiado por partículas leves aceleradas, nomeadamente prótões, deutérões, ou nalguns casos, partículas  $\alpha$ , que dão origem à reação nuclear.<sup>1</sup>

Embora o  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  seja, hoje em dia, o radioisótopo mais utilizado em Medicina Nuclear, um grande número de radioisótopos têm encontrado aplicação quer em diagnóstico ( $^{123}\text{I}$ ,  $^{201}\text{Tl}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{133}\text{Xe}$  e  $^{81\text{m}}\text{Kr}$ ) quer em terapia ( $^{131}\text{I}$ ).<sup>1</sup>

Os radionuclídeos utilizados para o diagnóstico são emissores de radiação  $\gamma$  ou partículas  $\beta^+$ . Os radionuclídeos emissores de radiação  $\gamma$  com características físicas mais adequadas para o diagnóstico em MN são o  $^{99m}\text{Tc}$  ( $t_{1/2}=6,02\text{h}$ ,  $E_{\gamma(\text{max})}=140\text{ keV}$ ), o  $^{123}\text{I}$  ( $t_{1/2}=13,20\text{h}$ ,  $E_{\gamma(\text{max})}=159\text{ keV}$ ),  $^{67}\text{Ga}$  ( $t_{1/2}=78,26\text{h}$ ,  $E_{\gamma(\text{max})}=296\text{ keV}$ ),  $^{201}\text{Tl}$  ( $t_{1/2}=72\text{h}$ ,  $E_{\gamma(\text{max})}=167\text{ keV}$ ) e o  $^{111}\text{In}$  ( $t_{1/2}=67,9\text{h}$ ,  $E_{\gamma(\text{max})}=245\text{ keV}$ ),  $^{15}\text{O}$  ( $t_{1/2}=2,03\text{ min}$ ,  $E_{\beta^+(\text{max})}=650\text{ keV}$ ),  $^{13}\text{N}$  ( $t_{1/2}=9,98\text{ min}$ ,  $E_{\beta^+(\text{max})}=432\text{ keV}$ ),  $^{11}\text{C}$  ( $t_{1/2}=20,4\text{ min}$ ,  $E_{\beta^+(\text{max})}=326\text{ keV}$ ) e o  $^{18}\text{F}$  ( $t_{1/2}=109,8\text{ min}$ ,  $E_{\beta^+(\text{max})}=202\text{ keV}$ ), sendo este último o mais utilizado nos diferentes procedimentos de diagnóstico.<sup>1</sup>

As características mais importantes de um radioisótopo a ser utilizado em imagens são: o período e modo de decaimento do radioisótopo, a energia de radiação emitida e o custo e facilidade de obtenção do radionuclídeo. O período de semi-desintegração de um radionuclídeo deve ser suficientemente longo de modo a permitir a produção do radiofármaco e obtenção da imagem, mas não tão longo que torne a sua dosimetria desfavorável para o doente. A energia deve ser adequada ao sistema de deteção a ser utilizado, no caso das câmaras utilizadas em SPECT os raios  $\gamma$  devem ter valores de energia entre 100 e 150 keV, enquanto na técnica PET, os raios  $\gamma$  detetados apresentam valores de energia de 511 keV. Devido às suas características, as técnicas de deteção, a resolução espacial e a sensibilidade da técnica PET (4-8 mm) são superiores às da técnica SPECT (7-10mm).<sup>1,2,3</sup>

### 1.1.2 $^{67}\text{Ga}$ – Radionuclídeo de diagnóstico

O Gálio (do latim, Gallia) foi descoberto em 1875 por Lecop de Boisbaudran, químico francês, através do seu espectro característico, ao examinar uma blenda de zinco (mineral composto por sulfureto de zinco, ZnS) originária dos pirinéus. No mesmo ano foi isolado pelo próprio Lecop Boisbaudran através do processo de eletrólise do hidróxido numa solução de hidróxido de potássio (KOH), atribuindo ao novo elemento o nome do seu país natal: *Gallia*.<sup>2,3,4,5</sup>

O gálio é um metal do grupo IIIB da tabela periódica e em condições fisiológicas existe apenas no estado de oxidação +3. Este fato é determinante no que respeita à síntese de radiofármacos. Tal como o boro, o alumínio e o índio, este metal é classificado como «ácido duro» estabelecendo ligações preferenciais com bases de Lewis iónicas e não polarizáveis tais como átomos de azoto e oxigénio (grupos carboxilato, fosfonato, fenolato e amino). A química de coordenação do Ga(III) é muito semelhante à do Fe(III) o que, como veremos, tem importantes implicações no que

respeita à sua utilização na preparação de radiofármacos. Em solução aquosa os cátions hidratados Ga(III) são apenas estáveis em condições ácidas, ocorrendo hidrólise, por elevação do pH, com formação dos hidróxidos insolúveis Ga(OH)<sub>3</sub>.<sup>1</sup>

A química de coordenação do gálio tem merecido grande interesse, sobretudo devido à utilização potencial de isótopos radioativos de gálio em radiofármacos.<sup>1</sup>

Existem três radionuclídeos de gálio (<sup>66</sup>Ga, <sup>67</sup>Ga, <sup>68</sup>Ga) com características físicas apropriadas à sua utilização em SPECT ou em PET.<sup>1</sup>

O <sup>66</sup>Ga ( $t_{1/2}=9,45$  h), emissor de positrões de elevada energia (4,1 MeV) é produzido em ciclotrão a partir da reação <sup>66</sup>Zn(p,2n)<sup>66</sup>Ga. Existem muito poucos exemplos da utilização deste radioisótopo. O dotatoc, análogo do otreótido conjugado com o dota, foi marcado com este radionuclídeo, tendo sido aplicado no estudo dos recetores do subtipo II da somatostatina e no estudo dos recetores de estrogénio no cancro da mama.<sup>1,6</sup>

O <sup>67</sup>Ga ( $t_{1/2}=78,1$ h) é utilizado em SPECT, sendo produzido num ciclotrão a partir do <sup>68</sup>Zn enriquecido através da reação <sup>68</sup>Zn(p,2n)<sup>67</sup>Ga. A análise dos esquemas de decaimento para o <sup>67</sup>Ga indicam as energias dos fótons gama e a abundância: <sup>67</sup>Ga, 93keV (40%), 184keV (24%), 296keV (22%), e 388keV (7%).<sup>1</sup>

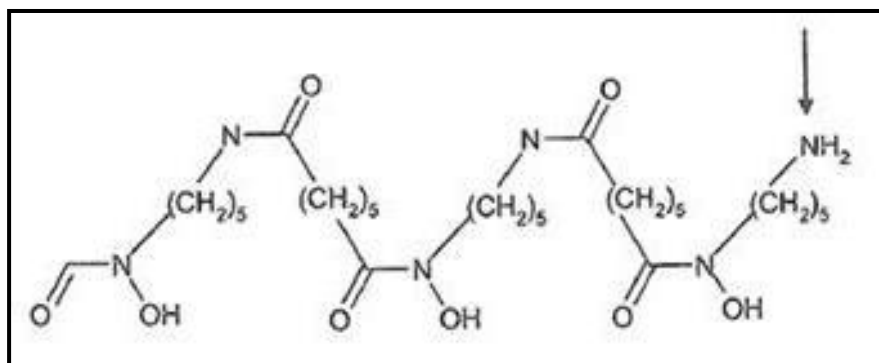
O <sup>68</sup>Ga ( $t_{1/2}=68$  minutos), emissor de positrões, é produzido num gerador <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga e decai em 89% por emissão de positrões. A energia máxima do positrão é 1,899 keV (a energia média por desintegração é 740 keV). O longo período do <sup>68</sup>Ge ( $t_{1/2}=280$  dias) permitindo a obtenção do <sup>68</sup>Ga *in situ*, sem necessidade de se recorrer a um ciclotrão exige, por outro lado, um eficiente método de separação do <sup>68</sup>Ge do <sup>68</sup>Ga.<sup>1</sup>

Para poderem ser utilizados como radiofármacos, os radionuclídeos de gálio devem ser estabilizados com ligandos que levem à formação de complexos termodinamicamente estáveis em relação à hidrólise a pH fisiológico e cineticamente inertes na escala temporal dos procedimentos necessários em Medicina Nuclear.<sup>1</sup>

### 1.1.3 Ligandos para o gálio

De acordo com as suas características estruturais podem dividir-se os ligandos utilizados para coordenar os iões Ga<sup>3+</sup> em dois grandes grupos: os ligandos de cadeia linear e os ligandos macrocíclicos. Muitos ligandos pertencentes a ambas as classes possuem, para além dos locais de ligação ao metal, grupos funcionais (-NH<sub>2</sub> ou -COOH) que lhes permitem a ligação a uma macromolécula. A desferrioxamina\_B

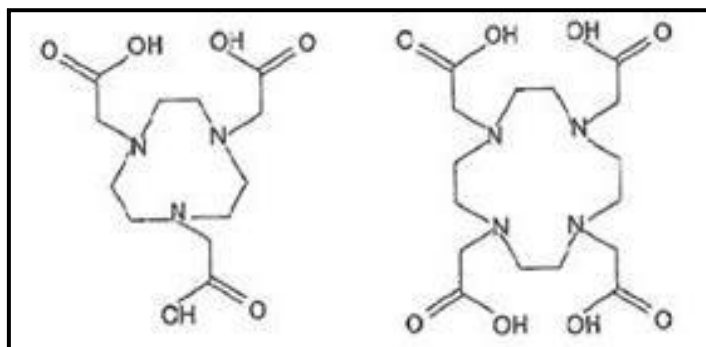
(DFO) – como se pode observar na Figura 1.1, é um exemplo de um ligando de cadeia linear que tem sido utilizada como ligando bifuncional por apresentar elevado rendimento de marcação com o  $^{67}\text{Ga}^{3+}$ . O quelato apresenta um grupo  $-\text{NH}_2$  disponível para acoplar biomoléculas.<sup>1</sup>



**Figura 1.1:** Estrutura com indicação do local de ligação dos grupos substituintes do DFO:  $\text{NH}_2$ .<sup>1</sup>

Devido à estrutura química pré-organizada dos ligandos macrocíclicos, eles são considerados os mais adequados para estabilizar o  $^{67}\text{Ga}$ . Estes ligandos são, por definição, ligandos polidentados cíclicos contendo átomos doadores incorporados no anel e que geralmente contêm grupos substituintes ligados ao esqueleto do anel. As principais características que diferenciam os macrociclos dos seus análogos lineares são a elevada estabilidade dos complexos formados, a especificidade e seletividade em relação aos catiões a coordenar. A maior desvantagem deste tipo de ligandos é a lenta cinética de formação dos complexos que é, no entanto, compensada pela igualmente lenta cinética de dissociação dos mesmos. Ao encapsularem o ião metálico, protegem-no eficazmente de ligandos competidores, nomeadamente, no caso do gálio, da transferrina (proteína plasmática transportadora de ferro), e que é o principal competidor para o  $\text{Ga}^{3+}$  na corrente sanguínea. Com efeito o gálio e o ferro partilham uma química muito semelhante: carga, raio iónico (62 pm para o  $\text{Ga}^{3+}$  e 65 pm para o  $\text{Fe}^{3+}$ ) e preferência pelo número de coordenação 6. A transferrina possui dois locais de ligação ao ferro que têm elevada afinidade para o  $\text{Ga}^{3+}$  e esta proteína existe em concentrações elevadas no plasma,  $2,5 \times 10^{-3}$  M. As constantes de ligação do gálio à transferrina são respetivamente,  $\log K(\text{Ga-tf}) = 20,3$ . Assim, quando se injeta  $^{67}\text{Ga}^{3+}$  na forma de citrato de gálio ou de outro complexo pouco estável, mais de 90% deste metal é complexado pela transferrina.<sup>1</sup>

O ligando 1,4,7-triazaciclononano-N,N',N''-triacetato (nota) e o 1,4,7,10-tetraazaciclododecano,N,N',N'',N'''-tetraacetato (dota), como se pode visualizar na Figura 1.2, são ligandos macrocíclicos que têm sido utilizados como ligandos bifuncionais para complexar o  $^{67}\text{Ga}$ , uma vez que formam quelatos de elevada estabilidade. Essa elevada estabilidade deriva do excelente «encaixe» do pequeno íon metálico (raio iônico 0.76 Å) na cavidade do ligando<sup>1</sup>.



**Figura 1.2:** Estrutura dos macrociclos nota (1,4,7-triazaciclononano-N,N',N''-triacetato) (esquerda) e dota (1,4,7,10-tetraazaciclododecano, N,N',N'',N'''-tetraacetato) (direita).<sup>1</sup>

### 1.1.3.1 Ligando bifuncional – dota

O dota é um ligando tetraamina cíclico que apresenta elevada estabilidade termodinâmica e uma elevada inércia cinética de descomplexação, características fundamentais para qualquer aplicação in vivo. Devido à elevada estabilidade dos seus complexos com muitos íões M (2+) e M (3+) este agente quelante tem sido o mais utilizado para a derivatização e radiomarcagem de moléculas bioativas, sendo considerado um ligando universal utilizado para a marcação com radiometais de íões trivalentes, como os radiolantanídeos e também o  $^{67}\text{Ga}$ . Para a marcação de biomoléculas o ligando dota é derivatizado a partir das aminas da cadeia cíclica ou a partir da cadeia carbonada, sendo designado assim por ligando bifuncional, uma vez que fica com capacidade de estabilizar o centro metálico e de simultaneamente se ligar covalentemente à biomolécula.<sup>1,7</sup>

### 1.1.4 Radiofármacos de gálio-67

O  $^{67}\text{Ga}$ , na forma de citrato de gálio, foi durante muitos anos utilizado na deteção de processos inflamatórios, mas caiu em desuso com o desenvolvimento de métodos de marcação de leucócitos com o  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO ou com o  $^{111}\text{In}$ -oxina.<sup>1</sup>

No entanto, continua ainda a ser utilizado no diagnóstico de alguns processos inflamatórios crónicos, nomeadamente na sarcoidose e em pacientes em que os níveis de glóbulos brancos estão de algum modo comprometidos como é o caso dos portadores de SIDA. Em oncologia utiliza-se o  $^{67}\text{Ga}$  no diagnóstico e estadiamento de alguns tumores dos tecidos moles, nomeadamente nalguns tipos de linfoma. Embora se saiba que 90% do gálio injetado na corrente sanguínea na forma de citrato de gálio é captado pela transferrina, desconhece-se ainda hoje qual o mecanismo de incorporação do gálio na célula tumoral. Tem sido posta a hipótese de ser devida à captação do complexo  $^{67}\text{Ga}$ -transferrina pelos recetores de transferrina de células tumorais, mas poderão existir (ou coexistir) outros mecanismos.<sup>1</sup>

O radionuclídeo  $^{67}\text{Ga}$ , por apresentar um tempo de semi-vida elevado e por ser utilizado para SPECT, tem sido um dos radionuclídeos “chave” nos projetos de desenvolvimento de radiofármacos para a deteção do Gânglio Sentinela (GS).

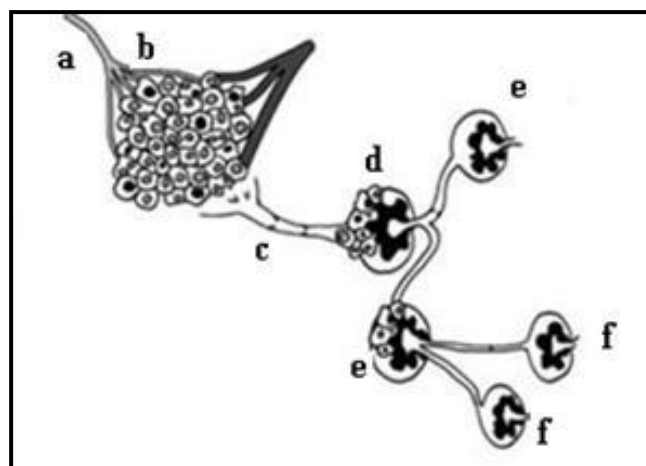
## 1.2 Algumas considerações sobre o Gânglio Sentinela (GS)

O sistema linfático forma um sistema de circulação de líquido pelo corpo humano, neste caso de linfa, sendo constituído por uma vasta rede de órgãos linfoides, linfonodos, dutos linfáticos, tecidos linfáticos, capilares linfáticos e vasos linfáticos. É responsável pela manutenção do equilíbrio hídrico nos tecidos; pela absorção de ácidos gordos e subsequente transporte da gordura para o sistema circulatório; pela produção de células imunes, como os linfócitos, monócitos e células produtoras de anticorpos conhecidas como plasmócitos; pela proteção contra os microrganismos e substâncias estranhas e pela drenagem do excesso de fluido intersticial dos espaços extra-celulares que, ao passar para o interior deste sistema, se designa por linfa. A linfa flui através dos vasos linfáticos até aos gânglios linfáticos, onde o seu movimento é unidirecional, sendo posteriormente devolvida à circulação sanguínea.<sup>8,9</sup>

O sistema linfático fornece trajetórias para a propagação (metástases) das células tumorais de uma parte do corpo para a outra. As patologias dos nódulos linfáticos são demonstradas pela diminuição ou mesmo ausência do fluxo da linfa.<sup>8,9</sup>

Os gânglios linfáticos, pequenas estruturas de aproximadamente 1cm de diâmetro, são responsáveis pela filtração da linfa, removendo moléculas, microorganismos e células estranhas para que não atinjam a corrente sanguínea. Estas estruturas participam ainda ativamente na iniciação e resposta imunitária do organismo, encontrando-se no seu interior linfócitos B, linfócitos T e macrófagos. Apesar de se aglomerarem principalmente em grandes grupos na região cervical, axilar, torácica, abdominal e pélvica, os gânglios linfáticos encontram-se também distribuídos em menor número por todo o organismo. Assim, cada gânglio recebe linfa de uma determinada região específica do corpo.<sup>8,10</sup>

Cabanas, em 1977, propôs o envolvimento do sistema linfático na disseminação sequencial do tumor primário durante os seus estudos nos pacientes com carcinoma no pênis. Descobriu que um gânglio linfático específico na virilha, que se manteve constante na sua localização e que, conseqüentemente denominado como “gânglio sentinela”, era a área de drenagem preferencial do carcinoma das células escamosas do pênis. Durante a sua pesquisa percebeu que o GS era a primeira posição da localização das células tumorais através dos vasos linfáticos antes da sua passagem para outros gânglios de via de drenagem linfática. Assim, deduziu que o status do sistema linfático inteiro poderia ser previsto pela identificação, dissecação cirúrgica e subsequente exame histopatológico do GS. Assim, a ocorrência de doença metastática no GS pode ser usada como um possível indicador de propagação da doença noutros gânglios da região, e, portanto, a dissecação dos gânglios linfáticos regionais pode ser recomendada. Da mesma forma, a ausência de doença no GS pouparia os pacientes do trauma da dissecação de outros gânglios da região particular. Desde então, o GS, termo postulado por Gould et al. em 1960, foi considerado como o gânglio linfático que apresenta maior probabilidade de disseminação linfática, ou seja, o primeiro gânglio linfático que recebe drenagem linfática do tumor primário, sendo a sua detecção importante para o estadiamento do tumor e da terapêutica a adotar (Figura 1.3).<sup>10,11,12,13,14,15</sup>



**Figura 1.3:** Concetualização esquemática do gânglio sentinela: **a** – artéria, **b** – veia, **c** – canal linfático, **d** – gânglio sentinela, **e** – segundo gânglio linfático, **f** – terceiro gânglio linfático.<sup>14</sup>

### 1.2.1 Técnicas utilizadas para a detecção do GS

A visualização da drenagem linfática começou no final do século XVIII, quando Sappey et al. tentaram a realização de imagens do sistema linfático complexo da mama usando injeções de mercúrio. Foi mais tarde descrito por Haagensen et al. no “The Lymphatics in Cancer”, onde descreveu os estudos anatómicos usando injeções de vários fluidos marcados. Dos vários estudos realizados, a melhor visualização do local exato e o número de nódulos sentinela foi conseguido através da linfocintigrafia.<sup>12</sup>

A linfocintigrafia é uma técnica de imagiologia nuclear que envolve o uso de radionuclídeos para a obtenção de informação morfológica e funcional da drenagem linfática. Tem sido utilizada para o mapeamento do GS de vários tumores, auxiliando, então, na adaptação do campo cirúrgico e na determinação do local cirúrgico. Esta técnica envolve uma injeção de macromoléculas radiomarcadas quer no local anatómico mais distal da origem dos vasos linfáticos quer no local “doente”. As características e as propriedades dos agentes utilizados são os fatores principais que regulam a eficiência desta técnica. A integridade dos nódulos, permeabilidade dos canais linfáticos, juntamente com outros fatores biológicos como a supressão da atividade fagocítica do macrófago que afeta a integridade do nódulo em causa, a propulsão da linfa, a cirurgia recente ou a radiação na área da drenagem linfática conduz a adequada localização dos gânglios linfáticos regionais.<sup>12,13,16,17,18</sup>

Nos casos de detecção do GS por esta técnica, é prática clínica comum a abordagem cirúrgica, com confirmação e remoção dos gânglios linfáticos auxiliares (**Auxilliary Lymph Node Dissection – ALND**). Esta abordagem é considerada invasiva

e apresenta uma grande morbidade associada devido ao elevado número de gânglios removidos cirurgicamente. Em alternativa, surgiu recentemente a biópsia radioguiada ao GS (**Sentinel Lymph Node Biopsy – SLNB**). É uma técnica mais precisa e menos invasiva, uma vez que tem por objetivo a deteção e remoção apenas do GS através da sua prévia localização anatómica, recorrendo à administração local de um composto radioativo que se acumula no GS. A deteção do local de maior radioatividade é efetuada com uma sonda gama, à superfície e no interior do paciente, para identificar o gânglio a remover (Figura 1.4).<sup>18,19,20,21,22,23,24</sup>

