

ALYNE ELOISE LAFRATTA

Preparo e avaliação dos complexos de derivados de
tiossemicarbazonas com ($^{67/68}\text{Ga}$)gálio,
 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tecnécio e (^{111}In)índio, como potenciais
agentes para detecção de tumores

São Paulo

2016

ALYNE ELOISE LAFRATTA

Preparo e avaliação dos complexos de derivados de
tiossemicarbazonas com ($^{67/68}\text{Ga}$)gálio, [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]tecnécio e
(^{111}In)índio, como potenciais agentes para detecção de
tumores

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Oncologia

Orientador: Dr. Fabio Luiz Navarro Marques

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lafratta, Alyne Eloise

Preparo e avaliação dos complexos de derivados de tiossemicarbazonas com ($^{67/68}\text{Ga}$)gálio, ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)tecnécio e (^{111}In)índio, como potenciais agentes para detecção de tumores / Alyne Eloise Lafratta. -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Oncologia.

Orientador: Fabio Luiz Navarro Marques.

Descritores: 1.Compostos radiofarmacêuticos 2.Melanoma experimental
3.Compostos de tecnécio 4.Radioisótopos de índio 5.Radioisótopos de gálio
6.Cintilografia

USP/FM/DBD-114/16

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

À minha querida madrinha e avó Layde, por sempre caminhar ao meu lado, pela cumplicidade e por acreditar em mim desde o dia do meu nascimento.

Aos meus avôs e avós, Domingos (*In memoriam*), Antônio e Adelina, pela formação do meu caráter, pela dedicação, incentivos e imensa sabedoria.

À minha mãe Marlene, meu pai Lauro (*In memoriam*), meu irmão Lauro, minha cunhada Tatiane e meu sobrinho Nicolas, vocês sempre alegam meus dias e me ajudam nos momentos mais difíceis.

Ao meu noivo Danilo pela imensa paciência, carinho, atenção e dedicação; sem você seria muito difícil continuar a caminhada.

À minha prima Marina (*In memoriam*), por ter plantado a semente da ciência em meu coração.

Aos meus tios Marisa e Edison, grandes incentivadores à escrita, às boas leituras e aos estudos, exemplos de superação, força e honestidade, aprendo muito com vocês.

Aos meus tios Tanya e José Antônio pelos bons conselhos, orientações sempre oportunas, amparo nos momentos mais difíceis, tenho-os como exemplo de profissionais admiráveis da área da saúde.

Aos meus velhos e queridos amigos, Adriana, Henrique e Nathalie pela amizade, boas risadas, amparo e consideração.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Fabio Luiz Navarro Marques, por ter oferecido a oportunidade de adentrar as engrenagens da ciência, pela amizade, comprometimento e profissionalismo.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Buchpiguel, pelos incentivos e apoio.

Ao Prof. Dr. Roger Chammas, pelas sugestões e apoio.

Ao Dr. Victor Marcelo Deflon, pela colaboração e apoio.

Ao Dr. André Gustavo de Araujo Fernandes, pela colaboração e desenvolvimento de toda parte de síntese das moléculas utilizadas neste trabalho.

Aos colegas do IQ-USP - São Carlos, Henrique Koch, Pedro Ivo, Viviana Prado, Rafaela Pesci, pela amizade, apoio e colaboração na realização deste trabalho.

À minha grande amiga, MSc. Julia Armiliato Gonzalez, pela amizade verdadeira, cumplicidade, conselhos e carinho indispensáveis para realização deste trabalho.

Aos amigos, MSc. Bruno Martins Pássaro e MSc. Heber Simões Videira, pela amizade, consideração e apoio em todos os momentos.

Às amigas MSc. Carolina Luz, MSc. Monick Evangelista, pela contribuição, amizade, momentos de descontração e auxílios na parte experimental do trabalho.

Às colegas Dra. Daniele de Paula Faria e Camila Carneiro, pelos ensinamentos, apoio, colaboração e auxílio na aquisição das imagens em micro PET/SPECT/CT.

