

Novas aplicações do radiofármaco
Ubiquidina₂₁₋₄₉ no diagnóstico por imagem
SPECT/PET/CT de doenças negligenciáveis

Coordenadora: Dra. Lorena Pozzo

IPEN, 2017

Resumo

Na última década, diversos esforços foram dedicados ao desenvolvimento de novos produtos radiofarmacêuticos para a detecção de infecções por patógenos e sua diferenciação de inflamações estéreis. A ubiquidina (UBI_{29-41}) é um peptídeo antimicrobiano catiônico sintético que se liga preferencialmente à membrana celular bacteriana no local da infecção e tem demonstrado um grande potencial para o diagnóstico de infecções. Atualmente, o Centro de Radiofarmácia do IPEN estabeleceu um protocolo de radiomarcagem e controle de qualidade do fragmento de UBI_{29-41} com ^{99m}Tc , com o objetivo de comercializar uma formulação liofilizada para diagnóstico de focos de infecção por bactérias.

Apesar do reconhecimento da UBI_{29-41} radiomarcada na detecção de infecções bacterianas e fúngicas, o seu uso na detecção de infecções parasitárias ainda não foi estudado até hoje. Nossos dados preliminares e inéditos demonstraram que a UBI_{29-41} radiomarcada com ^{99m}Tc é capaz de ligar *in vitro* ao parasita *Trypanosoma cruzi*, responsável pela doença de Chagas. Esta doença parasitária apresenta elevada morbidade na América Latina e pode ser fatal. Até o momento, não existe vacina para esta doença e as estratégias de tratamento e abordagens diagnósticas não são totalmente eficientes para enfrentar esta infecção parasitária.

Neste contexto, nosso objetivo principal é expandir o uso da UBI_{29-41} para o diagnóstico por imagem de doenças negligenciadas e de grande relevância no contexto nacional.

A análise não invasiva de todo o corpo com a tecnologia de imagem por SPECT/PET/CT específica para patógenos pode melhorar significativamente a qualidade de vida dos pacientes, identificando rapidamente uma fonte de infecção e monitorando a resposta ao tratamento. Dessa forma, este projeto visa implementar uma tecnologia que não existe clinicamente no Brasil.

Índice

Resumo	2
1. Introdução.....	4
1.1. Ubiquidina	5
1.2. Situação atual da ^{99m}Tc -UBI ₂₉₋₄₁ no Centro de Radiofarmácia do IPEN	6
1.3. Novas aplicações para UBI-29-41 radiomarcada: Doença de Chagas	6
2. Objetivos	8
3. Metodologia	9
3.1. Radiomarcção da UBI ₂₁₋₄₉ com ^{99m}Tc	9
3.2. Radiomarcção da UBI ₂₁₋₄₉ com ^{68}Ga	9
3.3. Testes de controle de qualidade	9
3.4. Estudo de captação celular específica.....	9
3.5. Experimentos de retenção celular e internalização	10
3.6. Modelo animal de infecção por <i>Staphylococcus Aureus</i>	10
3.7. Modelo de animal de infecção por <i>Trypanossoma cruzi</i>	10
3.8. Estudos de biodistribuição	11
3.9. Imagem por SPECT/PET/CT	11
3.10. Adaptação do Laboratório de Imagens IPEN/USP para utilização de animais infectados, nível 2	12
4. Principais contribuições científicas ou tecnológicas	13
5. Cronograma físico	13
6. Orçamento detalhado	14
7. Participantes do projeto	15
Consultores	15
8. Infraestrutura e apoio técnico, estimativa de recursos técnicos de outras fontes	15
10. Referências bibliográficas	16

1. Introdução

De maneira geral, pacientes imunodeprimidos estão mais sujeitos a diferentes tipos de infecções (agudas, crônicas e de baixo grau), especialmente quando em ambiente clínico ou hospitalar. Esta redução imunológica pode ocorrer devido à ação da quimio ou radioterapia em casos de tratamento oncológico ou em pacientes transplantados, queimados e mesmo por cirurgias dos mais variados tipos. Além de provocar intervenções muitas vezes desconfortáveis e dolorosas, esta complicação aumenta os custos de cuidados de saúde (<http://datasus.saude.gov.br>). Um diagnóstico fácil e rápido, com respostas quanto à existência ou não de um micro-organismo, sua localização e natureza, é essencial para que seja iniciada uma terapia dirigida rápida e eficaz.