A localização e a biópsia do GS representam um dos mais recentes desenvolvimentos na cirurgia. Encontram-se bem estabelecidas para identificar e examinar cuidadosamente apenas os gânglios que recebem drenagem diretamente do local primário. A dissecação completa do GS pode, agora, ser restrita aos pacientes com doença metastática demonstrada pelo GS, “poupando” os pacientes da cirurgia e dos riscos e complicações inerentes, o que lhes oferece uma melhor qualidade de vida.<sup>25</sup>



**Figura 1.4:** Biópsia radioguiada ao GS.<sup>26</sup>

#### 1.2.1.1 Corantes orgânicos usados como co-adjuvantes na deteção do GS

A administração de um corante orgânico como co-adjuvante permite aumentar a sensibilidade do método de deteção do GS (**SLNB**) com base na visualização do corante no gânglio que já contém o radiofármaco.<sup>15,21,27,28,29</sup>

Cada agente apresenta as suas vantagens e desvantagens para a localização do GS. O radiofármaco é útil para revelar a localização geral, no corpo, para a

iniciação da incisão cirúrgica e para identificação definitiva do GS, guiada pela sonda, durante a cirurgia. O uso do corante azul permite a visualização do GS, durante a cirurgia, o que facilita o desempenho da mesma. Uma desvantagem significativa do corante azul é que deve ser injetado imediatamente antes da cirurgia, uma vez que se move rapidamente para os vasos linfáticos e é pouco retido pelo GS. Tal fato constitui uma enorme desvantagem quando se usa apenas o corante azul: um gânglio linfático secundário pode ser identificado erroneamente como um GS, devido à passagem rápida de todo o corante através do GS.<sup>12,30,31,32</sup>

Atualmente, a detecção dual do GS, recorrendo ao corante azul e ao radiofármaco é considerado o método de referência, pois, não só melhora a taxa de detecção (estimada em 95%) como também reduz o risco de resultados falsos negativos, reduz a recidiva axilar em casos em que a dissecação axilar não é realizada porque o GS não é metastático e reduz o número de injeções durante o procedimento da biópsia radioguiada ao GS, reduzindo assim a dose de radiação a que o paciente está sujeito. No entanto, este método pode ser inadequado para o mapeamento do GS no cancro das pequenas células do pulmão: o uso dos corantes azuis é limitado *in vivo* pela pobre visibilidade, particularmente na presença de nódulos no mediastino, diminuindo assim a razão sinal-fundo que permite a detecção nodal.<sup>33,34,35</sup>

## 1.2.2 Radiofármacos usados na detecção do GS

### 1.2.2.1 Propriedades dos radiofármacos

Os radiofármacos utilizados na detecção do GS são administrados localmente a diferentes profundidades (à superfície: via intra-venosa; em profundidade: espaço intersticial/vaso linfático), uma vez que a farmacocinética *in vivo* da maior parte dos compostos é à partida desconhecida.<sup>20</sup>

Genericamente, um radiofármaco para a detecção do GS deverá preencher certos requisitos, entre os quais se destaca: ser estável *in vivo*, apresentar rápida depuração do local de injeção, reduzida taxa de migração, elevada acumulação no GS, partículas de pequeno diâmetro e elevada afinidade para o recetor.<sup>20</sup>

Desta forma, estes compostos radioativos deverão ter partículas de dimensões uniformes, compreendidas entre os 5 nm e os 100 nm. As partículas inferiores a 5 nm são rapidamente absorvidas pelos capilares sanguíneos, e conseqüentemente, não

atingem o sistema linfático, enquanto as partículas de dimensões superiores a 100 nm apresentam dificuldade em migrar através dos canais linfáticos até ao gânglio.<sup>20,36,37</sup>

Foi descrito num estudo preliminar realizado por Cremonesi et al. que a administração de partículas coloidais com dimensões entre os 200 nm e 1000 nm proporcionou uma melhor e mais fácil localização do GS no cancro da mama, relativamente a partículas de menores dimensões, levando a um melhor compromisso entre a rápida drenagem linfática e a retenção satisfatória no GS. No entanto, os compostos com tais características não se encontram disponíveis para exames clínicos de rotina.<sup>19</sup>

### 1.2.2.2 Radiofármacos em uso clínico

As preparações radiofarmacêuticas foram desenvolvidas logo após a Segunda Guerra Mundial. Em 1955, Hultborn et al. relataram o uso clínico de coloides de <sup>198</sup>Au para a linfocintigrafia. As suas partículas apresentavam dimensões relativamente uniformes, entre os 5-30 nm. No entanto, estes radiofármacos apresentavam duas problemáticas: fraca resolução espacial devido à intensidade dos fotões gama (412 keV) e elevada dose de radiação (600 mGy/MBq) no local de injeção, observando-se por vezes necrose dos tecidos.<sup>12,38</sup>

Com novas investigações, o <sup>99m</sup>Tc foi introduzido como um substituto ao <sup>198</sup>Au, uma vez, que apresenta disponibilidade, é barato e leva a imagens ideais com características de dosimetria ideais quando comparado com o anterior. Foram, também desenvolvidos radiofármacos, com outros radionuclídeos, para o uso em linfocintigrafia, como por exemplo, citrato de <sup>67</sup>Ga, <sup>197</sup>Hg ou anticorpos monoclonais marcados com o <sup>111</sup>In, <sup>131</sup>I e <sup>125</sup>I.<sup>12,27,38</sup>

A nanotecnologia foi um dos progressos tecnológicos, que proporcionou um grande impulso à imagem do GS. O seu desenvolvimento contribuiu, significativamente, para a localização do GS em vários tipos de cancro. As nanopartículas podem, eventualmente, levar à deteção do GS, visualização e identificação da sua localização no corpo (imagens *in vivo* em tempo real), podendo levar à completa eliminação das células cancerígenas identificadas pela localização precisa do GS.<sup>12</sup>

Os colóides de trissulfureto de antimónio foram as primeiras nanopartículas a serem marcadas com o <sup>99m</sup>Tc (<sup>99m</sup>Tc-ATC), apresentando dimensões que variam entre os 3 nm e os 30 nm. Estes coloides revelaram utilidade na deteção do GS, tendo identificado 94% dos gânglios que continham metástases. No entanto, estas

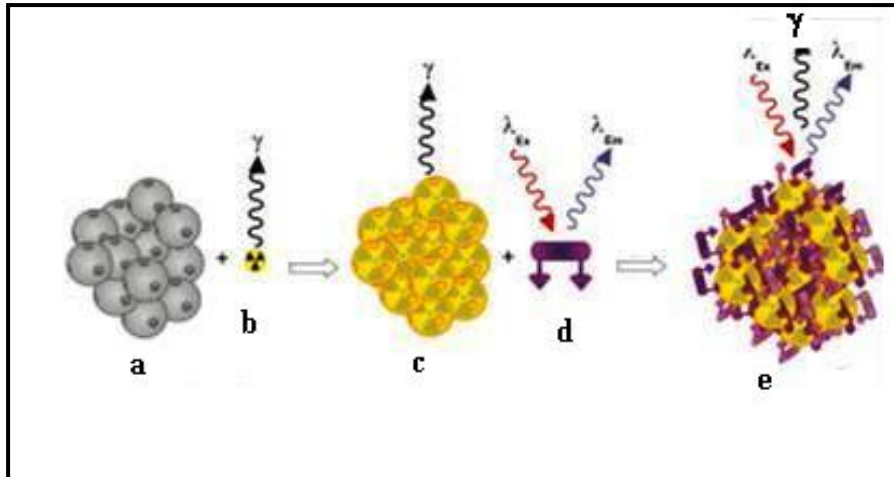
nanopartículas não se encontram disponíveis, comercialmente, na Europa. Além disso, observaram-se diversas reações adversas, associadas à formação de colóides de  $^{99m}\text{Tc}$  e à elevada toxicidade do antimónio.<sup>27,38</sup>

Os colóides de enxofre marcados com  $^{99m}\text{Tc}$  ( $^{99m}\text{Tc-SC}$ ) são, atualmente, os agentes mais empregues, na prática comum, na localização do GS. Apresentam dimensões que variam entre os 100 e os 5000 nm, sendo o tamanho das partículas determinado pela técnica de preparação e pelo processo de marcação. As suas principais desvantagens relacionam-se com a fraca especificidade e depuração lenta do local de administração, podendo levar à discriminação de gânglios linfáticos próximos do local de injeção.<sup>24,38</sup>

As partículas de albumina de soro humana marcadas com  $^{99m}\text{Tc}$  ( $^{99m}\text{Tc-HSA}$ ) são outro dos agentes muito utilizados na prática clínica para a deteção do GS, em especial pela Europa. Apresentam um diâmetro que varia entre 6 a 8 nm. No entanto, a sua imagem apresenta uma limitação uma vez que esta molécula não é reconhecida pelo sistema linfático e não se acumula nos nódulos linfáticos, atravessa o conjunto de canais linfáticos até ao sistema de circulação, um fato que dificulta a identificação do GS.<sup>39,40</sup>

Com o intuito de avaliar as abordagens de imagem pré e intra-operatórias do GS, T. Buckle et al. fizeram um estudo, com recurso a modelos murinos com cancro da mama metastático, em que compararam o procedimento pré-operatório usando o  $^{99m}\text{Tc-Nanocoll}$  (Agregados de albumina humana marcados com o  $^{99m}\text{Tc}$ ) baseado em procedimentos intra-operatórios com a indocianina verde (ICG). Além disso, demonstraram a utilidade do agente de imagem multimodal supramolecular, a ICG incorporado no  $^{99m}\text{Tc-nanocolóides}$  de albumina para a imagem pré e intra-operatória combinada do GS, como se pode verificar na Figura 1.5.<sup>41</sup>

Após a conclusão deste estudo, T. Buckle et al. verificaram que o  $^{99m}\text{Tc-Nanocoll}$  apresentava um elevado sinal de especificidade relativamente à baixa razão sinal-fundo encontrada para a ICG. Por outro lado, a deteção radioativa e fluorescente do complexo ICG- $^{99m}\text{Tc-Nanocoll}$  retratou com precisão as características idênticas na situação pré e intra-operatória, respetivamente. Isto pode aumentar significativamente a viabilidade da imagem intra-operatória do GS via fluorescência.<sup>41</sup>



**Figura 1.5:** Representação esquemática do colóide de albumina radiomarcado com  $^{99m}\text{Tc}$  (nanocoll) e marcação fluorescente com ICG: **a** – Nanocoll (agregados de albumina serosa humana); **b** –  $^{99m}\text{Tc}$ , **c** –  $^{99m}\text{Tc}$ -Nanocoll; **d** – ICG; **e** – Complexo multimodal (ICG- $^{99m}\text{Tc}$ -Nanocoll).<sup>41</sup>

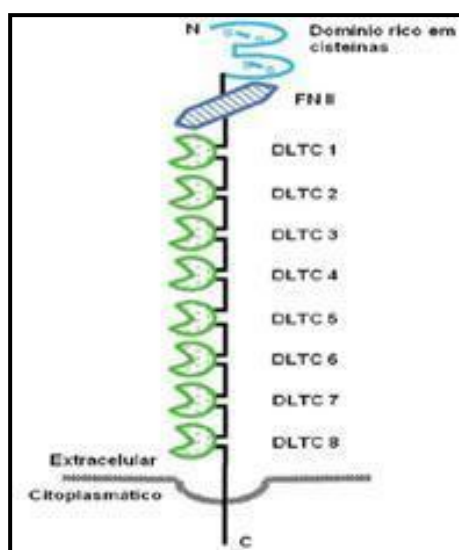
Um outro estudo foi realizado por A. Leeuwen et al., com o objetivo de melhorar a precisão da detecção intra-operatória do GS no cancro da próstata. Para tal, fizeram uso de um modelo de murinos com adenocarcinoma transgênico da próstata (**Transgenic Adenocarcinoma of mouse prostate - TRAMP**) que foram submetidos a injeções intratumorais de: um cocktail de corante Patent Blue (Pb) ICG; um cocktail de radiocolóides de albumina ( $^{99m}\text{Tc}$ -Nanocoll), Pb e ICG ou um cocktail de albumina radiomarcada ( $^{99m}\text{Tc}$ -Vasculosis), Pb e ICG. Neste estudo chegaram à conclusão que a imagem do gânglio linfático com um cocktail de Pb, ICG e  $^{99m}\text{Tc}$ -Nanocoll levou à obtenção de informação visual adicional sobre a precisão da injeção (Pb), e fornece a possibilidade de orientação de fluorescência ótica durante o procedimento cirúrgico (ICG).<sup>34</sup>

O. Brouwer et al. realizaram um estudo comparativo entre o padrão de drenagem linfocintigráfico do traçador híbrido ICG- $^{99m}\text{Tc}$ -nanocolóides e o padrão de drenagem do  $^{99m}\text{Tc}$ -nanocolóides. Para atingirem o seu objetivo realizaram o procedimento para cada um dos radiofármacos após a injeção dos mesmos com intervalo de tempo estipulado entre as injeções em 22 pacientes. Ambos os radiofármacos demonstraram resultados idênticos e ausência de efeitos adversos. Além disso, a introdução do ICG no radiofármaco  $^{99m}\text{Tc}$ -nanocolóides trouxe uma mais valia ao procedimento do GS.<sup>31</sup>

## 1.2.3 Novos radiofármacos para a detecção do GS

### 1.2.3.1 Conceitos gerais

Vários esforços têm sido realizados no sentido do desenvolvimento de novos radiofármacos com maior especificidade para a detecção do GS. Uma das estratégias que tem sido utilizada incide na presença de unidades de manose nos radiofármacos. Os recetores da manose são recetores transmembranares de 175 kDa, que se encontram expressos à superfície dos macrófagos presentes no sistema linfático, nomeadamente nos gânglios; nas células dendríticas; nas células do endotélio linfático e hepático; no baço e nas células mesangiais dos rins. São constituídos por uma região extracelular rica em cisteína, duas unidades contendo fibronetina, um domínio transmembranar que permite a ligação às células e ainda múltiplos domínios de letina do tipo C que permitem o reconhecimento de glícidos. A sua estrutura primária é composta por 11 domínios, como se pode visualizar na Figura 1.6.<sup>15,28,42,43,44,40,45</sup>



**Figura 1.6:** Diagrama da estrutura de domínios no recetor de manose. FNII: domínio do tipo fibronetina II, DLTC: domínio de letina tipo-C, C: domínio citoplasmático.<sup>42</sup>

Estes recetores são considerados recetores endocíticos, uma vez que, em estado estacionário somente 10% a 30% destes encontram-se na superfície celular. Podem ligar-se a substâncias tanto exógenas como endógenas. Por esta razão, os recetores de manose desempenham um papel importante nos processos tanto homeostáticos como imunológicos. Existem evidências da inclusão destes recetores

no desencadeamento e apresentação dos antígenos, na fagocitose e endocitose, nas cadeias de sinalizações intracelulares e na migração celular.<sup>41,42,43</sup>

F. Ichihara et al. realizaram um estudo com o objetivo de demonstrar que a migração dos linfócitos nos gânglios linfáticos através dos vasos linfáticos aferentes é reduzida nos murinos deficientes nos receptores de manose dos macrófagos (MR), enquanto a estrutura da vasculatura linfática permanece normal nestes animais.<sup>44</sup>

Este estudo demonstrou a importância dos receptores de manose nos macrófagos no “tráfego” de diferentes subpopulações de linfócitos da periferia através dos vasos linfáticos aferentes nos gânglios linfáticos. Além disso, os resultados sugeriram que as células tumorais não podem, eficientemente, metastizar para os gânglios linfáticos na ausência de MR nas vasos linfáticos aferentes e, conseqüentemente, os tumores atingem tamanhos maiores no local primário de injeção. Este estudo favorece a ideia de que os MR podem servir como moléculas de adesão durante a migração celular para os gânglios linfáticos.<sup>44</sup>

O desenvolvimento de radiofármacos com elevada densidade de unidades de manose conferem especificidade para os macrófagos, podendo identificar-se indiretamente o GS, uma vez que as moléculas estranhas provenientes do tumor primário são reconhecidas no gânglio em que a linfa é filtrada desencadeando a proliferação dos macrófagos.<sup>45</sup>

Foram desenvolvidos dois compostos de albumina com a manose até à data atual. Um deles foi sintetizado por Jeong et al., que conjugaram várias unidades de manose aos grupos amina livre da albumina do soro humana (mannosyl neoglycoalbumin – NMA). Posteriormente reduziram os grupos dissulfureto da proteína para permitir a coordenação do <sup>99m</sup>Tc aos átomos de enxofre livres resultantes, obtendo-se o <sup>99m</sup>Tc-NMA.<sup>37</sup>

O outro composto foi desenvolvido por Takagi et al., que conjugaram várias unidades de manose à albumina e funcionalizaram a molécula resultante com o ácido hidrazino nicotínico (HYNIC-NMA), marcando-a com o <sup>99m</sup>Tc, resultando no <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-NMA, com elevada estabilidade e especificidade para estudos *in vivo*.<sup>43</sup>

Com base em estudos comparativos de biodistribuição, verificaram que o <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-NMA apresentou um maior tempo de acumulação no GS relativamente ao composto <sup>99m</sup>Tc-NMA, que era rapidamente internalizado pelos macrófagos e metabolizado. No entanto, a utilização deste tipo de compostos é considerada problemática devido aos potenciais riscos associados ao uso da albumina de soro humana.<sup>43</sup>

Um outro estudo foi realizado por S. Leong et al. com o objetivo de determinar a segurança e a eficácia do  $^{99m}\text{Tc}$ -tilmanocept, macromolécula sintética que consiste em múltiplas unidades de manose e no ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA), que se acumula no tecido linfático pela ligação aos recetores da manose residentes na superfície das células reticuloendoteliais residentes no sistema linfático, no mapeamento linfático em pacientes com cancro da mama primário e melanoma cutâneo.<sup>47</sup>

Este radiofármaco mostrou identificar com precisão os tumores com drenagem nos nódulos linfáticos nos pacientes com melanoma e cancro da mama (especificidade de 100%). A avaliação estatística do seu desempenho excedeu as avaliações estabelecidas para ambos os tumores. Além disso, os números de desempenho, mesmo para padrões atuais que assumem que a prática da biópsia do SLN é melhorada, atendeu ou mesmo excedeu o nível de padrão cirúrgico.<sup>47</sup>

Foi desenvolvido outro radiofármaco, por J.Choin et al, que conjugaram o agente quelante bifuncional, 2-(*p*-inotiocianatobenzil)-1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-ácido triacético (SCN-nota) à albumina do soro humana com unidades de manose (MAS) e a sua marcação com  $^{68}\text{Ga}$ , tendo-se obtido o  $^{68}\text{Ga}$ -nota-MAS.<sup>40</sup>

Este radiofármaco foi considerado promissor, pois demonstrou ser estável, mostrou elevada captação no Sistema Reticuloendotelial (RES) que contém tecidos como o fígado, baço, fémur, tendo rapidamente migrado para os nódulos linfáticos.<sup>45</sup> Neste sentido, têm sido realizadas investigações para o desenvolvimento de novas partículas radioativas com base em polímeros naturais, como o dextrano, ou sintéticos, como o polietinoglicol (PEG) ou a metacrilamida (HMPA).<sup>48,49</sup>

### 1.2.3.2 Dextrano

O dextrano é um polímero natural composto por unidades lineares  $\alpha$ -1,6-D-glucopiranosose com baixa percentagem de cadeias laterais ligadas. Este polímero pode ser obtido pelo processo de síntese por fermentação natural, através da ação da enzima dextransucrase, da bactéria *Leuconostoc mesenteroides*, na presença de sacarose e por via sintética, por exemplo, através da reação de polimerização da 2,3,4-tri-O-benzil- $\beta$ -D-glucopiranosose catalisada pelo pentafluoreto de fósforo a pressão reduzida e conseqüente clivagem dos grupos éster através de redução de Birch.<sup>49,50</sup>

O dextrano é facilmente solúvel (em dimetilsulfóxido – DMSO, formamida, etilenoglicol, glicerina e água), biodegradável, não tóxico e pode ser obtido numa

variedade de pesos moleculares (1000-2.000.000 Da) por hidrólise enzimática. Este polissacarídeo é usado como reagente importante na ampla gama de síntese nas indústrias biotecnológicas e tecnológicas. A solução de dextrano para a injeção é geralmente usada na prática clínica para a substituição da perda de sangue, substituição do plasma em hipotensão ou choque, profilaxia ou tromboembolismo, expansão do volume.<sup>48,49,50,51</sup>