À amiga de profissão, Evelyn Martins, pela compreensão, boa vontade, incentivos e amizade.

Aos colaboradores do LIM-31, Dra. Débora Levy, Dr. Jorge Ruiz e MSc. Livia Fernandes, pelo apoio e contribuição na parte de biologia molecular.

À colega Dra. Camila Morais Melo, pelo auxílio na parte experimental em cultura celular.

Às amigas Marluce e Josy, por estarem sempre presentes, pelo imensurável comprometimento no desenvolvimento de toda a parte de experimentação animal.

Ao Sr. MSc. Jair Mengatti, diretor do Centro de Radiofarmácia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, e equipe, pelo fornecimento das doses de ^{67}Ga e ^{111}In .

À Dra. Marycel Barbosa, do Hospital Albert Einstein, e equipe, pelo suporte nos experimentos com ^{68}Ga .

Ao Centro de Medicina Nuclear do InRAD - HCFMUSP, pelo acolhimento,
oportunidade e estadia para o desenvolvimento desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
pela bolsa de estudo para realização deste projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo
auxílio financeiro para realização deste projeto – 2014/22250-1

EPÍGRAFE

"Ser feliz não é ter uma vida perfeita, mas deixar de ser vítima dos problemas e se tornar o autor da sua própria história".

(Abraham Lincoln)

Resumo

Lafratta, A.E. *Preparo e avaliação dos complexos de derivados de tiossemicarbazonas com (^{67/68}Ga)gálio, [^{99m}Tc]tecnécio e (¹¹¹In)índio, como potenciais agentes para detecção de tumores* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Nas últimas décadas a medicina nuclear tornou-se uma grande aliada no auxílio ao diagnóstico de doenças e também para o tratamento do câncer. Parte deste sucesso está relacionada à constante pesquisa e desenvolvimento de novos radiofármacos.

Uma classe de molécula que vem se mostrando promissora para o tratamento de tumores, tanto na sua forma orgânica quanto na forma de complexos organo-metálicos, é a tiossemicarbazona e seus derivados, os quais também podem formar complexos com radioisótopos metálicos dando origem a radiofármacos para diagnóstico e terapia.

Neste trabalho foram preparados complexos com o ligante benzil-5-hidroxi-3-metil-5-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-carboditionato (H₂bdtc) com os radioisótopos [^{99m}Tc]tecnécio, (^{67/68}Ga)gálio e (¹¹¹In)índio, e foram avaliados a pureza radioquímica, Log P e a estabilidade na presença de L-cisteína, L-histidina, soro albumina humana (SAH) e plasma de sangue humano; também foram avaliadas a taxa de captação dos radiofármacos *in vitro* em células de melanoma murino B16F10 e TM1M, além da avaliação da captação *ex vivo* e *in vivo* utilizando camundongos C57B/6 inoculados com as duas

linhagens tumorais. Com o [^{99m}Tc]tecnécio foram obtidos dois complexos diferentes, dependendo da concentração do PBS na solução, sendo que em um deles foi possível confirmar sua estrutura como $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$ a partir do complexo de rênio $[\text{ReO}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$, o outro complexo de [^{99m}Tc]tecnécio, bem como de ($^{67/68}\text{Ga}$)gálio e (^{111}In)índio não tiveram a estrutura caracterizada. A eficiência de marcação dos complexos foi superior a 90 %, com Log P maior que 1 para os complexos $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$, $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$ e $[\text{bdtc}]\text{-}^{67/68}\text{Ga}$ e 0,9 para $[\text{bdtc}]\text{-}^{111}\text{In}$. Todos os complexos se mostraram com boa estabilidade na presença de L-cisteína e L-histidina, principalmente na primeira hora de incubação, mas não o foram na presença de SAH e plasma. A captação *in vitro* dos complexos em células B16F10 e TM1M variou entre 0,6 % e 1,8 %, e nos estudos de biodistribuição *ex vivo* foi observada intensa e persistente captação hepática e no baço, superando 90 %, e captação no tumor variando de 0,2 % a 3 %, enquanto que nas imagens *in vivo* não foi possível observar de forma adequada captação nos tumores a ponto de permitir o uso como agente de diagnóstico.