O diagnóstico atual clássico de infecções consiste em palpação, medição de temperatura, avaliação de soro sanguíneo, biopsias etc. Há também a possibilidade de uso de métodos de imagem como a Tomografia Computadorizada por Raios-X (TC), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e cintilografia (*Single Photon Emission Computed Tomography* – SPECT e *Positron Emission Tomography* – PET). Entretanto, sabe-se que os dois primeiros métodos levam à localização do foco de infecção somente quando já existem alterações anatômicas, ou seja, em estágio avançado da doença. Com a cintilografia, seja SPECT ou PET, a urgência necessária ao tratamento de infecções poderia ser contemplada uma vez que os focos iniciais podem ser imediatamente detectados a partir de radiofármacos específicos.

Nas últimas décadas a Medicina Nuclear tem procurado auxiliar no diagnóstico de focos de infecção e diferenciação dos processos inflamatórios. Esta pode ser uma poderosa ferramenta para delinear o foco de infecção antes e após o tratamento das infecções. Cada radiofármaco em estudo ou já proposto para esta finalidade apresenta sensibilidade específica, vantagens e desvantagens na detecção dos focos, mas não possui uma especificidade e seus diferentes mecanismos de captação na área de infecção estão relacionados com o aumento da permeabilidade vascular, migração de leucócitos para a área de infecção, ligação às proteínas plasmáticas, bactérias e metabolismo de glicose.

Dentre os radiofármacos utilizados para identificar processos de infecção e inflamação estão os leucócitos marcados com ^{99m}Tc , considerado o padrão ouro e o citrato de gálio (^{67}Ga), atualmente comercializado no Brasil. Os leucócitos marcados possuem a desvantagem da técnica laboriosa de marcação nem sempre disponível nos centros de Medicina Nuclear, enquanto o citrato de gálio (^{67}Ga) não é específico e possui energias desfavoráveis para a dosimetria do paciente e para a aquisição de imagens. Neste cenário, novas moléculas para diagnóstico de focos de infecção têm sido pesquisadas, particularmente envolvendo biomoléculas, como os peptídeos antimicrobianos. Nesta

categoria, a Ubiquidina na forma de um fragmento sintético (UBI 29-41) tem despertado cada vez mais o interesse de pesquisadores no desenvolvimento de radiofármacos para o diagnóstico do foco de infecção.

1.1. Ubiquidina

A ubiquidina (UBI) é um peptídeo natural com uma sequência de 59 aminoácidos por isto leva a denominação de UBI₁₋₅₉, peso molecular de 6,7 kDa e foi originalmente isolada a partir da fração citosólica de macrófagos murinos ativados com IFN-gama e depois foi isolada do canal de ar de células epiteliais humanas. Este peptídeo foi avaliado experimentalmente em camundongos e os resultados obtidos serviram para extrapolar os resultados para seres humanos, comprovando sua baixa imunogenicidade e resistência das bactérias em relação aos antibióticos clássicos, aumentando assim o interesse em avaliar sua eficácia na identificação de infecção. Diversos fragmentos de Ubiquidina foram sintetizados, marcados com ^{99m}Tc e avaliados quanto à especificidade na identificação de focos de infecção pela bactéria *S. aureus* e biodistribuição em alguns órgãos importantes no metabolismo de captação e eliminação do fragmento radiomarcado após uma hora de injeção. Dentre eles, o fragmento UBI₂₉₋₄₁ (Thr-Gly- Arg-Ala-Lys-Arg-Arg-Met-Gln-Tyr-Asn-Arg-Arg), foi o que apresentou as características mais favoráveis na obtenção de imagem de infecção, facilidade de marcação e biodistribuição (rápida excreção renal 22,3 ± 2,5 % AI/g, acúmulo no fígado de 13,5 ± 2,2 % AI/g, meia vida biológica ao redor de 142 minutos e taxa de Target/Non-target 2,04 ± 0,36) [1].

Diversos modelos de infecção com fungo e bactérias (*Scherichia Coli*, *Staphylococcus Aureus*, *Candida Albicans* *Aspergillus Fumigus*) têm sido utilizados para estudar o potencial da UBI₂₉₋₄₁ radiomarcada no diagnóstico de focos de infecção tanto *in vitro* como *in vivo*. Em todos estes estudos foi encontrado que a UBI₂₉₋₄₁ se liga aos agentes infecciosos *in vitro* e se acumula nos sítios de infecção *in vivo* [2-4]. Além do mais, a UBI₂₉₋₄₁ radiomarcada com ^{99m}Tc tem sido avaliada em estudos clínicos para diagnóstico de: osteomielite, suspeita de infecção óssea, artrite séptica, infecções nos pés de pacientes diabéticos, após cirurgia de implante de próteses e na identificação de focos de infecção em pacientes com febre e septemia associada a uma histiocitose [5-8].