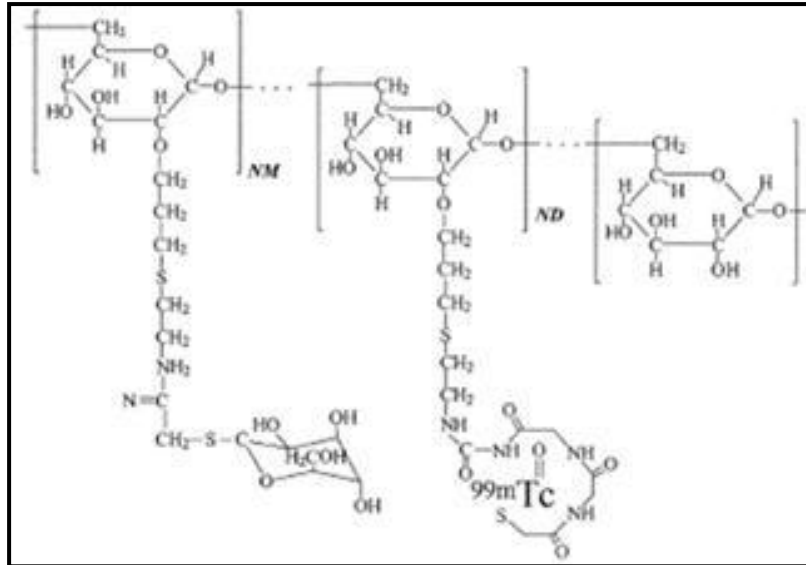
O uso do dextrano tem ainda como vantagem o fato de poder ser utilizado como veículo multifuncional para terapia ou diagnóstico, uma vez que permite acoplar na mesma cadeia fármacos, complexos metálicos, corantes orgânicos, biomoléculas, etc. Vários estudos têm demonstrado que o uso do conjugado dextrano-manose revelou ser promissor sob o ponto de vista clínico para a detecção do GS.<sup>49,51</sup>

### 1.2.3.3 Conjugados <sup>99m</sup>Tc-Dextrano-Manose

Para ultrapassar a depuração lenta de muitos radiofármacos, em uso clínico para a linfocintigrafia, Henze et al. (1982) e Ercan et al. (1985) usaram dextrano de diferentes pesos moleculares (70 000, 90 000 e 500 000 g/mol) marcado diretamente com o <sup>99m</sup>Tc.<sup>51</sup>

No entanto, o composto radioativo <sup>99m</sup>Tc-dextrano nunca foi utilizado na prática clínica, devido à sua baixa estabilidade *in vivo*. De forma a ultrapassar este inconveniente, Matsunaga et al. realizaram um estudo, funcionalizando dextranos de diferentes pesos moleculares (60 000 e 90 000 g/mol) com a unidade de cisteamina, levando ao aumento do rendimento de marcação, no entanto, este composto apresentava baixa especificidade para o GS, apresentando uma taxa de excreção rápida, devido ao seu peso molecular.<sup>27,51,52</sup>

Mais recentemente, um outro estudo foi realizado por D. Vera e colaboradores, que desenvolveram a síntese de conjugados dextrano-manose: DTPA-Manose-Dextrano (Lymphoseek®; 7-8 nm), e MAG<sub>3</sub>-Manose-dextrano (19-20,5 nm) (Figura 1.7).<sup>53</sup>



**Figura 1.7:** [ $^{99m}\text{Tc}$ ]MAG3-manosil-dextrano, dextrano consistiu de 21 unidades de manose e 3 unidades de MAG3 por dextrano. O peso molecular foi de 19,389 g/mole.<sup>53</sup>

Estudos de ligação *in vitro* demonstraram que o Lymphoseek seria o mais promissor na detecção do GS, por apresentar elevada afinidade para os recetores dos macrófagos, uma rápida depuração do local de injeção e uma baixa captação no gânglio distal, o que demonstra que este radiofármaco apresenta propriedades ideais para a finalidade proposta.<sup>53</sup>

Um outro estudo que teve por base o Lymphoseek, foi realizado por R. Ting et al. teve por objetivo a síntese de uma sonda dual PET/NIRF, que a fizeram reagir com o Lymphoseek e marcaram com o  $^{18}\text{F}$ , obtendo-se o [ $^{18}\text{F}$ ]BOMB Lymphoseek. Os radiotraçadores e a fluorescência por infravermelhos (NIRF) são combinações adequadas porque ambos são suficientemente sensíveis para permitir a visualização direta de concentrações de ligação ao recetor na ordem dos nanomolar e picomolar. A PET permite a detecção quantitativa independentemente da profundidade, o que a torna ideal para a imagem de corpo inteiro e a NIRF oferece uma melhor resolução espacial e temporal e é um instrumento barato, no entanto, encontra-se limitada para alvos superficiais, tornando-se ideal para a cirurgia guiada pela imagem e histologia.<sup>54</sup>

Esta sonda de imagem manteve as mesmas propriedades farmacêuticas que o [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Lymphoseek, a rápida marcação do GS, à 1h, baixo nível de acumulação no gânglio linfático distal, bons valores de extração do GS. Pode melhorar a biópsia do GS, pois uma única injeção substitui a combinação múltipla da injeção de um radiofármaco com a ajuda da excisão ótica não específica como o corante isosulfano azul.<sup>54</sup>

Foi, também, desenvolvido um novo estudo, por Morais M. et al, que teve por base a utilização de conjugados poliméricos de dextrano-manose marcados com o  $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ , potencialmente úteis para a detecção do GS. Para alcançar tal objetivo, sintetizou e caracterizou as macromoléculas dextrano-amina-pz<sub>1</sub>-manose (1 unidade pirazolo-diamina/mol dextrano) e dextrano-amina-pz<sub>4</sub>-manose (4 unidades pirazolo-diamina/mol dextrano). Estes compostos continham 16 unidades manose/mol dextrano para o reconhecimento/alvejamento *in vivo* dos recetores de manose e unidades quelantes pirazolo-diamina (pz – átomos doadores N,N,N) para a estabilização do fragmento organometálico *fac*-[M(CO<sub>3</sub>)<sup>+</sup> (M = Re,  $^{99m}\text{Tc}$ ).<sup>55</sup>

A avaliação biológica em modelos animais não foi realizada, no entanto, foram realizados estudos de estabilidade *in vitro* com a histidina e a cisteína. Estes estudos permitiram chegar às seguintes conclusões: o composto  $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ -dextrano-amina, sem unidades quelantes pirazolo-diamina revelou ser instável na presença de ambos os aminoácidos. O composto  $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ -dextrano-amina-pz<sub>1unidade</sub>-manose revelou ser pouco estável na presença de aminoácidos, provavelmente, devido ao fato de existir um número significativo de aminas livres (27 unidades amina/mol dextrano). O  $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ -dextrano-amina-pz<sub>4unidades</sub>-manose e  $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ -dextrano-acetamida/amina-pz<sub>4unidades</sub>-manose mostraram ser estáveis. Tal fato atribuiu-se ao maior número de unidades pirazolo-diamina presentes (4 unidades pz/mol dextrano).<sup>55</sup>

Um outro estudo foi realizado por Kim et al., que desenvolveram o  $^{99m}\text{Tc}$ -acetato de dextrano (DxA), para usar como transportador linfático para a cyclosporina A (CyA) e a sua marcação com o  $^{99m}\text{Tc}$ . A CyA foi carregada e o  $^{99m}\text{Tc}$  foi utilizado para marcar as partículas DxA. Este estudo centrou-se na avaliação da biodistribuição das partículas DxA com CyA marcadas com  $^{99m}\text{Tc}$  e na sua comparação com o  $^{99m}\text{Tc}$ -HSA, empregue como controlo. Kim et al. chegaram à conclusão que as partículas DxA com CyA marcadas com  $^{99m}\text{Tc}$  exibiram uma tendência semelhante ao  $^{99m}\text{Tc}$ -HSA, o que significa que as partículas DxA com CyA marcadas com  $^{99m}\text{Tc}$  poderão distribuir-se tão bem como o  $^{99m}\text{Tc}$ -HSA através do gânglio linfático. Este radiofármaco exibiu radioatividade a nível inguinal, renal, axilar, no ilíaco e na popliteia, tendo sido semelhante ao  $^{99m}\text{Tc}$ -HSA, no caso do gânglio inguinal. As partículas de DxA mostraram o poder de distribuir o CyA bem como, quando marcadas com o  $^{99m}\text{Tc}$ , mostraram a sua distribuição nos gânglios linfáticos.<sup>56</sup>

Keliher et al. também desenvolveram nanopartículas compostas por vários dextrans (Dextran nanoparticles - DNPs) de cadeia pequena (10 kDa) com ligações cruzadas em 13 nm de diâmetro da nanopartícula e posteriormente marcadas com o

$^{89}\text{Zr}$  ( $t_{1/2} = 78.4\text{h}$ ;  $\beta^+ = 22.3\%$ ). Uma vez que o objetivo deste estudo foi a aplicação clínica deste composto, evitaram o uso de dextransos de cadeia longa, dada a sua hipersensibilidade.<sup>57</sup>

Estas nanopartículas mostraram uma acumulação celular completa às 24h após a administração e mostraram uma cinética mais rápida em comparação às nanopartículas com dextransos de cadeia longa em uso clínico ( $t_{1/2}$  vascular  $\sim 3.9\text{h}$  vs  $t_{1/2}$  vascular  $\sim 24-48\text{h}$ ). Além disso, este tipo de nanopartículas exibiu um nível elevado de captação nos macrófagos, sem se observar nenhum efeito adverso, o que também vai de encontro às preparações de dextrano em uso clínico.<sup>57</sup>

### 1.3. Objetivo do trabalho

Vários estudos realizados demonstraram algumas das desvantagens inerentes aos radiofármacos utilizados na detecção do GS, nomeadamente, os colóides de  $^{198}\text{Au}$ , o  $^{99\text{m}}\text{Tc-ATC}$ , o  $^{99\text{m}}\text{Tc-SC}$ , o  $^{99\text{m}}\text{Tc-HSA}$ . No sentido de se ultrapassar estas desvantagens têm sido realizados estudos baseados em compostos dextrano-manose marcados com o  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .<sup>24,27,38,39,40</sup>

Este trabalho centra-se na síntese do composto dextrano-manose marcado com o  $^{67}\text{Ga}$  para a detecção precoce do GS, de forma a tornar-se um contributo para a evolução da técnica de linfocintigrafia.

Assim, para se alcançar o objetivo proposto, o trabalho desenvolvido contempla essencialmente três passos:

1. Síntese e caracterização de conjugados dextrano-manose contendo unidades quelantes do tipo dota;
2. Marcação com o  $^{67}\text{Ga}$  e avaliação da estabilidade *in vitro*;
3. Avaliação biológica dos compostos radioativos em modelos animais.

## 2. Resultados e discussão

---

Neste capítulo apresentam-se e analisam-se os resultados obtidos nesta dissertação. Nos pontos 2.2 a 2.5 é abordada a síntese e a caracterização química do conjugado polimérico dextrano-amina-dota-manose. Descreve-se na alínea 2.6, a síntese e caracterização e radioquímica do complexo  $^{67}\text{Ga}$ -dextrano-amina-dota-manose. Por fim, na alínea 2.7 avaliou-se a estabilidade *in vitro* do radiocomposto obtido em 2.6.

### 2.1 Considerações Gerais

Com o trabalho realizado nesta dissertação pretendia-se contribuir para o desenvolvimento de compostos potencialmente úteis para a visualização doGS. Quando se iniciou este mestrado, no Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas do Instituto Superior Técnico/Instituto Tecnológico Nuclear (IST/ITN) já tinham sido desenvolvidos e avaliadas, com a mesma finalidade, macromoléculas poliméricas, do tipo dextrano-amina-manose, marcadas com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , tendo sido os resultados obtidos bastante promissores.<sup>15,39,55</sup>

O tecnécio – 99 metaestável ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) é sem dúvida o radionuclídeo mais utilizado em diagnóstico por SPECT não só devido às suas características físicas ( $T_{1/2} = 6,02\text{h}$ ;  $E_{\gamma(\text{max})} = 140\text{KeV}$ ) mas também por ser facilmente acessível e a baixo custo através de gerador ( $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ ). Para além disso, o tecnécio apresenta uma química diversificada o que tem permitido desenvolver um grande número de radiofármacos.<sup>1,2,3</sup>

Como alternativa aos radiofármacos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , para a deteção do GS, decidimos sintetizar uma macromolécula polimérica semelhante à já anteriormente desenvolvida, substituindo o  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  por  $^{67}\text{Ga}$ . O  $^{67}\text{Ga}$  apresenta um longo período de semi-desintegração ( $T_{1/2}=78,1\text{h}$ ) é emissor gama de média energia ( $E_{\gamma}=93\text{KeV}$  (37%); 185 (20%); 300 (17%); 394 (4%)) e é produzido em ciclotrão. Para além disso, o polímero que se irá desenvolver poderá ser igualmente marcado com  $^{68}\text{Ga}$ , que apresenta excelentes características físicas: tempo de semi desintegração de 68 minutos, é um emissor de positrão ( $\beta^+ = 89\%$ ,  $E_{\beta^+\text{max}}=1,92\text{ MeV}$ ), possui uma baixa emissão de fotões (1077 keV, 3,2%) e decai para o  $^{68}\text{Zn}$  estável. Além disso, o  $^{68}\text{Ga}$  é produzido por gerador de  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ , permitindo a sua obtenção *in situ* sem recorrer ao uso do ciclotrão. No entanto, as soluções de  $^{68}\text{Ga}$ , obtidas dos geradores comerciais

$^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ , são geralmente muito ácidas e muito diluídas para o uso em procedimentos de marcação direta, contém ainda elevados níveis de contaminantes, como o  $^{68}\text{Ge}$  e outros metais que competem quimicamente com o  $^{68}\text{Ga}$ , como o  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  e, como consequência, há redução do rendimento de marcação. Quanto menor a quantidade de impurezas no eluído, menor será a competição entre a (bio)molécula radiomarcada e não radiomarcada, sendo a qualidade de imagem melhor, desta forma, existe a necessidade de diminuir a quantidade destes metais, purificando o eluído. Atualmente, os geradores de  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  estão a ser desenvolvidos para ultrapassar estes inconvenientes, sem a necessidade de purificação prévia ou mesmo a necessidade de adição de soluções para aumentar o pH do eluído.<sup>58,59</sup>

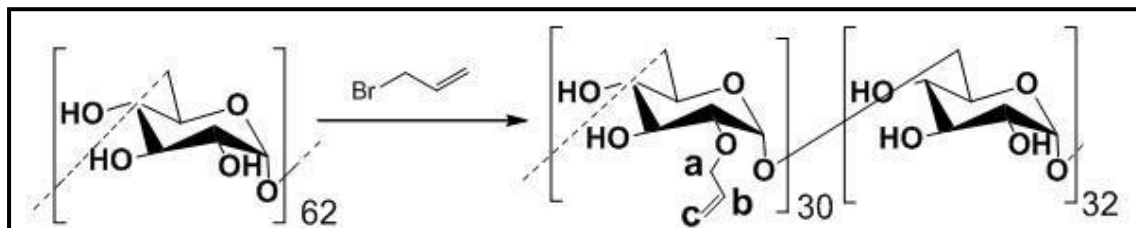
Um dos requisitos inerentes ao uso de radiofármacos é a sua elevada estabilidade *in vivo*, para que o radionuclídeo alcance intato apenas os órgãos alvo evitando assim a radiotoxicidade interna, devido à sua acumulação em órgãos vitais não alvo. Assim, para que o radiofármaco seja estável *in vivo* é necessário que o radiometal seja estabilizado com agente quelante apropriado para a formação de um complexo estável. Os agentes quelantes macrocíclicos, como por exemplo o dota, podem formar complexos estáveis, do ponto de vista termodinâmico e cinético, com um grande número de radiometais trivalentes, nomeadamente o gálio. Assim, optamos por conjugar o ligando dota ao polímero de dextrano.<sup>59</sup>

O dextrano (10000 g/mol; 62 unidades/mol) foi escolhido para a realização deste trabalho, não só pelo seu baixo custo, como por ser facilmente solúvel, ser biodegradável, não tóxico e por ser um reagente importante na ampla gama de síntese nas indústrias biotecnológicas e tecnológicas. Além disso, o seu uso apresenta como vantagem o fato de poder ser utilizado como veículo multifuncional para terapia ou diagnóstico, por permitir acoplar na mesma cadeia fármacos, complexos metálicos, corantes orgânicos, biomoléculas. O uso do conjugado dextrano-manose revelou ser promissor sob o ponto de vista clínico para a deteção do GS, e, como referido anteriormente, foi realizado um estudo com a mesma finalidade no entanto, com um radionuclídeo e um agente quelante diferente. Desta forma, surgiu um interesse em desenvolver um estudo posterior, de forma, a introduzir o radionuclídeo  $^{67}\text{Ga}$ , pelas suas características físicas que se considera adequadas para a deteção do GS na técnica SPECT, e semelhantes às do  $^{68}\text{Ga}$ , para aplicação em PET.<sup>48,49,50,51</sup>

## 2.2 Síntese e Caracterização do Dextrano-amina

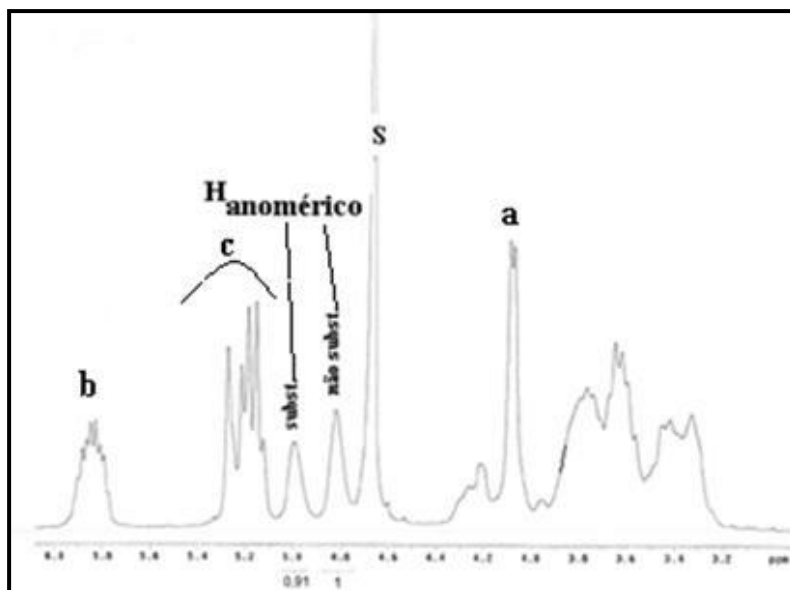
### 2.2.1 Síntese e caracterização do dextrano-alilo

O conjugado polimérico dextrano-alilo foi sintetizado de acordo com o método descrito por M Morais (Figura 2.1).<sup>15,39,55</sup>



**Figura 2.1:** Síntese do dextrano-alilo.

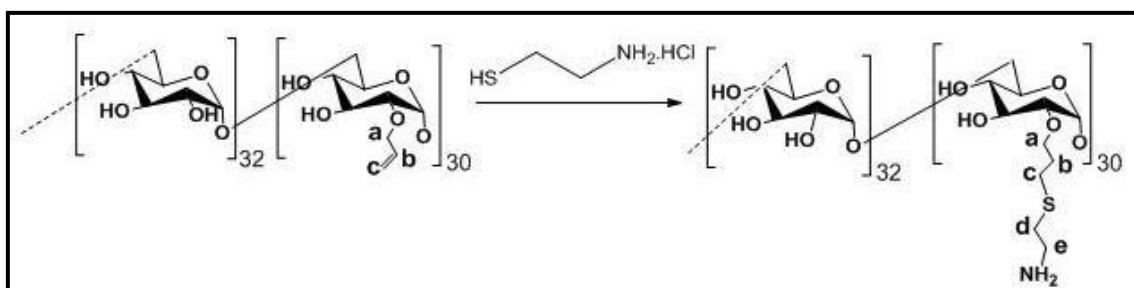
O grau de substituição do polímero foi calculado com base na relação dos valores de integração dos sinais correspondentes ao próton anomérico dos monómeros substituídos e não substituídos do espectro de <sup>1</sup>H-RMN (Figura 2.2), tendo sido estimado em 48%, ou seja, 30 unidades de grupos alilo. Tanto quanto se tem conhecimento, até ao momento foi a maior substituição reportada para esta síntese. O rendimento da reação (68%) também foi bastante superior ao esperado, baseado nas sínteses anteriormente reportadas. No entanto, com o objetivo de aumentar ainda mais o grau de substituição do dextrano, fez-se reagir 3,5 equivalentes de brometo de alilo/monómero de glicose a 50°C durante 20h. De fato foi obtido um grau de substituição de cerca de 59%, ou seja, 36 unidades de grupos alilo. Porém, o composto obtido apresentava uma baixa solubilidade em água, sendo por isso pouco útil para as sínteses posteriores. Optou-se por prosseguir o processo de síntese com o polímero de dextrano que continha 30 unidades de grupos alilo.<sup>15,39,55</sup>



**Figura 2.2:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN em  $\text{D}_2\text{O}$  do dextrano-alilo.

A caracterização estrutural do dextrano-alilo baseou-se unicamente na espectroscopia de  $^1\text{H}$ -RMN. A atribuição dos sinais foi feita por analogia com as atribuições anteriormente feitas com compostos semelhantes.<sup>15,39,55</sup>

### 2.2.2 Síntese do dextrano-amina



**Figura 2.3:** Síntese do dextrano-amina.

O conjugado polimérico dextrano-amina foi sintetizado de acordo com o método descrito por M Morais (Figura 2.3), tendo sido a conversão dos grupos alilo em grupos amina de 100%. Esta conclusão foi baseada no espectro de  $^1\text{H}$ -RMN, onde se verificou o total desaparecimento das ressonâncias centradas a 5,86 e 5,22 ppm, correspondente respetivamente ao protão  $\text{H}^b$  e aos dois protões  $\text{H}^c$  do alceno terminal

do grupo alilo, e simultaneamente ao aparecimento das ressonâncias a 1,57 e 2,35 ppm respeitantes aos mesmos prótons.<sup>15,39,55</sup>

Tal como no caso do precursor dextrano-alilo, a caracterização estrutural do dextrano-amina baseou-se unicamente na espectroscopia de <sup>1</sup>H-RMN. A atribuição dos sinais foi feita por analogia com as atribuições anteriormente feitas com compostos semelhantes. Na Figura 2.4 apresenta-se o espectro de <sup>1</sup>H-RMN do dextrano-amina, com a respetiva atribuição dos sinais.<sup>15,39,55</sup>