Os resultados permitem concluir que os complexos de derivados tiossemicarbazonas podem formar complexos com diferentes metais, mas novos derivados devem ser preparados para tentar melhorar o desempenho nos sistemas biológicos.

Os experimentos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina – USP, processo 372/12.

Descritores: Tiossemicarbazonas; Complexos metálicos; Quelantes; Detecção de tumores; Melanoma; Radioisótopos em medicina; Tecnécio; Rênio; Gálio; Índio; Radiofarmácia; Medicina nuclear.

Abstract

Lafratta, A.E. *Preparation and evaluation of the thiosemicarbazone derivative complexes ($^{67/68}\text{Ga}$)gallium, [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]technetium and (^{111}In)Indium as potential agents for tumor detection* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

In recent decades, nuclear medicine has been used as diagnostic agent for disease and for the treatment of cancer. Part of this success is related to the constant research and development of new radiopharmaceuticals.

Thiosemicarbazone and their derivatives have proven to be promising agent for the treatment of tumors, both in its organic form or as organo-metallic complexes. Also, they can to form complexes with metal radioisotopes giving radiopharmaceuticals for diagnosis and therapy.

In this work we prepared complex of benzyl-5-hydroxy-3-methyl-5-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-carbodionato (H_2bdtc) with radioisotopes [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]technetium ($^{67/68}\text{Ga}$)gallium and (^{111}In)indium and the radiochemical purity, Log P and stability in the presence of L-cysteine, L-histidine, human serum albumin (HSA) and human blood plasma were assessed; also were assessed the *in vitro* uptake rate of radiopharmaceuticals in murine melanoma cells B16F10 and TM1M, besides the evaluation of ex vivo uptake and in vivo using C57Bl/6 mice inoculated with both tumor lines.

With [$^{99\text{m}}\text{T}$] technetium two different complexes were obtained, depending on the concentration of the PBS in the solution, and one of them was

had its structure to confirm as $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$ from the standard rhenium complex $[\text{ReO}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$, the other $[[^{99m}\text{Tc}]$ technetium complex as well as $(^{67/68}\text{Ga})$ gallium and (^{111}In) indium not have characterized the structure. The labeling efficiency of complexes was higher than 90%, with log P higher than 1 for the complexes $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$, $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$ and $[(^{67/68}\text{Ga})\text{-bdtc}]$ and 0.9 to $[[^{111}\text{In}]\text{-bdtc}]$. All the complexes showed good stability in the presence of L-cysteine and L-histidine, especially in the first hour of incubation, but not in the presence of HSA and plasma. The uptake in vitro complexes in B16F10 and TM1M cells varied between 0.6% and 1.8%, and in *ex vivo* biodistribution studies was observed intense and persistent liver uptake and spleen, exceeding 90%, and tumor uptake in changing from 0.2% to 3%, while in vivo imaging was not possible to observe a proper uptake in tumors, not allowing to use these molecules as a diagnostic agent.

The results indicate that the thiosemicarbazone derivative complex can give complexes with different metals, but new derivatives should be prepared to try to improve performance in biological systems.

The animal experimentation was approved by Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina – USP, process 372/12.

Descriptors: Thiosemicarbazones; Metal complex; Chelate; Tumor detection; Melanoma; Radioisotopes in medicine, Technetium; Rhenium; Gallium; Indium; Radiopharmacy; Nuclear medicine.

