



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**MARCAÇÃO DE ANÁLOGO DA TIMIDINA COM COMPLEXO
ORGANOMETÁLICO DE TECNÉCIO-99m PARA
DIAGNÓSTICO DE CÂNCER: AVALIAÇÃO
RADIOQUÍMICA E BIOLÓGICA**

RODRIGO LUIS SILVA RIBEIRO SANTOS

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

Orientadora:
Dra. Bluma Linkowski Faintuch

**São Paulo
2007**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**MARCAÇÃO DE ANÁLOGO DA TIMIDINA COM COMPLEXO
ORGANOMETÁLICO DE TECNÉCIO-99m PARA DIAGNÓSTICO DE
CÂNCER: AVALIAÇÃO RADIOQUÍMICA E BIOLÓGICA**

RODRIGO LUIS SILVA RIBEIRO SANTOS



Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações.

**Orientador:
Dra. Bluma Linkowski Faintuch**

SÃO PAULO

2007

À minha mãe, Maria de Lourdes da Silva,
e minha avó, Tereza Rocha da Silva (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço, inicialmente, ao superintendente do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN-SP e ao M.Sc. Jair Mengatti, gerente do Centro de Radiofarmácia, pela oportunidade de desenvolver este estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Brasil, por ter concedido o apoio financeiro (bolsa de mestrado) para realização do presente trabalho.

À minha orientadora e agora, amiga, Dra. Bluma Linkowski Faintuch, por me aceitar como seu aluno e, principalmente, por me ajudar nos momentos difíceis no decorrer deste estágio.

Ao Dr. Roger Schibli, do Centro de Radiofarmácia do Paul Scherrer Institute (Suíça), pela doação da biomolécula, proporcionando, assim, a execução desta pesquisa.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por colaborar no desenvolvimento de modelos tumorais utilizados neste trabalho.

A todos os colegas, funcionários, técnicos e, em especial, à Dra. Emiko Muramoto, que direta ou indiretamente, auxiliaram em algumas das etapas experimentais.

Ao amigo, Rodrigo Teodoro, por ser cúmplice de boa parte das experiências executadas nos laboratórios.

À grande amiga, Prof^a. Karin Juliana de Meira Grava Simioni e ao Prof. Luiz Antonio A. L. Pinheiro, por ter auxiliado na revisão desta dissertação,

E meu sincero apreço ao amigo e companheiro, Ronaldo Lopes Santos, pela sua eterna paciência e respeito durante toda a realização deste Mestrado.

É um paradoxo a Terra se mover ao redor do Sol e a água ser constituída por dois gases altamente inflamáveis. A verdade científica é sempre um paradoxo, se julgada pela experiência cotidiana que se agarra à aparência efêmera das coisas.

Karl Marx

"Eu desejo conhecer os
pensamentos de Deus... o resto
são detalhes"
Albert Einstein

**MARCAÇÃO DE ANÁLOGO DA TIMIDINA COM COMPLEXO
ORGANOMETÁLICO DE TECNÉCIO-99m PARA DIAGNÓSTICO DE CÂNCER:
AVALIAÇÃO RADIOQUÍMICA E BIOLÓGICA**

Rodrigo Luis Silva Ribeiro Santos

RESUMO

Análogos da timidina têm sido marcados com diferentes radioisótopos devido ao seu potencial em monitorar a proliferação incontrolável de células. Considerando que o radioisótopo tecnécio-99m mantém ainda uma posição privilegiada devido às suas propriedades químicas e nucleares, este trabalho constituiu-se do desenvolvimento de uma nova técnica de marcação da timidina com o ^{99m}Tc , mediante o emprego de complexos organometálicos. Os objetivos do trabalho foram: a síntese do complexo organometálico carbonil-tecnécio-99m; marcação da timidina com este complexo precursor; avaliação da estabilidade; e avaliações radioquímicas e biológicas com animais sadios e portadores de tumor. A preparação do complexo precursor, utilizando o gás CO foi de fácil execução, assim como a marcação da timidina com este precursor, obtendo-se uma pureza radioquímica $\geq 97\%$ e $\geq 94\%$, respectivamente. Sistemas cromatográficos com bons níveis de confiabilidade foram utilizados, podendo qualificar e quantificar as espécies radioquímicas. O resultado do estudo *in vitro* da lipofilicidade revelou que a timidina radiomarcada é hidrofílica, com um coeficiente de partição (log P) de -1,48. O complexo precursor e a timidina radiomarcada apresentaram boa estabilidade radioquímica em até 6 h em temperatura ambiente. A estabilidade com soluções de cisteína e histidina apresentaram perdas entre oito e onze pontos percentuais para concentrações de até 300 mM. Os ensaios de biodistribuição em camundongos sadios indicaram que a timidina radiomarcada apresentou uma rápida depuração sangüínea e baixa captação nos demais órgãos, com predominância de excreção da droga pelo sistema urinário e hepatobiliar. A captação tumoral foi baixa, apresentando valores de 0,28 e 0,18 %DI/g para tumor de pulmão e mama, respectivamente. Os resultados obtidos sugerem mais investigações em outros modelos tumorais ou a modificação da estrutura da molécula orgânica que atua como ligante.

**LABELING OF THYMIDINE ANALOG WITH AN ORGANOMETALLIC
COMPLEX OF TECHNETIUM-99M FOR DIAGNOSTIC OF CANCER:
RADIOCHEMICAL AND BIOLOGICAL EVALUATION**

Rodrigo Luis Silva Ribeiro Santos

ABSTRACT

Thymidine analogs have been labeled with different radioisotopes due to their potential in monitoring the uncontrollable cell proliferation. Considering that the radioisotopes technetium-99m still keep a privileged position as a marker due to its chemical and nuclear properties, this dissertation was constituted by the developed of a new technique of labeling of thymidine analog with ^{99m}Tc , by means of the organometallic complex. The aims of this research were: synthesis of the organometallic complex technetium-99m-carbonyl, thymidine labeling with this precursor, evaluation of stability, and radiochemical e biological evaluation with healthy and tumor-bearing animals. The preparation of the organometallic precursor, using the CO gas, was easily achieved, as well as the labeling of thymidine with this precursor, resulting itself a radiochemical pureness of $\geq 97\%$ and $\geq 94\%$, respectively. Chromatography systems with good levels of trustworthiness were used, ensuring the qualification and quantification of the radiochemical samples. The result of *in vitro* testing of lipophilicity disclosed that the radiolabeled complex is hydrophilic, with a partition coefficient (log P) of -1.48. The precursor complex and the radiolabeled have good radiochemical stability up to 6 h in room temperature. The cysteine and histidine challenge indicated losses between 8 and 11% for concentrations until 300 mM. The biodistribution assay in healthy mice revealed rapid blood clearance and low uptake by general organs with renal and hepatobiliary excretion. The tumor concentration was low with values of 0.28 and 0.18 %ID/g for lung and breast cancer, respectively. The results imply more studies in other tumor models or the modification of the structure of the organic molecule that act like ligand.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%DI	- porcentagem de dose injetada;
β -CFT	- neurotransmissor: 3 β -(4-fluor-fenil)-tropano;
5-HT _{1A}	- tipo de ligante serotoninérgico;
A549	- tipo de linhagem de células de tumor pulmonar;
BAIB	- ácido β -amino-isobutilico;
BFCA	- do inglês <i>bifunctional chelating agent</i> , agente quelante bifuncional;
Bq	- unidade de atividade, Becquerel;
BUIB	- ácido β -ureidoisobutilico;
CA20948	- tipo de linhagem de células de tumor pancreático;
Ci	- unidade de atividade, Curie;
cpm	- contagem por minuto;
CR	- Centro de Radiofarmácia;
DMBA	- 9,10-dimetil-1,2-benzenoantraceno;
DNA	- ácido desoxirribonucléico;
dTDP	- 5-desoxitimidina-difosfato;
dTMP	- 5-desoxitimidina-monofosfato;
dTTP	- 5-desoxitimidina-trifosfato;
<i>fac</i>	- geometria facial;
FAU	-análogo da timidina 1-(2-desoxi-2-fluor- β -D-arabinofuranosil)-uracil;
FDG	- 2-fluor-2-desoxi-D-glicose
FLT	- análogo da timidina 3-desoxi-3-fluor-timidina;
FMAU	- análogo da timidina 1-(2-desoxi-2-fluor- β -D-arabinofuranosil)-timina;
FMUSP	- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo;
GRP	- do inglês <i>gastrin releasing peptide</i> , peptídeo liberador de gastrina;
HPLC	- do inglês <i>High Performance Liquid Chromatograph</i> , Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
HYNIC	- ácido 6-hidrazinonicotinamida;

IDA	- do inglês <i>imino diacetic acid</i> , ácido aminodiacético;
IPEN/CNEN-SP:	- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/Comissão Nacional de Energia Nuclear – São Paulo;
ITLC-SG	- do inglês <i>Instant Thin Layer Chromatography-Silica Gel</i> , suporte para cromatografia de camada delgada;
L	- ligante timidina-ácido aminodiacético;
L5178Y	- tipo de linhagem de células de linfoma;
LIM-58	- Laboratório de Investigação Médica 58 da Clínica Ginecológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo;
MAG ₃	- mercaptoacetiltriglicina
MIBI	- 2-metoxi-isobutil-isonitrila
P	- coeficiente de partição;
PBS	- do inglês <i>Phosphate Buffer Saline</i> , tampão fosfato salina;
PET	- do inglês <i>Positron Emission Tomography</i> , Tomografia por Emissão de Pósitron;
R _f	- fator de retenção;
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear;
RNA	- ácido ribonucléico;
SPECT	- do inglês <i>Single Photon Emission Computed Tomography</i> , Tomografia Computadorizada de Emissão de Fóton Único;
t _{1/2}	- tempo de meia-vida;
TI	- transição isomérica;
TLC-AL	- do inglês <i>Thin Layer Chromatography-Alumin</i> , suporte para cromatografia em camada delgada;
TQ ₁	- enzima timidina quinase 1;
TQ _h	- enzima timidina quinase humana;
TQ _v	- enzima timidina quinase viral;
USP	- do inglês <i>United State Pharmacopeia</i> , Farmacopéia Americana;
VIP	- do inglês <i>Vasoactive Intestinal Peptide</i> , peptídeo intestinal vasoativo.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Características de um radiofármaco.....	2
1.2. Radioisótopo tecnécio-99m	4
1.2.1. Histórico do tecnécio	4
1.2.2. Características químicas, físicas e nucleares do ^{99m} Tc.....	4
1.2.3. Marcação de biomoléculas com ^{99m} Tc	6
1.2.4. Complexos organometálicos	9
1.2.4.1. Núcleo carbonil-tecnécio-99m	10
1.2.4.2. Aplicações do núcleo carbonil-tecnécio-99m	15
1.3. Biomolécula timidina	17
1.3.1. Timidina radiomarcada	21
1.4. Considerações finais	26
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. Equipamentos	28
3.2. Materiais	29
3.3. Reagentes	29
3.4. Animais	30
3.5. Métodos	31
3.5.1. Eluição do radioisótopo ^{99m} Tc	31
3.5.2. Síntese do complexo precursor.....	31
3.5.3. Otimização da síntese do complexo precursor	32
3.5.4. Marcação da timidina com o complexo precursor	32
3.5.5. Otimização da marcação da timidina com o complexo precursor ..	32
3.5.6. Avaliação radioquímica do complexo precursor e da timidina radiomarcada	33
3.5.7. Purificação da timidina radiomarcada	34
3.5.8. Avaliação <i>in vitro</i> da estabilidade radioquímica do complexo precursor e da timidina radiomarcada	35

3.5.9. Avaliação <i>in vitro</i> da estabilidade radioquímica da timidina radiomarcada em função da cisteína e histidina	35
3.5.10. Estudo <i>in vitro</i> da lipofilicidade da timidina radiomarcada	35
3.5.11. Estudo <i>in vivo</i> de animais sadios e portadores de tumor	36
4. RESULTADOS	39
4.1. Eluição do radioisótopo ^{99m} Tc	39
4.2. Síntese e otimização do complexo precursor	39
4.3. Marcação e otimização da timidina com o complexo precursor	42
4.4. Avaliação radioquímica do complexo precursor e da timidina radiomarcada	45
4.5. Purificação da timidina radiomarcada	47
4.6. Avaliação <i>in vitro</i> da estabilidade radioquímica do complexo precursor e da timidina radiomarcada	47
4.7. Avaliação <i>in vitro</i> da estabilidade radioquímica da timidina radiomarcada em função da cisteína e histidina	48
4.8. Estudo <i>in vitro</i> da lipofilicidade da timidina radiomarcada	49
4.9. Estudo <i>in vivo</i> de animais sadios e portadores de tumor	49
5. DISCUSSÃO	53
5.1. Eluição do radioisótopo ^{99m} Tc	54
5.2. Síntese e otimização do complexo precursor	55
5.3. Marcação e otimização da timidina com o complexo precursor	59
5.4. Avaliação radioquímica do complexo precursor e da timidina radiomarcada	62
5.5. Purificação da timidina radiomarcada	63
5.6. Estudo <i>in vitro</i> da estabilidade radioquímica do complexo precursor e da timidina radiomarcada	63
5.7. Estudo <i>in vitro</i> da estabilidade radioquímica em função da cisteína e histidina	64
5.8. Estudo <i>in vitro</i> da lipofilicidade da timidina radiomarcada	66
5.9. Estudo <i>in vivo</i> de animais sadios e portadores de tumor	67
6. CONCLUSÕES	73
6.1. Perspectivas futuras	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

1. INTRODUÇÃO

A Medicina Nuclear é uma especialidade médica que utiliza fontes abertas de radiação ionizante para fins diagnósticos e terapêuticos. O uso dessas fontes, conhecidas como radiofármacos, consiste na associação de um radionuclídeo a um fármaco que apresenta afinidade específica em determinados órgãos ou tecidos do corpo humano.

O progresso em técnicas de diagnóstico em Medicina Nuclear, através dos anos, desde a descoberta do radioisótopo tecnécio-99 meta-estável (^{99m}Tc) em 1970⁽¹⁾, é verdadeiramente notável. Este desempenho pode ser atribuído, sem dúvida, às suas propriedades nucleares e às suas características químicas, as quais podem proporcionar radiofármacos com o ^{99m}Tc em vários estados de oxidação, como por exemplo, Tc(I), Tc(III) e Tc(V)⁽²⁾. O seu uso, também, foi muito facilitado com o desenvolvimento de geradores molibdênio-99/tecnécio-99m ($^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$) e a formulação de kits liofilizados, tornando o seu uso uma realidade em radiofarmácia hospitalar⁽³⁾.

A marcação de moléculas biologicamente ativas com radionuclídeos, com propósito radiofarmacêutico, é um campo de intensa pesquisa⁽¹⁾. Primeiramente surgiram os anticorpos monoclonais marcados com diferentes radioisótopos. Posteriormente, vieram os peptídeos, como o vaso intestinal ativo (VIP) e análogos da somatostatina⁽⁴⁾.

Durante os últimos 20 anos, a pesquisa na área de desenvolvimento de radiofármacos de ^{99m}Tc estava direcionada ao desenvolvimento dos núcleos com estado de oxidação +V. Este estado de oxidação, principalmente na forma

química $^{99m}\text{TcO}^{3+}$, era o predominante na literatura devido às suas características bioquímicas, exceto pelo radiofármaco sestamibi-tecnécio-99m, $[^{99m}\text{Tc}(\text{MIBI})_6]^+$, um composto de Tc(I) que foi largamente empregado no início da década de 90⁽¹⁾.

1.1. Características de um radiofármaco

Radiofármacos, drogas que contêm um radionuclídeo, são rotineiramente, usados na Medicina Nuclear. Um bom radiofármaco é aquele que apresenta uma farmacocinética ideal, caracterizada pelo baixo tempo de retenção no sangue e alta captação do órgão de interesse ou alta razão de captação órgão/tecido⁽⁵⁾.

A capacidade da biomolécula de reconhecer os receptores determinará a fixação do radiofármaco no tecido pretendido e não deverá ser alterada com a incorporação do radionuclídeo⁽⁶⁾. A biodistribuição de radiofármacos pode ser determinada também pelas propriedades químicas e físicas ou pelas interações biológicas do produto⁽⁷⁾.

Os principais fatores que devem ser considerados para a preparação de um radiofármaco são: especificidade; compatibilidade; estereoquímica; solubilidade; carga e tamanho da molécula; estabilidade *in vitro*; cinética inerte *in vivo*; capacidade de ligação à biomolécula; e natureza do sistema quelante^(3,8,9).

As propriedades bioquímicas e biológicas dos fármacos conferem a especificidade da droga, responsável por direcionar o radiofármaco ao receptor desejado. As propriedades nucleares dos radiofármacos possibilitam o diagnóstico por imagem cintilográfica ou a terapia da doença.

Para o diagnóstico, a radiação deve ser capaz de penetrar o corpo e ser detectada por um instrumento externo ao paciente. Para que uma boa

imagem seja obtida, a energia gama do radioisótopo deve estar entre 100 e 200 keV. Porém, na prática, energias entre 80 e 300 keV também são utilizadas⁽¹⁰⁾.

Os radionuclídeos devem decair por raios gama (γ) ou emissão de pósitron (β^+) sem acompanhamento de partículas alfa (α) ou beta (β^-). Seu tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) deve ser relativamente curto (menos de um dia) e seu produto de decaimento deve apresentar isótopos “filhos” relativamente estáveis⁽¹⁰⁾. Os equipamentos utilizados com esta finalidade são Câmara a Cintilação, Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único (SPECT) e Tomografia por Emissão de Pósitron (PET).

Os radioisótopos mais utilizados em clínicas diagnósticas, além do ^{99m}Tc , são: gálio-67 (^{67}Ga); índio-111 (^{111}In); iodo-123 (^{123}I); tálio-201 (^{201}Tl); flúor-18 (^{18}F); e carbono-11 (^{11}C).

Aplicações radioterapêuticas envolvem a destruição celular e, para isto, o radionuclídeo a ser utilizado deve apresentar emissão corpuscular (α , β^- ou elétrons Auger) e $t_{1/2}$ entre 1 e 10 dias⁽¹⁰⁾. Os que têm sua aplicação clínica relatada são: iodo-131 (^{131}I); ítrio-90 (^{90}Y); e lutécio-177 (^{177}Lu).

A viabilidade e o custo do radionuclídeo são outros fatores que devem ser considerados para o uso radiofarmacêutico. Radionuclídeos produzidos a partir de ciclotrons, como o ^{18}F e ^{11}C , geralmente apresentam $t_{1/2}$ muito curto e custos superiores aos radionuclídeos produzidos em reatores nucleares (^{131}I) ou geradores (^{99m}Tc).

Para que um novo radiofármaco seja disponibilizado para testes clínicos, deverá apresentar algumas características, como por exemplo, alto rendimento, baixo tempo de síntese e alta atividade específica⁽¹¹⁾.

1.2. Radioisótopo tecnécio-99m

1.2.1. Histórico do tecnécio

O elemento químico tecnécio não é encontrado na crosta terrestre em abundância, pois o mesmo não é gerado continuamente pela reação ou decomposição de outros elementos presentes no planeta. Pequenas amostras de tecnécio foram encontradas em rochas, provavelmente devido aos raios cósmicos que bombardearam a Terra⁽¹²⁾.

O tecnécio, cujo número atômico é 43, foi descoberto em 1925 pelos cientistas Noddack, Tacke e Berg, os quais o chamaram, inicialmente, de *massarium*. Eles se basearam nos espectros e emissão de raios X obtidos com concentrados de gangas de vários minerais, como por exemplo, a columbita⁽¹²⁾. O nome "tecnécio" foi originado do grego *technetos* que significa "artificial" e empregado, primeiramente, por Paneth em 1947, justamente por ser o primeiro elemento radioativo produzido pelo homem⁽³⁾.

Somente em 1937, na Itália, que os cientistas Perrier e Segré isolaram e estudaram este elemento, o qual foi extraído de uma placa defletora de molibdênio usada em ciclotron e, somente a partir de 1970, o radioisótopo ^{99m}Tc começou a ser empregado com freqüência na Medicina Nuclear⁽¹⁾.

1.2.2. Características químicas, físicas e nucleares do ^{99m}Tc

O tecnécio é um metal de transição situado no Grupo 7 da Tabela Periódica. Apresenta propriedades tanto ácidas como básicas. Seu ponto de fusão é de 2.200°C e seu ponto de ebulição 4.877°C. É encontrado em nove estados de oxidação, variando seu número de oxidação de -I a +VII. A

estabilidade desses estados de oxidação depende do tipo de ligantes e do meio químico^(1,3,13).

O tecnécio possui 21 isótopos, os quais apresentam número de massa que varia entre 90 e 110, e $t_{1/2}$ que varia entre 0,86 s e $2,6 \times 10^6$ anos. Nenhum destes isótopos é estável e o isótopo ^{99m}Tc é o que apresenta as melhores propriedades físicas e químicas para a detecção externa⁽¹²⁾.

O ^{99m}Tc é um emissor gama, com energia monocromática de 140 keV (89% de abundância), ideal para aquisição de imagens cintilográficas. Seu $t_{1/2}$ de 6,02 h é suficientemente longo para realizar a síntese do radiofármaco e suficientemente pequeno para minimizar a dose de radiação ao paciente^(1-3,12-19). A ausência de radiação corpuscular alfa e beta permite, também, a injeção de uma atividade maior que 30 mCi⁽¹³⁾.

O ^{99m}Tc alcançou uma posição privilegiada no uso clínico devido às suas propriedades físicas e nucleares extremamente favoráveis. Em 2003, era usado em quase 85% dos exames de imagem diagnóstica cintilográficas realizados por ano em hospitais^(7,14).

O desenvolvimento do gerador de molibdênio-99/tecnécio-99m ($^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$) permitiu que o uso do radionuclídeo ^{99m}Tc se tornasse economicamente viável em seu uso rotineiro⁽¹⁾.

Este gerador pode ser produzido utilizando três métodos químicos diferentes – cromatográfico, sublimação e extração por solventes. O procedimento mais utilizado é o cromatográfico, justamente por apresentar um excelente custo-benefício. A coluna cromatográfica deste gerador é baseado em um sistema de alumina com o isótopo ^{99}Mo como produto de fissão^(3,20).

O ^{99m}Tc é produzido pelo radionuclídeo “pai” (^{99}Mo) com $t_{1/2}$ de 2,75 dias e é eluído a baixas concentrações, da ordem de $10\ \mu\text{mol/L}$ ⁽¹¹⁾.

No gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, o íon molibdato ($^{99}\text{MoO}_4^{2-}$) é absorvido em uma coluna de alumina e o ^{99m}Tc é formado pelo decaimento do ^{99}Mo (FIG. 1). O ^{99m}Tc na forma de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$) é eluído por esta coluna com solução salina⁽¹⁰⁾.

