



CNEN/SP

ipen Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO



BR0342808

INIS-BR-3821

**ESTUDO DE MARCAÇÃO, BIODISTRIBUIÇÃO E ANÁLISE
COMPARTIMENTAL DA N-ACETIL CISTEÍNA MARCADA
COM Tc-99m. INVESTIGAÇÃO COMPARATIVA COM
MIBI-^{99m}Tc EM MODELO TUMORAL *IN VIVO***

BLUMA LINKOWSKI FAINTUCH

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

Orientadora:

Dra. Maria Aparecida T.M. de Almeida

São Paulo

1997

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

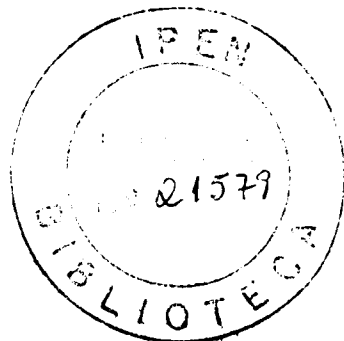
**ESTUDO DE MARCAÇÃO, BIODISTRIBUIÇÃO E ANÁLISE
COMPARTIMENTAL DA N-ACETIL CISTEÍNA MARCADA COM
Tc-99m. INVESTIGAÇÃO COMPARATIVA COM MIBI-^{99m}Tc EM
MODELO TUMORAL *IN VIVO***

BLUMA LINKOWSKI FAINTUCH

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

**Orientadora:
Dra. Maria Aparecida T. M. de Almeida**

**SÃO PAULO
1997**



À memória do meu querido e saudoso pai, Mojzesz Linkowski, que o
Eterno o tenha em bom lugar.

À minha querida mãe
por tudo o que sou.

Ao Joel
por ter chegado até aqui, todo o meu carinho.

Ao Salomão e Daniel
com todo o meu amor.

AGRADECIMENTOS

- Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, na pessoa de seu Superintendente Dr. Cláudio Rodrigues e ao corpo docente e pesquisadores, em especial do setor de Processamento de Radiofármacos, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, nosso apreço.
- À Dra. Maria Aparecida T. M. de Almeida, orientadora e amiga, pelo constante estímulo e inestimável apoio à realização desta Tese, nossa profunda gratidão.
- À Dra. Constância Pagano G. da Silva, chefe da Coordenadoria de Processamento de Material Radioativo pelas condições oferecidas para a execução deste trabalho, consignamos nossa gratidão.
- À Dra. Nilda P.S. de Pereira, chefe de Supervisão de Controle de Qualidade de Radiofármacos, pelo incentivo e amizade desde nosso ingresso no departamento, nossa admiração e reconhecimento.
- À Marycel B. Figols, chefe de Supervisão de Radiofarmácia, pelo auxílio e facilidades oferecidas, reiteramos nosso apreço.
- À Dra. Emiko Muramoto, mestra e colaboradora, pela incansável participação nas etapas experimentais e oportunas sugestões, nossa sincera homenagem pelo elevado exemplo de docência e pesquisa.

- Às Dras. Olga Gonçalves de Carvalho e Elaine B. de Araújo, pela inestimável colaboração, apoio e amizade em todas as fases deste estudo, nossos sinceros agradecimentos.
- Ao Dr. Carlos Henrique Mesquita, pela profunda erudição na elaboração da análise compartimental, nosso reconhecimento.
- Ao Centro de Medicina Nuclear, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. Carlos Buchpiegel, nosso penhor pela significativa ajuda.
- Ao Centro de Processamento de Dados do IPEN, nas pessoas de Sonia A. L. Correia e Eliane S. Souza, as quais sobrecarregamos em muitas ocasiões, nosso muito obrigado.
- A todos os colegas, funcionários técnicos, em especial ao Edson Vieira Alves, e funcionários administrativos, que direta ou indiretamente auxiliaram na execução deste trabalho nosso mais sincero apreço.

SUMÁRIO

	PÁGINA
AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO	1
1.1 Traçadores cardíacos e o desenvolvimento do MIBI- ^{99m} Tc.....	1
1.1.1 Considerações gerais.....	1
1.1.2 Antecessores recentes do MIBI- ^{99m} Tc.....	3
1.1.3 Compostos isonitrilas marcados com Tc-99m.....	5
1.1.4 Síntese do MIBI.....	9
1.1.4.1 Preparação do sal Cu(MIBI) ₄ BF ₄	10
1.1.5 Química do Cardiolite.....	11
1.1.6 MIBI- ^{99m} Tc como agente tumoral.....	12
1.2 N-Acetil Cisteína (NAC).....	16
1.2.1 Considerações gerais.....	16
1.2.2 NAC como agente preventivo em Oncologia.....	20
1.2.3 Proteção contra radicais livres.....	23
1.2.4 Uso da NAC e da cisteína como marcadores tumerais.....	25
1.2.5 Metabolismo da NAC.....	25
1.3 Importância dos radiofármacos no diagnóstico de tumores malignos.....	32
1.3.1 Generalidades.....	32
1.3.2 Agentes para detecção tumoral.....	33
1.3.3 Etapas do desenvolvimento do tumor.....	35
1.3.4 Estudos no tumor de Walker.....	37
1.4 Tenécio-99m- Características.....	39
1.4.1 Introdução.....	39
1.4.2 Propriedades do Tc-99m.....	41
1.5 Farmacocinética dos traçadores radioativos.....	43
1.5.1 Conceitos gerais.....	43
1.5.2 Estudo de modelos compartimentais.....	46

2. OBJETIVOS.....	49
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
3.1 Materiais.....	51
3.1.1 Reagentes, Soluções, outros materiais.....	51
3.1.2 Equipamentos.....	52
3.1.3 Material biológico.....	53
3.1.4 Cepa tumoral.....	53
3.2 Métodos e Parte Experimental.....	54
3.3 Marcação do MIBI com ^{99m} Tc.....	55
3.3.1 Controle radioquímico.....	56
3.4 Marcação da NAC com Tc-99m.....	57
3.4.1 Otimização dos parâmetros da marcação.....	58
3.4.2 Determinação da pureza radioquímica.....	58
3.4.2.1 Controle radioquímico através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	61
3.5 Padronização do modelo tumoral.....	61
3.6 Estudos biológicos do MIBI- ^{99m} Tc e da NAC- ^{99m} Tc.....	62
3.6.1 Distribuição biológica.....	62
3.6.2 Análise do sangue e plasma.....	67
3.6.3 Estudos de eliminação.....	68
3.6.4 Determinação da porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas.....	69
3.6.5 Determinação da porcentagem de ligação aos eritrocitos.....	70
3.7 Captação tumoral e estudos de imagem.....	71
3.8 Análise compartimental.....	71
3.8.1 Criação do modelo e determinação das suas variáveis.....	73
3.9 Métodos estatísticos.....	76
3.9.1 Procedimentos gerais.....	76
3.9.2 Análise de regressão linear para dados múltiplos.....	76
3.9.3 Comparação dos radiofármacos para órgãos da mesma população.....	77
4. RESULTADOS.....	78
4.1 Preparo dos marcadores radioisotópicos.....	78
4.1.1 Procedimentos e controle radioquímico do conjunto liofilizado de MIBI marcado com Tc-99m.....	78

4.1.2 Controle radioquímico da marcação de NAC com Tc-99m e procedimentos para otimização dos parâmetros de marcação.....	79
4.1.2.1 Controle radioquímico da NAC- ^{99m} Tc através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	81
4.2 Estudos de biodistribuição.....	82
4.3 Captação tumoral.....	98
4.4 Estudos preliminares de imagem.....	98
4.5 Análise farmacocinética.....	100
4.6 Estudos estatísticos.....	106
4.6.1 Análises de regressão.....	106
4.6.2 Análise de regressão para a captação tumoral.....	109
4.6.3 Comparação normal/tumor para cada traçador.....	109
4.6.4 Perfil órgão a órgão dentro de um mesmo grupo.....	110
4.6.5 Teste de Newman-Keuls para captação tumoral.....	115
5. DISCUSSÃO.....	118
5.1 Considerações gerais.....	118
5.2 Marcação do MIBI com Tc-99m.....	119
5.3 Marcação da NAC com tecnécio-99m.....	121
5.4 Biodistribuição do MIBI- ^{99m} Tc.....	126
5.4.1 Ratos sadios.....	126
5.4.2 Ratos com tumor.....	127
5.5 Perfis gerais de captação da droga.....	132
5.6 Biodistribuição da NAC- ^{99m} Tc.....	134
5.6.1 Animais sadios.....	134
5.6.2 Animais com câncer.....	137
5.7 Comparação de ratos normais e doentes.....	139
5.8 Comparação entre as duas drogas.....	141
5.9 Captação tumoral.....	143
5.9.1 Dificuldades de captação da droga pelo tumor.....	143
5.9.2 Captação tumoral em função da massa neoplásica.....	147
5.10 Imagem do tumor.....	149
5.11 Características teóricas do modelo de distribuição bicompartimental.....	151
5.12 Estudos farmacocinéticos das drogas.....	152
5.13 Estudos estatísticos dos traçadores empregados.....	158
5.13.1 Correlação linear da biodistribuição entre as duas drogas.....	158
6. CONCLUSÕES.....	161
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	163

RESUMO

Se eu não for por mim,
quem será por mim ?
Mas se eu for só por mim,
quem sou eu ?
E se não agora, quando ?

Rabi Hillel
(Ética dos Pais)

**ESTUDO DE MARCAÇÃO, BIODISTRIBUIÇÃO E ANÁLISE
COMPARTIMENTAL DA N-ACETIL CISTEÍNA MARCADA COM
Tc-99m. INVESTIGAÇÃO COMPARATIVA COM MIBI-^{99m}Tc EM
MODELO TUMORAL *IN VIVO***

Bluma Linkowski Faintuch

RESUMO

Realizou-se um trabalho de marcação e biodistribuição de dois ligantes diferentes, respectivamente o Metoxiisobutilisonitrila (MIBI) e a N-Acetil Cisteína (NAC), empregando-se como marcador o Tc-99m. O objetivo principal foi a avaliação das características farmacocinéticas da segunda substância, com vistas à sua possível aplicação no diagnóstico tumoral. Para esta finalidade utilizou-se uma padronização *in vivo* com ratos sadios e ratos portadores de tumor experimental.

O derivado de aminoácido N-Acetil cisteína foi marcado com o radioisótopo Tc-99m por uma técnica simples, utilizando o cloreto estanoso como agente redutor. Foi realizada uma otimização dos parâmetros da marcação, obtendo-se uma pureza radioquímica superior a 98 %. O conjunto liofilizado do MIBI, já conhecido da literatura e aqui empregado como controle, também foi marcado com Tc-99m, seguindo-se as instruções do fabricante, e obtendo-se resultados acima de 97 % de pureza.

Estudos *in vivo* foram realizados partindo-se da padronização do modelo tumoral em ratos machos *Wistar*. O tumor utilizado foi o Carcinossarcoma de Walker 256.

A biodistribuição e captação das duas drogas por órgãos e tecidos, assim como sua excreção foi feita em dois grupos de ratos, a saber sadios e portadores de tumor, contendo 6 animais por grupo e por tempo de avaliação, num total de 336 ratos.

Após a injeção dos radiofármacos por via intravenosa, os animais foram sacrificados em dez tempos previamente definidos, que variaram de 1 a 1440 minutos. Os animais foram dissecados, e órgãos, tecidos e tumor,

foram retirados para a contagem da radioatividade. Amostras de sangue também foram colhidas e quantificadas, assim como de plasma.

A imagem cintilográfica de ratos portadores da lesão tumoral foi documentada, procedendo-se também estudos *in vitro* para determinação da ligação das drogas às proteínas plasmáticas.

Construíram-se curvas de captação a partir dos dados coletados e foram realizadas análise compartimental e cálculos estatísticos.

Os resultados da biodistribuição do MIBI-^{99m}Tc vieram confirmar as informações disponíveis na literatura. Trata-se de um agente de perfusão miocárdica com altas captações também nos rins e fígado. Apresenta depuração sanguínea rápida e a sua eliminação é realizada pelo sistema hepatobiliar.

Valores comparativos de captação desta droga pelos órgãos em ratos sadios e com tumor mostraram que a captação renal e hepática foi superior para ratos com tumor.

No estudo da biodistribuição da NAC-^{99m}Tc em ambos os grupos de ratos, a maior atividade foi encontrada nos rins (com exceção do músculo total) com um pico aos 120 minutos. Nas outras vísceras a captação foi muito menor, decaindo com o passar do tempo. A depuração sanguínea foi rápida porém não tanto quanto a do MIBI-^{99m}Tc.

A maioria dos órgãos avaliados, após administração de NAC-^{99m}Tc, exibiu captação inferior na população portadora de tumor, relativamente aos ratos sadios.

Tanto o MIBI-^{99m}Tc quanto a NAC-^{99m}Tc apresentaram mais de 50% de ligação às proteínas plasmáticas, porém em relação aos eritrócitos a proporção no caso do MIBI-^{99m}Tc foi bem superior à da NAC-^{99m}Tc.

A relação tumor/músculo mostrou-se mais favorável à NAC-^{99m}Tc, porém a relação tumor/sangue foi maior para o MIBI-^{99m}Tc nas primeiras duas horas, uma vez que a depuração sanguínea deste é muito mais rápida.

Através da imagem realizada em câmara de cintilação dos animais portadores de câncer experimental, observou-se que com o MIBI-^{99m}Tc, em dois tempos avaliados, não se pôde visualizar com segurança o nódulo canceroso. Entretanto, com a NAC-^{99m}Tc a massa neoplásica apresentou-se claramente delineada, quatro horas após a injeção do fármaco.

A farmacocinética das drogas foi passível de análise mediante um modelo bicompartimental, constatando-se tempos de meia vida diferentes, porém bastante rápidos para ambos os agentes.

Os resultados mostram a NAC-^{99m}Tc como um radiofármaco com tropismo para o tecido tumoral e promissor para estudos ulteriores de diagnóstico por imagem.

ABSTRACT

If I can stop one heart from breaking,
I shall not live in vain;
If I can ease one life the aching,
Or cool one pain,
Or help one fainting robin
Unto his nest again,
I shall not live in vain.

Emily Dickinson

**LABELLING, BIODISTRIBUTION AND COMPARTMENTAL
ANALYSIS OF N-ACETYLCYSTEINE LABELLED WITH Tc-99m.
COMPARATIVE INVESTIGATION WITH ^{99m}Tc-MIBI IN AN *IN
VIVO* TUMORAL MODEL**

Bluma Linkowski Faintuch

ABSTRACT

Labelling and biodistribution studies were done with two different ligands, respectively Methoxyisobutyl isonitrile (MIBI) and N-acetylcysteine (NAC), employing Tc-99m as a tracer. The main objective was to assess the pharmacokinetic properties of the second substance, aiming at its possible application in cancer diagnosis. To this purpose an *in vivo* investigation was done using healthy and tumor-bearing rats with experimental cancer.

The amino acid derivative N-acetylcysteine was labelled with Tc-99m by means of a simple technique, using stannous chloride as a reducing agent. Optimization of the labelling procedure was done, with a final radiochemical purity greater than 98%. The freeze-dried kit of MIBI is already well-known and its role was to serve as control. It was labelled with Tc-99m, according to the manufacturer's instructions, and a radiochemical purity above 97% was achieved.

In vivo observations were done starting with standardization of the cancer model in male *Wistar* rats. The Walker 256 carcinosarcoma was employed.

Biodistribution, uptake of the two drugs and excretion studies were analysed both in tumor-bearing and in control rats. Six rats were investigated for each group and assessment time with a total of 336 animals.

After intravenous injection of the tracer, animals were sacrificed at ten specific times, between one and 1440 minutes. The carcass was dissected and fragments of all major organs and tissues, as well as of the tumor, were collected for measurement of specific radioactivity. Blood and plasma samples were taken, and urinary and fecal excretion was assessed.

Scintillographic images of the tumor-bearing rats were documented, and *in vitro* studies were aimed at determination of binding of the drugs to plasma proteins.

The obtained data permitted the determination of uptake curves and compartmental analysis, and differences between the groups were statistically analysed.

Biodistribution findings of ^{99m}Tc -MIBI confirmed information available in the literature. It is a myocardial perfusion agent which also exhibits substantial uptake by kidney and liver. Blood clearance is rapid and elimination proceeds mainly through the hepatobiliary system.

Comparison of organ values with this drug in control and tumor-bearing rats revealed higher activity for kidneys and liver in the presence of cancer.

As regards ^{99m}Tc -NAC, principal distribution was to the kidneys in both rat populations (except when total skeletal muscle was considered), and the peak level was reached by 120 minutes.

Uptake by other organs was markedly smaller, and tended to decrease with time. Blood clearance occurred early but was not as rapid as with ^{99m}Tc -MIBI.

When rats with and without tumor were compared, most findings of organ uptake were lower in the cancer group.

Binding to plasma proteins was above 50% for both pharmacologic agents, whereas erythrocytes carried a greater proportion of ^{99m}Tc -MIBI than ^{99m}Tc -NAC.

Tumor/muscle ratio was more favorable for ^{99m}Tc -NAC, whereas tumor/blood ratio for ^{99m}Tc -MIBI was higher in the first two hours, as this last substance is more quickly eliminated from the blood stream.

Images of tumor-bearing rats registered in a scintillation camera indicated that with ^{99m}Tc -MIBI none of the two selected times was adequate for visualization of the cancer mass. In contrast, ^{99m}Tc -NAC permitted clear identification of the tumor, four hours after injection.

With the help of a bi-compartmental model, it was possible to study the pharmacokinetic pattern of the two radiopharmaceuticals. Half-life times were different but quite short in both circumstances.

The results demonstrate that ^{99m}Tc -NAC is a radiopharmaceutical with affinity for cancer tissue and promising for further investigation concerning imaging diagnosis of tumors.

Este trabalho, incluindo as referências bibliográficas, foi padronizado de acordo com a publicação “Guia para elaboração de publicações técnico-científicas” da Divisão de Informação e Documentação Científicas, Biblioteca “Terezine Arantes Ferraz”, SUGAI, M. & IGAMI, M.P.Z. IPEN/CNEN, São Paulo, 1995.

1. INTRODUÇÃO

O que é a vida de um homem? Uma sombra.
Mas que sombra? A sombra, imutável, de
uma construção? Ou a de uma árvore que
sobrevive às estações? Não, a vida de um
homem se compara à sombra de um pássaro
em pleno vôo: apenas entrevista, já está apagada.

Talmud

1. INTRODUÇÃO

1.1 Traçadores cardíacos e o desenvolvimento do Metoxiisobutilisonitrila-^{99m}Tc (MIBI-^{99m}Tc)

1.1.1 Considerações gerais

Os primeiros estudos com o MIBI-^{99m}Tc estiveram voltados para o seu emprego como agente de imagem miocárdica, e mesmo em nossos dias suas aplicações oncológicas se configuram como um subproduto da experiência em afecções do coração, razão pela qual iniciaremos a revisão pela análise dos isótopos radioativos de interesse em Cardiologia.

Desde 1973, quando o ²⁰¹Tl foi produzido pela primeira vez ^(25, 92), na forma de cloreto taloso, este tornou-se muito importante em Medicina Nuclear cardiovascular, pela sua aplicação nos estudos não invasivos de *stress* e repouso, para avaliação do fluxo sanguíneo regional e distinção entre miocárdio isquêmico e infartado.

A depuração sanguínea do ²⁰¹Tl é rápida (2,9 min.), sendo que apenas 5% permanece no sangue 5 minutos após a injeção. É excretado praticamente todo pelos rins e a meia-vida biológica no corpo inteiro é de cerca de 10 dias ⁽¹²⁾.

Entretanto, temos que assinalar o fato do tálio não ser um radiotraçador ideal, ou seja, ele apresenta uma meia vida física longa (73,1 horas), o que implica a aplicação de doses baixas de radioatividade e em tempos muito longos para aquisição de dados. Emite um fóton de baixa energia (68 a 82 keV), resultando na degradação da resolução espacial das imagens, e tem um custo de obtenção alto pois é produzido em ciclotron⁽¹⁴⁵⁾.

Por essas razões, durante os últimos 17 anos, a principal meta da Medicina Nuclear cardiovascular tem sido o desenvolvimento de complexos de Tc-99m que pudessem substituir o ²⁰¹Tl nos estudos de perfusão cardíaca.

Doses relativamente grandes de ^{99m}Tc podem ser administradas para aumentar a resolução de contraste de imagens cintilográficas, com menor radiação ao paciente do que com a maioria dos radionuclídeos.

Em 1980, pela primeira vez foram sugeridos complexos de Tc-99m como radiotraçadores ideais^(45, 46). Esta posição de destaque do Tc-99m na Medicina Nuclear deve-se às suas propriedades físicas e radioativas extremamente favoráveis. Ele tem uma meia-vida de 6 horas, emite raio gama de 140 keV, não é emissor beta e é obtido de geradores ⁹⁹Mo-^{99m}Tc na forma de íon pertecnetato, permitindo a marcação rápida de conjuntos liofilizados, no local clínico⁽¹⁴⁵⁾.

O tecnécio na forma de íon pertecnetato (TcO_4^-) obtido do gerador está num estado de oxidação +7, e deve ser reduzido a um estado de oxidação mais baixo para complexar-se com diversos ligantes⁽¹⁴⁵⁾.

1.1.2 Antecessores recentes do MIBI-^{99m}Tc

Muitos complexos de ^{99m}Tc foram avaliados para obtenção de imagem de perfusão miocárdica.

O primeiro cátion Tc a ser avaliado com esta finalidade foi o Tc(III), complexado com 1,2 bis (dimetilfosfino) etano (DMPE) $((\text{DMPE})_2\text{Cl}_2\text{-}^{99\text{m}}\text{Tc})^+$ ⁽⁶⁰⁾. Os resultados clínicos foram desanimadores porque a razão de captação coração/pulmão foi extremamente baixa. A captação alta no fígado interferia na imagem miocárdica, além do que uma parcela inconveniente de osso (ou medula óssea) era visualizada. Surgiu a hipótese da possível redução *in vivo* do cátion Tc(III) para espécies neutras de Tc(II) $((\text{DMPE})_2\text{Cl}_2\text{-}^{99\text{m}}\text{Tc})^0$, as quais se acumulam preferencialmente em órgãos do sistema retículo endotelial ⁽¹¹⁸⁾.

Esta hipótese foi primeiramente avaliada por uma técnica indireta, que utilizou a relação periódica entre Tc e Re. O cátion de Re(III) $((\text{DMPE})_2\text{Cl}_2\text{Re})^+$ foi preparado e caracterizado ⁽¹⁶⁷⁾, e mostrou, como esperado, o mesmo tamanho, forma, carga e lipofilicidade, do seu análogo Tc(III). Também, para o meio bioquímico (sangue, proteína, etc.), as propriedades externas dos dois complexos eram indistintas. A diferença crucial entre eles era que o complexo de Tc(III) era reduzido mais facilmente do que o análogo Re(III) a 190 mV. Portanto, o cátion Tc(III) era reduzido *in vivo*, todavia o cátion Re(III) não sofreria redução porque a

diferença de 190mV levaria o potencial de redução para fora da faixa acessível aos sistemas biológicos. Entretanto, como há outros fatores que podem causar diferenças na biodistribuição dos compostos de Tc e Re (por exemplo, ^{99m}Tc é um isótopo sem carregador enquanto que o ^{186}Re contém amostras consideráveis de carregador ^{185}Re), era importante proceder-se um experimento com controle apropriado.

Isto pôde ser realizado usando os cátions análogos Tc(I) e Re(I), $((\text{DMPE})_3\text{-}^{99m}\text{Tc})^+$ e $((\text{DMPE})_3\text{-}^{186}\text{Re})^+$ pois nenhum deles sofre redução química e portanto, quando coinjetadas, estas 2 espécies devem apresentar biodistribuição idênticas ⁽⁴⁷⁾.

Do ponto de vista de imagem de perfusão miocárdica, a redução *in vivo* do cátion Tc(III) era indesejável, porque as espécies neutras resultantes perdem intensidade no coração e acumulam-se no fígado (provavelmente na forma de ligação proteica). Conseqüentemente isto levava a razões coração/fígado muito baixas e decréscimo contínuo na intensidade da imagem. Os cátions Tc(I) e Re(III) $((\text{DMPE})_2\text{Cl}_2\text{-}^{186}\text{Re})^+$ não sofrem redução *in vivo* e portanto não são removidos do miocárdio ⁽⁴⁸⁾.

A mais recente e importante classe de complexos de tecnécio catiônicos, desenvolvida para estudos de perfusão miocárdica, tornou-se aquela na qual o estado de oxidação do tecnécio é +1.

O primeiro complexo catiônico a ser avaliado em humanos foi $((\text{DMPE})_3\text{-}^{99m}\text{Tc})^+$ ⁽⁶¹⁾, que apresentou imagens de qualidade superior àquelas obtida com complexos Tc(III). Apesar desta melhora, mostrou-se

inadequado clinicamente em função de sua depuração sanguínea bastante lenta.

Em 1984 um novo cátion Tc(I) contendo grupos éster hidrolisáveis foi preparado, e a sua biodistribuição estudada em modelos animais, onde se mostrou satisfatória ⁽⁴¹⁾, e depois em humanos.

Com o intuito de se reduzir a ligação às proteínas do plasma humano, novas séries de cátions Tc(I) como $((\text{arene})_2\text{-}^{99\text{m}}\text{Tc})^+$, onde arene=1,3,5 - trimetil benzeno e 1,2,3,5 - tetrametil benzeno, foram preparadas, caracterizadas e avaliadas em modelos animais e submetidas a testes *in vitro*, para avaliação da ligação ao plasma humano ⁽¹⁷⁶⁾.

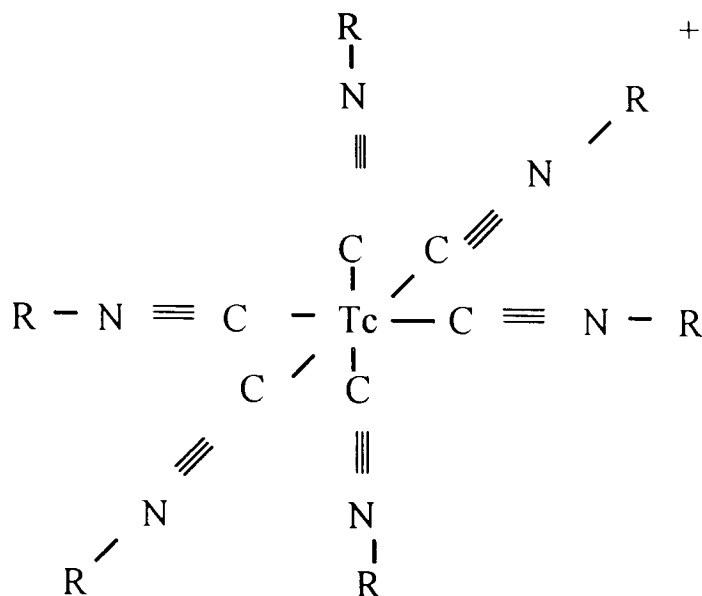
Esses agentes exibiram uma rápida depuração sanguínea porém a captação miocárdica foi relativamente baixa, enquanto que a captação hepática foi muito alta. Isto resultou em uma razão coração/figado baixa, fato que dificultou a interpretação das imagens. Essas deficiências clínicas, associadas com os procedimentos de síntese muito complicados usados para preparar estes agentes organometálicos, levaram ao abandono dos cátions de $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{arene})_2^+$ como agentes para imagem miocárdica.

1.1.3 Compostos isonitrilas marcados com Tecnécio-99m

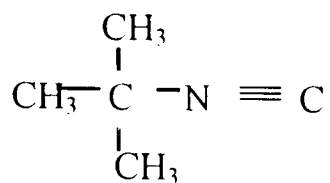
O mais importante desenvolvimento na busca para um substituto do ^{201}Tl ocorreu com a descoberta de uma nova classe de complexos de Tc(I):

complexos de Tc(I) hexakis - alquil isonitrila, $((\text{CNR})_6\text{Tc})^+$, onde R é o grupo alquil como metil, etil, n-propil, tercio butil ou substitutos como metoxi isobutil.

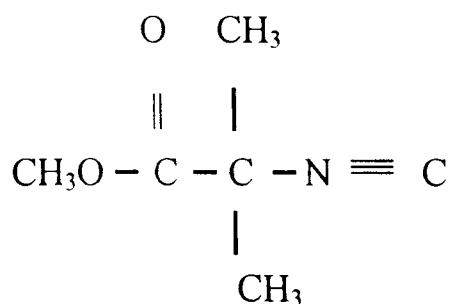
Estes complexos são constituídos de cátion monovalente com Tc(I) centrado num octaedro circundado por 6 grupos alquil isonitrila idênticos, coordenados através do carbono isonitrila ⁽¹¹⁾.



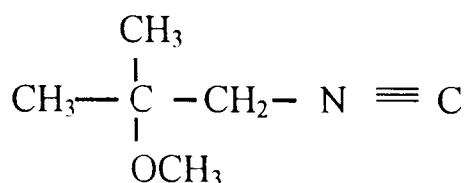
^{99m}Tc-ISONITRILAS



TBI - tercio butil isonitrila



CPI - carbometoxi isopropil isonitrila



MIBI/MMI - Metoxiisobutilisonitrila

Tais moléculas não se ligam ao plasma humano, e fornecem boas imagens miocárdicas em várias espécies animais. Os compostos isonitrila são doadores sigma e ligantes de receptores pi que podem ser utilizados para desenvolver complexos metálicos estáveis⁽²⁴⁾.

O primeiro derivado isonitrila avaliado em humanos ((TBI)₆-^{99m}Tc⁺, onde TBI = t- isobutilisonitrila) foi desenvolvido pelas equipes de Davison e de Jones^(84, 72). Estudos mecanísticos preliminares⁽¹⁴⁶⁾ sugeriram que a captação cardíaca deste agente, e seus análogos, estava relacionada à lipofilicidade e não à participação da bomba de Na⁺/K⁺ ATPase. Estudos em voluntários normais⁽⁶²⁾ e pacientes infartados⁽⁷³⁾ estabeleceram o ((TBI)₆-^{99m}Tc)⁺ como um agente com características adequadas para imagem de perfusão miocárdica.

Entretanto, a persistente alta captação do $((\text{TBI})_6^{-99\text{mTc}})^+$ pelo fígado, mascara o ápice cardíaco e este fenômeno resulta em uma deficiência séria, que veta o seu uso na rotina clínica ⁽⁶²⁾.

Para diminuir a atividade hepática associada com $((\text{TBI})_6^{-99\text{mTc}})^+$, alguns grupos desenvolveram um derivado que contém, um éster hidrossolúvel, o carbometoxiisopropilisonitrila, $(\text{CPI})_6^{-99\text{mTc}}^+$ ^(74, 75). Este derivado exibe uma rápida depuração sanguínea assim como do pulmão e fígado, propriedade característica dos complexos de isonitrilas. O $\text{CPI-}^{99\text{mTc}}$ poderia ser útil nas aplicações de rotina clínica porém, os grupos de ésteres hidrolisáveis do CPI podem torná-lo difícil para a formulação de um “kit” radiofarmacêutico com estabilidade aceitável.

No estudo feito em meio de cultura com células cardíacas de galinha equilibradas com $\text{CPI-}^{99\text{mTc}}$, Piwnica-Worms e col.(1988) ⁽¹³²⁾ observaram que 61% da atividade estava associada com a membrana celular e somente 24% com o citosol. De maneira semelhante, 80% do $\text{TBI-}^{99\text{mTc}}$ está associado com a fração da membrana de células cardíacas cultivadas de rato e 70% da $\text{CPI-}^{99\text{mTc}}$ com a fração da membrana celular de hemácias ⁽¹⁴⁷⁾. Os inibidores dos transportadores catiônicos de membrana nos tecidos cardíacos geralmente não alteram a captação celular de várias isonitrilas- $^{99\text{mTc}}$ ^(132, 146, 112).

Uma alternativa química para tentar diminuir a captação hepática associada com $(\text{TBI})_6^{-99\text{mTc}}$ levou ao desenvolvimento do $(\text{MIBI})_6^{-99\text{mTc}}$, éter análogo, que exibe propriedades de imagem miocárdica superior, e que

está sendo produzido comercialmente pela Du Pont com o nome de Cardiolite ⁽¹¹³⁾. Aparece na literatura com uma variedade de designações, incluindo metoxiisobutilisonitrila-^{99m}Tc (MIBI); Hexamibi-^{99m}Tc, 2-metoxipropilisonitrila-^{99m}Tc (MMI), isonitrila-^{99m}Tc (ISO), RP-30, RP-30 A, Sestamibi-^{99m}Tc.

1.1.4 Síntese do MIBI

A síntese ⁽¹⁷⁹⁾ é composta de 3 etapas que são as seguintes:

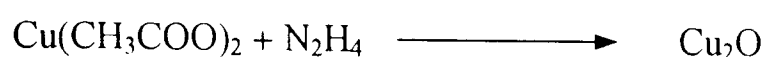
1. Preparo do N-2-metil-2-propenil formamida
2. Preparo do N-2-metilpropil formamida
3. Síntese do 2- metoxi-2 isobutilisocianeto

Este método de 3 etapas, que emprega técnicas simples de laboratório, tais como refluxo e destilação a pressão reduzida, tem na primeira fase a transformação de uma amina em amida. Na segunda o acetato de mercúrio, ao se ligar à amida, rompe a dupla ligação, promovendo uma carga positiva no carbono 2, que possibilita a introdução do grupo metoxi (OCH₃). Na última etapa verifica-se a transformação da amida em isocianeto, utilizando-se o cloreto de fosforilo, que desidratará a amida para transformá-la em isocianeto.

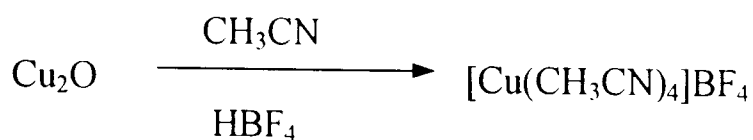
1.1.4.1 Preparação do sal $(\text{Cu}(\text{MIBI})_4)\text{BF}_4$ (IAEA, 1989)⁽⁷⁷⁾

Após a síntese do 2-metoxi-2-metilpropilisocianeto (MIBI) é preparado o sal de $(\text{Cu}(\text{MIBI})_4)\text{BF}_4$. Esta preparação apresenta o seguinte esquema:

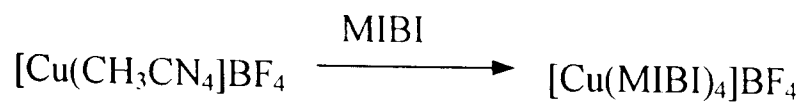
Preparação do Cu_2O



Preparação do $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{BF}_4$



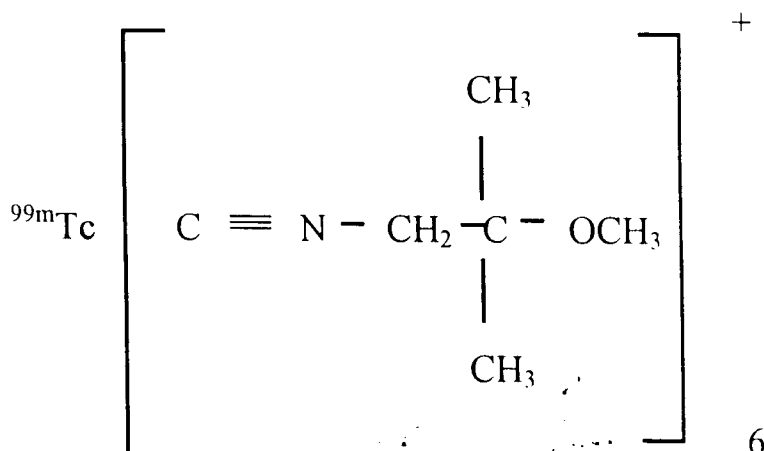
Preparação do $[\text{Cu}(\text{MIBI})_4]\text{BF}_4$



O $(\text{Cu}(\text{MIBI})_4)\text{BF}_4$ é um composto branco, cristalino, lipofílico, solúvel em acetona, clorofórmio, cloreto de metileno, etanol e metanol. É moderadamente solúvel em água e insolúvel em dietil éter, pentano, heptano e ciclohexano. O ponto de fusão é 99,5 a 100,5 °C.

1.1.5 Química do Cardiolite (Du Pont Pharma-Radiopharmaceuticals) ⁽⁵⁰⁾

Cardiolite (conjunto liofilizado para a preparação do Sestamibi-^{99m}Tc) é um preparado liofilizado, apirogênico e estéril contendo 1,0 mg de $(\text{Cu}(\text{MIBI})_4\text{BF}_4)$, 0,075 mg de cloreto estanoso dihidratado, 1,0 mg de cloridrato de L-cisteína monohidratado, 2,6 mg de citrato de sódio dihidratado e 20 mg de manitol, armazenado sob atmosfera de nitrogênio. Antes da liofilização o pH do preparado é ajustado entre 5,3 e 5,9. Após a reconstituição, o pH é de 5,0 a 6,0. O Cardiolite quando reconstituído com pertecnetato de sódio, fornece um complexo lipofílico, catiônico, com 6 moléculas de 2 metoxi isobutil isonitrila, com a seguinte fórmula estrutural:



1.1.6 MIBI-^{99m}Tc como agente tumoral

Desde os últimos anos da década de 80 vários trabalhos surgiram descrevendo a captação do MIBI-^{99m}Tc em doenças oncológicas ou não, distribuídas por todo o organismo, tais como adenoma de tireóide, osteomielite, actinomicose pulmonar, aneurisma, cisto ósseo e evidentemente em tumores ⁽¹⁵⁶⁾.

Após o achado acidental de metástase pulmonar de carcinoma de tireóide durante imagem cardíaca ⁽¹¹⁴⁾, apareceram relatos descrevendo a captação em osteossarcoma ⁽²⁷⁾, carcinoma de mama ⁽²⁶⁾, linfoma ⁽¹⁵¹⁾, carcinoma broncogênico ^(115, 154), carcinoma de paratireóide ⁽⁹⁰⁾ bem como carcinoma medular ⁽¹¹⁹⁾ e carcinoma de células de Huerthle da tireóide ⁽¹⁵⁾. Também foi descrito o acúmulo do agente em células de carcinoma humano *in vitro* ⁽⁴³⁾ e em tumores cerebrais transplantados em ratos ⁽¹⁷⁴⁾.

O Sestamibi-^{99m}Tc é freqüentemente captado pelo câncer da mama ⁽⁸⁵⁾. À semelhança da mamografia e da ultrassonografia, esta cintilografia pelo MIBI-^{99m}Tc é julgada de algum interesse para detectar a invasividade da lesão.

A invasividade é uma propriedade biológica do tumor primário e está fortemente relacionada à capacidade de induzir angiogênese.

O câncer requer o desenvolvimento de novos vasos para proliferação, e induz angiogênese ao liberar fatores especiais nos tecidos invadidos ⁽¹⁰¹⁾.

Scopinaro e col. (1994) ⁽¹⁵⁰⁾ fizeram a cintigrafia com MIBI-^{99m}Tc em 19 pacientes com metástases linfo nodais e em pacientes sem metástases. O estudo concluiu que o MIBI-^{99m}Tc é um marcador também das metástases de câncer de mama; sua captação está relacionada à angiogênese e possivelmente ao metabolismo oxidativo do tumor.

Caner e col. (1992) ⁽²⁸⁾, classificaram o agente como melhor do que o metilenodifosfonato-^{99m}Tc (MDP-^{99m}Tc) para diferenciar lesões ósseas benignas das malignas. Embora o MDP-^{99m}Tc seja um agente não específico, localiza sítios primários e metastáticos de tumor no sistema esquelético, porém raramente mostra infiltrados no pulmão e gânglios linfáticos. Os autores acreditam que sua captação está mais relacionada a fatores como fluxo sanguíneo, necrose do tumor, demanda metabólica e atividade mitocondrial do que com a natureza da lesão. Os dados deles sugerem que a radioterapia e/ou a quimioterapia inibem significativamente a captação do MIBI-^{99m}Tc e por isso este pode ser usado para avaliar a eficácia daquelas terapias ⁽²⁸⁾.

No trabalho de Kao e col. (1994) ⁽⁸⁷⁾ foi observada a captação do MIBI-^{99m}Tc em carcinoma de mama e em metástases ganglionares axilares em níveis igualmente satisfatórios.

Lu e col. (1995) ⁽⁹⁸⁾, relataram o caso de um paciente com hiperparatireoidismo associado a dor óssea e fratura, como resultado de carcinoma de paratireóide. O acúmulo crescente do MIBI-^{99m}Tc indicou o carcinoma da paratireóide, demonstrando a afinidade desta substância pelo

tumor maligno, e não somente por adenoma da paratireóide ou doenças benignas da tireóide ⁽⁹⁰⁾. A imagem de corpo inteiro com MIBI-^{99m}Tc pôde ser usada ainda para detectar uma metástase do câncer da paratireóide, fornecendo diagnóstico completo para orientar a ressecção da metástase e do tumor primário, prolongando a vida do paciente.

Yen e col. (1994) ⁽¹⁸¹⁾, estudaram 37 pacientes portadores de carcinoma de célula de Hürthle da glândula tireóide após tireoidectomia total, e procederam ao estudo comparativo de mapeamento de corpo inteiro com I-131, Tl-201 e MIBI-^{99m}Tc. As imagens com este último foram de superior qualidade e detectaram significativamente mais lesões metastáticas de carcinoma de células de Hürthle em pacientes com taxa elevada de tiroglobulina após tireoidectomia total.

Aktolun e col. (1994) ⁽⁶⁾ avaliaram a necrose tumoral e a detecção de metástases ganglionares mediastinais no carcinoma brônquico, utilizando a cintilografia e a tomografia computadorizada. Concluíram que a cintilografia com o MIBI-^{99m}Tc é tão sensível quanto a tomografia no diagnóstico de gânglios invadidos do hilo pulmonar e do mediastino. O MIBI-^{99m}Tc é captado avidamente por tecido tumoral viável mas não se acumula em carcinoma brônquico necrótico.

Tanto o MIBI-^{99m}Tc quanto o ²⁰¹Tl são de particular interesse na avaliação de tumores cerebrais devido à baixa captação pelo cérebro normal.

Packard e col. (1994)⁽¹²⁶⁾, estudaram a captação dos radioisótopos acima mencionados em gliossarcoma 9L implantado em cérebros de ratos. A captação dos dois traçadores pelo tumor foi significativamente maior do que pelo cérebro normal, sem entretanto afetar a sua biodistribuição.

Num estudo comparativo entre ^{201}Tl , MIBI- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e Teboroxima- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ feito por Maublant e col. (1993)⁽¹⁰⁴⁾, a captação do Sestamibi foi a de maior poder discriminante para separar células normais das malignas, enquanto a teboroxima foi a menos proveitosa para esta finalidade.

Para obtenção da imagem de um tumor com MIBI- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ deve-se levar em conta as taxas diferentes de permeabilidade do endotélio do tumor em diferentes estágios do crescimento tumoral.

Estudos *in vitro* com cultura de células de carcinoma humano demonstraram que a captação do MIBI é bastante aumentada quando comparada com a de células não tumorais⁽⁴³⁾.