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura da tiossemicarbazona (1,2) e tiossemicabazato (a,b).....	34
Figura 2. Análise retrossintética de tiossemicarbazonas	35
Figura 3. Estrutura da Triapina 3-AP (A) e do Dp44mT (B)	37
Figura 4. Quelantes utilizados para complexar gálio ⁴⁸	43
Figura 5. Alguns sistemas quelantes para índio	46
Figura 6. Esquema de decaimento do ⁹⁹ Mo ao ^{99m} Tc.....	46
Figura 7. Esquema de obtenção dos radiofármacos de [^{99m} Tc]tecnécio por processo de marcação direta ou por transquelação (e-ox = estado de oxidação)	48
Figura 8. Estrutura de complexos de [^{99m} Tc]tecnécio utilizados em medicina nuclear ⁵⁶	49
Figura 9. Estrutura dos ligantes (A) benzil-5-hidroxi-3-metil-5-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-carboditionato (H ₂ bdtc), (B) [ReO(bdtc)(Hbdtc)]	52
Figura 10. Esquema de ensaios de captação celular	67
Figura 11. Ensaio de eliminação celular nos tempos de 15, 60 e 120 min, após incubação inicial por 120 min.	69
Figura 12. Ensaio de eliminação celular no tempo de 120 min, após incubação inicial por 120 min.	70
Figura 13. Cromatogramas (A) Marcação com variações de pH 3,0 - 5,0 e temperatura; (B) Marcação em pH 5,5 e variações de temperatura; (C) Marcação em pH 7, com variações de volume final de tampão e temperatura.	77
Figura 14. Rendimento do composto [[^{99m} Tc]-bdtc] em função do pH, temperatura e volume de PBS 0,1 N.....	78

Figura 15. Cromatogramas em HPLC: (A) Complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$ por detecção em Flow Scintillation Analyzer, Radiomatic 610TR, processado em software ProFSA, PerkinElmer. (B) Padrão não radioativo $[\text{ReO}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$ detectado por UV a 180 nm, utilizando HPLC, Software Class-VP, Shimadzu.	80
Figura 16. Cromatograma do complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$, obtido em: (A) Papel Whatman 3MM / NaCl 0,9 %; (B) Papel Whatman 3MM / acetona. A distribuição foi analisada em scanner detector AR-2000 RC Scanner Bioscan e processada usando WinScan Software.....	81
Figura 17. Cromatogramas (A) Complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$ marcado sem aquecimento; (B) Complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$ aquecido à 90 °C por 5 minutos; (C) Injeção de $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$. HPLC Flow Scintillation Analyzer, Radiomatic 610TR, software ProFSA, PerkinElmer.....	82
Figura 18. Cromatograma do complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$, obtida em: (A) Papel Whatman 3MM / NaCl 0,9 %; (B) Papel Whatman 3MM / acetona A distribuição foi analisada em scanner detector AR-2000 RC Scanner Bioscan e processada usando WinScan Software.	83
Figura 19. Cromatogramas (A) $^{111}\text{InCl}_3$ e (B) complexo $[[^{111}\text{In}]\text{-bdtc}]$, obtido em papel Whatman 4/ $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (75:25). A distribuição foi analisada em scanner detector AR-2000 RC Scanner Bioscan e processada usando WinScan Software.	85
Figura 20. Cromatogramas (A) $[[^{67}\text{Ga}(\text{cit})_2]^{3-}$ e (B) $^{67}\text{GaCl}_3$, obtido em papel Whatman 3MM/Py:EtOH:H ₂ O (1:2:4). A distribuição foi analisada em scanner detector AR-2000 RC Scanner Bioscan e processada usando WinScan Software.	86