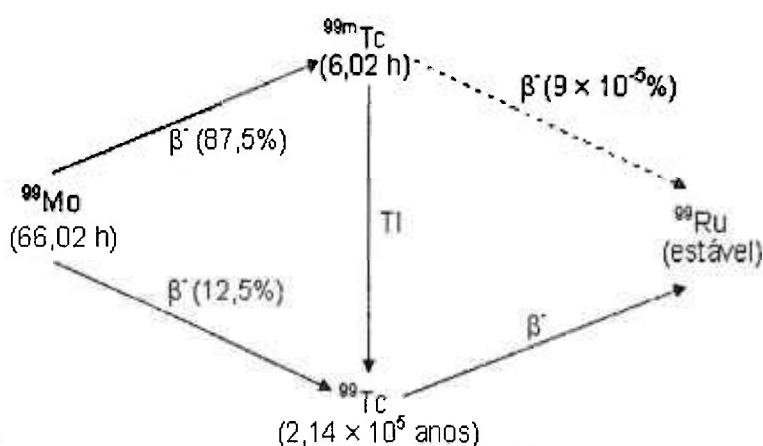


FIGURA 1 – Esquema do decaimento radioativo do ^{99}Mo (TI = Transição Isomérica)⁽²⁰⁾

1.2.3. Marcação de biomoléculas com ^{99m}Tc

Na forma de $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$, o isótopo ^{99m}Tc possui o número de oxidação (+VII), que é o mais estável em solução aquosa, porém nesta forma química, o tecnécio não consegue se ligar às biomoléculas para formação de compostos de coordenação. Sendo assim, o uso de agentes redutores e técnicas de complexação para estabilizar o radioisótopo se faz necessário.

As reações de complexação podem ser realizadas com vários tipos de agentes quelantes, cujos números de coordenação podem variar de 4 a 9. No entanto, o tipo de complexo formado e sua estabilidade dependem do meio reacional por exemplo, pH, tipo de natureza do ligante, agente redutor e sua concentração⁽⁹⁾.

A técnica mais utilizada e de maior sucesso na marcação de biomoléculas com o radioisótopo ^{99m}Tc , era a que utilizava o tecnécio com número de oxidação +V, tipicamente com átomos de oxigênio, como por exemplo, núcleos de $^{99m}\text{TcO}^{3+}$ ou $\text{Tc}_2\text{O}_3^{4+}$, os quais eram formados pela redução do íon $^{99m}\text{TcO}_4^-$ com o cátion estano (Sn^{2+})^(1,9,15,19).

Os métodos de marcações de biomoléculas com radioisótopo ^{99m}Tc podem ser agrupados, basicamente, em quatro formas: 1) marcação direta; 2) pré-marcação indireta; 3) pós-marcação indireta; 4) marcação com precursor.

Na marcação direta, utiliza-se um agente redutor para reduzir o ^{99m}Tc ao mesmo tempo que se reduzem as pontes dissulfetos da biomolécula, formando, assim, dois grupos tióis que se ligam ao radionuclídeo. Esta técnica pode ser utilizada em marcações com proteínas ou peptídeos que apresentam pontes de enxofre. Porém, o método apresenta algumas limitações: a marcação não é específica, ou seja, apresenta baixo controle do sítio de ligação do tecnécio deixando a sua geometria desconhecida; os complexos formados são instáveis *in vivo*; e as quebras das pontes de enxofre podem alterar a estrutura da biomolécula e impedir a sua integridade biológica^(7,9,21). Esta técnica não é adequada para biomoléculas pequenas⁽⁹⁾. A principal vantagem da técnica é a sua fácil execução⁽⁷⁾. Ela foi muito empregada na década de 90 para a marcação de peptídeos e anticorpos com Tc(V) ^(7,14).

Na utilização de métodos de marcação indireta, se faz necessário o uso de ligantes, chamados também de agentes quelantes bifuncionais (BFCA), que são moléculas que contêm grupos funcionais capazes de unirem-se ao metal (^{99m}Tc) formando um complexo.

O BFCA será o responsável por ligar a molécula alvo (biomolécula) ao radionuclídeo (^{99m}Tc) e formar o complexo adequado. O BFCA possui dois propósitos: ligar seguramente o radionuclídeo metálico sem a dissociação *in vivo* e promover um apêndice estrutural para que o radioisótopo ligue-se a biomolécula sem alterar a sua integridade biológica⁽¹³⁾. Um BFCA ideal é aquele que apresenta alta estabilidade no complexo formado, alto rendimento na reação, pequeno tamanho, boa solubilidade e ausência de isômeros^(7,9,22).

Na pré-marcação indireta, o tecnécio é ligado, inicialmente, ao BFCA para somente depois se ligar e complexar a biomolécula. Nesta técnica, o processo químico é muito bem definido e de fácil controle. Como a marcação e a etapa de complexação são separadas, é possível assegurar que o radionuclídeo é atacado diretamente pelo BFCA sem afetar a estrutura da biomolécula caso ela venha a apresentar grupos funcionais competitivos com o BFCA⁽⁷⁾.

Já na pós-marcação indireta, a biomolécula é conjugada com BFCA previamente, para somente depois realizar a complexação com o radionuclídeo. Esta é a técnica mais utilizada na síntese de radiofármacos justamente por não utilizar o radioisótopo no primeiro momento da síntese e também por apresentar uma química bem definida e relativa simplicidade. Porém, a principal desvantagem é a possível modificação da biomolécula durante o processo de complexação com o radioisótopo⁽⁷⁾.

Por fim, a técnica de precursores está fundamentada na preparação inicial de um complexo de ^{99m}Tc , chamado de agente precursor, que somente depois se ligará à biomolécula desejada. Este método está sendo muito empregado devido ao advento dos experimentos de Alberto e col. (1995)⁽²³⁾, que utilizaram o Tc(I) como metal central de um complexo organometálico.

1.2.4. Complexos Organometálicos

A síntese de compostos de coordenação e de complexos organometálicos em particular, os quais são capazes de ligarem-se a biomoléculas é um dos desafios na química de coordenação em direção à aplicação⁽²¹⁾.

Compostos organometálicos clássicos, com pelo menos um metal de transição diretamente ligado ao carbono, são extremamente raros em sistemas biológicos. O único composto organometálico natural descoberto há muito tempo é a coenzima da vitamina B12, adenosil cobamida⁽²⁴⁾.

A química bio-organometálica, estudada inicialmente por Salmain e col. (1993)⁽²⁵⁾, é uma ciência emergente para futuras aplicações no campo da imunologia e pesquisa de receptores^(26,27). O termo "bio-organometálico" se refere ao uso da combinação de compostos organometálicos com moléculas bioativas para o uso farmacêutico ou como vetores de ligação ao receptor⁽²⁸⁾.

A palavra "organometálico" faz com que, em se tratando de produtos químicos, associe-se a eles a noção de compostos sensíveis ao ar e à umidade, e insolúveis em água⁽²⁴⁾. Muitos complexos metálicos se decompõem na presença de água ou ar por um longo período. Porém, os complexos organometálicos têm apresentado excelente estabilidade sob condições aquosas e aeróbias⁽²⁸⁾.

A opção de fazer a síntese do complexo precursor em ambiente aquoso está no fato da água ser um solvente favorável em processos industriais e, também, de ser considerada o solvente universal⁽²⁸⁾.

Os fármacos na forma de quelatos metálicos apresentam algumas propriedades físicas que lhes conferem atividade farmacodinâmica

características, como por exemplo, solubilidade, potencial de oxirredução e constantes de dissociação baixas⁽²⁹⁾.

Pouca importância vinha sendo dada aos núcleos de ^{99m}Tc em baixo estado de oxidação, Tc(I) , uma vez que o controle da reação e redução do Tc(VII) era muito trabalhosa e não apresentava muita estabilidade. Esta dificuldade foi superada quando Trop e col. (1980)⁽³⁰⁾ descobriram que os ligantes monodentados isotiocianato formavam complexos organometálicos de Tc(I) bastante estáveis e solúveis em água^(3,13). Devido a esta descoberta, Jones e col. (1984)⁽³¹⁾ desenvolveram o $[\text{}^{99m}\text{Tc(MIBI)}_6]^+$, o qual se tornou o primeiro radiofármaco organometálico utilizado na Medicina Nuclear, mais tarde, patenteado com o nome de Cardiolite® pela empresa americana Dupont Pharma⁽³²⁾.

1.2.4.1. Núcleo carbonil-tecnécio-99m

A aplicação na Medicina Nuclear dos complexos organometálicos de tecnécio-99m e rênio-188 (^{188}Re) com ligantes carbonil foi proposta, inicialmente, por Salmain e col. (1993)⁽²⁵⁾ e Top e col. (1995)⁽³³⁾.

Porém, os primeiros estudos de Alberto e col. (1995)⁽²³⁾ na síntese destes complexos organometálicos não apresentaram bons resultados. O tempo de reação muito longo (entre 6 e 10 h), a alta temperatura (110 °C), as múltiplas etapas no processo e o baixo rendimento da reação eram os principais empecilhos para a síntese do complexo. Somente alguns anos depois que, também, Alberto e col. (1997)^(15,21) conseguiram aprimorar a técnica e obter melhores resultados. No entanto, foi em 1998 que o conveniente precursor complexo organometálico aquoso *fac*-triaquatricarboniltecnécio(I)⁽³⁴⁾ foi sintetizado

proporcionando o grande impulso no desenvolvimento de novos radiofármacos⁽³⁵⁾. Neste trabalho, o nome deste complexo foi abreviado por carbonil-tecnécio-99m, cuja fórmula é $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ (FIG. 2), ou simplesmente $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$.

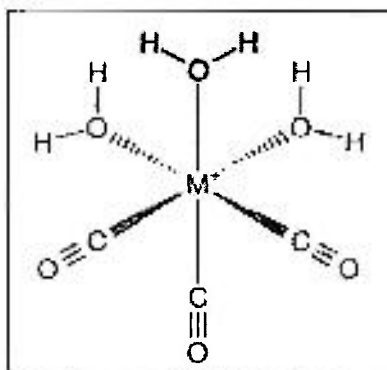


FIGURA 2 – Fórmula estrutural do complexo carbonil-tecnécio-99m ($M = \text{}^{99\text{m}}\text{Tc}$)

O complexo organometálico $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ não foi desenvolvido para uma direta aplicação radiofarmacêutica como ocorre com o Cardiolite®, mas sim, para ser utilizado como um precursor na marcação de biomoléculas, conjugadas ou não com ligantes apropriados. Estes ligantes podem ser mono, bi e tridentado, os quais substituem os ligantes aqua (H_2O) presentes no complexo, protegendo assim o metal central contra a transquelação ou reoxidação⁽²⁴⁾.

Segundo Alberto e col. (1999)⁽²⁶⁾, pouco se conhecia sobre o comportamento *in vitro* e *in vivo* dos complexos carbonil-tecnécio-99m. Todavia, a comunidade científica já demonstrava grande interesse nestes complexos, uma vez que as suas propriedades químicas eram ideais para o desenvolvimento de novos alvos radiofarmacêuticos específicos⁽⁸⁾.

O $\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}$ fica no centro da molécula no estado de oxidação +I formando um complexo com uma estrutura não polar⁽³⁶⁾ e quase estérico e geometria octaédrica, portanto, é quimicamente muito inerte, ou seja, protegido contra ataque de ligantes ou reoxidação do metal^(2,24). O que não acontece com outros

núcleos de ^{99m}Tc , como por exemplo, o Tc(V)-oxo, que quando ligado a um quelato tetradentado, apresenta uma geometria piramidal quadrática, caracterizada por faces desprotegidas e susceptíveis aos ataques de ligantes ou à protonação, que leva à decomposição do complexo original⁽²⁴⁾.

A susceptibilidade ao ataque está relacionada à simetria do complexo e conseqüentemente à energia de ligação dos ligantes que podem deformá-la. Quanto mais simétrica for a geometria mais estável é o complexo.

O complexo carbonil-tecnécio-99m é solúvel em água e apresenta uma boa estabilidade por horas em uma grande faixa de pH (2 – 12)⁽²⁴⁾.

Outra característica da utilização da técnica do núcleo carbonil-tecnécio-99m é a formação de um complexo bem definido e com elevada atividade específica, a qual depende somente do tipo de ligante, ao contrário da técnica de marcação com o uso do agente quelante ácido 6-hidrazinonicotinamida (HYNIC), cujos modos de coordenação não são claramente definidos^(7,13,19,37,38).

O complexo $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ é relativamente pequeno, sendo o tamanho um importante fator para a retenção bioativa⁽³⁹⁾. Na FIG. 3, pode-se observar uma comparação qualitativa do tamanho do complexo $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ com o núcleo $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$, agente renal, realizado em análise de raio X⁽²⁴⁾.

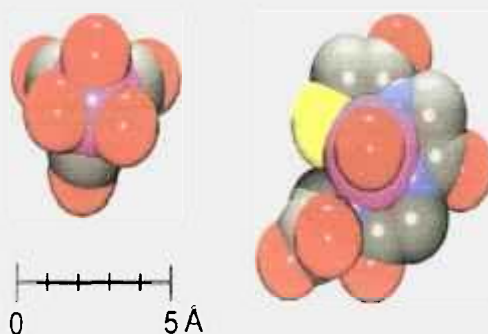


FIGURA 3 – Comparação do tamanho do complexo precursor $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ (esquerda) e $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ (direita) baseado em análise de raio X. Onde violeta = ^{99m}Tc ; vermelho = O; cinza = C; azul = N; amarelo = S⁽²⁴⁾.

O núcleo carbonil-tecnécio-99m fornece uma configuração facial (FIG. 4), ou seja, os três ligantes iguais estão na mesma face da geometria. Esta estereoquímica favorece a ausência de centros quirais e de isômeros, desde que a outra face do octaedro seja preenchida por um único tipo de ligante⁽⁴⁰⁾. A biodistribuição de um radiofármaco que apresenta centro quiral pode ser prejudicada⁽²⁾.

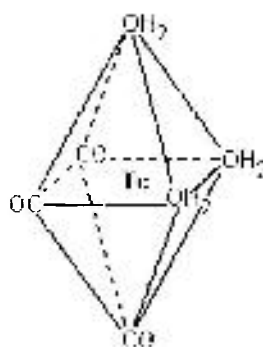


FIGURA 4 – Configuração geométrica do *fac*-[^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺

A habilidade de coordenação a diversos ligantes é explicada pela configuração eletrônica de baixo spin d^6 , fornecendo complexos cineticamente inertes em forma de “conchas” fechadas em um ambiente octaédrico bastante rígido^(13-15,19,21,26).

Os três grupos CO possuem ligações fortes, pequenas e não estão sujeitas à protonação como acontece com os grupos aqua. O baixo número de oxidação do metal no centro do complexo faz a sua proteção contra os fortes doadores como, por exemplo, as hidroxilas e carboxilas, presentes em grande quantidade nas biomoléculas⁽²⁶⁾.

Os três grupos aqua coordenados à estrutura metálica são rapidamente substituídos por uma grande variedade de ligantes mono, bi ou tridentados, como por exemplo, os grupos funcionais aminas, tioéteres, tióis, fosfinas e aminoácidos⁽²⁴⁾.

O grupo que irá se ligar ao complexo $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ não precisa estar conjugado à biomolécula. A própria biomolécula pode prover este grupo, como é o caso do aminoácido histidina, um ligante tridentado encontrado na maioria das proteínas e peptídeos^(24,26). Esta possibilidade, reação direta do complexo $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ com a biomolécula, pode ser considerada uma vantagem da técnica uma vez que, teoricamente, a especificidade da biomolécula não é alterada⁽⁴¹⁾.

Esta habilidade dos aminoácidos reagirem com o complexo carbonil-tecnécio-99m foi investigada por Egli e col. (1999)⁽⁵⁾. Eles puderam verificar que a histidina é um ótimo ligante capaz de se conjugar ao complexo em baixas concentrações (10^{-4} mol/L), proporcionando uma alta atividade específica. Waibei e col. (1999)⁽⁴²⁾ demonstraram também o desempenho do complexo em se ligar eficientemente aos peptídeos que apresentam resíduos de histidina, mantendo a integridade da biomolécula.

O ligante tridentado é o ideal, pois, com apenas um único ligante é possível fazer as substituições das três moléculas de água presente na estrutura. Desta forma, a proporção do ligante/complexo é 1:1, favorecendo, assim, toda a sua geometria e, também, a atividade específica⁽⁴³⁾.

Egli e col. (1999)⁽⁵⁾ e Alberto e col. (1999)⁽¹¹⁾ verificaram que a não substituição dos três ligantes aqua, como ocorre quando os ligantes mono ou bidentados são utilizados, confere uma instabilidade ao complexo *in vivo*. Isto acontece, pois a presença de uma ou mais moléculas de H_2O deixa o complexo vulnerável a trocas com grupos ligantes competitivos, justamente por estas moléculas de H_2O serem ligantes lábeis. Um exemplo de grupo competitivo é o das proteínas plasmáticas, que fazem com que haja um tempo de permanência em órgãos e uma depuração sangüínea muito longa.

Em resumo, pode-se dizer que o núcleo carbonil-tecnécio-99m, além de ser muito estável, apresenta várias vantagens adicionais, como por exemplo: ser menor e menos polar do que os sistemas Tc(V)-oxo empregados rotineiramente; não necessitar de coligantes para estabilizar o estado de oxidação +I; fornecer sítios de coordenação abertos permitindo um amplo grau de flexibilidade na escolha de ligantes; ser independente da temperatura, pH e tempo; e além de ser possível armazená-lo por horas na forma de kits⁽²⁴⁾.

Alberto e col. (2001)⁽⁴⁴⁾ desenvolveram um kit de preparação do complexo carbonil-tecnécio-99m, com a finalidade de evitar o uso do gás tóxico CO, usando o borano carbonato de potássio, $K_2[H_3BCO_2]$, o qual libera CO sob hidrólise e, concomitantemente, reduz o Tc(VII) a Tc(I). Este kit está disponível para estudos de pesquisa com o nome de IsoLink® fornecido pela Mallinckrodt Medical B. V. (Holanda)⁽⁴⁵⁾.

1.2.4.2. Aplicações do núcleo carbonil-tecnécio-99m

A primeira aplicação do núcleo carbonil-tecnécio-99m na química bio-organometálica foi realizada por Alberto e col. (1999)⁽²⁶⁾. A marcação foi realizada com ligantes receptores serotoninérgicos (5-HT_{1A}). Estudos preliminares confirmaram que este complexo organometálico poderia ser aplicado em sistemas aquosos para a marcação de biomoléculas ativas com grande afinidade aos receptores.

Um neuroreceptor derivado do tropano (β -CFT) foi marcado com o complexo carbonil-tecnécio-99m por Hoeping e col. (1998)⁽⁴⁶⁾. O complexo formado apresentou alta lipofilicidade, pequeno tamanho geométrico e ausência de isômeros, além de preservar a afinidade do transporte da dopamina.

Os análogos da somatostatina como octreotato estão entre os compostos mais extensamente estudados para diagnóstico e radioterapia sistêmica. Marmion e col. (1999)⁽⁴⁷⁾ marcaram a tirosina-octreotato com o complexo carbonil-tecnécio-99m mostrando alta razão de captação tumor/sangue quando comparada à molécula radiomarcada conjugada com HYNIC, realizada por Decristoforo e col. (2000)⁽⁴⁸⁾.

Du e col. (2001)⁽⁴¹⁾ sintetizaram a molécula somatostatina-dextran-histidina marcada com o complexo carbonil-tecnécio-99m. O produto foi purificado, uma vez que apresentou um baixo rendimento de reação ($\leq 80\%$) e instabilidade frente ao aminoácido cisteína de 25%.

O comportamento *in vitro* e *in vivo* do complexo carbonil-tecnécio-99m em função de seus sítios de ligação, estudado por Schibli e col. (2000)⁽²⁷⁾, indicaram que os complexos de ligantes bidentados eram os mais captados pelo fígado e rins do que os correspondentes complexos tridentados.

Schibli e Schubiger (2002)⁽²⁴⁾ estudaram a influência da carga na aquisição de imagens de octreotato-carbonil-tecnécio-99m em ratos com tumor pancreático (CA20948), utilizando três diferentes tipos de ligantes. Todos os ligantes apresentaram captação no tumor. Contudo, foi observado que o ligante com carga mais negativa pôde proporcionar uma retenção tumoral um pouco melhor e uma predominância em excreção renal.

A caracterização química e biológica de complexos organometálicos de ^{99m}Tc e ^{188}Re com diversos ligantes ditioéteres foi realizada por Pietzsch e col. (2000)⁽²²⁾, assim como os ensaios de estabilidade com glutathione, que indicaram a não transquelação dos complexos *in vivo*.

Estudos com análogos do peptídeo bombesina marcada com o núcleo carbonil-tecnécio-99m foram realizados por La Bella e col. (2002)^(49,50). Seus resultados demonstraram alta afinidade pelo receptor GRP, com rápida internalização e alta captação específica em tecidos *in vivo*.

Chu e col. (2004)⁽⁵¹⁾ investigaram marcações de ácidos carboxílicos com o complexo carbonil-tecnécio-99m e concluíram que estes complexos não são adequados para imagens cardíacas devido ao baixo acúmulo no miocárdio.

O desempenho químico e biológico dos aminoácidos tirosina e lisina, ambos marcados com o complexo carbonil-tecnécio-99m, foram analisados por Djokic e Jankovic (2005)⁽⁵²⁾. As marcações foram realizadas com rendimentos inferiores a 70% e os estudos de biodistribuição em ratos saudáveis demonstraram altas captações no fígado, rins e intestino.

Lipowska e col. (2006)⁽³⁶⁾ realizaram a primeira avaliação clínica em humanos do complexo carbonil-tecnécio-99m conjugado com o peptídeo **lantionine**. Os resultados demonstraram seu potencial como agente renal, competindo, desta forma, com outros radiofármacos já disponíveis no mercado.

1.3. Biomolécula timidina

Biomolécula é uma denominação dada aos compostos orgânicos que apresentam funções biológicas e são encontrados nos sistemas biológicos. Cada componente individual encontrado nas células do organismo vivo, como por exemplo, lipídios, proteínas ou ácidos nucleicos, apresentam funções específicas.

Toda a informação que uma célula necessita durante a sua vida e a de seus descendentes, está organizada em forma de código nas fitas dos ácidos nucleicos que constituem os armazenadores e transmissores de informação nos

seres vivos. Esta informação traduzida em proteínas permite que a célula execute todo o trabalho necessário à sobrevivência do organismo.

Existem dois tipos de ácidos nucléicos: ácido desoxirribonucléico (DNA) e ácido ribonucléico (RNA). Ambos são macromoléculas de nucleotídeos conectados entre si via ligações covalentes denominadas "ligações fosfodiéster"^(53,54). Os nucleotídeos são formados por um nucleosídeo e um ou mais grupos fosfatos, os quais são responsáveis pelas cargas negativas dos nucleotídeos. Os nucleotídeos são também conhecidos como éster fosfórico de um nucleosídeo⁽⁵³⁾.

O termo nucleosídeo foi criado e introduzido no vocabulário científico por Levene e Jacobs (1909), e estava, originalmente, associado aos ácidos nucléicos dos quais os nucleosídeos foram obtidos pela primeira vez por hidrólise⁽⁵⁵⁾.

Os nucleosídeos são constituídos por uma base nitrogenada (purínica ou pirimidínica), ligada a uma pentose (açúcar com cinco átomos de carbono) que pode ser uma ribose ou uma desoxirribose (ausência de hidroxila no segundo carbono). Os nucleosídeos formados por uma ribose são característicos do RNA e os formados por uma desoxirribose são peculiares ao DNA.