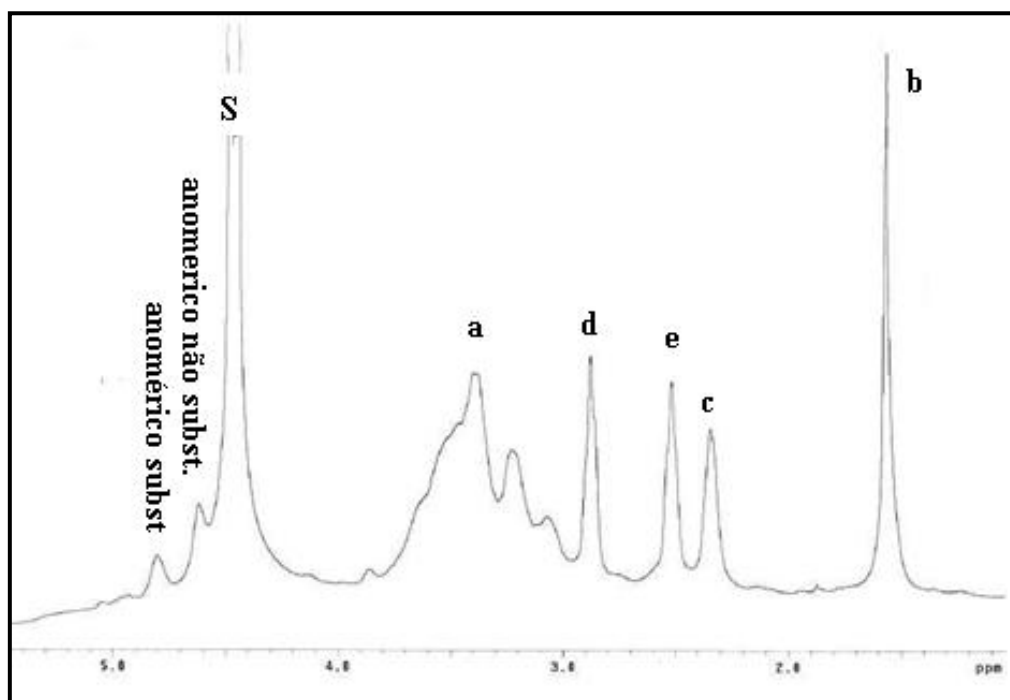
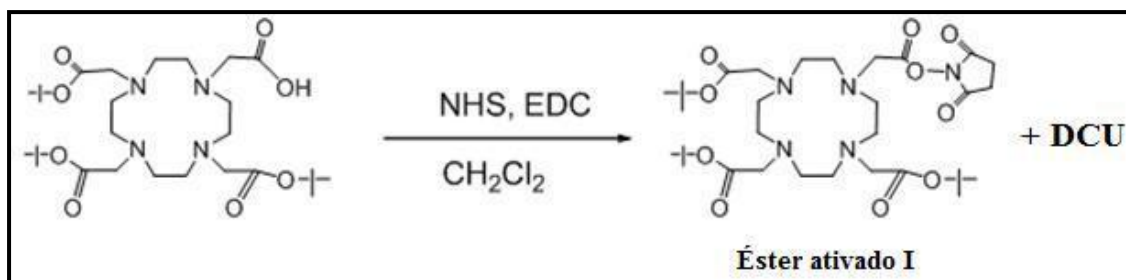


Figura 2.4: Espectro de <sup>1</sup>H-RMN em D<sub>2</sub>O do dextrano-amina.

## 2.3 Síntese e Caracterização do Conjugado Dextrano-amina-dota-tris(<sup>t</sup>Bu)ester

### 2.3.1 Síntese de Ativação do dota-tris(<sup>t</sup>Bu)ester [ácido 2-(4,7,10-tris(2-(terbutoxi-2-oxoetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-il) acético]

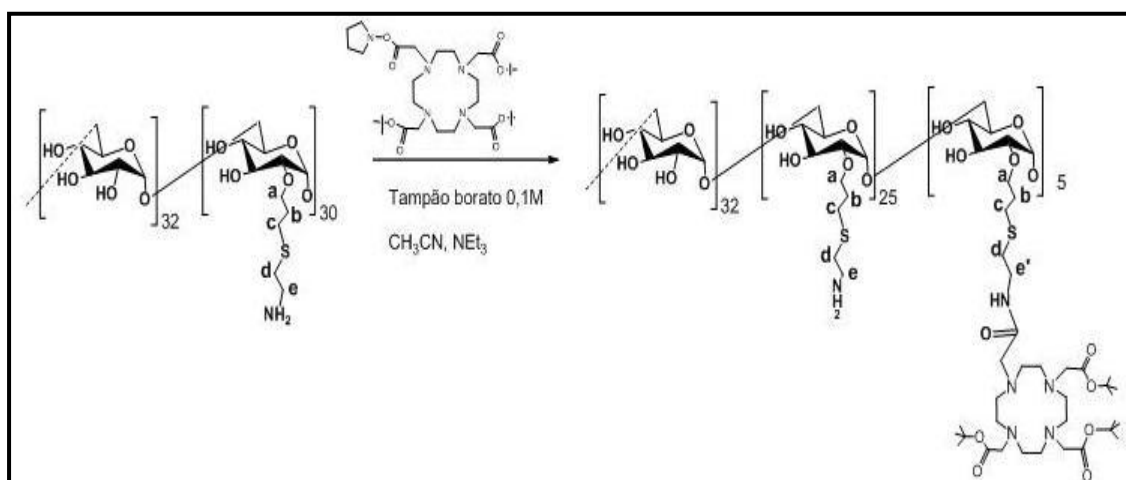


**Figura 2.5:** Síntese de ativação do éster do  $\text{do}_3^t\text{ButCOOH}$ .

O éster tri-tert butílico,  $\text{do}_3^t\text{ButCOOH}$ , do ligando dota foi ativado por reação com a *N*-hidroxisuccinimida (NHS) na presença de *N,N'*-diciohhexilcarbodiimida (DCC), obtendo-se o éster ativado I (Figura 2.5). Observou-se a formação de um precipitado branco, no decorrer da reação, correspondente à *N,N'*-diciohhexilureia (DCU) que foi eliminado por filtração. Utilizou-se este intermediário imediatamente na reação seguinte, sem qualquer purificação adicional.

A primeira tentativa de ativação deste éster foi feita usando o sistema de ativadores *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida- EDC e NHS, na presença de trietilamina. Contudo, ao fim de 24h o avanço da reação foi praticamente nulo. Assim, optou-se por usar o sistema DCC-NHS. Também neste caso se verificou que a reação foi bastante lenta, tendo sido necessário utilizar relações molares ativador/éster superiores às descritas na literatura para o mesmo tipo de reações.<sup>60</sup>

### 2.3.2 Síntese do conjugado dextrano-amina- $\text{do}_3^t\text{ButCOOH}$



**Figura 2.6:** Síntese do Dextrano-amina- $\text{do}_3^t\text{ButCOOH}$ .

O conjugado polimérico dextrano-amina-dota-tris<sup>t</sup>But-ester foi obtido por reação de dextrano amina, em tampão borato a pH=9, com o éster ativado, na presença de trietilamina (Et<sub>3</sub>N). O éster ativado não é muito solúvel em soluções aquosas, pelo que foi necessário dissolvê-lo em acetonitrilo. A Et<sub>3</sub>N vai promover a reação de amidação. Contudo, o polímero de dextrano-amina tem alguma tendência a precipitar na presença de Et<sub>3</sub>N, pelo que a quantidade utilizada tem que ser a estritamente necessária para dar início à reação. Para diminuir a probabilidade de precipitação do polímero, adicionou-se um pouco de H<sub>2</sub>O à mistura reacional, Figura 2.6.

O éster foi conjugado ao dextrano-amina com um rendimento de 73%. A caracterização estrutural do dextrano-amina-do<sub>3</sub><sup>t</sup>ButCOOH baseou-se na espectroscopia de <sup>1</sup>H-RMN e <sup>13</sup>C-RMN e a atribuição dos sinais foi realizada por analogia com as atribuições anteriormente feitas com compostos semelhantes. Na Figura 2.7 e na Figura 2.8 apresenta-se o espectro de <sup>1</sup>H-RMN e <sup>13</sup>C-RMN, respetivamente, do dextrano-amina-do<sub>3</sub><sup>t</sup>ButCOOH, com a respetiva atribuição dos sinais. No espectro de <sup>1</sup>H-RMN foi possível identificar um singuleto a 1,34 ppm correspondente aos prótons do grupo tBut do do<sub>3</sub><sup>t</sup>ButCOOH. O padrão do espectro de <sup>1</sup>H-RMN mudou significativamente, relativamente ao espectro de <sup>1</sup>H-RMN do dextrano-amina, o que se deve certamente ao acoplamento do grupo do<sub>3</sub><sup>t</sup>ButCOOH (5 unidades). Paralelamente, são distinguíveis no espectro ressonâncias do grupo dextrano-amina, nomeadamente dois tripletos a cerca de 3,10 ppm e a 2,74 ppm que correspondem, respetivamente, aos prótons metilénicos adjacentes ao átomo de enxofre (Hd) e ao grupo amina livre que não reagiu (He) e ainda um singuleto a cerca 1,75 ppm, correspondente aos prótons metilénicos H(b) ( Figura 2.7).<sup>15,39,55,61</sup>

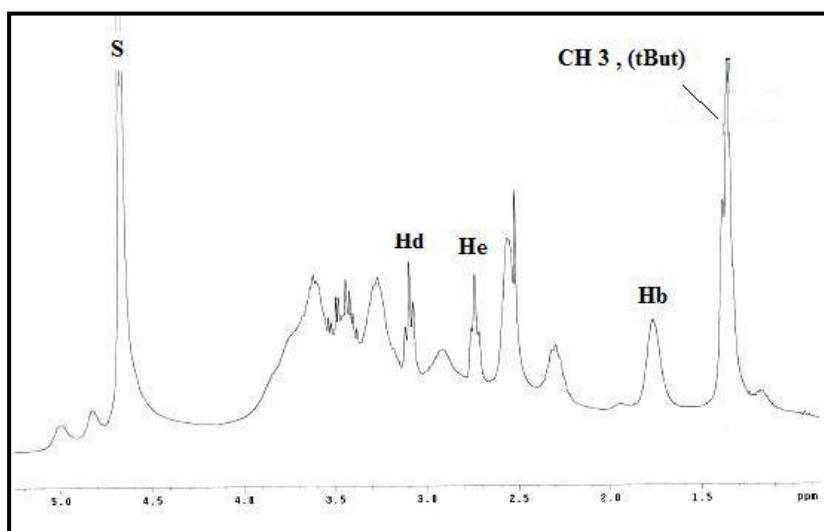
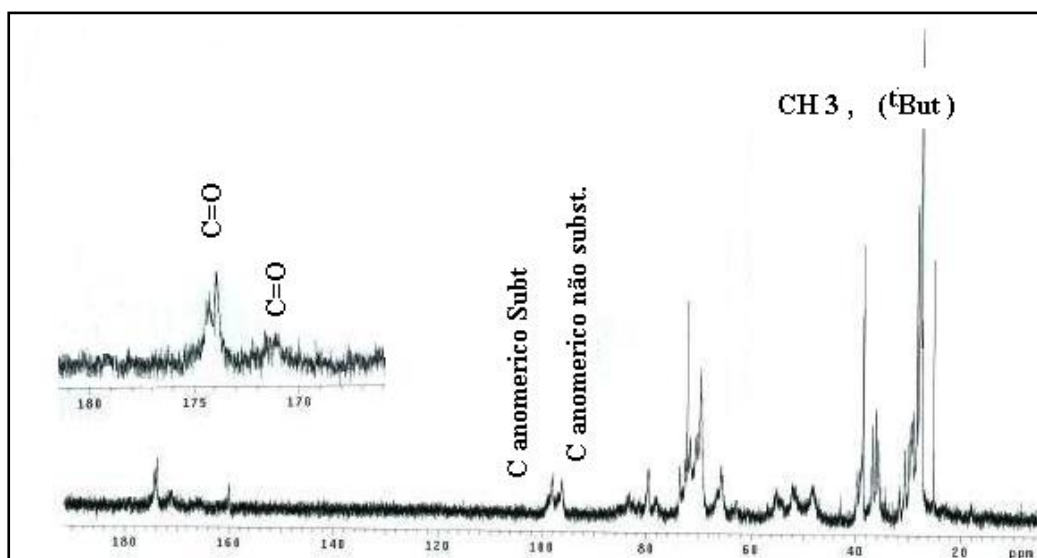


Figura 2.7: Espectro de <sup>1</sup>H-RMN em D<sub>2</sub>O do dextrano-amina-do<sub>3</sub><sup>t</sup>ButCOOH.

No espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN foi possível identificar a campo baixo picos correspondentes aos grupos carbonilo do  $\text{do}_3^t\text{ButCOOH}$  (173,87 e 173,59 ppm) e do grupo amida (171,57 ppm) e a campo mais alto as ressonâncias devidas aos carbonos anoméricos substituídos (99,87 ppm) e não substituído (97,97 ppm) e as ressonâncias dos carbonos  $\text{CH}_3$  dos grupos  $^t\text{But}$  (29,27), que confirmam a conjugação do grupo  $\text{do}_3^t\text{ButCOOH}$  ao dextrano-amina (Figura 2.8).<sup>61</sup>

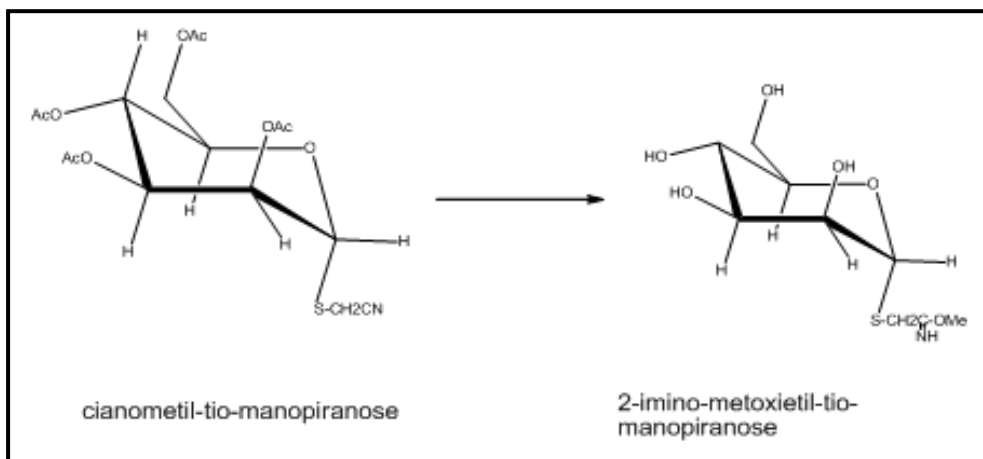


**Figura 2.8:** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN em  $\text{D}_2\text{O}$  do dextrano-amina- $\text{do}_3^t\text{ButCOOH}$ .

O grau de conjugação da unidade  $\text{do}_3^t\text{ButCOOH}$  (5 unidades) ao dextrano-amina foi calculado com base no  $^1\text{H}$ -RMN, relacionando-se o valor da integração do sinal dos grupos  $\text{CH}_3$  correspondentes à unidade  $\text{do}_3^t\text{ButCOOH}$  (1,34 ppm) com o valor da integração do sinal dos prótons metilênicos  $\text{H}_e$ , adjacentes ao grupo amina livre que não reagiu (2,74 ppm).<sup>15,39,55</sup>

## 2.4 Síntese e Caracterização do Conjugado Dextrano-amina-do<sub>3</sub><sup>t</sup>But-manose

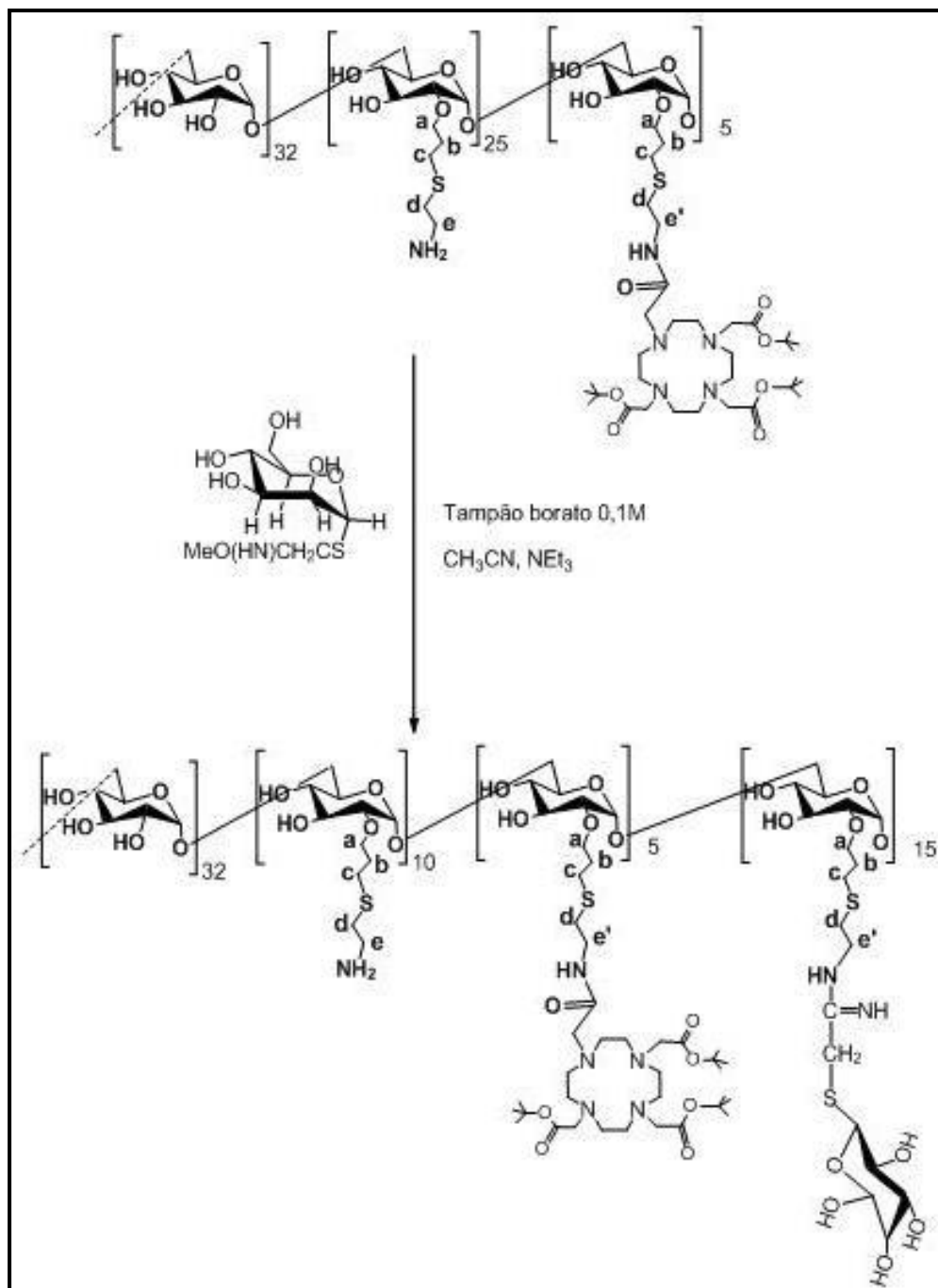
### 2.4.1 Síntese da 2-(imino-metoxietil)-1-tio-manopiranosose



**Figura 2.9:** Síntese do 2-(imino-metoxietil)-1-tio-manopiranosose.

A 2-(imino-metoxietil)-1-tio-manopiranosose foi sintetizada de acordo com o método descrito por M Morais (Figura 2.9). O cianometil-tio-manopiranosose já existia no laboratório e a sua pureza química foi confirmada por <sup>1</sup>H-RMN e <sup>13</sup>C-RMN. A 2-(imino-metoxietil)-1-tio-manopiranosose foi usada imediatamente após ter sido isolada para a conjugação ao composto dextrano-amina-do<sub>3</sub><sup>t</sup>ButCOOH, sem qualquer purificação.<sup>15,39,55</sup>