De entre os patógenos testados com a UBI₂₉₋₄₁, o *Staphylococcus aureus* é considerado um dos principais patógenos humanos, destacando-se por sua elevada frequência e patogenicidade que o capacita a produzir doenças, tanto em indivíduos imunocomprometidos quanto em sãos e por sua fácil disseminação intra-hospitalar associada à resistência aos antimicrobianos [9-12]. A característica mais extraordinária do *S. aureus* é a sua elevada capacidade de adquirir resistência aos antibióticos. Nenhuma

outra espécie bacteriana, com semelhante nível de virulência para o organismo humano, apresenta tamanho grau de flexibilidade para suportar e sobreviver à terapia antimicrobiana [12]. Dessa forma, é necessária a adoção de programas de vigilância e o emprego de metodologias apropriadas para o diagnóstico precoce de infecção por esta bactéria.

1.2. Situação atual da ^{99m}Tc -UBI₂₉₋₄₁ no Centro de Radiofarmácia do IPEN

A ubiquidina tem despertado cada vez mais interesse no centro de radiofarmácia do IPEN e, recentemente, foram concluídos com sucesso os estudos de marcação e controle de qualidade do fragmento de UBI₂₉₋₄₁ com ^{99m}Tc , de forma a preparar uma formulação liofilizada para diagnóstico de focos de infecção [13]. Além do mais, já foram realizados estudos de genotoxicidade e citotoxicidade do fragmento UBI₂₉₋₄₁ que são pré-requisitos regulamentares para a realização de estudos clínicos com este radiofármaco, considerado novo no Brasil [13].

Nossos resultados [13], assim como da literatura demonstram que a UBI₂₉₋₄₁ radiomarcada apresenta um grande potencial para a identificação de focos de infecção por *S. aureus* e, dessa forma, é do nosso interesse colocar este radiofármaco à disposição nos centros de medicina nuclear do Brasil.

1.3. Novas aplicações para UBI-29-41 radiomarcada: Doença de Chagas

A infecção por doenças parasitárias causadas por protozoários e helmintos estão na base do desenvolvimento científico brasileiro há cerca de um século e a doença de Chagas congrega o maior número de pesquisadores do país atuando em uma mesma problemática [14]. Apesar do avanço significativo no controle da infecção vetorial e por transfusão de sangue, ainda hoje existem cerca de oito milhões de pessoas infectadas. O número de mortes é hoje de cerca de quatorze mil por ano e constitui a doença parasitária responsável pelo maior número de mortes na América Latina, superando a malária [14]. Portanto, cada vez mais estudos para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico específicos mais rápidos e eficientes são prioritários para o país. Nossos dados preliminares e inéditos demonstraram que a UBI₂₉₋₄₁ radiomarcada com ^{99m}Tc é capaz de ligar *in vitro* ao parasita *Trypanosoma cruzi*, responsável pela doença de Chagas (Figura 1). Estes dados demonstram uma nova aplicação da UBI₂₉₋₄₁ no diagnóstico de doenças negligenciáveis, como a doença de Chagas.

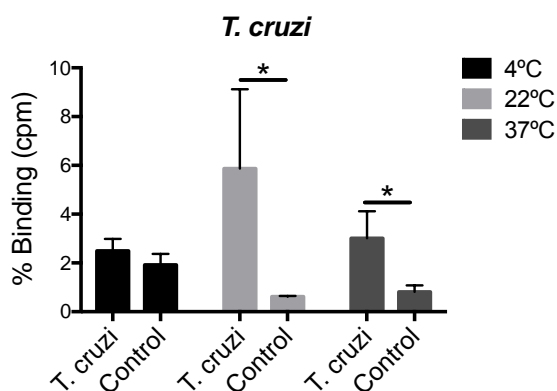


Figura 1. Ensaio de ligação in vitro da Ubiquitina-^{99m}Tc. 1×10^8 *T. cruzi*, foram incubados com $10 \mu\text{Ci}$ de ubiquitina-^{99m}Tc por 1 hora a 4°C, 22°C ou 37°C. A ligação da ubiquitina-^{99m}Tc foi analisada em um contador gamma tipo poço (Perkin Elmer). N=3, *p>0.05, **p>0.01, ***p>0.001.