Nas avaliações realizadas do MIBI- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ em séries de pacientes com cancer, Hassan e col. (1988)^(68, 69), e Mueller e col. (1989)⁽¹¹⁴⁾ verificaram uma alta sensibilidade para tumores malignos pulmonares, comparativamente ao cloreto de Tl-201 , enquanto Kao e col. (1993a)⁽⁸⁶⁾ constataram uma pequena sensibilidade às doenças pulmonares, concluindo que o MIBI- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ é de valor limitado para diferentes lesões pulmonares.

No câncer de tireóide o MIBI-^{99m}Tc apresenta vantagem quando comparado ao I-131 por apresentar uma melhor dosimetria e qualidade de imagem, além de não requerer a interrupção da terapêutica hormonal. Entretanto, o ¹³¹I permanece como o preferido para diagnóstico de câncer de tireóide devido ao seu papel na terapia.

Na imagem de hiperplasia paratireóide, todos os estudos realizados demonstraram a superioridade do Sestamibi-^{99m}Tc em comparação ao ²⁰¹Tl, atingindo uma sensibilidade diagnóstica na faixa de 93 a 98%⁽¹⁰⁰⁾.

Cumpra assinalar que o MIBI-^{99m}Tc acumula-se em determinados tecidos, acometidos por afecções benignas e inflamatórias tais como sarcoidose⁽⁵⁾, actinomicose⁽⁴⁾, hiperplasia do gânglio linfático⁽³⁾, alveolite fibrosa⁽⁶⁹⁾, osteomielite aguda⁽²⁸⁾ e pé diabético⁽²⁸⁾.

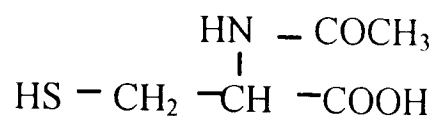
1.2 N-Acetil Cisteína (NAC)

1.2.1 Considerações gerais

Há mais de 30 anos a NAC, sintetizada por Hele e Pirie em 1931⁽¹³¹⁾, é amplamente utilizada no tratamento de problemas respiratórios, em vista da sua eficácia no tratamento de bronquite aguda e crônica. É comercializada no Brasil com o nome de Fluimucil (Laboratório Zambon Farmacêutica), e com outras denominações em diversas partes do mundo.

O produto obtido inicialmente apresentou-se parcialmente racêmico sendo que foi novamente sintetizado e apresentado em um segundo trabalho⁽¹³¹⁾ (Pirie e Hele, 1933) onde se obteve pouca racemização e o preparo foi simplificado, com a substituição do acetato de chumbo por óxido de cobre como um precipitante para a NAC.

A NAC de fórmula molecular $C_5H_9NO_3S$, peso molecular 163,20 e fórmula estrutural⁽²⁾



possui alta solubilidade e estabilidade.

Até o início da década de 60 sua eficácia foi explicada com base em suas propriedades mucolíticas⁽¹³¹⁾. Mais tarde, foi descoberto que a capacidade de reduzir a viscosidade do muco (pela quebra das pontes de enxofre S-S e despolimerização das moléculas do muco) é apenas uma e não a principal propriedade da NAC.

Suas principais características, que também explicam sua eficácia na bronquite, estão subordinadas à sua atividade como um antagonista direto dos radicais livres e especialmente à sua capacidade de aumentar os níveis de cisteína intracelular. Trata-se do aminoácido limitante na biossíntese de glutathiona, responsável por mecanismos naturais de defesa celular contra os danos da oxidação⁽⁴⁰⁾.

A NAC apresentou-se também como eficiente antídoto contra o envenenamento por acetaminofeno (paracetamol) desde o final da década de 1970 ⁽¹³⁶⁾.

A toxicidade hepatorenal do acetaminofeno é mediada por um metabólito reativo, normalmente detoxificado por glutathiona reduzida ⁽¹⁰⁹⁾. Se a glutathiona é inexistente, a ligação covalente a macromoléculas, oxidação de grupos sulfidril em enzimas, ou ambas podem levar à morte celular.

A NAC quando fornecida oralmente dentro de 10 horas atenua os danos hepatorenais induzidos por acetaminofeno ⁽⁵²⁾. A NAC mostra-se um agente seguro, mesmo quando doses altas (de até 30 g/dia) são fornecidas a adultos que ingeriram quantidades excessivas de acetaminofeno ⁽¹⁰⁸⁾. Sua tolerância é boa mesmo na presença de condições fisiológicas alteradas, causadas por overdose em procedimentos de emergência, e está aprovada para administração endovenosa.

Mais recentemente a NAC ganhou grande atenção como agente quimiopreventivo do câncer e está na categoria dos compostos sulfurosos com potencial neste contexto ⁽⁸⁹⁾.

Quando ingerida oralmente, NAC é rapidamente absorvida, desacetilada, e incorporada nos depósitos de glutathiona intra e extracelular. A NAC pode ser considerada como um dos derivados da cisteína que apresenta a melhor combinação de baixa toxicidade aliada à grande capacidade precursora da glutathiona ⁽²²⁾.

Como já mencionado, a NAC é um derivado acetilado do aminoácido sulfurado não-essencial cisteína, com a propriedade de repor os estoques de glutathiona no plasma e nas células.

A glutathiona (GSH) é um importante composto intracelular, responsável pela detoxificação de radicais livres, drogas e metabólitos. A GSH está presente também nos elementos figurados do sangue e em outros tecidos, bem como no plasma, e sua deficiência tem sido associada a disfunção mitocondrial e dano celular.

Um outro derivado da cisteína, a S-carboximetilcisteína, especificamente desenvolvida especificamente para o uso sistêmico, mostrou baixa eficiência como precursor da cisteína intracelular uma vez que a maior parte do composto administrado foi excretada, sem transformação na urina (165)

Há várias evidências de que as propriedades antioxidantes dos tióis como NAC e glutathiona previnem a progressão da enfermidade, em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica, por bloquearem as reações dos radicais livres (49).

Está provado ainda que a glutathiona está envolvida na detoxificação de vários compostos e na proteção de células contra os efeitos deletérios da radiação e do oxigênio livre (“stress oxidativo”).

Uma vez que a cisteína é o componente limitante para a síntese da glutatona, e devido à sua toxicidade ⁽⁹⁾ e oxidação espontânea, torna-se evidente que um agente de fornecimento da cisteína tal como a NAC apresenta valor potencial em terapia. Além disso, a necessidade de cisteína para a síntese proteica não deve ser ignorada, por tratar-se de aminoácido amplamente representado nas proteínas tissulares.

1.2.2 NAC como agente preventivo em Oncologia

Os agentes quimiopreventivos mais comuns utilizados na profilaxia de câncer de cabeça, pescoço e leucoplasia oral pertencem ao grupo dos retinóides como beta-caroteno e vitamina A.

Um agente quimiopreventivo que deve ser acrescentado a este grupo é a N-acetil cisteína, um antioxidante e nucleófilo que foi usado num projeto clínico, o EUROSCAN (European Chemoprevention Study) sob os auspícios da EORTC (Organização Européia para Pesquisa e Tratamento de Câncer) ⁽⁷⁾. Este estudo, voltado para pacientes tratados de câncer oral, laringeo ou de pulmão, revelou alguns resultados interessantes.

Agentes carcinogênicos podem ser derivados de fontes endógenas e exógenas. A primeira barreira contra carcinogênios é encontrada no espaço extracelular (trato gastrointestinal, trato respiratório, sistema hematológico) muito antes dos compostos danosos poderem alcançar as células alvo. Citotoxicidade, genotoxicidade e iniciação de câncer podem ser prevenidas

pela captação inibitória, pela remoção facilitada dos produtos carcinogênicos ou pela inibição endógena.

A NAC possui a habilidade de exercer efeitos protetores, incluindo a inibição extracelular de agentes mutagênicos de fontes exógenas e endógenas, inibição da genotoxicidade de espécies reativas oxigenadas, proteção do DNA e enzimas nucleares e prevenção da formação de precursores carcinogênicos de DNA⁽⁷⁾.

A NAC também mostrou resultados benéficos em ensaios de sensibilidade cromossômica e anticarcinogenicidade em modelos animais. Os primeiros resultados obtidos no EUROSCAN mostraram-se favoráveis aos pacientes, com baixa frequência de efeitos colaterais⁽¹⁶⁶⁾.

A NAC e a glutathione são exemplos típicos de compostos dotados de efeitos quimiopreventivos de mecanismos múltiplos, sendo assim capazes de proteger contra uma larga faixa de agentes mutagênicos e carcinogênicos.

A glutathione já foi usada como agente de proteção⁽¹⁶³⁾. Entretanto, como este tripeptídeo não atravessa membranas celulares, sua eficácia na prática clínica é muito limitada.

Vários trabalhos sobre as atividades antimutagênicas e anticarcinogênicas da NAC e glutathione foram realizados por De Flora e col. (1984,1991)^(36, 37, 38). Eles estiveram entre os primeiros a reconhecer a inibição da mutagenicidade pela NAC em presença de várias substâncias químicas de ação direta e espécies de oxigênio reativas (oxidantes).

A NAC é capaz de detoxificar eletrófilos reativos e radicais livres associado a reações de conjugação ou redução. Primeiro reduz as espécies de oxigênio reativo a espécies menos reativas⁽¹¹¹⁾. Segundo, a NAC é desacetilada em muitos tecidos e células para formar cisteína, provendo a biossíntese da glutathiona, que serve diretamente como antioxidante, ou agindo como um substrato no ciclo redox da glutathiona^(105, 20).

A NAC, como um precursor da glutathiona intracelular, é também capaz de estimular enzimas (fase 2) no ciclo da glutathiona (peroxidase GSH, redutase GSSG, transferase-S GSH)⁽³⁹⁾.

O reparo do dano do DNA parece ser estimulado por tióis como NAC e glutathiona em experimentos com hepatócitos em meio de cultura expostos à irradiação e carcinógenos⁽³¹⁾.

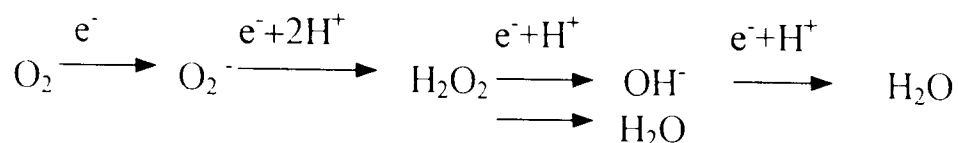
Em um modelo hepatocarcinogênico de rato, a NAC administrada por sonda gástrica foi capaz de inibir a formação de precursores carcinogênicos no DNA⁽⁷⁸⁾, considerados como um dos primeiros passos da transformação tumoral.

Albini e col. (1995)⁽⁷⁾ fizeram um estudo em animais para avaliar se a NAC afeta a formação e desenvolvimento de tumores primários e metástases pulmonares em camundongos inoculados com vários tipos de células tumorais.

Os dados obtidos indicaram que a NAC afeta o processo de invasão celular do tumor e metástase, provavelmente devido à inibição das gelatinases pelo seu grupo sulfidril, com a contribuição de outros mecanismos, incluindo potente atividade antioxidante deste tiol.

1.2.3 Proteção contra radicais livres

Os mecanismos antioxidantes são baseados em processos de bloqueio envolvendo radicais livres. Na sequência normal dos eventos metabólicos, o oxigênio é capaz de aceitar um total de 4 elétrons, como mostrado abaixo



O ânion radical superóxido (O_2^-) é produzido pela adição de um elétron ao oxigênio molecular. A adição de 2 elétrons leva à formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que não é por definição um radical livre embora seja um reativo intermediário. A adição de outro elétron ao peróxido de hidrogênio forma o radical mais reativo que é o hidroxil (OH^-). Pela aquisição de outro elétron o radical hidroxil é convertido em água⁽⁴⁰⁾.

A interação da N-acetil cisteína com O_2 ou OH^- levará a formação do dissulfeto de NAC com a formação intermediária do radical tinitil. A importância e reatividade deste radical são desconhecidas. A NAC também

reduz H_2O_2 resultando na formação da NAC dissulfeto levando a uma perda da genotoxicidade ⁽³⁶⁾.

A interação da NAC e glutathiona com H_2O_2 , O_2 e OH pode ser vista na Figura 1.1 ⁽⁷¹⁾.

Graças ao grupo tiol da cisteína ela mantém um ambiente redutor e portanto protege os constituintes intracelulares do “stress” oxidativo.

A glutathiona reduzida (GSH) como substrato para a enzima glutathiona peroxidase, remove os radicais livres de oxigênio.

Os peróxidos de hidrogênio são reduzidos a água e os peróxidos lipídicos aos seus análogos hidroxil, pela transferência de átomos de hidrogênio, os quais acompanham a formação de glutathiona dissulfeto (GSSG) a partir de 2 moléculas de GSH.

Em adição, grupos tióis são importantes para a função de muitas proteínas. Para proteger grupos tióis nas proteínas, altas concentrações de GSH são necessárias.

1.2.4 Uso da NAC e da Cisteína como marcadores tumorais

Não encontramos na literatura registros assinalando a utilização da NAC marcada isotopicamente no diagnóstico por imagem de tumores ou de quaisquer outras afecções.

Diversos grupos já ensaiaram a cisteína ou a homocisteína em situações de câncer, com sucesso variável ^(125, 157, 158).

Note-se que a cisteína e seus derivados são reconhecidos usualmente como agentes renais, porém relatos utilizando NAC com este propósito tampouco têm sido publicados.

1.2.5 Metabolismo da NAC

Um esquema do metabolismo da NAC pode ser apreciado na Figura 1.2 ⁽⁴²⁾.

No plasma e nos tecidos a NAC pode apresentar-se na sua forma intacta, na forma reduzida assim como em várias formas oxidadas.

A NAC, principalmente na sua forma não modificada, e quando desacetilada a cisteína, liga-se a algumas proteínas através de pontes dissulfídicas. Não se pode descartar ainda a incorporação direta da NAC ou da cisteína na síntese de novas proteínas, como aminoácido estrutural das mesmas.

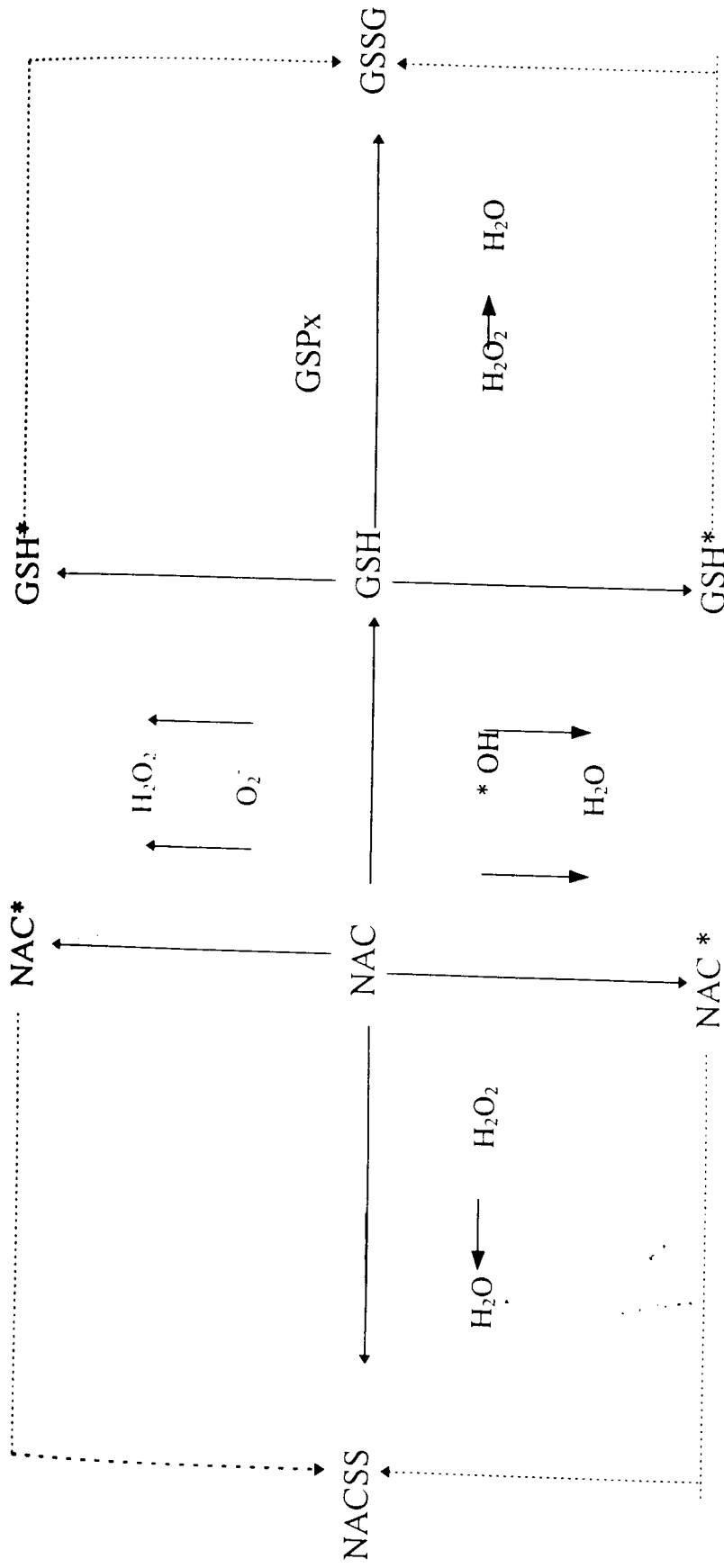


Figura 1.1 - Interação da N-acetil cisteína e glutatona com espécies ativas de oxigênio

Abreviações: NAC = N- acetil cisteína; GSSG = glutatona dissulfeto; GSH* = glutatona reduzida (reativa); NAC* = N-acetil cisteína reativa; OH* = radical intermediário de hidróxido reativo; NACSS = N-acetil cisteína dissulfeto; GSH = glutatona reduzida; O₂⁻ = ânion superóxido; GSP_x = intermediário que leva a formação de glutatona dissulfeto.

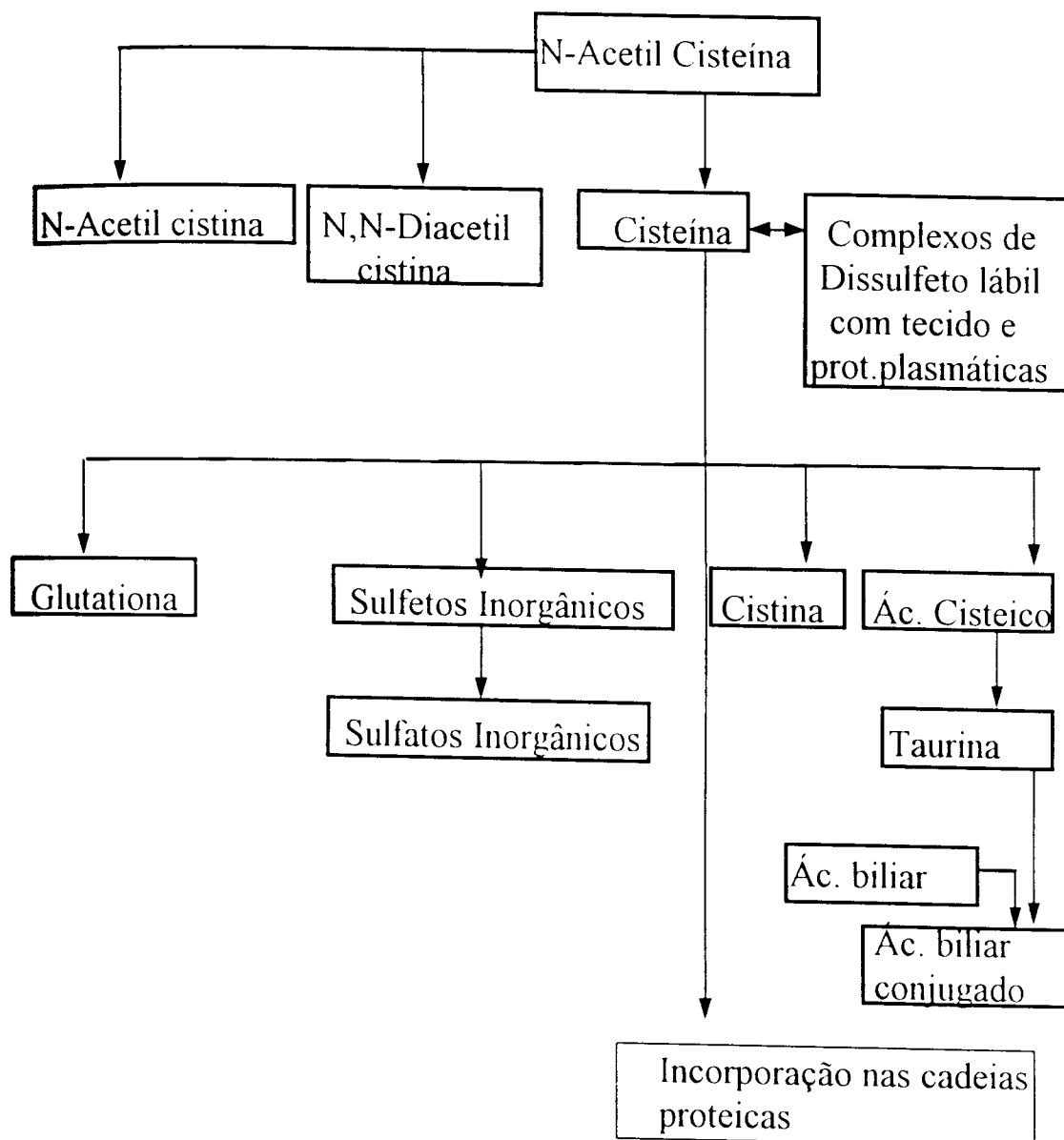


FIGURA 1.2 - Metabólitos da NAC ⁽⁴²⁾

A NAC tem um grupo sulfidril livre como a cisteína. Ela pode ser oxidada a um dissulfeto, N,N'- diacetil cistina (como normalmente é encontrada no plasma), e pode formar dissulfetos mistos reagindo com outros tióis de baixo peso molecular tais como a cisteína e glutathione. A

NAC pode ser oxidada pela reação como os grupos tióis das proteínas plasmáticas.

As estruturas da NAC e de alguns de seus produtos de oxidação estão na figura abaixo ⁽¹²²⁾.

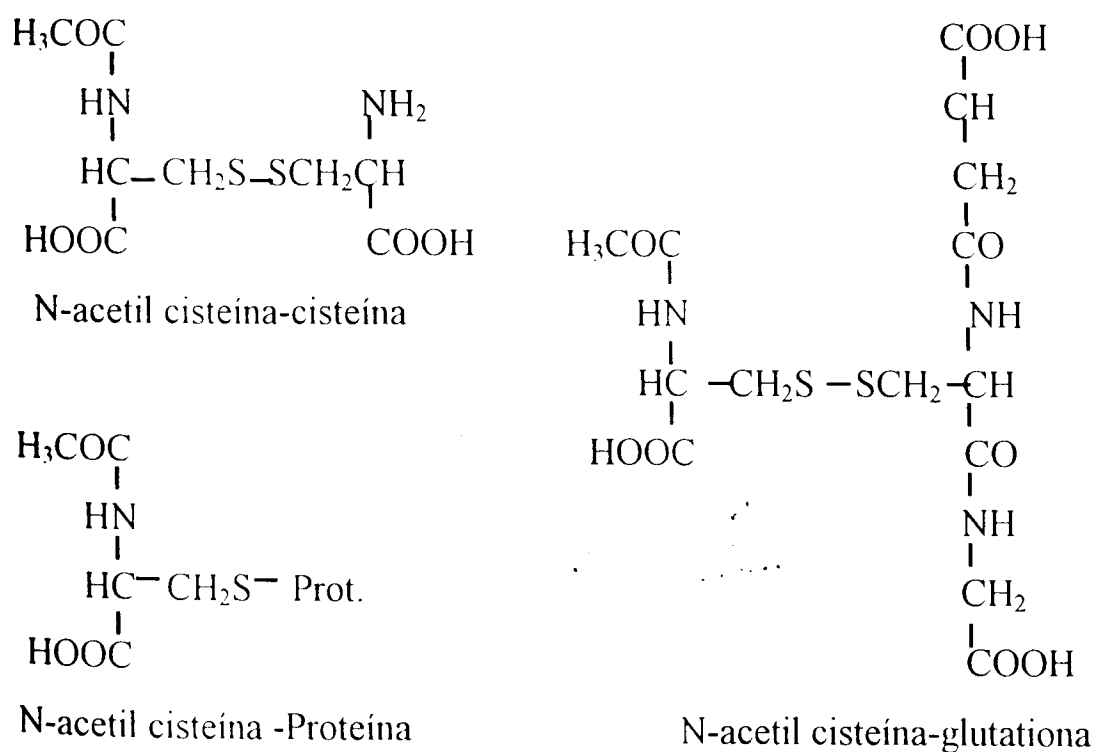
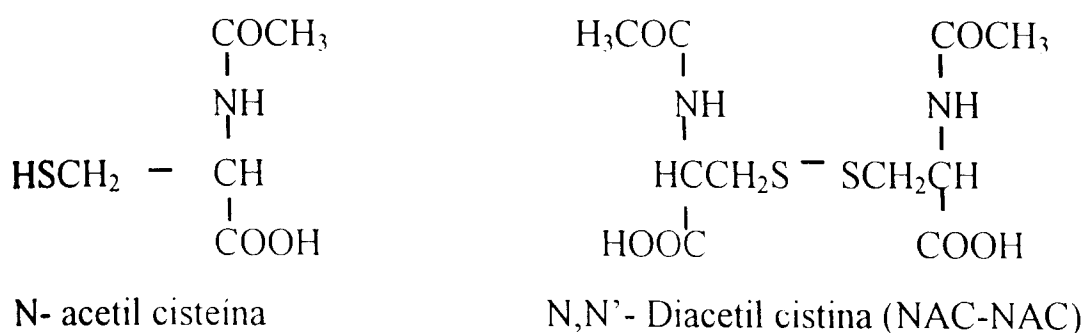


Figura 1.3 - Estrutura da NAC e alguns de seus produtos de oxidação

Os principais metabólitos da NAC são cisteína e cistina^(152, 140).

A cisteína intracelular é necessária para a síntese de proteínas, glutathiona e vários outros metabólitos. Os animais obtém a cisteína mediante a hidrólise de ligações peptídicas de cisteína proveniente das proteínas da dieta, e também a partir de metionina⁽⁹⁾.

Estes aminoácidos são transportados através da mucosa intestinal, tanto como aminoácidos livres como na forma de peptídeos.

A cisteína e a cistina, que estão presentes no plasma sanguíneo, são transportadas para dentro das células. A taxa de captação da cisteína e cistina varia nas diferentes células.

A conversão do enxofre metionina a enxofre cisteína constitui uma fonte significativa de cisteína. A cisteína é reconhecida como potencialmente tóxica mesmo quando administrada em quantidades moderadas.

Num estudo⁽⁹⁾ verificou-se que a adição da L-cisteína a uma dieta básica de aminoácidos essenciais para camundongos levou a uma rápida perda de peso e morte.

Outrossim, a administração subcutânea da L-cisteína segue-se rapidamente de uma degeneração de neurônios no cérebro⁽⁹⁾.

Uma simples injeção de L-cisteína (1,2 mg/g de peso corpóreo) em ratos com 4 dias de vida conduziu a uma atrofia cerebral que se tornou evidente 27 a 32 dias após administração ⁽⁹⁾.

Em estudos realizados pelos autores ⁽⁹⁾ notou-se que camundongos que receberam injeções intraperitoniais de L-cisteína (10 mmol/kg) tomaram-se letárgicos e alguns tiveram convulsões.

É sabido que L-cisteína adicionada a meio de cultura é tóxica para as células e por isto recomenda-se não usá-la como constituinte de tais preparados⁽⁹⁾. A toxicidade da L-cisteína pode ser reduzida significativamente pela armazenagem do meio ou pela adição de piruvato.

Os mecanismos pelos quais a cisteína exerce toxicidade não são bem conhecidos, porém sabe-se que a cisteína sofre oxidação espontânea em pH neutro para formar cistina e peróxido de hidrogênio, o que em solução para administração parenteral forma precipitado. A formação de grandes quantidades de H₂O₂ em certos sítios extra e intracelulares pode reverter-se em efeitos deletérios.

A glutathiona é um tripeptídeo contendo cisteína (gama-glutamil-cisteinil-glicina) na sua estrutura, comumente encontrado em células de mamíferos. Suas funções celulares incluem a manutenção do potencial de redução celular, participação como cofator em várias reações enzimáticas e transporte de aminoácidos. A glutathiona também provém a célula com uma defesa contra xenobióticos eletrofilicos e oxidantes intracelulares e é necessária para a função linfocitária.

Devido ao fato da glutathione não ser efetivamente transportada para dentro da maioria das células ⁽⁵⁸⁾, como é o caso da NAC, é de interesse aumentar sua síntese intracelular.

Mecanismos para o aumento das concentrações de glutathione nas células têm aplicação particular em casos onde um agente causa o esgotamento do nível intracelular normal.

A glutathione celular pode esgotar-se pela exposição a xenobióticos eletrofílicos tais como overdose de acetaminofeno, metabólitos de oxigênio reativo tais como H_2O_2 , ou por síndromes tais como infecção por HIV, na qual citocinas inflamatórias são superproduzidas e causam *stress* oxidativo em níveis sistêmico e celular ^(21, 53).

Embora alguma glutathione seja sintetizada por essencialmente todas células de mamíferos, o fígado é particularmente ativo na síntese e envio da glutathione para o plasma ⁽⁵⁷⁾.

A glutathione sintetizada e enviada pelo fígado pode ser subsequentemente hidrolisada por gama-glutamyl transpeptidase localizada na superfície das células, em tecidos extrahepáticos para aumentar a cisteína plasmática ⁽¹⁾. Portanto, a glutathione também age como uma forma importante de armazenamento e transporte da cisteína, e um aumento na síntese da glutathione hepática, fornecerá um aumento da glutathione ou do substrato para sua síntese para o corpo todo.

1.3 Importância dos radiofármacos no diagnóstico de tumores malignos

1.3.1 Generalidades

A vida moderna expõe as pessoas a inúmeros agentes potencialmente carcinogênicos, os quais se somam a causas hereditárias e outros mecanismos que podem vir a iniciar o crescimento de um tumor.

A busca de métodos diagnósticos e a corrida contra o tempo para que as lesões sejam detectadas logo no seu início fazem com que as pesquisas sejam direcionadas para recursos cada vez mais precisos, confiáveis, práticos e eficientes.

A Medicina Nuclear, em contraste com outras técnicas médicas de imagem, não está baseada somente na estrutura anatômica, mas preferencialmente na visualização de funções específicas, tais como receptores. Tecnicamente isto converte os exames de Medicina Nuclear numa técnica ideal para a detecção tumoral. Uma vez que um radiofármaco altamente específico torne-se disponível, um tumor poderá ser descrito baseado em suas características bioquímicas, fisiológicas ou biológicas. Além disso, com uma razão alta de atividade alvo/radiação de fundo, informações redundantes causadas por estruturas anatômicas normais (como ocorre com radiografia convencional, ultrassonografia, tomografia

computadorizada e ressonância magnética (MRI)), não interferirão na interpretação dos resultados ⁽⁷⁹⁾.

Entretanto, um agente ideal para imagem de tumor em Medicina Nuclear ainda não existe, apesar de inúmeros esforços canalizados para este terreno.

1.3.2 Agentes para detecção tumoral

Excetuando-se massas tireoidianas e alguns outros tumores estudados isotopicamente desde o término da II Guerra Mundial, os radioisótopos ^{67}Ga e ^{201}Tl foram os mais utilizados em décadas recentes. Ambos são radioisótopos de elementos que ocorrem naturalmente e estão comercialmente disponíveis como citrato de ^{67}Ga e cloreto de ^{201}Tl . Embora o ^{67}Ga tenha sido usado para imagem de tumor desde 1968, quando foi demonstrada a sua presença num linfoma ⁽⁷⁹⁾, tem-se pesquisado o seu potencial na caracterização tecidual mais fina, por exemplo, para diferenciar tumores recorrentes de massa necrótica após radioterapia e quimioterapia.

O mecanismo de captação não é totalmente entendido. Parece que se comporta como um análogo do íon férrico, acumulando-se dentro da célula tumoral por simples difusão e possivelmente penetrando via canais de cálcio.

Atualmente, o ^{67}Ga é usado não somente em procedimentos diagnósticos como para detectar a eficácia da terapia e também para definir o prognóstico oncológico ^(55, 88).

Não obstante, o citrato de ^{67}Ga tem várias desvantagens: propriedades físicas pouco satisfatórias para gama câmara, natureza osteotrófica, sensibilidade dose-dependente e irradiação não desprezível particularmente para as doses diagnósticas recomendadas ⁽⁸⁾.

Importantes pesquisas são igualmente realizadas com o tálio, e imagens realizadas com ^{201}Tl após terapia de tumor cerebral têm-se mostrado de valia na discriminação de tecido necrótico pós irradiado de tumor recorrente ou tumor viável residual ^(83, 169).

A imagem obtida com ^{201}Tl mostra-se mais atraente do que com ^{67}Ga no aspecto do tempo necessário para completar o estudo: 3-4 horas, versus 48-72 horas para imagens com ^{67}Ga . O ^{201}Tl também é mais específico do que o ^{67}Ga para tumores do cérebro, mama e mediastino ⁽¹⁶⁹⁾. Entretanto, o ^{201}Tl também apresenta propriedades físico-químicas desfavoráveis como citado em outro ítem. Uma proposta recente indica que o ^{201}Tl , quando usado conjuntamente com o ^{67}Ga , pode identificar o sarcoma de Kaposi e diferenciá-lo do linfoma em pacientes HIV positivos ⁽⁹⁷⁾. Note-se que o espectro de marcadores isotópicos para estudos tumorais não se esgota com os dois elementos citados.

A somatostatina marcada com In-111 parece promissora, particularmente para lesões de linfoma de localização mediastinal (17, 268) porém seu custo e falta de disponibilidade restringe o seu uso.

Estudos com amostras pequenas usando anticorpos monoclonais marcados com I-123 ou I-131 apresentaram um certo valor (30).

Em meio a esse complexo, avulta o Tc-99m com propriedades físicas que o tornam melhor adaptado a exames em gama câmara, com baixo nível de irradiação permitindo o uso de doses altas.

1.3.3 Etapas do desenvolvimento do tumor

A patogênese do câncer ocorre em várias etapas, que já se encontram parcialmente elucidadas.

Os conhecimentos da carcinogênese do ponto de vista tradicional são derivados primariamente de estudos em modelos animais, porém mais recentemente passou-se a contar com trabalhos de análise molecular dos gens relacionados ao câncer e a fatores de crescimento.

Através da observação clínica sabe-se que o período latente entre a exposição a um agente causador de câncer e o seu desenvolvimento pode estender-se por várias décadas.

Classicamente foram identificadas na carcinogênese quatro fases distintas: iniciação, promoção, conversão e progressão⁽³⁵⁾.

A fase de iniciação é descrita como uma transformação precoce, rápida e potencialmente reversível numa célula alterada cronicamente. Ela começa através da mutação do material genético exposto a carcinógenos.

A promoção é um processo mais gradual durante o qual uma célula iniciada adquire características cada vez mais malignas.

Esta fase complexa da carcinogênese, envolvendo várias transformações celulares, tipicamente ocorre nas últimas décadas da vida em humanos.

Os dois estágios finais da carcinogênese são conversão e progressão. Em contraste às duas primeiras fases que foram muito estudadas em animais experimentais, conhece-se muito pouco a respeito destas últimas.

Uma característica chave desses estágios é o crescimento contínuo e a multiplicação de células anormais, que são necessárias não apenas para expansão mas também para a geração de novas, com propriedades potencialmente mais malignas, pela aquisição de transformações adicionais inerentes ao desenvolvimento de clones.

A natureza de múltiplas fases do processo carcinogênico aumenta a possibilidade de intervenção em diferentes estágios⁽¹⁷⁵⁾.

1.3.4 Estudos no tumor de Walker

O tumor transplantado selecionado para o estudo foi o Carcinossarcoma de Walker 256.

Este tumor foi descoberto no abdomen de uma rata albina grávida em 1928, no laboratório de George Walker no Hospital Johns Hopkins ⁽⁵⁹⁾.

O tumor de Walker é um carcinossarcoma mamário de rato. É carcinoma pela justaposição de células na histologia. É sarcoma pela ocorrência de células fusiformes em associação com fibrilas reticulares ⁽¹⁰³⁾.

Este tumor tem como características certa dependência hormonal ⁽⁵¹⁾, pega tumoral fácil em diversas raças de ratos, raramente desenvolve metástase e não sofre regressão espontânea ⁽¹⁰⁷⁾. Possui um período curto de latência (+/- 7 dias) e impõe sobrevida baixa (+/- 30 dias), quando é inoculado no subcutâneo de rato *Wistar* ⁽⁶⁴⁾.

O tumor inocula-se em diversas linhagens de ratos, a partir de células tumorais procedentes tanto de macerado de tumor sólido, quanto da ascite neoplásica ou mesmo da cultura *in vitro* ⁽⁹⁶⁾.

A idade do animal influi no crescimento tumoral, que se mostrou mais lento em animais velhos (12 meses) do que em jovens (3 meses) ⁽¹⁸⁾.

Por outro lado, Talalay e col. (1952)⁽¹⁶⁰⁾ observaram que o crescimento do tumor de Walker não sofre influências quanto ao sexo.

O tumor de Walker desenvolve-se com grande facilidade em vários locais de implantação.

Talalay e col. (1952)⁽¹⁶⁰⁾ compararam o desenvolvimento do carcinossarcoma de Walker 256 injetado por via intraperitoneal, muscular e subcutânea em ratos e observaram que o crescimento mais rápido ocorreu na forma intraperitoneal, e o mais lento na forma subcutânea.

Pela sua facilidade de manipulação, crescimento previsível, rápida propagação em laboratório, e quadro clínico semelhante ao de muitos tumores sólidos humanos de elevada malignidade, o carcinossarcoma de Walker é bem conhecido no meio acadêmico brasileiro ⁽¹⁷²⁾.

Sua tendência à formação de massas sólidas, infiltrativas e por vezes necrotizantes também mimetiza com perfeição a biologia do câncer humano de linhagem epitelial, que abrange algumas das entidades oncológicas de maior interesse prático.

Por tais motivos foi selecionado o mesmo como modelo experimental na presente investigação, voltada para a biodistribuição e o diagnóstico por imagem de formações tumorais.

1.4 Tecnécio-99m - Características

1.4.1 Introdução

Não há tecnécio na crosta terrestre pois o mesmo não é gerado continuamente pela reação ou decomposição de outros elementos presentes no planeta, e de outro lado a idade da Terra é consideravelmente maior que o tempo de meia-vida dos isótopos. Foi encontrado tecnécio em rochas devido provavelmente a raios cósmicos que bombardearam a Terra.⁽¹⁷⁸⁾

Em 1925 Noddack, Tacke e Berg anunciaram a descoberta do elemento 43 ao qual deram o nome de “masurium”. Basearam-se nos espectros de emissão de raio X obtidos com concentrados de gangas de vários minerais, como a columbita, gadolinita e outros⁽¹⁷⁸⁾.

No entanto, desde esta descoberta não foi possível repetir a experiência original.

Em 1937, Perrier e Segrè, trabalhando na Itália, isolaram e estudaram o isótopo radioativo do elemento 43, que foi extraído de uma placa defletora de molibdênio usada em ciclotron⁽¹⁵³⁾.

O tecnécio, foi portanto o primeiro elemento radioativo produzido artificialmente e é o radionuclídeo mais amplamente utilizado na Medicina Nuclear clínica⁽¹¹⁶⁾.

O tecnécio-99m alcançou esta posição privilegiada no uso clínico devido às suas características físicas extremamente favoráveis.

A aplicação indireta do tecnécio em Medicina Nuclear iniciou-se em 1963, quando Sørensen e Harchanbanth administraram ^{99}Mo com a finalidade de visualizar a área hepática empregando um mapeador retilíneo⁽¹⁷⁰⁾. No ano seguinte, Harper e col. (1964)⁽⁶⁷⁾ lançaram mão do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ na forma de pertecnetato ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$) com a finalidade de obter imagens cintilográficas da glândula tireóide.

Sua meia-vida de 6,02 horas e a ausência de partículas beta permitem a administração de atividade do Tc-99m sem envolver uma dose de radiação significativa ao paciente. Além do mais, os fótons monocromáticos de 140 keV são prontamente colimados para fornecer imagem de resolução superior⁽¹²⁴⁾.

Além dessas características, possui a vantagem de ser obtido de maneira relativamente fácil, a partir de geradores, pois é um produto de desintegração do molibdênio 99 (meia-vida de 67 horas).

O gerador é eluído com solução fisiológica, que extrai o Tc-99m na forma de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) em uma concentração de 10^{-9} moles.

1.4.2 Propriedades do Tc-99m

O tecnécio é um metal de transição situado no Grupo VII B da Tabela Periódica, mostrando vários atributos químicos semelhantes aos do Mn e Re. Apresenta, portanto, propriedades tanto ácidas como básicas. O tecnécio tem 22 isótopos, sendo que o mais usado é o Tc-99m. Este é encontrado em vários estados de oxidação, variando sua valência de -1 a +7. A estabilidade desses estados de oxidação depende do tipo de ligantes e meio químico⁽¹³⁸⁾.

Ligante é uma molécula que contém grupos funcionais capazes de unir-se a um íon metal para formar um complexo. Um complexo pode ter ligações iônicas, covalentes e covalentes coordenadas. Se vários sítios com o ligante unem-se ao íon metal, formando simultaneamente uma estrutura de anel, a espécie resultante se chamará quelato e o ligante, de agente quelante. Os estados mais estáveis em solução aquosa são o +7 (TcO_4^-) e o +4 (TcO_2). O $^{99\text{m}}\text{Tc}$ em estados de oxidação inferiores é passível de complexação com diversas substâncias, enriquecendo seu interesse em Medicina Nuclear⁽¹⁴²⁾.

Para se complexar com outras substâncias e tornar-se específico para diferentes tipos de diagnóstico, o Tc de valência +7 deve ser reduzido a um estado de oxidação inferior. O agente redutor mais utilizado para este fim é o cloreto estano (SnCl₂).

Quando a redução é incompleta o TcO_4^- [Tc(VII)] pode se tornar uma impureza radioquímica apresentando-se em forma livre na solução do fármaco marcado. Neste caso o TcO_4^- não reduzido não irá marcar o substrato ⁽¹⁴²⁾.

O Tc^{+4} deve ser imediatamente complexado ao composto de interesse. Na redução há misturas de Tc^{+3} , Tc^{+4} , Tc^{+5} , dependendo das condições da reação. Tal redução deve se processar em meio de nitrogênio (N_2) para não ocorrer a reoxidação ⁽¹²³⁾.

As espécies de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ reduzido são quimicamente reativas e combinam-se com uma grande variedade de compostos. Os agentes quelantes frequentemente doam pares solitários de elétrons para formarem ligações covalentes coordenadas com Tc-99m. Os grupos químicos doadores de elétrons mais comuns nos compostos são: $-\text{COO}^-$, $-\text{OH}^-$, $-\text{NH}_2$ e $-\text{SH}$ ⁽¹⁴²⁾.

O número de coordenação dos complexos de Tc-99m pode variar entre 4 e 9. Fatores como a natureza do ligante, o potencial de óxido-redução, a estequiometria da reação, a ordem seguida para se juntar os diferentes reagentes e ainda o pH da reação, devem ser levados em conta no processo de marcação com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ⁽¹⁴²⁾.