As bases nitrogenadas purínicas são constituídas por dois anéis heterocíclicos formados por átomos de carbono e nitrogênio. Já as bases nitrogenadas pirimidínicas são constituídas por um único anel heterocíclico. Adenina e Guanina são bases purínicas. Citosina, Timina e Uracil são bases pirimidínicas^(53,54).

A Timina é o único nucleotídeo que é incorporado somente no DNA e não no RNA, tornando o nucleosídeo timidina apropriado para os estudos do

metabolismo do DNA⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾. Porém, devido ao seu rápido metabolismo, alguns dos seus metabólitos, que não são incorporados, acabam prejudicando a captação nos tecidos tumorais ou até mesmo dificultando o diagnóstico⁽⁵⁹⁾. Apesar de cada metabólito apresentar suas próprias características, eles podem interferir no fluxo e no diagnóstico final. Desta forma, modelos matemáticos devem ser desenvolvidos para elucidar tais dúvidas⁽⁵⁸⁾.

A timidina (FIG. 5) se forma quando a base nitrogenada (Timina) se liga a uma pentose (desoxirribose), por meio da ligação β -N-glicosídica.

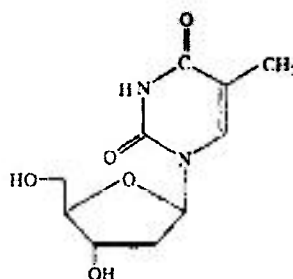


FIGURA 5 – Fórmula estrutural do nucleosídeo timidina

As ligações N-glicosídicas dos nucleosídeos e nucleotídeos são estáveis em meios alcalinos. No entanto, devido ao grupo fosfato ser altamente polar, os nucleotídeos são mais solúveis em soluções aquosas do que em seus nucleosídeos. Todavia, nucleosídeos são mais solúveis do que as bases livres⁽⁵⁴⁾.

Os eventos catabólicos da timidina incluem a quebra da ligação da pentose com a base pirimidínica e abertura do anel desta última⁽⁶⁰⁾. Os principais metabólitos (FIG. 6) formados são: ácido β -amino-isobutílico (BAIB); ácido β -ureidoisobutílico (BUIB); amônia (NH_3); e gás carbônico (CO_2)⁽⁵⁹⁾.

O processo de incorporação da timidina ao DNA é realizado em múltiplas etapas. A etapa inicial do seu metabolismo é a fosforilação da desoxitimidina para 5-desoxitimidina-monofosfato, que é catalisada pela enzima

timidina quinase 1 (TQ₁). Nesta etapa, o nucleosídeo se transforma em nucleotídeo, o qual não consegue atravessar a membrana celular e permanece retida na célula^(61,62). A etapa seguinte é a conversão de dTMP para 5-desoxitimidina-difosfato (dTDP) e, depois, para 5-desoxitimidina-trifosfato (dTTP) até a incorporação no DNA^(54,63,64). Estudos demonstraram que a atividade da timidina quinase aumenta em dez vezes somente na síntese do DNA^(61,65).

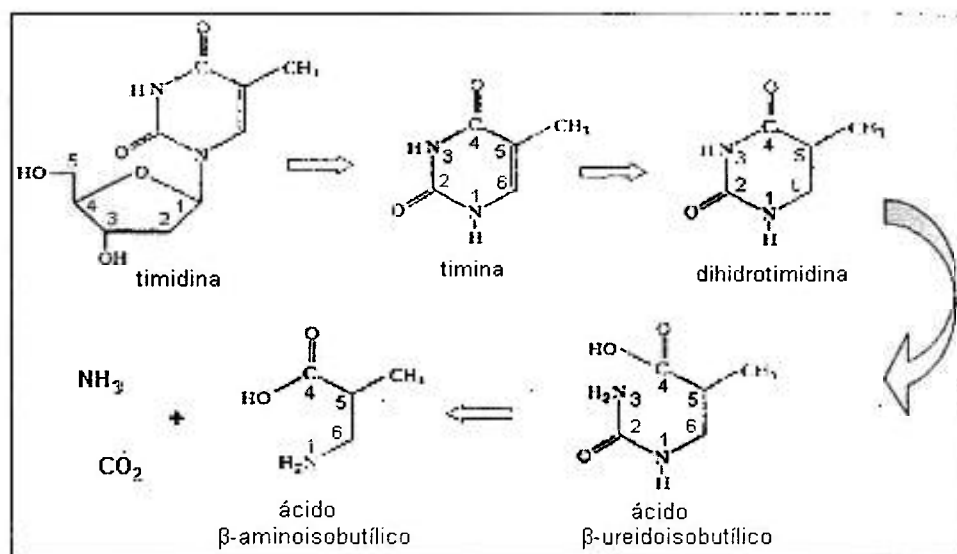


FIGURA 6 – Estrutura da timidina e seus principais metabólitos

Quinases são as enzimas que fosforilam, catalisando a transferência do grupo γ fosfato da timidina-trifosfato, ou outro nucleosídeo trifosfato, aos grupos receptores álcool ou amino⁽⁶³⁾.

O aumento da atividade enzimática (quinase) está fortemente relacionado com a proliferação celular⁽⁶⁴⁾, o que caracteriza a excelente ferramenta para a determinação de tumores biológicos⁽⁶⁶⁾. Considerando este princípio, o monitoramento da timidina quinase está sendo largamente estudado, tanto em cultura celular (*in vitro*) como *in vivo*⁽⁵⁹⁾. A introdução de genes específicos apresentaram ser também uma excelente ferramenta para monitorar a

distribuição, a magnitude e o tempo de variação da terapia de transferência genética *in vivo*⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾.

Os altos níveis enzimáticos de timidina quinase ocorrem, principalmente, em câncer de mama⁽⁷⁰⁻⁷²⁾, pulmão^(69,71,73), pescoço⁽⁷³⁾, rins⁽⁷³⁾, cólon⁽⁷¹⁾, linfoma^(61,71,73) e sarcoma^(70,71).

1.3.1. Timidina radiomarcada

Análogos da timidina, marcados com radioisótopos, têm sido investigados para os mais diversos campos de pesquisa, principalmente para o uso em Medicina Nuclear.

O uso da timidina em bioquímica e biologia celular foi estudado, inicialmente, por Rajewshy em 1965, o qual realizou a sua marcação com o radioisótopo trítio (³H) para a investigação do DNA e para mensurar o crescimento celular^(57,62,74).

No campo da proteção radiológica, foram realizados estudos utilizando a timidina marcada ³H com a finalidade de comparar a eficácia de líquidos cintilantes biodegradáveis e não biodegradáveis, como pesquisado por Medeiros e col. (2003)⁽⁷⁵⁾.

A utilização da timidina marcada com ³H tem sido realizada, também, como forma de avaliação nos resultados das pesquisas que utilizam vermes. Como exemplo têm-se o estudo de antígenos recombinantes de *Trypanosoma cruzi*⁽⁷⁶⁾ e a regeneração hepática após hepatectomia parcial em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*⁽⁷⁷⁾.

O uso da PET para aquisição de imagens oncológicas é relativamente recente se comparada com as técnicas de diagnósticos, tais como a radiográfica

(raios X), o ultra-som, a tomografia computadorizada e a ressonância magnética nuclear (RMN)⁽⁷⁸⁾.

Apesar da grande expansão do uso PET nos últimos anos, sua tecnologia ainda não foi totalmente explorada para o uso clínico mais sofisticado⁽⁵⁷⁾, principalmente pela ausência de radiofármacos específicos ou algumas limitações nos radiofármacos que já existem.

Os substratos de pirimidinas mais utilizados e estudados para o monitoramento da proliferação celular via PET são timidina e os seus três análogos: 1-(2-desoxi-2-fluor-β-D-arabinofuranosil)-uracil (FAU); 3-desoxi-3-fluor-timidina (FLT); e 1-(2-desoxi-2-fluor-β-D-arabinofuranosil)-timina (FMAU) (FIG. 7). Estas biomoléculas marcadas com ¹⁸F ou ¹¹C apresentam suas vantagens e desvantagens⁽⁵⁷⁾.

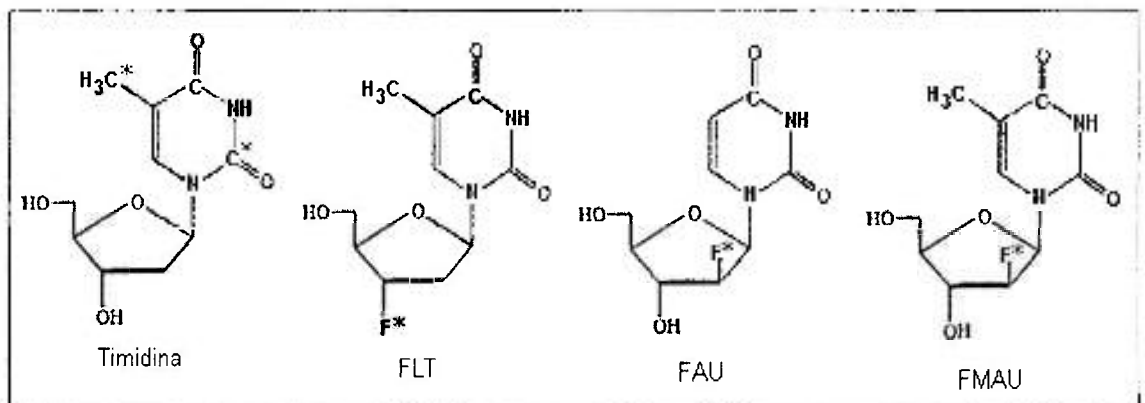


FIGURA 7 – Estrutura química da timidina marcada com ¹¹C e seus análogos marcados com ¹⁸F. (*) posição onde as marcações ocorrem.

O pioneiro da síntese da timidina marcada com ¹¹C foi Christman (1972), o qual possibilitou a sua difusão para o diagnóstico e tratamento do câncer⁽⁵⁷⁾. A sua marcação pode ser realizada em duas diferentes posições: na posição 5'-metil ou na posição 2' da pirimidina^(57,63,74), sendo que estas

influenciam no tipo e nos números de metabólitos formados no plasma^(63,79), uma vez que ela é rapidamente metabolizada.

Quando o ^{11}C está no anel da pirimidina, a timidina é degradada a dióxido de carbono ($^{11}\text{CO}_2$), e quando marcada na posição metil, forma o BAIB, um metabólito mais complexo (FIG. 6)⁽⁵⁷⁾. A presença de altas concentrações de metabólitos pode mascarar a imagem do composto original. Porém, parte do $^{11}\text{CO}_2$ é rapidamente eliminado pelo pulmão⁽⁷⁹⁾. O rápido catabolismo da timidina *in vivo* e o baixo tempo de meia-vida do ^{11}C são as desvantagens para o uso de imagens clínicas⁽⁶³⁾.

Shields e col. (1990)⁽⁵⁹⁾ investigaram o metabolismo da timidina marcada com ^{11}C em ratos e cachorros na validação de modelos cinéticos e bioquímicos para a interpretação de imagens em PET. A permanência dos metabólitos da timidina no tecido sangüíneo também foi estudada com a finalidade de verificar as suas influências no diagnóstico final⁽⁸⁰⁾.

A fim de se obter estimativas do fluxo da timidina marcada com ^{11}C no sangue até a incorporação no DNA, Mankoff e col. (1998) desenvolveram os primeiros modelos matemáticos para eliminar as interferências nas imagens PET provindas dos metabólitos⁽⁸¹⁾ e validaram os métodos utilizando as imagens dinâmicas em PET com ratos saudáveis e humanos voluntários⁽⁶⁶⁾.

A timidina marcada com ^{11}C foi utilizada, também, para a investigação da taxa de proliferação de células tumorais no cérebro⁽⁵⁶⁾ e em tumores malignos intra-abdominais em estado avançado⁽⁷⁰⁾, ambos em pacientes voluntários.

A marcação do ^{18}F na posição 2' ou 3' no açúcar desoxiribose no FMAU e FLT, respectivamente, estabiliza a ligação glicosídica e previne a sua degradação^(57,58).

A hipótese de que a captação tumoral da timidina radiomarcada é uma função da atividade enzimática, timidina quinase 1 (TQ₁), foi confirmada por Barthel e col. (2005)⁽⁸²⁾. O estudo foi realizado com o análogo da timidina (FLT) em ratos portando células de linfoma (L5178Y) utilizando imagens dinâmicas PET.

Poucos estudos foram realizados com a timidina marcada com o ^{99m}Tc. Estas investigações foram realizadas pelo grupo do Dr. Roger Schibli, utilizando a técnica [^{99m}Tc(CO)₃]⁺. Eles realizaram a primeira síntese, caracterização e estudo da atividade enzimática desses novos complexos. A atividade enzimática foi estudada com timidina quinase viral (TQv) e timidina quinase humana (TQh)⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾.

Os análogos da timidina marcados com [^{99m}Tc(CO)]⁺ mostraram-se fortes candidatos para o monitoramento de terapia genética e para o diagnóstico da proliferação de células tumorais, apesar de ainda não terem sido largamente investigado^(67-69,78).

Com a finalidade de se obter novos caminhos para o diagnóstico ou até mesmo para terapia, Schmid e col. (2006)⁽⁸³⁾ realizaram a síntese, e avaliação radioquímica e biológica da timidina marcada com ⁶⁸Ga e ¹¹¹In. Contudo, seus resultados preliminares demonstram baixa captação no tumor.

Vários ligantes derivados do ácido aminodiacético (IDA) foram utilizados na Medicina Nuclear. O primeiro estudo foi realizado por Loberg e col. (1976)⁽⁸⁴⁾ com complexo lipofílico de ^{99m}Tc de número de oxidação +III, que apresentou um rápido depuramento hepático.

A serotonina, neurotransmissor presente no sistema nervoso central, foi sintetizada com o ligante IDA para a marcação com o precursor [^{99m}Tc(CO)₃]⁺ e futuros estudos de biodistribuição em ratos saudáveis. Seus resultados indicaram

uma baixa captação no cérebro, apesar da droga ter atravessado a barreira hematoencefálica e possuir um baixo caráter lipofílico⁽⁹⁵⁾.

No presente estudo, o nucleosídeo timidina foi sintetizado com o ligante tridentado IDA (FIG. 8) na posição 5' da pentose e marcada com o complexo precursor $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ (FIG. 9).

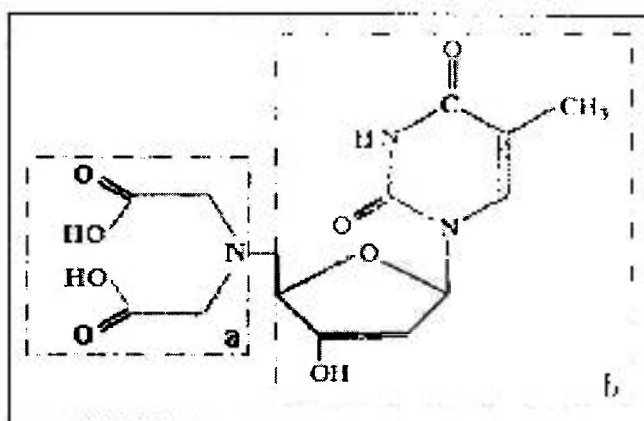


FIGURA 8 – Fórmula estrutural do nucleosídeo conjugado com o ligante (a) ligante tridentado ácido aminodiacético (IDA); (b) timidina

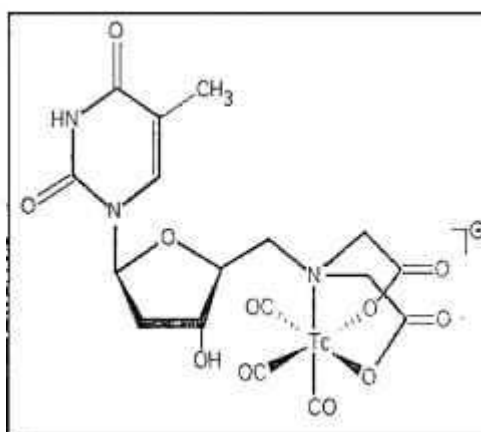


FIGURA 9 – Fórmula estrutural da timidina marcada com o complexo organometálico, $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{L})]^-$ (onde L = timidina-ácido aminodiacético)

1.4. Considerações finais

A radiofarmácia é uma ciência multidisciplinar que não depende exclusivamente dos esforços dos farmacêuticos e químicos, e sim da colaboração de bioquímicos, físicos e médicos nucleares, os quais são indispensáveis no desenvolvimento e sucesso de novos radiofármacos.

Apesar da grande ascensão das técnicas de PET, o radioisótopo ^{99m}Tc ainda mantém uma posição privilegiada para o diagnóstico na Medicina Nuclear, devido as suas características físico-químicas, do excelente custo-benefício e do advento do precursor complexo organometálico, $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$.

O nucleosídeo timidina apresenta um grande potencial para o diagnóstico, favorecido pela sua atuação nos processos celulares vitais como a proliferação celular e a sua incorporação ao DNA.

2. OBJETIVOS

A moderna Medicina Nuclear demanda agentes diagnósticos cada vez mais precisos, específicos e de elevada confiabilidade. As moléculas bioativas representam uma valiosa promessa, em particular, nucleotídeos e nucleosídeos como a timidina, que atuam em processos celulares vitais, como a síntese de DNA e a divisão celular. O desenvolvimento de técnicas de marcação eficazes para esta substância é pioneiro em nosso meio e poderá trazer, em seu bojo significativas aplicações futuras para o diagnóstico de tumores malignos de grande expressão clínica.

Sendo assim, o objetivo geral deste trabalho foi o desenvolvimento de uma nova técnica de marcação da molécula análoga da timidina com o radioisótopo ^{99m}Tc , mediante o emprego de complexos organometálicos voltado, preponderantemente, para o diagnóstico.

Os objetivos específicos do trabalho foram: 1) síntese do precursor, o complexo carbonil-tecnécio-99m, otimização da síntese e avaliação radioquímica; 2) marcação da biomolécula análoga da timidina com o complexo precursor, otimização e avaliação radioquímica da marcação; 3) avaliação da estabilidade radioquímica *in vitro*; 4) estudo da biodistribuição da droga em animais sadios e portadores de tumor.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Equipamentos

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) Waters 600 com detector UV/VIS – Waters, Tunable Absorbance Detector e detector de radiação Radiomatic Flo-one – Packard, EUA;
- Balança analítica, modelo M-220 – Denver Instruments, EUA;
- Purificador de água Ellix acoplado a sistema de purificação MilliQ, EUA;
- Calibrador de doses, modelo CRC-15R – Capintec Inc., EUA;
- Contador automático tipo poço com cristal NaI(Tl), modelo D5002, cobra II, auto-gamma, A. Packard, Camberra, EUA;
- Refrigerador Biflex 450 L Frostfree, Biflex 450 – Cônsul, Brasil;
- Freezer vertical com temperatura de -70 °C – Eletrolab, Brasil;
- Máquina de gelo em escama, modelo EGE 300M, Everest Refrigeração Ltda., Brasil;
- Bomba de vácuo, modelo 825 T – Fisaton, Brasil;
- Estufa, modelo Orion 515 – Farrem, Brasil;
- Aquecedor de 0-350°C, modelo Rh-KT/C – IKA, EUA;
- Medidor de pH, modelo DM-31 – Digimed, Brasil;
- Agitador de tubos, modelo AP56 – Phoenix, Brasil;
- Centrifuga, modelo HIMAC-CF 7D2 – HITACHI, EUA;
- Capela com sistema de exaustão – BRASLAB Equipamentos para Laboratório Ltda, Brasil.

3.2. Materiais

- Fitas cromatográficas ITLC-SG (*Instant Thin Layer Chromatography - Silica Gel*), 5 × 20 cm – Pall Corporation, EUA;
- Fitas cromatográficas TLC-AL (*Thin Layer Chromatography – Alumin*), 20 × 20 cm – Merck, Alemanha;
- Fitas cromatográficas Whatman N°1 – Whatman International Ltd., Inglaterra;
- Mini colunas compactadas C₁₈, Sep-Pak® – Waters, EUA;
- Fitas de pH, Neutralit pH 5-10 – Merck, Alemanha;
- Pipetas automáticas de 10, 100 e 1000 µL – Eppendorf, Alemanha;
- Cubas cromatográficas, 5 × 20 cm;
- Vidrarias em geral e instrumentos cirúrgicos.

3.3. Reagentes

- Radioisótopo tecnécio-99m, obtido do gerador molibdênio-99/tecnécio-99m produzido no Centro de Radiofarmácia (CR) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP), Brasil;
- Solução fisiológica estéril (cloreto de sódio) 0,9% – EquiPLEX, Brasil;
- Análogo da timidina conjugada com o ligante ácido aminodiacético (IDA), sintetizada pelo grupo do Dr. Roger Schibli do Centro de Radiofarmácia, Paul Scherrer Institute, Villigen, Suíça;
- Gás nitrogênio, grau de pureza 99,99% – White Martins, Brasil;
- Gás monóxido de carbono, grau de pureza 99,5% – White Martins, Brasil;

- Borohidreto de sódio, carbonato de sódio, e tartarato de sódio e potássio tetra hidratado – Sigma Aldrich, EUA;
- Fosfato dissódico anidro – Merck, Alemanha;
- Fosfato de sódio monobásico – Merck, Alemanha;
- Cisteína, grau de pureza 98% – Sigma Aldrich, EUA;
- Histidina, grau de pureza 99% – Sigma Aldrich, EUA;
- Heparina (Liquemine®), solução 5000 U.I./mL – Roche, Brasil;
- Acetonitrila, grau de pureza p.a. – Merck, Alemanha;
- Ácido trifluoracético, grau de pureza p.a. – Merck, Alemanha;
- Octanol, grau de pureza p.a. – Merck, Alemanha;
- Metanol, grau de pureza p.a. – Merck, Alemanha;
- Etanol, grau de pureza p.a. – Merck, Alemanha;
- Butanona (metiletilcetona), grau de pureza p.a. – Synth, Brasil;
- Trietilamina, grau de pureza p.a. – Merck, Alemanha;
- Ácido clorídrico, grau de pureza 37% p.a. – Merck, Alemanha;
- Ácido fosfórico, grau de pureza 85% p.a. – Merck, Alemanha.

3.4. Animais

- Camundongos sadios da espécie *Swiss* – Biotério IPEN/CNEN-SP, Brasil;
- Camundongos da espécie *Nude* portadores de célula tumoral de pulmão (A549) – Biotério IPEN/CNEN-SP, Brasil;
- Ratas da espécie *Sprague-Dawley* portadores de tumor de mama – Laboratório de Investigação Médica – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil.

3.5. Métodos

3.5.1. Eluição do radioisótopo ^{99m}Tc

O radioisótopo tecnécio-99m foi eluído de um gerador molibdênio-99/tecnécio-99m ($^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$), fornecido pelo IPEN/CNEN-SP, em solução de cloreto de sódio 0,9% na forma de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$). A atividade foi medida em calibrador de dose padronizado para ^{99m}Tc . Diluições do pertecnetato de sódio foram realizadas de acordo com a atividade e o volume utilizado no estudo. As determinações de pureza química, radioquímica e radionuclídica, assim como o rendimento do gerador, são determinados pela Divisão de Controle de Qualidade do CR. Controles de esterilidade e apirogenicidade também são realizados pela mesma equipe.