Figura 21. Cromatograma do: (A) $^{67}\text{GaCl}_3$ e (B) $^{67}\text{Ga-bdte}$, obtido em papel Whatman 3MMmm/Acetonitrila:H ₂ O (75:25). A distribuição foi analisada em scanner detector AR-2000 RC Scanner Bioscan e processada usando WinScan Software.	86
Figura 22. Cromatogramas (A) complexo $[[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdte})(\text{Hbdte})]$ injetado no tempo 0; (B) Co-injeção do complexo $[[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdte})(\text{Hbdte})]$ com $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$. 90	
Figura 23. Cromatogramas do complexo $[[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdte})(\text{Hbdte})]$ incubado na presença de L-cisteína 1 mM : (A) no tempo), (B) por 1 hora; (C) por 3 horas; (D) por 6 horas.	92
Figura 24. Estabilidade do complexo $[[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdte})(\text{Hbdte})]$ incubado em solução de L-cisteína por 0, 1, 3 e 6 horas determinado por cromatografia planar em : (A) em papel Whatman 3MMMM/acetona ; (B) papel Whatman 3MM/NaCl 0,9 %.	93
Figura 25. Cromatogramas do complexo $[[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdte})(\text{Hbdte})]$ incubado na presença de L-histidina 1 mM: (A) por 1 hora; (B) por 3 horas; (C) por 6 horas.	94
Figura 26. Estabilidade do complexo $[[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdte})(\text{Hbdte})]$ incubado em solução de L-histidina por 0, 1, 3 e 6 horas determinado por cromatografia planar em : (A) em papel Whatman 3MMMM/acetona ; (B) papel Whatman 3MM/NaCl 0,9 %.	95
Figura 27. Cromatografia planar do complexo $[[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdte})(\text{Hbdte})]$ incubado em plasma de sangue humano, por 0, 1, 3 e 6 horas em: (A) papel Whatman 3MM/acetona ; (B) papel Whatman 3MM/NaCl 0,9 %; (C) ITLC-SG-Alb/EtOH:NH ₄ OH:H ₂ O (2:1:5), com $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ como referência.	97

Figura 28. Cromatografia planar do complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$ incubado em solução de albumina humana a 0,2 %, por 0, 1, 3 e 6 horas em: (A) papel Whatman 3MM/acetona ; (B) papel Whatman 3MM/NaCl 0,9 %; (C) ITLC-SG-Alb/EtOH:NH₄OH:H₂O (2:1:5), com $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ como referência. 99

Figura 29. Cromatografia planar do: (A) complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$ em papel Whatman 3MM/acetona nos tempos 0, 1, 3 e 6 horas incubado em solução de L-cisteína; (B) complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$, em papel Whatman 3MM/NaCl 0,9 % nos tempos 0, 1, 3 e 6 horas incubado em solução de L-cisteína..... 101

Figura 30. Cromatografia planar do: (A) Complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$ em papel Whatman 3MM/acetona nos tempos 0, 1, 3 e 6 horas incubado em solução de L-histidina; (B) complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$ em papel Whatman 3MM/NaCl 0,9 % nos tempos 0, 1, 3 e 6 horas incubado em solução de L-histidina. 102

Figura 31. Cromatografia planar do complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$ incubado em plasma de sangue humano, por 0, 1, 3 e 6 horas em: (A) papel Whatman 3MM/acetona ; (B) papel Whatman 3MM/NaCl 0,9 %; (C) ITLC-SG-Alb/EtOH:NH₄OH:H₂O (2:1:5), com $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ como referência..... 104

Figura 32. Cromatografia planar do complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$ incubado em solução de albumina a 0,2 %, por 0, 1, 3 e 6 horas em: (A) papel Whatman 3MM/acetona ; (B) papel Whatman 3MM/NaCl 0,9 %; (C) ITLC-SG-Alb/EtOH:NH₄OH:H₂O (2:1:5), com $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ como referência..... 106

Figura 33. Cromatografia planar do: (A) complexo $[[^{111}\text{In}]\text{-bdtc}]$ em papel Whatman 4/CHCl₃:MeOH (75:25) nos tempos 0, 1, 3 e 6 horas incubado em L-cisteína; (B) complexo $[[^{111}\text{In}]\text{-bdtc}]$ em papel Whatman 4/CHCl₃:MeOH (75:25) nos tempos 0, 1, 3 e 6 horas incubado em L-histidina. ¹¹¹InCl₃ foi utilizado como referência. 108