Os complexos de Tc-99m podem ser classificados quanto às suas propriedades eletrônicas, lipofílicas e estéricas relacionadas às características de distribuição dos mesmos ⁽¹¹⁶⁾.

A maioria das informações relativas ao comportamento químico do **tecnécio** foi avaliada em concentrações de 10^{-4} e 10^{-5} M, utilizando várias técnicas analíticas como polarografia, espectrometria de massa, cristalografia de raio X, cromatografia e outros.

Propriedades físico-químicas como grau de ionização que se correlaciona com a solubilidade do composto, e interações eletrostáticas entre a droga e o receptor, também permitem uma melhor avaliação do **radiofármaco** adequando-o às necessidades da Medicina Nuclear.

1.5 Farmacocinética dos traçadores radioativos

1.5.1 Conceitos gerais

O **radiofármaco** é uma droga radioativa, geralmente beta ou gama emissora, tendo seu uso em terapia ou diagnóstico, contendo um ou mais radionuclídeos como parte de sua composição orgânica ou inorgânica⁽¹¹⁰⁾.

É administrado em geral por via intravenosa e uma vez localizado em um órgão determinado do corpo pode ser detectado por aparelhos adequados como gama câmara, SPECT (tomografia computadorizada por emissão de fóton simples) e PET (tomografia por emissão de pósitrons).

A radiofarmacocinética é a parte da farmacologia que estuda a velocidade das trocas de concentração que sofrem os radiofármacos no organismo, e em especial, os mecanismos de transporte, distribuição, metabolismo e excreção ⁽¹¹⁷⁾.

A observação da cinética *in vivo* tem sido a base da Medicina Nuclear. Imagens sequenciais do movimento de transporte dos radiofármacos através de diferentes órgãos e sistemas fornecem o diagnóstico clínico. O desenvolvimento de radiofármacos melhores e mais seletivos ou específicos, assim como a utilização de dados para cálculos de doses de radiação, também são realizados graças aos estudos farmacocinéticos.

Os processos farmacocinéticos determinam a concentração e o grau de penetração que a droga pode alcançar no seu sítio de ação.

Os marcadores, ao ganharem a corrente sanguínea são simultaneamente distribuídos por todo o corpo, após o que passam a ser eliminados. A distribuição usualmente ocorre muito mais rapidamente do que a eliminação.

A eliminação da droga, uma vez atingido o equilíbrio de distribuição, normalmente é descrita por uma cinética de primeira ordem. Isto significa que a velocidade do processo é proporcional à dosagem ou concentração do substrato (droga) no sistema ⁽²⁹⁾.

A taxa de distribuição aos tecidos de cada órgão é determinada pelo **fluxo** sanguíneo de perfusão do órgão e pela facilidade com a qual as **moléculas** da substância atravessam a parede capilar e penetram nas células **do tecido** ⁽⁶³⁾.

No sangue, a droga tende a se distribuir rapidamente entre o plasma e os eritrócitos. Uma ligação transitória da droga também pode ocorrer, em porcentagens variáveis, com as proteínas plasmáticas.

Uma vez que em sua maioria os compostos são moléculas relativamente pequenas, eles rapidamente atravessam os capilares sanguíneos e atingem os fluidos extracelulares de quase todos os órgãos. Muitos produtos são também lipossolúveis podendo ultrapassar membranas celulares e distribuir-se nos compartimentos intracelulares de vários tecidos.

Ao longo do organismo há uma distribuição dos traçadores via água corporal e proteínas ou outras macromoléculas, que são dispersas nos fluidos ou tornam-se componentes das células.

O corpo pode ser visto como uma coleção de compartimentos separados mas interligados, cada um contendo uma fração da dose administrada. A transferência da droga de um compartimento a outro está associada com uma constante de velocidade (k) ⁽¹⁴¹⁾. A magnitude da constante determina a velocidade com que a transferência ocorre.

As constantes de velocidade associadas com a distribuição são de regra muito maiores do que as relacionadas à eliminação.

Para a maioria dos compostos, as concentrações plasmáticas medidas logo após a injeção intravenosa mostram distintas fases distributivas. Isto significa que uma fração da dose é eliminada antes da obtenção do equilíbrio de distribuição, sua cinética assume as características de um sistema multicompartimental. Normalmente são necessários dois ou mais compartimentos para descrever o tempo de fluxo da droga no plasma⁽¹³⁹⁾. Eles são chamados de compartimento central e compartimentos periféricos.

Em que pese a maior fidelidade destes esquemas teóricos multicompartimentais, a análise sob o prisma de dois espaços corporais apenas, muitas vezes já possibilita uma descrição adequada do padrão de distribuição de algumas substâncias.

1.5.2 Estudo de modelos compartimentais

Os estudos compartimentais são baseados nas análises matemáticas referentes à transferência de drogas entre áreas corporais..

A teoria dos compartimentos simplifica, para fins de pesquisa, certos fenômenos biológicos, assemelhando a dinâmica de um sistema estacionário a uma soma de processos elementares determinados, que diferenciam os diversos compartimentos.

Um modelo compartimental pode ser proposto para representar o sistema biológico e seu comportamento cinético face à substância em estudo⁽⁹⁴⁾. Um modelo é composto por um número finito de compartimentos e por probabilidades de transição ou transferência de substâncias entre eles.

O processo de modelagem inicia-se com observações experimentais, que são em número finito, para definir a natureza do sistema que é responsável por essas observações.

Após a introdução do traçador radioativo no sistema, fazem-se amostragens seriadas, no maior número de estados possível. Um caso típico é a injeção intravenosa do traçador, e amostragens subsequentes no sangue total, plasma, urina, e diversos órgãos em instantes que variam desde poucos minutos até vários dias após a introdução do traçador. Dosagens da substância traçada nas diversas amostras são efetuadas pelos métodos clássicos. A radioatividade de cada amostra é então determinada, utilizando-se detetores de cintilação tipo poço ou quaisquer outros instrumentos apropriados.

Os dados experimentais assim obtidos podem ser expressos nas mais diversas unidades. Em geral, prefere-se expressá-los como fração da dose (atividade) do traçador radioativo injetado por grama da substância traçada (atividade específica), como fração da dose por ml do fluido amostrado (concentração radioativa), ou simplesmente como fração da dose.

A partir dos dados experimentais, obtém-se uma série de curvas que refletem a evolução do traçador em função do tempo⁽⁹¹⁾.

A análise de curvas experimentais pode ser feita graficamente ou através de ajuste com o auxílio de programas de computador.

Como visto, a análise compartimental constitui uma ferramenta mais para se descrever e esmiuçar o comportamento *in vivo* de determinados fármacos. Embora valiosa, sua interpretação sofre influências subjetivas bem como dificuldades de aplicação de um procedimento matemático exato e pouco tolerante a erros, a um fenômeno biológico complexo e sujeito a múltiplas influências. Assim sendo, não deve ser valorizada isoladamente, mas sempre dentro do contexto dos demais achados *in vivo* e *in vitro*, a fim de permitir uma caracterização racional do agente em estudo.

2. OBJETIVOS

Quem é sábio?

Aquele que aprende com todos os homens.

Quem é forte?

Aquele que domina sua paixão.

Quem é rico?

Aquele que se alegra com o que possui

Quem é honrado?

Aquele que honra seus semelhantes.

(Ética dos Pais)

2. OBJETIVOS

O desenvolvimento de eficientes radiofármacos para definição da imagem tumoral faz-se necessário em vista da baixa especificidade daqueles disponíveis no mercado, assim como do elevado custo dos produtos importados.

Dentre os marcadores recentemente preconizados para esta finalidade, destaca-se o MIBI-^{99m}Tc, já manufaturado industrialmente e utilizado na rotina hospitalar dentro da área de Medicina Nuclear desde fins da década de 80.

A investigação de uma droga nova, nominalmente a N-acetil cisteína marcada com Tc-99m, foi o principal alvo do nosso estudo.

Objetivos gerais

Foram metas do presente estudo a realização da marcação de um aminoácido derivado da cisteína (N-acetil cisteína) com o ^{99m}Tc, seguida da otimização do procedimento. Uma vez lograda a preparação de um composto apto para avaliação *in vivo*, buscou-se a configuração da sua biodistribuição, tanto num modelo normal (ratos sadios) quanto num contexto tumoral (ratos com carcinossarcoma de Walker). Para controle dos

resultados de biodistribuição em animais com e sem câncer, empregou-se substância bem padronizada na radiofarmácia, qual seja o MIBI-^{99m}Tc, e com reconhecida afinidade por tecidos malignos.

Objetivos específicos

- 1) Determinar a pureza radioquímica verificada na marcação da N-acetil cisteína pelo Tc-99m.
- 2) Averiguar os níveis de captação nos principais órgãos e sistemas biológicos da NAC-^{99m}Tc, em um modelo de roedor normal, comparando a farmacocinética com a do MIBI-^{99m}Tc.
- 3) Analisar a biodistribuição da NAC-^{99m}Tc em ratos com câncer experimental, igualmente recorrendo a um estudo controle com MIBI-^{99m}Tc.
- 4) Estimar o nível de captação do marcador NAC-^{99m}Tc na massa tumoral propriamente dita, com vistas a possíveis aplicações para diagnóstico por imagem cintilográfica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Há quatro tipos de discípulos:

O que é rápido em entender e rápido em esquecer, a sua qualidade é anulada pelo seu defeito; o que é demorado em entender e demorado em esquecer, o seu defeito é compensado pela sua qualidade; o que é rápido em entender e demorado em esquecer, este leva uma boa porção; o que é demorado em entender e rápido em esquecer este leva uma má porção.

(Ética dos pais)

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes, soluções, outros materiais

- Acetona - grau de pureza p.a., Merck
- Ácido Tricloroacético (TCA)- grau de pureza p.a., Merck
- Antibiótico (Frademicina-Rhodia) - Lincomicina
- Cloreto de sódio - grau de pureza, p.a., Merck
- Cloreto estanoso ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) - grau de pureza p.a., Merck
- Coluna cromatográfica para cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa, Nucleosil C18 (250 x 4,6 mm), Instrumentos Científicos C.G.
- Dessecador
- Etanol - grau de pureza p.a., Merck
- Fitas de alumínio impregnadas com sílica gel para cromatografia em camada delgada (CCD-SG) - DC - Alufolien-Kieselgel 60, Merck
- Fitas de papel para cromatografia (Whatman no. 1, Whatman 3MM)
- Heparina - solução 5000 un/ml - Lique mine (Roche)
- Membrana filtrante de poro 0.22 μm , Millipore

- N- Acetil Cisteína - Oxford Nutrition, (U.K.)
- Nitrogênio gasoso, White Martins
- Pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$)- solução eluída de gerador ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$, IPEN-CNEN/SP
- Placas de cromatografia de camada delgada plásticas, de óxido de alumínio, "Baker Flex"
- SESTAMIBI - conjunto liofilizado (Cardiolite) - DuPont Pharma
- Solução tampão fosfato pH 4, pH 7, pH 8, pH 10, pH 12
- Uretana - (1 mg/ g rato) - Sigma

3.1.2 Equipamentos

- Agitador Vortex-Genie2 (VWR Scientific)
- Balança modelo HM100, Helmac, Brasil
- Calibrador de radioisótopos, modelo Mediac, Nuclear Chicago, Estados Unidos
- Câmara de cintilação SIEMENS modelo Orbiter.
- Centrífuga modelo GLC-L, Sorval, Estados Unidos
- Contador automático tipo poço, com cristal de NaI(Tl), modelo MAG 312, Berthold, Alemanha
- Contador tipo poço, com cristal de NaI(Tl), modelo ANSR, Abbott, Brasil
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência CG-480C (Shimadzu C-R4A Chromatopac) acoplado com detetores de ultra violeta CG-435 B e de radioatividade LB 2040, Berthold

- Estufa

3.1.3 Material Biológico

- Animais utilizados- *Ratus norvegicus albinus* da linhagem *Wistar*, machos, pesando entre 200 e 250 g, alimentados com ração comercial e água “ad libitum”. Ratos saudáveis e ratos portadores de Carcinossarcoma de Walker 256.

3.1.4 Cepa tumoral

As células tumorais de Walker 256 são oriundas do Banco de tumores “Christ Hospital Line”, Arthur D. Little, USA, e mantidas desde então, por repiques seriados na cavidade peritoneal de ratos.

O tumor sólido (Carcinossarcoma de Walker) foi obtido a partir de um rato portador do mesmo, cedido gentilmente pelo Laboratório de Fisiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

3.2 Métodos e Parte Experimental

O fluxograma da pesquisa obedeceu às seguintes etapas:

Marcação e padronização dos radiofármacos

- 1) Marcação do produto controle (MIBI) com Tc-99m.
- 2) Controle da pureza radioquímica do MIBI-^{99m}Tc
- 3) Marcação do aminoácido (NAC) com Tc-99m.
- 4) Otimização dos parâmetros de marcação.
- 5) Controle radioquímico da NAC-^{99m}Tc.

Estudos *in vivo*

- 1) Padronização do modelo tumoral
- 2) Biodistribuição do MIBI-^{99m}Tc em ratos sadios e com tumor
- 3) Biodistribuição da NAC-^{99m}Tc em ratos sadios e com tumor
- 4) Captação tumoral e métodos de imagem cintilográfica
- 5) Análise compartimental e cálculos estatísticos

Estudos *in vitro*

Determinação da ligação proteica do MIBI-^{99m}Tc e da NAC-^{99m}Tc nos dois grupos de ratos estudados.

3.3 Marcação do MIBI com ^{99m}Tc

A marcação e o controle de qualidade do conjunto liofilizado de **Cardiolite** foram efetuados segundo determinações do fabricante, que resumimos abaixo.

Os frascos liofilizados de **Cardiolite** apresentam a seguinte composição:

1,0 mg de $[\text{Cu}(\text{MIBI})_4]\text{BF}_4$

0,075 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

1,0 mg de L-cisteína

2,6 mg de Citrato de sódio

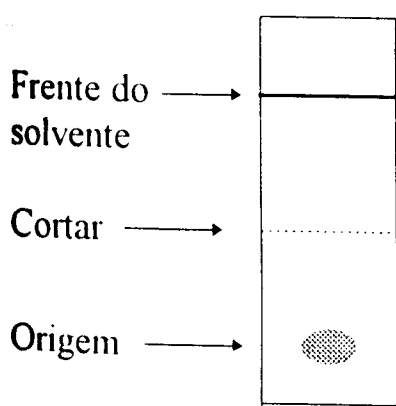
20 mg de Manitol

A reconstituição do produto é feita adicionando-se 3 ml de solução de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$), eluído do gerador de ^{99}Mo - ^{99m}Tc , com atividade de 37 MBq/ml (1mCi/ml), em um frasco de liofilizado de MIBI; este é agitado e aquecido por 10 minutos, em banho-maria em ebulição. Após o aquecimento, deixa-se esfriar por 15 minutos à temperatura ambiente e filtra-se em membrana millipore 0,22 μm .

3.3.1 Controle radioquímico

O controle radioquímico do produto marcado é realizado utilizando-se placas de cromatografia de camada delgada plásticas, de óxido de alumínio, "Baker Flex" com a dimensão de 2,5 x 7,5 cm. A placa é colocada para secar em estufa a 100° C por 1 hora e armazenada no dessecador até o seu uso. Semeamos com tubo capilar 1 gota de etanol a 1,5 cm da origem da placa, e sem secar mais 2 gotas do MIBI-^{99m}Tc sobre a gota de etanol. Coloca-se a placa novamente no dessecador para secar por 15 minutos. Em seguida, coloca-se em um becker contendo etanol, tapa-se com microfilme para haver a saturação do solvente, e deixa-se desenvolver por 5 cm a partir do ponto de aplicação. Corta-se a placa a 4 cm da base e outro corte é feito na frente do solvente. A atividade de cada parte é avaliada em contador gama.

Diagrama da placa de "Baker-Flex"



Cálculo da porcentagem de pureza radioquímica

$$\% \text{Sestamibi-}^{99\text{m}}\text{Tc} = \frac{\text{Atividade da parte superior}}{\text{Atividade de ambas as partes}} \times 100$$

3.4 Marcação da NAC com Tc-99m

A NAC, pó cristalino, solúvel em água, etanol e praticamente insolúvel em éter, obtida da Oxford Nutrition, apresenta as seguintes características ⁽²⁾:

- solubilidade em água: 17 g/100 g (20° C)
- rotação específica $[\alpha]_D^{20} = 21,3$ a 27,0
- transmitância: $\geq 98,00 \%$
- outros aminoácidos: não detectáveis
- pH : 2,0 a 2,8
- ponto de fusão: 106-110°
- contaminação por metais pesados: abaixo de 10 ppm
- contaminação microbiana: estéril e apirogênico (aprovado para uso oral e injetável em humanos).

A NAC foi marcada com Tc-99m, obtido da eluição do molibdênio na forma de pertecnetato de sódio.

Na marcação inicial utilizamos o método modificado de Ozker e col. (1992) ⁽¹²⁵⁾. Partimos de 10 mg do ligante dissolvido em 1 ml de água

destilada, onde se adicionou 2 ml de solução tampão fosfato pH 7, 0,2 mg de solução de cloreto estanoso ($260 \mu\text{g}$ de Sn^{++}) dissolvido em HCl 0,1N como redutor, ambas previamente nitrogenadas, e 37 MBq/ml de pertecnetato de sódio. A mistura foi agitada e deixada em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente e filtrada em seguida em membrana Millipore $0,22 \mu\text{m}$.

3.4.1 Otimização dos parâmetros da marcação

Para otimização da marcação e melhor resolução na determinação da pureza radioquímica, foram estudados vários parâmetros.

Analisou-se a variação da massa do ligante (1,3,5,10,15 mg de NAC), do redutor (26-50-100-260 μg de Sn(II)), no pH da solução final (4,0-6,0-7,0-8,0-9,0), e no tempo de incubação (30,60,90 e 120 min.). Em todos os estudos, realizou-se um número mínimo de seis determinações para cada item de cada parâmetro

3.4.2 Determinação da pureza radioquímica

A pureza radioquímica do marcado foi avaliada através de métodos cromatográficos utilizando papel Whatman nº 1, Whatman 3MM e fitas de

alumínio impregnadas com sílica gel para cromatografia ascendente em camada delgada (CCD-SG) ⁽¹²⁵⁾.

A amostra foi aplicada, utilizando-se tubo capilar, a um centímetro da margem inferior da fita. A frente do solvente percorreu uma distância de 10 cm a partir do ponto de aplicação, em um sistema de solventes acetona e solução fisiológica usados como fase móvel. Em seguida, deixou-se secar a fita e a mesma foi cortada em tiras de 1 cm. Essas tiras foram colocadas em tubos e levadas a um contador gama para a avaliação da radioatividade.

Cálculo :

- Determinação do TcO_4^- (solvente - acetona)

$$\frac{\text{atividade da fração final da fita}}{\text{atividade total da fita}} \times 100 \quad (A)$$

- Determinação do TcO_2 (solvente - sol. fisiológica)

$$\frac{\text{atividade da fração inicial da fita}}{\text{atividade total da fita}} \times 100 \quad (B)$$

- Pureza radioquímica (PR) da NAC-^{99m}Tc

$$\% PR = 100 - A - B$$

Na Figura 3.1 podemos observar o desenvolvimento do sistema cromatográfico utilizado.

Em acetona, o pertecnetato ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) foi para a frente do solvente ($R_f = 1,0$), enquanto o tecnécio coloidal ($^{99m}\text{TcO}_2$) juntamente com o composto marcado (NAC- ^{99m}Tc) permaneceram na origem da fita ($R_f = 0$).

Em solução fisiológica, o $^{99m}\text{TcO}_2$ permaneceu na origem ($R_f = 0$) e o complexo moveu-se juntamente com o ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) para a frente da fita.

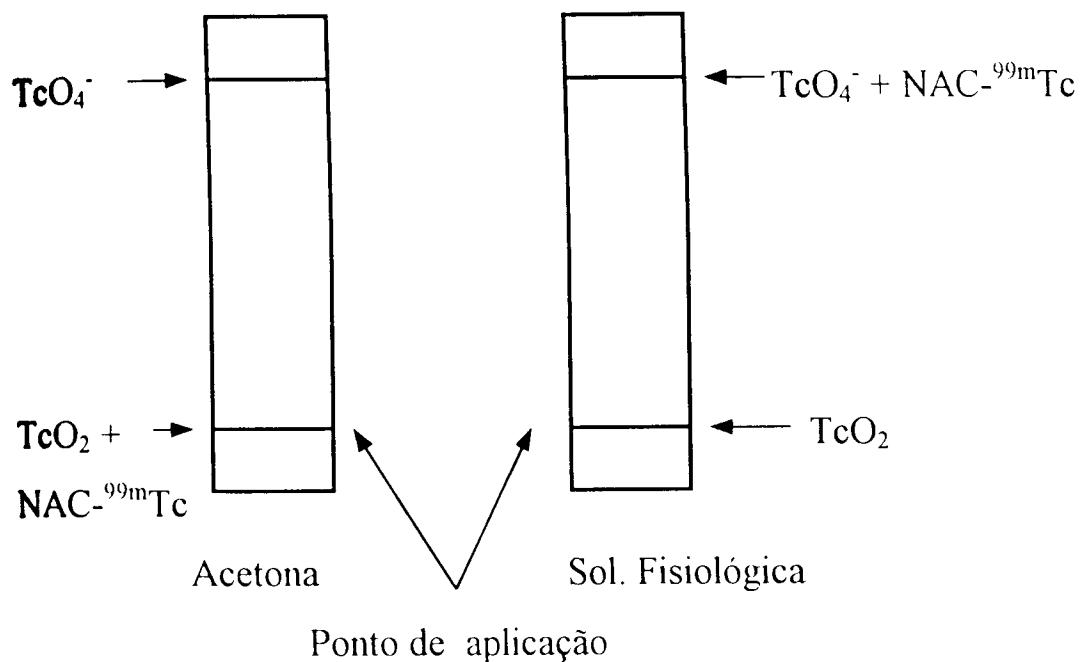


Figura 3.1 - Sistema cromatográfico para avaliação radioquímica da NAC- ^{99m}Tc .

3.4.2.1 Controle radioquímico através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A NAC depois de marcada com Tc-99m, nas melhores condições verificadas através de cromatografia em camada delgada, foi submetida a análise em cromatógrafo de alta eficiência CG-480 C, Shimadzu C-R4A Chromatopac, tendo acoplado um detetor de radioatividade Nuclear Spectrometer LB 2040 - Berthold, para obtenção do tempo de retenção e verificação da eventual existência de outras formas radioquímicas.

A análise foi realizada com coluna Nucleosil C18 (250 x 4,6 mm) em fase reversa eluída isocraticamente com uma solução de citrato de trisódio 0,05M e metanol na proporção de 70:30, fluxo de 0,8ml/min, pressão de 150 atm e 2 µl da amostra após ultrasonificação. A leitura do U.V. foi feita em comprimento de onda 230 nm^(95, 54).

3.5 Padronização do modelo tumoral

Para obtenção de uma massa tumoral bem definida, passível de mensuração, e de morfologia e localização comparáveis às de neoplasias frequentes no homem, optou-se pelo modelo da massa sólida única de subcutâneo situada na região do flanco⁽¹⁷²⁾.

O tumor de Walker, obtido de um animal portador de lesão, foi removido e triturado em meio de solução fisiológica e mantido a baixa temperatura. Posteriormente, o macerado foi filtrado, através de compressa de gaze, onde se adicionou 2 mg/ml do antibiótico Lincomicina (Frademicina, Rhodia) para prevenir a bacteremia nos ratos.

A inoculação de uma suspensão de células contendo de $2,5 \cdot 10^5$ a $3,0 \cdot 10^5$ células viáveis do tumor ⁽⁶⁴⁾ foi realizada mediante injeção da mesma, no tecido subcutâneo da parede lateral direita do abdomen do rato, num volume de 2 ml.

Oito dias após a inoculação das células malignas, os tumores tomavam-se palpáveis e visíveis, procedendo-se a injeção endovenosa do radiofármaco e o estudo de biodistribuição nos vários órgãos e fluidos (sangue e plasma), bem como na massa tumoral (Figuras 3.2, 3.3, 3.4).

3.6 Estudos biológicos do MIBI-^{99m}Tc e da NAC-^{99m}Tc

3.6.1 Distribuição biológica

Foram utilizados 6 a 10 ratos machos sadios da raça *Wistar* com peso médio de 250 g, para cada tempo avaliado, para cada produto nos diferentes estudos realizados. Os ratos portadores de tumor, com as mesmas características e em mesmo número, foram preparados conforme descrição no item anterior.

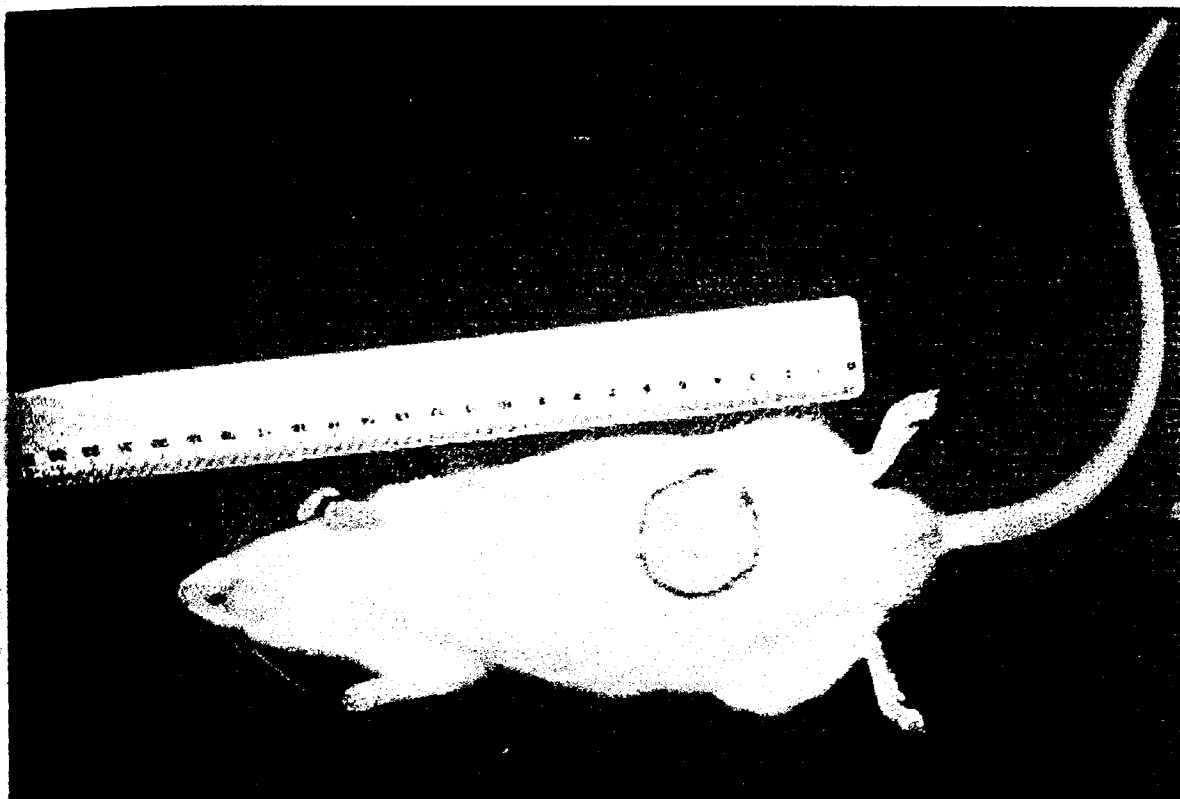


FIGURA 3.2 - Massa tumoral inoculada na parede anterior do abdomen
(A padronização subsequente contemplou somente a parede lateral direita desta região).
Após oito dias, percebe-se o nódulo canceroso, ressaltado por um anel desenhado a tinta
(diâmetro à superfície \cong 4 cm).

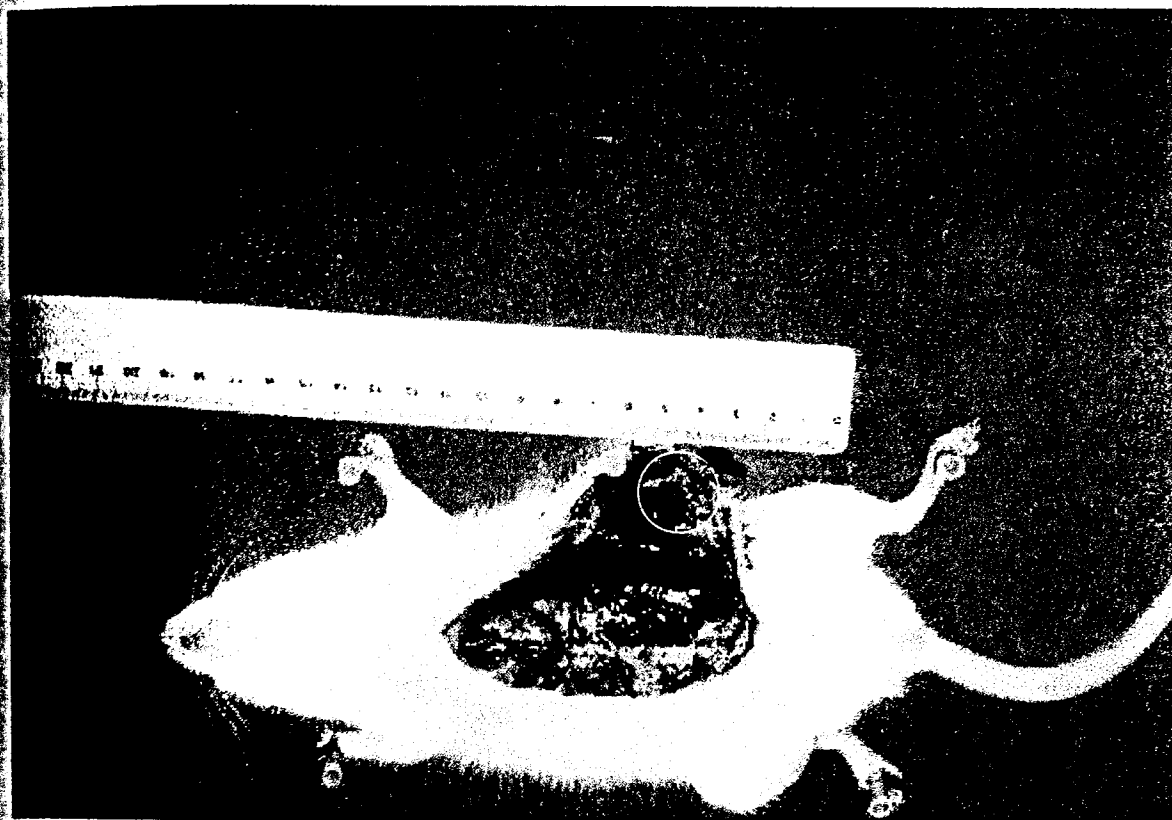


FIGURA 3.3 - Início da dissecação do nódulo subcutâneo

A pele e tecido celular subcutâneo foram rebatidos conjuntamente com a massa neoplásica, que apesar de suas grandes dimensões não invade estruturas vizinhas.

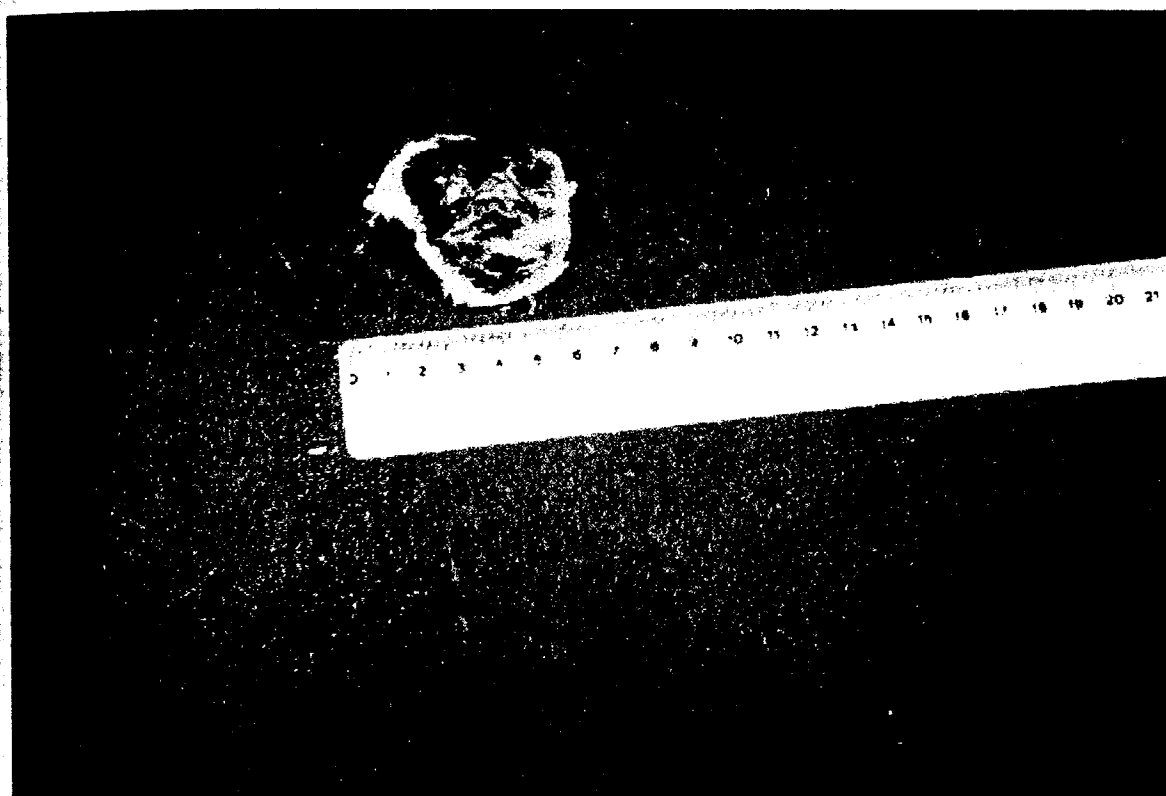


FIGURA 3.4 - Nódulo tumoral isolado e aberto.

Percebe-se um bloco bem identificado de tecido sólido formando uma pseudo-cápsula. Seu interior é irregular, algumas vezes exibindo zonas de hemorragia espontânea ou fragmentos necrosados (Diâmetro máximo antes da abertura de \cong 5 cm).

Durante o bioensaio, todos os animais foram anestesiados com solução de uretana (1 mg/g de peso corpóreo) injetada intraperitonealmente. Subseqüentemente, administrou-se intravenosamente 3,7 MBq/0,1 ml do radiofármaco. Decorridos os tempos pré-estabelecidos (1,5,10,15,30,60,90, 120,960 e 1440 minutos), os animais foram sacrificados por decapitação e seu sangue foi coletado em frasco heparinizado. Posteriormente, procedeu-se à dissecação da carcaça, retirando-se os órgãos e tecidos considerados essenciais (rins, fígado, coração, pulmão, baço, estômago, intestino grosso, intestino delgado e músculo anterior da coxa esquerda), conjuntamente com o tumor, quando existente. Intestino delgado, grosso e estômago foram avaliados sem o conteúdo.

Estes órgãos foram pesados e em seguida colocados em tubos para a contagem da atividade em contador gama tipo poço com detetor de NaI(Tl).

Foi feito um padrão tomando-se a mesma dose injetada nos animais, isto é, 3,7 MBq/0,1 ml e diluindo-se para 10 ml. Em seguida tomou-se 1 ml desta solução, colocou-se também num tubo e fez-se a contagem. A porcentagem de cada órgão foi calculada a partir da contagem do padrão equivalente a 100 % da dose injetada. Para os estudos de musculatura esquelética, adotou-se como massa 40 % do peso animal ⁽⁸⁴⁾.

3.6.2 Análise do sangue e plasma

Do sangue coletado em vidros heparinizados imediatamente após o sacrifício dos animais por decapitação, tomava-se uma alíquota de 1 ml, colocada em tubos para a determinação da radioatividade.

O restante do sangue do vidro era centrifugado a 3000 rpm por 10 min., e amostras de 0,5 ml do plasma eram retiradas também para a determinação da radioatividade.

Ambas as determinações foram calculadas em relação a um padrão da dose administrada preparado como descrito acima.

O cálculo da radioatividade sanguínea e plasmática obedeceu às equações que se seguem:

$$\frac{\text{contagem da atividade do sangue}}{\text{contagem da atividade do padrão}} \times 100 = \text{atividade sangue/ml (\%)}$$

$$\frac{\text{contagem da ativ. do plasma} \times 2}{\text{contagem da atividade do padrão}} \times 100 = \text{atividade plasma/ml (\%)}$$

$$\text{Volemia} = \text{Peso}_{\text{animal}} (\text{g}) \times 0.0575 \quad (93)$$

$$\text{Volume plasmático} = \frac{\text{Volemia (ml)} \times (100 - \text{Hematócrito})}{100} \quad (56)$$

Plasma total (%) = Volume plasmático x atividade plasma/ml (%)

3.6.3 Estudos de eliminação

A eliminação urinária foi avaliada para cada produto em ratos sadios e com lesão experimental.

Primeiramente, fez-se a determinação da radioatividade na excreção urinária com os animais anestesiados. Subseqüentemente à administração intravenosa do radiofármaco, amarrou-se o pênis para haver retenção da urina na bexiga. Após o tempo de observação apropriado, o animal foi sacrificado e a bexiga cuidadosamente retirada para a determinação da radioatividade presente na mesma.

Para confirmação dos resultados obtidos, o estudo de excreção urinária foi repetido, colocando-se os animais após a injeção do composto radioativo pela mesma via em gaiolas individuais, circulares, forradas com papel absorvente para coleta das excretas. Os animais foram induzidos a urinar por compressão abdominal no momento da coleta da urina para a obtenção do material e avaliação da radioatividade presente. Esta técnica foi aplicada regularmente com intuito de esvaziar periodicamente a bexiga e evitar a superposição dos dados, no limite de tempo, em virtude do acúmulo de diferentes conteúdos biológicos na bexiga.

As fezes de cada rato foram recolhidas e a radioatividade contada após 6 horas da dose administrada.

A determinação da atividade nos intestinos cheios (sucos gastrointestinais) foi efetuada apenas para o estudo da NAC-^{99m}Tc em ratos sadios e ratos com tumor, 240 minutos após a injeção da droga. Por não se incluir entre os parâmetros definidos no protocolo, sua mensuração foi feita apenas a título indicativo.

Os cálculos da porcentagem de captação, tanto para urina, quanto para fezes, foram efetuados utilizando a radioatividade da dose injetada como padrão.

3.6.4 Determinação da porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas

Para a determinação da porcentagem do radiofármaco que se liga às proteínas plasmáticas, utilizou-se o método da precipitação, com ácido tricloroacético^(10, 182).

Tomou-se 200 µl de plasma coletado após 15 e 30 minutos da administração da dose e adicionou-se 1 ml de solução de ácido tricloroacético (TCA) a 10 %. Após agitação vigorosa em Vortex por um minuto, a solução foi centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm e separou-se o

precipitado do sobrenadante. O precipitado foi lavado com mais 1 ml de solução de TCA, e repetiu-se o procedimento.

A radioatividade das proteínas plasmáticas precipitadas foi determinada em contador gama e a porcentagem de ligação calculada a partir da contagem da amostra de plasma inicial.

3.6.5 Determinação da porcentagem de ligação aos eritrócitos ⁽¹⁰⁾

Para esta determinação, mediu-se primeiramente a atividade de amostras de 1 ml de sangue obtidas após 15 e 30 minutos da administração da droga. Essas amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos.

O plasma foi desprezado, os eritrócitos lavados com 1 ml de solução salina 0,9 % e novamente centrifugados. O procedimento foi repetido por mais duas vezes, totalizando 3 lavagens, após o que determinou-se a radioatividade correspondente aos eritrócitos.

A porcentagem de ligação dos fármacos aos eritrócitos foi obtida relacionando-se a atividade do sangue inicial e final, corrigindo-se as medidas conforme o decaimento do radionuclídeo.

3.7 Captação tumoral e estudos de imagem

Uma vez calculada a captação pelo tecido neoplásico, e confirmados valores significativos, procedeu-se a tentativa de visualização do tumor pela cintilografia.

Os estudos de imagem foram realizados no Centro de Medicina Nuclear da Universidade de São Paulo, sob a orientação do Prof. Dr. Carlos Buchpieguel.

Os animais foram preparados de acordo com as técnicas anteriormente descritas, injetando-se intravenosamente a dose do traçador (74 MBq/2mCi) e em seguida posicionando-se convenientemente em gama-câmara para obtenção de imagens cintilográficas do MIBI-^{99m}Tc e NAC-^{99m}Tc nos períodos de 20 e 240 minutos respectivamente.

3.8 Análise compartimental

Os dados de atividade sanguínea e excreção urinária obtidos na biodistribuição das drogas nos vários tempos estudados foram inseridos para análise compartimental em dois programas para computador, para obtenção de curvas experimentais capazes de definir um modelo de distribuição, assim como para coleta de dados pertinentes à análise cinética.

Os programas utilizados foram o "Anacomp" versão 1996 elaborado pelo Dr. Carlos Henrique Mesquita do Departamento de Aplicações Industriais do IPEN/CNEN ⁽¹⁰⁶⁾ e o Programa "Biexp" desenvolvido pela Dra. Consuelo A. de Murphy, Instituto Nacional de la Nutricion Salvador Zubiran, México 1992 ⁽¹¹⁷⁾.

O programa "Anacomp" é um esquema computacional de múltiplas aplicações, projetado para a análise de dados cinéticos em termos de modelos matemáticos, capaz de fornecer numerosas equações e projeções.

O programa "Biexp" é mais modesto e somente aceita dados que se adaptem a um modelo bicompartimental, isto é, apresentam curvas sanguíneas constituídas de duas exponenciais. Seu manejo é mais flexível, mas em contrapartida não oferece alguns dos resultados do programa anterior. Tendo-se em vista a complementaridade das duas abordagens e também o fato de que uma hipótese bicompartimental é plausível e presta-se para uma avaliação geral das drogas em tela, foi este o modelo básico selecionado. Optou-se portanto pela tentativa de caracterização de dois espaços hídricos de distribuição, um central e um periférico, mediante a aplicação de ambos os programas de análise.

3.8.1 Criação do modelo e determinação das suas variáveis

Admitiu-se que a quantidade de fármaco que sai do compartimento central (sangue) até o compartimento periférico (extravascular) é fornecida pela contante de distribuição k_{12} ; a quantidade que volta em sentido inverso calcula-se com a constante de difusão k_{21} e a quantidade eliminada do compartimento “central” é representada por k_{13} . Estas relações podem ser observadas na Figura 3.5.