3.5.2. Síntese do complexo precursor

O complexo organometálico *fac*-triaquatricarboniltecnécio-99m(I), chamado também de complexo carbonil-tecnécio-99m, $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$, foi sintetizado em duas etapas baseado no protocolo de Alberto e col. (1998)⁽³⁵⁾, com pequenas modificações. Na primeira etapa, foram pesados, em um único frasco, 5,5 mg de borohidreto de sódio (NaBH_4), 4 mg de carbonato de sódio (Na_2CO_3) e 20 mg de tartarato de sódio e potássio ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$); e submetidos à pressão constante de monóxido de carbono (CO) durante 30 min, ou seja, saturação do meio. Na segunda, etapa, chamada de complexação, foi adicionado ao mesmo frasco 1 mL de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$) com atividade de 1110 MBq (30 mCi) e aquecido durante 20 min à temperatura de 75 °C. A reação foi interrompida em banho de gelo e o pH ajustado para 7 com, aproximadamente, 200 μL de uma mistura de HCl 1N e tampão fosfato 1M (2:1).

3.5.3. Otimização da síntese do complexo precursor

A otimização da síntese do complexo precursor foi realizada com variação de seis parâmetros, a saber: 1) tempo submetido ao monóxido de carbono de 30, 45 e 60 min; 2) tempo de reação de 20, 30, 40, 50 e 60 min; 3) atividade do pertecnetato de sódio de 370 MBq a 3700 MBq; 4) massa do borohidreto de sódio de 5,5 e 6,5 mg; 5) variação do pH de 6 a 8; 6) volume do pertecnetato de sódio de 1 e 2 mL. O estudo de cada parâmetro foi realizado somente depois de determinado o melhor resultado do parâmetro anterior.

3.5.4. Marcação da timidina com o complexo precursor

O sal da biomolécula, análogo da timidina (FIG. 8), já sintetizado e conjugado com o ligante ácido aminodiacético (IDA) foi diluído em solução tampão fosfato salina (PBS) 0,2 M (pH 7,4) a uma concentração de 10^{-3} mol/L. Em seguida, foi distribuído em tubos Eppendorf® em pequenas quantidades e congelado em freezer a -20 °C até o seu uso.

A marcação inicial foi realizada com 20 µg do ligante L (onde L = timidina-ácido aminodiacético) e 450 µL do complexo carbonil-tecnécio-99m, previamente preparado. Após agitação, o frasco contendo a mistura foi aquecido durante 30 min à temperatura de 75°C. A reação foi interrompida em banho de gelo. A concentração final do ligante foi de $1,1 \times 10^{-4}$ M e atividade específica de 6,7 GBq/µmol.

3.5.5. Otimização da marcação da timidina com o complexo precursor

A otimização da marcação para a obtenção de um melhor rendimento foi efetuada com a variação de três parâmetros: 1) tempo de reação de 30, 45 e

60 min; 2) massa do ligante (L) de 10, 20 e 50 μg ; 3) volume do complexo carbonil-tecnécio-99m de 250, 350 e 450 μL .

Para a otimização da marcação do ligante (L), o complexo precursor foi preparado com um volume de 1,5 mL e uma atividade de 1110 MBq (30 mCi).

3.5.6. Avaliação radioquímica do complexo precursor e da timidina radiomarcada

A avaliação radioquímica foi realizada por meio de técnicas de cromatografia em papel e em camada delgada ascendente, sendo que, inicialmente, vários solventes e misturas de solventes como fase móvel foram testados. Para a fase estacionária, foram utilizadas as fitas Whatmann N°1, ITLC-SG e TLC-AL.

As fitas de papel ou de camada delgada foram preparadas com 14 cm de comprimento e 1,5 cm de largura, sendo que a amostra foi aplicada nas fitas a uma distância de 1,5 cm da origem com o auxílio de uma seringa e agulha.

Após a aplicação da amostra, as fitas foram suspensas verticalmente com a extremidade inferior imersa na fase móvel apropriada, evitando o contato entre o solvente e o ponto de aplicação da amostra. As cubas foram fechadas e as fitas retiradas após o solvente ascender 10 cm através do papel, impellido por forças capilares. Depois de secas, as fitas foram cortadas em segmentos de 1 cm e colocadas em tubos para contagem da radiação em equipamento tipo poço de NaI(Tl). Todos os ensaios cromatográficos foram realizados em duplicata.

O cálculo radioquímico foi determinado em porcentagem da atividade de cada espécie radioquímica em relação à atividade total da fita, sempre de acordo com o fator de retenção (R_f) correspondente.

A análise qualitativa radioquímica foi avaliada, também, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Neste caso, duas soluções foram utilizadas como fase móvel: a primeira (A), constituída de solução aquosa de ácido trifluoracético 1% e a segunda (B), solução de ácido trifluoracético 1% em acetonitrila. O gradiente inicial utilizado foi de 95% A e 5% B até o tempo de 1 min. No intervalo de 1 a 25 min, a proporção dos solventes foi alterada linearmente para 30% A e 70% B. A partir de 26 min e até o final da corrida (30 min), a proporção foi modificada, novamente linearmente, para 95% A e 5% B. Foi injetado um volume de 10 μ L da amostra para um fluxo de 1 mL/min.

3.5.7. Purificação da timidina radiomarcada

Na purificação e na confirmação da pureza radioquímica da timidina radiomarcada, [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{L})$], foi utilizado o filtro de mini-coluna compactada C₁₈ Sep-Pak®. Para a ativação da coluna, foi injetado 5 mL de etanol e 5 mL de água seguida da mesma quantidade de ar (5 mL), retirando-se, assim, o excesso de solvente retido na coluna. A amostra foi aplicada e as impurezas iônicas foram eluídas com 2 mL de água. O produto final purificado foi eluído com 2 mL de etanol. Todo o processo de purificação foi executado cuidadosa e vagarosamente. O rendimento da purificação pôde ser verificado em calibrador de dose e avaliado por cromatografia em papel e em camada delgada. Para a determinação da porcentagem da atividade recuperada, foram medidas as atividades iniciais do frasco antes da sua purificação.

Para os estudos biológicos *in vivo* e *in vitro*, o complexo purificado foi evaporado com gás inerte (N₂) e, depois, reconstituído com solução fisiológica (NaCl 0,9%) de pH neutro.

3.5.8. Avaliação *in vitro* da estabilidade radioquímica do complexo precursor e da timidina radiomarcada

A estabilidade do precursor $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ foi avaliada à temperatura ambiente com 1, 2, 4 e 6 horas após o seu preparo. Para a timidina radiomarcada, os tempos estudados foram os mesmos do complexo precursor, mas com o acréscimo de mais um tempo (24 h). A pureza radioquímica foi avaliada em cromatografia em papel e camada delgada.

3.5.9. Avaliação *in vitro* da estabilidade radioquímica da timidina radiomarcada em função da cisteína e histidina

A estabilidade radioquímica, frente aos aminoácidos cisteína e histidina, também conhecida como “desafio da cisteína” e “desafio da histidina”, foi determinada com o produto final purificado. Soluções de cisteína ou histidina foram preparadas com solução de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) nas concentrações 300, 30, 3 e 0,3 mM. Aliquotas de 100 μL destas soluções foram misturadas a 100 μL (0,3 mM) do complexo. Desta forma, as razões molares entre cisteína/complexo ou histidina/complexo foram de 1000:1, 100:1, 10:1 e 1:1. Todos os frascos, incluindo o frasco controle contendo apenas o complexo e o tampão fosfato, foram agitados e colocados em estufa a 37 °C. A avaliação radioquímica foi efetuada nos tempos de 1 e 4 h por cromatografia em papel e camada delgada.

3.5.10. Estudo *in vitro* da lipofilicidade da timidina radiomarcada

O estudo de lipofilicidade do $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{L})]^-$ foi realizado por meio do teste de coeficiente de partição (P), utilizando o octanol como solvente orgânico e a água como solvente aquoso.

Uma alíquota de 100 µL da timidina radiomarcada foi adicionada a um frasco cônico (próprio para ser utilizado em centrifugas) contendo 1 mL de octanol e 1 mL de água. O frasco foi homogeneizado e, com a finalidade de se separar as duas fases (aquosa e orgânica), centrifugado à velocidade de 1500 rpm durante 10 min à temperatura ambiente. Após a centrifugação, foi pipetado cuidadosamente, em triplicata, 100 µL de cada fase e colocado em tubos para a contagem da atividade. O coeficiente de partição (P) foi calculado de acordo com a equação 1 e expresso em log P.

$$P = \frac{\text{cpm}(\text{octanol})}{\text{cpm}(\text{água})} \quad (1)$$

onde: cpm = contagem por minuto

3.5.11. Estudo *in vivo* de animais sadios e portadores de tumor

Os animais utilizados nos estudos *in vivo* foram mantidos em gaiolas esterilizadas, forradas com material absorvente freqüentemente trocado, e alimentados com ração comercial adequada e água *ad libitum*. Os ensaios foram realizados com a aprovação do Comitê de Ética do IPEN/CNEN-SP.

Os estudos de biodistribuição animal da timidina radiomarcada foram realizados com três espécies de animais: camundongos Swiss, machos e com massa corpórea entre 20 e 30 g; camundongos machos *Nude* (15-20 g); e ratas *Sprague-Dawley* (230-260 g). Em todos os estudos, os animais foram pesados, a droga injetada pela veia caudal, e os animais sacrificados após um tempo determinado.

Nos camundongos sadios da espécie *Swiss*, o estudo invasivo foi realizado com os tempos de 5, 15 e 30 min, e 1, 2, 4 e 24 h após a administração da droga.

Já para o estudo de biodistribuição em modelo tumoral, foram utilizadas 5×10^6 células de pulmão da linhagem A549, as quais foram inoculadas em camundongos *Nude* com idade aproximada de seis semanas. Após o desenvolvimento do tumor sólido, visível e palpável, os animais foram submetidos ao estudo invasivo realizado com 2 h após a administração da droga.

Foram realizados, também, estudos de biodistribuição em ratas da espécie *Sprague-Dawley* portadoras de tumor mamário. A indução da carcinogênese mamária experimental foi realizada, por gavagem, pela administração de 20 mg de 9,10-dimetil-1,2-benzaantraceno (DMBA). Esta técnica foi desenvolvida no Laboratório de Investigação Médica (LIM-58) da Clínica Ginecológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP)⁽⁸⁵⁾. Os animais foram sacrificados após 1 e 2 h da administração da droga.

Após a eutanásia, os tecidos e órgãos (sangue, coração, pulmão, rins, baço, estômago, pâncreas, fígado, intestino grosso e delgado, músculo, osso e tumor), de todos os animais, foram retirados, pesados e colocados em tubos para que a sua atividade radioativa fosse mensurada em contador do tipo poço de NaI(Tl).

A porcentagem da dose injetada por grama (%DI/g) de cada órgão foi calculada de acordo com a equação 2.

$$\%DI/g = \frac{\text{cpm órgão}}{\text{cpm padrão}} \times \frac{100}{\text{peso órgão}} \quad (2)$$

A porcentagem de dose injetada por mililitro de sangue (%DI/mL sangue) foi calculada de acordo com a equação 3.

$$\%DI/mL \text{ sangue} = \frac{\text{cpm sangue}}{\text{cpm padrão}} \times \frac{100}{0,1 \text{ mL}} \quad (3)$$

O padrão utilizado nas equações 2 e 3 foi preparado com o mesmo volume de droga administrada no animal e colocado para a contagem da atividade no mesmo momento em que a atividade dos órgãos era mensurada.

A porcentagem de dose injetada no sangue total foi calculada para uma volemia de 6,5% do peso corpóreo do animal (equação 4). A porcentagem de dose injetada (%DI) do músculo e do osso total foi calculada assumindo, respectivamente, um volume de 40% e 10% do peso corpóreo do animal (equações 5 e 6).

$$\%DI \text{ sangue total} = \%DI/mL \text{ sangue} \times 0,065 \times \text{peso do animal (g)} \quad (4)$$

$$\%DI \text{ músculo total} = \%DI/g \text{ músculo} \times 0,40 \times \text{peso do animal (g)} \quad (5)$$

$$\%DI \text{ osso total} = \%DI/g \text{ osso} \times 0,10 \times \text{peso do animal (g)} \quad (6)$$

A razão tumor/sangue e tumor/músculo também foi determinada (equações 7 e 8).

$$\text{tumor / sangue} = \frac{\%DI/g \text{ tumor}}{\%DI/mL \text{ sangue}} \quad (7)$$

$$\text{tumor / musculo} = \frac{\%DI/g \text{ tumor}}{\%DI/g \text{ musculo}} \quad (8)$$

4. RESULTADOS

4.1. Eluição do radioisótopo ^{99m}Tc

As atividades dos geradores de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ utilizados variaram entre 18,5 GBq (500 mCi) e 37 GBq (1000 mCi).

O rendimento médio dos geradores utilizados foi superior a 97%, a pureza radioquímica na forma de $^{99m}\text{TcO}_4^- \geq 98\%$, a concentração de alumínio inferior a 10 ppm, e a atividade de $^{99}\text{Mo} < 0,15 \mu\text{Ci}/\text{mCi } ^{99m}\text{Tc}$.

Os resultados das análises de esterilidade e pirogenicidade foram sempre negativos quanto à presença de contaminantes.

4.2. Síntese e otimização do complexo precursor

Na preparação do complexo precursor, $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$, utilizando o gás CO, os primeiros experimentos proporcionaram uma pureza radioquímica de $92,9 \pm 1,2\%$ ($n = 5$) para o precursor.

O primeiro parâmetro investigado para a otimização da síntese do complexo precursor foi o tempo de saturação do meio com o gás CO, onde os sais permaneceram submetidos à pressão constante deste gás. Este parâmetro mostrou uma tendência de aumento da pureza radioquímica do complexo organometálico, como pode ser observado na FIG. 10. No tempo máximo estudado, 60 min, obteve-se o melhor resultado ($95,3 \pm 1,0\%$), fixando-se, assim, este tempo para as marcações subseqüentes, embora a variação esteja próxima ao erro estatístico ou experimental.

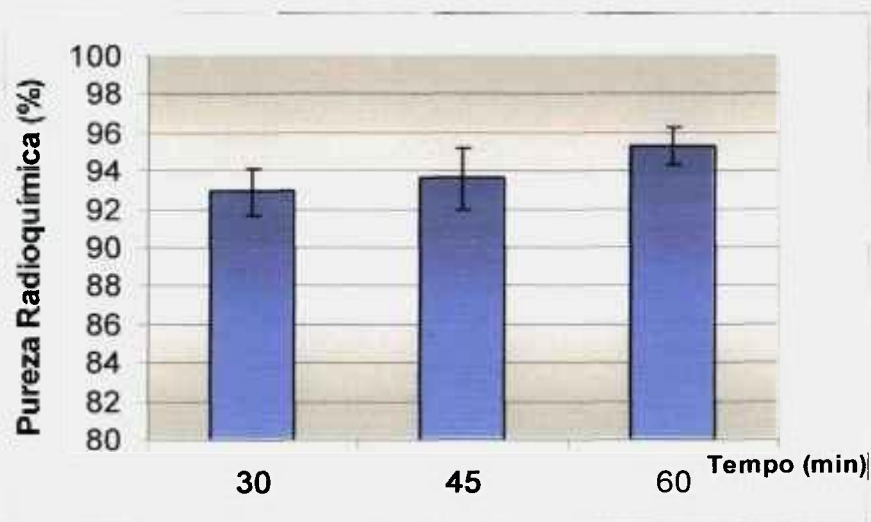


FIGURA 10 – Pureza radioquímica do $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ em função do tempo em que os sais permaneceram submetidos ao gás CO (n = 5)

O tempo de reação foi o segundo parâmetro estudado e pôde-se verificar que ele é um fator que afeta o rendimento do preparo do complexo precursor. O melhor valor foi obtido com 30 min de reação ($97,0 \pm 1,2\%$). Quando o tempo de reação foi superior aos 30 min, observou-se (FIG. 11) um decréscimo no rendimento do complexo precursor. Desta forma, as sínteses futuras foram sempre realizadas com este tempo.

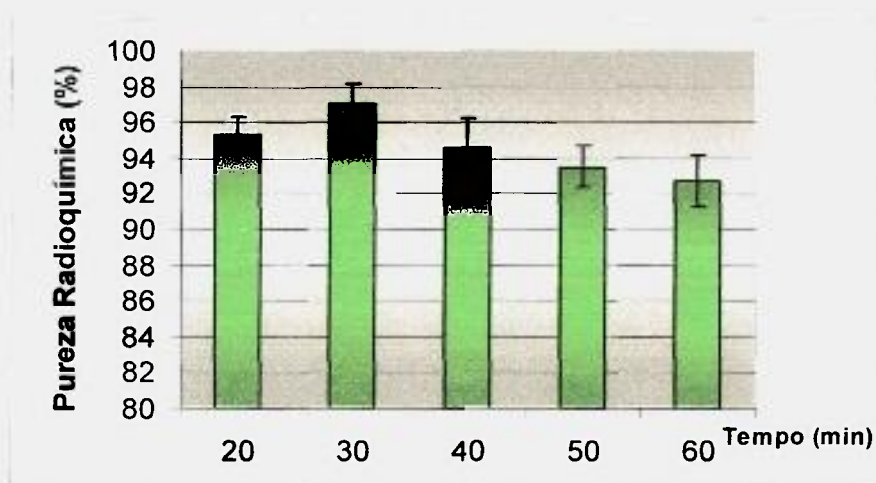


FIGURA 11 – Pureza radioquímica do $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ em função do tempo de reação (n = 5)

Com relação aos valores de atividades do ^{99m}Tc , cujos resultados estão expressos na TAB. 1, constatou-se que para atividades superiores a 1850 MBq, a porcentagem de pureza radioquímica do complexo precursor diminuiu.

TABELA 1 – Pureza radioquímica do complexo precursor em função das atividades de ^{99m}Tc

Atividade (MBq)	Espécies Radioquímicas (% ^a)		
	$^{99m}\text{TcO}_2$	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$
370	1,8 ± 0,7	2,1 ± 0,3	96,1 ± 0,9
740	1,4 ± 0,6	1,9 ± 0,4	96,7 ± 0,9
1110	1,3 ± 0,6	1,7 ± 0,7	97,0 ± 1,2
1850	2,5 ± 0,5	2,7 ± 0,7	94,8 ± 1,1
2960	2,5 ± 0,4	3,1 ± 0,8	94,4 ± 1,0
3700	3,4 ± 0,5	2,8 ± 0,5	93,8 ± 1,0

(a) valores representam médias ± desvio-padrão (n = 5).

A massa do redutor (NaBH_4) foi outro parâmetro examinado (FIG. 12). Ele foi investigado simultaneamente com a atividade do ^{99m}Tc , ou seja, com massas de 5,5 e 6,5 mg, estudou-se a influência de três valores de atividades (740, 1850 e 2960 MBq).

Nesta avaliação, verificou-se que ao aumentar a massa do redutor para 6,5 mg, não se conseguiu uma melhora em termos de pureza radioquímica para nenhuma atividade estudada.

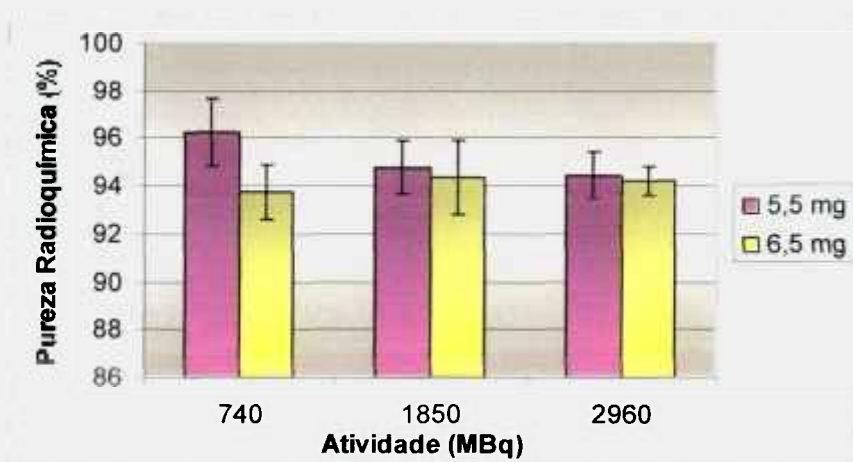


FIGURA 12 – Pureza radioquímica do $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ de diferentes massas de NaBH_4 em função da atividade de ^{99m}Tc (n = 5)

No entanto, com os resultados da variação do pH (TAB. 2), observou-se uma boa estabilidade para o intervalo de pH entre 6,0 e 7,5, e um pequeno decréscimo no rendimento para pH 8,0.

TABELA 2 – Pureza radioquímica do complexo precursor em função do pH final

pH	Espécies Radioquímicas (% ^a)		
	^{99m} TcO ₂	^{99m} TcO ₄ ⁻	^{99m} Tc(CO) ₃ ⁺
6,0	2,5 ± 0,3	2,8 ± 0,5	94,7 ± 0,6
6,5	2,2 ± 0,4	2,4 ± 0,4	95,4 ± 0,8
7,0	2,1 ± 0,8	2,4 ± 0,9	96,4 ± 0,7
7,5	2,4 ± 0,3	3,6 ± 0,6	94,1 ± 0,7
8,0	4,0 ± 0,4	4,9 ± 0,4	91,2 ± 0,7

(a) valores representam médias ± desvio-padrão (n = 5)

A variação do volume de ^{99m}TcO₄⁻ utilizado na preparação do complexo precursor, último parâmetro estudado, não demonstrou nenhuma influência no rendimento final (TAB. 3).

TABELA 3 – Pureza radioquímica do complexo precursor em função de diferentes volumes de ^{99m}Tc

Volume de ^{99m} Tc (mL)	Espécies Radioquímicas (% ^a)		
	^{99m} TcO ₂	^{99m} TcO ₄ ⁻	^{99m} Tc(CO) ₃ ⁺
1	2,4 ± 1,2	1,9 ± 0,2	95,7 ± 1,3
2	2,3 ± 0,6	2,2 ± 0,5	95,6 ± 1,0

(a) valores representam médias ± desvio-padrão (n = 3)

4.3. Marcação e otimização da timidina com o complexo precursor

As primeiras reações entre o ligante L (timidina-ácido aminodiácetico) com o complexo precursor proporcionaram uma pureza radioquímica de 90,7 ± 1,6% (n = 5) para o produto final, [^{99m}Tc(CO)₃(L)]⁻.

A otimização da marcação da timidina foi realizada, inicialmente, variando-se o tempo de reação, que é um importante parâmetro para as marcações com o ^{99m}Tc relacionado ao seu rendimento. Foi estudado o aumento do tempo de reação de 30 min para 45 e 60 min. Na TAB. 4, observa-se que o

melhor tempo de reação foi de 60 min ($93,2 \pm 1,4\%$). Sendo assim, fixou-se este tempo para os estudos posteriores.

TABELA 4 – Pureza radioquímica da timidina radiomarcada em função do tempo de reação

Tempo de reação (min)	Espécies Radioquímicas (% ^a)			
	^{99m} TcO ₂	^{99m} TcO ₄ ⁻	[^{99m} Tc(CO) ₃] ⁺	[^{99m} Tc(CO) ₃ (L)]
30	0,6 ± 0,3	4,7 ± 1,0	4,1 ± 0,6	90,7 ± 1,6
45	0,7 ± 0,3	5,4 ± 1,2	3,2 ± 1,0	90,8 ± 1,9
60	0,4 ± 0,1	4,3 ± 0,7	2,1 ± 0,9	93,2 ± 1,4

(a) valores representam média ± desvio-padrão (n = 5).