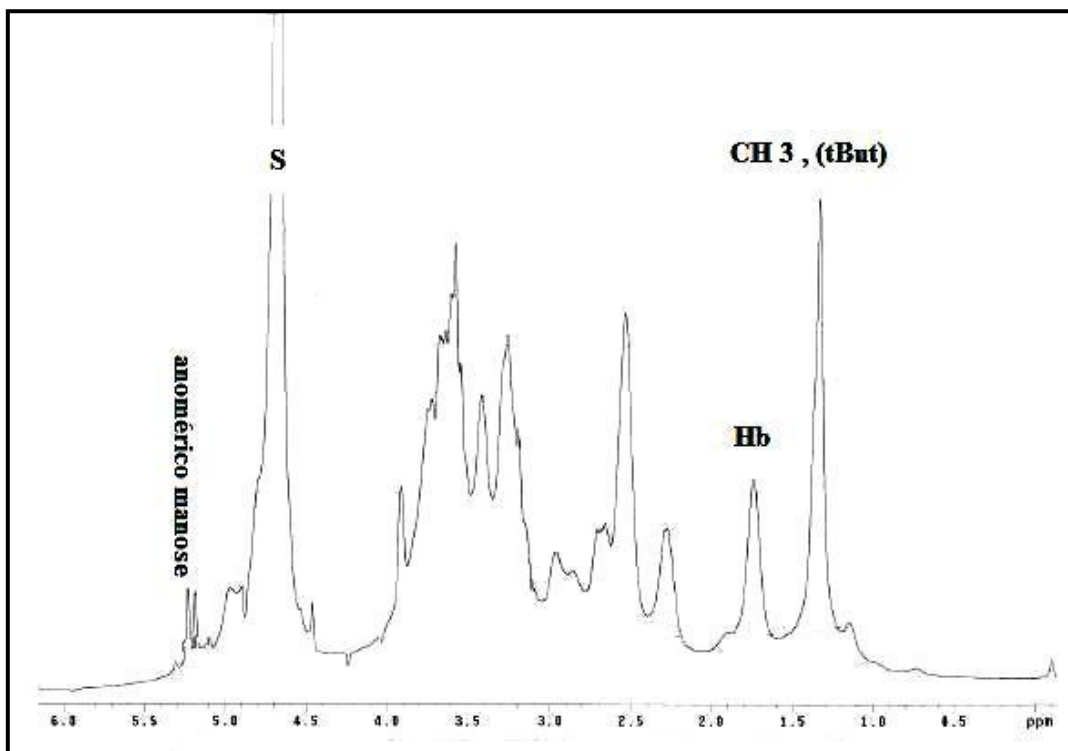
## 2.4.2 Síntese do conjugado dextrano-amina-do<sub>3</sub><sup>t</sup>But-manose



**Figura 2.10:** Síntese do Dextrano-amina-do<sub>3</sub><sup>t</sup>But-manose.

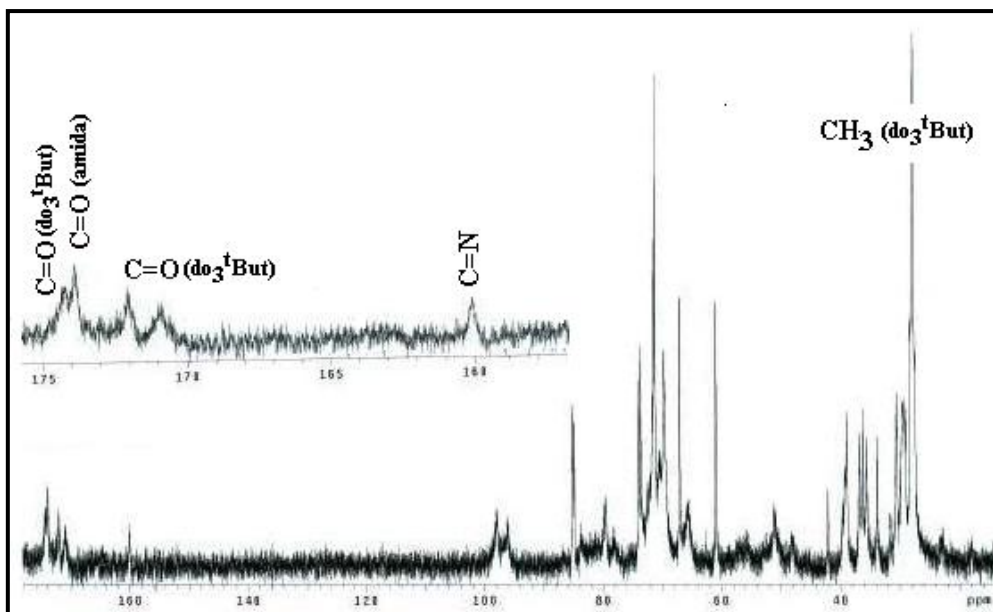
O conjugado polimérico dextrano-amina-do<sub>3</sub><sup>t</sup>But-manose foi sintetizado de acordo com o método descrito por M Morais (Figura 2.10), com um rendimento de 67%.<sup>15,39,55</sup>

A caracterização estrutural do dextrano-amina-do<sub>3</sub><sup>t</sup>But-manose baseou-se na espectroscopia de <sup>1</sup>H-RMN e <sup>13</sup>C-RMN. A atribuição dos sinais foi realizada por analogia com as atribuições anteriormente feitas com compostos semelhantes. Na Figura 2.11 e na Figura 2.12 apresenta-se o espectro de <sup>1</sup>H-RMN e <sup>13</sup>C-RMN, respetivamente.



**Figura 2.11:** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN em D<sub>2</sub>O do dextrano-amina-do<sub>3</sub><sup>t</sup>But-manose.

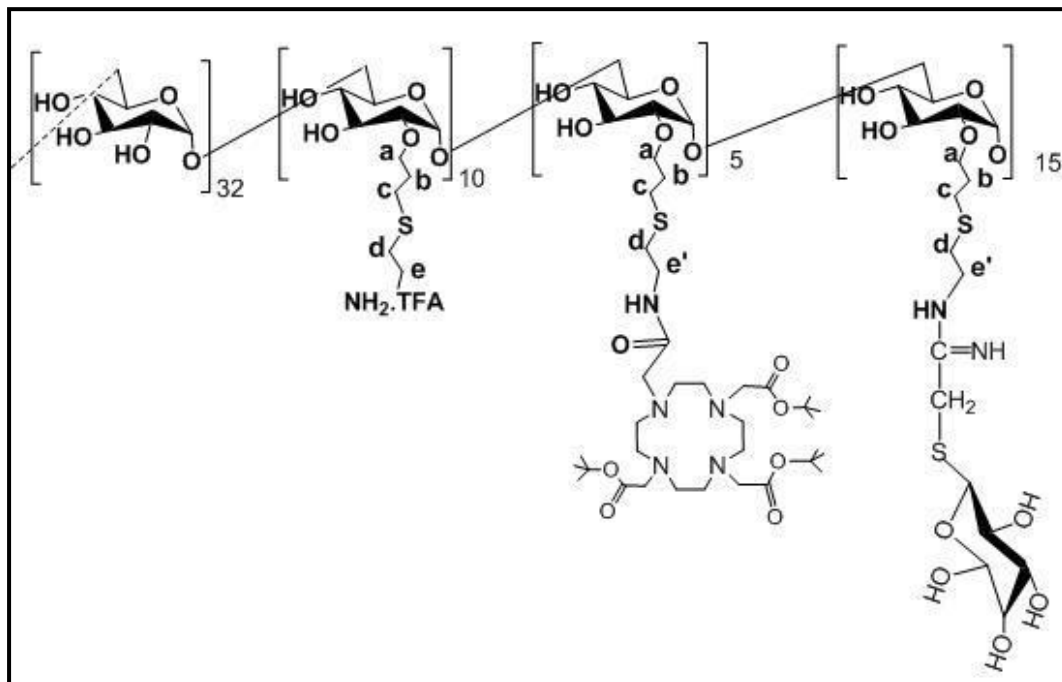
O aparecimento do sinal a 160,05 ppm no espectro de <sup>13</sup>C-RMN, atribuível ao carbono C=N, confirma a conjugação do derivado da manose ao polímero de dextrano. Nesta zona do espectro são ainda visíveis os sinais correspondentes aos grupos carbonilo do grupo do<sub>3</sub><sup>t</sup>butCOOH e da amida.<sup>61</sup>



**Figura 2.12** – Espetro de  $^{13}\text{C}$ -RMN em  $\text{D}_2\text{O}$  do dextrano-amina- $\text{do}_3^t\text{But}$ -manose.

A determinação do número de unidades de manose conjugadas foi feita com base na análise do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN, relacionando o valor da integração do pico característico do próton anomérico da manose (5,23 ppm) com o valor de integração dos grupos  $\text{CH}_3$  correspondentes à unidade  $\text{do}_3^t\text{ButCOOH}$  (1,33 ppm). Verificou-se que existiam 3 grupos manose por cada grupo  $\text{do}_3^t\text{ButCOOH}$ .

## 2.5 Síntese e Caracterização do Conjugado Dextrano-amina-dota-manose



**Figura 2.13:** Síntese do Dextrano-amina-dota-manose.

O conjugado polimérico dextrano-amina-dota-manose foi sintetizado de acordo com o método descrito por M Morais (Figura 2.13). Esta reação de síntese teve como objetivo a hidrólise dos grupos tBut do grupo do<sub>3</sub>tButCOOH. A hidrólise foi efetuada com ácido trifluoracético (TFA), com um rendimento de 100%. O desaparecimento da ressonância a campo alto, do espectro <sup>1</sup>H-RMN, correspondente aos prótons metilênicos do grupo tBut, corrobora a hidrólise total deste grupo (Figura 2.14). O espectro de <sup>13</sup>C-RMN consolida esta ideia, uma vez que se observou a ausência do pico a cerca de 28,97 ppm, correspondentes aos carbonos dos grupos tBut. A campo mais baixo são visíveis os sinais correspondentes aos grupos carbonilo dos grupo do<sub>3</sub>tbutCOOH (174,24; 173,92; 172,02 ppm) e amida (169,98 ppm) e um correspondente ao C=N (165,46 ppm) (Figura 2.15).<sup>15,39,55,61</sup>

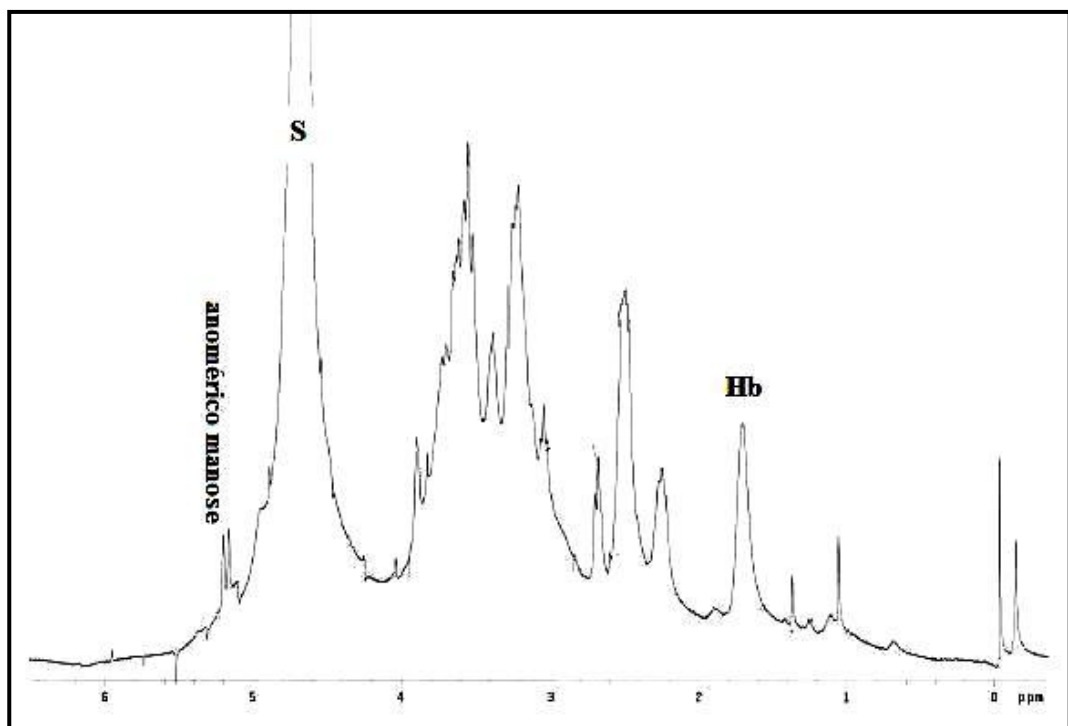


Figura 2.14 – Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN em  $\text{D}_2\text{O}$  do dextrano-amina-dota-manose.

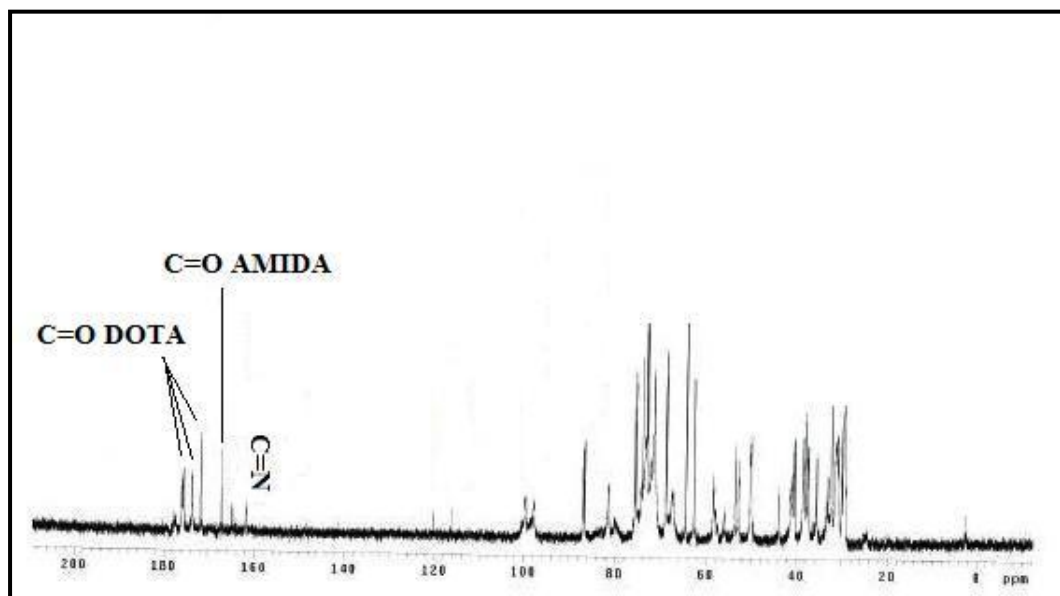


Figura 2.15 – Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN em  $\text{D}_2\text{O}$  do dextrano-amina-dota-manose.

O conjugado polimérico final (dextrano-amina-dota-manose) foi utilizado na síntese radioquímica com  $^{67}\text{GaCl}_3$ .

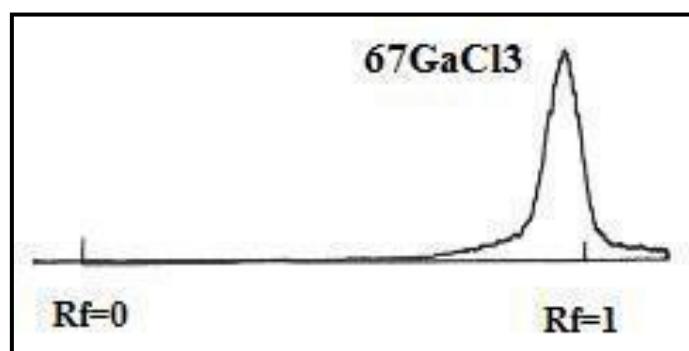
## 2.6 Síntese radioquímica do conjugado polimérico radioactivo $^{67}\text{Ga}$ -[dextrano-amina-dota-manose]

O manuseamento das substâncias radioativas ( $^{67}\text{Ga}$ ) foi realizado sob condições de proteção e segurança radiológica, numa hotte com extração, com um visor de chumbo. A manipulação das doses radioativas foi realizada com os devidos protetores de chumbo. O uso de um dosímetro individual de corpo e pulso foi outra medida utilizada para a monitorização da exposição à radiação.

### 2.6.1 Síntese do $^{67}\text{GaCl}_3$

Na reação de síntese do conjugado polimérico radioactivo  $^{67}\text{Ga}$ -[dextrano-amina-dota-manose] foi usado o  $^{67}\text{GaCl}_3$  como precursor. O  $^{67}\text{Gálio}$  foi fornecido sob a forma de citrato de gálio, no entanto, é convertido a cloreto, por se traduzir, de uma maneira geral, em cinéticas de marcação mais rápidas. No entanto, as marcações em  $^{67}\text{GaCl}_3$  têm de ser sempre otimizadas no sentido de se evitar a formação de espécies coloidais radioativas. A conversão do citrato a cloreto foi realizada com recurso a algumas alterações efetuadas numa metodologia obtida da literatura.<sup>62</sup>

O controlo de qualidade foi realizado para se averiguar se a conversão do citrato a cloreto foi completa e se havia a formação de colóides. Neste sistema, o citrato e os colóides ficam retidos na origem ( $R_f=0$ ), enquanto que o  $^{67}\text{GaCl}_3$  migra para a frente de solvente ( $R_f=1$ ). A análise do sistema cromatográfico foi realizada no radiocromatógrafo (Figura 2.16).



**Figura 2.16:** Cromatograma analítico obtido na radiosíntese do  $^{67}\text{GaCl}_3$ .

Pela análise do cromatograma analítico observa-se a existência de um único pico na frente de solvente ( $R_f=1$ ), que corresponde ao cloreto de gálio e a inexistência

de pico na origem ( $R_f=0$ ). Desta forma, é possível concluir que por um lado a conversão do citrato a cloreto foi completa e que também não se formaram colóides.

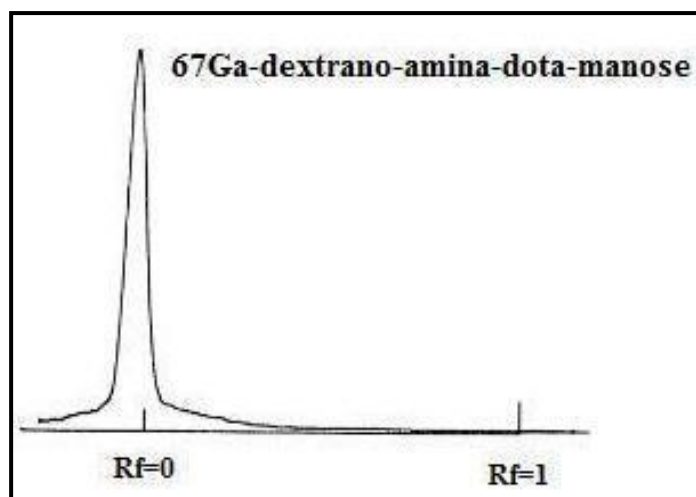
## 2.6.2 Preparação do conjugado polimérico radioativo de $^{67}\text{GaCl}_3$

De forma a otimizar as condições experimentais de marcação do  $^{67}\text{Ga}$ -dextrano-amina-dota-manose, procedeu-se à marcação do conjugado polimérico radioativo com o  $^{67}\text{GaCl}_3$  à temperatura ambiente aos 30 e aos 60 minutos e a  $100^\circ\text{C}$  aos 5, 15 e 30 minutos, a  $100^\circ\text{C}$  (Tabela 2.1)

**Tabela 2.1:** Valores de Pureza Radioquímica da marcação do conjugado polimérico radioativo  $^{67}\text{Ga}$ -[dextrano-amina-dota-manose] à temperatura ambiente, aos 30 e 60 minutos, e a  $100^\circ\text{C}$ , aos 5, 15 e 30 minutos.

| Temperatura                           | Tempo de marcação (minutos) | Pureza Radioquímica (%) |
|---------------------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| <b>Ambiente</b>                       | 30                          | 9                       |
|                                       | 60                          | 27                      |
| <b><math>100^\circ\text{C}</math></b> | 5                           | 56                      |
|                                       | 15                          | 100                     |
|                                       | 30                          | 100                     |

A pureza radioquímica (PR) foi controlada. Neste sistema o  $^{67}\text{Ga}$ -dextrano-amina-dota-manose e os colóides ficam retidos na origem, não migram ( $R_f=0$ ) enquanto o cloreto de gálio migra para a frente do solvente ( $R_f=1$ ). Realizou-se a análise da tira de Papel Whatman nº1 no radiocromatógrafo. De seguida, apresenta-se o exemplo de um cromatograma analítico referente à marcação a  $100^\circ\text{C}$  durante 30 minutos (Cromatograma 2.17).



**Figura 2.17:** Cromatograma analítico obtido para a marcação do conjugado polimérico radioativo ( $^{67}\text{Ga}$ -dextrano-amina-dota-manose) a  $100^{\circ}\text{C}$  aos 30 minutos.

Pela análise da Tabela 2.1 verifica-se que a reação de marcação do conjugado polimérico radioativo [dextrano-amina-dota-manose] com o  $^{67}\text{GaCl}_3$  à temperatura ambiente não foi bem sucedida, no entanto, verifica-se que aumentando o tempo de marcação, de 30 minutos (PR=9%) para 60 minutos (PR=27%), a PR aumenta. A  $100^{\circ}\text{C}$ , a reação de marcação, quer aos 15 minutos (PR=100%) quer aos 30 minutos (PR=100%) foi completa.

Como já foi referido anteriormente, a reação de marcação de conjugados que contêm o ligando dota requer, de um modo geral, temperaturas superiores à temperatura ambiente. Tal fato relaciona-se com a estrutura pré-organizado do ligando, que se traduz numa elevada rigidez, tendo como consequência uma cinética de complexação lenta. No caso concreto do Gálio, acresce ainda o fato de a cavidade central deste macrociclo ser grande encapsular o  $\text{Ga}^{3+}$ . A cinética da reação pode ser aumentada com o aumento da temperatura. Tal como já foi referido, apesar de a cinética de formação dos complexos formados com este ligando seja de um modo geral lenta, a cinética de descomplexação é igualmente muito lenta, sendo essa a grande vantagem do uso deste ligando para a preparação de radiofármacos.<sup>59</sup>

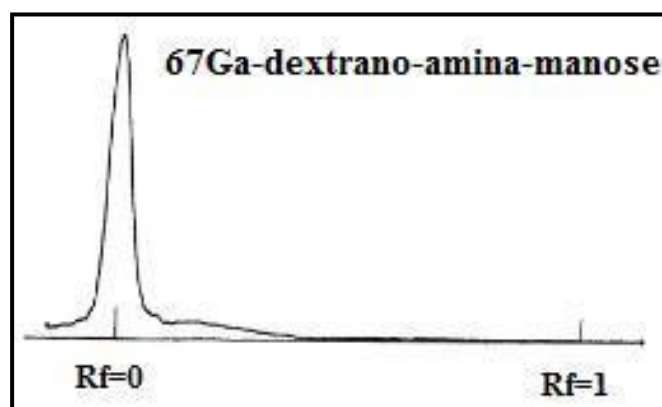
Pela análise do cromatograma analítico obtido para a reação de marcação do conjugado polimérico radioativo, a  $100^{\circ}\text{C}$  aos 30 minutos (Figura 2.17) verifica-se que todo o cloreto de gálio foi consumido. No entanto, nada se poderá dizer relativamente à formação de colóides. Assim, para averiguarmos se houve ou não formação de colóides durante esta radiosíntese, fizemos passar uma alíquota de  $^{67}\text{Ga}$ -dextrano-amina-dota-manose por uma coluna de Sephadex PD-10. Nesta coluna os colóides

ficam retidos no topo da coluna e as outras espécies radioquímicas são eluídas. Após a eluição, a coluna foi lida no radiocromatógrafo tendo-se observado o mesmo valor de radioatividade ao longo de toda a coluna. Tal fato comprova que não se formaram espécies radioquímicas sob a forma coloidal na reação de síntese de  $^{67}\text{Ga}$ -dextrano-amina-dota-manose.