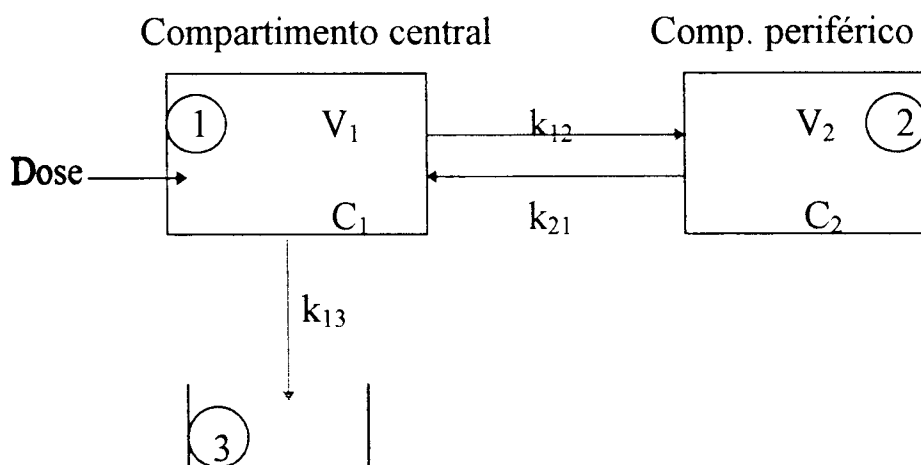


FIGURA 3.5 - Esquema do modelo de dois compartimentos abertos. O compartimento 3 é representado apenas para recolher a droga eliminada do compartimento 1.

Para todas as análises farmacocinéticas partiu-se da administração rápida de dose única (D) diretamente no compartimento central ou intravascular. Supondo haver distribuição instantânea do fármaco neste compartimento, a concentração C_1 alcançada imediatamente após a administração é igual à dose, dividida pelo volume do compartimento central

(V₁). Neste instante, a concentração do fármaco no compartimento periférico é zero. Logo após administração de D, o fármaco começa a ser transferido para o compartimento periférico, até atingir certa concentração (C₂), com tendência ao equilíbrio (“*steady state*”).

Alinhando-se os pontos relacionados entre C₁ e tempo, em gráfico semi-logarítmico, obteve-se a curva com dois componentes lineares. A rápida queda inicial na concentração, chamada fase *alfa*, ou de distribuição, representou o processo de distribuição do fármaco do compartimento central para o periférico. Assim que esta fase se completa, a curva entra na fase *beta* ou de eliminação lenta, na qual o desaparecimento do fármaco do organismo é determinado pela eliminação reversível à partir do compartimento central. Portanto, esta curva pode ser decomposta em duas retas relacionadas, cada uma às respectivas fases da curva ^(91, 117) (Figura 3.6).

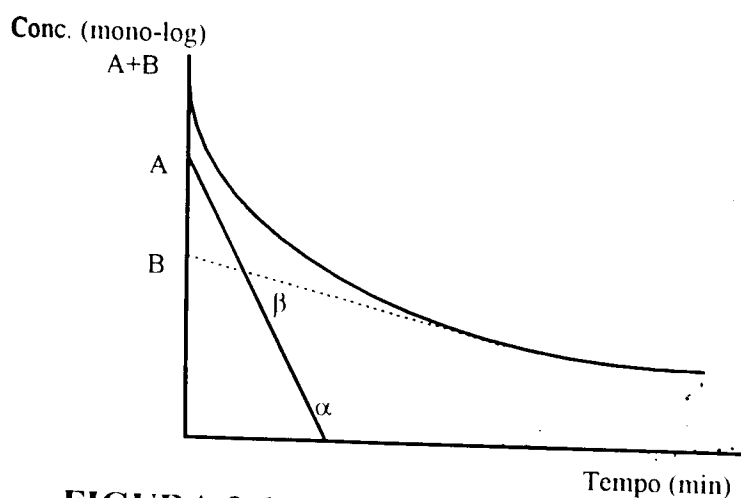


FIGURA 3.6 - Curva de decaimento plasmático

Projetando-se as retas obtidas no gráfico até o ponto de intersecção para $t = 0$, obtiveram-se os coeficientes teóricos de concentração sérica, respectivamente denominados coeficiente A e coeficiente B, os quais são obviamente dependentes da dose total administrada (D), dos volumes dos

compartimentos (V_1 e V_2), e das inter-relações físico-químicas entre fármaco e organismo.

Os ângulos formados pelas retas das fases α e β e o eixo das ordenadas não dependem da dose administrada, mas sim dos valores dos coeficientes de eliminação (k_e) e do intercâmbio entre os dois compartimentos (k_{12} e k_{21}). Estes ângulos definiram dois novos índices, ou seja, coeficiente α e coeficiente β respectivamente, os quais, tal como os coeficientes A e B, são híbridos e dependentes de outros fatores. Deve-se ressaltar que a análise da curva sanguínea é realizada pelos programas computacionais utilizados.

Desta forma, a curva exponencial foi representada pela equação geral $C_1 = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$.

O ritmo de perda do isótopo do compartimento 1 pode ser expresso em termos de meia-vida, isto é, o tempo necessário para que a concentração reduza-se à metade de um valor inicial, de referência.

Calculou-se o tempo de meia-vida dividindo-se o logaritmo natural na base 2 pelo coeficiente de velocidade.

$$T_{1/2} = \frac{0,693}{\alpha \text{ ou } \beta}$$

O volume de distribuição da droga obtém-se pela razão entre a quantidade da dose do fármaco administrado e a concentração sanguínea ($V = \text{Dose}/C$).

3.9 Métodos estatísticos

3.9.1 Procedimentos gerais

Calculou-se a média e o desvio padrão para todas as grandezas de distribuição normal, estimando-se também as porcentagens de retenção tecidual, quando cientificamente relevante.

As curvas de captação e eliminação correspondentes a tecidos e compartimentos significativos foram traçadas em microcomputador modelo PC-Pentium, com auxílio de programa Microsoft Excel. A significância das diferenças observadas foi aferida com base na análise de variância dos valores respectivos, calculando-se a probabilidade (“p”) a um nível de 5 %.

3.9.2 Análise de Regressão Linear para dados múltiplos

Foram realizadas correlações entre as variáveis de captação de cada radiofármaco, em diversos órgãos, para ratos sadios e ratos portadores de neoplasia, e a correlação entre os dois radiofármacos, no estudo de biodistribuição realizado.

Foi também realizada a correlação entre peso (tamanho do tumor) e a captação dos radiofármacos pelo mesmo.

Os estudos foram feitos aplicando-se regressão linear pelo método de análise matricial, com cruzamento de todos os parâmetros analisados. Para cada situação, calculou-se o índice de Pearson (“r”) e a probabilidade (“p”).

3.9.3 Comparação dos radiofármacos para órgãos da mesma população

As captações dos órgãos e tecidos ao longo do tempo em cada um dos modelos animais (sadios e câncer) e dos traçadores investigados (MIBI-^{99m}Tc e NAC-^{99m}Tc) foram cotejadas entre si através do teste de Newman-Keuls para comparações múltiplas.

Nessas condições, os valores das 10 principais curvas de captação de cada um desses grupos foram comparados entre si. Os resultados foram apresentados em forma gráfica, divididos por classes estatisticamente semelhantes.

Todas as análises aqui citadas foram feitas no programa de estatística KSTAT para DOS utilizando-se um microcomputador PC-Pentium. Em todas as eventualidades, adotou-se um nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

“O sucesso não tem nada a ver com os êxitos que conseguimos na vida. Sucesso é o que conseguimos fazer pelos outros”.

Danny Thomas

4.RESULTADOS

4.1 Preparo dos marcadores radioisotópicos

4.1.1 Procedimentos e controle radioquímico do conjunto liofilizado de MIBI marcado com Tc-99m.

A marcação do MIBI já se encontra devidamente padronizada e disponível comercialmente, razão pela qual não foi analisada no presente trabalho.

A pureza radioquímica obtida seguindo-se as recomendações do produtor (Du Pont Pharma), foi superior a $97,8 \pm 0,4$ % com uma impureza coloidal de $1,68 \pm 0,23$ %.

4.1.2 Controle radioquímico da marcação de NAC com Tc-99m e procedimentos para otimização dos parâmetros de marcação

Os melhores resultados foram observados utilizando-se um sistema cromatográfico ascendente em fitas de alumínio impregnadas com sílica gel (CCD-SG).

A pureza da marcação obtida foi superior a 98 %, determinada pela fórmula citada em materiais e métodos.

Os resultados da avaliação radioquímica dos vários parâmetros testados podem ser observados na Tabela 4.1.

Em relação aos tempos de incubação estudados (30, 60, 90 e 120 minutos), obtiveram-se como porcentagem de pureza radioquímica do complexo os seguintes valores, respectivamente: 98,36 %, 98,28 %, 97,47 % e 98,17 %.

Após a análise de todos os parâmetros, optamos pela seguinte sistematização: NAC-10 mg; Sn (II) - 26 µg ; pH da solução final 9; tempo de incubação - 30 minutos.

TABELA 4.1 - Efeitos da massa do ligante, massa do redutor e pH na pureza radioquímica da NAC-^{99m}Tc.

Parâmetros		^{99m} Tc-NAC (%)	(^{99m} TcO ₄) (%)	(^{99m} TcO ₂) (%)
NAC *	(mg)			
	3	95,56 ± 1,98	0,77 ± 0,03	3,67 ± 0,42
	5	96,50 ± 1,74	0,33 ± 0,01	3,17 ± 0,99
	10	98,43 ± 0,08	0,22 ± 0,01	1,35 ± 0,21
	15	88,69 ± 5,93	2,65 ± 0,12	8,66 ± 1,52
Sn (II) **	(µg)			
	26	98,73 ± 0,03	0,69 ± 0,01	0,58 ± 0,02
	50	98,53 ± 0,07	0,58 ± 0,02	0,89 ± 0,13
	100	98,69 ± 0,06	0,46 ± 0,02	0,85 ± 0,10
	260	93,57 ± 2,65	0,75 ± 0,03	5,68 ± 1,48
pH ***				
	4,0	69,18 ± 7,56	0,13 ± 0,01	30,69 ± 4,07
	6,0	78,29 ± 5,13	0,12 ± 0,01	21,59 ± 3,89
	7,0	96,10 ± 2,85	0,22 ± 0,03	13,40 ± 3,51
	8,0	96,10 ± 2,85	0,34 ± 0,06	3,56 ± 0,52
	9,0	98,76 ± 0,10	0,42 ± 0,03	0,82 ± 0,11

* com 0,2 mg de SnCl₂.2H₂O, em pH 9

** com 10 mg de NAC em pH 9

*** com 50 µg de Sn (II) e 10 mg de NAC

4.1.2.1 Controle radioquímico da NAC-^{99m}Tc através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise por CLAE da mistura utilizando-se os parâmetros finais, mostra um único pico com tempo de retenção (R_t) de 2,21 minutos (Figura 4.1).

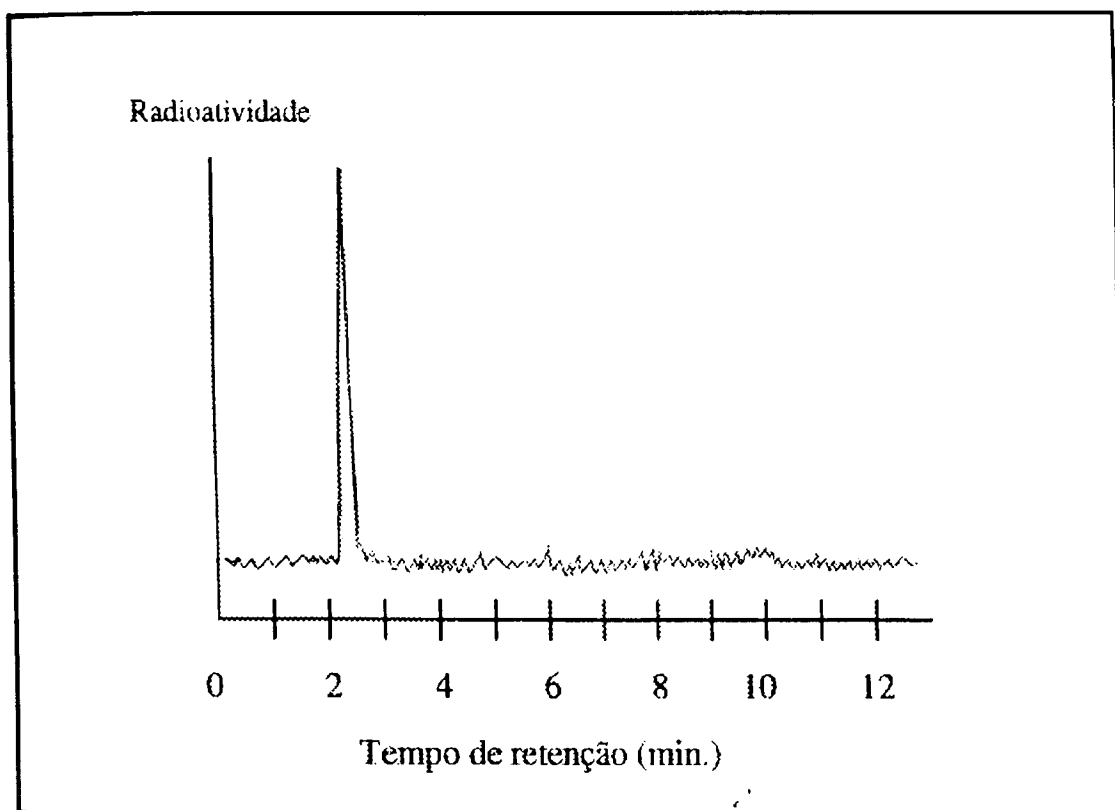


FIGURA 4.1 - Espectro de CLAE da marcação da NAC com Tc-99m.

4.2 Estudos de biodistribuição

Os estudos de biodistribuição dos radiofármacos foram realizados em ratos sadios e ratos com neoplasia.

Os valores da captação do MIBI-^{99m}Tc em ratos sadios, nos diferentes órgãos e tecidos, assim como da NAC-^{99m}Tc, expressos em porcentagem da dose por grama do órgão e porcentagem da dose por órgão encontram-se nas Tabelas 4.2, 4.3, 4.5 e 4.6 respectivamente.

Os valores da concentração do MIBI-^{99m}Tc e da NAC-^{99m}Tc nos diferentes órgãos e tecidos, em ratos portadores de carcinossarcoma de Walker 256 encontram-se nas Tabelas 4.8, 4.9, 4.11 e 4.12, respectivamente.

As porcentagens na urina acumulada e nas fezes para os dois modelos animais e para as duas drogas encontram-se nas Tabelas 4.4, 4.7, 4.10 e 4.13.

Os resultados da ligação dos radiofármacos às proteínas plasmáticas e aos eritrócitos podem ser observados nas Tabelas 4.14 e 4.15, respectivamente, tanto para ratos sadios quanto para ratos portadores de câncer.

TABELA 4.2 - Biodistribuição do MIBI-^{99m}Tc em ratos sadios (%Dose/g)

Tempo/ Órgão	1 min	5 min	10 min	15 min	30 min
Rins	5,92±0,92	5,15±1,61	6,24±0,56	5,67±1,15	5,71±0,62
Fígado	1,31±0,21	1,20±0,22	1,55±0,27	1,37±0,22	1,06±0,20
Coração	3,23±0,53	3,00±1,10	3,08±0,36	3,04±0,66	2,98±0,90
Pulmão	2,42±0,68	1,33±0,14	1,29±0,19	1,05±0,25	0,82±0,13
Baço	0,70±0,19	0,61±0,13	1,69±0,14	1,01±0,15	1,03±0,17
Estômago	0,42±0,11	0,43±0,15	0,51±0,11	0,53±0,16	0,60±0,12
Int. grosso	0,37±0,10	0,39±0,20	0,38±0,07	0,36±0,08	0,38±0,13
Int. delgado	0,50±0,18	0,57±0,16	0,60±0,08	0,63±0,15	0,72±0,16
Músculo	0,35±0,08	0,36±0,05	0,31±0,08	0,26±0,10	0,32±0,14

Tempo/ Órgão	60 min	90 min	120 min	960 min	1440 min
Rins	5,47±1,18	5,53±1,28	4,16±3,04	0,18±0,01	0,14±0,02
Fígado	0,80±0,21	0,70±0,24	0,65±0,12	0,07±0,02	0,05±0,01
Coração	2,77±0,55	2,75±0,56	2,72±0,52	1,05±0,28	0,84±0,04
Pulmão	0,54±0,14	0,43±0,17	0,30±0,08	0,03±0,00	0,03±0,00
Baço	0,80±0,30	1,26±0,39	0,72±0,21	0,02±0,00	0,03±0,01
Estômago	0,65±0,19	0,40±0,11	0,64±0,14	0,08±0,03	0,05±0,01
Int. grosso	0,37±0,09	0,35±0,09	0,34±0,06	0,17±0,02	0,10±0,02
Int. delgado	0,78±0,21	0,70±0,26	0,70±0,26	0,11±0,06	0,05±0,01
Músculo	0,30±0,20	0,25±0,14	0,20±0,07	0,18±0,05	0,16±0,04

**TABELA 4.3 - Biodistribuição do MIBI-^{99m}Tc em ratos sadios
(% Dose/órgão avaliado)**

Tempo/ Órgão	1 min	5 min	10 min	15 min	30 min
Rins	14,41±1,15	14,08±1,98	15,29±1,75	13,92±1,08	13,73±1,41
Fígado	14,81±2,05	15,15±0,59	16,79±1,16	14,11±0,81	14,74±1,95
Coração	3,62±0,67	2,72±0,57	3,53±0,42	3,30±0,31	3,36±0,67
Pulmão	3,56±0,41	1,93±0,11	2,35±0,33	1,84±0,26	1,31±0,11
Baço	0,59±0,19	0,54±0,16	0,95±0,26	0,80±0,19	0,77±0,22
Estômago	0,78±0,13	0,85±0,09	1,30±0,25	1,00±0,23	1,25±0,21
Int. grosso	1,48±0,35	1,49±0,29	1,74±0,36	1,98±0,17	2,38±0,55
Int. delgado	4,66±0,48	4,75±1,32	6,91±0,71	4,27±0,17	6,64±1,66
Músculo	42,21±1,79	36,78±2,48	34,15±2,32	33,78±4,36	32,84±3,44
Sangue	12,64±1,02	2,01±0,32	1,51±0,26	1,12±0,08	0,91±0,32
Plasma	8,69±2,44	1,64±0,80	1,12±0,31	0,67±0,13	0,58±0,32

Tempo/ Órgão	60 min	90 min	120 min	960 min	1440 min
Rins	11,63±2,50	14,87±2,03	6,18±1,60	0,50±0,04	0,38±0,07
Fígado	10,46±1,10	7,61±1,65	6,52±1,48	0,76±0,10	0,55±0,08
Coração	3,13±0,54	3,07±0,59	2,97±0,80	1,50±0,32	1,12±0,10
Pulmão	0,97±0,11	0,77±0,31	0,46±0,12	0,07±0,00	0,06±0,00
Baço	0,60±0,17	0,92±0,17	0,52±0,14	0,024±0,00	0,024±0,01
Estômago	1,15±0,13	0,79±0,17	1,21±0,24	0,13±0,00	0,11±0,01
Int. grosso	1,57±0,27	1,44±0,06	1,50±0,38	0,58±0,25	0,43±0,03
Int. delgado	6,50±1,70	5,32±1,27	5,30±1,30	0,50±0,16	0,42±0,02
Músculo	27,38±3,17	20,66±1,24	16,68±1,71	8,47±0,14	6,93±0,74
Sangue	0,62±0,26	0,37±0,08	0,18±0,07	0,06±0,01	0,004±0,00
Plasma	0,54±0,31	0,26±0,09	0,17±0,10	0,04±0,01	0,02±0,00

Tabela 4.4 - Excreção do MIBI-^{99m}Tc em ratos sadios (%Dose injetada)

Tempo	60 min	120 min	240 min	360 min
Urina	7,75±1,20	11,09±2,91	12,08±2,88	16,69±2,52
Fezes	-	-	-	9,53±0,18

TABELA 4.5 - Biodistribuição da *N*-Acetil cisteína-^{99m}Tc em ratos sadios (%Dose/g)

Tempo/ Órgão	1 min	5 min	10 min	15 min	30 min
Rins	4.46±1.61	7.62±0.93	10.55±4.54	14.34±7.23	17.66±6.17
Fígado	0.67±0.16	0.42±0.08	0.38±0.10	0.33±0.13	0.29±0.04
Coração	1.14±0.32	0.56±0.12	0.30±0.04	0.28±0.17	0.19±0.03
Pulmão	1.24±0.39	0.77±0.26	0.50±0.13	0.46±0.18	0.29±0.09
Baço	0.51±0.06	0.34±0.14	0.21±0.07	0.18±0.06	0.14±0.05
Estômago	0.64±0.18	0.42±0.15	0.33±0.12	0.29±0.10	0.24±0.06
Int. grosso	0.62±0.08	0.45±0.12	0.30±0.08	0.29±0.10	0.22±0.11
Int. delgado	0.47±0.09	0.31±0.07	0.30±0.08	0.28±0.17	0.29±0.08
Músculo	0.32±0.03	0.27±0.06	0.15±0.04	0.13±0.06	0.09±0.03

Tempo/ Órgão	60 min	90 min	120 min	240 min	960 min	1440 min
Rins	20.21±3.27	21.87±4.46	15.90±1.52	18.22±2.21	5.57±0.42	3.86±0.79
Fígado	0.29±0.06	0.26±0.08	0.22±0.06	-	0.05±0.01	0.04±0.01
Coração	0.15±0.02	0.10±0.04	0.05±0.01	-	0.02±0.00	0.09±0.00
Pulmão	0.23±0.04	0.20±0.03	0.11±0.02	-	0.04±0.01	0.02±0.01
Baço	0.13±0.03	0.10±0.05	0.05±0.00	-	0.03±0.01	0.02±0.00
Estômago	0.25±0.11	0.17±0.10	0.08±0.03	-	0.03±0.01	0.01±0.00
Int. grosso	0.23±0.07	0.16±0.13	0.11±0.03	0.07±0.02	0.02±0.01	0.02±0.01
Int. Delgado	0.31±0.10	0.28±0.06	0.21±0.02	0.26±0.05	0.02±0.01	0.01±0.00
Músculo	0.08±0.02	0.05±0.02	0.04±0.01	-	0.01±0.00	0.005±0.001

TABELA 4.6 - Biodistribuição da N-Acetil cisteína - ^{99m}Tc em ratos sadios (%Dose/órgão)

Tempo/ Órgão	1 min	5 min	10 min	15 min	30 min
Rins	8,02±1,70	18,52±3,33	22,56±3,66	30,62±4,90	37,2±9,78
Fígado	7,74±0,62	5,52±1,16	5,00±0,72	4,27±0,84	4,0±0,54
Coração	1,15±0,15	0,59±0,03	0,36±0,06	0,34±0,09	0,22±0,04
Pulmão	2,11±0,39	1,39±0,33	0,90±0,15	0,87±0,23	0,56±0,17
Baço	0,38±0,06	0,27±0,06	0,17±0,03	0,15±0,02	0,11±0,03
Estômago	1,32±0,26	0,99±0,21	0,70±0,06	0,67±0,12	0,53±0,13
Int. grosso	2,84±0,37	2,60±0,30	1,93±0,47	1,68±0,15	1,23±0,53
Int. delgado	4,83±0,95	3,72±0,67	3,37±0,27	3,14±1,22	3,11±0,57
Músculo	32,27±4,12	29,54±5,03	19,22±3,20	17,12±1,84	9,07±1,65
Sangue	41,83±5,49	25,42±5,78	17,22±3,36	12,10±2,33	9,70±2,94
Plasma	40,0±4,13	22,51±5,48	15,92±3,73	11,06±2,19	8,37±2,72

Tempo/ Órgão	60 min	90 min	120 min	240 min	960 min	1440 min
Rins	40,62±4,96	45,72±4,52	41,59±4,67	34,84±1,30	16,70±0,91	11,58±1,00
Fígado	3,92±0,48	3,43±0,32	2,17±0,25	-	0,67±0,01	0,48±0,07
Coração	0,22±0,07	0,13±0,03	0,06±0,01	-	0,03±0,00	0,01±0,00
Pulmão	0,48±0,09	0,38±0,06	0,18±0,03	-	0,10±0,01	0,04±0,007
Baço	0,10±0,01	0,09±0,03	0,04±0,00	-	0,02±0,001	0,02±0,00
Estômago	0,52±0,16	0,29±0,06	0,17±0,04	-	0,06±0,02	0,03±0,01
Int. grosso	1,18±0,14	0,88±0,48	0,57±0,11	0,64±0,19	0,12±0,02	0,12±0,02
Int. delgado	2,98±0,62	2,84±0,23	2,45±0,26	2,23±0,98	0,21±0,02	0,12±0,02
Músculo	6,98±1,39	5,49±1,79	4,13±0,98	-	0,95±0,11	0,70±0,06
Sangue	7,35±1,60	5,88±0,63	3,63±0,32	3,01±1,00	0,99±0,08	0,53±0,03
Plasma	7,13±1,62	4,40±1,14	1,82±0,29	1,64±0,54	0,7±0,05	0,35±0,03

TABELA 4.7 - Excreção da NAC- ^{99m}Tc em ratos sadios (%Dose injetada)

Tempo	60 min	120 min	240 min	360 min
Urina	30,85±4,75	39,48±3,58	50,81±3,99	56,74±3,92
Fezes	-	-	-	6,48±0,85
Int. cheio (%D/órgão)			11,98±2,08	
Int. vazio (%D/órgão)			2,23±0,82	

TABELA 4.8 - Biodistribuição do MIBI-^{99m}Tc em ratos portadores de tumor (% Dose/g)

Tempo/ Órgão	1 min	5 min	10 min	15 min	30 min
Rins	5,29±1,22	7,10±1,69	6,35±1,58	7,34±0,87	6,46±0,91
Fígado	1,65±0,69	1,54±0,14	1,51±0,69	1,47±0,22	1,31±0,31
Coração	2,17±0,36	2,16±0,35	1,80±0,27	2,35±0,34	2,10±0,39
Pulmão	1,18±0,19	0,90±0,17	0,62±0,15	0,65±0,11	0,58±0,10
Baço	1,04±0,38	0,91±0,18	0,93±0,56	0,86±0,14	0,86±0,24
Estômago	0,40±0,07	0,37±0,08	0,34±0,14	0,46±0,12	0,35±0,00
Int. grosso	0,32±0,05	0,37±0,06	0,29±0,08	0,41±0,03	0,33±0,09
Int. delgado	0,49±0,17	0,52±0,15	0,48±0,23	0,59±0,10	0,46±0,12
Músculo	0,32±0,10	0,24±0,04	0,20±0,05	0,13±0,03	0,20±0,09
Tumor	0,18±0,07	0,14±0,00	0,11±0,02	0,14±0,02	0,10±0,02

Tempo/ Órgão	60 min	90 min	120 min	960 min	1440 min
Rins	5,81±2,13	6,81±1,35	5,08±1,71	0,24±0,03	0,17±0,03
Fígado	1,16±0,63	1,58±0,28	1,26±0,23	0,22±0,04	0,14±0,05
Coração	2,00±0,48	2,31±0,07	2,05±0,61	0,78±0,18	0,57±0,20
Pulmão	0,32±0,12	0,33±0,05	0,30±0,07	0,04±0,01	0,02±0,00
Baço	0,88±0,25	0,94±0,10	0,84±0,47	0,03±0,00	0,03±0,00
Estômago	0,36±0,07	0,45±0,07	0,43±0,05	0,11±0,03	0,05±0,00
Int. grosso	0,26±0,08	0,35±0,07	0,30±0,03	0,25±0,02	0,14±0,11
Int. delgado	0,42±0,19	0,87±0,15	0,57±0,14	0,08±0,01	0,08±0,04
Músculo	0,25±0,08	0,26±0,05	0,24±0,06	0,14±0,05	0,12±0,05
Tumor	0,10±0,04	0,12±0,02	0,11±0,03	0,02±0,01	0,01±0,00

TABELA 4.9 - Biodistribuição do MIBI-^{99m}Tc em ratos portadores de tumor (% Dose/ órgão avaliado)

Tempo/ Órgão	1 min	5 min	10 min	15 min	30 min
Rins	12,94±3,10	16,87±2,69	14,20±1,26	14,20±1,26	14,58±1,75
Fígado	16,95±5,70	19,10±1,76	19,92±2,25	19,92±2,25	21,46±2,90
Coração	2,27±0,32	3,11±0,61	2,89±0,33	2,89±0,33	2,92±0,46
Pulmão	2,21±0,59	1,96±0,34	1,64±0,17	1,64±0,17	1,13±0,17
Baço	1,15±0,31	1,02±0,22	1,15±0,16	1,15±0,16	1,31±0,16
Estômago	0,85±0,14	0,85±0,15	0,96±0,18	0,96±0,18	0,78±0,13
Int. grosso	1,27±0,24	1,93±0,18	1,73±0,19	1,73±0,19	1,55±0,27
Int. delgado	4,06±0,50	3,76±0,69	4,45±0,78	4,45±0,78	2,96±0,41
Músculo	39,98±3,14	29,60±2,37	19,58±1,81	19,58±1,81	21,17±1,56
Sangue	13,11±3,40	1,79±0,18	1,09±0,25	1,09±0,25	0,64±0,06
Plasma	5,38±1,21	0,82±0,07	0,44±0,09	0,44±0,09	0,28±0,06

Tempo/ Órgão	60 min	90 min	120 min	960 min	1440 min
Rins	13,68±3,22	14,97±0,91	14,74±2,95	0,68±0,01	0,41±0,07
Fígado	18,12±4,06	17,86±3,36	14,57±2,33	2,52±0,53	1,40±0,27
Coração	2,54±0,52	2,42±0,26	2,47±0,56	1,03±0,13	0,70±0,22
Pulmão	0,79±0,21	0,64±0,11	0,66±0,16	0,11±0,01	0,05±0,00
Baço	1,06±0,25	1,08±0,13	1,10±0,45	0,05±0,00	0,04±0,00
Estômago	0,77±0,15	0,79±0,09	0,80±0,06	0,22±0,05	0,11±0,01
Int. grosso	1,15±0,21	1,18±0,24	1,18±0,22	1,16±0,08	0,70±0,34
Int. delgado	3,76±0,82	3,08±0,73	2,95±0,57	0,74±0,05	0,65±0,26
Músculo	20,84±1,69	18,03±2,71	18,98±0,57	12,17±1,26	10,20±1,82
Sangue	0,42±0,10	0,42±0,04	0,41±0,15	0,07±0,01	0,06±0,02
Plasma	0,18±0,04	0,17±0,02	0,26±0,10	0,04±0,01	0,02±0,01

Tabela 4.10 - Excreção do MIBI-^{99m}Tc em ratos com tumor (%Dose injetada)

Tempo	60 min	120 min	240 min	360 min
Urina	8,36±1,20	9,94±1,30	17,09±1,84	21,00±2,22
Fezes	-	-	-	10,08±0,20

TABELA 4.11- Biodistribuição da NAC-^{99m}Tc em ratos com carcinossarcoma de Walker (%Dose/g)

Tempo/ Órgão	1 min	5 min	10 min	15 min	30 min
Rins	3,02±0,77	5,12±2,17	6,28±1,68	9,94±2,69	10,26±3,36
Fígado	0,52±0,12	0,28±0,07	0,31±0,06	0,26±0,03	0,26±0,06
Coração	0,86±0,03	0,33±0,09	0,34±0,10	0,21±0,06	0,16±0,03
Pulmão	1,03±0,24	0,42±0,17	0,41±0,10	0,32±0,06	0,25±0,02
Baço	0,42±0,11	0,21±0,07	0,21±0,06	0,15±0,02	0,12±0,02
Estômago	0,32±0,07	0,25±0,07	0,28±0,05	0,27±0,03	0,19±0,05
Int. grosso	0,36±0,09	0,26±0,13	0,27±0,08	0,20±0,06	0,17±0,06
Int. delgado	0,31±0,08	0,20±0,06	0,19±0,03	0,19±0,04	0,19±0,09
Músculo	0,25±0,07	0,15±0,07	0,14±0,03	0,08±0,03	0,06±0,01
Tumor	0,20±0,05	0,18±0,07	0,25±0,07	0,19±0,07	0,19±0,10

Tempo/ Órgão	60 min	90 min	120 min	240 min	960 min	1440 min
Rins	10,83±2,98	14,27±3,46	13,77±1,84	16,93±2,29	7,82±1,43	4,97±0,97
Fígado	0,25±0,11	0,25±0,11	0,25±0,14	-	0,07±0,02	0,04±0,01
Coração	0,12±0,07	0,12±0,06	0,10±0,05	-	0,02±0,00	0,01±0,00
Pulmão	0,16±0,09	0,16±0,06	0,14±0,08	-	0,04±0,01	0,02±0,00
Baço	0,11±0,08	0,12±0,08	0,09±0,04	-	0,04±0,01	0,03±0,01
Estômago	0,19±0,11	0,15±0,07	0,09±0,04	-	0,03±0,01	0,02±0,00
Int. grosso	0,16±0,08	0,12±0,04	0,12±0,06	0,04±0,01	0,03±0,01	0,02±0,00
Int. delgado	0,20±0,08	0,21±0,10	0,20±0,07	0,52±0,12	0,02±0,01	0,02±0,01
Músculo	0,05±0,03	0,05±0,02	0,05±0,02	-	0,01±0,00	0,006±0,00
Tumor	0,19±0,04	0,26±0,02	0,20±0,02	0,19±0,06	0,08±0,01	0,04±0,00

TABELA 4.12 - Biodistribuição da N-acetil cisteína em ratos portadores de tumor (% Dose/órgão)

Tempo/ Órgão	1 min	5 min	10 min	15 min	30 min
Rins	7,17±1,07	11,13±5,50	16,70±4,23	24,89±5,89	29,96±7,52
Fígado	6,52±1,03	3,99±0,94	4,21±0,45	3,75±0,38	4,07±0,49
Coração	1,25±0,18	0,45±0,10	0,41±0,08	0,35±0,03	0,22±0,04
Pulmão	2,14±0,32	1,02±0,22	1,05±0,26	0,73±0,10	0,55±0,05
Baço	0,48±0,10	0,27±0,01	0,27±0,05	0,25±0,07	0,15±0,07
Estômago	0,85±0,13	0,62±0,17	0,60±0,06	0,62±0,13	0,59±0,06
Int. grosso	2,10±0,28	1,40±0,52	1,51±0,35	1,27±0,20	1,06±0,15
Int. delgado	3,07±0,56	2,18±0,57	2,02±0,27	1,71±0,37	1,92±0,65
Músculo	32,32±5,93	26,31±6,99	16,30±2,32	15,53±1,91	10,18±1,34
Sangue	41,79±3,85	22,35±2,29	15,88±4,25	13,13±2,50	8,48±1,87
Plasma	37,02±5,11	14,87±4,73	13,72±3,25	10,70±1,96	7,62±1,26

Tempo/ Órgão	60 min	90 min	120 min	240 min	960 min	1440 min
Rins	31,37±3,49	34,59±4,75	36,77±3,59	39,52±4,53	23,21±2,49	15,46±1,93
Fígado	3,57±1,10	4,05±0,98	2,60±0,65	-	0,94±0,11	0,63±0,12
Coração	0,15±0,08	0,17±0,05	0,07±0,01	-	0,03±0,00	0,01±0,007
Pulmão	0,43±0,17	0,43±0,13	0,18±0,02	-	0,10±0,01	0,07±0,02
Baço	0,15±0,08	0,11±0,03	0,14±0,05	-	0,06±0,02	0,07±0,02
Estômago	0,62±0,15	0,49±0,10	0,21±0,07	-	0,06±0,01	0,04±0,005
Int. grosso	0,78±0,23	0,81±0,20	0,66±0,18	0,42±0,13	0,17±0,09	0,10±0,01
Int. delgado	2,16±0,57	2,0±0,78	1,78±0,52	1,48±0,41	0,20±0,03	0,15±0,008
Músculo	10,65±1,34	8,54±0,94	6,07±0,53	-	1,22±0,19	0,76±0,01
Sangue	7,43±3,39	6,87±2,69	3,15±0,64	3,03±0,66	0,99±0,23	0,48±0,01
Plasma	6,86±2,47	5,99±1,83	2,16±0,50	1,92±0,20	0,60±0,14	0,28±0,00

TABELA 4.13 - Excreção da NAC-^{99m}Tc em ratos com tumor (% Dose injetada)

Tempo	60 min	120 min	240 min	360 min
Urina	36,02±5,79	38,34±3,82	43,23±1,70	50,73±3,41
Fezes	-	-	-	2,31±0,35

TABELA 4.14 - Ligação dos radiofármacos às proteínas plasmáticas

COMPOSTO	GRUPO	% DE LIGAÇÃO AS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS
MIBI- ^{99m} Tc	RATOS SADIOS	63,42±8,15
	RATOS COM TUMOR	64,67±7,00
NAC- ^{99m} Tc	RATOS SADIOS	55,62±6,16
	RATOS COM TUMOR	54,93±6,22

TABELA 4.15 - Ligação dos radiofármacos aos eritrócitos

COMPOSTO	GRUPO	% DE LIGAÇÃO AOS ERITRÓCITOS
MIBI- ^{99m} Tc	RATOS SADIOS	29,17±4,44
	RATOS COM TUMOR	37,50±2,88
NAC- ^{99m} Tc	RATOS SADIOS	6,42±1,04
	RATOS COM TUMOR	4,58±0,57

As curvas de captação do traçador pelos distintos órgãos e tecidos para os dois compostos e para os dois modelos animais, estão configuradas nos gráficos das Figuras 4.2 e 4.3, onde a diferença foi aferida por análise de variância e acha-se assinalada sob a forma do valor de “p”, assim como a curva de captação tumoral das duas drogas na Figura 4.4.

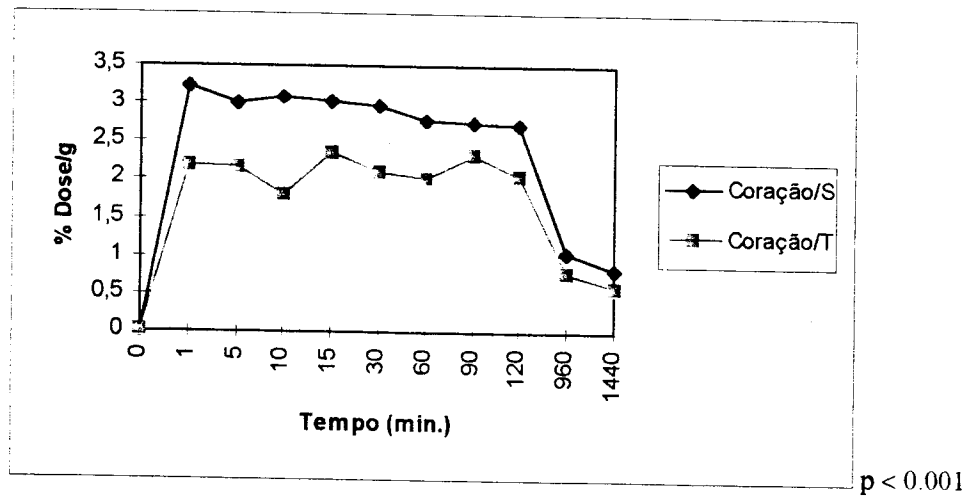
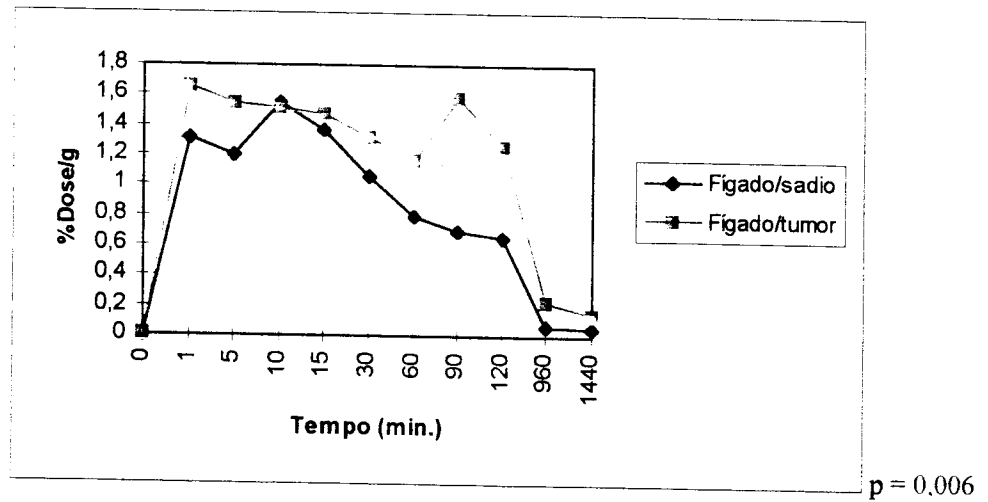
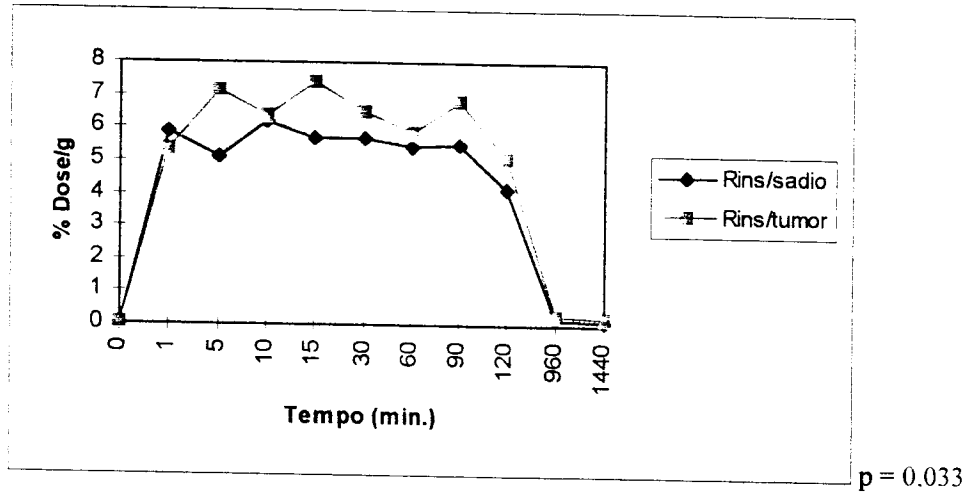


FIGURA 4.2 - Comparação da captação do MIBI-^{99m}Tc por órgãos e tecidos em animais sadios e com câncer.