A variação da massa do ligante (L) também foi investigada para um valor inferior (10 µg) e superior (50 µg) a utilizada na marcação inicial, cujos resultados estão apresentados na TAB. 5.

TABELA 5 – Pureza radioquímica da timidina radiomarcada em função das massas do ligante (L) utilizado

Parâmetros do complexo final			Espécies Radioquímicas (% ^a)			
Massa do ligante (µg)	Concentração final do ligante (mol/L)	Atividade Específica (GBq/µmol)	^{99m} TcO ₂	^{99m} TcO ₄ ⁻	^{99m} Tc(CO) ₃ ⁺	[^{99m} Tc(CO) ₃ (L)]
10	$0,5 \times 10^{-4}$	13,3	0,6±0,3	3,0±0,8	4,4±1,5	92,6±1,5
20	$1,1 \times 10^{-4}$	6,7	0,4±0,1	4,3±0,7	2,1±0,9	93,2±1,4
50	$2,6 \times 10^{-4}$	2,7	0,3±0,1	3,9±0,8	1,6±0,7	94,1±1,6

(a) valores representam média ± desvio-padrão (n = 5).

O aumento da massa do ligante proporcionou um pequeno aumento da pureza radioquímica. Contudo, diminuiu bastante a atividade específica do complexo que é um fator preponderante dos radiofármacos. Mesmo assim, fixou-se este parâmetro em 50 µg do ligante para as marcações futuras devido ao ganho de 1,5 ponto percentual na pureza radioquímica, se comparado com a massa de 10 µg do ligante.

Na tentativa de se obter uma maior atividade específica, alguns experimentos (n = 5) foram realizados com as mesmas massas de ligantes (20 e

50 µg), mas com um complexo precursor sintetizado com atividade elevada (2960 MBq). A atividade específica alcançada foi de 17,8 GBq/µmol (L = 20 µg) e 7,1 GBq/µmol (L = 50 µg). No entanto, a pureza radioquímica foi de apenas 87,8 ± 0,7% e 92,4 ± 2,0%, respectivamente.

Estudos de marcação do ligante (L) com a utilização de diferentes volumes do complexo carbonil-tecnécio-99m também foram efetuados (TAB. 6). Porém, observou-se que o volume do complexo precursor não apresentou influência em seu resultado final. As marcações foram executadas com os parâmetros fixados anteriormente (60 min de reação e 50 µg do ligante).

TABELA 6 – Pureza radioquímica da timidina radiomarcada em função do volume do complexo precursor utilizado

Volume Precursor (µL)	Parâmetros do complexo final		Espécies Radioquímicas (% ^a)			
	Concentração final do ligante (mol/L)	Atividade Específica (GBq/µmol)	^{99m} TcO ₂	^{99m} TcO ₄ ⁻	^{99m} Tc(CO) ₃ ⁺	[^{99m} Tc(CO) ₃ (L)]
250	4,6 × 10 ⁻⁴	1,5	0,4±0,1	3,8±0,6	1,8±0,7	94,0±1,2
350	3,4 × 10 ⁻⁴	2,1	0,3±0,1	3,9±0,8	1,8±1,0	94,0±1,7
450	2,6 × 10 ⁻⁴	2,7	0,3±0,1	3,9±0,8	1,6±0,7	94,1±1,6

(a) valores representam média ± desvio-padrão (n = 5).

As concentrações finais obtidas nos dois últimos estudos (TAB. 5 e 6) em função da pureza radioquímica (%) estão apresentados, também, na FIG. 13. O que se pôde verificar é que houve um ligeiro aumento do rendimento quando a concentração foi quintuplicada de 0,05 para 0,26 mM. No entanto, acima deste valor, o rendimento se manteve constante.

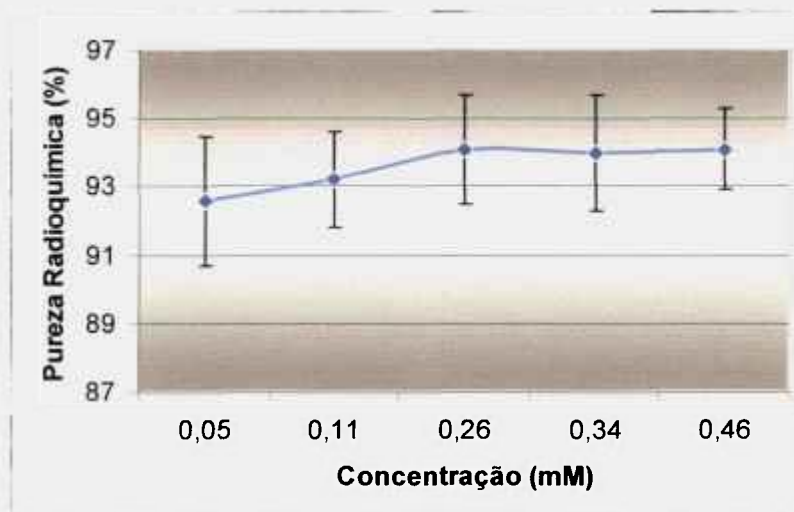


FIGURA 13 – Pureza radioquímica do $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{L})]^-$ em função da concentração final do ligante

4.4. Avaliação radioquímica do complexo precursor e da timidina radiomarcada

Nos ensaios realizados por meio de cromatografia em papel e em camada delgada, foram testados diferentes sistemas cromatográficos de maneira a definir o sistema que fornecesse a melhor separação entre as diversas espécies radioquímicas presentes na amostra em estudo. Na TAB. 7, são apresentadas as fases móveis, estacionárias e os fatores de retenção (R_f) para as diferentes espécies radioquímicas.

Analisando-se a TAB. 7, pôde-se observar que, ao juntar os sistemas 4, 6 e 10, tem-se bem definidas e isoladas cada espécie radioquímica. No sistema 4, foi definido o $^{99m}\text{TcO}_2$ ($R_f = 0$), no sistema 10, o $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ($R_f = 0,9/1$), e no sistema 6, o precursor $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ ($R_f=0/0,1$). A porcentagem da pureza radioquímica do $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{L})]^-$ foi determinada subtraindo todas as impurezas radioquímicas presentes da porcentagem total.

TABELA 7 – Fase móvel, fase estacionária e fatores de retenção das diferentes espécies radioquímicas

Sistemas	Fase Estacionária	Fase Móvel	R _f			
			^{99m} TcO ₂	^{99m} TcO ₄ ⁻	[^{99m} Tc(CO) ₃] ⁺	[^{99m} Tc(CO) ₃ (L)] ⁻
1	Whatman	MeOH/HCl conc (99:1)	0	0,7/0,8	0,9/1,0	0,8/0,9
2	ITLC-SG	MeOH/HCl conc (99:1)	0	0,9/1,0	0,9/1,0	0,9/1,0
3	TLC-AI	MeOH/HCl conc (99:1)	0	0,8/0,9	0,4/0,5	0,9/1,0
4	Whatman	MeOH/HCl 6M (99,5:0,5)	0	0,4/0,5	0,7/0,8	0,7/0,8
5	ITLC-SG	MeOH/HCl 6M (99,5:0,5)	0	0,9/1,0	0,9/1,0	0,9/1,0
6	TLC-AI	MeOH/HCl 6M (99,5:0,5)	0	0,8/0,9	0/0,1	0,7/0,8
7	Whatman	MeOH/HCl 1M (100:4)	0	0,5/0,6	0,7/0,8	0,7/0,8
8	ITLC-SG	MeOH/HCl 1M (95:5)	0	0,9/1,0	0,9/1,0	0,9/1,0
9	Whatman	Butanol	0	0/0,1	0,8/1,0	0/0,2
10	TLC-AI	Butanol	0	0,9/1,0	0/0,2	0/0,2
11	Whatman	Butanona	0	0,8/0,9	0/0,1	0/0,1
12	ITLC-SG	Butanona	0	0,9/1,0	0,9/1,0	0/0,2
13	TLC-AI	Butanona	0	0,9/1,0	0/0,3	0/0,2

O controle de qualidade do complexo precursor e da timidina radiomarcada também foi realizado em HPLC para alguns ensaios, sendo que no radiocromatograma (FIG. 14), pôde-se observar os tempos de retenção para as três espécies radioquímicas, [^{99m}TcO₄]⁻, [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺ e [^{99m}Tc(CO)₃(L)]⁻, que foram, respectivamente, 5,3 min, 17,1 min e 14,8 min.

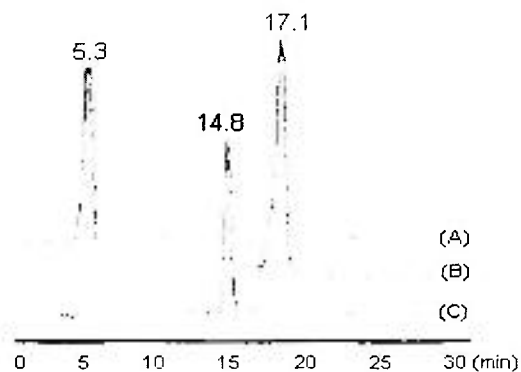


FIGURA 14 – Radiocromatogramas do ^{99m}TcO₄⁻ (A), [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺ (B) e [^{99m}Tc(CO)₃(L)]⁻ (C)

4.5. Purificação da timidina radiomarcada

A purificação da timidina radiomarcada foi realizada utilizando-se dois solventes, água e etanol. O aproveitamento radioativo no processo de purificação da timidina radiomarcada foi da ordem de 75%. O percentual da atividade em cada solvente e na coluna C₁₈ (filtro) pode ser observado na TAB. 8.

TABELA 8 – Resultados da purificação da timidina radiomarcada

Solvente/Filtro	Percentual da Atividade (% ^a)
Água	5,0 ± 1,3
Etanol	93,7 ± 1,4
Filtro	1,3 ± 0,5

(a) valores representam média ± desvio-padrão (n = 10).

4.6. Avaliação *in vitro* da estabilidade radioquímica do complexo precursor e da timidina radiomarcada

Os resultados apresentados na FIG. 15 demonstraram que tanto o complexo precursor, quanto a timidina radiomarcada, apresentaram uma pequena diminuição na pureza radioquímica em até 6 h de incubação. A timidina radiomarcada apresentou ser bastante estável em até 24 h.

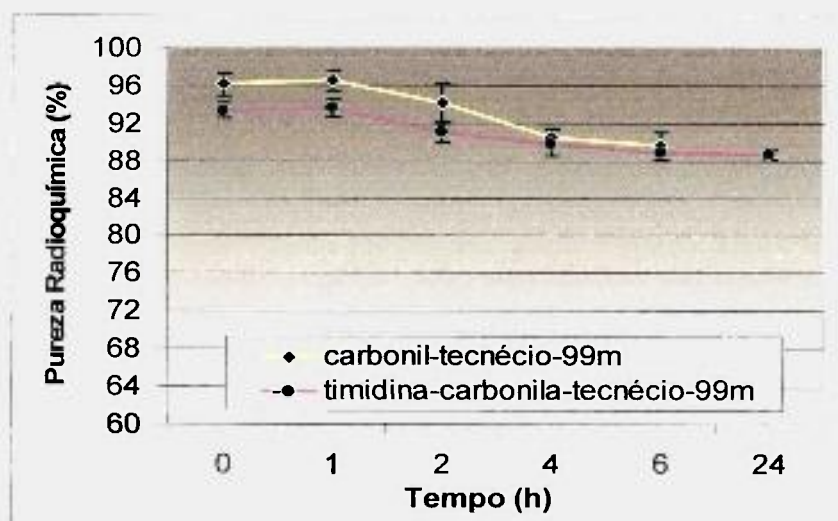


FIGURA 15 – Estabilidade radioquímica do complexo precursor e da timidina radiomarcada (n = 5)

4.7. Avaliação *in vitro* da estabilidade radioquímica da timidina radiomarcada em função da cisteína e histidina

Os ensaios “desafio da cisteína” e “desafio da histidina” também confirmaram uma relativa estabilidade radioquímica da timidina radiomarcada frente a estes aminoácidos (TAB. 9 e 10).

TABELA 9 – Estabilidade da timidina radiomarcada em função da cisteína

Concentração Cisteína (mM)	Razão Molar (cisteína/complexo)	Pureza Radioquímica (% ^a)	
		1 h	4 h
0	0:1	96,7 ± 1,2	93,0 ± 1,9
0,3	1:1	96,4 ± 1,3	92,8 ± 1,1
3	10:1	95,9 ± 1,3	91,2 ± 2,1
30	100:1	94,2 ± 1,2	88,3 ± 2,8
300	1000:1	88,3 ± 1,3	83,2 ± 2,7

(a) valores representam média ± desvio-padrão (n = 5).

Com a cisteína, obteve-se estabilidade para concentrações de até 30 mM com 1 h de incubação, e pureza radioquímica superior aos 94%. Porém, quando a concentração foi elevada para 300 mM, a pureza radioquímica foi inferior aos 90%. Na avaliação com 4 h de incubação, ocorreu uma discreta perda da estabilidade para todas as concentrações estudadas, aproximando-se dos 80% de pureza radioquímica para 300 mM de cisteína.

TABELA 10 – Estabilidade da timidina radiomarcada em função da histidina

Concentração Histidina (mM)	Razão Molar (histidina/complexo)	Pureza Radioquímica (% ^a)	
		1 h	4 h
0	0:1	96,1 ± 1,0	92,8 ± 2,2
0,3	1:1	93,4 ± 2,0	91,9 ± 2,9
3	10:1	91,6 ± 2,8	90,3 ± 2,8
30	100:1	91,1 ± 2,3	85,7 ± 2,4
300	1000:1	87,8 ± 1,9	82,1 ± 2,1

(a) valores representam média ± desvio-padrão (n = 5).

Com relação ao estudo de estabilidade com a histidina, os resultados foram semelhantes aos obtidos com a cisteína, isto é, uma perda de oito pontos percentuais com 1 h de incubação e de onze pontos percentuais com 4 h de incubação em soluções de concentrações de até 300 mM.

4.8. Estudo *in vitro* da lipofilicidade da timidina radiomarcada

O resultado do estudo *in vitro* da lipofilicidade revelou que a timidina radiomarcada é hidrofílica, apresentando um coeficiente de partição (log P) de $-1,48 \pm 0,08$ (n = 5).

4.9. Estudo *in vivo* de animais sadios e portadores de tumor

Os resultados do estudo da biodistribuição da timidina radiomarcada injetado em camundongos *Swiss* sadios, em termos de porcentagem de dose injetada por grama (%DI/g), encontram-se na TAB. 11, assim como em termos de porcentagem de dose injetada por órgão (%DI/órgão) na FIG. 16.

TABELA 11 – Biodistribuição (%DI/g)^a da timidina radiomarcada em camundongos *Swiss* sadios em função do tempo

Órgão ou Tecido	5 min	15 min	30 min	
Sangue ^b	1,97 ± 0,48	0,52 ± 0,24	0,12 ± 0,05	
Coração	0,94 ± 0,36	0,33 ± 0,10	0,18 ± 0,05	
Pulmão	1,66 ± 0,37	0,61 ± 0,24	0,27 ± 0,07	
Rins	27,50 ± 4,12	5,79 ± 1,13	1,34 ± 0,32	
Baço	1,44 ± 0,30	0,31 ± 0,08	0,28 ± 0,11	
Estômago	4,73 ± 1,18	3,14 ± 0,32	2,31 ± 0,40	
Pâncreas	1,34 ± 0,61	0,81 ± 0,21	0,75 ± 0,35	
Fígado	10,38 ± 1,32	8,86 ± 1,45	3,85 ± 1,83	
Intestino Grosso	2,09 ± 0,71	1,07 ± 0,51	1,58 ± 0,27	
Intestino Delgado	7,83 ± 1,19	28,65 ± 2,22	22,34 ± 2,03	
Músculo	0,44 ± 0,05	0,32 ± 0,05	0,33 ± 0,15	
Osso	0,63 ± 0,20	0,59 ± 0,13	0,35 ± 0,15	

Órgão ou Tecido	1 h	2 h	4 h	24 h
Sangue ^b	0,09 ± 0,02	0,05 ± 0,03	0,04 ± 0,02	0,02 ± 0,01
Coração	0,14 ± 0,09	0,13 ± 0,06	0,08 ± 0,05	0,02 ± 0,01
Pulmão	0,16 ± 0,05	0,10 ± 0,04	0,09 ± 0,04	0,03 ± 0,02
Rins	0,88 ± 0,19	0,84 ± 0,20	0,61 ± 0,12	0,20 ± 0,11
Baço	0,22 ± 0,07	0,21 ± 0,09	0,17 ± 0,05	0,03 ± 0,02
Estômago	0,66 ± 0,20	0,54 ± 0,21	0,31 ± 0,15	0,14 ± 0,05
Pâncreas	0,48 ± 0,29	0,42 ± 0,18	0,19 ± 0,13	0,03 ± 0,01
Fígado	3,60 ± 2,20	2,39 ± 1,07	1,17 ± 0,46	0,50 ± 0,19
Intestino Grosso	1,64 ± 1,08	2,02 ± 1,13	14,27 ± 4,28	1,42 ± 0,82
Intestino Delgado	22,99 ± 5,40	19,61 ± 3,75	2,54 ± 1,08	0,42 ± 0,24
Músculo	0,15 ± 0,03	0,13 ± 0,07	0,09 ± 0,04	0,02 ± 0,01
Osso	0,23 ± 0,08	0,19 ± 0,08	0,15 ± 0,05	0,03 ± 0,01

(a) valores representam média ± desvio-padrão (n = 5)

(b) %DI/mL

Analisando-se o tempo de 5 min após a administração da droga pôde-se observar que a maior captação ocorreu nos órgãos de excreção renal ou hepática (rins, fígado, intestino e estômago). Verificou-se, também, uma rápida depuração sanguínea após os 30 min.

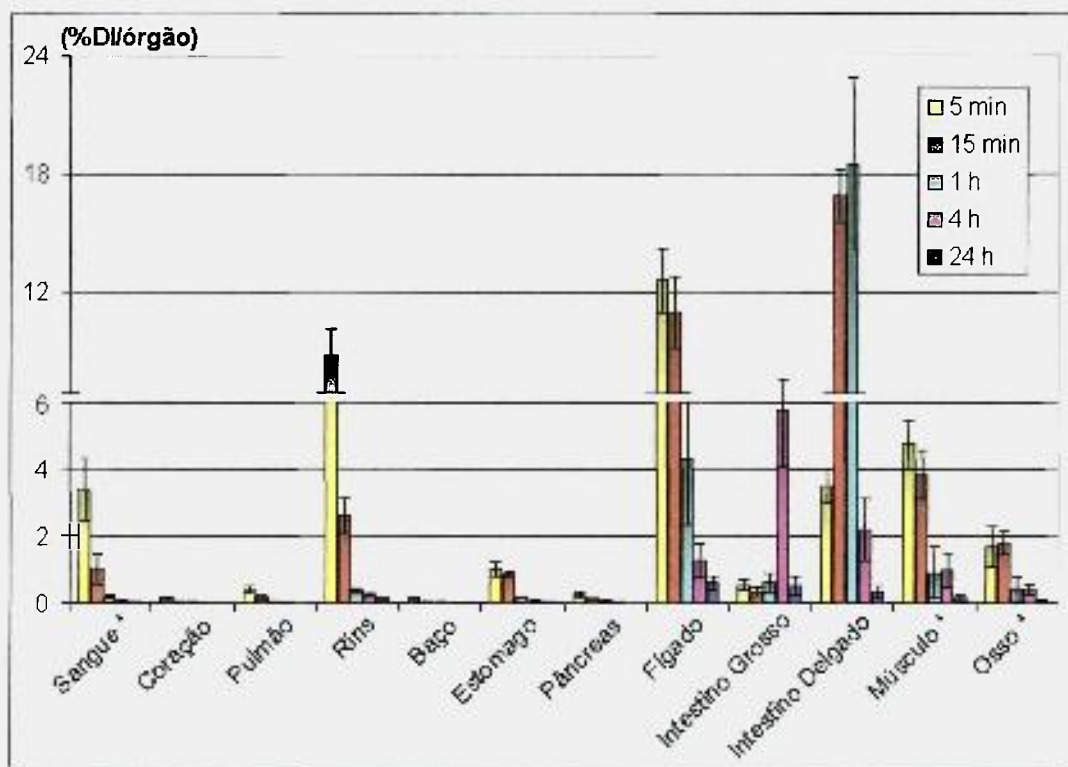


FIGURA 16 – Biodistribuição (%DI/órgão) da timidina radiomarcada em camundongos Swiss sadios em função do tempo após a administração da droga (*) sangue, músculo e osso total

A avaliação da droga 2 h após sua administração em animais portando tumor de pulmão (TAB. 12) caracterizou-se pela alta captação intestinal. A captação da droga no tumor foi de 0,28 %DI/g, a razão tumor/músculo e tumor/sangue de 1,56 e 0,18, respectivamente. Na FIG. 17, pode-se verificar uma comparação entre os estudos com animais sadios e portadores de tumor de pulmão, em que a captação da droga em órgãos de animais sadios foi sempre inferior à captação em animais com tumor, com exceção do intestino.