## 2.7 Estudos de estabilidade *in vitro* do conjugado polimérico radioativo de $^{67}\text{Ga}$

### 2.7.1 Estabilidade nas soluções de reação

A estabilidade do conjugado polimérico radioativo  $^{67}\text{Ga}$ -[dextrano-amina-dota-manose] foi analisada após 24 horas à temperatura ambiente. Neste sistema o  $^{67}\text{Ga}$ -dextrano-amina-dota-manose e os colóides ficam retidos na origem, não migram ( $R_f=0$ ) enquanto o cloreto de gálio migra para a frente do solvente ( $R_f=1$ ). Realizou-se o controle de qualidade e analisou-se a tira de Papel Whatman n<sup>o</sup>1 no radiocromatógrafo (Figura 2.18).



**Figura 2.18:** Cromatograma analítico obtido para o estudo de estabilidade do conjugado polimérico radioativo ( $^{67}\text{Ga}$ -dextrano-amina-dota-manose) às 24 horas após a marcação.

Pela análise do cromatograma analítico verifica-se um pico correspondente ao conjugado polimérico radioativo na origem e ausência de pico na frente de solvente, o que indica a ausência de formação de eventuais impurezas radioquímicas que migrem. A existência ou não de colóides no radiocomposto foi igualmente averiguada

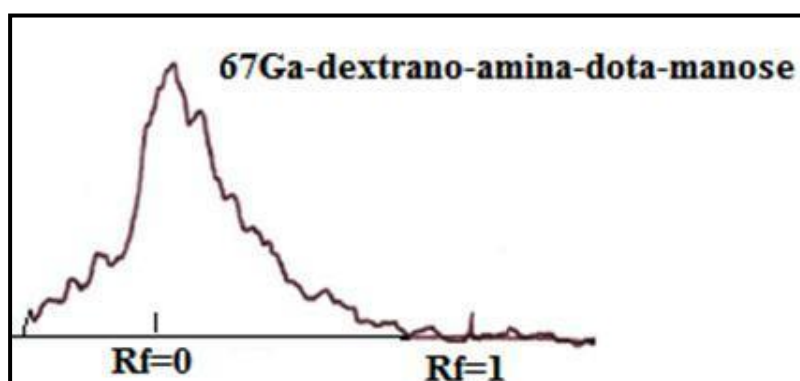
fazendo-se passar uma alíquota da solução por uma coluna de Sephadex PD-10. Verificou-se que não existiam colóides, pelo que se concluiu que o conjugado polimérico radioativo é estável 24 horas após a reação de marcação.

### 2.7.2 Estabilidade na presença de apotransferrina e glutatona

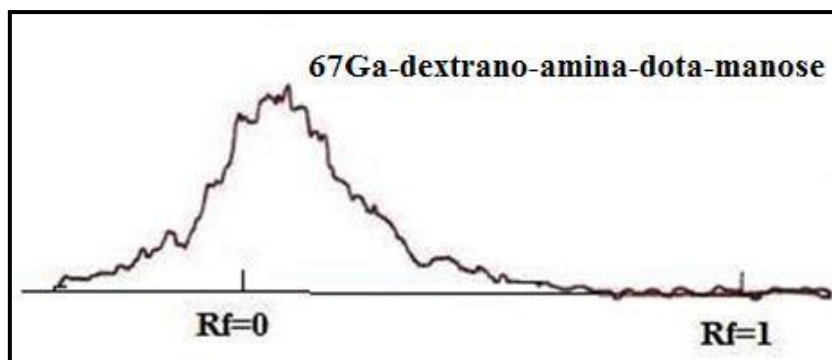
O estudo de estabilidade tinha como objetivo avaliar a possível existência de fenómenos de trans-quelatação e prever o potencial comportamento *in vivo* do conjugado polimérico radioativo  $^{67}\text{Ga}$ -[dextrano-amina-dota-manose]. A escolha da glutatona e da apotransferrina baseou-se no fato destes dois compostos estarem presentes no soro humano, podendo assim competir pela coordenação do centro metálico com o gálio.

A estabilidade do conjugado polimérico radioativo  $^{67}\text{Ga}$ -[dextrano-amina-dota-manose] foi analisada em soluções contendo um excesso de apotransferrina (3 mg/mL bicarbonato de sódio, pH = 7,4) e glutatona [ $1 \times 10^{-3}$  M em tampão fosfato salino (PBS), pH = 7,4)]. Colocou-se a mistura contendo o conjugado polimérico radioativo e um excesso de glutatona a 37°C, durante 2 horas e à mesma temperatura, durante 24 horas colocou-se uma outra mistura contendo o conjugado polimérico radioativo e um excesso de apotransferrina.

Realizou-se o Controlo de qualidade e analisou-se a tira de Papel Whatman nº 1 no radiocromatógrafo (Figura 2.19 e 2.20).



**Figura 2.19:** Cromatograma analítico obtido para o estudo de estabilidade do conjugado polimérico radioativo ( $^{67}\text{Ga}$ -dextrano-amina-dota-manose) após 2 horas, na solução em excesso de glutatona.



**Figura 2.20:** Cromatograma analítico obtido para o estudo de estabilidade do conjugado polimérico radioativo ( $^{67}\text{Ga}$ -dextrano-amina-dota-manose) após 24 horas, na solução em excesso de apotransferrina.

Pela análise dos cromatogramas analíticos verifica-se um pico correspondente ao conjugado polimérico radioativo na origem. Apenas se pode constatar que não se formaram impurezas radioquímicas que migrem para a frente de solvente ( $R_f=1$ ). Nada se pode inferir relativamente à estabilidade do conjugado polimérico radioativo na presença de um excesso de glutathione e apotransferrina.

### 3. Conclusões e Perspetivas

---

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de compostos potencialmente úteis para a visualização do GS, baseados em macromoléculas poliméricas, do tipo dextrano-amina-manose, marcados com  $^{67}\text{Ga}$ , de forma a ultrapassar alguns inconvenientes intrínsecos ao uso do  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .

O conjugado polimérico –dextrano-amina-dota-manose- foi purificado por diálise e caracterizado por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Os espectros de  $^1\text{H}$ -RMN permitiram a determinação dos graus de conjugação para cada uma das unidades do conjugado polimérico.

A reação de conversão do citrato de gálio a cloreto de gálio ocorreu com sucesso, tendo sido completa e com ausência de formação de qualquer tipo de impurezas radioquímicas, nomeadamente colóides.

Sintetizou-se, com elevado rendimento, o conjugado polimérico radioativo  $^{67}\text{Ga}$ -dextrano-amina-dota-manose que, para além de grupos amina livres, contém unidades de manose (15 unidades/mol dextrano) para o alveijamento *in vivo* dos recetores de manose e unidades quelantes dota (5 unidades/mol dextrano) para a estabilização do radiometal.<sup>15,39,55</sup>

A reação de marcação do conjugado polimérico –dextrano-amina-dota-manose com o  $^{67}\text{GaCl}_3$  foi completa ao fim de 15 minutos a  $100^\circ\text{C}$ . Os estudos de estabilidade demonstraram que o conjugado polimérico radioativo  $^{67}\text{Ga}$ -dextrano-amina-dota-manose é estável após 24 horas a reação de marcação. Nada se pode concluir relativamente à estabilidade do conjugado polimérico radioativo na presença da glutathione e da apotransferrina.

No caso do conjugado polimérico radioativo ser estável na presença de glutathione e apotransferrina, o conjugado polimérico radioativo  $^{67}\text{Ga}$ -dextrano-amina-dota-manose deverá ser avaliado relativamente à sua afinidade para os recetores de manose em linhas celulares de macrófagos, bem como ao seu perfil farmacocinético em modelo animal apropriado.



## 4. Procedimento Experimental

---

Neste capítulo é apresentado o procedimento experimental inerente ao trabalho realizado. É incluída a lista de reagentes e solventes utilizados, os métodos de purificação e caracterização dos compostos e finalmente é feita a descrição detalhada das reações de síntese, química e radioquímica, efetuadas para a obtenção dos compostos.

### 4.1 Material

Para além do material corrente de laboratório, nomeadamente balões reacionais de vidro, provetas, pipetas, funis, etc foi ainda utilizado outro material específico à realização de algumas sínteses químicas e radioquímicas:

#### 4.1.1 Material utilizado em reações químicas

- Balança analítica, Mettler Toledo
- Bomba de vácuo, Alcatel
- Electrodo de pH, Mettler Toledo
- Espectrómetro de RMN, Varian, INOVA- 300
- Lâmpada de Ultra-Violeta (254nm /385nm), Spectroline
- Linhas de vácuo/Azoto, utilizadas para as reações que decorreram em atmosfera inerte
- Liofilizador, I-12, ALPHA
- Membranas para diálise (MWCO 6-8 KDa), Medicell International LTD
- Potenciómetro, EXTECH Instruments, Model 671, Boston, USA.
- Rotavapor, R-201, BUCHI, Switzerland

#### 4.1.2 Material utilizado nas marcações radioquímicas

- Agitador de tubos Vortex, Thermolyne Type 167000 Mixer
- Balança analítica, Sartorius 2006 MP
- Banho termostaticado, TEMBLOC
- Câmara de ionização, Aloka, Curimeter IGC-3, Tokyo, Japan
- Micropipetas, Eppendorf
- Minicolunas compatadas, sep-Pack<sup>®</sup> (Classic Silica Cartridges), Waters<sup>®</sup>, EUA

- Colunas PD-10. Sephadex™ G-25
- Papel cromatográfico Whatman 1, Whatman®, EUA
- Radiocromatógrafo, modelo Berthold LB 2723 equipado com cristal de cintilação NaI(Tl) com 20mm de diâmetro

## 4.2 Reagentes e Solventes

Todos os reagentes químicos e solventes foram utilizados sem qualquer purificação. Na Tabela 4.1 são apresentados os reagentes e solventes utilizados durante a realização deste trabalho assim como o seu fornecedor e o grau de pureza (Pró-análise  $\geq$  98.5%, Puro  $\geq$  95.0%, Técnico  $\geq$  90.0%).

**Tabela 4.1:** Reagentes e solventes utilizados no trabalho realizado.

| Reagente   | Fornecedor     | Grau de pureza |
|--|----------------|----------------|
| 2-aminoetanotiol.HCl   | Sigma-Aldrich  | Pró-análise    |
| Apotransferrina  | Sigma-Aldrich  | Pró-análise    |
| Bicarbonato de Sódio (NaHCO <sub>3</sub> )   | Sigma-Aldrich  | Pró-análise    |
| Borohidreto de sódio   | Riedel-de Haën | Pró-análise    |
| Brometo de alilo   | Sigma-Aldrich  | Pró-análise    |
| Carbonato de potássio (K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )  | Sigma-Aldrich  | Pró-análise    |
| Cloreto de Sódio (NaCl)  | Sigma-Aldrich  | Pró-análise    |
| Dextran (Origen Natural-10000g/mol; 62 unidades glucose/mol)                                   | Sigma-Aldrich  | Pró-análise    |
| Éster-tri-tert-butilico de dota (do <sub>3</sub> ButCOOH)                                      | Chematech      | Pró-análise    |
| Fosfato de sódio dibásico anidro (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )                           | Sigma-Aldrich  | Pró-análise    |
| Fosfato de sódio monobásico di-hidratado (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O) | Sigma-Aldrich  | Pró-análise    |
| Glutationa   | Sigma-Aldrich  | Pró-análise    |
| Hidróxido de sódio   | Panreac        | Pró-análise    |
| N,N'-Diciclohexilcarboimida (DCC)  | Sigma-Aldrich  | Pró-análise    |
| N,N-Diisopropiletilamina (DIPEA)   | Sigma-Aldrich  | Pró-análise    |
| N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida Hidroclorada (EDC)                                | Fluka          | Pró-análise    |

|  |                                    |             |
|--|------------------------------------|-------------|
| N-hydroxisucinimida (NHS)  | Sigma-Aldrich                      | Pró-análise |
| Permanganato de Potássio (KMnO <sub>4</sub> )  | Sigma-Aldrich                      | Pró-análise |
| Persulfato de amónia   | Sigma-Aldrich                      | Pró-análise |
| Tetraborato de Sódio (Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> .10H <sub>2</sub> O) | Sigma-Aldrich                      | Pró-análise |
| <b>Solvente</b>  |                                    |             |
| Acetonitrilo   | Fluka                              | Pró-análise |
| Ácido acético glacial  | Panreac                            | Pró-análise |
| Água deuterada   | Euriso-top <sup>®</sup>            | Pró-análise |
| Clorofórmio  | Fisher chemical                    | Pró-análise |
| Cyclohexano  | LAB-SCAN<br>Analytical<br>Sciences | Pró-análise |
| Diclorometano (DCM)  | Fisher Chemical                    | Pró-análise |
| Dimetilformamida (DMF)   | Fisher Chemical                    | Pró-análise |
| Dimetilsulfóxido (DMSO)  | Panreac                            | Pró-análise |
| Metanol  | Fisher Chemical                    | Pró-análise |

## 4.3 Métodos

### 4.3.1 Técnica de Purificação

#### 4.3.1.1 Diálise

A diálise consiste num fenómeno físico, que permite a separação de moléculas, por difusão seletiva, através de uma membrana semipermeável. A mistura que se pretende purificar é colocada nessa membrana fechada e colocada num recipiente com água. As moléculas de maiores dimensões ficam retidas na membrana e as de menores dimensões atravessam a membrana e difundem para a água.

A purificação dos compostos poliméricos foi realizada por este método. Assim, os sais e outros produtos indesejáveis que se formaram no decorrer das reações difundiram-se para a água, enquanto que os compostos derivados de dextrano ficaram retidos na membrana.

## 4.3.2 Técnicas de caracterização

### 4.3.2.1 Espetroscopia de Ressonância Magnética e Nuclear (RMN)

A espectroscopia é o estudo da radiação electromagnética com a matéria. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é um ramo da espectroscopia que explora as propriedades magnéticas de núcleos atômicos. Em química a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é frequentemente usada no estudo da estrutura dos compostos. Como outras técnicas espectroscópicas, a RMN depende das variações de energia quantificáveis que podem ser induzidas em pequenas moléculas quando estas são irradiadas por radiação electromagnética. O método funciona, de uma forma geral, da seguinte maneira: os núcleos dos elementos comportam-se como se fossem ímanes girando em torno de um eixo. Quando se coloca um composto num campo magnético muito forte e simultaneamente se irradia o composto com energia electromagnética, os núcleos podem absorver energia num processo denominado ressonância magnética. A absorção desta radiação pelos núcleos desses elementos é quantificada e dá origem a um espectro característico. Por volta de 1950, descobriu-se que as frequências de ressonância nuclear não dependem apenas da natureza dos núcleos atômicos, mas também do seu ambiente químico. A utilidade desta técnica tornou-se então muito óbvia, na medida que poderia ser utilizada para determinar o número e o tipo de grupos químicos num composto. O registo é apresentado como uma série de picos cujas áreas são proporcionais ao número de prótons que representam. Os deslocamentos químicos são medidos na escala horizontal do espectro, e normalmente expressos em partes por milhão (ppm). As posições são medidas em relação à absorção dos núcleos de um composto de referência.<sup>63</sup>

Esta técnica de Ressonância Magnética e Nuclear (RMN) foi utilizada ao longo do trabalho não só para identificar e caracterizar os novos derivados de dextrano que foram isolados, mas também permitiu verificar se a reação foi ou não completa, se o produto obtido é puro e finalmente se a reação foi bem sucedida.

Os espectros de RMN foram obtidos num espectrómetro Varian Unit Inova-300, com frequências de ressonância de 300 MHz para  $^1\text{H}$ , 75,5 MHz para  $^{13}\text{C}$ . Os espectros foram feitos em  $\text{D}_2\text{O}$ . Os desvios químicos dos sinais de  $^1\text{H}$  RMN foram referenciados utilizando o desvio químico residual da  $\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{D}_2\text{O}$   $\delta_{\text{H}}$  4,67 ppm). Os desvios químicos dos sinais de  $^{13}\text{C}$  RMN foram referenciados relativamente a uma referência externa de 1,4-dioxano ( $\delta_{\text{C}}$  = 69,3 ppm).

#### 4.3.2.2 Cromatografia em Camada Fina (TLC)

As reações de síntese da ativação do ester tri ter-butilico de dota ( $\text{do}_3^t\text{ButCOOH}$ ) e da 2-(imino-metoxietil)-1-tio-manopiranosose foram monitorizadas por Cromatografia em Camada Fina (**Tin Layer Chromatography – TLC**), usando placas de sílica-gel Merk 60-F<sub>254</sub> com 2mm de espessura, em suporte de alumínio. No caso da 1ª reação as placas de cromatografia foram reveladas com uma solução de Permanganato de Potássio ( $\text{KMnO}_4$ ). A solução de  $\text{KMnO}_4$  foi preparada por dissolução de 3g de  $\text{KMnO}_4$  e 20g de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  em 300mL de  $\text{H}_2\text{O}$  e 5mL de NaOH 5%. Na reação de síntese do derivado da manose, as placas cromatográficas foram reveladas com radiação UV (254 nm) e/ou por aquecimento a 150°C após pulverização com o revelador ácido sulfúrico/etanol/água: 1/5/4.

#### 4.3.2.3 Medição da Atividade das soluções radioativas

A atividade das soluções de  $^{67}\text{Ga}$  foi medida numa câmara de ionização (Aloka, Curimeter IGC-3, Tokyo, Japan). Em clínica de MN, recorre-se à câmara de ionização para medir a atividade dos radiofármacos, antes da sua administração nos pacientes. Uma câmara de ionização é um detetor gasoso composto por dois elétrodos separados por uma atmosfera gasosa. Geralmente, o vaso que contém a atmosfera gasosa é, ele próprio um dos elétrodos (cátodo) sendo o outro eletrodo (ânodo) um fio metálico fino no interior do sistema. A radiação gama interage com o gás contido no detetor provocando, eventualmente, ionização e a consequente libertação de eletrões. Estes são acelerados em direção ao ânodo e, se totalmente coletados pelo ânodo produzem uma corrente mensurável.<sup>1</sup>

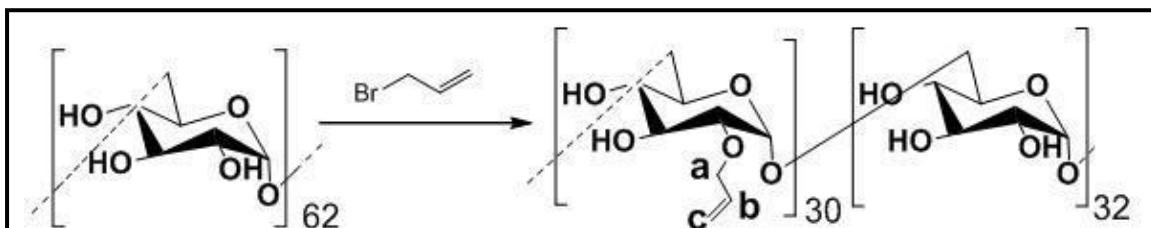
### **4.4 Síntese e caracterização dos compostos descritos nesta dissertação**

#### 4.4.1 Síntese do dextrano-amina

##### 4.4.1.1 Síntese do dextrano-alilo

Esta síntese foi realizada segundo o método descrito por M. Morais. A uma solução de dextrano (1,002 g, 0,1 mmol) em água destilada (7,5 mL) adicionou-se hidróxido de sódio (NaOH; 0,27 g, 6,75 mmol) e borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ; 0,022 g, 0,58 mmol). A solução foi colocada sob agitação a 55°C e adicionou-se brometo de

alilo (2,50 mL, 14,5 mmol). O pH foi mantido a 14 durante a reação com adição, gota a gota, de uma solução de hidróxido de sódio 2,5 M (10 mL). Após 20 horas, a solução foi neutralizada com solução de ácido acético 2,5 M e transferida para o interior de uma membrana para diálise (com troca de 10 volumes de água destilada). Após concentração da solução e liofilização, o dextrano-alilo foi obtido sob a forma de um sólido de cor branca (Figura 4.1).<sup>15,39,55</sup>



**Figura 4.1:** Síntese do Dextrano-alilo.

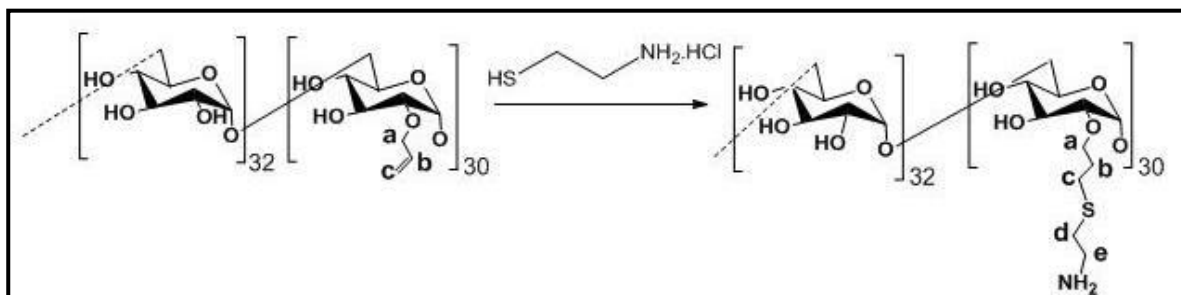
Com base na relação das áreas dos valores de integração dos sinais correspondentes ao próton anomérico dos monómeros substituídos e não substituídos do espectro de <sup>1</sup>H-RMN do composto, estimou-se que o grau de substituição era 48%. Como o dextrano utilizado continha 62 unidades/mol, presumiu-se que o novo polímero de dextrano sintetizado teria 30 unidades alilo/mol dextrano.<sup>15,39,55</sup>

$$M[C_6H_{10}O_5]_{32}(C_9H_{14}O_5)_{30} = 11255 \text{ g/mol}$$

Rendimento: 68% (0,774g, 0,068 mmol)

<sup>1</sup>H-RMN (D<sub>2</sub>O, 20°C, δ ppm): 5,86 (m largo, H<sup>b</sup>); 5,22 (m largo, H<sup>c</sup>); 4,99 (s largo, 1,00 H, H<sub>anom. Subst.</sub>); 4,84 (s largo, 0,91 H, H<sub>anom.</sub>); 4,09 (d, H<sup>a</sup>); 3,80 – 3,33 (m, dextrano).