Até o momento, o peptídeo UBI₂₉₋₄₁ marcado com ^{99m}Tc ou ⁶⁸Ga é o radiotraçador mais promissor para diferenciar infecções de inflamações. Entretanto, seu uso é bastante restrito internacionalmente e no Brasil, apesar de já ter sido objeto de estudo, é um radiofármaco pouco conhecido da comunidade médica.

Este projeto se insere no **Programa 1 - Radiofarmácia, Atividade 110 – Pesquisa e Desenvolvimento e Inovação de novos radiofármacos**, prevista no Plano Diretor do IPEN.

2. Objetivos

Para a aprovação de um radiofármaco de uso clínico, é essencial que se estabeleça o seu mecanismo de ação e os possíveis efeitos que sua administração pode causar ao paciente. Estes ensaios fazem parte dos estudos pré-clínicos que são obrigatórios de acordo com a RDC-64/2009 da ANVISA, como pré-requisito para a condução de estudos clínicos com novos radiofármacos. Dessa forma, nosso objetivo principal é realizar os teste pré-clínicos com a UBI₂₉₋₄₁ radiomarcada não só com ^{99m}Tc (para seu uso em SPECT) mas também com ⁶⁸Ga (PET) para o diagnóstico de doenças negligenciáveis como a doença de Chagas. Dessa forma nossos objetivos específicos são:

1. Avaliação *in vitro* da ligação de UBI₂₉₋₄₁ radiomarcada com ^{99m}Tc ou ⁶⁸Ga com as várias formas parasitárias de *T. cruzi* (Amastigota, Epimastigota e Tripomastigota)
 - 1.1. Estudo de captação celular específica
 - 1.2. Estudo de retenção celular e internalização
 - 1.3. Comparação desses estudos com ¹⁸F-FDG (radiofármaco comumente utilizado na clínica para o diagnóstico de processos inflamatórios)
2. Avaliação *ex vivo* da ligação de UBI₂₉₋₄₁ radiomarcada com ^{99m}Tc ou ⁶⁸Ga em modelo de infecção por *T. cruzi*
 - 2.1. Estudo da biodistribuição na fase aguda (1, 2 e 3 semanas de infecção) e crônica de infecção por *T. cruzi*
 - 2.2. Estudo da farmacocinética na fase aguda (1, 2 e 3 semanas de infecção) e crônica de infecção por *T. cruzi*
 - 2.3. Comparação desses estudos com ¹⁸F-FDG na fase aguda e crônica de infecção por *T. cruzi*
3. Avaliação por imagem SPECT/PET/CT da ligação da UBI₂₉₋₄₁ radiomarcada com ^{99m}Tc ou ⁶⁸Ga em modelo de infecção por *T. cruzi*
 - 3.1. Comparação quantitativa de dados de biodistribuição e de imagens PET/CT e/ou SPECT/CT na fase aguda e crônica de infecção por *T. cruzi*
 - 3.2. Comparação do valor de diagnóstico por imagem da UBI₂₉₋₄₁ radiomarcada com ¹⁸F-FDG na fase aguda e crônica de infecção por *T. cruzi*
4. Como controle positivo de ligação da UBI₂₉₋₄₁, todos os estudos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* serão comparados com a bactéria *S. aureus* e o seu modelo de infecção.

3. Metodologia

3.1. Radiomarcção da UBI₂₁₋₄₉ com ^{99m}Tc

Para a radiomarcção do peptídeo ubiquidina, 25 µg do peptídeo serão adicionados a 5 µL de solução de cloreto estano recém preparada em ácido clorídrico 0,01 M (frasco A). Em outro frasco de vidro será preparada a mistura da solução de pertecnetato de sódio (^{99m}Tc) recém eluída do gerador junto com a solução tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,05 M pH 9,0 (frasco B). Um volume conhecido da solução do Frasco B será transferido para o frasco A utilizando uma seringa. A mistura será incubada por 15 minutos à temperatura ambiente e em seguida passada por uma mini coluna Sep Pak C18. A mistura de marcação será então diluída com solução de cloreto de sódio 0,9% (1 a 3 mL). Encerrado o tempo de reação, uma alíquota será retirada para medida do pH com uma fita indicadora e outra alíquota para o controle radioquímico por HPLC.

3.2. Radiomarcção da UBI₂₁₋₄₉ com ⁶⁸Ga

O protocolo de radiomarcção com ⁶⁸Ga será realizado de acordo com protocolos previamente estabelecidos [15].