TABELA 12 – Biodistribuição da timidina radiomarcada em camundongos *Nude* portando célula tumoral de pulmão (A549) 2 h após a administração da droga

Órgão ou Tecido	%DI/g ^a
Sangue ^b	1,54 ± 0,56
Coração	0,79 ± 0,12
Pulmão	2,06 ± 0,55
Rins	1,50 ± 0,16
Baço	0,63 ± 0,15
Estômago	1,05 ± 0,57
Pâncreas	1,12 ± 0,53
Fígado	3,67 ± 1,14
Intestino	13,89 ± 1,46
Músculo	0,18 ± 0,06
Tumor	0,28 ± 0,10
Sangue total (6,5% ^c)	1,73 ± 0,61
Músculo total (40% ^c)	1,27 ± 0,34

(a) valores representam médias ± desvio-padrão (n = 5)

(b) %DI/mL

(c) do peso do camundongo

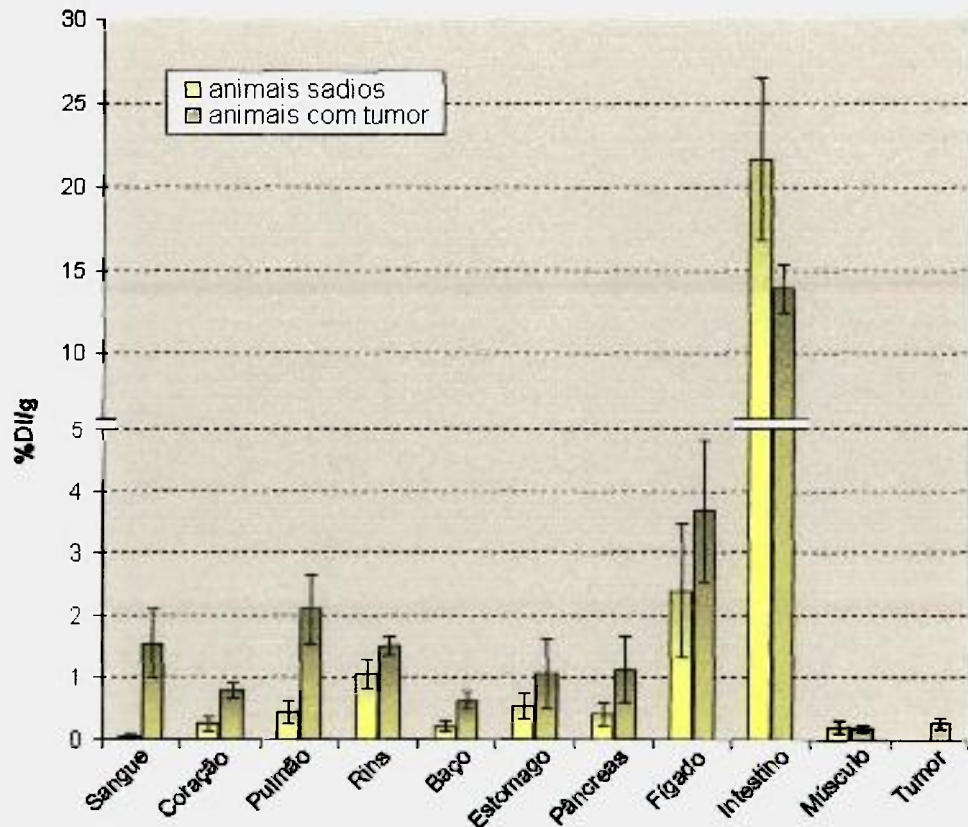


FIGURA 17 – Biodistribuição (%DI/g) da timidina radiomarcada em camundongos saudáveis em função dos camundongos com tumor de pulmão 2 h após a administração da droga

Os resultados da biodistribuição em ratas *Sprague-Dawley* com tumor de mama mostraram que a captação tumoral foi de 0,18 %DI/g com excreção renal da droga (TAB. 13). A razão tumor/sangue e tumor/músculo para os estudos de 1 h e 2 h foram 0,7 e 2,3, e 0,6 e 2,1, respectivamente.

TABELA 13 – Biodistribuição (%DI/g)^a da timidina radiomarcada em ratas *Sprague-Dawley* com tumor de mama em função do tempo após a administração da droga

Órgão ou Tecido	1 h	2 h
Sangue ^b	0,25 ± 0,04	0,20 ± 0,05
Coração	0,10 ± 0,02	0,09 ± 0,06
Pulmão	0,18 ± 0,06	0,17 ± 0,10
Rins	7,52 ± 0,88	1,67 ± 0,01
Baço	0,11 ± 0,02	0,09 ± 0,04
Estômago	0,28 ± 0,11	0,30 ± 0,09
Fígado	0,58 ± 0,22	0,36 ± 0,15
Intestino Grosso	0,21 ± 0,05	0,18 ± 0,06
Intestino Delgado	1,51 ± 0,32	1,44 ± 0,24
Músculo	0,08 ± 0,02	0,07 ± 0,02
Osso	0,07 ± 0,02	0,06 ± 0,02
Tumor	0,18 ± 0,02	0,15 ± 0,02
Sangue total (6,5% ^c)	3,83 ± 0,57	3,25 ± 0,72
Músculo total (40% ^c)	7,29 ± 1,95	7,11 ± 1,63
Osso total (10% ^c)	1,70 ± 0,52	1,52 ± 0,51

(a) valores representam médias ± desvio-padrão (n = 3)

(b) %DI/mL

(c) do peso do camundongo

5. DISCUSSÃO

O ^{99m}Tc foi o principal radionuclídeo na Medicina Nuclear por, aproximadamente, quatro décadas, e ainda mantém esta posição privilegiada, principalmente no Brasil, embora isto possa ser modificado em um futuro próximo⁽¹⁷⁾.

Esta incógnita sobre o futuro do ^{99m}Tc tem gerado grande interesse na comunidade científica, como pôde ser observado em alguns dos Simpósios e Congressos de Medicina Nuclear^(16,17,38,45,86). No entanto, esta preocupação não está relacionada com a qualidade dos radiofármacos de ^{99m}Tc , mas sim, com a grande ascensão do uso da PET.

Apesar da PET ter apresentado excelentes resultados no diagnóstico de algumas doenças – principalmente o câncer –, ela possui algumas limitações que devem ser consideradas.

O primeiro aspecto é o fato dela apresentar um custo econômico muito elevado, tanto quanto ao equipamento como quanto para os exames. No Brasil, ainda são poucos os hospitais ou clínicas que possuem um equipamento PET.

Outra característica é a de que os radiotraçadores empregados em PET devem possuir radionuclídeos emissores de pósitron, o que acaba limitando a sua aplicação e o desenvolvimento de novos radiofármacos com função biológica pré-determinada. Muitas vezes, um único radiotraçador é utilizado para diagnosticar várias doenças, não apresentando uma especificidade, como por exemplo, o ^{18}F [FDG].

O $t_{1/2}$ curto, presente na maioria dos radionuclídeos emissores de pósitron, é outra limitação que faz com que apenas os hospitais localizados próximo aos centros de pesquisas possam adquirir os radiotraçadores.

Diante destas desvantagens ou dificuldades do uso da técnica PET, o ^{99m}Tc , provavelmente, ainda será, por mais alguns anos, o principal radionuclídeo utilizado em imagens moleculares.

Ainda assim, se com o passar do tempo a utilização da PET for inevitável, as pesquisas envolvendo o tecnécio não devem ser extintas, já que grandes avanços tecnológicos para a preparação e utilização do radioisótopo ^{94m}Tc (emissor de pósitron de $t_{1/2} = 53$ min) já foram obtidos. Esta é uma excelente oportunidade, pois os mesmos radiofármacos de ^{99m}Tc poderiam ser marcados com o ^{94m}Tc e apresentar as mesmas especificidades biológicas que os atuais de ^{99m}Tc ^(2,87).

Análogos da timidina marcadas com ^{11}C e ^{18}F estão sendo investigados e utilizados para a obtenção de imagens oncológicas devido à sua incorporação ao DNA, o qual promove um importante mecanismo para mensurar a proliferação celular e o comportamento de tumores^(80,88). Sabendo-se das dificuldades que os radioisótopos emissores de pósitron possuem, resolveu-se investigar, neste trabalho, a possibilidade do emprego da timidina marcada com o ^{99m}Tc , utilizando a promissora técnica do complexo precursor desenvolvida por Alberto e col. (1998)⁽³⁵⁾.

5.1 Eluição do radioisótopo ^{99m}Tc

Os geradores de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ são produzidos no IPEN-SP há vários anos e nos últimos sete, com a Certificação de Qualidade ISSO-9001. São

produzidos, atualmente, 270 geradores semanais aprovados pela Divisão de Controle de Qualidade e liberados para o seu uso em pacientes.

O controle físico-químico e radioquímico indicaram que todos os parâmetros analisados estão dentro da faixa estabelecida pela XXVIII Edição da Farmacopéia Americana (USP).

A presença de eventuais impurezas radionuclídicas está relacionada com o modo de produção do radionuclídeo ou com uma preparação inadequada dos geradores. A presença de ^{99}Mo no eluído de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ é um exemplo de impureza radionuclídica. Estas impurezas aumentam a dose de radiação para o paciente e podem interferir na qualidade das imagens⁽⁶⁾.

Já as impurezas radioquímicas têm origem na decomposição dos radiofármacos, devido à ação do solvente, temperatura, pH, luz, presença de agentes oxidantes ou redutores, e radiólise⁽⁶⁾. A definição de pureza radioquímica é o percentual do radionuclídeo na forma química de interesse em uma determinada amostra radioativa. Desta forma, as impurezas radioquímicas encontradas nas marcações que utilizam a técnica do complexo carbonil-tecnécio- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ são: $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$, $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ e $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$. A presença destas espécies radioquímicas também diminui a qualidade da imagem e aumenta a dose de radiação para o paciente.

5.2 Síntese e otimização do complexo precursor

Algumas vantagens podem ser observadas quando a preparação de um radiofármaco é realizada a partir do complexo precursor: o núcleo $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ é pequeno e solúvel em água; os seus ligantes aqua são lábeis possibilitando a rápida substituição por outros ligantes desejados; o núcleo

apresenta uma geometria simétrica, o que mantém sua estabilidade quando submetido a variações do meio reacional; o núcleo pode proporcionar uma atividade específica elevada; e apresenta também relativa facilidade de síntese, desenvolvida por Alberto e col. (1998)⁽³⁵⁾ e favorecida com o kit IsoLink®^(13,24,32,39).

No presente trabalho, os primeiros ensaios da síntese do complexo precursor mostraram uma pureza radioquímica de $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ relativamente baixa (92,9%) se comparada com os $\geq 95\%$ encontrado na literatura^(5,8,22,27,35,41,43,50). Esta divergência no resultado pode estar relacionada às diferentes condições empregadas inicialmente. Por meio dos estudos de otimização, nos quais foram investigados os parâmetros que realmente influenciavam no rendimento do preparo do complexo precursor, pôde-se obter resultados em níveis de 97% de pureza radioquímica.

A otimização de uma marcação radioquímica é realizada com a finalidade de se obter uma máxima pureza radioquímica e conseqüentemente evitar a etapa de purificação do produto, o que demandaria maiores tempos para manipulação da substância radioativa e para o uso imediato do radiofármaco.

No caso do complexo precursor, o estudo da otimização foi realizado, também, para se obter o melhor rendimento para a sua subsequente utilização na marcação da biomolécula timidina.

A influência do gás CO nos sais foi o primeiro parâmetro averiguado por ser a primeira etapa da preparação do complexo precursor. Ao se analisar o gráfico da pureza radioquímica do complexo carbonil-tecnécio-99m em função do gás CO (FIG. 10), pôde-se observar que este tempo foi diretamente proporcional ao rendimento do complexo precursor. No entanto, tempos superiores aos 60 min

não foram estudados porque o período de síntese do complexo precursor, neste caso, seria muito longo, dificultando, desta forma, os ensaios subseqüentes.

Depois de definido o parâmetro do gás CO, resolveu-se investigar a influência do tempo de reação no rendimento do complexo precursor. Verificou-se (FIG. 11) que, após os 30 min de reação, a pureza radioquímica foi prejudicada, chegando em níveis de 93% com 60 min. Este comportamento pode estar ligado à decomposição ou reoxidação da espécie radioquímica $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$, que acontece em elevadas temperaturas logo após o tempo de reação de 30 min, justificando, assim, o uso do banho de gelo para interromper a reação.

Os ensaios de otimização do complexo precursor estavam sendo realizados como a atividade de 1110 MBq (30 mCi) de ^{99m}Tc . No entanto, esta atividade é considerada baixa para os ensaios *in vivo* (invasivos e imagens) que seriam realizados posteriormente. Desta forma, resolveu-se pesquisar a influência da atividade do ^{99m}Tc na síntese do complexo precursor.

Através dos resultados obtidos (TAB. 1), demonstrou-se infelizmente, que ao aumentar a atividade do ^{99m}Tc para até 3700 MBq (100 mCi), a pureza radioquímica do $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ decaiu dos 97% para, aproximadamente, 94%. Uma hipótese para esta diminuição da pureza radioquímica pode estar relacionada à baixa concentração do agente redutor, borohidreto de sódio, já que com a elevada atividade de ^{99m}Tc , este reagente não seria suficiente para reduzir todo o radioisótopo presente.

Diante desta nova dificuldade, resolveu-se estudar a relação entre a massa do redutor com a atividade do ^{99m}Tc . Para tanto, foram analisadas duas massas de redutor (5,5 e 6,5 mg) com três valores de atividades: uma atividade

considerada baixa (740 MBq); uma atividade considerada mediana (1850 MBq); e outra alta (2960 MBq).

Contudo pôde-se observar (FIG. 12) que com o aumento da massa do agente redutor para 6,5 mg, a pureza radioquímica não teve crescimento, o que não confirma a hipótese inicial. Ainda, pôde-se verificar um decréscimo na pureza radioquímica com este aumento da massa do redutor para a atividade de 740 MBq, o que já era esperado, pois o excesso de redutor favorece o aumento da impureza coloidal $^{99m}\text{TcO}_2$.

Para algumas marcações de biomoléculas que utilizam o radioisótopo ^{99m}Tc , o pH é um dos principais fatores que alteram o rendimento e a pureza radioquímica dos produtos. No entanto, verificou-se (TAB. 2) que não houve variação considerável no rendimento da reação no intervalo de pH entre 6,0 e 7,5; quando o pH do meio é igual a 8,0 verificou-se uma pequena diminuição no rendimento.

Todavia, estudos de Alberto e col. (1999)⁽¹¹⁾ asseguraram que o complexo precursor é estável por horas na faixa de pH de 2 a 12 em temperatura ambiente. Porém em temperaturas elevadas e com um pH >10 o complexo precursor sofre hidrólise quase que imediatamente.

O pH é muito importante para a estabilidade do produto e deverá estar próximo ao pH sanguíneo (~7,4). Contudo, a característica tamponante do sangue permite um alargamento da faixa de pH⁽⁶⁾. Isso justifica o ajuste final do pH do complexo precursor em ~7,0, uma vez que a sua síntese acontece em meio alcalino devido ao sal borohidreto de sódio. O pH da preparação é, normalmente, medido com papel indicador, o que evita a exposição do experimentador à radiação e a contaminação do material de medida⁽⁶⁾.

Apesar do ^{99m}Tc ser eluído diariamente, o gerador é produzido semanalmente e calibrado para a sua primeira eluição na segunda-feira. Desta forma, com o passar dos dias, a atividade do gerador decai de acordo com o $t_{1/2}$ do ^{99}Mo , sendo que na quinta-feira sua atividade já está abaixo de 50% da inicial. Diante desta propriedade física dos geradores, os ensaios que necessitariam de maiores atividades, como os de biodistribuição, teriam de fazer uso de maiores volumes de ^{99m}Tc para a síntese do complexo precursor, suprindo, assim, a carência de atividade. Este fato justificou o estudo da influência do volume de ^{99m}Tc .

No entanto, esse parâmetro não influenciou na pureza radioquímica do complexo precursor o que favorece os experimentos que necessitem de maiores volumes ou maiores atividades (TAB. 3).

Terminando a análise de todos os parâmetros da síntese do complexo precursor, ficou definido o seguinte protocolo final: 5,5 mg de NaBH_4 ; 4 mg de Na_2CO_3 ; 20 mg de $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 60 min de gás CO ; 1 a 2 mL de $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ (370 a 1110 MBq); 30 min de reação (75 °C); e ajuste final para pH $\sim 7,0$. Realizado desta forma, a pureza radioquímica do complexo precursor foi de $97 \pm 1,2\%$.

5.3 Marcação e otimização da timidina com o complexo precursor

São poucas as referências bibliográficas encontradas na literatura no que diz respeito à marcação e aplicação do nucleosídeo timidina com o radioisótopo ^{99m}Tc , principalmente utilizando a técnica do complexo organometálico $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$. Desta forma, os resultados aqui discutidos não foram confrontados com muitos outros trabalhos.

A marcação do análogo da timidina com o complexo precursor não proporcionou, inicialmente, uma boa pureza radioquímica de $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{L})]^-$. O resultado de 90,7% pode ser justificado devido ao curto tempo de reação utilizado (30 min).

Tomando por base a TAB. 4, resultados do primeiro parâmetro investigado na otimização, pôde-se confirmar a afirmação de que 30 min de reação não eram suficientes para a substituição do ligante aqua do complexo precursor pelo ligante L (biomolécula). Observou-se que, com 45 e 60 min de reação, o percentual da espécie radioquímica $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ foi maior do que com os 30 min iniciais. Schibli e col. (2003)⁽⁶⁸⁾ também realizaram reações entre os análogos da timidina com o complexo carbonil-tecnécio-99m em um tempo de reação de 60 min, obtendo resultados muito parecidos com os aqui apresentados.

Durante o preparo do complexo precursor, com 1110 MBq de $^{99\text{m}}\text{Tc}$, observou-se a presença de 1,3% de $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ (TAB. 1). Esta impureza radioquímica pode ter se transformado em $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ durante a reação com o ligante L (TAB. 4). Alberto e col (1997)⁽¹⁵⁾ confirmaram que, na insuficiência de CO, pequenas quantidades de $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ podem ser reoxidadas a $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$.

Em outro parâmetro investigado (TAB. 5), verificou-se que, ao aumentar a massa do ligante (L) para 50 μg , a pureza radioquímica do complexo precursor apresentou um pequeno aumento, embora a atividade específica tenha diminuído cerca de cinco vezes.

Apesar da significativa redução da atividade específica para 2,7 GBq/ μmol (6,7 GBq/mg), este valor pode ser considerado excelente, uma vez que Schibli e col. (2003)⁽⁶⁸⁾ obtiveram uma atividade específica máxima de 0,18 GBq/ μmol , já considerada suficiente para as aplicações radiofarmacêuticas.

Mankoff e col. (1999)⁽⁶⁶⁾ obtiveram, também, uma atividade específica de 2,4 GBq/ μ mol ao marcar a timidina com ^{11}C .

A elevada atividade específica é necessária para que não haja saturação dos ligantes “frios” aos receptores, uma vez que eles estão presentes em baixas concentrações. Outro aspecto da atividade específica é o seu benefício que está relacionado às técnicas de Medicina Nuclear, pois outros métodos de diagnósticos, como imagens de raios X ou RMN, podem oferecer imagens de melhor resolução. No entanto, são necessários usos de agentes de contraste que são administrados em doses elevadas, podendo acarretar problemas alérgicos ou de toxicidade. Sendo assim, a aplicação de radiofármacos só será benéfica se os mesmos forem produzidos com baixa concentração do substrato, ou seja, uma elevada atividade específica⁽⁶⁾.

O volume final de reação em marcações com o complexo carbonil-tecnécio-99m também é um fator que influencia o rendimento da reação. Normalmente, volumes pequenos fornecem melhores resultados. Porém, nestes experimentos, o aumento do volume do complexo precursor não influenciou no rendimento do complexo final (TAB. 6).

Desta forma, o protocolo final para a marcação deste análogo da timidina (ligante L) com o complexo precursor ficou estabelecido em: 50 μ g do ligante L; 250 a 450 μ L do $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ (preparado com atividade entre 370 e 1110 MBq de $^{99\text{m}}\text{Tc}$); e 60 min de reação (75 °C). A atividade específica máxima obtida foi de 2,7 GBq/ μ mol com uma pureza radioquímica de $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{L})]^- \geq 94\%$.

5.4 Avaliação radioquímica do complexo precursor e da timidina radiomarcada

A avaliação radioquímica realizada em HPLC (FIG. 14) determinou a presença de todas as espécies radioquímicas presentes na amostra, exceto a espécie $^{99m}\text{TcO}_2$ que, por ser um colóide, não é eluído da coluna cromatográfica, nestas condições experimentais de trabalho (tipo de fase estacionária, fase móvel e condição de eluição). Sendo assim, técnicas de cromatografia em papel e em camada delgada foram investigadas para a qualificação e quantificação de todas as espécies radioquímicas presentes.

Pôde-se constatar, com base na TAB. 1, que as espécies radioquímicas, $^{99m}\text{TcO}_4^-$, $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ e $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{L})^-$, não foram separadas em muitos dos sistemas estudados, impossibilitando a sua determinação, como foi no caso dos sistemas 1, 2, 5 e 8.

Em outros sistemas, as espécies radioquímicas apresentaram grandes arrastes, caracterizando uma incompleta separação e prejudicando a determinação do fator de retenção (sistemas 9, 11 e 12). Sendo assim, foi utilizado o sistema 4 para se determinar as impurezas $^{99m}\text{TcO}_2$ e $^{99m}\text{TcO}_4^-$ na preparação do complexo precursor. Para a confirmação destas mesmas impurezas e mais o precursor que não se ligou ao ligante (L), foram utilizados os sistemas 4, 6 e 10.

Fica definido, então, o seguinte protocolo final para a determinação das impurezas radioquímicas: sistema 4 $^{99m}\text{TcO}_2$ ($R_f = 0$); sistema 10 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ($R_f = 0,9/1,0$); e sistema 6 $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ ($R_f = 0/0,1$). A porcentagem da pureza radioquímica do complexo $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{L})^-$ foi determinada subtraindo todas as impurezas radioquímicas presentes da porcentagem total (100%).

Alberto e col. (1997)⁽¹⁵⁾, ao realizarem a síntese do complexo precursor, comprovaram que nenhum outro intermediário como, por exemplo, um hipotético complexo hexaaquatecnécio(I)⁽³⁴⁾, $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_6]^+$, é formado.

5.5 Purificação da timidina radiomarcada

A purificação de um determinado radiofármaco marcado com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ só é necessária caso o produto de interesse apresente uma pureza radioquímica inferior a 95% ou se no estudo em questão seja melhor a ausência total de impurezas⁽²⁾. Desta forma, a purificação da timidina radiomarcada foi necessária uma vez que o mesmo apresentou uma pureza radioquímica de $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{L})]$ em 94,1% e, também, para assegurar a qualidade dos futuros ensaios *in vitro* e *in vivo*.

A purificação foi realizada em SepPak®, sendo que as impurezas iônicas como $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ e $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ foram eluídas na água, a impureza coloidal ($^{99\text{m}}\text{TcO}_2$) permaneceu retida no filtro e o produto final foi eluído no etanol.

5.6 Estudo *in vitro* da estabilidade radioquímica do complexo precursor e da timidina radiomarcada

O complexo precursor e a timidina radiomarcada apresentaram boa estabilidade em temperatura ambiente em até 6 h após o preparo. Houve uma perda de dez pontos percentuais para o complexo precursor e de cinco pontos percentuais para a timidina radiomarcada. Em até 24 h não houve perda adicional para a timidina radiomarcada. Para o complexo precursor, este último tempo não foi avaliado uma vez que o mesmo não é utilizado em intervalos muito longos. No entanto, Schibli e col. (2002)⁽²⁴⁾ asseguraram sua estabilidade em até 24 h.

Os ensaios de estabilidade dos análogos da timidina marcados com o complexo precursor estudados por Netter e col. (2002 e 2003)^(67,69), e Schibli e col. (2003)⁽⁶⁸⁾, foram $\geq 90\%$, o que está de acordo com os resultados obtidos neste estudo.

A estabilidade do complexo precursor está também relacionada à baixa labilidade do ligante CO o que estabiliza o metal na esfera de coordenação. A redução do metal na ausência do ligante CO resulta em pouca concentração de espécies bem definidas como o $^{99m}\text{TcO}_2$ ⁽¹¹⁾.

Muitos compostos radiomarcados decompõem-se por ação da radiação emitida pelo próprio radionuclídeo. Este efeito, chamado de radiólise, pode acontecer quando a atividade específica do composto é muito elevada. A radiólise pode provocar a quebra da ligação química entre o radionuclídeo e a molécula ou interagir com o solvente formando radicais livres, que também podem ter efeito nocivo para o composto radioativo, promovendo o aparecimento de impurezas radioquímicas⁽⁶⁾. Não foi observado um aumento significativo de impurezas devido à radiólise durante o período de incubação da timidina radiomarcada para o estudo de estabilidade (FIG. 15).