#### 4.4.1.2 Síntese do dextrano-amina



**Figura 4.2:** Síntese do Dextrano-amina.

Esta síntese foi realizada segundo o método descrito por M Morais. A uma solução de dextrano-alilo (0,430 g, 0,038 mmol) em DMSO seco (3 mL) foi adicionado 2-aminoetanotiol.HCl (0,7774 g, 6,843 mmol). A reação decorreu sob atmosfera inerte de azoto, para prevenir a oxidação do 2-aminoetanotiol. A reação só teve início com a adição de persulfato de amónia (0,1150 g, 0,5039 mmol). Após 3 horas sob agitação a 50°C, o volume foi duplicado com água destilada e o pH ajustado a 4 com uma solução de NaOH 2,5M. Seguidamente, a solução foi transferida para o interior de uma membrana para diálise. O dextrano-amina foi obtido sob a forma de um sólido de cor branca após concentração da solução de diálise e liofilização. Por <sup>1</sup>H-RMN do composto verificou-se que a conversão dos grupos alilo do polímero em grupos amina foi completa (Figura 4.2).<sup>15,39,55</sup>

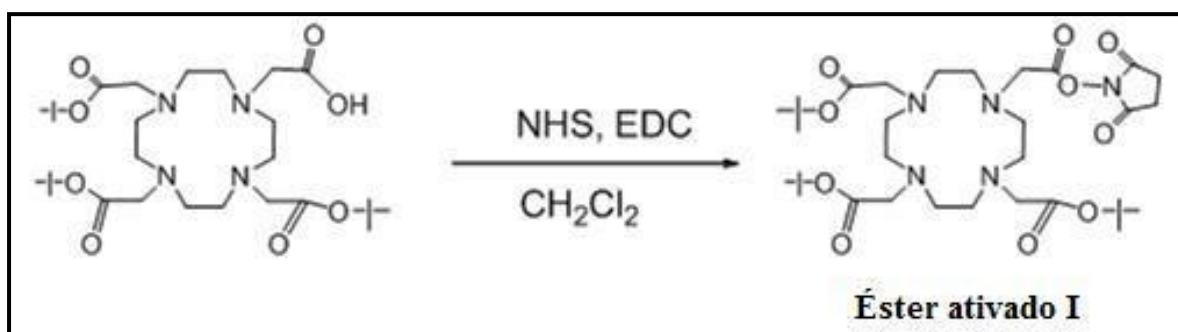
$$M[(C_6H_{10}O_5)_{32}(C_{11}H_{21}O_5NS)_{30}] = 13569 \text{ g/mol}$$

Rendimento: 92% (0,474 g, 0,035 mmol)

<sup>1</sup>H-RMN (D<sub>2</sub>O, 20°C, δ ppm): 4,80 (s largo, H<sub>anom. Subst.</sub>); 4,62 (s largo, H<sub>anom. não subst.</sub>); 3,38 (d, H<sup>a</sup>); 2,88 (t, H<sup>d</sup>); 2,52 (t, H<sup>e</sup>); 2,35 (s, H<sup>c</sup>); 1,57 (s, H<sup>b</sup>).

#### 4.4.2 Síntese do conjugado dextrano-amina-dota-tris(tBu)éster

##### 4.4.2.1 Síntese de Ativação do dota-tris(tBu)éster [ácido 2-(4,7,10-tris(2-(terbutoxi-2-oxoetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-il)acético]



**Figura 4.3:** Síntese de ativação do éster do <sup>t</sup>ButCOOH

A uma solução de do<sub>3</sub><sup>t</sup>ButCOOH (0,15 g, 0,26 mmol) e NHS (0,043 g, 0,37 mmol) em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (5 mL) adicionou-se lentamente diciclohexilcarbodiimida (DCC, 1,2 eq, 0,0643 0,31 mmol). A reação foi deixada sob agitação, à temperatura

ambiente, durante a noite. Fez-se o controlo da mistura reacional por cromatografia em camada fina ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ ; 9:1), e verificou-se que a reacção não tinha evoluído. Adicionou-se quantidades iguais às utilizadas anteriormente de DCC e NHS. Após 6 horas verificou-se a formação de um precipitado branco, a ureia. Fez-se novamente o controlo da reacção por TLC e verificou-se que a reacção tinha avançado, no entanto, não era completa. Deixou-se reagir à temperatura ambiente até o dia seguinte e verificou-se que a reacção tinha sido completa, tendo-se relevado uma mancha correspondente ao éster ativado ( $R_f = 0,46$ )<sup>60</sup>

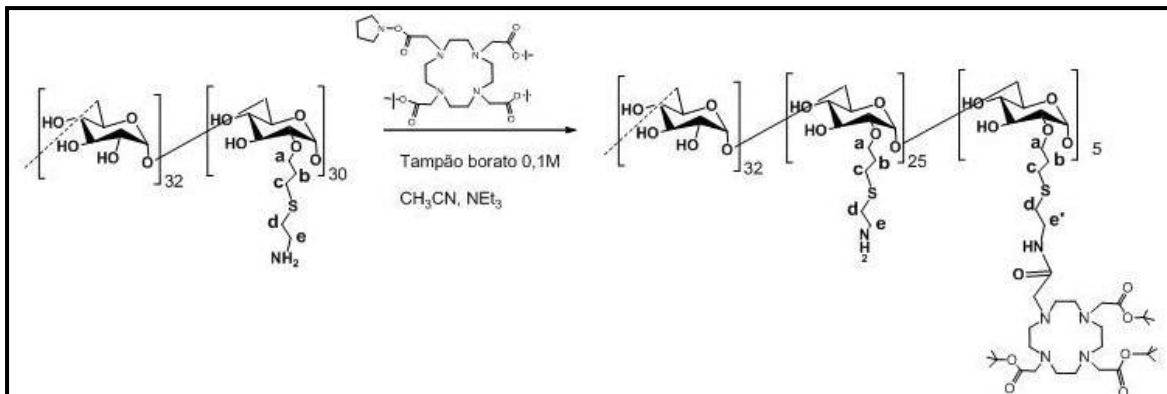
Filtrou-se, redissolveu-se o produto em acetonitrilo, tornou-se a filtrar a ureia e repetiu-se esta operação uma ou outra vez. O produto foi utilizado de seguida sem qualquer purificação adicional (Figura 4.3)<sup>60</sup>

#### 4.4.2.2 Síntese do conjugado dextrano-amina-do<sub>3</sub><sup>1</sup>ButCOOH

A uma solução de dextrano-amina (0,151 g, 0,011 mmol) em tampão borato 0,1M, pH = 9 (5 mL) foi adicionado uma solução de acetonitrilo (1 mL) contendo o éster ativado sintetizado anteriormente e uma gota de  $\text{Et}_3\text{N}$ , como catalizador. Adicionaram-se umas gotas de  $\text{H}_2\text{O}$ , para melhor dissolução do polímero, e a mistura reacional ficou sob agitação durante 24 horas. A solução ficou ligeiramente turva. Utilizou-se tampão borato para garantir que o pH da solução se mantinha básico, condição necessária para que a amina do dextrano seja desprotonada e se dê a reacção de amidação. O tampão borato foi preparado adicionando HCl a uma solução de tetraborato de sódio, até se obter o pH 9. O pH da solução foi medido com um eléctrodo Mettler Toledo acoplado a um potenciómetro EXTECH Instruments, Model 671.

Após 24h de reacção, a solução foi transferida para o interior de uma membrana de diálise, com troca de 5 volumes de água destilada. A solução contendo o dextrano-amina-do<sub>3</sub><sup>1</sup>ButCOOH foi concentrada e liofilizada, tendo sido obtido um sólido de cor branca (Figura 4.4).<sup>15,39,55</sup>

O grau de conjugação da unidade do<sub>3</sub><sup>1</sup>ButCOOH ao dextrano-amina foi calculado por <sup>1</sup>H-RMN relacionando o valor da integração do sinal dos grupos  $\text{CH}_3$  correspondentes à unidade do<sub>3</sub><sup>1</sup>ButCOOH (1,34 ppm) com o valor da integração do sinal dos prótons metilénicos H e, adjacentes ao grupo amina livre que não reagiu (2.72 ppm).



**Figura 4.4:** Síntese do Dextrano-amina-do<sub>3</sub><sup>t</sup>ButCOOH.

$$M[(C_6H_{10}O_5)_{32}(C_{11}H_{21}O_5NS)_{25}(C_{39}H_{72}O_{12}N_5S)_5] = 16346 \text{ g/mol}$$

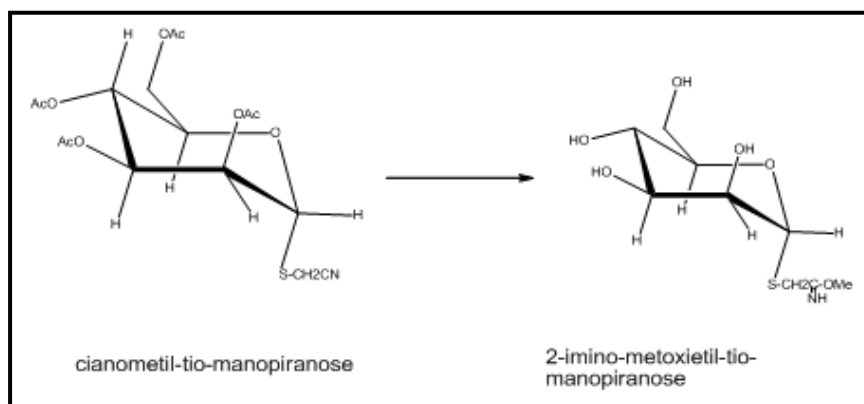
Rendimento: 73% (0,130 g, 0,008 mmol)

**<sup>1</sup>H-RMN** (D<sub>2</sub>O, 20°C, δ ppm): 4,99 (s largo, H<sub>anom. Subst.</sub>); 4,82 (s largo, H<sub>anom. não subst.</sub>); 3,66 – 3,17 (m); 3,10 (t, H<sup>d</sup>); 2,90 (s largo); 2,74 (t, H<sup>e</sup>); 2,55 (s,largo); 2,51 (s) 2,30 (m); 1,75 (s largo, Hb grupo amina que não reagiu); 1,34 (s, CH<sub>3</sub> do grupo <sup>t</sup>But).

**<sup>13</sup>C-RMN** (D<sub>2</sub>O, 20°C, δ ppm): 173,87 (C=O); 173,59 (C=O); 171,57 (C=O); 99,87 (C anomérico substituído); 97,97 (C anomérico não substituído); 29,27 (CH<sub>3</sub>, <sup>t</sup>But).

### 4.4.3 Síntese do conjugado dextrano-amina-do<sub>3</sub><sup>t</sup>But-manose

#### 4.4.3.1 Síntese da 2-(imino-metoxietil)-1-tio-manopiranosose

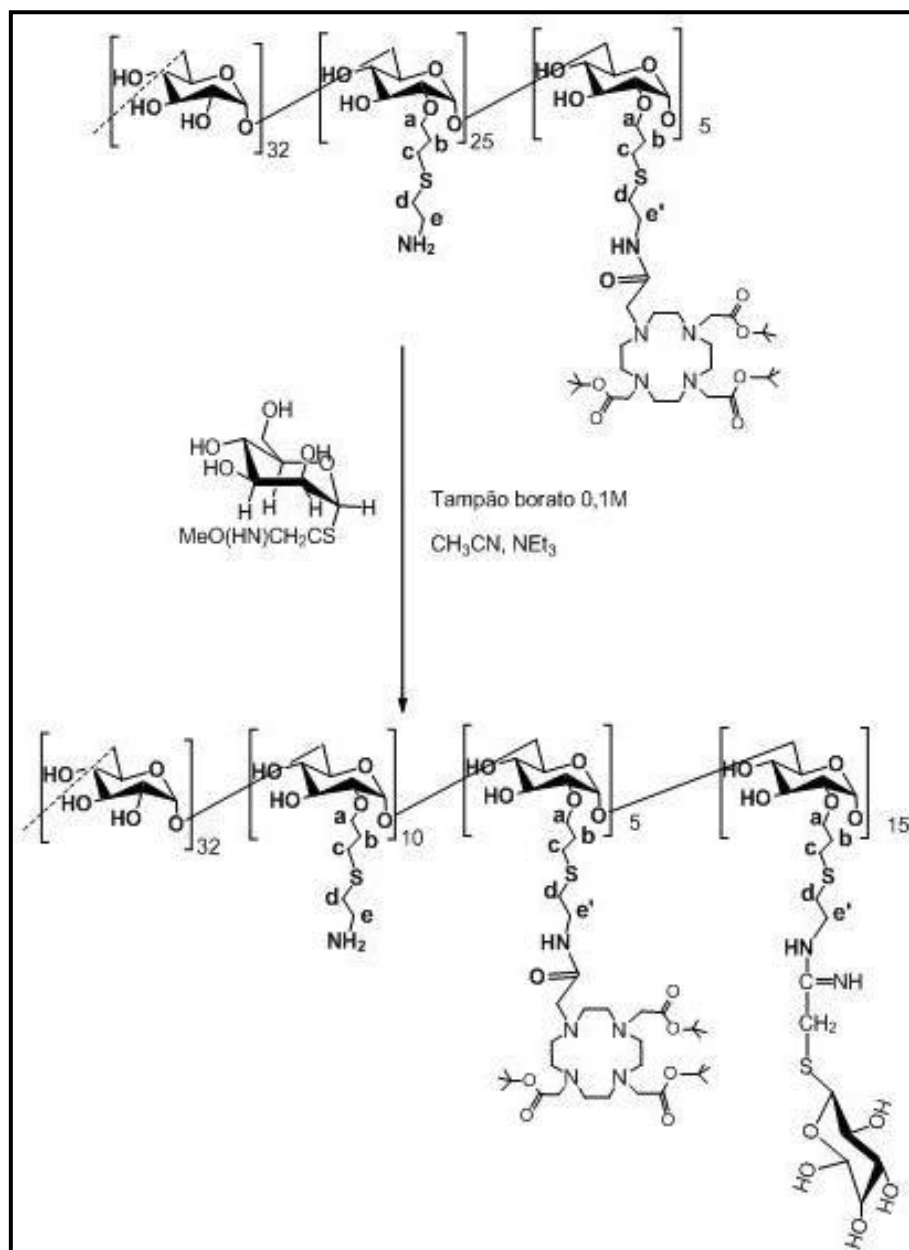


**Figura 4.5:** Síntese do 2-(imino-metoxietil)-1-tio-manopiranosose.

A uma solução de 0,1M de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-cianometil-1-tio-manopiranosose (0,280 g, 0,69 mmol) em metanol seco (6,622 mL) adicionou-se uma solução 0,01M de NaOMe (0,348 mL). A solução foi colocada sob agitação à temperatura ambiente e controlada por TLC (acetato de etilo/ácido acético/água; 8:2:1), identificou-se apenas uma mancha ( $R_f = 0,37$ ) ao fim de 20 horas, através do revelador (ácido sulfúrico/etanol/água; 1:5:4). O solvente foi evaporado a pressão reduzida e o xarope obtido foi usado imediatamente para conjugação ao composto dextrano-amina-do<sub>3</sub><sup>t</sup>ButCOOH (Figura 4.5).<sup>15,39,55</sup>

#### 4.4.3.2 Síntese do conjugado dextrano-amina-do<sub>3</sub><sup>t</sup>But-manose

Uma solução de dextrano-amina-do<sub>3</sub><sup>t</sup>ButCOOH (0,092 g, 0,006 mmol) em tampão borato 0,2 M, pH = 9 (5 mL) foi adicionada à solução metanólica contendo o 2-(imino-metoxi-etil)-1-tio-manopiranosose. A solução foi colocada sob agitação à temperatura ambiente. Após 20 horas, a solução límpida obtida foi transferida para o interior de uma membrana de diálise, com troca de 5 volumes de tampão borato 0,2 M, pH = 9 e 5 volumes de água destilada. O dextrano-amina-do<sub>3</sub><sup>t</sup>But-manose foi obtido sob a forma de um sólido de cor amarela após evaporação a pressão reduzida da solução aquosa (Figura 4.6).<sup>15,39,55</sup>



**Figura 4.6:** Síntese do Dextrano-amina-do<sub>3</sub><sup>t</sup>But-manose.

A determinação do número de unidades de manose conjugadas foi feita com base na análise do espectro de <sup>1</sup>H-RMN, relacionando o valor da integração do pico característico do próton anomérico da manose (δ 5,23 ppm) com o valor de integração dos grupos CH<sub>3</sub> correspondentes à unidade do<sub>3</sub><sup>t</sup>ButCOOH (δ 1,33 ppm).

$M[(C_6H_{10}O_5)_{32}(C_{11}H_{21}O_5NS)_{10}(C_{39}H_{72}O_{12}N_5S)_5(C_{19}H_{34}N_2O_{10}S_2)_{15}] = 19874 \text{ g/mol}$

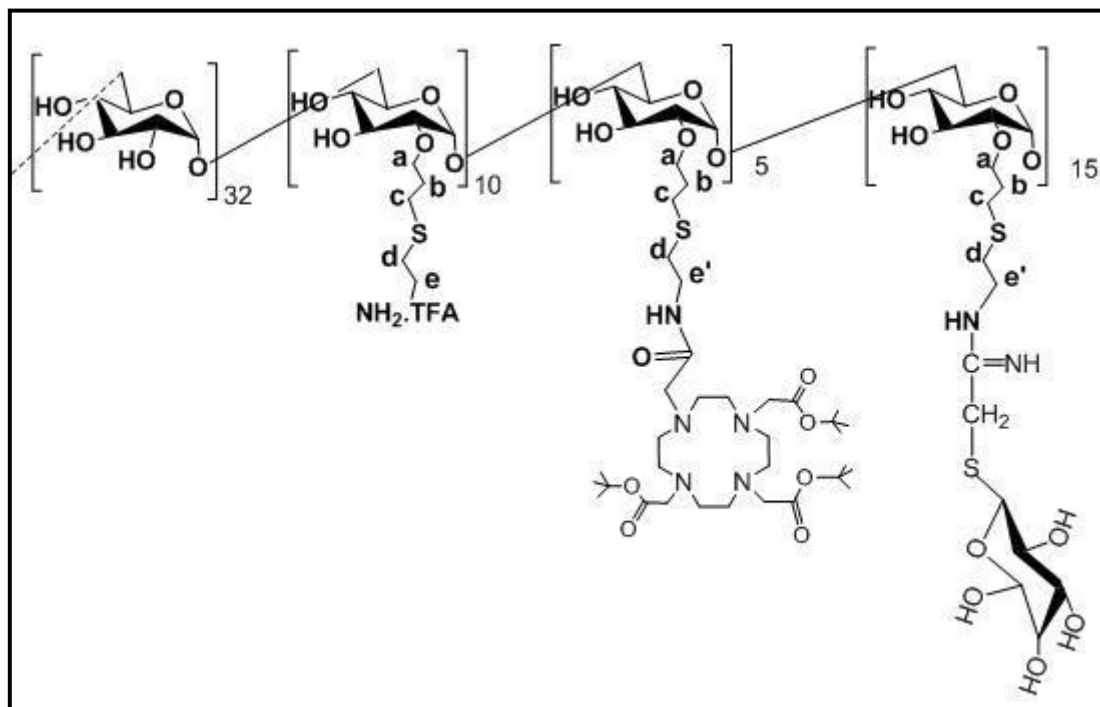
Rendimento: 67% (0,074 g, 0,004 mmol)

**<sup>1</sup>H-RMN** (D<sub>2</sub>O, 20°C, δ ppm): 5,23 (d, H anomérico manose); 4,97 (s largo, H<sub>anom.</sub> Subst.); 4,89 (s largo, H<sub>anom.</sub> não subst.); 3,74 – 3,19 (m); 2,71-2,66 (m); 2,53 (s,largo); 2,27 (s largo) (m); 1,74 (s largo, Hb grupo amina que não reagiu); 1,33 (s, CH<sub>3</sub> do grupo <sup>t</sup>But).