3.3. Testes de controle de qualidade

Os procedimentos analíticos encontram-se descritos em detalhes nos Procedimentos Operacionais Padrão relevantes no IPEN e estão disponíveis mediante solicitação. Todos os processos de radiomarcção serão realizados sob condições de boas práticas de laboratório e serão realizados todos os testes analíticos com HPLC e espectroscopia de massas assim como os testes químicos e radioquímicos para verificação da integridade da formulação.

3.4. Estudo de captação celular específica

Brevemente, 10⁸ bactérias *S. aureus* ou parasitas *T. cruzi* (nas suas várias formas: Amastigota, Epimastigota e Tripomastigota) serão utilizados para determinar a captação específica celular. Um grupo de células será bloqueada 30 min antes do ensaio com a respectiva UBI não radioativa (um excesso de 100 vezes) e posteriormente incubadas com 3,7 KBq de UBI-^{99m}Tc ou ⁶⁸Ga a 37°C durante 1 hora. Em seguida, as células serão

lavadas com PBS a fim de remover a UBI não ligada. As células serão lisadas com 0.5 mL de 0.1M de NaOH, recolhidas e medidas num contador- γ .

3.5. Experimentos de retenção celular e internalização

Para avaliar a internalização celular, 10^8 bactérias *S. aureus* ou parasitas *T. cruzi* (nas suas várias formas: Amastigota, Epimastigota e Tripomastigota) serão incubadas com a UBI radioconjugada a 4°C. Ao final de 1 hora, a UBI-radioconjugada será removida e as células serão lavadas com PBS gelado. 1mL de PBS será adicionado a às células e estas serão posteriormente incubadas a 37°C. Ao fim de 0, 30 min, 1, 2 e 24 horas, um grupo de células será removido, a UBI não ligada será coletada e as células serão lavados com PBS gelado. Para remover a radioatividade ligada à membrana celular, as células serão incubadas com 1 mL de tampão ureia-citrato (8M urea, 0.1M sodium citrate, 3mM EDTA, pH 8.0), por 5 min no gelo e esta solução será coletada. As células serão novamente lavadas com 1mL de PBS gelado e lisadas com 0.5 mL de 0.1M de NaOH. As frações ligadas à membrana e internalizadas serão medidas num contador- γ .

3.6. Modelo animal de infecção por *Staphylococcus Aureus*

Os animais Balb/c serão criados no biotério do IPEN e todos os experimentos serão realizados de acordo com as leis relevantes e após aprovação pelo comitê de ética.

Para induzir a infecção local, a bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC: 25923) será cultivada por 16 horas em meio BHI. Após esse período, a cultura será centrifugada (1500g, 10 min), lavada e ressuspensa em salina a uma concentração de 10^8 CFU/20 μ L. Camundongos Balb/c com 6-9 semanas receberão uma injeção no músculo da pata com 20 μ L de *S. Aureus*. 24h após essa injeção os animais serão utilizados para aquisição de imagens ou estudos de biodistribuição invasiva. Após esses estudos, os animais serão eutanasiados para posterior processamento. Cada grupo consistirá de 5 animais e será incluso um grupo controle sem infecção por *S. Aureus*.

3.7. Modelo de animal de infecção por *Trypanossoma cruzi*

Camundongos Balb/c com 6-9 semanas serão infectados intraperitonealmente com 10000 formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*. Este processo será realizado por nossos colaboradores da Faculdade de Farmácia da USP de Ribeirão Preto (CEUA - USP, Campus de Ribeirão Preto – Protocolo nº 08.1.587.53.1). Todos os animais terão a parasitemia e sobrevivência monitoradas. Os animais infectados serão depois transportados

para o IPEN para os estudos de biodistribuição e aquisição de imagens por SPECT/PET/CT.

3.8. Estudos de biodistribuição

3.8.1. Biodistribuição de *S.aureus*

10^8 CFU de *S. aureus* serão injetadas intramuscularmente na pata traseira de 10 camundongos Balb/c.

Ao final de 24 horas pós-infecção, os animais serão pesados, contidos manualmente e, injetados com 3,7 MBq de ubiquidina- ^{99m}Tc ou ubiquidina- ^{68}Ga . 4 horas após a injeção, o sangue será coletado pelo plexo orbital dos camundongos, utilizando um tubo capilar heparinizado, os principais órgãos serão removidos e a atividade será medida num contador gama.