5.7 Estudo *in vitro* da estabilidade radioquímica em função da cisteína e histidina

Os testes chamados “desafio da cisteína” e “desafio da histidina” foram realizados com a finalidade de se verificar a estabilidade ou a força da ligação entre a biomolécula e o seu radioisótopo. Apesar destes ensaios serem realizados *in vitro*, eles podem simular a estabilidade do radiofármaco *in vivo*, uma vez que pequenas concentrações destes aminoácidos são encontradas no organismo.

O aminoácido cisteína pode ser considerado um ligante bidentado, ou seja, possui dois sítios ativos – o grupamento amino ($-\text{NH}_3^+$) e a carboxila dissociada ($-\text{COO}^-$) – que podem se ligar ao complexo carbonil-tecnécio-99m. Além destes grupamentos, a cisteína possui um radical sulfidríla ($-\text{SH}$) que é altamente reativo, responsável pela conformação das proteínas devido à formação de pontes de enxofres⁽⁵³⁾.

Nos ensaios de estabilidade realizados com cisteína com 1 h de incubação (TAB. 9), pôde-se verificar diminuição na pureza radioquímica, o que pode ser indicativo de transquelação da timidina radiomarcada. A diminuição na porcentagem da pureza radioquímica é evidente em concentrações acima de 30 mM, após 1 h, e 3 mM após 4 h. Em teoria, este estudo indicou que a timidina radiomarcada não apresentaria transquelação *in vivo*, uma vez que a concentração de cisteína no organismo é muito baixa, sendo que no plasma humano, varia entre 0,03 e 0,108 mM^(89,90).

Transquelação é um fenômeno que pode ocorrer com os complexos de metais de transição que é a troca do íon metálico dos quelatos por outros ligantes, como a proteína do plasma, levando à quebra do complexo radioativo⁽⁶⁾.

O aminoácido histidina pode promover a ruptura da ligação entre a biomolécula e o precursor. Esta clivagem pode acontecer, pois a histidina possui três sítios de ligações, tornando-a um ligante tridentado, formando um complexo estável favorecido por sua geometria facial com mínima distorção⁽¹¹⁾.

O “desafio da histidina” indicou resultados muitos parecidos com os obtidos com a cisteína, apesar de apresentar uma perda de cinco pontos percentuais com uma concentração de 30 mM de histidina para 1 h de incubação e uma perda de sete pontos percentuais para 4 h de incubação. A concentração

de histidina no organismo também é baixa, variando no plasma humano entre 0,026 e 0,12 mM⁽⁹⁰⁾.

Os resultados obtidos com os ensaios “desafios da cisteína” e “desafio da histidina” estão em concordância com os obtidos por Schibli e col. (2000)⁽²⁷⁾, que realizaram os mesmos testes com o ligante IDA marcado com o complexo precursor.

5.8 Estudo *in vitro* da lipofilicidade da timidina radiomarcada

O coeficiente de partição é uma medida da lipofilicidade de um composto e é definido como a razão da concentração do mesmo, no equilíbrio, após dissolução em um sistema de duas fases, formadas por dois solventes imiscíveis, como por exemplo, a água e o octanol⁽⁹¹⁾.

Ele também é uma das principais propriedades físico-químicas de um fármaco, pois a sua farmacocinética e biodistribuição *in vivo* dependem da sua característica hidrofílica ou lipofílica⁽⁸⁾. Usualmente, o valor do coeficiente final é expresso em log P, sendo que um composto lipofílico deve apresentar um alto coeficiente ($\geq 0,9$). Quanto maior o coeficiente de partição, maior a afinidade da substância pela fase orgânica. No entanto, substâncias hidrofílicas apresentam baixo log P. Essa característica, em radiofarmácia, influencia na depuração sanguínea e uma rápida excreção renal⁽⁹²⁾.

Ligação às proteínas, transquelação que ocorre entre as proteínas do plasma, reduz a lipofilicidade do radiofármaco. Complexos iônicos são menos lipofílicos do que complexos neutros⁽⁶⁾ e, geralmente, apresentam maiores captações no fígado e tecidos gordurosos⁽¹⁸⁾.

Como já era esperado, o complexo $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{L})]^-$ apresentou caráter hidrofílico ($\log P = -1,48$), sendo este resultado próximo ao obtido por Schibli e col. (2000)⁽²⁷⁾ em sua marcação do ligante IDA com o complexo precursor ($\log P = -2,12$).

5.9 Estudo *in vivo* de animais sadios e portadores de tumor

Antes de se analisar os resultados dos estudos de biodistribuição, é importante ressaltar que o tamanho, a carga, a isomeria e a solubilidade da molécula determinam a farmacocinética da droga^(2,6,39).

Por exemplo, moléculas com massa molecular maior do que 60.000 Da não são filtradas no glomérulo renal⁽⁶⁾. O nucleosídeo timidina apresenta uma baixa massa molecular e o complexo precursor também é considerado como um núcleo pequeno (FIG. 3). Sendo assim, sua biodistribuição é fortemente favorecida.

A timidina radiomarcada apresentou carga negativa (ânion), apesar do complexo precursor ser um cátion. A carga do composto final influencia também na sua biodistribuição. Por exemplo, um fármaco com alvo cerebral deve atravessar a barreira hematoencefálica, sendo que o composto sem carga favorece esta ação^(18,26). Porém, um estudo indicou que compostos com cargas negativas podem apresentar melhor retenção no tumor⁽²⁴⁾.

A mistura de isômeros pode alterar a atividade biológica do composto alvo e complicar a interpretação dos resultados obtidos com ele^(2,7). Uma única inversão da orientação espacial de um grupo funcional pode alterar completamente as suas propriedades farmacodinâmicas⁽²⁹⁾. Devido a estas dificuldades, esforços têm sido realizados para o desenvolvimento de novos

radiofármacos de ^{99m}Tc marcados com biomoléculas pequenas, cujo mecanismo de complexação não apresenta isômeros.

A timidina não possui sítios ativos para se ligar ao complexo precursor. Para tanto, o nucleosídeo foi sintetizado com o ligante tridentado (IDA) na posição 5' da pentose (FIG. 8). O IDA é um ligante tridentado ideal para o complexo carbonil-tecnécio- ^{99m}Tc ⁽⁴³⁾. Ele proporciona uma configuração geométrica que protege o metal central (^{99m}Tc) contra a transquelação, eliminando, também, formas enantioméricas (isômeros)⁽²⁷⁾. Estas características são imprescindíveis para receptores específicos e uma boa biodistribuição do radiofármaco^(18,27). Wei e col. (2005)⁽⁷⁸⁾ sintetizaram a timidina com diversos ligantes tridentados também na posição 5' da pentose para marcações com o $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$.

Os estudos de biodistribuição de um determinado radiofármaco indicam a sua utilidade e eficácia. Estes estudos consistem, basicamente, na avaliação da distribuição nos tecidos, depuração plasmática e o tipo de excreção após a administração do radiofármaco. A distribuição tecidual indica se o composto tem interesse para o diagnóstico de determinado órgão ou tumor, e a excreção avalia o tempo durante o qual o paciente vai estar exposto à dose de radiação⁽⁶⁾.

Quando um radiofármaco é administrado a um paciente, ocorrem processos de distribuição, metabolização e excreção como qualquer outro fármaco. A excreção do radiofármaco faz-se por meio dos mecanismos existentes (por exemplo, excreção pulmonar, hepática e renal) e segue uma lei exponencial semelhante ao decaimento do radionuclídeo. O tempo necessário para que a quantidade de radiofármaco existente no organismo se reduza à metade chama-se "tempo de meia-vida biológica"⁽⁶⁾.

Como já foi discutido no item 5.3, são poucas as referências bibliográficas da timidina marcada com o complexo carbonil-tecnécio-99m. No entanto, os estudos de biodistribuição desenvolvidos neste trabalho foram comparados com outros, sempre que possível.

Analisando-se o estudo de biodistribuição de camundongos saudáveis (TAB. 11), pôde-se observar que a maior captação da droga ocorreu nos rins (27,50 %DI/g) com 5 min após sua administração, indicando início precoce da excreção renal. Pôde-se verificar, também, que a depuração dos rins foi muito rápida, sendo que mais de 95% da atividade presente no órgão foi eliminada após 1 h. Após 24 h da administração da droga, a atividade nos rins era de apenas 0,20 %DI/g. Sabe-se que o análogo da timidina FLT é excretado pelo rins e bexiga⁽⁶⁵⁾.

A segunda maior captação da droga ocorreu no fígado (10,4 %DI/g) com 5 min após a sua administração, indicando também outra excreção, desta vez pela rota hepatobiliar. No entanto, esta excreção revelou-se ser um pouco mais lenta que a renal, pois somente 75% da atividade inicialmente presente no órgão foi eliminada com 1 h e 89% com 4 h. A retenção da droga após 24 h foi de 0,50 %DI/g.

Pôde-se constatar que por este mesmo mecanismo de excreção biliar, a droga atingiu o estômago e o intestino delgado. Até o tempo de 2 h, verificou-se que a captação no intestino delgado era maior que a captação no intestino grosso, sendo que a partir de 4 h ocorreu a inversão, característica comum da excreção.

Sabe-se que, quando um radiofármaco apresenta $^{99m}\text{TcO}_4^-$ livre, o mesmo é transportado para o estômago, aumentando, assim, a captação radioativa deste órgão, prejudicando, muitas vezes, a qualidade da imagem.

A captação de 4,73 %DI/g presente no estômago após 5 min não indica, necessariamente, a presença de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ livre, pois uma das vantagens da técnica do complexo precursor é, justamente, a sua elevada estabilidade do complexo formado. Entretanto, a hipótese de transquelação com proteínas plasmáticas só seria confirmada por meio de ensaios de estabilidade em plasma ou ligação às proteínas, não realizados neste trabalho devido às dificuldades técnicas. Não se pode desconsiderar, também, a possibilidade da formação de metabólitos, característica comum da timidina (FIG. 6) devido ao seu rápido metabolismo *in vivo*⁽⁹³⁾. De qualquer forma, a depuração neste órgão também foi rápida. Após 1 h da administração da droga restava apenas 15% da atividade inicial do órgão.

Vale a pena assinalar outra propriedade, que é a retenção pancreática. Embora, nos dois primeiros tempos (5 e 15 min) ela se posicione nas proximidades daquela do sangue, músculos e ossos, portanto, sem capacidade diagnóstica. A partir de 30 min as relações se alteraram. Observa-se neste tempo, aproximadamente, o dobro da captação de músculo e osso, e seis vezes aquela do sangue.

Relações favoráveis se mantêm até 2 h, com índices pancreáticos entre duas e seis vezes superiores aos destas estruturas. É verdade que o intestino delgado e, em menor grau o grosso, exibem nestes tempos, atividade substancialmente mais elevada, o que, dada a sua proximidade anatômica, poderia encobrir a visualização desta glândula. Entretanto, com imagens oblíquas

ou dorsais que tendem a desviar as alças intestinais da frente do pâncreas, teoricamente, poderia conseguir imagens úteis, notando-se que o pâncreas é sede relativamente freqüente de tumores e as opções diagnósticas, neste caso, nem sempre são plenamente satisfatórias.

De modo geral, os outros órgãos e tecidos também apresentaram uma rápida depuração (FIG. 16) e não apresentaram expressivas retenções da atividade. Para o tecido sangüíneo, mais de 97% da atividade inicial já havia sido eliminada após 2 h da administração da droga. As investigações da biodistribuição do complexo precursor, marcado com o ligante IDA, realizados por Shibli e col. (2000)⁽²⁷⁾, também apresentaram boa depuração em todos os órgãos e tecidos com 24 h.

Os dois modelos tumorais – mama e pulmão – foram escolhidos por estarem entre os tipos de câncer que mais afetam a sociedade, e também por sua afinidade com o nucleosídeo timidina^(61,67,69-73).

O estudo de biodistribuição com camundongos portando tumor de pulmão foi realizado com o tempo de 2 h após a administração da droga. Pôde-se observar (FIG. 17) que houve uma maior retenção da atividade em todos os órgãos se comparado com as captações de órgãos de animais sadios, exceto para o intestino. O estudo indicou, também, uma baixa captação da droga no tumor (0,28 %DI/g) e baixa relação tumor/sangue e tumor/músculo.

Já na análise dos resultados da biodistribuição das ratas com tumor de mama (TAB. 13), pôde-se verificar que a maior retenção ocorreu nos rins, indicando a predominância pela excreção da droga pela via urinária, conforme já previsto no estudo anterior de animais sadios. O intervalo de apenas uma hora para este estudo não demonstrou diferenças significativas na avaliação. A

captação da droga e as relações tumor/sangue e tumor/músculo também foram baixas.

Schibli e col. (2002)⁽²⁴⁾, ao marcarem o peptídeo octreotato conjugado com o ligante IDA utilizando o complexo carbonil-tecnécio-99m, realizaram alguns estudos de biodistribuição em ratos com tumor pancreático com base nas características antes delineadas. Eles conseguiram uma boa razão tumor/sangue (36) após 4 h da administração do complexo.

A captação do radiofármaco depende do fluxo sangüíneo, perfusão tecidual, permeabilidade capilar e capacidade de difusão⁽⁶⁾. A solubilidade está relacionada com a distribuição e localização da droga no organismo. Substâncias lipofílicas difundem-se melhor na membrana celular e, conseqüentemente, maior será a sua localização no órgão alvo^(6,92). Esta pode ser, então, uma possível explicação para a baixa captação tumoral nos modelos investigados, uma vez que a droga é hidrofílica.

A conjugação de agentes quelantes na timidina em outra posição se não a 5' da pentose, pode proporcionar a redução das ligações da enzima TQ₁⁽⁶⁸⁾. No entanto, é nesta posição que ocorre a fosforilação da timidina, a qual inicia o seu metabolismo até a incorporação no DNA⁽⁹⁴⁾. No presente trabalho, a timidina foi conjugada com o ligante IDA nesta importante posição, a qual pôde impossibilitar a sua incorporação ao DNA. Esta pode ser outra possível justificativa para a baixa captação nos tumores investigados.

6. CONCLUSÕES

A preparação do complexo precursor utilizando o gás monóxido de carbono ocorre em duas etapas simples e requer um tempo de, aproximadamente, 1,5 h de síntese. Com a sua otimização, obteve-se rendimento de $\geq 97\%$, próximo aos encontrados na literatura e aceitáveis pelas farmacopéias. Pôde-se propor, também, um protocolo de síntese de acordo com as necessidades apresentadas pelo Centro de Radiofarmácia do IPEN/CNEN-SP.

A otimização da marcação do nucleosídeo timidina com o complexo precursor foi executada com rendimento de $\sim 94\%$, possibilitando a criação de protocolos de marcação para os estudos *in vitro* e *in vivo*.

O estudo da avaliação radioquímica do complexo precursor e da timidina radiomarcada utilizando a cromatografia em papel e em camada delgada pôde fornecer sistemas cromatográficos com bons níveis de confiabilidade, podendo qualificar e quantificar as espécies radioquímicas presentes na amostra.

O complexo precursor e a timidina radiomarcada apresentaram boa estabilidade radioquímica em até 6 h em temperatura ambiente, resultado este que está previsto pela literatura.

Os testes intitulados "desafio da cisteína" e "desafio da histidina", confirmaram a possível estabilidade *in vivo* da timidina radiomarcada.

O cálculo do coeficiente de partição indicou que a timidina radiomarcada é hidrofílica.

Os estudos de biodistribuição em camundongos saudáveis indicaram um rápido depuramento sanguíneo e dos demais órgãos, com a predominância de

excreção da droga pelo sistema renal e hepatobiliar, com expressivas retenções nos intestinos.

Já os estudos invasivos em ratos e camundongos com câncer de mama e pulmão, indicaram uma baixa captação tumoral, justificado, provavelmente, devido à localização da conjugação do IDA com a timidina.

6.1. Perspectivas futuras

Como parte final, recomenda-se a realização de ensaios *in vitro* da estabilidade em plasma e de ligação às proteínas plasmáticas deste complexo radiomarcado para avaliar a possível estabilidade *in vivo*.

Outra sugestão seria a investigação de outros modelos tumorais ou até mesmo a síntese de um novo análogo da timidina, mas conjugado com um ligante tridentado na posição 3' da ribose, como ocorre com o bem sucedido [^{18}F]FLT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. JURISSON, S. S.; LYDON, J. D.; Potencial Technetium small molecule radiopharmaceutical. *Chemical Reviews*, v. 99, p. 2205-2218, 1999.
2. MEASE, R. C.; LAMBERT, C. Newer methods of labeling diagnostic agents with Tc-99m. *Seminars in Nuclear Medicine*, v. 31, n. 4, p. 278-285, 2001.
3. BANERJEE, S.; PILLAI, M. R. A.; RAMAMOORTHY, N. Evaluation of Tc-99m in diagnostic radiopharmaceuticals. *Seminars in Nuclear Medicine*, v. 31, n. 4, p. 260-277, 2001.
4. BOERMAN, O.C.; OYEN, W. J. G.; CORSTENS, F. H. M. Radio-labeled receptor-binding peptides: a new class of radiopharmaceuticals. *Seminars in Nuclear Medicine*, v. 30, n. 3, p. 195-208, 2000.
5. EGLI, A.; ALBERTO, R.; TANNAHILL, L.; SCHIBLI, R.; ABRAM, U.; SCHAFFLAND, A.; WAIBEL, R.; TOURWÉ, D.; JEANNIN, L.; ITERBEKE, K.; SCHUBIGER, P. A. Organometallic ^{99m}Tc -aquaion labels peptide to an unprecedented high specific activity. *The Journal of Nuclear Medicine*, v. 40, p. 1913-1917, 1999.
6. OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; FERREIRA, D.; COELHO, P.; VEIGA, F. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 2, p. 151-165, 2006.
7. FICHNA, J.; JANECKA, A. Synthesis of Target-Specific Radiolabeled Peptides for Diagnostic Imaging. *Bioconjugate Chemistry*, v. 14, p. 3-17, 2003.
8. KOTHARI, K. K.; RAGHURAMAN, K.; PILLARSETTY, N. K.; HOFFMAN, T. J.; OWEN, N. K.; KATTI, K. V. VOLKERT, W. A. Syntheses, in vitro and in vivo characterization of a ^{99m}Tc -(I)-tricarbonyl-benzylamino-dihydroxymethyl phosphine (NP_2) chelate. *Applied Radiation and Isotopes*, v. 58, p. 543-549, 2003.
9. BLOK, D.; FEITSMA, R. I. J.; VERMEIJ, P.; PAUWELS, E. J. K. Peptide radiopharmaceuticals in nuclear medicine. *European Journal of Nuclear Medicine*, v. 26, p. 1511-1519, 1999.
10. JURISSON, S.; BERNING, D.; JIA, W.; MA, D. Coordination Compounds in Nuclear Medicine. *Chemical Reviews*, v. 93, p. 1137-1156, 1993.

11. ALBERTO, R.; SCHIBLI, R.; WAIBEL, R.; ABRAM, U.; SCHUBIGER, A.; Basic aqueous chemistry of $[M(OH)_3(CO)_3]^+$ (M = Re, Tc) directed towards radiopharmaceutical application. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 190-192, p. 901-919, 1999.
12. FAINTUCH, B. L. *Estudo de marcação, biodistribuição e análise compartimental da N-acetilcisteína marcada com ^{99m}Tc . Investigação comparativa com MIBI- ^{99m}Tc* . 1997. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Universidade de São Paulo, São Paulo.
13. BANERJEE, S. R.; MARESCA, K. P.; FRANCESCONI, L.; VALLIANT, J.; BABICH, J. W.; ZUBIETA, J. New directions in the coordination chemistry of ^{99m}Tc : a reflection on technetium core structures and a strategy for new chelate design. *Nuclear Medicine and Biology*, v. 32, p. 1-20, 2005.
14. JURISSON, S. S. Tc and Re Peptide Chemistry: Direct Labeling. In: NICOLINI, M.; MAZZI, U. (Ed.). *Technetium, rhenium and other methals in chemistry and nuclear medicine*. Padova, Italy: SGEEditoriali, 2002, v. 6, p. 15-21.
15. ALBERTO, R.; SCHIBLI, R.; ANGST, D.; SCHUBIGER, A.; ABRAM, U.; ABRAM, S.; KADEN, T. A. Application of technetium and rhenium carbonyl chemistry to nuclear medicine. Preparation $[Net_4]_2[TcCl_3(CO)_3]$ from $[NBu_4][TcO_4]$ and structure of $[NEt_4][Tc_2(\mu-Cl)_3(CO)_6]$; structures of the model complexes $[Net_4][Re_2(\mu-OEt)_2(\mu-OAc)(CO)_6]$ and $[ReBr\{-CH_2S(CH_2)_2Cl\}_2(CO)_3]$. *Transition Metal Chemistry*, v. 22, p. 597-601, 1997.
16. DUATTI, A. Which role for Technetium-99m radiopharmaceuticals in the age of molecular imaging? In: International Symposium on Trends in Radiopharmaceuticals, Nov. 14-18, 2005, Vienna. *Resumos...* Vienna: IAEA, 2005. p. 24 (IAEA-CN-130/014).
17. VERBRUGGEN, A. M. Technetium radiopharmaceuticals, current situation and perspectives. In: International Symposium on Trends in Radiopharmaceuticals, Nov. 14-18, 2005, Vienna. *Resumos...* Vienna: IAEA, 2005. p. 1 (IAEA-CN-130/001).
18. REICHERT, D. E.; LEWIS, J. S.; ANDERSON, C. J. Metal complexes as diagnostic tools. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 184, p. 3-66, 1999.
19. TISATO, F.; PORCHIA, M.; BOLZATI, C.; REFOSCO, F.; VITTADINI, A. The preparation of substitution-inert ^{99}Tc metal-fragments: Promising candidates for the design of new ^{99m}Tc radiopharmaceuticals. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 250, p. 2034-2045, 2006.