Figura 34. Cromatografia planar do complexo [$^{111}\text{In-bdte}$] não incubada ($t= 0$ h) e incubado em: (A) plasma humano e (B) solução de soro albumina humana a 0,2 %, por 1, 3 e 6 horas, e $^{111}\text{InCl}_3$ em ITLC-SG-Alb/EtOH: NH_4OH : H_2O (2:1:5).....	109
Figura 35. Cromatografia planar do: (A) $^{67}\text{GaCl}_3$ e complexo [$^{67}\text{Ga-bdte}$] em papel Whatman 3 MM/ AcN : H_2O (75:25) nos tempos 0, 1, 3 e 6 horas incubado em L-cisteína; (B) $^{67}\text{GaCl}_3$ e complexo [$^{67}\text{Ga-bdte}$] em papel Whatman 3 MM/ AcN : H_2O (75:25) nos tempos 0, 1, 3 e 6 horas incubado em L-histidina.	111
Figura 36. Cromatografia planar do complexo [$^{67}\text{Ga-bdte}$] não incubada ($t= 0$ h) e incubado em: (A) plasma humano e (B) solução de soro albumina humana a 0,2 %, por 1, 3 e 6 horas, e $^{67}\text{GaCl}_3$ em ITLC-SG-Alb/EtOH: NH_4OH : H_2O (2:1:5).....	112
Figura 37. Taxa de captação dos radiofármacos [[$^{99\text{m}}\text{Tc}$](bdte)(Hbdte)], [[$^{99\text{m}}\text{Tc}$]-bdte], [$^{111}\text{In-bdte}$] e [$^{67}\text{Ga-bdte}$], em função do tempos, em células: (A) TM1M e (B) B16F10.....	115
Figura 38. Taxa de eliminação dos radiofármacos [[$^{99\text{m}}\text{Tc}$](bdte)(Hbdte)], [[$^{99\text{m}}\text{Tc}$]-bdte], [$^{111}\text{In-bdte}$] e [$^{67}\text{Ga-bdte}$], após incubação inicial de 120 min, em função do tempo, em células: (A) TM1M e (B) B16F10.	118
Figura 39. Biodistribuição ex vivo do [[$^{99\text{m}}\text{Tc}$]O(bdte)(Hbdte)], em animais sadios ($n=2-3$), expressa em % da dose injetada/órgão (% DI).	120
Figura 40. Biodistribuição ex vivo do [[$^{99\text{m}}\text{Tc}$]O(bdte)(Hbdte)], em animais sadios ($n=2-3$), expressa % da dose injetada/g de órgão (% DI/g) ($n=3-4$)...	122
Figura 41. Biodistribuição ex vivo do [[$^{99\text{m}}\text{Tc}$]-bdte], em animais sadios ($n=2-3$), expresso em % da dose injetada/órgão (% DI) ($n=3-4$).....	123

Figura 42. Biodistribuição <i>ex vivo</i> do [^{99m}Tc]-bdtc], em animais sadios (n=2-3), expresso em % de dose injetada/ g órgão (% DI/g) (n=3-4).....	124
Figura 43. Biodistribuição <i>ex vivo</i> do [^{99m}Tc]O(bdtc)(Hbdtc)] em animais com tumores B16F10 e TM1M (n=2-3), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por órgão (% DI)	127
Figura 44. Biodistribuição <i>ex vivo</i> do [^{99m}Tc]O(bdtc)(Hbdtc)] em animais com tumores B16F10 e TM1M (n=2-3), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por grama de órgão (% DI/g).	128
Figura 45. Biodistribuição <i>ex vivo</i> do [^{99m}Tc]-bdtc] em animais com tumores B16F10 e TM1M (n=2-3), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por órgão (% DI).....	129
Figura 46. Biodistribuição <i>ex vivo</i> do [^{99m}Tc]-bdtc] em animais com tumores B16F10 e TM1M (n=2-3), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por grama de órgão (% DI/g).....	130
Figura 47. Biodistribuição <i>ex vivo</i> do [^{111}In -bdtc] em animais com tumores B16F10 e TM1M (n=2-3), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por órgão (% DI).....	133
Figura 48. Biodistribuição <i>ex vivo</i> do [^{111}In -bdtc] em animais com tumores B16F10 e TM1M (n=2-3), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por grama de órgão (% DI/g).....	134
Figura 49. Biodistribuição <i>ex vivo</i> do [^{68}Ga -bdtc] em animais com tumores B16F10 e TM1M (n=2-3, *=1), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por órgão (% DI).	135