3.8.2. Biodistribuição de *T. cruzi*

10.000 parasitas *T. cruzi* serão injetadas intraperitonealmente em 45 camundongos Balb/c. Este processo será realizado na Faculdade de Farmácia da USP de Ribeirão Preto (CEUA - USP, Campus de Ribeirão Preto – Protocolo nº 08.1.587.53.1).

Ao final de 1, 2 ou 3 semanas pós-infecção, os animais serão pesados, contidos manualmente e, injetados com 3,7 MBq de ubiquidina- ^{99m}Tc ou ubiquidina- ^{68}Ga . Após 4 ou 24 horas de injeção, o sangue será coletado pelo plexo orbital dos camundongos, utilizando um tubo capilar heparinizado e os principais órgãos serão removidos e a atividade será medida num contador gama.

3.9. Imagem por SPECT/PET/CT

3.9.1. Detecção de *S.aureus*

1×10^8 *S. aureus* serão injetadas na pata traseira de 10 camundongo Balb/c. Este processo foi previamente aprovado pelo centro de bioterismo do IPEN (protocolo de aprovação 84/2011). 24 horas pós-infecção, os animais serão pesados, contidos manualmente e, injetados com 37 MBq de ubiquidina- ^{99m}Tc ou ubiquidina- ^{68}Ga . 60 minutos após a injeção do radiofármaco os animais serão anestesiados com isoflurano por inalação (Concentração inicial 0.5%- anestesia geral 1 a 1.87%) para posterior aquisição de imagens (Albira-Bruker). A aquisição da imagem será realizada durante 60 minutos A visualização das imagens, processamento e análise serão realizados com os softwares proprietário e PMOD.

3.9.2. Detecção de *T. cruzi*

1000 parasitas *T. cruzi* serão injetadas intraperitonealmente em 30 camundongos Balb/c. Este processo será realizado na Faculdade de Farmácia da USP de Ribeirão Preto (CEUA - USP, Campus de Ribeirão Preto – Protocolo nº 08.1.587.53.1).

Ao final de 1, 2 ou 3 semanas pós-infecção, os animais serão pesados, contidos manualmente e, injetados com 37 MBq de ubiquidina-99mTc ou ubiquidina-68Ga. 60 minutos após a injeção do radiofármaco os animais serão anestesiados com isoflurano por inalação (Concentração inicial 0.5%- anestesia geral 1 a 1.87%) para posterior aquisição de imagens (Albira-Bruker). A aquisição da imagem será realizada durante 60 minutos. A visualização das imagens, processamento e análise serão realizados com os softwares proprietário e PMOD.

3.10. Adaptação do Laboratório de Imagens IPEN/USP para utilização de animais infectados, nível 2

Para adequar o laboratório de imagens a nível 2 (que permite o estudo com animais infectados), o laboratório deverá:

3.10.1. Ser equipado com uma autoclave.

A autoclave será necessária para o descarte apropriado dos animais infectados e EPIs. Dessa forma, depois de eutanasiar os animais, estes serão colocados em um saco de plástico autoclavável com capacidade e resistência compatíveis com o peso das carcaças (devidamente identificados de acordo com a simbologia adotada internacionalmente) e, posteriormente autoclavados por 20 min a 120°C. Após este procedimento, as carcaças serão mantidas em um congelador específico para posterior descarte final. Os corpos serão descartados como rejeito de risco biológico e o destino das carcaças será incineração. Todo o material potencialmente infectado será autoclavado antes de ser descartado ou reutilizado.

3.10.3. Manutenção dos animais infectados

Os animais experimentalmente infectados serão mantidos em gaiolas fechadas em microisoladores individuais no qual o ar entra e sai convenientemente filtrado por meio de filtro HEPA. As gaiolas serão manuseadas com luvas protetoras. No final do experimento, os animais serão mantidos no biotério experimental do centro de radiofarmácia até a atividade do radiofármaco decair. Após decaimento os animais eutanasiados serão descartados como resíduo biológico.