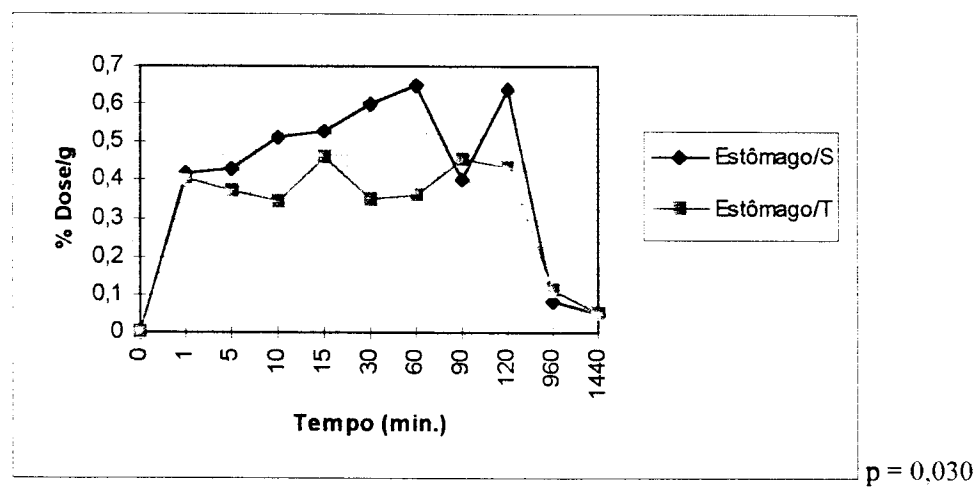
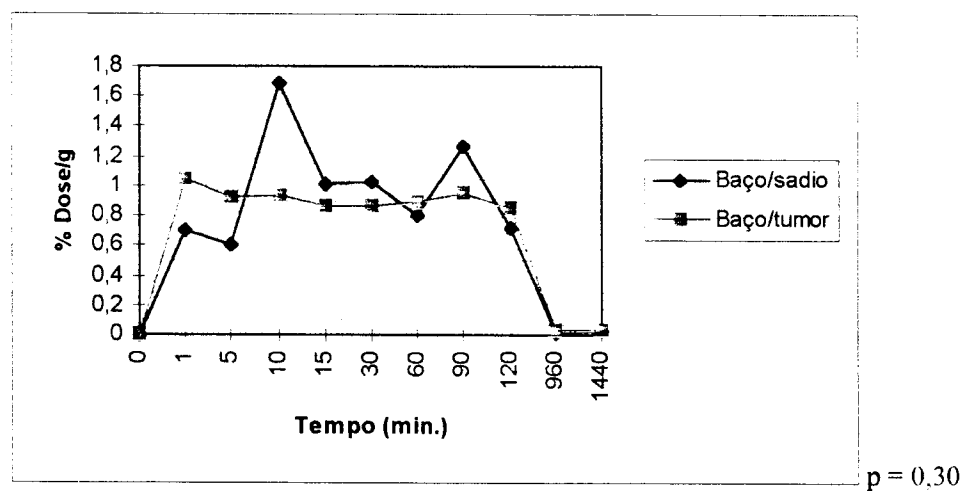
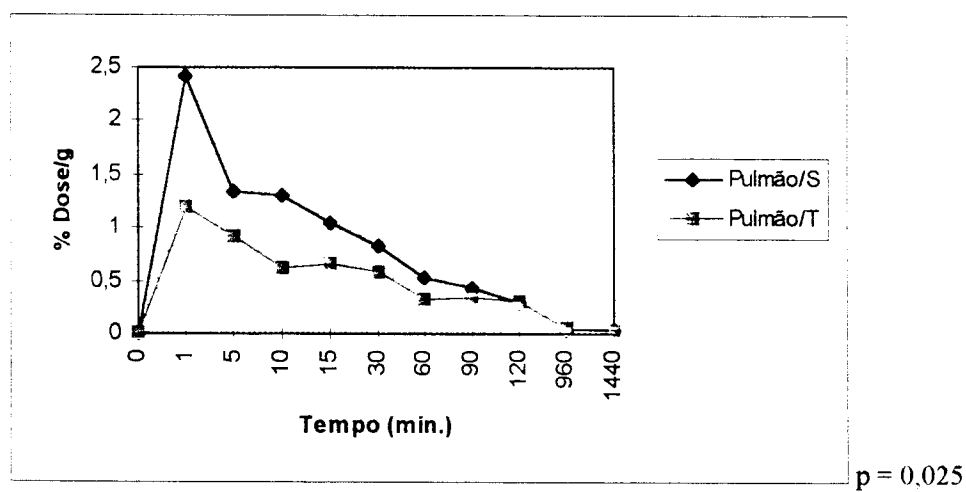
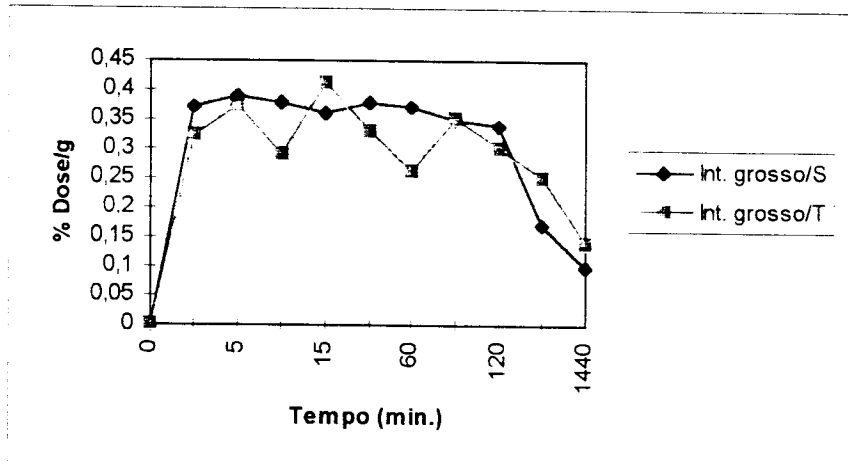
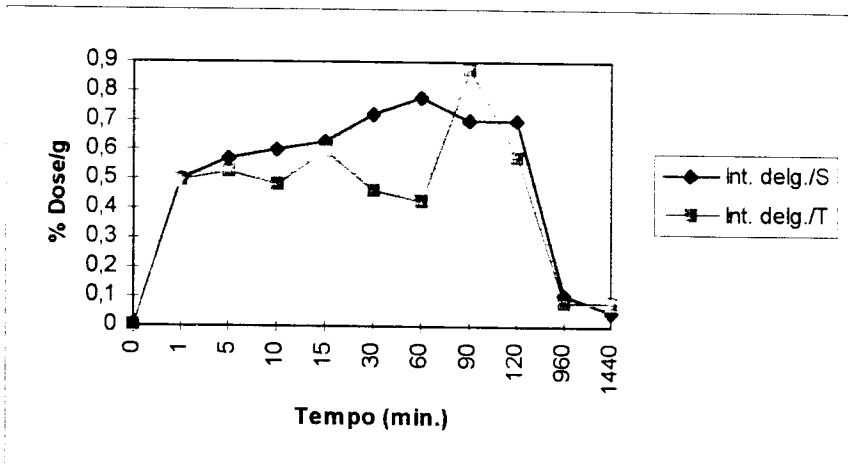


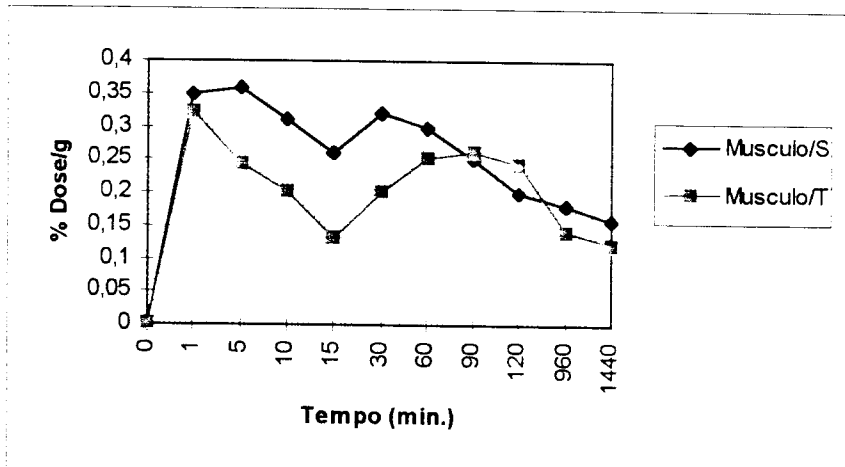
FIGURA 4.2 - Continuação



p = 0.354



p = 0.123



p = 0.011

FIGURA 4.2- Continuação

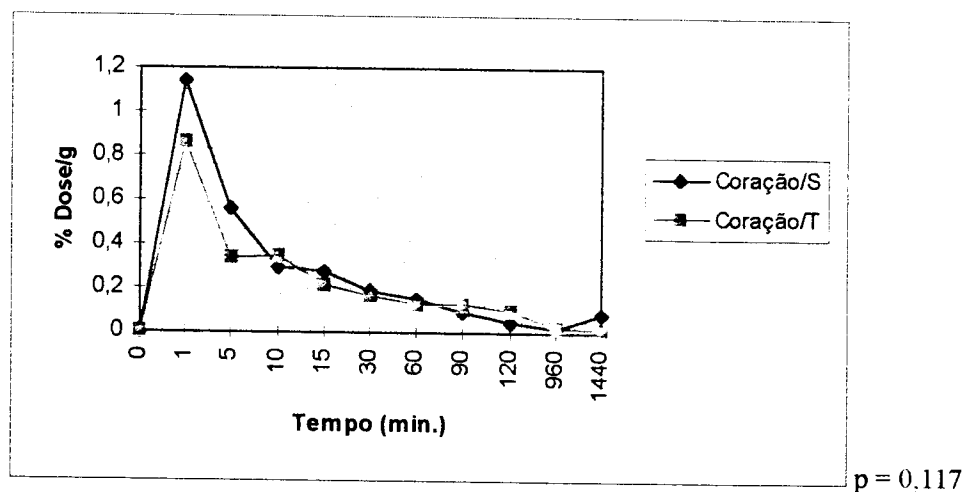
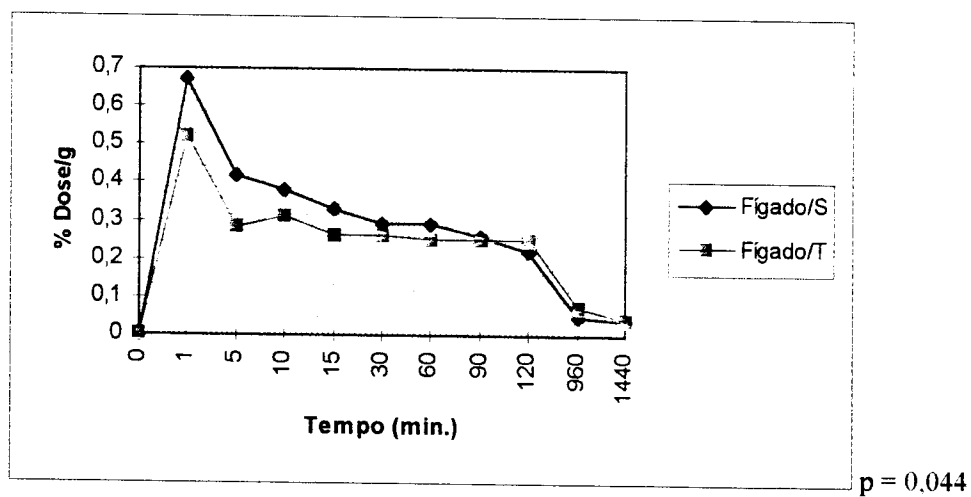
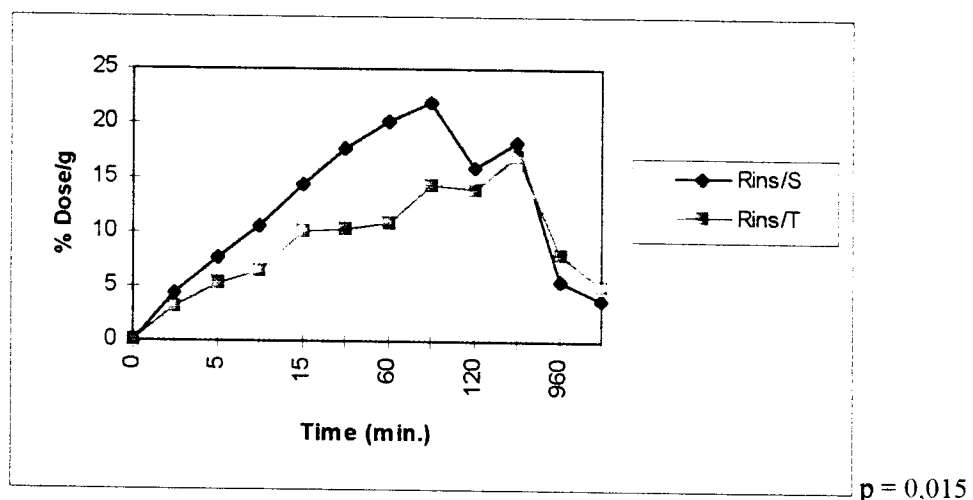
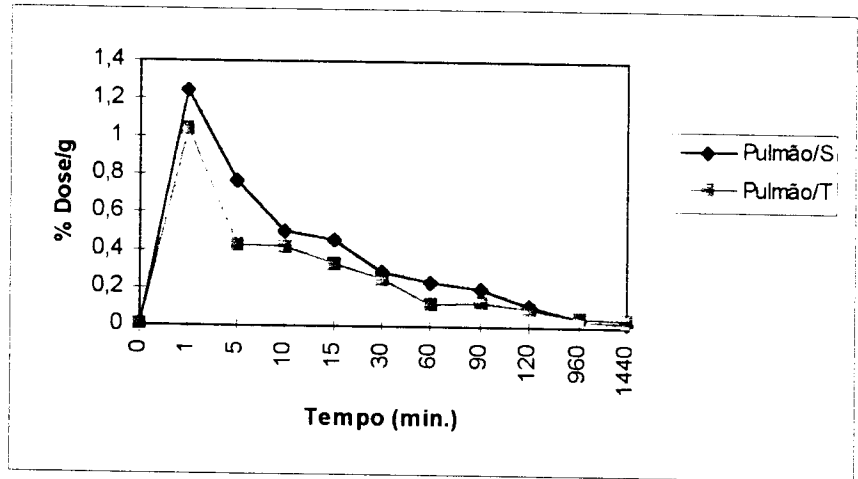
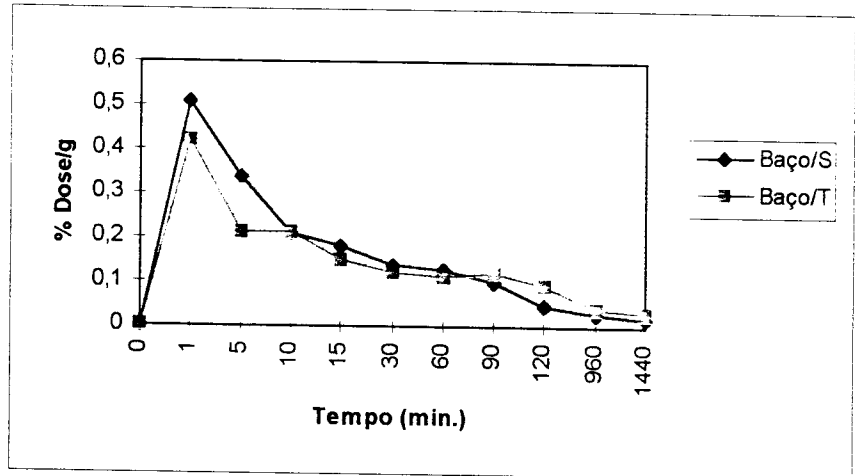


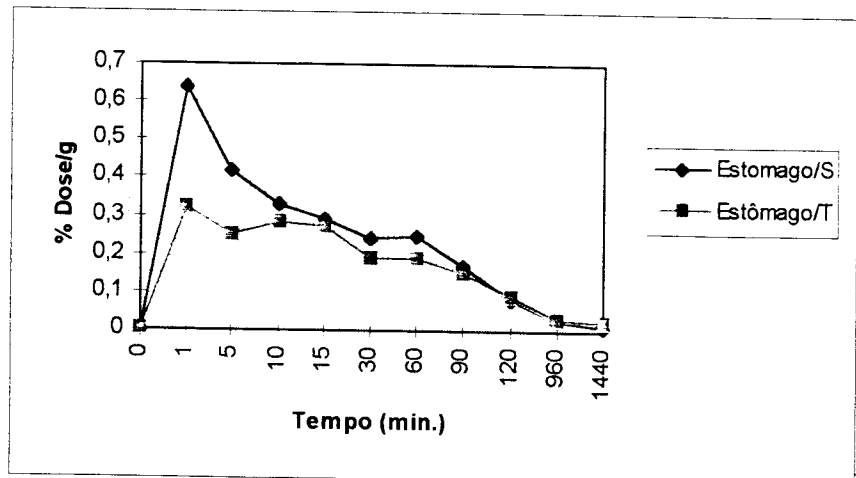
FIGURA 4.3 - Comparação da captação da $\text{NAC-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ nos órgãos e tecidos de ratos saudáveis e com câncer



p = 0.035

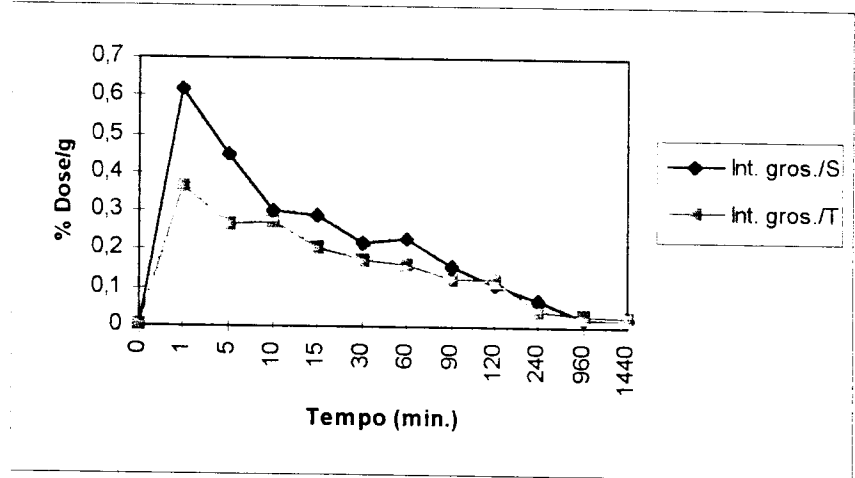


p = 0,235

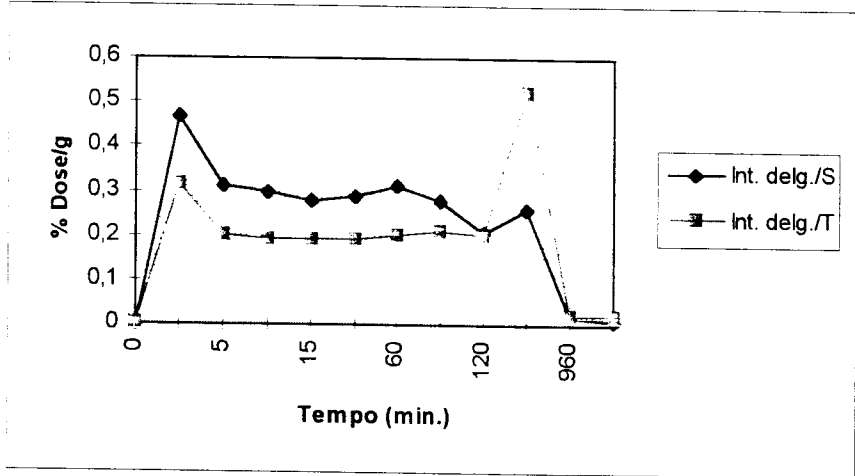


p = 0.070

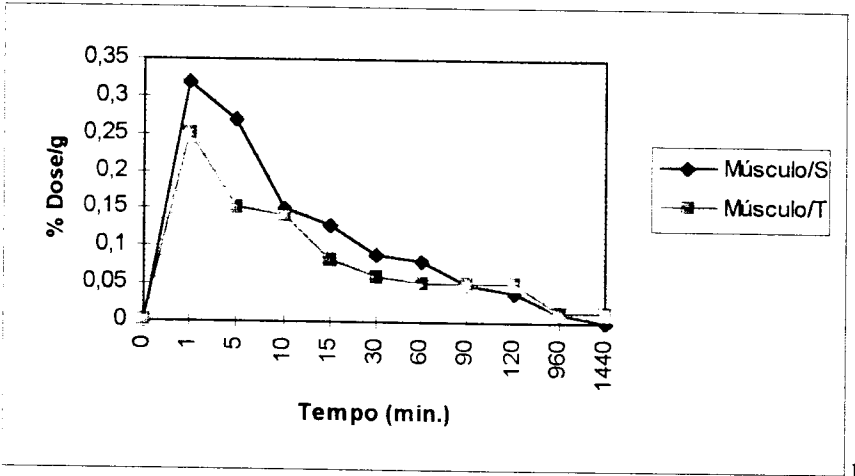
FIGURA 4.3 - Continuação.



p = 0.352



p = 0.002



p = 0.043

FIGURA 4.3 - Continuação.

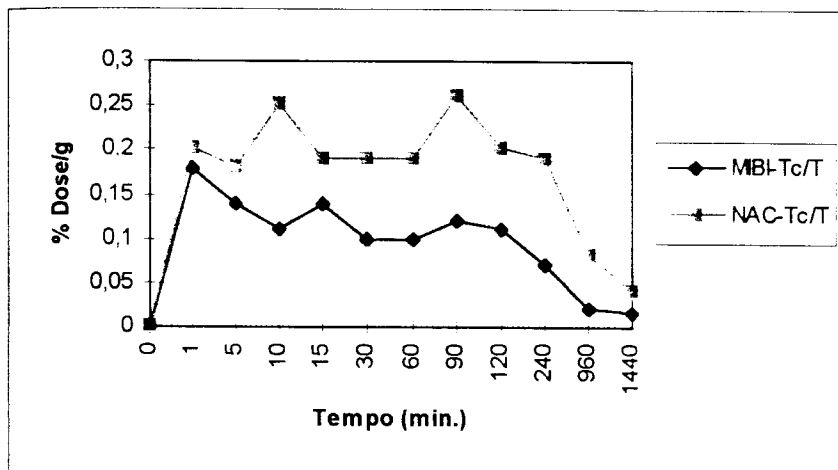


FIGURA 4.4 - Captação tumoral pelas duas drogas

4.3 Captação tumoral

Nas tabelas 4.16 e 4.17 pode-se apreciar a relação tumor/músculo e tumor/sangue determinadas para o MIBI-^{99m}Tc e NAC-^{99m}Tc, bem como a relação de captação dos dois traçadores pelo tecido canceroso.

4.4 Estudos preliminares de imagem

Procedeu-se à injeção de 1 mCi de cada um dos radiotraçadores em animal portador de cancer escolhido aleatoriamente (um animal para cada droga), e se determinou a imagem em câmara de cintilação após 20 minutos e 240 minutos.

TABELA 4.16 - Relação tumor/músculo e tumor/sangue do MIBI-^{99m}Tc e da NAC-^{99m}Tc

Tempo (min.)	Tumor/ Músculo		Tumor/Sangue	
	MIBI- ^{99m} Tc	NAC- ^{99m} Tc	MIBI- ^{99m} Tc	NAC- ^{99m} Tc
1	0,56	0,80	0,24	0,10
5	0,58	1,20	1,55	0,22
10	0,55	1,78	1,83	0,30
15	1,07	2,37	2,80	0,35
30	0,50	3,17	3,33	0,47
60	0,40	3,80	5,00	0,70
90	0,46	13,0	6,00	0,89
120	0,46	4,00	3,67	0,91
240	-	-	-	0,95
960	0,14	8,00	2,00	2,00
1440	0,083	6,67	1,25	1,60

TABELA 4.17 - Relação da captação dos dois radiofármacos pelo tumor

Tempo (min.)/ Agentes	MIBI- ^{99m} Tc	NAC- ^{99m} Tc
	% Dose/g	% Dose/g
1	0,18	0,20
5	0,14	0,18
10	0,11	0,25
15	0,14	0,19
30	0,10	0,19
60	0,10	0,19
90	0,12	0,26
120	0,11	0,20
240	-	0,19
960	0,021	0,08
1440	0,016	0,04

Para o MIBI-^{99m}Tc em nenhum dos tempos pôde-se visualizar com segurança o nódulo canceroso. Apresentamos na Figura 4.5 a imagem de 20 minutos, para fins ilustrativos.

Ao injetar-se NAC-^{99m}Tc, também foi impossível definir-se qualquer padrão tumoral no primeiro tempo. Já após quatro horas, a massa neoplásica estava claramente delineada no abdomen direito do animal, sem superposição nem interferência por parte de estruturas de vizinhança (Figura 4.6).

4.5 Análise farmacocinética

Para a análise tanto do MIBI-^{99m}Tc quanto da NAC-^{99m}Tc adotou-se um modelo bicompartimental definido por meio de uma relação matemática de duas exponenciais, uma de decaimento rápido e outra de decaimento lento. A equação utilizada foi

$$C(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$$

No caso do MIBI-^{99m}Tc, houve sucesso apenas com o programa computacional "Biexp". Já a NAC-^{99m}Tc foi compatível também com o programa "Anacomp". Na Tabela 4.18 temos os valores dos dados cinéticos obtidos pelo programa "Biexp".

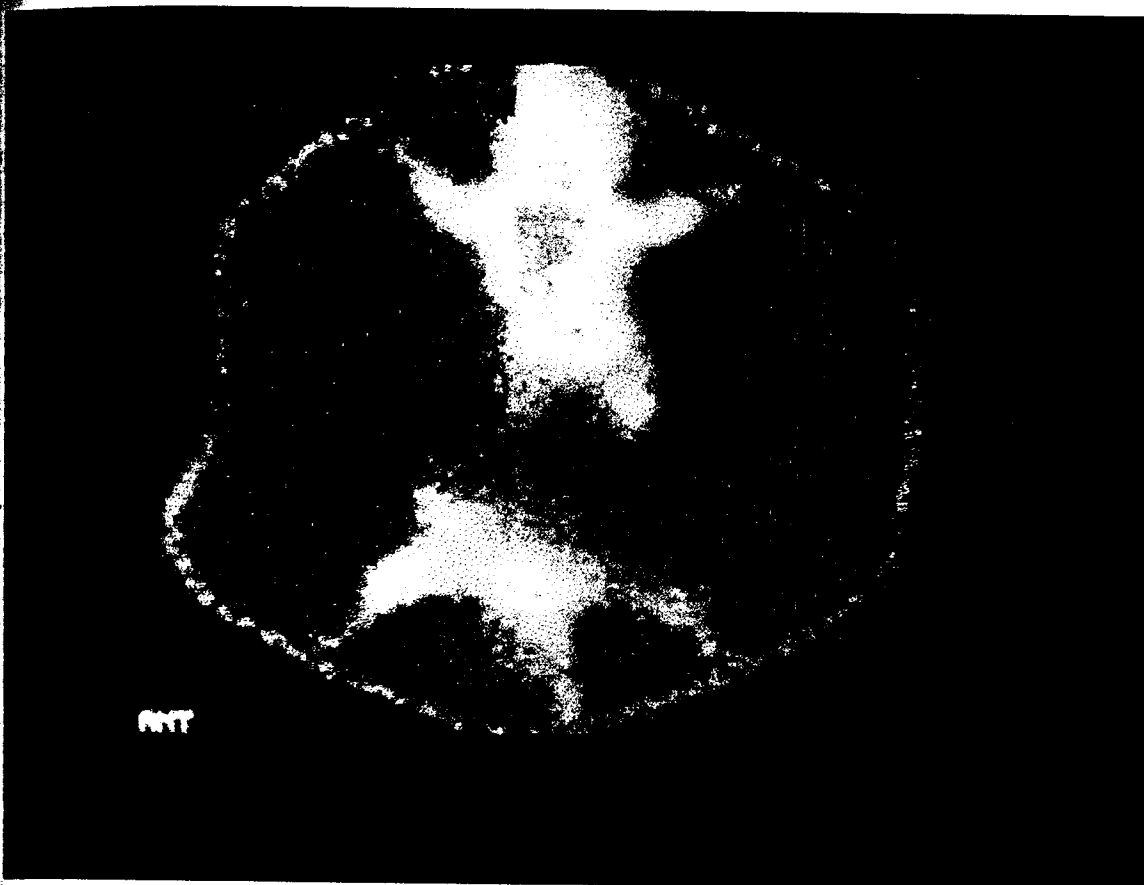


FIGURA 4.5 - Imagem cintilográfica de rato com cancer 20 minutos após administração de MIBI-^{99m}Tc.

Não se constata no abdomen direito nenhuma estrutura compatível com o nódulo tumoral.

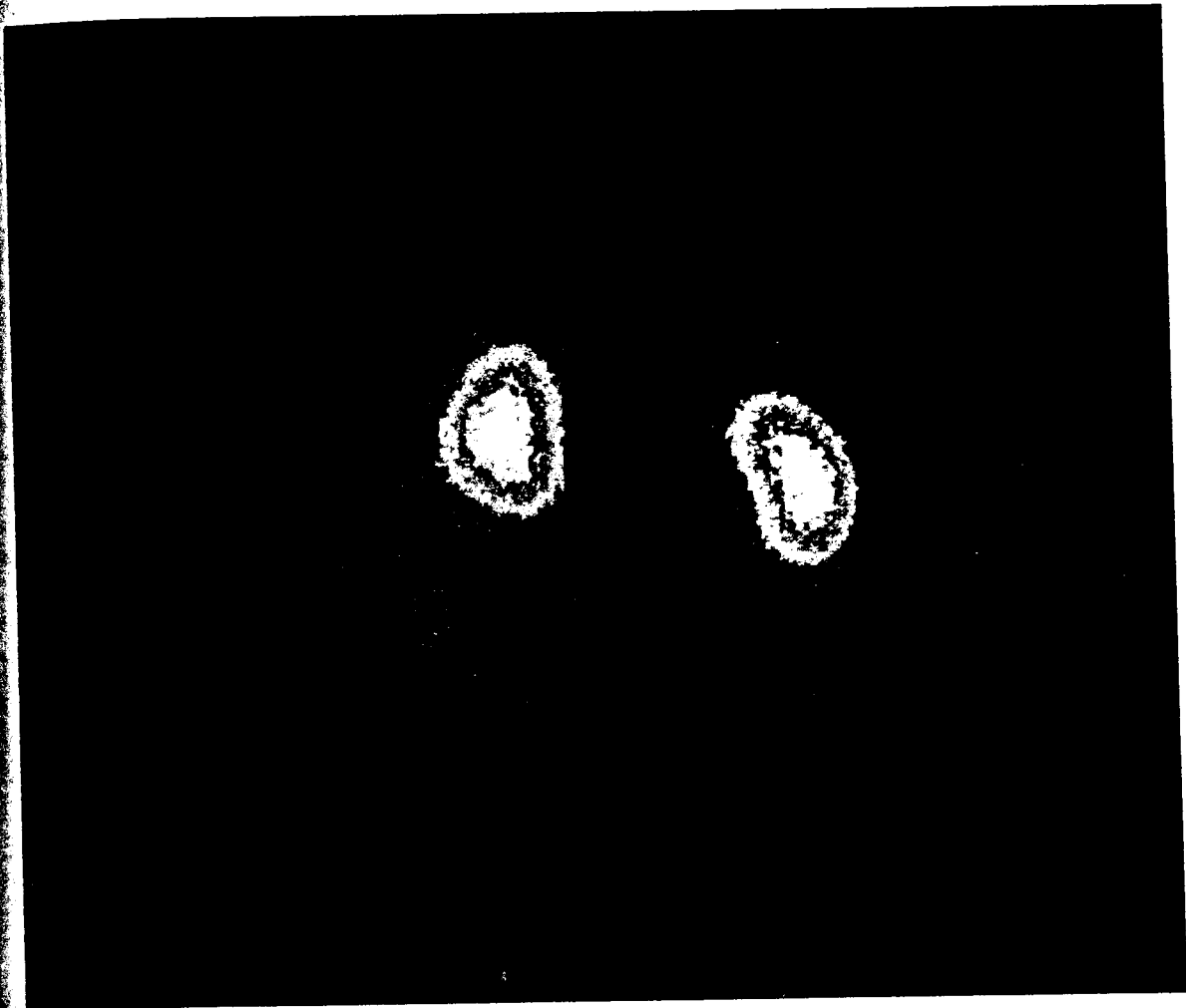


FIGURA 4.6 - Imagem cintilográfica de rato com cancer 240 minutos após injeção de NAC-^{99m}Tc.

Os dois rins formam figuras altamente radioativas na foto, notando-se abaixo do rim direito uma formação alongada na exata topografia do tumor experimental.

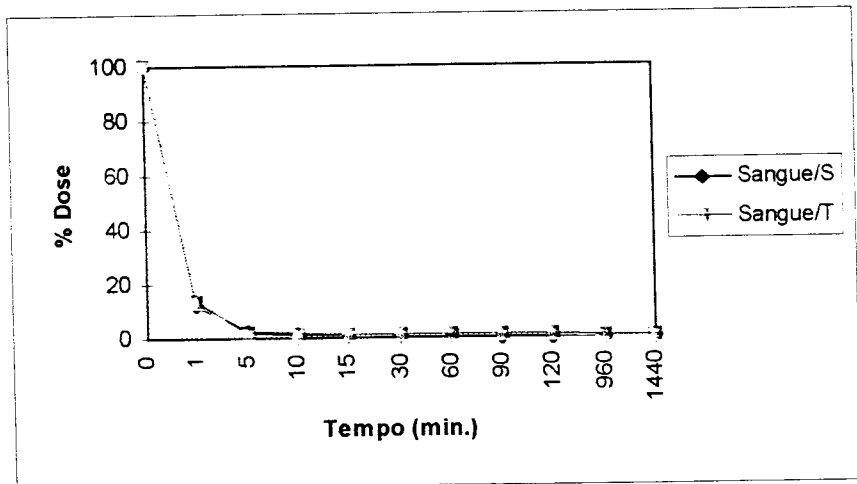
Tabela 4.18 - Parâmetros farmacocinéticos das duas drogas (Programa Biexp)

Parâmetros (unidades)	MIBI- ^{99m} Tc	NAC- ^{99m} Tc
Concentração inicial (c/min.ml)	32625,73	24915,97
A (c/min.ml)	30979,31	21460,97
B (c/min.ml)	1646,41	3454,25
α (1/h)	51,64	1,64
$T_{1/2}$ (h)	0,013	0,42
β (1/h)	1,06	0,078
$T_{1/2}$ (h)	0,65	8,87
k_{12} (1/h)	33,93	0,99
k_{21} (1/h)	3,61	0,29
k_{10} (1/h)	15,15	0,43
$\alpha + \beta$ (1/h)	52,70	1,72
$\alpha \cdot \beta$ (1/h ²)	54,76	0,12
Dose (c/min)	100000	100000
Área abaixo da curva (AUC)(c.h/min.ml)	2,15	57266,71
Volume do compartimento central (ml)	3,07	4,01
Depuração total (ml/h)	46,46	1,75
Depuração total (ml/min)	0,77	0,03
Tempo médio de residência (h)	0,69	10,03
Constante de eliminação (1/h)	1,45	0,0997

Utilizando o programa “Anacomp” para a NAC-^{99m}Tc, obtivemos os dados das constantes de transferência e eliminação relativamente próximos aos obtidos no programa “Biexp”, e a curva de depuração sanguínea ajustou-se também a este modelo.

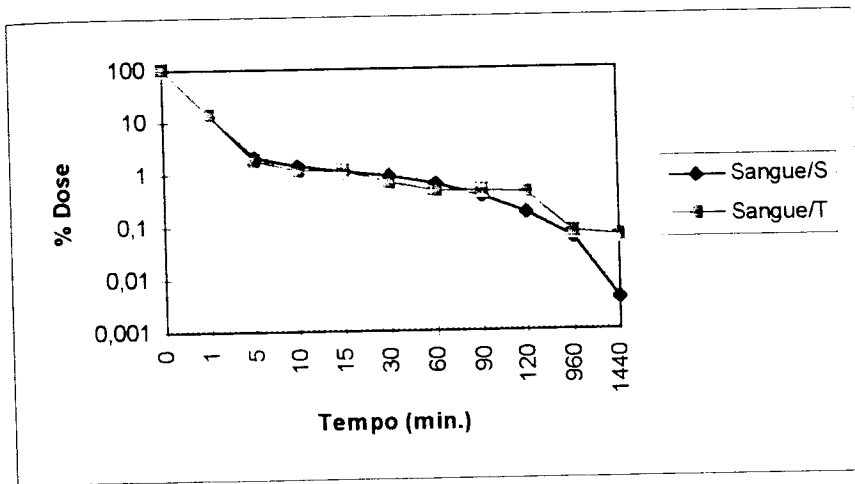
As curvas de depuração sanguínea das duas drogas em escala decimal e monologarítmica podem ser observadas na Figura 4.7.

A principal diferença das duas modalidades residiu na capacidade do sistema Anacomp, de formular três equações exponenciais voltadas respectivamente para os espaços intravascular, extravascular e para a urina acumulada (f_1 , f_2 e f_3) (Tabela 4.19), ao passo que o programa Biexp limitou-se a uma equação sanguínea apenas.

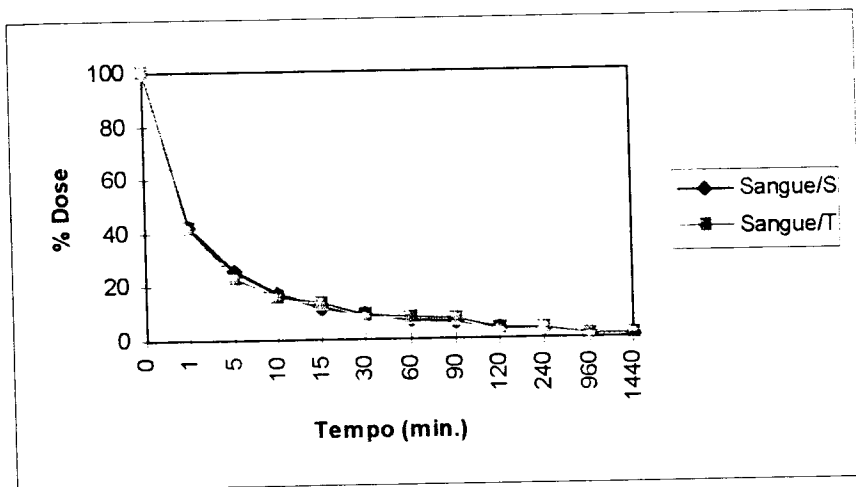


(a)

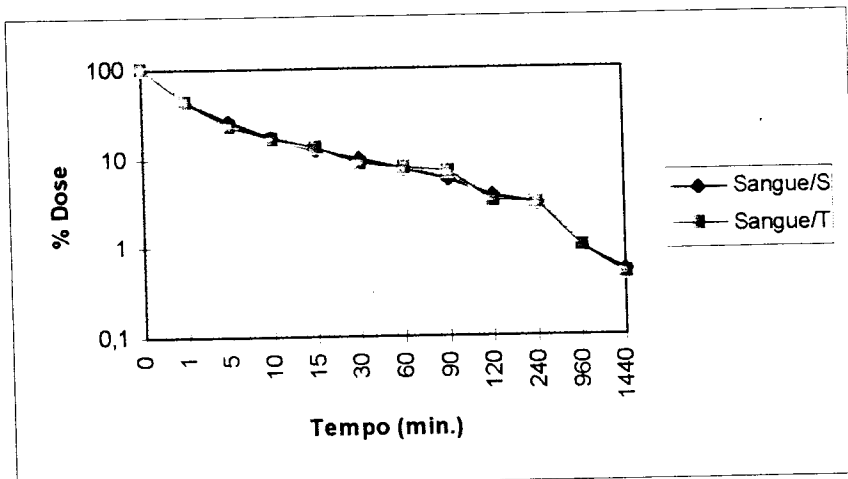
FIGURA 4.7 - Depuração sanguínea das duas drogas em escala decimal e logarítmica.
 (a) e (b) MIBI-^{99m}Tc; (c) e (d) NAC-^{99m}Tc



(b)



(c)



(d)

FIGURA 4.7 - Continuação.

TABELA 4.19 - Equações que definiram o modelo compartimental da $\text{NAC-}^{99\text{m}}\text{Tc}$

PROGRAMA	EQUAÇÃO
BIEXP*	$C_t = 21460,97^{-1,65 t} + 3454,25^{-0,08 t}$
ANACOMP**	$f_1 = 93,13^{-0,31 t} + 6,87^{-2,55 t}$ $f_2 = -82,98^{-0,31 t} + 82,98^{-2,55 t}$ $f_3 = 10,15(1 - e^{-0,31 t}) + 89,85(1 - e^{-2,55 t})$

Obs.: (*) $t = 1/h$

(**) $t = 1/\text{min.}$

4.6 Estudos estatísticos

4.6.1 Análises de regressão

Os valores de captação dos dois agentes estudados e dos dois modelos em tela (normal e câncer), para cada órgão, foram comparados pela técnica da matriz de correlação, a fim de averiguar o grau de correlação entre estes achados.

As observações constam da Tabela 4.20, onde para cada correlação individual é fornecido o índice de Pearson (“r”) e a significância estatística (“p”). Tal como já definido anteriormente, foram consideradas significativas as correlações com valor de $p < 0,05$.

TABELA 4.20 - Correlação linear entre os dois radiofármacos no estudo de biodistribuição

RINS	MIBI-^{99m}Tc T	NAC-^{99m}Tc N	NAC-^{99m}Tc T
MIBI- ^{99m} Tc N	0,956 ($< 0,0001$)	0,530 (0,11)	0,187 (0,60)
MIBI- ^{99m} Tc T		0,593 (0,07)	0,298 (0,40)
NAC- ^{99m} Tc N			0,881 ($< 0,001$)
FÍGADO	MIBI-^{99m}Tc T	NAC-^{99m}Tc N	NAC-^{99m}Tc T
MIBI- ^{99m} Tc N	0,873 ($< 0,001$)	0,832 ($< 0,005$)	0,803 (0,01)
MIBI- ^{99m} Tc T		0,821 ($< 0,005$)	0,852 ($< 0,005$)
NAC- ^{99m} Tc N			0,973 ($< 0,0001$)
CORAÇÃO	MIBI-^{99m}Tc T	NAC-^{99m}Tc N	NAC-^{99m}Tc T
MIBI- ^{99m} Tc N	0,951 ($< 0,0005$)	0,494 (0,15)	0,578 (0,08)
MIBI- ^{99m} Tc T		0,372 (0,29)	0,434 (0,21)
NAC- ^{99m} Tc N			0,974 ($< 0,0001$)
PULMÃO	MIBI-^{99m}Tc T	NAC-^{99m}Tc N	NAC-^{99m}Tc T
MIBI- ^{99m} Tc N	0,970 ($< 0,0001$)	0,981 ($< 0,0001$)	0,977 (0,0001)
MIBI- ^{99m} Tc T		0,961 ($< 0,0001$)	0,922 ($< 0,0005$)
NAC- ^{99m} Tc N			0,973 ($< 0,0001$)
BACÇO	MIBI-^{99m}Tc T	NAC-^{99m}Tc N	NAC-^{99m}Tc T
MIBI- ^{99m} Tc N	0,780 (0,01)	0,237 (0,51)	0,343 (0,33)
MIBI- ^{99m} Tc T		0,603 (0,06)	0,647 (0,04)
NAC- ^{99m} Tc N			0,968 ($< 0,0001$)

Para cada correlação, o primeiro algarismo transcrito é o índice de Pearson ("r") e o valor abaixo em parênteses traduz a significância estatística ("p").