**<sup>13</sup>C-RMN** (D<sub>2</sub>O, 20°C, δ ppm): 174,18 (C=O, dota); 173,88 (C=O, dota); 172,02 (C=O, dota); 160,05 (C=N); 28,97 (CH<sub>3</sub>, <sup>t</sup>But).

#### 4.4.4 Síntese do conjugado dextrano-amina-dota-manose

A uma solução de dextrano-amina-do<sup>t</sup>But-manose (0,062, 0,003 mmol) foi adicionado TFA (3 mL), para promover a hidrólise do grupo protetor Boc. A solução foi colocada sob agitação à temperatura ambiente. Após 3 horas, a solução, de cor alaranjada, foi transferida para o interior de uma membrana de diálise, com troca de 5 volumes água destilada. O dextrano-amina-dota-manose foi obtido sob a forma de um sólido de cor amarela, após evaporação a pressão reduzida da solução aquosa. O novo derivado de dextrano -dextrano-amina-dota-manose- foi dissolvido em 6 mL de H<sub>2</sub>O e dividido em alíquotas de 500, 200 e 100 µL e liofilizado (Figura 4.7).<sup>15,39,55</sup>



**Figura 4.7:** Síntese do Dextrano-amina-dota-manose.

$M[(C_6H_{10}O_5)_{32}(C_{11}H_{21}O_5NS.C_2HF_3O_2)_{10}(C_{19}H_{48}O_{12}N_5S)_5(C_{19}H_{34}N_2O_{10}S_2)_{15}] = 19692 \text{ g/mol}$   
Rendimento: 100% (0,060 g, 0,003 mmol)

**$^1\text{H-RMN}$**  ( $D_2O$ ,  $20^\circ\text{C}$ ,  $\delta$  ppm): 5,20 (d, H anomérico manose); 5,16 (s largo, H<sub>anom. Subst.</sub>); 5,10 (s largo, H<sub>anom. não subst.</sub>); 4,88 (H<sub>anom.</sub>); 3,82 – 3,06 (m); 3,04 (t); 2,70 (t); 2,50 (s, largo); 2,25 (s, largo); 1,70 (s largo, Hb grupo amina que não reagiu).

**$^{13}\text{C-RMN}$**  ( $D_2O$ ,  $20^\circ\text{C}$ ,  $\delta$  ppm): 174,24 (C=O, dota); 173,92 (C=O, dota); 172,02 (C=O, dota); 169,98 (C=O, amida); 165,46 (C=N); 162,75 ( $CF_3COO^-$ ); 118,50 ( $CF_3COO^-$ ); 97,97 (C anomérico não substituído); 96,09 (C anomérico substituído).

## 4.5 Síntese radioquímica do conjugado polimérico radioativo $^{67}\text{Ga}$ -[dextrano-amina-dota-manose]

O manuseamento das substâncias radioativas ( $^{67}\text{Ga}$ ) foi realizado sob condições de proteção e segurança radiológica, numa hotte com extração, com um visor de chumbo. A manipulação das doses radioativas foi realizada com os devidos protetores de chumbo. O uso de um dosímetro individual de corpo e pulso foi outra medida utilizada para a monitorização da exposição à radiação.

### 4.5.1 Síntese do $^{67}\text{GaCl}_3$

Para a conversão do citrato de Gálio em cloreto de gálio, utilizaram-se minicolunas compatadas, sep-Pack de sílica (Cartridges, Waters®, EUA). O citrato de gálio foi diluído com 2 mL de  $H_2O$  e aplicado na minicoluna. Seguidamente fez-se passar cerca de 10 mL de  $H_2O$  na coluna, para remover o citrato em excesso. Eluíu-se, seguidamente, a coluna com 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{HCl}$  0,1M, para se converter o citrato de gálio a cloreto de gálio, e recolheram-se frações de 100  $\mu\text{L}$ . Mediu-se a atividade de cada uma das frações, tendo-se utilizado a fração que apresentou maior atividade. O controlo de qualidade foi realizado com recurso ao sistema cromatográfico: Papel Whatman nº 1 como fase estacionária e uma mistura de  $\text{NaCl}$  0,9% /  $\text{HCl}$  0,1M (25:0.5) como fase móvel. A análise da tira de papel Whatman nº 1 foi realizada no radiocromatógrafo.<sup>62</sup>

#### 4.5.2 Preparação do conjugado polimérico radioativo de $^{67}\text{GaCl}_3$

Adicionou-se 150  $\mu\text{L}$  de  $^{67}\text{GaCl}_3$  (34,95  $\mu\text{Ci}$ ) a 50  $\mu\text{L}$  de uma solução (dextrano-amina-dota-manose) (0,1 mg / 500 $\mu\text{L}$  tampão acetato, pH=5). Aqueceu-se a solução durante 30 minutos a 100°C.

O controlo de qualidade foi realizado com recurso ao sistema cromatográfico: Papel Whatman nº 1 como fase estacionária e uma mistura de NaCl 0,9% / HCl 0,1M (25:0.5) como fase móvel. A análise da tira de papel Whatman nº 1 foi realizada no radiocromatógrafo.

### 4.6 Estudos de estabilidade *in vitro* do conjugado polimérico radioativo de $^{67}\text{Ga}$

#### 4.6.1 Estabilidade nas soluções de reação

A estabilidade do composto radioativo  $^{67}\text{Ga}$ -dextrano-amina-dota-manose foi analisada após 24 horas à temperatura ambiente. O controlo de qualidade foi realizado com recurso ao sistema cromatográfico: Papel Whatman nº 1 como fase estacionária e uma mistura de NaCl 0,9% / HCl 0,1M (25:0.5) como fase móvel. A análise da tira de papel Whatman nº 1 foi realizada no radiocromatógrafo.

#### 4.6.2 Estabilidade na presença de apotransferrina e glutatona

A uma solução contendo um excesso de apotransferrina (3 mg/ mL bicarbonato de sódio, pH = 7,4) e glutatona [ $1 \times 10^{-3}$  M em tampão fosfato salino (**Phosphate buffered saline - PBS**), pH = 7,4)] adicionou-se o conjugado polimérico (dextrano-amina-dota-manose). A mistura foi mantida a 37°C, durante 2 horas para a glutatona, e durante 24 horas para a apotransferrina. O controlo de qualidade foi realizado com recurso ao sistema cromatográfico: Papel Whatman nº 1 como fase estacionária e uma mistura de NaCl 0,9% / HCl 0,1M (25:0.5) como fase móvel. A análise da tira de papel Whatman nº 1 foi realizada no radiocromatógrafo.

A solução de PBS – Solução salina de fosfato 0,1M – foi preparada com a seguinte composição: 0,82% de cloreto de sódio, 0,16% de fosfato de sódio dibásico anidro, 0,02% de fosfato de sódio monobásico dihidratado. O pH final da solução era de 7,39.

## 5. Referências Bibliográficas

---

1. Lima AP, Abrunhosa A, Dourado A, Oliveira AD, Guerreiro C, Costa DC, et al. Física em Medicina Nuclear – Temas e aplicações. Coimbra: Imprensa Da Universidade de Coimbra; 2008.
2. Gopal B. Saha. Fundamentals of Nuclear Pharmacy. 5ª ed. New York: Springer-Verlag, 2004.
3. Kowalsy RJ, Falen SW. Radiopharmaceuticals in nuclear pharmacy and nuclear medicine. 2ª ed. N.W., Washington: Amer Pharmacists Assn; 2004.
4. Schwarz SW, Anderson CJ, Downer JB. Radiochemistry and Radiopharmacology. In Nuclear Medicine Technology and Techniques. 4ª ed. St. Louis: Mosby Year Book; 1997.
5. Christian P, Waterstram-Rich K. Nuclear Medicine and PET/CT – Technology and Techniques. 7ª ed. St Louis, Missouri: Elsevier Mosby; 2011.
6. Biersack HJ, Freeman LM, editors. Clinical Nuclear Medicine. Germany: Springer-Verlag; 2007;
7. Wangler C, Schäfer M, Schirmacher R, Bartenstein P, Wängler B. DOTA derivates for site-specific biomolecule-modification via click chemistry: synthesis and comparison of reaction characteristics. Bioorg Med Chem. 2011; 19(12): 3864-74.
8. Young B, Heath JW. Wheaters functional histology. 4ª ed, Edinburgh: Churchill; 2000.
9. Espanha M, Correia PP, Pascoal AG, Silva PA, Oliveira R. Anatomofisiologia – TOMO III – Funções da Vida Orgânica Interna. Lisboa: Universidade técnica de lisboa; 2001.
10. Wernick MN, Aarsvold JN. Emission Tomography: The Fundamentals of PET and SPECT. San Diego: Elsevier; 1994.
11. Yeung HWD, Cody HS, Turlakow A, Riedel ER, Fey J, Gonen M, et al. Lymphoscintigraphy and Sentinel Node Localization in Breast Cancer Patients: A Comparison Between 1-Day and 2-Day Protocols. J Nucl Med. 2001; 42:420-423.
12. Jain R, Dandekar P, Patravale V. Diagnostic nanocarriers for sentinel lymph node imaging. Journal of Controlled Release. 2009; 138:90-102.

13. Rossi CR, Salvo GL, Trifirò G, Mocellin S, Landi G, Macripò G, et al . The Impact of Lymphoscintigraphy Technique on the Outcome of Sentinel Node Biopsy in 1,312 Patients with Cutaneous Melanoma: An Italian Multicentric Study (SOLISM-IMI). *J Nucl Med.* 2006; 47:234-241.
14. Mariani G, Moresco L, Viale G, Villa G, Bagnasco M, Canavese G, et al. Radioguided Sentinel Lymph Node Biopsy in Breast Cancer Surgery. *J Nucl Med.* 2001; 42:1198-1215.
15. Morais M, Subramanian S, Pandey U, Samuel G, Venkatesh M, Martins M, et al. Mannosylated Dextran Derivatives Labeled with fac-[M(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (M = <sup>99m</sup>Tc, Re) for Specific Targeting of Sentinel Lymph Node. *Mol Pharmaceutics.* 2011; 609-620.
16. Sharma R, Wendt JA, Rasmussen JC, Adams KE, Marshall MV, Muraca EM. New horizons for imaging lymphatic function, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008; 1131: 13-36.
17. Kim EE, Mar MV, Inoue T, Chung JK, editors. *Sectional Anatomy – PET/CT and SPECT/CT.* New York: Springer; 2007.
18. Scolyer RA, Murali R, Satzger I, Thompson JF. The detection and significance of melanoma micrometastases in sentinel nodes. *Surg Oncol.* 2008; 17:165-174.
19. Cicco C, Cremonesi M, Luini A, Bartolomei M, Grana C, Prisco G, et al. Lymphoscintigraphy and Radioguided Biopsy of the Sentinel Axillary Node in Breast Cancer. *J Nucl Med.* 1998; 39:2080-2084.
20. Sato K. Current technical overviews of sentinel lymph node biopsy for breast cancer. *Breast Cancer.* 2007; 14:354-361.
21. Sicart SV, Paredes P, Zanón G, Pahisa J, Róman SM, Caparrós X, et al. Added Value of Intraoperative Real-Time Imaging in Searches for Difficult-to-Locate Sentinel Nodes. *J Nucl Med.* 2012; 51:1219-1225.
22. Hindié E, Groheux D, Brenot-Rossi I, Rubello D, Moretti JL, Espié M. The Sentinel Node Procedure in Breast Cancer Surgery: Nuclear Medicine as the Starting Point. *J. Nucl. Med.* 2011; 52:405-414.
23. Somasundaram SK, Chicken DW, Keshtgar MRS. Detection of the sentinel lymph node in breast cancer, *Br. Med. Bull.* 2007; 84:117-131.
24. Wallace AM, Comstock C, Hoh CK, Vera DR. Breast imaging: a surgeon prospective, *Nucl.Med.Biol.*2005; 32:781-792.

25. Kumar R, Jana S, Heiba SI, Dakhel M, Axelrod D, Siegel B, et al. Retrospective Analysis of Sentinel Node Localization in Multifocal, Multicentric, Palpable or Nonpalpable Breast Cancer. *J Nucl Med.* 2003; 44:7-10.
26. <http://novaradiologia.blogspot.pt/2010/05/linfonodo-sentinela-cancer-de-mama.html>
27. Vera DR, Wallace AM, Hoh CK, Mattrey RFA. A Synthetic Macromolecule for Sentinel Node Detection:  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA-Mannosyl-Dextran. *J. Nucl. Med.* 2001; 42:951-959.
28. Vermeeren L, Olmos RAV, Klop WMC, Balm AJM, Brekel MWM. A Portable  $\gamma$ -Camera for Intraoperative Detection of Sentinel Nodes in the Head and Neck Region. *J Nucl Med.* 2012; 51:700-703.
29. Tsopelas C, Sutton R. Why certain dyes are useful for localization the sentinel lymph node, *J. Nucl. Med.* 2002; 43:1377-1382.
30. Phillips WT, Klipper R, Goins B. Use of  $^{99m}\text{Tc}$ -Labeled Liposomes Encapsulating Blue Dye for Identification of the Sentinel Lymph Node. *J Nucl Med.* 2001; 42:446-451.
31. Brouwer OR, Buckle T, Vermeeren L, Klop WMC, Balm AJM, Poel HG et al. Comparing the Hybrid Fluorescent-Radioactive Tracer Indocyanine Green- $^{99m}\text{Tc}$ -Nanocolloid with  $^{99m}\text{Tc}$ -Nanocolloid for Sentinel Node Identification: A Validation Study Using Lymphoscintigraphy and SPECT/CT. *J Nucl Med.* 2012; 53:1-7.
32. Berg NSV, Brouwer OR, Klop WMC, Karakullukcu B, Zuur CL, Tan IB et al. Concomitant radio- and fluorescence-guided sentinel lymph node biopsy in squamous cell carcinoma of the oral cavity using ICG- $^{99m}\text{Tc}$ -nanocolloid. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2012) 39:1128-1136.
33. Khullar O, Frangioni JV, Colson YL. Image-Guided Sentinel Lymph Node Mapping and Nanotechnology-Based Nodal Treatment in Lung Cancer using Invisible Near-Infrared Fluorescent Light. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2011; 21(4):1-16.
34. Leeuwen AC, Buckle T, Bendle G, Vermeeren L, Olmos RV, Poel HG et al. Tracer-cocktail injections for combined pre- and intraoperative multimodal imaging of lymph nodes in a spontaneous mouse prostate tumor model. *Journal of Biomedical Optics.* 2011; 16:1-11.
35. Kerrou K, Pitre S, Countant C, Rouzier R, Ancel PY, Lebeaux C et al. The Usefulness of a Preoperative Compact Imager, a Hand-Held  $\gamma$ -Camera for

- Breast Cancer Sentinel Node Biopsy: Final Results of a Prospective Double-Blind, Clinical Study. *J Nucl Med.* 2011; 52:1346-1353.
36. Eshima D, Fauconnier T, Eshima L, Thornback JR. Radiopharmaceuticals for lymphoscintigraphy: Including dosimetry and radiation considerations, *Sem. Nucl. Med.* 2000; 1:25-32.
  37. Jeong JM, Hong MK, Kim YJ, Lee J, Kang JH, Lee DS, et al. Development of <sup>99m</sup>Tc-mannosyl human serum albumin (<sup>99m</sup>Tc-MSA) as a novel receptor binding agent for sentinel lymph node imaging, *Nucl.Med.Commun.* 2004; 12:1211-1217.
  38. Wilhelm AJ, Mijnhout S, Franssen EJJ. Radiopharmaceuticals in sentinel lymph node detection: an overview, *Eur.J.Nucl.Med.* 1999; 36-42.
  39. Pirmettis I, Arano Y, Tsoதாகos T, Okada K, Yamaguchi A, Uehara T, et al. New <sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub> Mannosylated Dextran Bearing S-Derivatized Cysteine Chelator for Sentinel Lymph Node Detection. *Mol. Pharmaceutics.* 2012; 1681-1692.
  40. Choi JY, Jeong JM, Yoo BC, Kim K, Kim Y, Yang BY et al. Development of <sup>68</sup>Ga-labeled mannosylated human serum albumin (MSA) as a lymph node imaging agent for positron emission tomography. *Nuclear Medicine and Biology.* 2011; 38:371-379.
  41. Buckle T, Leeuwen AC, Chin PTK, Janssen H, Muller SH, Jonkers J et al. A self-assembled multimodal complex for combined pre- and intraoperative imaging of the sentinel lymph node. *Nanotechnology.* 2010; 21:1-9.
  42. Fraser LP, Ezekowitz RAB. Mannose receptor and phagocytosis. *Adv.Cell.Molec.Biol. Membranes Organelles.* 1999; 5:87-101.
  43. Takagi K, Uehara T, Kaneko E, Nakayama M, Koizumi M, Endo K, et al. <sup>99m</sup>Tc-labeled mannosyl-neoglycoalbumin for sentinel lymph node identification, *Nucl.Med.Biol.* 2004; 31:893-900.
  44. Ichihara FM, Miiluniemi M, Karikoski M, Maksimow M, Niemelä J, Pomares LM et al. Macrophage mannose receptor on lymphatics controls cell trafficking. *Journal of the ASH.* 2011; 112:64-72.
  45. Noorman F, Rijkken DC. Regulation of tissue-type plasminogen activator concentrations by clearance via the mannose receptor and others. *Fibrinolysis & Proteolysis.* 1997; 173-186.
  46. Zhang H, MA Y, Sun XL. Recent developments in carbohydrate-decorated targeted drug / gene delivery. *Med. Chem. Res.* 2010; 30:270-289.

47. Leong SPL, Kim J, Ross M, Faries M, Scoggins CR, Metz WLR et al. A Phase 2 Study of  $^{99m}\text{Tc}$ -Tilmanocept in the Detection of Sentinel Lymph Nodes in Melanoma and Breast Cancer. *Ann Sur Oncol*. 2011; 18:961-969.
48. Henze E, Schelbert HR, Collins JD, Najafi A, Barrio JR, Bennett LR. Lymphoscintigraphy with Tc-99m-Labeled Dextran. *J. Nucl. Med*. 1982; 23:923-929.
49. Heinze T, Liebert T, Heublein B, Horning S. Functional polymers based on dextran, *Adv.Polym.Sci*. 2006; 205:199-291.
50. Núñez EGF, Faintuch BL, Teodoro R, Wiecek DP, Silva NG, Papadopoulos M, et al. Parameters optimization defined by statistical analysis for cysteine-dextran radiolabeling with technetium tricarbonyl core. *Applied Radiation and Isotopes*. 2001; 69:663-669.
51. Wingard K, Strand S. Evaluation in vitro and in vivo of two labeling techniques of different  $^{99m}\text{Tc}$  for lymphoscintigraphy. *Eur.J.Nucl.Med*. 1989; 15:146-151.
52. Matsunga K, Hara K, Imamura T, Fujioka T, Takata J, Karube Y. Technetium labeling of dextran incorporating cysteamine as a ligand, *Nucl. Med. Biol*. 2005; 32:279-285.
53. Vera DR, Wallace AM, Hoh CK. [ $^{99m}\text{Tc}$ ]-MAG<sub>3</sub>-mannosyl-dextran: a receptor-binding radiopharmaceutical for sentinel node detection, *J. Nucl. Med*. 2001; 28:493-498.
54. Ting R, Aguilera TA, Crisp JL, Hall DJ, Eckelman WC, Vera DR et al. Fast  $^{18}\text{F}$  Labeling of a Near-Infrared Fluorophore Enables Positron Emission Tomography and Optical Imaging of Sentinel Lymph Nodes. *Bioconjugate Chem*. 2012; 21:1811-1819.
55. Morais M. Compostos de  $^{99m}\text{Tc(I)}$  contendo conjugados dextrano-manose. [tese]. Lisboa: Universidade de Lisboa; 2008.
56. Kim, Jin, Chung KH, Lee CM, Seo YS, Song HC et al. Lymphatic Delivery of  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled Dextran Acetate Particles Including Cyclosporine. *A. J. Microbiol. Biotechnol*. 2008; 18(9):1599-1605.
57. Keliher EJ, Yoo J, Nahrendorf M, Marinelli B, Newton A, Pittet MJ et al.  $^{89}\text{Zr}$ -Labeled Dextran Nanoparticles Allow in Vivo Macrophage Imaging. *Bioconjugate Chemistry*. 2011; 22(12):2383-2389.
58. Meyer GJ, Mäcke H, Schuhmacher J, Knapp WH, Hofmann M.  $^{68}\text{Ga}$ -labelled DOTA-derivatised peptide ligands. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2004; 31: 1097-1104.

59. Costa RF. Desenvolvimento de métodos de purificação do Gálio-67 e Gálio-68 para a marcação de biomolécula. [tese]. São Paulo: Autarquia Associada à Universidade de São Paulo; 2012.
60. Wiley J and Sons. Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms, and Structure. 3<sup>a</sup> ed. New York: Jerry March; 1985.
61. Arranz F, Roman JS, Chaves M. <sup>13</sup>C Study of selectivity in modification of dextran with ethyl chloroformate. *Macromolecules*. 1987; 20: 801-806.
62. Scasnár V, Lier JEV. The use of SEP-PAK SI cartridges for the preparation of gallium chloride from the citrate solution. *Eur J Nucl Med*. 1993; 20:273.
63. Becker H, Berger W, Pomschke G, Fanghänel E, Fault J, Fischer M et al. *Química orgânica Experimental*. 5 ed. Berlim (R.D.A.), Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa; 1965.