20. BOYD, R. E. Technetium-99m Generators – The Available Options. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes*, v. 33, p. 801-809, 1982.
21. ALBERTO, R.; SCHIBLI, R.; ABRAM, U.; EGLI, A.; KNAPP, F. F.; SCHUBIGER, P. A. Potencial of the "[M(CO)₃]" (M = Re, Tc) Moiety for the Labeling of Biomolecules. *Radiochimica Acta*, v. 79, p. 99-103, 1997.
22. PIETZSCH, H. J.; GUPTA, A.; REISGYS, M.; DREWS, A.; SEIFERT, S.; SYHRE, R.; ALBERTO, R.; ABRAM, U.; SCHUBIGER, P. A.; JOHANNSEN, B. Chemical and Biological Characterization of Technetium(I) and Rhenium (I) Tricarbonyl Complexes with Dithioether Ligands Serving as Linkers for Coupling the Tc(CO)₃ and Re(CO)₃ Moieties to Biologically Active Molecules. *Bioconjugate Chemistry*, v. 11, p. 414-424, 2000.
23. ALBERTO, R.; SCHIBLI, R.; EGLI, A.; SCHUBIGER, P. A.; HERMANN, W. A.; ARTUS, G.; ABRAM, V.; KADEN, T. A. Metal carbonyl syntheses XXVII. Low-pressure carbonylation of [MoCl₄]- and [MO₄]-. The technetium(I) and rhenium(I) complexes [Net₄]₂[MCl₃(CO)₃]. *Journal of Organometallic Chemistry*, v. 492, p. 217-224, 1995.
24. SCHIBLI, R.; SCHUBIGER, P.A. Current use and future potential of organometallic radiopharmaceuticals. *European Journal of Nuclear Medicine*, v. 29, p. 1529-1542, 2002.
25. SALMAIN, M.; GUNN, M.; GORFI, A.; TOP, S.; JAOUEN, G. Labeling of Proteins by Organometallic Complex of Rhenium(I). Synthesis and Biological Activity of the Conjugates. *Bioconjugate Chemistry*, v. 4, p. 425-433, 1993.
26. ALBERTO, R.; SCHIBLI, R.; SCHUBIGER, A. P.; ABRAM, U.; PIETZSCH, H. J.; JOHANNSEN, B. First Application of fac-[^{99m}Tc(OH₂)₃(CO)₃]⁺ in Bioorganometallic Chemistry: Design, Structure, and in Vitro Affinity of a 5HT_{1a} Receptor Ligand Labeled with ^{99m}Tc. *Journal of the American Chemical Society*, v. 121, p. 6076-6077, 1999.
27. SCHIBLI, R.; LA BELLA, R.; ALBERTO, R.; GARCIA-GARAYOA, E.; ORTNER, K; ABRAM, U.; SCHUBIGER, P. A. Influence of the Denticity of Ligand Systems on the Vitro and in Vivo Behavior of ^{99m}Tc(I)-Tricarbonyl Complex: A hint for the Future Functionalization of Biomolecules. *Bioconjugate Chemistry*, v. 11, p. 345-351, 2000.
28. ALBERTO, R. Advances and Perspectives of Aqueous Organometallic Rhenium and Technetium Chemistry. In: NICOLINI, M.; MAZZI, U. (Ed.). *Technetium, rhenium and other metals in chemistry and nuclear medicine*. Padova, Italy: SGEEditoriali, 2002, v. 6, p. 3-13.

29. MINGOIA, Q. *Química Farmacêutica*. São Paulo, SP: Edições Melhoramentos, 1967. p. 14, 31, 37.
30. TROP, H. S.; DAVISON, A.; JONES, A. G.; DAVIS, M. A.; SZALDA, D. J.; LIPPARD, S. J. Synthesis and physical properties of hexakis(isothiocyanato)technetate(III) and (IV) complex. Structure of the $[\text{Tc}(\text{NCS})_6]_3^-$ ion. *Inorganic Chemistry*, v. 19, p. 1105-10, 1980.
31. JONES, A. G.; ABRAMS, M. J.; DAVISON, A.; BRODACK, J. W.; TOOTHAKER, A. K. ADELSTEIN, S. J. KASSIS, A. I. Biological studies of a new class of technetium complexes: The hexakis(alkylisonitrile)-technetium (I) cations. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes*, v. 11, p. 225-234, 1984.
32. VALLIANT, J. F.; MOREL, P.; SCHAFFER, P.; SOGBEIN, O.O.; STEPHENSON, K. A.; GREEN, A.; CHANKALAI, R. The synthesis and characterization of Re and Tc carbonate complexes. In: NICOLINI, M.; MAZZI, U. (Ed.). *Technetium, rhenium and other metals in chemistry and nuclear medicine*. Padova, Italy: SGEEditoriali, 2002, v. 6, p. 55-61
33. TOP, S.; HAFSA, E. H.; VESSIÈRES, A.; QUIVY, J.; VAISSERMANN, J.; HUGHES, D. W.; McGLINCHEY, M. J.; MORNON, J. P.; THOREAU, E.; JAUQUEN, G. Rhenium Carbonyl Complex of β -Estradiol Derivatives with High Affinity for the Estradiol Receptor: An Approach to Selective Organometallic Radiopharmaceuticals. *Journal of the American Chemical Society*, v. 117, p. 8372-8380, 1995.
34. FERREIRA, A. M. C.; TOMA, H. E.; MASSABNI, A. C. Nomenclatura de compostos de coordenação: uma proposta simplificada. *Química Nova*, v. 7, p. 9-15, 1984.
35. ALBERTO R.; SCHIBLI, R.; EGLI, A.; SCHUBIGER, A. P. A novel organometallic aqua complex of technetium for the labeling of biomolecules: synthesis of $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ from $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$ in aqueous solution and its reaction with a bifunctional ligand. *Journal of the American Chemical Society*, v. 120, n. 31, p. 7987-7988, 1998.
36. LIPOWSKA, M.; HE, H.; MALVEAUX, E.; XU, X.; MARZILLI, L. G.; TAYLOR, A. First Evaluation of a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Tricarbonyl Complex, $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{LAN})$, as a New Renal Radiopharmaceutical in Humans. *The Journal of Nuclear Medicine*, v. 47, p. 1032-1040, 2006.
37. PAK, J. K.; BENNY, P.; SPINGLER, B.; ORTNER, K.; ALBERTO, R. Ne Functionalization of Metal and Organic Protected L-Histidine for a Highly Efficient, Direct Labeling of Biomolecules with $[\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$. *Chemistry – A European Journal*, v. 9, p. 2053-2061, 2003.

38. ALBERTO, R. Novel technetium chemistry and radiopharmaceuticals: Tc(V), Tc(III) or Tc(I), which way to go for keeping Tc radiopharmaceuticals alive? In: International Symposium on Trends in Radiopharmaceuticals, Nov. 14-18, 2005, Vienna. *Resumos...* Vienna: IAEA, 2005, p. 57 (IAEA-CN-130/032).
39. JAOUEN, G.; TOP, S.; VESSIÈRES, A.; ALBERTO R. New paradigms for synthetic pathways inspired by bioorganometallic chemistry. *Journal of Organometallic Chemistry*, v. 600, p. 23-36, 2000.
40. BANDOLI, G.; TISATO, F.; DOLMELLA, A.; AGOSTINI, S. Structural overview of technetium compounds (2000-2004). *Coordination Chemistry Reviews*, v. 250, p. 561-573, 2006.
41. DU, J.; HILTUNEN, J.; MARQUEZ, M.; NILSSON, S.; HOLMBERG, A. R. Technetium-99m labelling of glycosylated somatostatin-14. *Applied Radiation and Isotopes*, v. 55, p. 181-187, 2001.
42. WAIBEL, R.; ALBERTO, R.; WILLUDA, J.; FINNERN, R.; SCHIBLI, R.; STICHELBERGER, A.; EGLI, A.; ABRAM, U.; MACH, J. P.; PLUCKTHUN, A.; SCHUBIGER, P. A. Stable one-step technetium-99m labeling complex. *Nature Biotechnology*, v. 17, p. 897-901, 1999.
43. SCHIBLI, R.; KATTI, K. V.; HIGGINBOTHAM, C.; VOLKERT, W. A.; ALBERTO, R. In Vitro and In Vivo Evaluation of Bidentate, Water-Soluble Phosphine Ligands as Anchor Groups for the Organometallic fac- $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ -core. *Nuclear Medicine and Biology*, v. 26, p. 711-716, 1999.
44. ALBERTO, R.; ORTENER, K.; WHEATLEY, N.; SCHIBLI, R.; SCHUBIGER A. P. Synthesis and properties of boranocarbonate: a convenient in situ CO source for the aqueous preparation of $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)(\text{CO})_3]^+$. *Journal of the American Chemical Society*, v. 123, n. 13, p. 3135-3136, 2001.
45. ALBERTO, R. $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ chemistry: a promising new concept for SPET?, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, v. 30, p. 1299-1302, 2003.
46. HOEPPING, A.; REISGYS, M.; BRUST, P.; SEIFERT, S.; SPIES, H.; ALBERTO, R.; JOHANNESSEN, B. TROTEC-1: a new high-affinity ligand for labeling of the dopamine transporter. *Journal of Medicines Chemistry*, v. 41, p. 4429-4432, 1998.
47. MARMION, M.; ALBERTO, R.; BUGAJ, J.; CHIN, L.; SCHMIDT, M.; SRINIVASAN, A. Preparation and biodistribution of $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{His,Tyr}]$ octreotate, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, v. 42, Supl. 1: S231-S233, 1999.

48. DECRISTOFORO, C.; MELENDEZ-ALAFORT, L.; SOSABOWSKI, J. K.; MATHER, S. J. Tc-99m-HYNIC-Tyr3-octreotide for imaging somatostatin-receptor-positive tumors: preclinical evaluation and comparison with In-111-octreotide. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 41, p. 1114-1119, 2000.
49. LA BELLA, R.; GARCIA-GARAYOA, E.; LANGER, M.; BLÄUENSTEIN, P.; BECK-SICKINGER, A. G.; SCHUBIGER, A. P. In vitro and in vivo evaluation of a ^{99m}Tc(I)-labeled bombesin analogue for imaging of gastrin releasing peptide receptor-positive tumors. *Nuclear Medicine and Biology*, v. 29, p. 553-560, 2002.
50. LA BELLA, R.; GARCIA-GARAYOA, E.; BÄHLER, M.; BLÄUENSTEIN, P.; SCHIBLI, R.; CONRATH, P.; TOURWÉ, D.; SCHUBIGER, P. A. ^{99m}Tc(I)-Postlabeled High Affinity Bombesin Analogue as a Potential Tumor Imaging Agent. *Bioconjugate Chemistry*, v. 13, p. 599-604, 2002.
51. CHU, T.; ZHANG, Y.; LIU, X.; WANG, Y.; HU, S.; WANG, X. Synthesis and biodistribution of ^{99m}Tc-carbonyltechnetium-labeled fatty acids. *Applied Radiation and Isotopes*, v. 60, p. 845-850, 2004.
52. DJOKIC, D. JANKOVIC, D. Labeling of some amino acids with [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺ precursor: Comparison of chemical and biological behavior. In: International Symposium on Trends in Radiopharmaceuticals, Nov. 14-18, 2005, Vienna. *Resumos...* Vienna: IAEA, 2005. p. 197 (IAEA-CN-130/108P).
53. STRYER, L. *Bioquímica*. 4 ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara-Koogan, 1996. p. 18-24, 598-600, 683, 706-707.
54. CORY, J. G. Metabolismo de nucleotídeos de purina e pirimidina. In: DEVLIN, T. M. (Ed.). *Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas*. 4. ed. São Paulo, SP: Edgard Blücher, 1998. p. 409-413, 422-427. Tradução de: Textbook of biochemistry with clinical correlation.
55. SOARES, M. C.; SOUZA, M. C. B. V.; FERREIRA, V. F. Estratégias para a síntese de desoxinucleosídeos. *Química Nova*, v. 24, n. 2, p. 206-219, 2001.
56. EARY, J. F.; MANKOFF, D. A.; SPENCE, A. M.; BERGER, M.; OLSHEN, A.; LINK, J. M.; O'SULLIVAN, F.; KROHN, K. A. 2-[C-11]Thymidine Imaging of Malignant Brain Tumors. *Cancer Research*, v. 59, p. 615-621, 1999.
57. SHIELDS, A. Positron Emission Tomography Measurement of Tumor Metabolism and Growth: Its Expanding Role in Oncology. *Molecular Imaging and Biology*, v. 8, p. 141-150, 2006.

58. KROHN, K. A.; MANKOFF, D. A.; MUZI, M.; LINK, J. M.; SPENCE, A. M. True tracers: comparing FDG with glucose and FLT with thymidine. *Nuclear Medicine and Biology*, v. 32, p. 663-671, 2005.
59. SHIELDS, A. F.; LIM, K.; GRIERSON, J.; LINK, J.; KROHN, K. A. Utilization of Labeled Thymidine in DNA Synthesis: Studies for PET. *The Journal of Nuclear Medicine*, v. 31, p. 337-342, 1990.
60. CONTI, P. S.; ALAUDDIN, M. M.; FISSEKIS, J. R.; SCHMALL, B.; WATANABE, K.; Synthesis of 2'-Fluoro-5-^[11C]-Methyl-1-β-D-Arabinofuranosyluracil (^[11C]-FMAU): A Potencial Nucleoside analog for In Vivo Study of Cellular Proliferation with PET. *Nuclear Medicine and Biology*, v. 22, p. 783-789, 1995.
61. JACOBS, A. H.; THOMAS, A.; KRACHT, L. W.; LI, J.; DITTMAR, C.; GARLIP, G.; GALLDIKS, N.; KLEIN, J. C.; SOBESKY, J.; HILKER, R.; VOLLMAR, S.; HERHOLZ, K.; WIENHARD, K.; HEISS, W. D. ¹⁸F-Fluoro-L-Thymidine and ¹¹C-Methylmethionine as Markers of Increased Transport and Proliferation in Brain Tumors. *The Journal of Nuclear Medicine*, v. 46, p. 1948-1958, 2005.
62. TENG, B.; WANG, S.; FU, Z.; DANG, Y.; WU, Z.; LIU, L. Semiautomatic synthesis of 3'-Deoxy-3'-^[18F]fluorothymidine using three precursors. *Applied Radiation and Isotopes*, v. 61, p. 187-193, 2006.
63. KROHN, K. A. Evaluation of alternative approaches for imaging cellular growth. *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine*, v. 45, n. 2, p. 174-178, 2001.
64. SCHWARTZ, J. L.; TAMURA, Y.; JORDAN, R.; GRIERSON, J. R.; KRONH, K. A. Effect of p53 activation on cell growth, thymidine kinase -1 activity, and 3'-deoxy-3'fluorothymidine uptake. *Nuclear Medicine and Biology*, v. 31, p. 419-423, 2004.
65. SHIELDS, A. F.; GRIERSON, J. R.; DOHMEN, B. M.; MACHULLA, H. J.; STAYANOFF, J. C.; LAWHORN-CREWS, J. M.; OBRADOVICH, J. E.; MUZIK, O.; MANGNER, T. J. Imaging proliferation in vivo with [F-18]FLT and positron emission tomography. *Nature Medicine*, v. 4, n. 11, p. 1334-1336, 1998.
66. MANKOFF, D. A.; SHIELDS, A. F.; LINK, J. M.; GRAHAM, M. M.; MUZI, M.; PETERSON, L. M.; EARLY, J. F.; KROHN, K. A. Kinetic Analysis of 2-^[11C]Thymidine PET Imaging Studies: Validation Studies. *The Journal of Nuclear Medicine*, v. 40, p. 614-624, 1999.

67. NETTER, M.; SCHIBLI R.; BIRRINGER, M.; SCAPOZZA, L.; SCHUBIGER, A. First Synthesis, Characterization and Enzyme Activity Studies of Re- and ^{99m}Tc -tricarbonyl-complex of Thymidine Analogues, In: NICOLINI, M.; MAZZI, U. (Ed.). ***Technetium, rhenium and other methals in chemistry and nuclear medicine***. Padova, Italy: SGEEditoriali, 2002, v. 6, p. 317-322.
68. SCHIBLI, R.; NETTER, M.; SCAPOZZA, L.; BIRRINGER, M.; SCHELLING, P.; DUMAS, C.; SCHOCH, J.; SCHUBIGER, P. A. First organometallic inhibitors for human thymidine kinase: synthesis and in vitro evaluation of rhenium(I)- and technetium(I)-tricarbonyl complexes of thymidine. ***Journal of Organometallic Chemistry***, v. 668, p. 67-74, 2003.
69. NETTER, M.; STAHEL, J.; SCHIBLI, R.; SCAPOZZA, L. Synthesis and in vitro evaluation of organometallic thymidine- ^{99m}Tc -tricarbonyl-complexes as inhibitors/substrates for thymidine kinase. In: JAUSSE, R.; GSCHWEND, B. (Ed.). Scientific Report 2002 – Life Sciences, Mar., 2003, Villigen. ***Proceedings...*** Villigen: Paul Scherrer Institute, 2003.
70. WELLS, P.; GUNN, R. N.; STELL, C.; RANICAR, A. S.; BRADY, F. 2- $^{[11\text{C}]}$ Thymidine Positron Emission Tomography Reproducibility in Humans. ***Clinical Cancer Research***, v. 11, p. 4341-4347, 2005.
71. TSENG, J. R.; DANDEKAR, M.; SUBBARAYAN, M.; CHENG, Z.; PARK, J. M.; LOUISE, S.; GAMBHIR, S. S. Reproducibility of 3'-Deoxy-3'- ^{18}F -Fluorothymidine MicroPET Studies in Tumor Xenografts in Mice. ***The Journal of Nuclear Medicine***, v. 46, p. 1851-1857, 2005.
72. LUCIGNANI, G. Imaging in cancer therapy and drug development. ***European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging***, v. 33, p. 386-388, 2006.
73. MANKOFF D. A; DEHDASHITI, F.; SHIELDS, A. F. Characterizing tumors using metabolic imaging: PET imaging of cellular proliferation and tumor receptors. ***Neoplasia***, v. 2, p. 71-88, 2000.
74. STEEL, C. J.; BRADY, F.; LUTHRA, S. K.; BROWN, G.; KHAN, I.; POOLE, K. G.; SERGIS, A.; JONES, T.; PRICE, P. M. An automated radiosynthesis of 2- $^{[11\text{C}]}$ thymidine using anhydrous $^{[11\text{C}]}$ urea derived from $^{[11\text{C}]}$ phosgene. ***Applied Radiation and Isotopes***, v. 51, p. 377-388, 1999.
75. MEDEIROS, R. B.; GODINHO, R. O.; MATTOS, M. F. S. S. Comparison of the efficacy of biodegradable and non- biodegradable scintillation liquids on the counting of tritium- and $^{[14\text{C}]}$ -labeled compounds. ***Brazilian Journal of Medical and Biological Research***, v. 36, p. 1733-1739, 2003.

76. PEREIRA, V. R. A.; LORENA, V. M. B.; NAKAZAWA, M.; SILVA, A. P. G.; MONTARROYOS, U.; CORREA-OLIVEIRA, R.; GOMES, Y. M. Evaluation of the immune response to CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi* in C57BL/6 mice. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 4, p. 435-440, 2003.
77. COSTA, G.; CUNHA-MELO, J. R.; AGUIAR, B. G.; GONÇALVES, S. C.; TOPPA, N. H.; COELHO, P. M. Z. Hepatic regeneration after partial hepatectomy in mice infected with *Schistosoma mansoni*, at the acute and chronic phases of the disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 41, n. 4, p. 225-258, 1999.
78. WEI, L.; BABICH, J.; ECKELMAN, W. C.; ZUBIETA, J. Rhenium Tricarbonyl Core Complexes of Thymidine and Uridine Derivatives. *Inorganic Chemistry*, v. 44, p. 2198-2209, 2005.
79. WELLS, R.; GUNN, R. N.; ALISON, M.; STEEL, C.; GOLDING, M.; RANICAR, A. S.; BRADY, F.; OSMAN, S.; JONES, T.; PRICE, P. Assessment of Proliferation in Vivo Using 2-[¹¹C]Thymidine Positron Emission Tomography in Advacend Intra-abdominal Malignancies. *Cancer Research*, v. 62, p. 5698-5702, 2002.
80. SHIELDS, A. F.; MANKOFF, D.; GRAHAM, M. M.; ZHENG, M.; KOZAWA, S. M.; LINK, J. M. KROHN, K. A. Analysis of 2-Carbon-11-Thymidine Blood Metabolites in PET Imaging. *The Journal of Nuclear Medicine*, v. 37, p. 290-296, 1996.
81. MANKOFF, D. A.; SHIELDS, A. F.; GRAHAM, M. M.; LINK, J. M., EARY, J. F.; KROHN, K. A. Kinetic analysis of 2-[Carbon-11]Thymidine PET Imaging Studies: Compartmental Model and Mathematical Analysis. *The Journal of Nuclear Medicine*, v. 39, p. 1043-1055, 1998.
82. BARTHEL, H.; PERUMAL, M.; LATIGO, J.; HE, Q.; BRADY, F.; LUTHRA, S. K.; PRICE, P. M. The uptake of 3'-deoxy-3' [¹⁸F]fluorothymidine into L5178Y tumours in vivo is dependent on thymidine kinase 1 protein levels. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, v. 32, p. 257-263, 2005.
83. SCHMID, M.; NEUMAIER, B.; VOGG, A. T. J.; WCZASEK, K.; FRIESEN, C.; MOTTAGHY, F. M.; BUCK, A.; RESKE, S. Synthesis and evaluation of a radiometal-labeled macrocyclic chelator-derivatised thymidine analog. *Nuclear Medicine and Biology*, v. 33, p. 359-366, 2006.
84. LOBERG, M. D.; COOPER, M.; HARVEY, E. Development of new radiopharmaceuticals based on N-substitution of iminodiacetic acid. *The Journal of Nuclear Medicine*, v. 17, p. 633-638, 1976.

85. BARROS, A. C. S. D.; MURANAKA, E. N. K.; MORI, L. J.; PELIZON, C. H. T.; IRIYA, K.; GIOCONDO, G.; PINOTTI, J. A. Induction of Experimental Mammary Carcinogenesis in rats with 7,12-dimethylbenz(A)anthracene, *Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo*, v. 59, n. 5, p.257-261, 2004.
86. WELCH, M. J. $[Tc(CO)_3]^+$ chemistry: a promising new concept for SPET?, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, v. 30, p. 1302-1302, 2003.
87. QAIM, S. M. Production of High Purity ^{94m}Tc for Positron Emission Tomography Studies. *Nuclear Medicine and Biology*, v. 27, p. 323-328, 2000.
88. SHIELDS, A. F.; GRIERSON, J. R.; KOZAWA, S. M., ZHENG, M. Development of Labeled Thymidine Analogs for Imaging Tumor Proliferation. *Nuclear Medicine and Biology*, v. 23, p. 17-22, 1996.
89. BOGDAN, J. A.; NAZARIO-LARRIEU, J.; SARWAR, J.; ALEXANDER, P.; BLAKE, M. S. Bordetella pertussis Autoregulates Pertussis Toxin Production through the Metabolism of Cysteine. *Infection and Immunity*, v. 69, n. 11, p. 6823-6830, 2001.
90. MEDICAL ENCYCLOPEDIA. Medline Plus, National Library of Medicine, Maryland (EUA), 2006. Disponível em: <<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003361.htm>>. Acesso em: 16 dez. 2006.
91. DA SILVA, L. R.; FERREIRA, M. M. C. Estudo do Coeficiente de Partição octanol-água de bifenilas policloradas (PCBs) utilizando parâmetros topológicos. *Química Nova*, v. 26, n. 3, p. 312-318, 2003.
92. ZHANG, J. B; WANG, X. B.; LI, C. Y. Synthesis and biodistribution of a new ^{99m}Tc nitrido complex for cerebral imaging. *Nuclear Medicine and Biology*, v. 29, p. 665-669, 2002.
93. SCHWARTZ, J.; TAMURA, Y.; JORDAN, R.; GRIERSON, J. R.; KROHN, K. A. Monitoring Tumor Cell Proliferation by Targeting DNA Synthetic Process with Thymidine and Thymidine Analogs. *The Journal of Nuclear Medicine*, v. 44, p. 2027-2032, 2003.
94. LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L., MATSUDARA, P., BALTIMORE, D.; DARNELL, J. *Biologia Celular e Molecular*. 4ª ed. Rio de Janeiro, RJ: Livraria e Editora Revinter Ltda., 2002.

95. SATPATI, D.; BAPAT, K.; BANERJEE, S.; KOTHARI, K.; SAMUEL, G.; VENKATESH, M. $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HTIDA}$: Synthesis, Radiolabeling and Biodistribution. *Indian Journal of Nuclear Medicine*, v. 19, n. 4, p. 141-142, 2004.