Figura 50. Biodistribuição ex vivo do [⁶⁸ Ga-bdtdc] em animais com tumores B16F10 e TM1M (n=2-3, *=1), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por grama de órgão (% DI/g).	136
Figura 51. Imagens tomográficas SPECT/CT após: (A); (B) 1 hora e (C); (D) 2 horas da injeção do composto [[^{99m} Tc]O(bdtdc)(Hbdtdc)]	138
Figura 52. Imagem SPECT/CT após 1 hora da injeção do composto [[^{99m} Tc]-bdtdc]	Erro! Indicador não definido.
Figura 53. Imagem planar de camundongo C57/Bl6 com implante de células TM1M lado esquerdo e B16F10 lado direito: (A) por tomografia computadorizada (CT); (B) por SPECT 2 horas após administração do [[^{99m} Tc]O(bdtdc)(Hbdtdc)]; (C) fusão de imagens CT e SPECT.	Erro! Indicador não definido.
Figura 54. (A) (CT) do animal com tumor TM1M lado esquerdo e B16F10 lado direito. (B) PET do animal com tumor TM1M lado esquerdo e B16F10 lado direito. (C) PET/CT do animal com tumor TM1M lado esquerdo e B16F10 lado direito.	140

Lista de Tabelas

Tabela 1. Exemplos de formas de decaimento de radioisótopos.....	39
Tabela 2. Alguns nuclídeos de gálio e características físicas	41
Tabela 3. Alguns nuclídeos de índio e características físicas	44
Tabela 4. Alguns radionuclídeos de tecnécio e características físicas	47
Tabela 5. Condições para reação entre [^{99m} Tc]tecnécio e H ₂ bdtc	57
Tabela 6. Sistemas cromatográficos utilizados na cromatografia planar para controle de qualidade dos complexos	62
Tabela 7. Rendimento do composto [[^{99m} Tc]-bdtc] em função do pH, temperatura e volume de PBS 0,1 N.....	78
Tabela 8. Valor do Log P dos complexos de H ₂ bdtc com radiometais, expressos como resultado da média de duas medidas.....	88
Tabela 9. Biodistribuição ex vivo do [[^{99m} Tc]O(bdte)(Hbdte)] em animais sadios (n=2-3), expressa em % de dose injetada/órgão (% DI).....	120
Tabela 10. Biodistribuição ex vivo do [[^{99m} Tc]O(bdte)(Hbdte)] em animais sadios (n=2-3), expressa em % de dose injetada/g órgão (% DI/g) (n=3-4).....	122
Tabela 11. Biodistribuição ex vivo do [[^{99m} Tc]-bdtc] em animais sadios (n=2-3), expressa em % de dose injetada/órgão (% DI) (n=3-4).....	123
Tabela 12. Biodistribuição ex vivo do [[^{99m} Tc]-bdtc], em animais sadios (n=2-3), expressa em % de dose injetada/grama de órgão (% DI/g) (n=3-4).	124