TABELA 4.20 - Continuação

ESTÔMAGO	MIBI-^{99m}Tc T	NAC-^{99m}Tc N	NAC-^{99m}Tc T
MIBI- ^{99m} Tc N	0,838 ($< 0,005$)	0,382 (0,28)	0,570 (0,09)
MIBI- ^{99m} Tc T		0,535 (0,11)	0,687 (0,03)
NAC- ^{99m} Tc N			0,920 ($< 0,0005$)
INT. GROSSO	MIBI-^{99m}Tc T	NAC-^{99m}Tc N	NAC-^{99m}Tc T
MIBI- ^{99m} Tc N	0,782 (0,01)	0,673 (0,03)	0,364 (0,30)
MIBI- ^{99m} Tc T		0,548 (0,10)	0,400 (0,25)
NAC- ^{99m} Tc N			0,665 (0,04)
INT. DELG.	MIBI-^{99m}Tc T	NAC-^{99m}Tc N	NAC-^{99m}Tc T
MIBI- ^{99m} Tc N	0,817 ($< 0,005$)	0,741 (0,01)	0,786 (0,01)
MIBI- ^{99m} Tc T		0,681 (0,03)	0,763 (0,01)
NAC- ^{99m} Tc N			0,974 ($< 0,0001$)
MÚSCULO	MIBI-^{99m}Tc T	NAC-^{99m}Tc N	NAC-^{99m}Tc T
MIBI- ^{99m} Tc N	0,624 (0,05)	0,848 ($< 0,005$)	0,792 (0,01)
MIBI- ^{99m} Tc T		0,588 (0,07)	0,656 (0,04)
NAC- ^{99m} Tc N			0,960 ($< 0,0001$)
SANGUE	MIBI-^{99m}Tc T	NAC-^{99m}Tc N	NAC-^{99m}Tc T
MIBI- ^{99m} Tc N	0,997 ($< 0,0001$)	0,88 ($< 0,005$)	0,931 ($< 0,0005$)
MIBI- ^{99m} Tc T		0,858 ($< 0,005$)	0,908 ($< 0,001$)
NAC- ^{99m} Tc N			0,975 ($< 0,0001$)

TABELA 4.20 - Continuação

PLASMA	MIBI- ^{99m} Tc T	NAC- ^{99m} Tc N	NAC- ^{99m} Tc T
MIBI- ^{99m} Tc N	0,994 ($< 0,0001$)	0,927 ($< 0,001$)	0,946 ($< 0,0005$)
MIBI- ^{99m} Tc T		0,912 ($< 0,001$)	0,929 ($< 0,001$)
NAC- ^{99m} Tc N			0,986 ($< 0,0001$)
TUMOR	MIBI- ^{99m} Tc T	NAC- ^{99m} Tc N	NAC- ^{99m} Tc T
NAC- ^{99m} Tc T	0,783 (0,001)		

4.6.2 Análise de regressão para a captação tumoral

Procedeu-se a verificação da influência da massa do tumor sobre os valores de captação ao longo do tempo dos dois radiofármacos. Os resultados foram transcritos na Tabela 4.21.

4.6.3 Comparação normal/tumor para cada traçador

Como visto, as razões de captação entre órgãos de animais sadios e doentes foram estudadas segundo duas abordagens matemáticas, a saber a comparação direta das curvas de captação (análise de variância para valores

TABELA 4.21 - Correlação linear entre captação da dose e tamanho do tumor

TEMPO (MIN.)	NAC- ^{99m} Tc		MIBI- ^{99m} Tc	
1	r = 0,137	p = 0,80	r = 0,280	p = 0,59
5	r = -0,833	p = 0,04	r = 0,263	p = 0,62
10	r = 0,382	p = 0,46	r = 0,445	p = 0,38
15	r = -0,868	p = 0,03	r = 0,510	p = 0,30
30	r = -0,542	p = 0,27	r = -0,521	p = 0,29
60	r = -0,912	p = 0,01	r = 0,439	p = 0,38
90	r = -0,707	p = 0,12	r = -0,271	p = 0,60
120	r = -0,568	p = 0,24	r = -0,074	p = 0,89

Os índices de Pearson (“r”) e a significância estatística (“p”) encontram-se discriminados para cada tempo analisado.

múltiplos) e o teste de regressão linear para valores múltiplos (matriz de correlação).

Na Tabela 4.22 discriminamos as significâncias estatísticas averiguadas em cada situação.

4.6.4 Perfil órgão a órgão dentro de um mesmo grupo

Para diferenciar os valores de captação de cada órgão, por vezes muito próximos, dentro de cada grupo, recorreu-se ao teste de Newman-Keuls para comparações múltiplas, com base nas determinações de %dose/g. Os resultados são apresentados nas Figuras 4.8, 4.9, 4.10 e 4.11. Percebe-se que no grupo MIBI-^{99m}Tc de ratos normais, as leituras de coração e rins foram acentuadamente superiores às das demais estruturas.

TABELA 4.22 - Diferenças normal/tumor para cada radiofármaco aferidas segundo dois modelos estatísticos

Marcador	Órgão normal x tumor	Significância análise variância	Significância regressão linear
MIBI- ^{99m} Tc	Rins	p = 0,033	p < 0,0001
	Fígado	p = 0,006	p < 0,001
	Coração	p < 0,001	p < 0,0005
	Pulmões	p = 0,025	p < 0,0001
	Baço	NS	p = 0,01
	Músculo	p = 0,011	p = 0,05
	Estômago	p = 0,030	p < 0,005
	Int. delgado	NS	p < 0,005
	Int. grosso	NS	p = 0,01
	Sangue	NS	p < 0,0001
Plasma	p = 0,015	p < 0,0001	
NAC- ^{99m} Tc	Rins	p = 0,015	p < 0,001
	Fígado	p = 0,044	p < 0,001
	Coração	NS	p < 0,001
	Pulmões	p = 0,035	p < 0,001
	Baço	NS	p < 0,001
	Músculo	p = 0,043	p < 0,001
	Estômago	NS	p < 0,005
	Int. delgado	p = 0,002	p < 0,001
	Int. grosso	NS	p = 0,04
	Sangue	NS	p < 0,001
Plasma	NS	p < 0,001	

Quando comparados entre si, estes dois órgãos, assim como o conjunto dos demais, agruparam-se na mesma ordem de grandeza, sem diferenças estatísticas.

No modelo tumoral deste marcador, os setores com maior atividade foram coração e fígado, bem como os rins. A análise por classes evidenciou

em primeiro lugar os rins, seguidos de coração e fígado (sem diferenças entre si), e subseqüentemente as demais amostras (também sem diferenças).

A avaliação de $\text{NAC-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ em ratos normais contemplou somente o rim como tecido distinto dos demais, e fato análogo repetiu-se quando a população tumoral foi estudada. Os dados para os demais órgãos considerados não se diferenciaram significativamente neste teste.

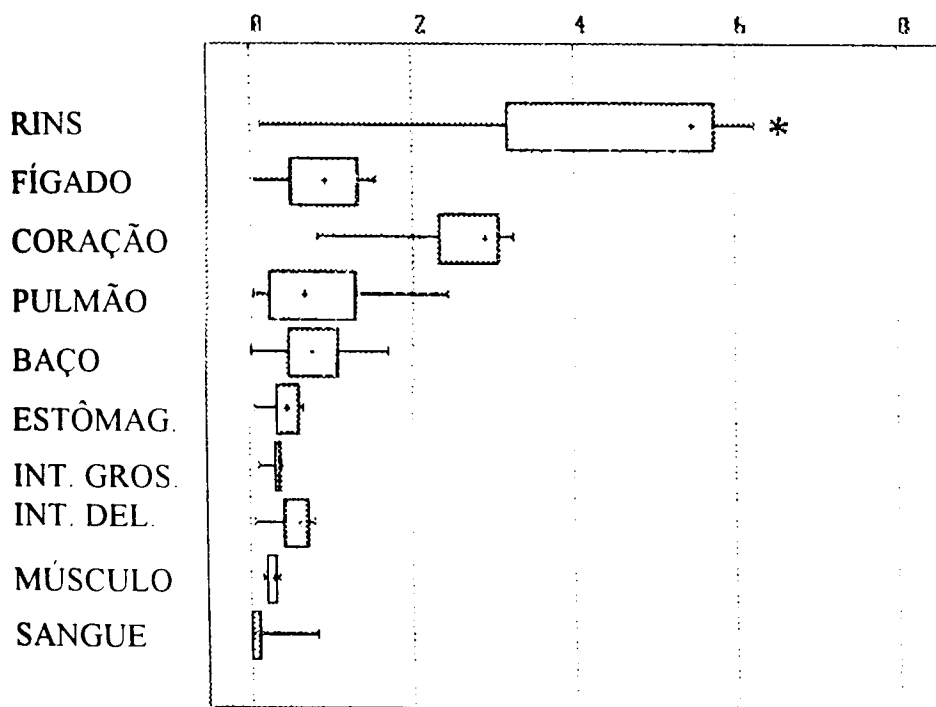


FIGURA 4.8 - Biodistribuição do $\text{MIBI-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ em ratos normais

Cada retângulo exemplifica a média \pm desvio padrão da captação do respectivo órgão ou tecido ao longo do tempo, em % dose/g. As linhas pontilhadas assinalam os percentis em que tais valores posicionam-se (respectivamente percentil 0,25, 50, 75 e 100). Os resultados são agrupados por classes estatísticas, quando múltiplos (vide texto). Os asteriscos denotam significância ($p < 0,05$).

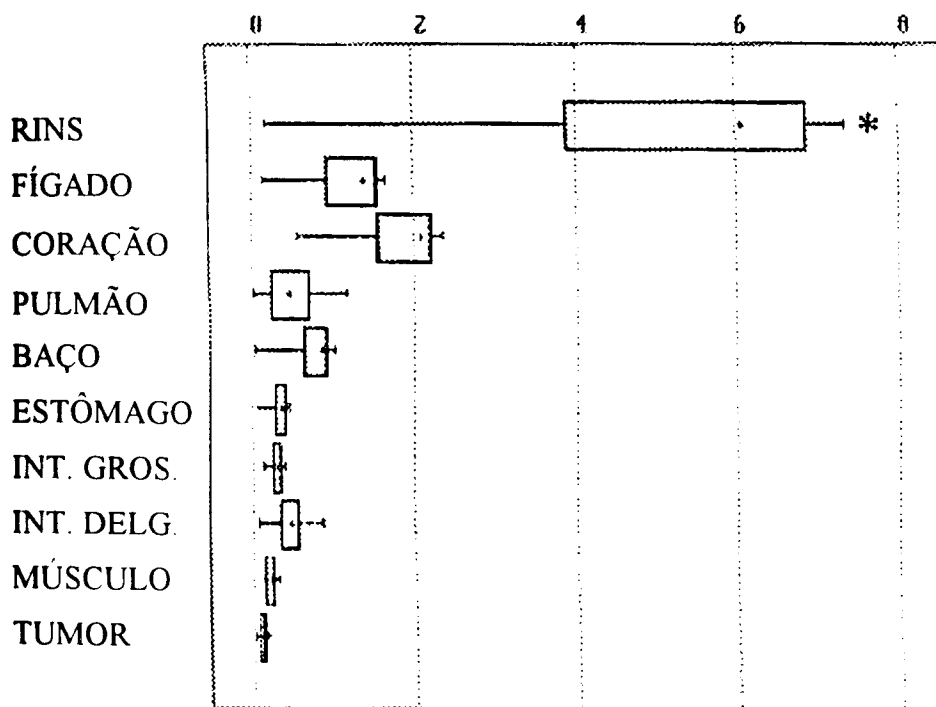


FIGURA 4.9 - Biodistribuição do MIBI-^{99m}Tc em ratos com tumor
 Cada retângulo exemplifica a média \pm desvio padrão da captação do respectivo órgão ou tecido ao longo do tempo, em % dose/g. As linhas pontilhadas assinalam os percentis em que tais valores posicionam-se (respectivamente percentil 0,25, 50, 75 e 100). Os resultados são agrupados por classes estatísticas, quando múltiplos (vide texto). Os asteriscos denotam significância ($p < 0,05$).

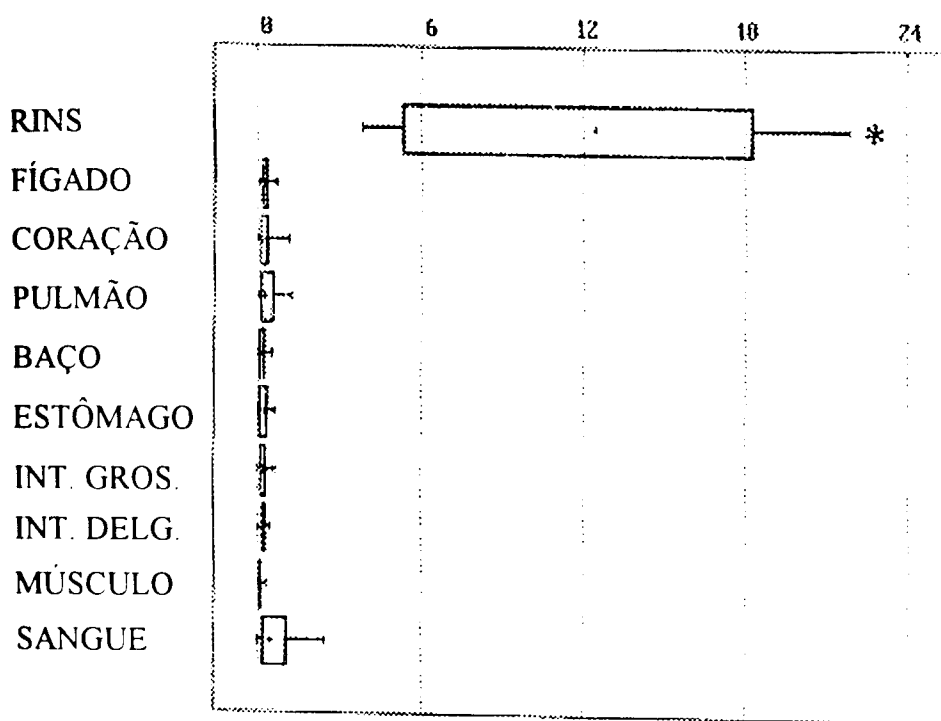


FIGURA 4.10 - Biodistribuição da NAC-^{99m}Tc em ratos normais

Cada retângulo exemplifica a média \pm desvio padrão da captação do respectivo órgão ou tecido ao longo do tempo, em % dose/g. As linhas pontilhadas assinalam os percentis em que tais valores posicionam-se (respectivamente percentil 0,25, 50, 75 e 100). Os resultados são agrupados por classes estatísticas, quando múltiplos (vide texto). Os asteriscos denotam significância ($p < 0,05$).

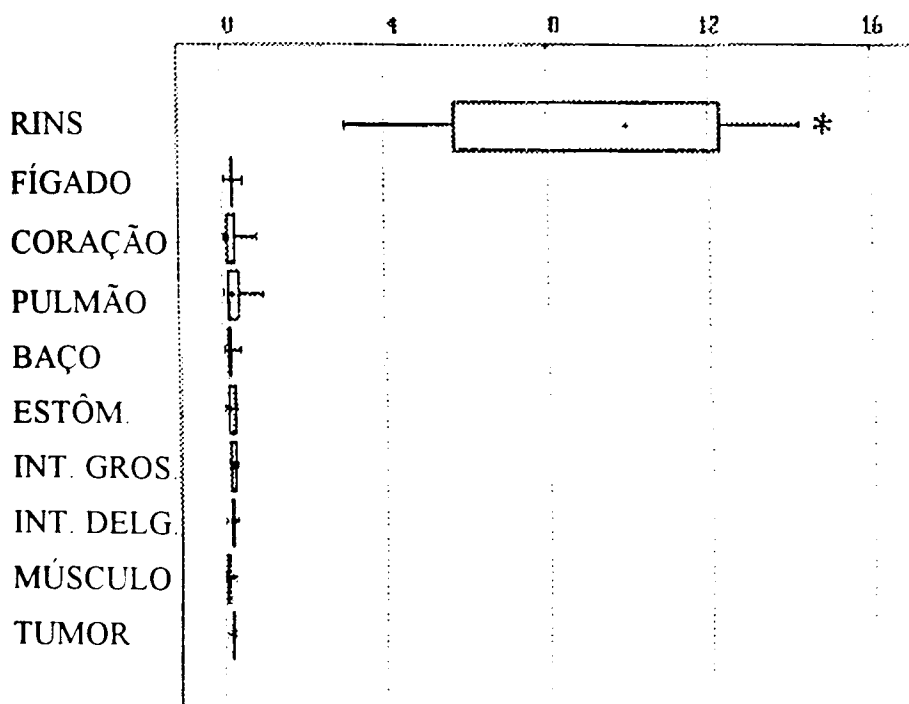


FIGURA 4.11 - Biodistribuição da NAC-^{99m}Tc em ratos com tumor. Cada retângulo exemplifica a média \pm desvio padrão da captação do respectivo órgão ou tecido ao longo do tempo, em % dose/g. As linhas pontilhadas assinalam os percentis em que tais valores posicionam-se (respectivamente percentil 0,25, 50, 75 e 100). Os resultados são agrupados por classes estatísticas, quando múltiplos (vide texto). Os asteriscos denotam significância ($p < 0,05$).

4.6.5 Teste de Newman-Keuls para captação tumoral

A Figura 4.12 sintetiza as discrepâncias constatadas para a relação tumor/sangue e tumor/músculo, considerando-se os dois radionuclídeos. Nota-se que a razão tumor/sangue beneficiou o MIBI-^{99m}Tc, ao passo que a relação tumor/músculo foi favorável à NAC-^{99m}Tc ($p < 0,05$). Prosseguindo-se para a comparação da captação tumoral propriamente dita, sempre em %

dose/g, reafirmou-se a preponderância de NAC-^{99m}Tc (Figura 4.13). Apesar dos desvios-padrão alargados destas medidas, a significância estatística alcançada foi expressiva ($p < 0,001$).

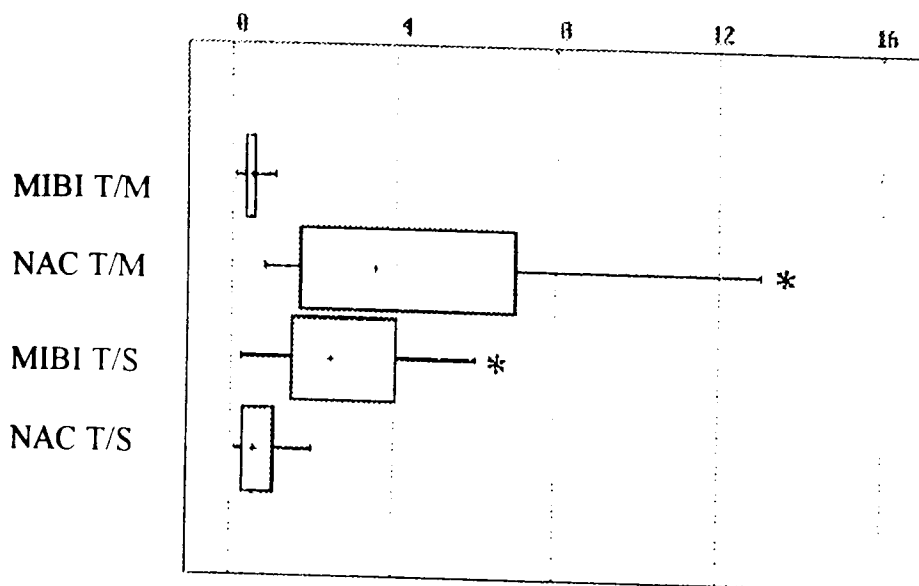


FIGURA 4.12 - Comparação entre as razões tumor/músculo (T/M) e tumor/sangue (T/S) para os dois radiofármacos.

Cada retângulo exemplifica a média \pm desvio padrão da captação do respectivo órgão ou tecido ao longo do tempo, em % dose/g. As linhas pontilhadas assinalam os percentis em que tais valores posicionam-se (respectivamente percentil 0,25, 50, 75 e 100). Os resultados são agrupados por classes estatísticas, quando múltiplos (vide texto). Os asteriscos denotam significância ($p < 0,05$).

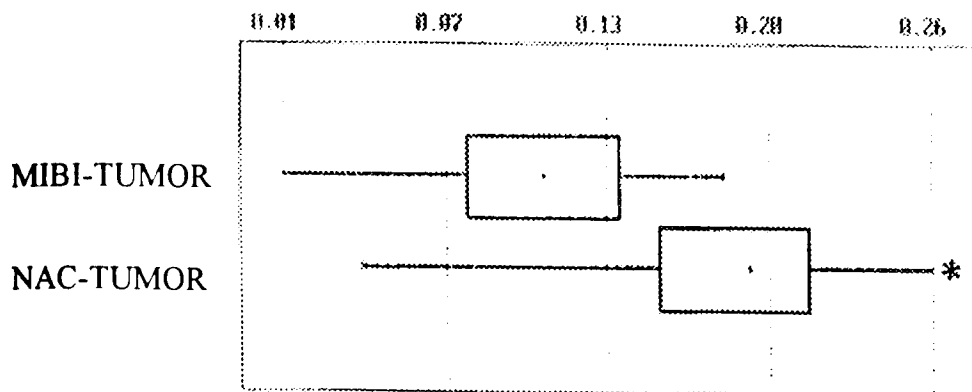


FIGURA 4.13 - Comparação das captações tumorais para os dois marcadores.

Cada retângulo exemplifica a média \pm desvio padrão da captação do respectivo órgão ou tecido ao longo do tempo, em % dose/g. As linhas pontilhadas assinalam os percentis em que tais valores posicionam-se (respectivamente percentil 0,25, 50, 75 e 100). Os resultados são agrupados por classes estatísticas, quando múltiplos (vide texto). Os asteriscos denotam significância ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

“A leitura torna o homem completo, a conferência deixa-o preparado, e a tarefa de escrever o faz exato. Leia não para contradizer ou confundir, nem tampouco para aceitar sem objeções ou procurar tema para discussões; antes pese e considere os fatos”.

Sir Francis Bacon

5. DISCUSSÃO

5.1 Considerações gerais

A utilização de novos radiofármacos em diagnóstico oncológico tem sido de importância apreciável para a detecção de tumores, bem como para o seguimento clínico de pacientes, possibilitando uma terapia mais eficaz.

Exige-se de todo traçador em investigação o estudo do perfil farmacocinético e a avaliação da sua especificidade e facilidade de utilização. Essas são informações fundamentais para o sucesso do seu emprego clínico.

Os aminoácidos marcados têm apresentado um interesse crescente em Medicina, devido ao seu uso potencial para diagnóstico, graças a sua rápida incorporação no metabolismo dos tecidos.

Estudos de tomografia por emissão de pósitrons, em humanos, realizados com aminoácidos marcados com ^{11}C e ^{13}N , mostraram que a captação de sua radioatividade pelos tumores propicia uma boa visualização na imagem cintilográfica ⁽¹⁴⁹⁾.

O tecnécio-99m tem se destacado como radionuclídeo exemplar no uso clínico, devido a suas boas características físicas e facilidade de obtenção. Suas propriedades químicas permitem-lhe combinar-se com outras moléculas ligantes em uma grande variedade de radiofármacos.

Este trabalho consta de um estudo de dois ligantes diferentes, marcados com Tc-99m. Um deles, bastante descrito na literatura, é o MIBI-^{99m}Tc, que desempenhou o papel de elemento de comparação para o outro complexo pesquisado (NAC-^{99m}Tc), em termos de captação tumoral.

5.2 Marcação do MIBI com Tc-99m

O manuseio deste marcador já foi extensamente investigado na literatura, e nenhuma surpresa era esperada nesta etapa da pesquisa.

Efetivamente, executando-se o controle radioquímico do MIBI-^{99m}Tc descrito pelo fabricante⁽⁵⁰⁾ obteve-se resultados acima de 97% de pureza.

Proulx e col. (1989)⁽¹³⁷⁾ estudaram outros métodos de determinação da pureza radioquímica para verificar se obtinham o mesmo resultado da sistemática atualmente em uso, e visando sobretudo diminuir o tempo do processamento, o que seria vantajoso quando um paciente grave é admitido na sala de emergência do hospital.

O fabricante recomenda uma cromatografia de camada delgada (TLC) usando fitas de óxido de alumínio, desenvolvidas em etanol absoluto.

Aqueles autores recorreram ao ITLC-SG e papel Whatman N° 1 em solventes padrão, como acetona e soro fisiológico. Também investigaram uma técnica simples de extração de solvente.

Encontraram resultados próximos aos do fabricante utilizando ITLC-SG em acetona e salina 0,9%. A extração com clorofórmio utilizando cartucho ("cartridge") pôde ser realizada em menos de 5 minutos.

Hung e col. (1991)⁽⁷⁶⁾, objetivando diminuir o tempo de preparo (10 min. em banho-maria) e do controle de qualidade, utilizaram um forno de microondas, sendo que o tempo para marcação reduziu-se a 10 segundos. Obtiveram uma média de 97% de pureza do produto marcado utilizando atividade máxima (150mCi) e volume máximo permitido de pertecnetato (3ml).

Para análise da pureza radioquímica do Sestamibi-^{99m}Tc, utilizaram um sistema cromatográfico de mini-papel (MPC) tendo como fase móvel uma mistura clorofórmio/tetrahidrofurano 1:1.

O sistema cromatográfico de que lançamos mão, segundo o fabricante, leva um tempo médio de 34 minutos para o seu desenvolvimento e secagem, enquanto que o MPC fica pronto em 2,3 minutos.

Para diminuir o tempo e facilitar o uso em emergências, como oclusão coronariana e infarto do miocárdio, os autores recomendam a combinação

do método de aquecimento em forno de microondas e com rápido sistema de controle de qualidade.

Para os nossos estudos não havia premência de tempo, nem justificativas para se obter equipamento especial como forno de microondas para a aceleração do tempo de marcação, optando-se pelo controle recomendado pela bula do produto. Os resultados foram inteiramente satisfatórios.

5.3 Marcação da NAC com tecnécio-99m

O controle de qualidade de radiofármacos é essencial antes de sua administração em animais para estudos biológicos, e mais ainda quando se cogita o emprego futuro em pacientes para procedimentos diagnósticos.

A avaliação da pureza radioquímica constitui uma etapa fundamental deste controle de qualidade.

No preparo de um fármaco marcado com tecnécio, a quantidade de pertecnetato livre deve permanecer em limites aceitáveis. Entretanto, a presença de oxigênio, principalmente antes da adição de tecnécio, pode levar à oxidação do íon estanoso a íon estânico de maneira que a quantidade de íon de Sn disponível para redução do Tc^{+7} diminui, resultando no aumento de $^{99m}TcO_4^-$ livre no radiofármaco de Tc-99m. Além disso, a alta atividade do ^{99m}Tc na presença de oxigênio pode causar a radiólise da água

ou de outros compostos como radicais hidróxido e peróxido, aumentando o risco de impurezas ⁽¹⁴²⁾.

Nas marcações com tecnécio, existe também a possibilidade do Tc-99m reduzido sofrer hidrólise em solução aquosa. Neste caso, o Tc-99m reduzido reage com água para formar várias espécies hidrolisadas (ex: $^{99m}\text{TcO}_2$) dependendo do pH, duração da hidrólise e presença de outros agentes.

A hidrólise compete com o processo de complexação do composto desejado, reduzindo dessa maneira o seu rendimento e interferindo no teste de diagnóstico biológico ⁽¹⁴²⁾.

Desta maneira, todos os cuidados possíveis para se evitar a formação desses produtos indesejáveis ou mantê-los em quantidades aceitáveis foram tomados, mediante cuidadosa padronização e otimização da rotina de marcação.

Através dos vários parâmetros estudados na marcação da NAC- ^{99m}Tc encontrados na Tabela 4.1, pudemos fazer algumas observações.

Com o aumento do pH final, obtivemos melhor rendimento até um ótimo no pH 9, com rendimento de 98,76 %.

Todas as soluções de radiofármacos devem possuir uma concentração de íons hidrogênio ou pH apropriados para sua estabilidade e integridade. O pH ideal de um radiofármaco para uso clínico deveria ser 7,4 (pH do

sangue), embora sejam admissíveis valores de 2 a 9 devido à grande capacidade de tamponamento do sangue ⁽¹⁴³⁾.

Estudos realizados por Subramanian e col. (1976) ⁽¹⁵⁵⁾ acerca do efeito da variação de pH, na faixa de 3-8,4, sobre a marcação da NAC com tecnécio, forneceram resultados opostos aos nossos. Eles obtiveram a melhor ligação no pH mais baixo, e à medida que o pH ia aumentando surgia uma coloração rósea na solução, além de piora nos níveis de marcação.

No nosso experimento, não observamos mudança alguma na coloração da solução, a qual permaneceu incolor durante todo o ensaio.

Sabe-se que quanto mais alcalino o pH, maior a possibilidade de surgir prótons dissociados nas extremidades da molécula como sulfidril (-SH), carboxil (-COOH) e outros radicais, criando desta maneira condições ótimas para a marcação destes grupos funcionais com o tecnécio ⁽¹⁵⁷⁾. Estes achados vêm inteiramente ao encontro da presente experiência.

A variação da massa de Sn (II) de 26 µg a 260 µg associou-se a um aumento progressivo na formação de ^{99m}TcO₂. Como consequência, a menor quota foi selecionada (26 µg de Sn (II), equivalente a 50 µg de SnCl₂.2H₂O).

A quantidade de Sn⁺² utilizada é muito importante. Quando grande, a possibilidade de hidrólise do estanho aumenta, competindo com o tecnécio reduzido para formar coloide-Sn-^{99m}Tc e outros complexos de Sn, e diminuindo assim o rendimento do composto marcado. Por outro lado, se

usarmos pouco estanho, isto acarretará a redução incompleta do tecnécio ao estado de oxidação desejado, e um rendimento duvidoso do complexo ⁽¹⁴²⁾.

O uso de cloreto estanoso apresenta a desvantagem de sofrer hidrólise em solução aquosa, em pH 6 a 7, formando colóides insolúveis. Por isso, uma solução ácida de Sn⁺² é preparada para evitar a hidrólise deste íon.

Subramanian e col. (1976) ⁽¹⁵⁵⁾ utilizaram em seus experimentos uma proporção pelo menos dez vezes superior de Sn (II), e no método cromatográfico, apenas a metil etil cetona como solvente. Há razões ponderáveis para se acreditar que, nestas condições, eles não conseguiram separar NAC-^{99m}Tc do colóide ^{99m}TcO₂.

Além disso, no estudo de biodistribuição efetuado pelos autores citados, a captação pelo fígado foi alta, cerca de duas vezes maior do que a porcentagem de captação obtida em nossos estudos. O padrão de captação do colóide de tecnécio, que é fortemente hepatotrópico, é compatível com os resultados obtidos por esses autores.

Takeda e Okada (1989) ⁽¹⁵⁸⁾ realizaram um estudo da homocisteína-^{99m}Tc e de alguns compostos derivados como a NAC. O rendimento de marcação obtido para N-acetil cisteína foi de somente 61,8 %, que é consideravelmente menor do que na presente investigação. A diferença pode ser atribuída a discrepâncias na técnica de marcação utilizada, e à necessidade de purificação do composto marcado através de coluna de troca iônica.

Ainda na Tabela 4.1 verificamos a influência da massa do ligante no rendimento da reação. Entre 3 mg e 10 mg, os resultados apresentaram progressivas melhoras, porém para grandes quantidades, o benefício reduziu-se devido provavelmente a um desequilíbrio entre a razão do ligante e do Sn (II). Portanto, 10 mg foi adotado como a quantidade ideal.

Em relação ao tempo de incubação, aumentos no tempo padrão de 30 minutos não se mostraram capazes de aprimorar o rendimento para taxas superiores a 98 %, portanto aquele valor permaneceu como o tempo de incubação sistematizado.

Finalizando a análise de todos os parâmetros na marcação da NAC com tecnécio, definimos o protocolo final como segue: 10 mg de NAC, 26 µg de Sn (II), pH 9 para a solução final e tempo de incubação de 30 minutos. A pureza radioquímica da NAC-^{99m}Tc assim obtida foi superior a 98%.

A análise de cromatografia líquida de alta eficiência realizada nos moldes dos parâmetros finais definidos confirmou a não formação de outras espécies radioquímicas. Tivemos a oportunidade de documentar outrossim a eficiente marcação de NAC na vigência desta padronização.

5.4 Biodistribuição do MIBI-^{99m}Tc

5.4.1 Ratos sadios

Vários estudos de biodistribuição deste radiofármaco já foram realizados^{171, 24}, principalmente em comparação com o Tl-201^(171, 4).

O MIBI é um traçador que foi introduzido em 1984 para o estudo de perfusão miocárdica^(113, 121).

Observamos que as maiores captações em % dose/g (Tabela 4.2) foram obtidas nos rins ($5,92 \pm 0,92\%$) e coração ($3,23 \pm 0,53\%$) permanecendo mais ou menos estáveis até os 120 minutos após injeção da droga. Porcentagens menores estavam presentes no pulmão, fígado, baço e intestino delgado. A análise estatística configurou ausência de diferenças significativas entre rins e coração, cujas captações foram superiores às de todos os demais órgãos.

A depuração do pulmão apresentou-se lenta, sendo de 77,68% após 60 minutos e 87,60 % após 120 minutos.

As captações renal e hepática foram as mais altas quando dadas em % dose/órgão (Tabela 4.3) apresentando-se bastante próximas, com exceção do músculo total, com $42,21 \pm 1,79\%$ no primeiro minuto após a

administração do fármaco, porém com uma depuração de aproximadamente 60% após 120 minutos, para as duas vísceras.

O coração apresentou uma atividade de 3,62 % após 1 minuto, bem próxima à do pulmão com 3,56 %, porém a primeira manteve-se relativamente estável até o 120 minutos, enquanto a atividade no pulmão decaiu 87,08 % neste período.

5.4.2 Ratos com tumor

Nos ratos com tumor, levando-se em consideração a porcentagem de dose por grama do órgão (Tabela 4.8), observamos a maior concentração do MIBI nos rins, seguidos do coração e fígado. O pulmão e o baço, embora com concentrações razoáveis, não se confirmaram estatisticamente superiores às demais vísceras. Nos três primeiros órgãos citados, as atividades permanecem relativamente estáveis nos tempos iniciais estudados. Estes achados mostram-se bastante semelhantes aos anotados nos controles sem câncer.

A porcentagem de atividade do baço tendeu a apresentar-se aumentada. Especula-se que em ratos com neoplasia, o baço aumentaria a sua atividade de liberação de células do sistema imunológico como meio de defesa do organismo, aumentando o seu tamanho e conseqüentemente a captação da droga. Tal afirmativa vem ao encontro da observação prática de

baço aumentado, que ocorreu no presente experimento. Entretanto, a análise estatística não confirmou claramente esta maior atividade esplênica.

A captação tumoral após um minuto foi de $0,18 \pm 0,07\%$ permanecendo inalterada até os 120 minutos com $0,11 \pm 0,03\%$, evidenciando que a droga fica retida no tumor. Calculamos uma depuração de $39,89\%$, isto é, uma depuração lenta, evidenciando novamente a afinidade da molécula pelo tumor.

A distribuição inicial, captação e retenção do traçador depende geralmente de vários fatores tais como fluxo sanguíneo regional e metabolismo do tecido ^(14, 32, 135).

A captação dos complexos catiônicos é caracterizada por uma especificidade relativamente pobre pelos tecidos não cardíacos, porém a captação e retenção aumenta em massas neoplásicas ⁽¹³³⁾.

Inicialmente pensou-se que a captação do MIBI-^{99m}Tc, assim como do ²⁰¹Tl, fosse um reflexo de fenômenos físico-químicos e biológicos inespecíficos como fluxo sanguíneo, disponibilidade, necrose tumoral, demanda metabólica e atividade mitocondrial do tumor, porém somente alguns destes mecanismos são atualmente aceitos como relevantes.

Admite-se que o MIBI-^{99m}Tc acumula-se dentro da mitocôndria e citoplasma das células fundamentalmente por causa dos potenciais elétricos gerados através das membranas ^(43, 134, 32).

Uma vez que os tumores malignos mantêm um potencial mais negativo através da membrana devido ao aumento de suas necessidades metabólicas, isso pode explicar o acúmulo preferencial do MIBI-^{99m}Tc nestes tumores. Nesse contexto, o papel do fluxo sanguíneo e de outros mecanismos de captação do MIBI-^{99m}Tc pelos tumores torna-se pouco significativo.

Vários modelos para o mecanismo de captação deste radiofármaco têm sido propostos, como ligação a uma proteína citosólica de 8-10 kDa, lipo-afinidade, e distribuição passiva através da membrana, em proporção à diferença de potencial produzida através da mesma ⁽¹⁰⁰⁾.

O acúmulo não diferencial na fração lipídica das membranas celulares não é aceito devido a três observações:

- a correlação fraca entre a captação do Sestamibi-^{99m}Tc e o tamanho da célula
- o acúmulo decrescente em células mortas
- e a observação microautoradiográfica de que o composto está localizado principalmente no citoplasma.

Também a ligação proposta à proteína citosólica de 8-10 kDa deve ser de fato uma união com partículas submitocondriais, identificadas imprópriamente devido a erro metodológico durante a centrifugação ⁽¹⁰⁰⁾. Conseqüentemente, permanece a proposta da diferença de potencial transmembrana.

Pesquisas recentes revelaram em algumas modalidades de câncer um transporte ativo para fora das células tumorais, contra o gradiente de potencial. Curiosamente, o mesmo mecanismo é também responsável pela baixa resposta quimioterápica do câncer a um grupo estruturalmente e funcionalmente diferente de agentes citotóxicos como antraciclinas, actinomicina D, alcalóides da vinca e outros.

Este tipo peculiar de resistência é devido a amplificação do gene mamífero MDR1, que está localizado no cromossoma 7 e cuja expressão é controlada pelos oncogenes mutantes p53 e p21⁽¹⁰⁰⁾.

Merece ser citado que este fenótipo MDR, desfavorável ao paciente, pode ser revertido com drogas bloqueadoras do canal de cálcio, ciclosporina A e mais algumas que, como o MIBI-^{99m}Tc, são lipofílicas e catiônicas⁽¹⁰⁰⁾.

Com base nesta associação, tem sido propugnado que a captação pelo tumor do marcador em questão teria vantagens não apenas diagnósticas, através de diferentes métodos de imagem, como informaria da existência de eventual multi-resistência a quimioterápicos, de crucial importância para o tratamento.

Passando à porcentagem da droga por órgão avaliado (Tabela 4.9) para ratos com tumor, observamos a maior concentração do fármaco no fígado seguido dos rins. No músculo total obtivemos 39,98 % da dose injetada. Barbarics e col.⁽¹⁶⁾ dão ciência de 30 % da dose injetada extraída pelo músculo. Novamente são pequenas as diferenças destes valores comparativamente aos controles normais.

As captações renal e hepática permaneceram relativamente estáveis assim como a captação pelo coração que foi também bastante significativa. Baço, intestino delgado e pulmão apresentaram também porcentagens de captação apreciáveis no primeiro minuto após administração do fármaco. Todavia decresceram lentamente ao longo das primeiras duas horas. Seus perfis não se confirmaram estatisticamente diferentes das demais vísceras.

A concentração sanguínea caiu para 13,11 % um minuto após a injeção da droga, em consonância com a depuração rápida do marcador para fora da corrente circulatória.

A biodistribuição do MIBI-^{99m}Tc é caracterizada por uma depuração sanguínea rápida e conseqüentemente por uma captação precoce por órgãos.

Em concordância com a literatura ⁽¹⁷¹⁾, a captação hepática mostrou-se alta, pois a depuração do MIBI-^{99m}Tc é realizada pelo sistema hepatobiliar.

Os órgãos envolvidos na excreção do MIBI (intestinos, rins, fígado) tiveram a maior dose absorvida por unidade da radioatividade injetada. Note-se que uma confirmação estatística só foi observada para os rins, em controles e ratos com tumor, e para o fígado na população cancerosa.

Não foi realizado estudo da tireóide, por se tratar de órgão especializado e de escassa relevância para os propósitos da pesquisa em curso, porém experimentos realizados por Savi e col. (1989)⁽¹⁴⁸⁾ sugerem que o MIBI-^{99m}Tc sofre conversão *in vivo* regenerando o pertecnetato. O

MIBI-^{99m}Tc de per si possui escassa afinidade pelo tecido tireoidiano, porém o pertecnetato já se fixa em maior proporção naquele órgão.

5.5 Perfis gerais de captação da droga

Comparando os valores de biodistribuição obtidos por Barbarics e col. (1994) ⁽¹⁶⁾ e Bouquillon e col. (1995)⁽²⁴⁾, observamos algumas discrepâncias. Na captação 5 minutos após a injeção no radiofármaco do primeiro trabalho, a % de dose/g no coração foi 2,87 vezes superior à do segundo trabalho, assim como no fígado 2,80, rins 1,35 e pulmão 2,20 vezes superior. Somente os valores sanguíneos foram equivalentes.

No presente experimento as cifras calculadas para os principais órgãos situaram-se geralmente a meio caminho entre estes dois relatos. Como nenhum dos pesquisadores citados procedeu a uma análise completa da biodistribuição, limitando-se a dois ou três tempos apenas, não temos condições de assegurar se algum problema técnico ou metodológico foi responsável pelos valores tão distintos por eles anunciados.

Pelas tabelas e gráficos comparativos de captação do MIBI pelos órgãos em ratos sadios e ratos com tumor (Tabelas 4.2 e 4.8, Figura 4.2) verificamos que a captação renal e hepática foi superior para ratos com tumor, e a captação do coração, pulmão, estômago e músculo foi inferior.

Convém esclarecer que pela mesma análise de variância (Figuras 4.8 e 4.9) não foram significativas as diferenças concernentes a baço, sangue, intestino delgado e intestino grosso. Ao se aplicar aos resultados o método da regressão linear (Tabela 4.20), constata-se que tanto para as captações com e sem diferenciação estatística, o grau de correlação e respectiva significância foram elevados, abrangendo a totalidade das amostras.

A atividade da excreção urinária após 360 min. foi de $16,69 \pm 2,52$ % em ratos sadios e de $21,0 \pm 2,22$ % nos animais cancerosos (Tabelas 4.4 e 4.10). Em ambas as amostras o nível nas fezes foi de aproximadamente 10 %. Os dados por nós localizados na literatura são de 48 horas, sendo que a concentração fecal mostrou-se superior a urinária ⁽¹⁷¹⁾.

A porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas, nos dois grupos de animais foi superior a 60 %. Verificamos que a droga também foi transportada pelos eritrócitos, porém em menor proporção, ainda que com valores mais elevados que os comumente observados em outros radiofármacos. Não encontramos informações sobre este mesmo composto que permitissem uma comparação com nossos achados.

5.6 Biodistribuição da NAC-^{99m}Tc

5.6.1 Animais sadios

Pela Tabela 4.5 podemos observar que o órgão com maior captação foi o rim, que apresenta um aumento de captação à medida que passa o tempo de administração da dose. Os pulmões ficaram em segundo lugar na listagem das maiores captações. Todas as outras estruturas apresentaram porcentagens reduzidas em relação aos rins, com decaimento acentuado à medida que se prolongava o tempo de injeção do fármaco. Estatisticamente, houve condições de diferenciação somente dos rins, que excederam o padrão de captação das demais estruturas.

Na Tabela 4.6, um minuto após a injeção da dose verificamos que a atividade nos rins e fígado era praticamente igual, devido à massa total do fígado e sua irrigação sanguínea, sendo que nos tempos subsequentes a atividade nos rins foi aumentando até um pico de 120 minutos. No fígado os valores passaram a se reduzir a partir das contagens iniciais.

Merecem registro as captações do intestino delgado e grosso, a seguir das vísceras anteriormente referidas, e cuja radioatividade mostrou decréscimo relativamente lento.

Houve notável retenção da substância em tecido muscular, quando os órgãos inteiros eram considerados, atingindo o elevado pico de $32,27 \pm 4,12$

% no primeiro minuto. Todavia, o descenso foi bastante rápido, limitando-se a $4,13 \pm 0,98$ % após 120 minutos.