4. Principais contribuições científicas ou tecnológicas

1. Entendimento do desenvolvimento sistêmico de doenças infecciosas, uma vez que todo o organismo do animal pode ser avaliado ao mesmo tempo. Desta forma, focos inesperados de infecção seriam detectados, abrindo caminho para a translação de seu uso na clínica médica.
2. Desenvolvimento de novo radiofármaco para diagnóstico diferencial de infecção;
3. Adaptação do Laboratório de Imagens IPEN/USP para utilização de animais infectados, nível 2;

5. Cronograma físico

	1º tri	2º tri	3º tri	4º tri	5º tri	6º tri	7º tri	8º tri
Produção do radiofármaco UBI ₂₁₋₄₉ marcado com ^{99m} Tc ou ⁶⁸ Ga								
Aquisição de insumos	X							
Marcação e CQ	X	X						
Validação biológica <i>in vitro</i>								
Aquisição de insumos	X							
Testes de ligação		X	X					
Análise de dados			X					
Validação biológica <i>in vivo</i> a partir da aquisição de imagens								
Aquisição de insumos	X							
Aquisição de bens de capital			X					
Elaboração de normas para nível 2	X	X						
Validação de normas		X	X					
Aquisição de imagens				X	X	X	X	
Ensaio de biodistribuição				X	X	X	X	
Análise de dados					X	X	X	
Publicações								X
Participação em congressos				X			X	

6. Orçamento detalhado

Produtos	Quantidade	Valor(R\$)
<i>Testes de controle de qualidade</i>		
UBI ₂₁₋₄₉	5 mg	1 400,00
UBI ₂₁₋₄₉ DOTA	5 mg	1 400,00
UBI scramble	5 mg	1 400,00
FILTRO MIILEX GS SLGSV255F 0,22 MICRONS	2	510,00
Acetonitrila 4L	20	4 000,00
SOLUÇÃO TAMPÃO PRONTA PARA O USO - INCOLOR pH 7	1	300,00
SOLUÇÃO TAMPÃO PRONTA PARA O USO - INCOLOR pH 4	1	300,00
Trifluoroacetic acid CHROMASOLV®, for HPLC, ≥99.0%	1	900,00
Potassium carbonate	1	270,00
<i>Validação biológica in vitro</i>		
DMEM High glucose	4	850,00
RPMI	4	1 000,00
Soro fetal bovino	8	3 000,00
Tripsina	5	1 500,00
Antibiótico e antimicótico	5	600,00
Garrafa T175	300	2 000,00
Garrafa T75	300	1 380,00
Placa de 6 poços	120	1 200,00
Ponteira de 1mL sem filtro	10000	800,00
Ponteira de 200µL sem filtro	10000	500,00
Ponteira de 10µL sem filtro	10000	500,00
Ponteira de 1mL com filtro	4800	2 500,00
Ponteira de 200µL com filtro	4800	2 400,00
Ponteira de 10µL com filtro	4800	2 400,00
Pipeta serológica estéril 5mL	500	1 000,00
Pipeta serológica estéril 10mL	500	1 200,00
Pipeta serológica estéril 25mL	500	1 360,00
Microtubo de 1,5mL	5000	800,00
Tubos de criogenia	1000	1 150,00
Falcon de 15mL	1000	700,00
Falcon de 50mL	500	720,00
DMSO	1	600,00
Placa de 100 mm	600	700,00
Phosphate buffered saline	2	1 200,00
HEPES	1	2 200,00
Bicarbonato de sódio	1	200,00
Sistema de filtração a vácuo 0,22µm pacote com 12 unidades	4	2 000,00
Brain Heart Infusion Broth	2	500,00
<i>Validação biológica in vivo a partir da aquisição de imagens</i>		
Autoclave	1	15 000,00
Impressora multifuncional	1	5 000,00
Ar condicionado	1	2 000,00
Software de gerenciamento de dados (ILab)	1	10 000,00
Repetidor de internet	1	500,00
Bancada de manuseio de materiais radioativos	1	30 000,00
Bancada de manuseio de materiais radioativos em L	1	5 000,00
Isoflurano; anestésicos	50	1 500,00
Toner de impressora laser	5	1 600,00
Inscrições em congressos	2	3 000,00
Gastos com importação	(3 x 1 400,00)* 10%	420,00
TOTAL		117 260,00

7. Participantes do projeto

1. Lorena Pozzo, Dr (coordenadora) – Pesquisadora do Centro de Radiofarmácia;
2. Luis Alberto Pereira Dias, Dr – Técnico do Centro de Radiofarmácia;
3. Emerson Bernardes, Dr – Pesquisador colaborador do Centro de Radiofarmácia;
4. Sofia Santos, Dr – Pesquisadora pós-doc do Centro de Radiofarmácia;

Consultores

1. Marcelo Tatit Sapienza, Dr, MD – Pesquisador do Centro de Medicina Nuclear – HC-FM.USP;
2. Michael M. Welling, Dr – Pesquisador senior da *Leiden University Medical School, The Netherlands*.

8. Infraestrutura e apoio técnico, estimativa de recursos técnicos de outras fontes

O projeto conta com a infra-estrutura fornecida pelo Centro de Radiofarmácia: Laboratório de Pesquisa para marcação e realização de testes, Laboratório de Controle de Qualidade e Laboratório de Imagens pré-clínicas (LABIM – IPEN/USP).

Espera-se contar com 2 alunos de iniciação científica, 1 mestrado e 2 doutorados com tempo parcial.

9. Referências bibliográficas

1. Ebenhan T, Gheysens O, Kruger HG, Zeevaart JR, Sathekge MM. Antimicrobial peptides: their role as infection-selective tracers for molecular imaging. *BioMed Research International*, v.2014, p 1-15.2014.
2. Welling MM, Lupetti A, Balter HS, Lanzerri S, Souto B, Rey AM, Savio EO, Annema AP, Puwels EKJ, Nibbering PH. Tecnécio- 99m-Labeled antimicrobial peptides for detection of bacterial and *Candida albicans* infections, *J. Nuc. Med.*, v. 42, p. 788-794, 2001.
3. Lupetti A, Dissel JTV, Brouwer CPJM, Nibbering PH. Human antimicrobial peptides antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*, *Eur. J. Clin. Microbiology Infect. Dis.*, v. 27, p. 1125-1129, 2008
4. Gemmel F, Dumarey N, Palestro CJ. Radionuclide imaging of spinal infections, *Eur. J. Nucl. Med. and Mol. Imaging*, vol 33, N° 10, p. 1226-1237, 2006.
5. Mendez JS, Murphy CA, Bautista JCR, Lopez MP. Specificity of Tecnécio-99m-UBI for detecting infection foci in patients with fever in study, *Nuc. Med. Communications*, v. 31, no 10, p899-895, 2010.
6. Saeed S, Zafar J, Khan B, Akhtar A, Qurieshi S, Fatima S, Ahmad N, Irfanullah J. Utility of 99mTc-labelled antimicrobial peptide ubiquicidin (29- 41) in the diagnosis of diabetic foot infection, *Eur. J. Nucl. Med. Mol Imaging*. v. 40, no 5, p. 737-741, 2013.
7. Bhelose A, Sarnaik JS, Raju A, Mehra KS, Singh Y, Kumar P, Chanda A, Ranganatha DK, Joshi SH, Ramamoorthy N. Preparation and evaluation of 99Tc-labelled radiopharmaceuticals and formulation of kits for imaging infection/inflammation, Board of Radiation and Isotope Technology, Barc Vashi Complex, Mumbai, India.
8. Gandomkar M, Najafi R, Shafiei M, Mazidi M, Goudarzi M, Mirfallah SH, Ebrahimi F, Heydarpor HD, Abdie N. Clinical evaluation of antimicrobial peptide [Tecnécio-99m/Tricine/Hynic0] ubiquicidin 29-41 as a human-specific infection imaging agent, *Nucl. Med. and Biology*, v. 36, p. 199-205, 2009.
9. Mark C, Enright M, Robinson A, Randle G, Feil E, Grundmann H, Spratt B. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *PNAS* [Internet]. 2002 May;99(11):7687-92.
10. Menegotto FR, Picoli SU. *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital. *Rev Bras Anal Clin* [Internet]. 2007 Apr-June;39(2):147-50.
11. Souza MP. *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina. *NewsLab*. 2011 Apr-May;105(1):120–32.

12. Rossi F, Andreazzi D. Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma. São Paulo: Atheneu, 2005.
13. Dias LAP. Desenvolvimento de um radiofármaco para marcação com Tc-99m para a identificação de infecção utilizando um peptídeo catiônico sintético. Tese. Instituto de Pesquisas Energéticas e nucleares. São Paulo, 2015
14. Souza, Wanderley. Doenças negligenciadas. Em: Doenças parasitárias. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 2010. ISBN: 978-85-85761-30-1
15. Ebenhan T, Chadwick N, Sathekge MM, Govender P, Govender T, Kruger HG, Marjanovic-Painter B, Zeevaart JR. Peptide synthesis, characterization and ⁶⁸Ga-radiolabeling of NOTA-conjugated ubiquicidin fragments for prospective infection imaging with PET/CT. Nucl Med Biol. 2014 May-Jun;41(5):390-400