A afinidade marcante do fármaco para tecidos com grande síntese proteica, em particular o músculo, porém em graus menores também para fígado, rins e intestinos, é compatível com o papel da cisteína como precursora das proteínas teciduais, e também do antioxidante intracelular glutathiona.

A propósito, determinou-se para fins ilustrativos o teor de NAC-^{99m}Tc no intestino cheio em um dos tempos (240 minutos). Embora se trate de uma informação isolada, que não fazia parte dos objetivos do trabalho, foi interessante verificar a elevada radioatividade na víscera cheia (aproximadamente 12 % da dose injetada, contrastando com apenas pouco mais de 2 % na parede intestinal). Como este material em sua maior parcela não foi excretado (dados de eliminação fecal), temos mais um indício de que tratava-se de NAC incorporada a sais biliares, enzimas intestinais, imunoglobulinas secretórias e outras moléculas que sofrem recirculação intestinal. Tal suposição vem inteiramente ao encontro do papel metabólico da NAC em processos biossintéticos importantes.

A depuração sanguínea foi muito rápida (74,58 % em 5 minutos), coadunando-se com o eficiente transporte e assimilação desta importante matéria prima de processos metabólicos essenciais.

As porcentagens de dose no sangue e plasma praticamente coincidiram, sugerindo que o composto foi transportado no sangue quase exclusivamente através da fração plasmática.

O mecanismo de transporte dos compostos elaborados não fazia parte dos objetivos desta pesquisa, porém Takeda e Okada (1989) ⁽¹⁵⁸⁾, num estudo envolvendo produto da mesma família, a homocisteína-^{99m}Tc, aventam a hipótese de formação de complexo com a albumina sérica.

A eliminação urinária foi de $56,74 \pm 3,92$ % em seis horas e a fecal de somente $6,48 \pm 0,85$ em igual período. Estes valores devem ser interpretados com cautela, visto que a fisiologia demonstra não haver quase nenhuma perda de aminoácidos livres na urina ou nas fezes ⁽¹²⁷⁾. Cumpre deduzir portanto que no primeiro caso, a radioatividade excretada pelos rins deve corresponder a moléculas degradadas por qualquer um dos processos usuais de metabolização dos aminoácidos (transaminação, desaminação e principalmente oxidação a CO₂ e uréia), onde então o resíduo de tecnécio seria eliminado.

No contexto intestinal, é lícito admitir-se a existência de mais uma parcela de NAC-^{99m}Tc, que foi incorporada á células intestinais, enzimas digestivas, sais biliares ou muco, e que escapou aos eficientes mecanismos de recirculação e reaproveitamento da proteína intestinal, perdendo-se assim para o exterior.

5.6.2 Animais com câncer

A preponderância da captação renal sobre a das demais vísceras manteve-se nesta população e foi confirmada estatisticamente. À semelhança do que sucedeu em ratos controles, as taxas renais não decresceram apreciavelmente nas primeiras horas, tendendo contrariamente a elevar-se e a exibir elevadas porcentagens até 240 minutos. Nas demais estruturas as concentrações do primeiro minuto não se sustentaram, baixando progressivamente em praticamente todos os territórios, ainda que um pouco mais lentamente nos intestinos. O teste de Newman-Keuls distinguiu somente o perfil renal do das demais vísceras e tecidos estudados.

Os valores de depuração plasmática e excreção urinária e fecal acompanharam de perto aqueles anteriormente transcritos para os animais controles (Tabelas 4.12 e 4.13).

Documentou-se captação tumoral inicial não muito avantajada, de $0,20 \pm 0,05$ %dose/g no primeiro minuto, porém esta não se enfraqueceu com o transcurso do tempo, mantendo-se inalterada até pelo menos 240 minutos.

Considerando-se que as dosagens sanguíneas e musculares decresceram precocemente, verificou-se que a passagem do tempo foi favorável para a relação tumor/músculo e tumor/sangue, com valores máximos aos 960 minutos (Tabela 4.16).

Este fenômeno havia sido detectado para a relação tumor/sangue no experimento executado com o MIBI-^{99m}Tc, porém foi inexpressivo no que concerne à relação tumor/músculo, sugerindo que não haveria uma probabilidade maior de diferenciação do câncer em relação a musculatura de vizinhança para nenhum dos tempos em que o MIBI-^{99m}Tc foi aplicado.

Osker e col. (1992) ⁽¹²⁵⁾ marcaram a cisteína com Tc-99m por dois métodos diferentes como troca de ligante e o método eletrolítico, e estudaram a biodistribuição do complexo em camundongos portadores de tumor sólido de Ehrlich. Eles obtiveram uma captação de 3,5% da dose injetada por grama do tumor após 90 minutos da administração do fármaco.

A concentração mais alta da dose injetada foi encontrada nos rins enquanto 1,9 % achava-se presente no fígado. A relação tumor/sangue foi de 2,5.

Tamemassa e cols. (1984a, 1984b) ^(161,162) observaram uma captação alta de DL-homocisteína marcada com Tc-99m em vários tumores experimentais *in vivo*. Takeda e cols. (1990) ⁽¹⁵⁹⁾ observaram o mecanismo de acúmulo da homocisteína-^{99m}Tc (HC-^{99m}Tc) e da homocisteína-^{99m}Tc-albumina no tumor de Ehrlich, onde verificaram que este último complexo permanecia retido por mais tempo no sangue e conseqüentemente acumulava-se mais nas células cancerosas do que apenas HC-^{99m}Tc. O estudo também foi realizado *in vitro*.

A albumina sérica usada como transportador para a HC-^{99m}Tc exibe propriedade repressora da excreção urinária da HC-^{99m}Tc e vale-se das alterações na permeabilidade capilar para o transporte da droga ao tumor.

Não foi frutífera a busca na literatura de protocolos equivalentes com NAC-^{99m}Tc, seja em tumor de Walker, seja ainda em outras modalidades de câncer experimental que permitissem uma análise comparativa com os dados da presente investigação.

5.7 Comparação de ratos normais e doentes

Nas Tabelas 4.5 e 4.11 e na Figura 4.3 torna-se evidente que houve diferenças significativas nas curvas de captação relativas a rins, fígado, intestino delgado, músculo e pulmões. Aplicando-se a análise de regressão linear (Tabela 4.20), verifica-se que tanto curvas semelhantes quanto diferentes exibiram graus variáveis de correlação entre si. À semelhança do afirmado para o MIBI-^{99m}Tc, esse achado disse respeito à totalidade das comparações entre ratos homólogos com e sem tumor (Tabela 4.20).

Um fenômeno interessante ocorrido no estudo das captações de ratos enfermos injetados com NAC-^{99m}Tc, e que não havia sucedido na eventualidade da outra droga, foi que sempre que existiu uma diferença entre atividade de órgãos, a menor captação correspondeu a ratos com câncer. Em nenhuma das vísceras e tecidos relatados acima, houve deposição do radionuclídeo superior à dos ratos controles.

Tal particularidade pode ser atribuída ao parasitismo que as enfermidades malignas exercem, pelo menos em algumas fases da sua evolução, sobre os nutrientes e substratos biossintéticos disponíveis no hospedeiro.

Esta afinidade exarcebada do tumor por moléculas nitrogenadas precursoras de proteínas, das quais NAC é um componente destacado, já foi designada de ratoeira de nitrogênio amínico ("nitrogen trap")⁽¹³⁾.

Entende-se porque, nestas circunstâncias, a distribuição de aminoácidos e outros nutrientes tende a privilegiar o câncer, em detrimento de estruturas da carcaça. Não haveria razão para se instalar processo análogo na vigência do estudo com MIBI-^{99m}Tc, pois sendo esta molécula estranha à síntese proteica, ainda que nitrogenada, não participaria da redistribuição em tela.

Uma explicação alternativa para a menor atividade das vísceras dos ratos com tumor, no presente grupo, em contraposição ao grupo sadio, seria a desnutrição calórico-proteica que também tende a ser induzida por aquela enfermidade. Efetivamente os estados carenciais conduzem a uma economia de atividades biossintéticas em diversos compartimentos do organismo⁽¹⁰²⁾, eventualmente contribuindo para o padrão observado.

Nos animais com tumor investigados pelo MIBI-^{99m}Tc, uma queda menos uniforme foi consubstanciada, com aumento da captação hepática e

também renal, o que é mais compatível com alguns modelos de desnutrição (102).

5.8 Comparação entre as duas drogas

Do ponto de vista químico, é forçoso admitir-se que estamos perante duas substâncias sensivelmente distintas. O MIBI, composto isonitrila, forma complexo com Tc(I) ⁽⁵⁰⁾, enquanto a NAC, um derivado de aminoácido, forma complexo com Tc (IV) ⁽¹⁵⁵⁾. Também fisiologicamente seus comportamentos são divergentes. Enquanto o MIBI-^{99m}Tc é um fármaco artificial que não desempenha qualquer função biológica no organismo é excretado rapidamente, a NAC é um derivado do aminoácido cisteína, substância naturalmente presente nos tecidos, onde participa da síntese proteica em geral, e também na produção da glutathione, um importante antioxidante fisiológico.

Como decorrência destas disparidades, o tropismo por órgãos e vísceras e as curvas de depuração dos marcadores não poderiam ser análogas, como de fato não foram.

A despeito das diferenças, os traçadores conseguem aproximar-se em alguns pontos. Nos dois casos estamos diante de moléculas nitrogenadas pequenas, de fácil marcação pelo ^{99m}Tc, e com depuração rápida e eficiente a partir da corrente sanguínea para as principais estruturas do organismo. Mais importante ainda, ambos revelam-se capazes de penetrar no tecido

tumoral e de formar imagens potencialmente diagnósticas, ensejando a comparação da facilidade de preparo e utilização, e sobretudo da afinidade específica, fundamental para uma boa definição visual.

Semelhanças e diferenças adicionais são evidenciadas no estudo do transporte das drogas na corrente circulatória.

Tanto o MIBI-^{99m}Tc quanto a NAC-^{99m}Tc possuem mais de 50 % de ligação às proteínas plasmáticas porém em relação aos eritrócitos a proporção da ligação no caso do MIBI (29,17 % para ratos sadios e 37,50 % para ratos com tumor) é bem superior à da NAC, que apresenta um índice de 6,42 % e 4,58 % para ratos sadios e com tumor respectivamente.

Em que pese a substancial ligação às proteínas plasmáticas verifica-se uma depuração bastante rápida das drogas, sendo que com o MIBI-^{99m}Tc este processo é mais rápido do que com a NAC-^{99m}Tc.

É lícito especular-se que sendo o MIBI-^{99m}Tc uma substância estranha ao organismo, haja menos mecanismos de transporte e sítios de ligação específicos que para um aminoácido de grande interesse metabólico como a NAC, justificando-se uma eliminação mais precoce. A NAC é certamente melhor conservada e também dispõe de mecanismos de recirculação, como na via cisteína-glutationa-cisteína, propiciando uma permanência mais alongada no espaço intravascular⁽³³⁾.

5.9 Captação tumoral

5.9.1 Dificuldades da captação da droga pelo tumor

Para erradicar os tumores, os agentes terapêuticos precisam dispersar-se através das células em altas concentrações, visando eliminar toda a massa tumoral ⁽⁸²⁾. Contudo, tumores sólidos frequentemente impõem fortes barreiras a esta dispersão. A mesma dificuldade está nos agentes de imagem tumoral, entre os quais incluem-se os traçadores radioisotópicos.

Os tumores impedem a penetração da droga particularmente devido a sua estrutura.

As células cancerosas frequentemente ocupam menos da metade do volume do tumor. Um a dez por cento do volume deve-se aos vasos sanguíneos integrantes da massa tumoral. O espaço remanescente é preenchido primariamente por uma matriz rica em colágeno, o interstício, que envolve as células cancerosas e pode separá-las da vasculatura. Tecidos sadios contêm também uma matriz extracelular, porém o interstício no tumor é comumente mais abundante.

Para alcançar células cancerosas em um tumor, um agente terapêutico precisa atravessar a parede dos vasos sanguíneos rumando para o interstício, e migrar por grandes distâncias através da matriz até alcançar as células ⁽⁸⁰⁾.

O sistema vascular dos tumores é muito desorganizado, tanto na sua anatomia quanto na sua fisiologia. Estas anomalias podem comportar-se como uma barreira importante na distribuição da droga. Em órgãos sadios, os vasos sanguíneos estão em uma ordem conhecida e provêm sangue para todas as áreas do tecido, favorecendo o fluxo e penetração de fármacos em geral.

Embora os tumores obtenham inicialmente sangue da vasculatura existente na região, eles eventualmente produzem novos pequenos vasos sanguíneos, que se ramificam excessivamente, entrelaçam-se em formas tortuosas e crescem em direções imprevisíveis, podendo ainda mudar de um dia para outro. Conseqüentemente, algumas áreas do tumor mostram-se bem vascularizadas, enquanto outras têm pouco ou nenhum suprimento sanguíneo.

As células tumorais nestas áreas carentes de sangue aparentemente estão mortas, porém elas frequentemente revivem se retorna a nutrição através dos vasos neoformados.

A ramificação e entrelaçamento da vasculatura frequentemente contribuem para diminuição do fluxo sanguíneo; um fenômeno que é exarcebado pela viscosidade sanguínea diferente nos tumores.

A distribuição sanguínea não uniforme portanto é um dos obstáculos para entrada da droga no tumor.

Um segundo impedimento deve-se à pressão tecidual anormalmente alta na matriz intestinal (medida pela força que a matriz exerce numa sonda nela inserida) ⁽⁸²⁾.

A pressão pode retardar a passagem de moléculas grandes através dos vasos para a matriz intestinal.

As moléculas deixam os vasos sanguíneos por dois mecanismos: difusão e convecção. Difusão é o movimento das moléculas de uma área de alta concentração para uma área de baixa concentração. Convecção é o transporte de moléculas por um fluxo de líquido ⁽⁸¹⁾.

A difusão não é afetada por gradientes de pressão porém a convecção é governada por eles. Os líquidos fluem de áreas de alta pressão para áreas de valor mais baixo carregando com eles as moléculas.

Moléculas pequenas como oxigênio e drogas quimioterápicas convencionais (as quais têm peso molecular inferior a 2000 daltons) deixam os vasos e migram através do tecido normal principalmente por difusão. Mas moléculas grandes, como as drogas da engenharia genética (que possuem peso molecular superior a 5000 daltons) movem-se principalmente por convecção ⁽⁸⁰⁾.

Os marcadores radioativos podem situar-se em qualquer uma dessas categorias, quer se tratem de substâncias sintéticas ou naturais de pequenas dimensões (como o MIBI-^{99m}Tc e a N-acetil cisteína-^{99m}Tc), quer

contrariamente se relacionem a hormônios, grandes peptídeos ou citocinas, cujas moléculas podem atingir elevado peso.

Em tecidos saudáveis, o movimento convectivo das moléculas grandes do sangue para o interstício ocorre porque a pressão nos capilares é maior do que a pressão no tecido intersticial (que é aproximadamente zero).

Nos tumores sólidos a pressão intersticial é muito alta e a passagem convectiva para o interstício fica impedida. Ainda assim algumas grandes moléculas penetram na matriz tumoral por difusão, porém não rapidamente, porque a taxa de passagem por difusão decresce à medida que o tamanho das moléculas aumenta.

Desta maneira, as moléculas grandes usualmente permanecem confinadas nos vasos sanguíneos, exceto na periferia onde a pressão intersticial é próxima da normal e a convecção se restabelece. Contudo, o organismo tende a eliminar a maior parte delas da circulação antes que elas possam se acumular em uma concentração ótima nos tumores⁽⁸⁰⁾.

Os desafios dos agentes diagnósticos e terapêuticos persistem mesmo após eles encontrarem o caminho para o interior do interstício. Para serem completamente efetivos, eles precisam difundir-se por toda a matriz, atingindo mesmo as células não alimentadas diretamente por vasos sanguíneos.

As moléculas pequenas completam o percurso muito mais facilmente (por difusão), a menos que sejam degradadas, reabsorvidas por microvasos ou impedidas por outros processos.

Quando as moléculas das drogas alcançam as células tumorais, seus problemas não terminam pois elas encontram resistência das próprias células.

5.9.2 Captação tumoral em função da massa neoplásica

Alguns trabalhos recentes envolvendo modelos animais mostraram a variação da captação de radiotraçadores pelo tumor como uma função do tamanho tumoral.

Patel e col. (1985) ⁽¹²⁷⁾ e Ogihara e col. (1986) ⁽¹²⁰⁾ mostraram um decréscimo da captação medida em porcentagem de dose por grama de tumor (% Dose/g), sempre que se aumenta a massa tumoral.

Anticorpos monoclonais marcados também foram estudados no contexto da variação da captação com a massa tumoral ^(129,66), com resultados semelhantes.

Tumores pequenos possuem um sistema circulatório mais uniforme e pressão intersticial mais baixa, portanto é mais fácil a penetração das drogas, o oposto sucedendo quando um câncer volumoso está sendo estudado.

Células tumorais geralmente crescem mais rapidamente do que células normais, com uma captação maior de glicose e oxigênio. De fato, o tecido tumoral desenvolve-se tão rapidamente que o processo de neovascularização não consegue adequar-se às necessidades do tumor. Isso resulta em áreas de hipóxia, mesmo a pouca distância dos capilares sanguíneos. O conteúdo de oxigênio diminui com o aumento do tamanho do tumor, conseqüentemente, as áreas centrais de tumores grandes tendem a ser anóxicas ⁽⁸²⁾.

Com a respiração deprimida causada pela hipóxia do tecido, a glicólise anaeróbia passa a representar a fonte de energia primária. Isso resulta no aumento dos níveis de ácido láctico e diminuição do pH, o que frequentemente interfere também com a biodistribuição de drogas e marcação mediante radionuclídeos.

Uma correlação inversa entre captação e massa é esperada, uma vez que o volume do tumor é progressivamente menos perfundido com o aumento de seu tamanho ⁽⁶⁵⁾. Zonas necróticas são inacessíveis ao transporte sanguíneo do agente, e a geometria do fluxo sanguíneo tumoral é uma barreira significativa para a captação do traçador ⁽¹⁷⁷⁾.

No modelo aqui selecionado de tumor subcutâneo, algumas variações de tamanho são inevitáveis, mesmo diante de uma cuidadosa sistematização da técnica de inoculação. Além disso, a vascularização subcutânea é inferior à encontrada no músculo, ou na cavidade peritoneal, de maneira que tumores subcutâneos atingem um tamanho mensurável mais tardio, e para

um dado volume apresentam-se mais necróticos do que os tumores intramusculares.

Realmente, registrou-se correlação inversa significativa em três tempos entre tamanho do tumor e captação de NAC-^{99m}Tc (tumores grandes captaram menos) (Tabela 4.21).

Mesmo nos tempos em que não se atingiu significância, manteve-se a tendência à correlação negativa apontada.

No caso do MIBI-^{99m}Tc, nenhuma correlação foi significativa, e na maioria dos tempos, tampouco houve tendência à correlação inversa observada para a NAC.

Com base no exposto é válido raciocinar-se que em tumores iniciais, que são justamente os mais difíceis de se detectar e os mais importantes para um tratamento curativo precoce, a captação seria substancialmente mais alta com a NAC, configurando um benefício adicional para este fármaco.

5.10 Imagem do tumor

Algumas lesões benignas, e sobretudo as malignas, possuem características que apresentam vantagens potenciais para o diagnóstico de imagem com radionuclídeos. Por exemplo, apresentam atividade metabólica e fluxo sanguíneo aumentados, permeabilidade vascular alta, pinocitose de

proteínas e ocasionalmente um antígeno específico associado a tumor. Com uma escolha apropriada do radiofármaco para qualquer uma destas características, a despeito de outras tantas barreiras referidas anteriormente, a imagem poderá ser avaliada, sendo os tumores definidos como manchas quentes ou hipercaptantes ⁽¹⁴⁴⁾.

Em outros casos, os tumores são vistos ou suspeitados por zonas frias, de atividade diminuída. Este fenômeno resulta do fato de que células tumorais muitas vezes não assimilam o radiofármaco administrado, enquanto as células normais o fazem. Numerosos radiofármacos para imagem de tumor têm sido desenvolvidos para testes clínicos, notadamente do modelo hipercaptante, porém a maioria deles é dotada de limitada especificidade. Nota-se também que um agente pode ser bom para alguns tipos de tumor e não para outros.

Estudos cintilográficos da cisteína-^{99m}Tc realizados por Ozker e col. (1992) ⁽¹²⁵⁾ demonstraram uma captação seletiva no tumor sólido de Ehrlich 30 minutos após injeção.

Através da imagem realizada em câmara de cintilação após 20 e 240 minutos, em animais portadores de câncer experimental, observou-se que com o MIBI-^{99m}Tc em nenhum dos tempos pôde-se visualizar com segurança o nódulo canceroso. Desai & Yuille (1993) ⁽⁴⁴⁾ sugerem que o tempo de imagem ótimo para captação do MIBI-^{99m}Tc em tumor está entre 30 e 60 minutos após a injeção. Outros autores como Kao e col. (1993a) ⁽⁸⁵⁾ e Hassan e col. (1989) ⁽⁶⁹⁾ definiram como tempo ótimo 10 minutos.

Ao injetar-se NAC-^{99m}Tc, também foi impossível definir-se qualquer padrão tumoral, no primeiro tempo de 20 minutos. Já após quatro horas a massa neoplásica estava claramente delineada no lado direito do abdomen do animal. Nenhum prejuízo ocorreu devido à superposição ou interferência por parte de estruturas adjacentes, uma vez que apenas os rins apresentavam alta radioatividade neste tempo, enquanto a depuração sanguínea era de 92,75%, e a muscular de aproximadamente 83%.

5.11 Características teóricas do modelo de distribuição bicompartimental

O primeiro passo para se efetuar uma análise compartimental de um fármaco, consiste na especificação do provável padrão de distribuição.

A adoção do princípio de dois compartimentos abertos permite geralmente boas soluções matemáticas, facilmente relacionáveis com as noções gerais sobre o destino das drogas no organismo: considera-se um dos compartimentos como “central” (sangue), de pequeno volume aparente, onde a dose conhecida do fármaco é introduzida e instantaneamente difundida; outro compartimento é o “periférico” (extravascular), de maior volume aparente, em permanente contato com o “central”. A excreção se faz do compartimento menor para o maior, através do coeficiente de eliminação (k_e) que também pode ser calculado ^(91, 94).

A concentração sanguínea do fármaco costuma refletir essas trocas, diminuindo rapidamente no princípio devido a distribuição em todo o

compartimento central e periférico. A seguir, cai lentamente, graças à fração que porventura retorna dos tecidos para os fluidos corporais, e pela eliminação, quer seja por excreção ou metabolização, chegando a alcançar o estado de equilíbrio, algum tempo depois ⁽⁹¹⁾.

Estes dois compartimentos não correspondem obrigatoriamente a entidades anatômicas precisas: são espaços teóricos de distribuição das drogas por vários fluidos e tecidos, onde as concentrações relativas podem ser bastante distintas. Sob este prisma, a concepção bicompartimental perde para as análises multicompartimentais. Ainda assim, contribui para o entendimento da dinâmica geral e destinação dos fármacos, com a vantagem de um tratamento matemático mais acessível ⁽¹³⁹⁾.

5.12 Estudos farmacocinéticos das drogas

Ao realizar-se um estudo farmacocinético é possível selecionar um modelo *a priori*, e depois tratar de acomodar os dados obtidos experimentalmente. Foi o que se efetuou, pois partiu-se de um modelo bicompartimental para as duas drogas, sendo que houve êxito na inserção dos dados disponíveis para a NAC-^{99m}Tc nos dois programas, e para o MIBI-^{99m}Tc na análise BIEXP.

O modelo do qual se parte é sempre uma hipótese. Quando há concordância entre os parâmetros experimentais e o modelo escolhido, considera-se a hipótese válida ⁽¹¹⁷⁾.

O estudo cinético de primeira ordem aqui utilizado aplica-se aos modelos bicompartimentais abertos, sendo, portanto, o de aplicação mais frequente. Parte-se do princípio de que a droga somente entra ou sai do sistema através do compartimento central, e que entre esse compartimento e o periférico existe transferência reversível do fármaco, de tal forma que o compartimento periférico funciona como reservatório ligado somente ao central⁽⁹¹⁾.

O tratamento matemático do estudo cinético de primeira ordem é usado para descrever a saída da droga de ambos os compartimentos do sistema. Assim, a taxa de remoção da droga de um compartimento é proporcional à sua concentração nesse local: quanto maior for essa concentração, maior quantidade de droga eflui do compartimento: a quantidade de droga que sai diminui proporcionalmente com o tempo conforme diminui sua concentração.

Quando a transferência se completa e não se acrescenta mais droga ao compartimento central, sua concentração neste compartimento (C_1) depende de processos simultâneos e independentes. Ela pode deixar o compartimento central ou por distribuição para o periférico, ou por eliminação para o exterior.

No modelo bicompartimental aberto, a concentração de droga no compartimento periférico (C_2) depende de C_1 e da taxa de transferência entre ambos os compartimentos. Admite-se que a transferência esteja associada a duas constantes de primeira ordem: k_{12} (taxa de transferência do

compartimento central para o periférico, isto é, de C_1 para C_2) e k_{21} (transferência inversa, isto é, de C_2 para C_1)⁽⁹⁴⁾.

Todos os tipos de eliminação irreversível da droga do compartimento central (biotransformação, secreção e excreção renal, eliminação pulmonar, eliminação por glândulas sudoríparas, salivares, gástricas, etc.) são também relacionados a uma constante de primeira ordem denominada taxa de eliminação (K_e). Isso ocorre porque a eliminação também depende de processos como difusão passiva, filtração, fluxo sanguíneo regional, transporte etc., que possuem as características de cinética de primeira ordem, ou seja funcionam abaixo do ponto de saturação dos processos envolvidos⁽¹¹⁷⁾.

Tanto para o MIBI-^{99m}Tc quanto para a NAC-^{99m}Tc temos uma depuração sanguínea que se aproxima de uma curva biexponencial.

O MIBI-^{99m}Tc é excretado intacto, sem evidência de metabolismo *in vivo*. Exibe um padrão bifásico de depuração sanguínea. Na fase inicial rápida o pico de atividade é alto e a depuração é muito rápida, seguida de uma depuração mais lenta.

O $T_{1/2}$ da fase rápida foi de 0,78 minutos (46,8 segundos) enquanto na fase lenta tivemos um índice de 39 minutos.

Os estudos pré-clínicos da Du Pont Pharma, citam Picard e cols.⁽¹³⁰⁾ que mediram a depuração sanguínea do Cardiolite em 20 pacientes, e obtiveram uma meia-vida de 1 minuto para a depuração sanguínea de

pacientes em exercício, enquanto que Wackers e cols. ⁽¹⁷¹⁾ obtiveram $T_{1/2} = 2,1$ minutos. Já Savi e cols. ⁽¹⁴⁸⁾ em seus estudos, obtiveram $T_{1/2}$ da componente rápida igual a 69,3 segundos para paciente em descanso e 60,3 segundos em pacientes com *stress*.

Pudemos verificar que os tempos de meia-vida do MIBI-^{99m}Tc são bem menores do que os da NAC-^{99m}Tc. O MIBI-^{99m}Tc realmente é depurado muito mais rapidamente do sangue do que a NAC-^{99m}Tc, conforme antecipado pelos resultados de atividade sanguínea nos primeiros minutos após a administração dos radiofármacos, e pelos valores da constante α (constante de eliminação rápida).

O volume de distribuição depende de muitos fatores, como a quantidade e velocidade do fluxo sanguíneo em diferentes órgãos e tecidos, as características físico-químicas do fármaco como pH, solubilidade, coeficiente de partição lipíde/água, união às proteínas plasmáticas, e de variáveis biológicas, como transporte ativo e destinação metabólica da substância ⁽¹¹⁷⁾.

A análise compartimental para várias drogas pode apresentar-se de maneira diferente quanto ao número de compártimentos, conforme a forma de administração da mesma, seja oral ou intravenosa ⁽⁶³⁾.

Borgström e col. (1986) ⁽²³⁾ apresentaram o primeiro estudo dos parâmetros básicos de farmacocinética após administração intravenosa da NAC não marcada, e também de sua disponibilidade após utilização oral. Os métodos bioanalíticos utilizados permitiram apenas a análise da NAC em

plasma desproteínizado. Eles concluíram que a NAC tinha uma razão de extração hepática baixa, um pequeno volume de distribuição de (0,33 l/kg) e baixa disponibilidade oral.

No trabalho da NAC marcada com S-35⁽⁹⁹⁾, uma comparação entre administração intravenosa e oral da mesma indicou que a absorção do radiomarcador foi completa, embora a NAC na parede do intestino do rato seja extensamente metabolizada a cisteína, glutatona e sulfeto inorgânico⁽³³⁾. A NAC é também metabolizada a glutatona por hepatócitos, o que deve configurar-se como um mecanismo essencial de ação quando a NAC é usada no tratamento de envenenamento por paracetamol⁽¹⁶⁴⁾.

Quando introduzida oralmente ocorre desacetilação rápida a cisteína no lúmen ou mucosa intestinal, de maneira que pouco do composto aparece na circulação como NAC⁽³⁴⁾.

Quando injetada intravenosamente, NAC livre está presente inicialmente no plasma, porém após 30 minutos, quase todo o composto apresenta-se como dissulfeto lábil.

Sulfato inorgânico foi o principal produto urinário excretado, juntamente com pequenas quantidades de taurina e NAC não modificada, em estudos realizados com NAC marcada com ³⁵S⁽¹⁵²⁾.

A NAC não marcada é uma molécula biológica pequena normalmente presente no organismo, e para qual existem mecanismos de transporte em numerosas células e tecidos, não encontrando barreiras à sua difusão.

A NAC-^{99m}Tc, embora não caracterizada nas condições do presente trabalho, provavelmente não se difunde pelo organismo e nem atravessa membranas biológicas com a mesma facilidade da NAC pura, o que justificaria os valores baixos de distribuição encontrados. As possíveis justificativas para essa situação seriam o aumento do peso da molécula (tamanho), alterações de carga elétrica (eletronegatividade) e interferência em mecanismos enzimáticos de transporte .

Note-se que essa baixa difusibilidade é apenas relativa, uma vez que os achados de biodistribuição da nova droga comprovam níveis de penetração aceitáveis em grande número de tecidos incluindo o tumor.

Além disso, drogas que possuem alto grau de ligação às proteínas plasmáticas como é o caso da NAC-^{99m}Tc e do MIBI-^{99m}Tc tendem a exibir menor volume de distribuição que agentes desprovidos de qualquer ligação (19).

Com base nas duas modelagens a que se procedeu com a NAC-^{99m}Tc, algumas características do aminoácido tornaram-se claras. Ficou bem demonstrada a depuração sanguínea rápida da droga (embora algo mais lenta que a do MIBI-^{99m}Tc), e seu volume de distribuição razoavelmente amplo (superior ao do MIBI-^{99m}Tc, e inferior ao estimado para NAC não marcada por Borgström e col. (1986) (23).

Sua longa vida e baixo índice de depuração foram corretamente quantificados, coadunando-se com as captações elevadas em tempos tardios

nos rins. Esta peculiaridade foi útil também para a adequada visualização e contrastação do tumor, nos estudos preliminares de imagem de que se lançou mão.

Finalmente, mesmo diante da forte suspeita de que o comportamento biológico da NAC-^{99m}Tc afasta-se dos relatos disponíveis para a NAC "in natura", conseguiram-se constantes de transferência e volumes de distribuição valiosos, que favorecem o prosseguimento futuro dos estudos farmacológicos e farmacocinéticos com este aminoácido marcado.

5.13 Estudos estatísticos dos traçadores empregados

5.13.1 Correlação linear da biodistribuição entre as duas drogas

Foi realizada análise de regressão linear para múltiplas variáveis (matriz de correlação) a fim de averiguar a presença ou ausência de correlação entre os achados de distribuição das duas drogas nos vários órgãos e compartimentos (Tabelas 4.20, 4.22).

Observaram-se correlações significativas em diversas oportunidades, principalmente envolvendo a mesma droga em órgãos homólogos de ratos normais e com tumor. Assim, o MIBI distribui-se de forma semelhante nos dois modelos de animais para todos os órgãos analisados, com significância

estatística particularmente elevada para rim, fígado, coração, pulmão, estômago, intestino delgado, sangue e plasma.

Analogamente, NAC foi captada de forma comparável por órgãos homólogos na presença e ausência de tumor, sempre com altos índices de significância estatística, ressalvado apenas o intestino grosso, onde a significância não foi tão marcante ($r = 0,665$, $p = 0,04$).

A comparação de tecidos homólogos e drogas diferentes, em normais, também evidenciou correlações significativas em algumas circunstâncias, porém não tão frequentes, refletindo a farmacologia e biodistribuição distintas dos dois marcadores. Assim, atingiram significância os perfis do fígado ($p < 0,005$), pulmão ($p < 0,0001$), intestino grosso, intestino delgado, sangue ($p < 0,005$) e plasma ($p < 0,001$).

Semelhanças estruturais nas moléculas orgânicas, que são de pequena dimensão, nitrogenadas e possuidoras de radicais metila e metoxi, possivelmente influenciaram essas coincidências de distribuição no organismo. Vale destacar a ausência de correlação no rim e coração, órgãos chave para a farmacologia respectivamente da N-acetil cisteína (marcador renal conhecido) e do MIBI (tropismo cardíaco por excelência), como elementos de clara distinção entre esses produtos.

Nos animais cancerosos, o cotejamento de tecidos homólogos e drogas distintas permitiu a constatação de panorama semelhante ao dos ratos sem tumor, certamente pelas mesmas razões. Ocorreram correlações significativas entre os perfis de radioatividade do fígado, pulmão, baço,

estômago, intestino delgado, músculo, sangue e plasma, com as exceções relevantes de rim e coração, já comentadas.

Finalmente, a comparação direta das captações de MIBI e NAC pelo tecido tumoral (Figura 4.4, Tabela 4.17) mostraram-se correlacionadas ($r = 0,783$, $p = 0,01$), porém sem as altíssimas significâncias vistas em algumas das análises anteriores. Pode-se inferir portanto que se trata de produtos químicos com apreciável afinidade pelas massas tumorais, mas não idênticos na sua distribuição temporal nem nas concentrações alcançadas, o que aliás era esperado.

O teste de Newman-Keuls, aplicado anteriormente para a comparação das captações de cada órgão, foi novamente utilizado (Figura 4.12) para uma apreciação visual das relações tumor/músculo e tumor/sangue alcançadas com cada droga. Ainda, utilizou-se o mesmo para comparação direta das duas captações tumorais (Figura 4.13).

No primeiro caso, ficou realçada a superioridade do MIBI- ^{99m}Tc no tocante à relação tumor/sangue, contrastando com a vantagem para a NAC- ^{99m}Tc na razão tumor/músculo.

A figura 4.13 não deixa dúvidas de que a penetração no tecido tumoral foi nitidamente melhor no caso da NAC- ^{99m}Tc ($p < 0,001$).

6. CONCLUSÕES

“Minhas primeiras tentativas neste campo não foram bem sucedidas... Algumas vezes eu interrompia minhas pesquisas, desesperado com a possibilidade de não atingir o objetivo, retomando-as a seguir com novas esperanças, e somente após sucessivas frustrações pude finalmente ver a luz”.

Berzelius

6. CONCLUSÕES

- 1) A marcação da N-acetilcisteína com Tc-99m foi realizada por uma técnica simples e reprodutível obtendo-se elevado grau de pureza radioquímica.
- 2) A biodistribuição do MIBI-^{99m}Tc em ratos sadios confirmou o direcionamento preferencial para rins e miocárdio com captações expressivas também para pulmão e fígado.
- 3) A biodistribuição do MIBI-^{99m}Tc em ratos com tumor revelou atividade um pouco aumentada em fígado e baço e um pouco diminuída em coração e pulmões, porém sem fugir do perfil geral já evidenciado em organismos sem doença.
- 4) A captação do MIBI-^{99m}Tc pelo tecido tumoral foi significativa porém insuficiente para visualização do mesmo por método de imagem.
- 5) A biodistribuição da droga em ratos sadios e com tumor não apresentou grandes variações, merecendo destaque seu grande tropismo pelos rins e no segundo grupo, sua presença no nódulo tumoral.
- 6) As razões tumor/sangue e tumor/órgão da NAC-^{99m}Tc permitiram a obtenção de imagem por cintilografia de boa qualidade após 240 min.

7) A NAC é um aminoácido de fácil aquisição e suscetível de marcação eficiente pelo ^{99m}Tc . Nas condições do presente estudo, confirmou-se o seu valor potencial como radiofármaco para diagnósticos por imagem, não somente do sistema renal como principalmente para lesões de natureza tumoral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A word is dead
When it is said,
Some say.

I say it just
Begins to live
That day.

Emily Dickinson

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ABBOTT, W.A.; BRIDGES, R.J.; MEISTER, A. Extracell metabolism of glutathione accounts for its disappearance for the basolateral circulation of the kidneys. *J. Biol. Chem.*, vol. 23, p.15393-15400,1984.
- 2 - AJINOMOTO Co. Inc. *Amino Acids Specifications*. Tokyo, Japão, 7 ed., p. 169-170, 1992.
- 3 - AKTOLUN, C.; BAYHAN, H.; CELASUN, B.; KIN, M.K. Unexpected uptake of technetium-99m hexakis-2-methoxy-isobutylisonitrile in giant lymph node hyperplasia of the mediastinum (Castle man's disease). *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 18, p. 856-859, 1991a.
- 4 - AKTOLUN, C.; DEMIREL, D.; KIR, M.; BAYHAN, H.; MADEN, H.A. Technetium-99m-MIBI and thallium-201 uptake in pulmonary actinomycosis. *J. Nucl. Méd.*, v. 32, p. 1429-1431, 1991b.
- 5 - AKTOLUN, C. & BAYHAN, H. Demonstration of pulmonary sarcoidosis with Tc-99m-MIBI SPECT: comparison to Ga-67 imaging. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 20, p. A944, 1993 (Abstract).

- 6 - AKTOLUN, C.; BAYHAN, H.; PABUCCU, Y.; BILGIC, H.; ACAR, H.; KOYLU, R. Assessment of tumour necrosis and detection of mediastinal lymph node metastasis in bronchial carcinoma with technetium-99m sestamibi imaging: comparison with CT scan. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 21, p. 973-979, 1994.
- 7 - ALBINI, A.; D'AGOSTINI, F.; GIUNCIUGLIO, D.; PAGLIERI, I.; BALANSKI, R.; DE FLORA, S. Inhibition of invasion, gelatinase activity, tumor take and metastasis of malignant cells by N-acetylcysteine. *Int. J. Cancer*, v. 61, p. 121-129, 1995.
- 8 - ANDERSON, K.; LEONARD, R.; CANELLOS, G.; SKARIN, A.; KAPLAN, W. High-dose gallium in lymphoma. *Am. J. Med.*, v. 75, p. 327-331, 1983.
- 9 - ANDERSON, M.E. & MEISTER, A. - Intracellular delivery of cysteine. In: JACOBY W.B. & GRIFFITH, O. W. (Eds.). *Methods in Enzimology*. New York, N.Y., Academic Press, 1987, v. 143, p. 313-325.

- 10 - ARAÚJO, E.B.- *Estudo da biodistribuição e características biológicas do ácido p- $\{bis-carboximetil\}$ aminometil carboxiamino $\}$ hipúrrico [Pahida] marcado com Técnico-99m. Estabelecimento dos parâmetros farmacocinéticos de distribuição por meio de um modelo de compartimentalização.* São Paulo, 1990. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/CNEN - USP.
- 11 - ASWEGEN, A.; WYK, A.J.; HERBST, C.P.; OTTO, A.C.; KNOESEN, O.; LOTTER, M.G.; MINNAAR, P.C.; KLEYNHANS, P.H.T.; FOURIE, P.J. Pictures in the heart. *Int. J. Nucl. Biol.*, v. 11, p. 225-234, 1984.
- 12 - ATKINS, H.L.; BUDINGER, T.F.; LEBOWITZ, E.; ANSARI, A.N.; GREENE, M.W.; FAIRCHILD, R.G.; ELLIS, K.J. Thallium-201 for medical use. Part 3: Human distribution and physical imaging properties. *J. Nucl. Med.*, v. 18, p. 133-140, 1977.
- 13 - BABSON, A.L. Some host-tumor relationships with respect to nitrogen. *Cancer Res.*, v.14, p. 89-93, 1954.
- 14 - BACKUS, M.; PIWNICA-WÖRMS, D.; HOCKETT, D. Microprobe analysis of Tc-MIBI in heart cells: calculation of mitochondrial membrane potential. *Am. Phys. Soc.*, p. 178-187, 1993.

- 15 - BALON, H.R.; FINK-BENNETT, D.; STOFFER, S.S. Technetium-99m-sestamibi uptake by recurrent Hürthle cell carcinoma of the thyroid. *J. Nucl. Med.*, v. 33, p. 1393-1395, 1992.
- 16 - BARBARICS, E.; KRONAUGE, J.F.; COSTELLO, C.E.; JANOKI, G.A.; HOLMAN, B.L.; DAVISON, A.; JONES, A.G. *In vivo* metabolism of the technetium isonitrile complex $[\text{Tc}(2\text{-ethoxy-2-methyl-1-isocyanopropane})_6]^+$. *Nucl. Med. Biol.*, vol. 21, p. 583-591, 1994.
- 17 - BARES, R.; DEMPKE, W.; HANDT, S.; GALONSKA, P.; BUELL, V.; OSIEKA, R.; MITTERMAYER, C. Somatostatin receptor scintigraphy (SRS) in malignant lymphoma: first results and comparison with CT and positron-emission tomography (PET) with fluorine-18 labeled deoxyglucose (FDG). *J. Nucl. Med.*, v. 34, p. 164, 1993 (Abstract).
- 18 - BELLAMY, D. & HIMSULL, S.M. Density-dependent mitosis in Walker 256 carcinoma and the influence of host age on growth. *Eur. J. of Cancer*, v.14, p. 747-751, 1978.
- 19 - BENET, L.Z. & PEROTTI, B.Y.T. Drug absorption, distribution and elimination. In: WOLFF, M.E. (Ed.). *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. New York, N.Y., John Wiley & Sons. 1995, v. 1, p. 113-102.

- 20 - BERGGREN, M.; DAWSON, J.; MOLDEUS, P. Glutathione biosynthesis in the isolated perfused rat lung: utilization of extracellular glutathione. *FEBS Lett*, v.176, p. 189-192, 1984.
- 21 - BILZER, M. & LAUTERBURG, B.H. Glutathione metabolism activated human neutrophils: stimulation of glutathione synthesis and consumption of glutathione by reactive oxygen species. *Eur. J. Clin. Invest.*, v. 21, p. 316-322, 1991.
- 22 - BONANOMI, L. & GAZZANIGA, A. Toxicological, pharmacokinetic and metabolic studies on N-acetylcysteine. *Eur. J. Respir. Dis.*, v. 61, p. 45-51, 1980.
- 23 - BORGSTRÖM, L.; KAGEDAL, B.; PAULSEN, O. Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, v. 31, p. 217-222, 1986.
- 24 - BOUQUILLON, S.; COULAIS, M.; DARTIGUENAVE, M.; TAFANI, J.A.M.; GUIRAUD, R. Synthesis, characterization and biodistribution of a new technetium-99m complex with trimethylsilylmethylisonitrile comparison with ^{99m}Tc -TBI and ^{99m}Tc -MIBI. *Nucl. Med. Biol.*, v. 22, p. 585-588, 1995.
- 25 - BRADLEY-MOORE, P.R.; LEBOWITZ, E.; GREENE, M.W.; ATKINS, H.L.; ANSARI, N. Thallium-201 for medical use. II. Biologic behaviour. *J. Nucl. Med.*, v. 16, p. 156-160, 1975.

- 26 - CAMPEAU, R.J.; KRONEMER, K.A.; SUTHERLAND, C.M.
Concordant uptake of Tc-99m sestamibi and Tl-201 in
 unsuspected breast tumor. *Clin. Nucl. Med.*, v. 17, p. 926-937,
 1992.
- 27 - CANER, B.; KITAPCI, M.; ARAS, T.; ERBENGI, G.; UGUR, Ö.;
 BEKDIK, C. Increased accumulation of hexakis (2-methoxy
 isobutyl isonitrile) technetium (I) in osteosarcoma and its
 metastatic lymph nodes. *J. Nucl. Med.*, v. 32, p. 1977-1978,
 1991.
- 28 - CANER, B.; KITAPÇI, M.; UNLÜ, M.; ERBENGI, G.;
 ÇALIKOĞLU, T.; GÖĞÜS, T.; BEKDIK, C. Technetium -99m-
 MIBI uptake in benign and malignant bone lesions: a comparative
 study with technetium-99m-MDP. *J. Nucl. Med.*, v. 33, p. 319-
 324, 1992.
- 29 - CARCAMO, E.C. *Introducción a la farmacocinética*. Washington,
 U.S.A., Secretaria General de la Organización de los Estados
 Americanos, 1982.
- 30 - CARDE, P.; PFREUNDSCHÜH, M.; DA COSTA, L.; MANIL, L.;
 LUMBROSO, I.D.; CAILLOU, B.; PARMENTIER, C.;
 SACCAVINI, I.C.; DIEHL, V. Radiolabeled monoclonal
 antibodies against Reed-Sternberg cells for *in vivo* imaging of
 Hodgkin's disease by immunoscintigraphy. *Cancer Res.*, v. 117,
 p. 101-111, 1989.

- 31 - CESARONE, C.F.; SCOVASSI, A.I.; SCARABELLI, L. Depletion of adenosinediphosphateribosyl transferase activity in rat liver during exposure to N-2-acetylaminofluorene: effect of thiols. *Cancer Res.*, v. 48, p. 3581-3585, 1988.
- 32 - CHERNOFF, D.M.; STRICHARTZ, G.R.; PIWNICA-WORMS, D. Membrane potential determination in large unilamellar vesicles with hexakis (2-methoxyisobutylisonitrile)technetium (I). *Bioch. Biophys. Acta.*, v. 1147, p. 262-266, 1993.
- 33 - COTGREAVE, I.A.; GRAFSTRÖM, R.C.; MOLDEUS, P. Modulation of pneumotoxicity by cellular glutathione and precursors. *Bull Eur. Physiopathol. Respir.*, v. 22, p. 2635-2665, 1986.
- 34 - COTGREAVE, I.A. & MOLDEUS, P. Methodologies for the analysis of reduced and oxidized N-acetylcysteine in biological systems. *Biopharm. Drug Dispos.*, v. 8, p. 365-375, 1987.
- 35 - COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Neoplasia. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. *Robbins pathologic basis of disease*. Philadelphia, PA., W.B. Saunders Company, 5 ed., 1994, p. 241-303.

- 36 - DE FLORA, S. Detoxification of genotoxic compounds as a threshold mechanism limiting their carcinogenicity. *Toxicol. Pathol.*, v.12, p. 337-343, 1984.
- 37 - DE FLORA, S.; BENNICELLI, C.; ZANACCHI, P. *In vitro* effects of N-acetylcysteine on the mutagenicity of direct-acting compounds and procarcinogens. *Carcinogenesis* v. 5, p. 505-510, 1984.
- 38 - DE FLORA, S.; IZZOTTI, A.; D'AGOSTINI, F. Antioxidant activity and other mechanisms of thiols involved in chemoprevention of mutation and cancer. *Am. J. Med.*, v. 91, p. 122S-130S, 1991.
- 39 - DE FLORA, S.; IZZOTTI, A.; D'AGOSTINI, F. Chemopreventive properties of N-acetylcysteine and other thiols. In: WATTENBERG, L.; LIPKIN, W.; BOONE, C.W., (Eds.). *Cancer chemoprevention*. Boca Raton, Fla.: CRC, 1992, p. 183-194.
- 40 - DE VRIES, N. & DE FLORA, S. N- Acetyl-l-cysteine. *J. Cel. Biochem.*, v.17F (suppl.), p. 270-277; 1993.
- 41 - DEAN, R.T.; ADAMS, M.D.; MILLER, F.W.; ROBBINS, M.S.; WESTER, D.W.; WHITE, D.H. Synthesis, characterization and identification of the hexakis (trimethylphosphite) (Tc-99m)Technetium (I) cation as a myocardial imaging agent. *J. Nucl. Med.*, v. 25, p. 15, 1984 (Abstract).

- 42 - DECARO, L.; GHIZZI, A.; COSTA, R.; LONGO, A.; VENTRESCA, G.P. Pharmacokinetics and bioavailability of oral acetylcysteine in healthy volunteers. *Arzneimittel-Forschung*, v. 39, p. 382-386, 1989.
- 43 - DELMON-MOINGEON, L.I.; PIWNICA-WORMS, D.; VAN DEN ABLEELE, A.D. Uptake of cation hexakis (2-methoxy isobutyl isonitrile) technetium-99m by human carcinoma cell lines in vitro. *Cancer Res.*, v. 50, p. 2198-2202, 1990.
- 44 - DESAI, S.P. & YUILLE, D.L. Visualization of a recurrent carcinoid tumor and an occult distant metastasis by technetium-99m-Sestamibi. *J. Nucl. Med.*, vol. 34, p. 1748-1750, 1993.
- 45 - DEUTSCH, E.; GLAVAN, K.A.; FERGUSON, D.L.; LUKES, S.J.; NISHIYAMA H.; SODD, V.J. Development of a Tc-99m myocardial imaging agent to replace Tl-201. *J. Nucl. Med.*, v. 21, p. 56, 1980 (Abstract).
- 46 - DEUTSCH, E.; BUSHONG, W.; GLAVAN, K.A.; ELDER, R.C. Heart imaging with cationic complexes of technetium. *Science*, v. 214, p. 85-86, 1981.

- 47 - DEUTSCH, E.; LIBSON, K.; VANDERHEYDEN, J.L. The chemistry of rhenium and technetium as related to the use of isotopes of these elements in therapeutic and diagnostic nuclear medicine. *Nucl. Med. Biol.*, v. 13, p. 465-477, 1986.
- 48 - DEUTSCH, E. & HIRTH, W. In vivo inorganic chemistry of technetium cations. *J. Nucl. Med.*, v. 28, 1491-1500, 1987.
- 49 - DOELMAN, C.J.A. & BAST, A. Oxygen radicals in lung pathology. *Free Rad. Biol. Med.*, v. 9, p. 381-400, 1990.
- 50 - DU PONT PHARMA RADIOPHARMACEUTICALS - *Cardiolite*. Prescribing information and summary of preclinical studies. Massachussets, U.S.A., 1991.
- 51 - EARLE, W.R. A study of the Walker rat mammary carcinoma 256 in vivo and in vitro. *Am. J. Cancer*, v. 24, p. 566-612, 1935.
- 52 - FLANAGAN, R.J. The role of acetylcysteine in clinical toxicology. *Med. Toxicol.*, v. 2, p. 93-104, 1987.
- 53 - FLANAGAN, R.J.; MEREDITH, T.J. Use of N-acetylcysteine in clinical toxicology. *Am. J. Med.*, v. 91, p. 131-139, 1991.
- 54 - FRANK, H.; THIEL, D.; LANGER, K. Determination of N-acetyl-L-cysteine in biological fluids. *Journal of Chromatography*, v. 309, p. 261-267, 1984.

- 55 - FRONT, D.; BEN-HAIM, S.; ISRAEL, O.; EPELBAUM, R.; HAIM, N.; EVEN-SAPIR, E.; KOLODNY, G.M.; ROBINSON, E.
Lymphoma: Predictive value of Ga-67 scintigraphy after treatment.
Radiology, v. 182, p. 359-363, 1992.
- 56 - GANONG, W.F.- Introdução. In: GANONG, W.F. *Fisiologia médica*. São Paulo, S.P., Atheneu, 2 ed., 1973, p. 1-18.
- 57 - GARCIA, R.A.G. & STINAPUK, M. The splanchnic organs, liver and kidney have unique roles in the metabolism of sulfur amino acids and their metabolites in rats. *J. Nutr.*, v. 122, p. 1693-1701, 1992.
- 58 - GARCIA-RUIZ, C.; FERNANDEZ-CHECA, J.C.; KAPLOWITZ, N. Bidirectional mechanism of plasma membrane transport of reduced glutathione in intact rat hepatocytes and membrane vesicles. *J. Biol. Chem.*, v. 267, p. 22256-22264, 1992.
- 59 - GAY, W.I. *Methods of Animal Experimentation*. New York, N.Y.: Academic, 1965, v. 2., p. 185.
- 60 - GERSON, M.C.; DEUTSCH, E.A.; NISHIYAMA, H.; LIBSON, K.F.; ADOLPH, R.J.; GROSSMAN, L.W.; SODD, V.J.; FORTMAN, D.L.; VANDERHEYDEN, J.L.E.; WILLIAMS, C.C.; SAENGER, E.L. Myocardial perfusion imaging with ^{99m}Tc-DMPE in man. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 8, p. 371-374, 1983.

- 61 - GERSON, M.C.; DEUTSCH, E.; LIBSON, K.F.; ADOLPH, R.J.; KETRING, A.R.; VANDERHEYDEN, J.L.; WILLIAMS, C.C.; SAENGER, E.L. Myocardial scintigraphy with ^{99m}Tc-tris-DMPE in man. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 9, p. 403-407, 1984.
- 62 - GERUNDINI, P.; SAVI, A.; GILARDI, M.C.; MARGONATO, A.; VICEDOMINI, G.; ZECCA, L.; HIRTH, W.; LIBSON, K.; BHATHIA, J.C.; FAZIO, F.; DEUTSCH, E. Evaluation in dogs and humans of three potential technetium-99m myocardial perfusion agents. *J. Nucl. Med.*, v. 27, p. 409-416, 1986.
- 63 - GIBALDI, M.- Compartmental and noncompartmental pharmacokinetics. In: GIBALDI, M. *Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics*. Philadelphia, PA. Lea & Febiger, 4 ed., 1991, p. 1-16.
- 64 - GOMES, M.C.C. *Desnutrição protéico-calórica, desenvolvimento corporal e crescimento do carcinossarcoma de Walker 256: Alterações metabólicas e morfológicas em ratos jovens*. São Paulo, 1985. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Ciências Biomédicas, USP.
- 65 - GULLINO, P.M.; GRANTHAM, F.H. Studies on the exchange of fluids between host and tumor. II. The blood flow of hepatomas and other tumors in rats and mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 27, p. 1465, 1961.

- 66 - HAGAN, P.L.; HALPERN, S.E.; DILLMAN, R.O.; SHAWLER, D.L.; JOHNSON, D.E.; CHEN, A.; KRISHNAN, L.; FRINCKE, J.; BARTHOLOMEU, R.M.; DAVID, G.S.; CARLO, D. Tumor size: effect on monoclonal antibody uptake in tumor models. *J. Nucl. Med.*, v. 27, p. 422-427, 1986.
- 67 - HARPER, P.V.; BECK, R.; CHARLESTON, D.; LATHROP, K.A. Optimization of a scanning . *Nucleonics* , v. 22, p. 50-54, 1964.
- 68 - HASSAN, I.M.; SHAWAIT, A.; CONSTANTINIDES, C.; MOBARAK, A.L.; MAHMOUD, A.R.; NAIR, M.; OMAR, Y.T.; ABDEL-DAYEM, H.M. Tc-99m methoxy isobutyl isonitrile (MIBI) (RP-30) uptake in malignant tumors. *J. Nucl. Med.*, v. 29, p. A985, 1988 (Abstract).
- 69 - HASSAN, I.M.; SAHWEIT, A.; CONSTANTINIDES, C.; MAHMOUD, A.R.; NAIR, M.; OMAR, Y.T.; ABDEL-DAYEM, H.M. Uptake and kinetics of Tc-99m hexakis 2-methoxy isobutyl isonitrile in benign and malignant lesions in the lungs. *Clin. Nucl. Med.*, v. 14, p. 333-340, 1989.
- 70 - HAYES, R. The medical use of gallium radionuclides: a brief history with some comments. *Semin. Nucl. Med.*, v. 8, p. 183-191, 1978.
- 71 - HOLDINESS, M. R. - Clinical Pharmacokinetics of N-Acetylcysteine. *Clin. Pharmacokinet*, v. 20, p. 123-134, 1991.

- 72 - HOLMAN, B.L.; JONES, A.G.; LISTER-JAMES, J.; DAVISON, A.; ABRAMS, M.J.; KIRXHENBAUM, J.M.; TUMEH, S.S.; ENGLISH, R.J. A new Tc-99m-labelled myocardial imaging agent hexakis (t-butyl isonitrile)-technetium (I) (Tc-99m TBI): initial experience in the human. *J. Nucl. Med.*, v. 25, p. 1350-1355, 1984.
- 73 - HOLMAN, B.L.; CAMPBELL, C.A.; LISTER-JAMES, J.; JONES, A.G.; DAVISON, A.; KLONER, R.A. Effect of reperfusion and hyperemia on the myocardial distribution of technetium-99m t-butylisonitrile. *J. Nucl. Med.*, v. 27, p. 1172-1177, 1986 a.
- 74 - HOLMAN, B.L.; SPORN, V.; PEREZ-BALINO, N. Myocardial imaging with ^{99m}Tc CPI: initial experience in the human. *Nuklearmedizin*, v. 4, p. 46-49, 1986 b.
- 75 - HOLMAN, B.L.; SPORN, V.; JONES, A.G.; SIA, S.T.B.; BALINO, N.P.; DAVISON, A.; LISTER-JAMES, J.; KRONAUGE, J.F.; MITTA, A.E.A.; CAMIN, L.L.; CAMPBELL, S.; WILLIAMS, S.J.; CARPENTER A.T. Myocardial imaging with technetium 99m CPI: initial experience in the human. *J. Nucl. Med.*, v. 28, p. 13-18, 1987.

- 76 - HUNG, J.C.; WILSON, M.E.; BROWN, M.L.; GIBBONS, R.J.
Rapid preparation and quality control method for technetium-99m-
2-methoxy isobutyl isonitrile (technetium-99m-Sestamibi). *J.
Nucl. Med.*, v.312, p. 2162-2168, 1991.
- 77 - INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA)
*Preparation of 2-methoxyisobutylisocyanide and its cuprous
chelate (MIBI) - Development of new radiopharmaceuticals:
final report of a research co-ordination meeting organized by
the IAEA.* Vienna, IAEA, 1989.
- 78 - IZZOTI, A.; BAGNASCO, M.; D'AGOSTINI, F. Chemoprevention
of carcinogen-DNA adduct formation. In: PASTORINO, U.;
HONG, W.K. (Eds.) *Chemoimmunoprevention of cancer.*
Stuttgart, Alemanha. Thieme-Verlag, 1991, p. 15-19.
- 79 - JACOBSSON, H.; WALLIN, G.; WERNER, S.; LARSSON, S.A.
Technetium-99m methoxyisobutylisonitrile localizes an ectopic
ACTH-producing tumour: case report and review of the literature.
Eur. J. Nucl. Med., v. 21, p. 582-586, 1994.
- 80 - JAIN, R.K. Transport of molecules in the tumor interstitium: a
review. *Cancer Research*, v. 47, p. 3039-3051, 1987 a.
- 81 - JAIN, R.K. Transport of molecules across tumor vasculature. *Cancer
and Metastasis Reviews.*, vol. 6, p. 559-593, 1987 b.

- 82 - JAIN, R.K. - Barriers to drug delivery in solid tumors. *Scientific American*, v. 7, p. 58-65, 1994.
- 83 - JINNOUCHI, S.; HOSHI, H.; OHNISHI, T.; FUTAMIS, S.; NAGAMACHI, S.; WATANABE, K.; UEDA, T.; WAKISAKA, S. Thallium-201 SPECT for predicting histological types of meningiomas. *J. Nucl. Med.*, v. 34, p. 2091-2094, 1993.
- 84 - JONES, A.G.; ABRAMS, M.J.; DAVISON, A. Biological studies of a new class of technetium complexes: the hexakis (alkylisonitrile) technetium (I) cations. *Int. J. Nucl. Med. Biol.*, v. 11, p. 225-234, 1984.
- 85 - KAO, C.H.; YANG, M.D.; WANG, S.J.; LIU, T.J.; YEH, S.H. The Tc-99m MIBI scintigraphy in the evaluation of mass abnormalities of the breast. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 20, p. 979, 1993 a (Abstract).
- 86 - KAO, C.H.; WANG, S.J.; LIN, W.Y.; HSU, C.Y.; LIAO, S.Q.; YEH, S.H. - Differentiation of single solid lesions in the lungs by means of single-photon emission tomography with technetium-99m methoxyisobutylisonitrile. *Eur. J. Nucl. Med.* 20:249-254, 1993b.
- 87 - KAO, C.H.; WANG, S.J.; YEH, S.H. - Tc-99m MIBI uptake in breast carcinoma and axillary lymph node metastases. *Clin. Nucl. Med.*, v. 19, p. 898-900, 1994.

- 88 - KAPLAN, W.D.; JOCHELSON, M.S.; HERMAN, T.S.; NADLER, L.M.; STOMPER, P.C.; TAKVORIAN, T.; ANDERSEN, J.W.; CANELLOS, G.P. Gallium-67 imaging: a predictor or residual tumor viability and clinical outcome in patients with diffuse large-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, v. 8, p. 1966-1970, 1990.
- 89 - KELLOFF, G.J.; BOONE, C.W.; STEELE, V.K.; PERLOFF, M.; CROWELL, J.; DOODY, L.A. Development of chemopreventive agents for lung and upper aerodigestive tract cancers. *J. Cel. Biochem.* v. 17F (suppl.), p. 2-17, 1993.
- 90 - KITAPCI, M.T.; TASTEKIN, G.; TURGUT, M.; CANER, B.; KARS, A.; BARISTA, I.; BEKDIK, C. Preoperative localization of parathyroid carcinoma using Tc-99m MIBI. *Clin. Nucl. Med.*, v. 18, p. 217-218, 1993.
- 91 - LARA, P.F. Farmacocinética. In: ZANINI, A.C. & OGA, S. (Eds.). *Farmacologia aplicada. São Paulo, S.P.*, Editora Atheneu, 1985. p. 35-45.
- 92 - LEBOWITZ, E.; GREENE, M.W.; FAIRCHILD, R.; BRADLEY-MOORE, P.R.; ATKINS, H.L.; ANSARI, A.N.; RICHARDS, P.; BELGRAVE, E. Thallium-201 for medical use. *I. J. Nucl. Med.*, v. 16, p. 151-155, 1975.
- 93 - LEE, H.B. & BLAUFOX, M.D. Blood volume in rat. *I. Nucl. Med.*, v. 26, p.72-6, 1985.

- 94 - LEME, P.R. Estudos dos compartimentos biológicos. In: ROCHA, A.F.G. & HERBERT, I.C. (Eds.) - *Medicina Nuclear Bases*. Rio de Janeiro, R.J., Guanabara Koogan, 1979, p. 64-76.
- 95 - LEWIS, P.A.; WOODWARD, A.J.; MADDOCK, J. High-performance liquid chromatographic assay for N-acetylcysteine in plasma and urine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 73, p. 996-997, 1984.
- 96 - LIN, Y.A. *Carcinoma de Walker: Cultivo e estudo comparativo da cinética de crescimento, antigenicidade, tumorigenicidade e citotoxicidade*. São Paulo, 1991. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina da USP.
- 97 - LOCKO, R.C.; PETROZZO, P.J. Nuclear medicine in HIV- related disease - an update. In: FREEMAN, L.M., (Ed.). *Nuclear medicine annual*, New York, N.Y.: Raven Press, 1993, p. 77-121.
- 98 - LU, G.; SHIH, S.J.; XIU, J.Y. Technetium-99m MIBI uptake in recurrent parathyroid carcinoma and brown tumors. *J. Nucl. Med.*, v. 36, p. 811-813, 1995.
- 99 - MADDOCK, J. Biological Properties of Acetylcysteine: Assay development and pharmacokinetic studies. *Eur. J. Respir. Dis.*, v. 61 (suppl.), n. 111, p. 52-58, 1980.

- 100 - MAFFIOLI, L.; STEENS, J.; PAUWELS, E.; BOMBARDIERI, E.
Applications of ^{99m}Tc -Sestamibi in oncology. *Tumori*, v. 82, p.
12-21, 1996.
- 101 - MAHADEVAN, V. & HART, I.R. - Metastasis and angiogenesis.
Acta Oncol., v. 29, p. 97-103, 1990.
- 102 - MARLISS, E.B. An overview of amino acid metabolism. In:
GREENE, H.L.; HOLLIDAY, M.A.; MUNRO, H.N. (Eds.)
Clinical nutrition update. *Amino acids*. Chicago, USA. American
Medical Association, 1977, p. 34-45.
- 103 - MATTOS, M.C.F.I. *Carcinossarcoma de Walker 256 do rato*. São
Paulo, 1973. Tese (Doutorado)- Fac. Ciências Médica e Biológica
de Botucatu.
- 104 - MAUBLANT, J.C.; ZHANG, Z.; RAPP, M.; OLLIER, M.;
MICHELOT, J.; VEYRE, A. In vitro uptake of Technetium-99-
Teboroxime in carcinoma cell lines and normal cells: comparison
with Technetium-99m-Sestamibi and Thallium-201. *J. Nucl.*
Med., v. 34, p.1949-1952, 1993.
- 105 - MEISTER, A.; ANDERSON, M. Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.*,
v. 52, p. 711-760, 1983.

- 106 - MESQUITA, C.H. *Modelo para determinação da absorção de substâncias radioativas- Aplicação em radiodosimetria e nutrição*. São Paulo, 1991. Tese (Doutorado) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/ CNEN - USP.
- 107 - MEYERS, R.L. Studies on tumor antigens of the Walker 256 carcinosarcoma. *Immunochemistry*, v. 12, p.589-595, 1975.
- 108 - MILLER, L.F. & RUMACK, B.H. Clinical safety of high oral doses of acetylcysteine. *Semin. Oncol.*, v. 10, p. 76-85, 1983.
- 109 - MITCHELL, J.R.; THORGEIRSSON, S.S.; POTTER, W.Z. Acetaminophen-induced hepatic injury: protective role of glutathione in man and rationale for therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.*, v. 16, p. 676-684, 1974.
- 110 - MITTA, A.E.A. La Radiofarmacia y la Medicina Nuclear. In: (SARF) Sociedade Argentina de Radiofarmacia. *Radiofarmacia*. Tucuman, Argentina, 1995, p. 7-30.
- 111 - MOLDÉUS, P.; COTGREAVE, I.A.; BERGGREN, M. Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine. *Respiration*, v. 50, p. 31-43, 1986.
- 112 - MOUSA, S.A.; MAINA, M.; BROWN, B.A.; WILLIAMS, S.J. Studies on the mechanism of retention of RP-30 in the heart. *Nuklearmedizin*, v. 26, p. 76, 1987 a (Abstract).

- 113 - MOUSA, S.A.; WILLIAMS, S.J.; SANDS, H. Characterization of in vivo chemistry of cations in the heart. *J. Nucl. Med.*, v. 28, p. 1351-1357, 1987 b.
- 114 - MUELLER, S.T.; GUTH-TOUGELIDES, B.; CREUTZIG, H. Imaging of malignant tumors with Tc-99m-MIBI SPECT. *J. Nucl. Med.*, v. 28, p. A562, 1987 (Abstract).
- 115 - MUELLER, S.P.; REINERS, C.; PAAS, M.; GUTH-TOUGELIDIS, B.; BUDACH, V.; KONIETZKO, N.; ALBERTI, W. Tc-99m MIBI and Tl-201 uptake in bronchial carcinoma. *J. Nucl. Med.*, v. 30, p. A845, 1989 (Abstract).
- 116 - MURPHY, C.A. *El tecnecio en la Medicina Nuclear*. México, México. Sociedade Mexicana de Medicina Nuclear, p.311-313, 1985.
- 117 - MURPHY, C.A. *Manual de Radiofarmacocinética*. México, México. Sociedade Mexicana de Medicina Nuclear, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, 1992.

- 118 - NISHIYAMA, H.; DEUTSCH, E.; ADOLPH, R.J.; SODD, V.J.; LIBSON, K.; SAENGER, E.L.; GERSON, M.C.; GABEL, M.; LUKES, S.J.; VANDERHEYDEN, J.L.; FORTMAN, D.L.; SCHOLS, K.L.; GROSSMAN, L.W.; WILLIAMS, C.C. Basic kinetic studies of Tc-99m DMPE as a myocardial imaging agent in the dog. *J. Nucl. Med.*, v. 23, p. 1093-1101, 1982.
- 119 - O'DRISCOLL, C.M.; BAKER, F.; CASEY, M.J.; DUFFY, G.J. Localization of recurrent medullary thyroid carcinoma with technetium-99m-methoxyisobutyl nitrile scintigraphy: a case report. *J. Nucl. Med.*, v. 32, p. 2281-2283, 1991.
- 120 - OGIHARA, I.; KOJIMA, S.; JAY, M. Differential uptake of gallium-67-labeled liposomes between tumors and inflammatory lesions in rats. *J. Nucl. Med.*, v. 27, p. 1300-1307, 1986.
- 121 - OKADA, R.D.; GROVER, D.; GAFFNEY, T.B.S.; WILLIAMS, S. Myocardial kinetics of technetium-99m hexakis-2-methoxy-2-methylpropyl isonitrile. *Circulation*, v. 77, p. 491-498, 1988.
- 122 - OLSSON, B.; JOHANSSON, M.; GABRIELSSON, J.; BOLME, P. Pharmacokinetics and bioavailability of reduced and oxidized N-acetylcysteine. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, v. 34, p. 77-82, 1988.

- 123 - OWUNWANNE, A.; PATEL, M.; SADEK, S. Quality control of radiopharmaceuticals. In: OWUNWANNE, A.; PATEL, M.; SADEK, S. *The handbook of Radiopharmaceuticals*. London, U.K. CHAPMAN & HALL MEDICAL, 1995a, p. 18-22.
- 124 - OWUNWANNE, A.; PATEL, M.; SADEK, S. Basic aspects of radiopharmaceuticals. In: OWUNWANNE, A.; PATEL, M.; SADEK, S. *The handbook of Radiopharmaceuticals*. London, U.K. CHAPMAN & HALL MEDICAL, 1995b, p. 57-99.
- 125 - OZKER, K.; URGANCIOGLU, I.; SUNGUR, A.; AMAC, A.; HOSKAN, N.; ARDAGIL, N. ^{99m}Tc -Cysteine: Labelling, control and radiochemical evaluation. *Appl. Radiat. Isot.*, v. 43, p. 1517-1518, 1992.
- 126 - PACKARD, A.B.; KRONAUGE, J.F.; WEN, P.; DAY, P.J.; JONES, A.G. Uptake of Tc-99m-Sestamibi by stereotactically implanted 9L gliosarcoma tumor in the rat. *J. Labelled Comp. Radiophar.*, v. 35, p. 17-18, 1994.
- 127 - PATEL, K.R.; TIN, G.W.; WILLIAMS, L.E.; BALDESCHWIELER, J.D. Biodistribution of phospholipid vesicles in mice bearing Lewis lung carcinoma and granuloma. *J. Nucl. Med.* v. 26, p. 1048-1055, 1985.

- 128 - PEASTON, M.J.T. Protein and amino acid metabolism - response to injury. In: LEE, H.A. (Ed.), *Parenteral nutrition in acute metabolic illness*. New York, N.Y. Academic Press, 1974, p. 139.
- 129 - PHILBEN, V.J.; JAKOWATZ, J.G.; BEATTY, B.G. The effect of tumor CEA content and tumor size on tissue uptake of indium 111-labeled anti-CEA monoclonal antibody. *Cancer*, v. 57, p. 571-576, 1986.
- 130 - PICARD, M. E COL. - *APUD* DU PONT PHARMA
RADIOPHARMACEUTICALS - *Cardiolite*. Prescribing information and summary of preclinical studies. Massachussets, U.S.A., 1991.
- 131 - PIRIE, N.W. & HELE, T.S. CCXXXIII. Studies in the sulphur metabolism of the dog. XII. The preparation and metabolism of d-Acetylcysteine. *Biochem*, p. 1716-1718, 1933.
- 132 - PIWNICA-WORMS, D.; KRONAUGE, J.F.; HOLMAN, B.L.; LISTER-JAMES, J.; DAVISON, A.; JONES, A.G. Hexakis (carbomethoxyisopropylisonitrile) technetium (I), a new myocardial perfusion imaging agent: binding characteristics in cultured chick heart cells. *J. Nucl. Med.*, v. 29, p. 55-61, 1988.
- 133 - PIWNICA-WORMS, D.; HOLMAN, B.L. Noncardiac applications of hexakis-(alkylisonitrile) technetium-99m complexes. *J. Nucl. Med.*, v. 31, p. 1166-1167, 1990 a..

- 134 - PIWNICA-WORMS, D.; KRONAUGE, J.F.; DELMON, L.; HOLMAN, B.L.; MARSH, J.D.; JONES, A.G. Effect of metabolic inhibition on technetium-99m MIBI kinetics in cultured chick myocardial cells. *J. Nucl. Med.*, v. 31, p. 464-472, 1990 b.
- 135 - PIWNICA-WORMS, D.; CHIU, M.L.; KRONAUGE, J.F. Divergent kinetics of ^{201}Tl and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi in cultured chick ventricular myocytes during ATP depletion. *Circulation*, v. 85, p. 1531-1541, 1992.
- 136 - PRESCOTT, L.F. & CRITCHLEY, J.A..J.H. The treatment of acetaminophen poisoning. *Ann. Rev. of Pharmacol. Toxicol.* v. 23, p. 87-101, 1983.
- 137 - PROUXL, A.; BALLINGER, J.R.; GULENCHYN, K.Y. Routine determination of radiochemical purity of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI. *Appl. Radiat. Isot.*, vol. 40, p. 95-97, 1989.
- 138 - RICHARDS, P.; STEIGMAN, J. Chemistry of technetium as applied to radiopharmaceuticals. In: SUBRAMANIAN, G.; RHODES, B.A.; COOPER, J.F.; SODD, V.J. (Eds.). *Radiopharmaceuticals*. New York, N.Y. The Society of Nuclear Medicine, 1975, p. 23-25.

- 139 - ROCHA, A.F.G. Estudos dos compartimentos biológicos. In: ROCHA, A.F.G. *Medicina Nuclear*. Rio de Janeiro, R.J.: Guanabara Koogan, 1976, p. 215-219.
- 140 - RODENSTEIN D.; DE COSTER A.; GAZZANIZA A.
Pharmacokinetics of oral acetylcysteine: Absorption, binding and metabolism in patients with respiratory disorders. *Clin. Pharmacokinet.*, v. 3, p. 247-254, 1978.
- 141 - ROWLAND, M.; TOZER, T.N. Intravenous Dose. In: ROWLAND, M.; TOZER, T.N. *Clinical Pharmacokinetics Concepts and Applications*. Philadelphia, PA.: Williams & Wilkins, 3 ed., 1995, p. 17-31.
- 142 - SAHA, G.B. Radiopharmaceuticals and methods of radiolabelling. in: SAHA, G.B. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. New York, N.Y.: Springer-Verlag, 3 ed., 1992 a, p. 80-107.
- 143 - SAHA, G.B. Quality control of radiopharmaceuticals. In: SAHA, G.B. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. New York, N.Y.: Springer-Verlag, 3 ed., 1992 b, p. 143-167.
- 144 - SAHA, G.B. Tumor imaging. In: SAHA, G.B. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. New York, N.Y.: Springer-Verlag, 3 ed., 1992 c, p. 290.

- 145 - SAHA, G.B.; GO, R.T.; MACINTYRE, W.J. Radiopharmaceuticals for cardiovascular imaging. *Nucl. Med. Biol.*, v. 19, p. 1-20, 1992.
- 146 - SANDS, H.; DELANO, M.L.; CAMIN, L.L. Comparison of the transport of $^{42}\text{K}^+$, $^{24}\text{Na}^+$, ^{201}Tl , and $(^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{DMPE})_2\text{Cl}_2)$ using human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 812, p. 665-670, 1985.
- 147 - SANDS, H.; DELANO, M.L.; GALLAGHER, B.M. Uptake of hexakis (t-butylisonitrile) technetium (I) and hexakis (isopropylisonitrile) technetium (I) by neonatal rat and human erythrocytes. *J. Nucl. Med.*, v. 27, p. 404-408, 1986.
- 148 - SAVI, A.; GERUNDINI, P.; ZOLI, P.; MAFFIOLI, L.; COMPIERCHIO, A.; COLOMBO, F.; MATARRESE, M.; DEUTSCH, E. Biodistribution of Tc-99m methoxy-isobutyl-isonitrile (MIBI) in humans. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 15, p. 597-600, 1989.
- 149 - SCHOBER, O.; MEYER, G.J.; BAAB, M.R.; DIETZ, H.; HUNDESHAGEN, H. Multiparameter studies in brain tumors by PET. *J. Nucl. Med.*, v. 29, p. 85, 1988 (Abstract).

- 150 - SCOPINARO, F.; SCHILLACI, O.; SCARPIN, M.; MINGAZZINI, P.L.; MACIO, L.; BANCI, M.; DANIELI, R.; ZERILLI, M.; LIMITI, M.R.; COLELLA, A.C. Technetium-99m sestamibi: an indicator of breast cancer invasiveness. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 21, p. 984-987, 1994.
- 151 - SCOTT, A.M.; KOSTAKOGLU, L.; O'BRIEN, J.P.; STRAUS, D.J.; ABDEL-DAY, H.M.; LARSON, S.M. Comparison of technetium-99m-MIBI and thallium-201-chloride uptake in primary thyroid lymphoma. *J. Nucl. Med.*, v. 33, p. 1396-1398, 1992.
- 152 - SHEFFNER, A.L.; MEDLER, E.M.; BAILEY, K.R.; GALLO, D.G.; MUELLER, A.J.; SHARETT, H.P. Metabolic studies with acetylcysteine. *Biochem. Pharmacol.*, v.15, p. 1523-1535, 1966.
- 153 - SRIVASTANA, S.C. & RICHARDS, P. Technetium labeled compounds. In: RAYUDU, G.V.S. (Ed.) *Radiotracers for medical applications*. Boca Raton, Fl., CRC., 1983, p. 107-186.
- 154 - STROUSE, P.J. & WANG, D.C. Incidental detection of bronchogenic carcinoma during Tc-99m SESTAMIBI cardiac imaging. *Clin. Nucl. Med.*, v. 18, p. 448-449, 1993.
- 155 - SUBRAMANIAN, G.; SINGH, M.V.; CHANDER, J.; SINGH, B. ^{99m}Tc- Sn-Acetylcysteine: A new renal scanning agent. *Eur. J. Nucl. Med.* v. 1, p. 243-245, 1976.

156 - SUTTER, C.W.; JOSHI, M.J.; STADALNIK, R.C. Noncardiac uptake of technetium-99m MIBI. *Sem. Nucl. Med.*, v. 24, p. 84-86, 1994.

157 - TAKEDA, A.; HIBINO, T.; OKADA, S. Intensification of tumor affinity of ^{99m}Tc-DL-Homocysteine by cooperative use of SH-containing compounds. *Nucl. Med. Biol.*, vol. 16, p. 581-585, 1989a.

158 - TAKEDA, A. & OKADA, S. Chemical form of tumor-tropic ^{99m}Tc-DL-Homocysteine. *Appl. Radiat. Isot.*, vol. 40, p. 565-568, 1989b.

159 - TAKEDA, A.; HIBINO, T.; HOSHINO, A.; OKADA, S.- Tumor accumulation mechanism of ^{99m}Tc-DL-homocysteine, a model compound for the development of tumor-imaging radiopharmaceuticals. *Nucl. Med. Biol.*, vol. 17, p. 751-755, 1990.

160 - TALALAY, P.; TAKANO, G.M.V.; HUGGINS, C. Studies on the Walker tumor: Standardization of the growth of transplantable tumor. *Cancer Research*, v. 12, p. 834-837, 1952.

161 - TAMEMASA, O.; GOTO, R.; TAKEDA, A.; YANO, M. ^{99m}Tc-DL-homocysteine, a potential tumor imaging agent. *Radioisotopes*, v. 33, p.636, 1984 a.

- 162 - TAMEMASA, O.; TAKEDA, A., GOTO, R. Tumor detection with some ^{99m}Tc -labeled S-containing amino acids. *GANN*, v. 75, p. 395, 1984 b.
- 163 - TEDESCHI, M.; BOHM, S.; DIRE, F. Glutathione and detoxification. *Cancer Treat Rev.*, v. 17, p. 203-208, 1990.
- 164 - TEE, L.B.G.; BOOBIS, A.R.; DAVIES, D.S. N-acetylcysteine for paracetamol overdose. *Lancet*, v.1, p. 331-332, 1986.
- 165 - TURNBULL, L.B.; TENG, L.; KINZIE, J.M. Excretion and biotransformation of carboxymethyl-cysteine in rat, dog, monkey and man. *Xenobiotica*, v. 8, p. 621-628, 1978.
- 166 - VAN ZANDWIJK, N.; PASTORINO, U.; DE VRIES, N. Euroscan: the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC): chemoprevention study in lung cancer. *Lung Cancer*, v. 9, p. 351-365, 1993.
- 167 - VANDERHEYDEN, J.L.; HEEG, M.J.; DEUTSCH, E. Comparison of the chemical and biological properties of *trans*- $[\text{Tc}(\text{DMPE})_2\text{Cl}_2]^+$ and *trans*- $[\text{Re}(\text{DMPE})_2\text{Cl}_2]^+$, where DMPE = 1,2-bis(dimethylphosphino)ethane. Single cristal structural analysis of *trans*- $[\text{Re}(\text{DMPE})_2\text{Cl}_2]\text{PF}_6$. *Inorg. Chem*, v. 23, p. 1666-1673, 1986.

- 168 - VANHAGEN, P.; KRENNING, E.; REUBI, J.; MULDER, A.;
BAKKER, W.; OEI, H.; LÖWENBERG, G.; LAMBERT, S.
Somatostatin analogues scintigraphy of malignant lymphomas. *Br.
J. Haematol.*, v. 83, p. 75-79, 1993.
- 169 - VERTOSICK, F.T. Jr.; SELKER, R.G.; GROSSMAN, S.J.; JOYCE,
J.M. Correlation of thallium-201 single photon emission computed
tomography and survival after treatment failure in patients with
glioblastoma multiforme. *Neurosurgery*, v. 34, p. 396-401, 1994.
- 170 - VILLALOBOS, J.P. - *Estudo da cinética do pertecnetato nas
glândulas parótida e submandibulares, em indivíduos normais.*
São Paulo, 1981. Dissertação (Mestrado), Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares/CNEN - USP.
- 171 - WACKERS, F.J.T.; BERMAN, D.S.; MADDAHI, J.; WATSON,
D.D.; BELLER, G.A.; STRAUSS, W.; BOUCHER, C.A.;
PICARD, M.; HOLMAN, B.L.; FRIDRICH, R.; INGLESE, E.;
DELALOYE, B.; DELALOYE, A.B.; CAMIN, L.; McKUSICK,
K. Technetium-99m hexakis 2-methoxyisobutyl isonitrile: human
biodistribution, dosimetry, safety and preliminary comparison to
thallium-201 for myocardial perfusion imaging. *J. Nucl. Med.*, v.
30, p. 301-311, 1989.

- 172 - WAITZBERG, D.L. *Repercussão de diferentes situações nutricionais sobre o crescimento tumoral, a composição corpórea e a resposta cutânea de hipersensibilidade tardia. Estudo experimental.* São Paulo, 1986. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina da USP.
- 173 - WEBB, W.R. Clinical evaluation of a new mucolytic agent acetylcysteine. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, v. 44, p. 330-343, 1962.
- 174 - WEBER, D.A.; FRANCESCHI, D.; IVANOVIC, M.; FRANCESCHI, M.; ATKINS, H.; CODERRE, J.A.; POPENCE, E.; CONTI, N.; STRAND, S.E.; BUTTON, T. Comparative uptake properties of Tl-201, Tc-99m HMPAO, - MIBI, -DTBA, and I-123 IMT in primary brain tumor. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 20, p. A838, 1993 (Abstract).
- 175 - WEINSTEIN, I.B. Cancer prevention: recent progress and future opportunities- *Cancer Res.* v. 51 (suppl.), p. 50805-50855, 1991.
- 176 - WESTER, D.W.; NOSCO, D.L.; COVENEY J.R.; DEAN, R.Y.; GERUNDINI, P.; ZECCA, L.; SAVI, A.; FAZIO, F. - New Technetium-99m myocardial agent with low plasma binding and fast blood clearance. *J. Nuc. Med.*, v. 27, p. 894, 1986 (Abstract).

- 177 - WILLIAMS, L.E.; DUDA, R.B.; PROFFITT, R.T.; BEATTY, B.G.;
BEATTY, J.D.; WONG, J.Y.C.; SHIVELY, J.E.; PAXTON, R.J.
Tumor uptake as a function of tumor mass: a mathematic model. *J. Nucl. Med.*, v. 29, p. 103-109, 1988.
- 178 - WOLF, W. Radiochemistry. In: TUBIS, M. & WOLF, W. (Eds.)
Radiopharmacy. New York., N.Y., John Wiley & Sons 1976, p.
217.
- 179 - WYK, A.J.V.; ASWEGEN, A.; KNOESEN, O.; FOURIE, P.J.;
KOEKEMOER, J.; C.P.; HERBST, C.P.; OTTO, A.C.;
LOTTER, M.G. Synthesis and ^{99m}Tc labelling of MMI (MIBI)
and its ethyl analogue EMI. *Appl. Radiat. Isot.*, v. 42, p. 687-
689, 1991.
- 180 - YARBRO, J.W. N-acetylcysteine (NAC): A significant
chemoprotective adjunct. Proceedings of a symposium. *Semin.
Oncol.* v. 10 (suppl. A), p. 1-92, 1983.
- 181 - YEN, T.C.; LIN, H.D.; LEE, C.H.; CHANG, S.L.; YEH, S.H. The
role of technetium-99m sestamibi whole-body scans in diagnosing
metastatic Hürthle cell carcinoma of the thyroid gland after total
thyroidectomy: a comparison with iodine-131 and thallium-201
whole-body scans. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 21, p. 980-983, 1994.

182 - ZNBOUA, B.; DJOKIC, D.; BOGDANOVA, V.; TADZER, I.;

ADJINOVIC, B.; RASTOVAC, M. Synthesis of p-amino hippuric acid analog and its labeling by technetium-99m. *Int. J. Radiat.*

Appl. Instrum., Part A: Appl. Radiat. Isot., vol. 40, p. 225-234, 1989.