Tabela 13. Biodistribuição ex vivo do [^{99m}Tc]O(bdtc)(Hbdtc)] em animais com tumores B16F10 e TM1M (n=2-3), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por órgão (% DI).	127
Tabela 14. Biodistribuição ex vivo do [^{99m}Tc]O(bdtc)(Hbdtc)] em animais com tumores B16F10 e TM1M (n=2-3), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por grama de órgão (% DI/g).	128
Tabela 15. Biodistribuição ex vivo do [^{99m}Tc]-bdtc] em animais com tumores B16F10 e TM1M (n=2-3), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por órgão (% DI).....	129
Tabela 16. Biodistribuição ex vivo do [^{99m}Tc]-bdtc] em animais) com tumores B16F10 e TM1M (n=2-3), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por grama de órgão (% DI/g).....	130
Tabela 17. Biodistribuição ex vivo do [^{111}In -bdtc] em animais com tumores B16F10 e TM1M (n=2-3), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por órgão (% DI).....	133
Tabela 18. Biodistribuição ex vivo do [^{111}In -bdtc] em animais com tumores B16F10 e TM1M (n=2-3), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por grama de órgão (% DI/g).....	134
Tabela 19. Biodistribuição ex vivo do [^{68}Ga -bdtc] em animais com tumores B16F10 e TM1M (n=2-3, *=1), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por órgão (% DI).	135
Tabela 20. Biodistribuição ex vivo do [^{68}Ga -bdtc] em animais com tumores B16F10 e TM1M (n=2-3, *=1), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por grama de órgão (% DI/g).	136

Tabela 21. Relação tumor/sangue (% ID/g) dos complexos [^{111}In -bdtc] e [^{68}Ga -bdtc] para as linhagens de melanoma murino B16F10 e TM1M 137

Lista de Abreviações

[¹¹¹In-bdtk]	Complexo benzil-5-hidroxi-3-metil-5-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-carboditionato (¹¹¹ In)índio (III)
[⁶⁷Ga-bdtk]	Complexo benzil-5-hidroxi-3-metil-5-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-carboditionato (^{67/68} In)gálio (III)
[^{99m}Tc]O(bdtk)(Hbdtk)]	Benzil-5-hidroxi-3-metil-5-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-carboditionato complexo com o isótopo metaestável de massa 99 do tecnécio
[^{99m}Tc]-bdtk]	Benzil-5-hidroxi-3-metil-5-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-carboditionato complexo com o isótopo metaestável de massa 99 do tecnécio
[ReO(bdtk)(Hbdtk)]	Complexo bis-(benzil-5-hidroxi-3-metil-5-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-carboditionato) rênio (V)
°C	Grau Celsius
μCi	Microcurie
μL	Microlitro
¹¹¹In	Isótopo de massa 111 do índio
⁶⁶Ga	Isótopo de massa 66 do gálio
⁶⁷Ga	Isótopo de massa 67 do gálio
⁶⁸Ga	Isótopo de massa 68 do gálio
⁹⁹Mo	Isótopo de massa 99 do molibdênio
^{99m}Tc	Isótopo metaestável de massa 99 do tecnécio
AcN	Acetonitrila
B16F10	Linhagem celular de melanoma murino
bdtk	Benzil-5-hidroxi-3-metil-5-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-carboditionato

Bq	Becquerel
B16F10	Linhagem celular de melanoma murino
CH₃CH₂OH	Etanol
CH₃COCH₃	Acetona
CH₃CN	Acetonitrila
CH₃OH	Metanol
CH₃SOCH₃	Dimetilssulfóxido
CHCl₃	Clorofórmio
cm	Centímetro
cm²	Centrímetro quadrado
CO₂	Dióxido de carbono
CT	Computed tomography (Tomografia computadorizada)
Cys	Cisteína
DMSO	Dimetilssulfóxido
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid - Ácido etilenodiaminotetraacético
EtOH	Etanol
g	Grama
H₂bdtc	Benzil-5-hidroxi-3-metil-5-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-carboditionato
H₂O	Água
HCl	Ácido clorídrico
His	Histidina
HPLC	High Performance Liquid Chromatography ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

ITLC-SG	Instant Thin Layer Chromatography – Silica Gel ou Cromatografia em camada delgada de sílica gel
ITLC-SG-Alb	ITLC-SG- impregnado com albumina a 0,2 %
L	Litro
Log P	Valor logarítimo do coeficiente de partição
MBq	Megabecquerel
mCi	Milicurie
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mL/mim	Mililitro por minuto
mM	Milimol
mm	Milímetro
NaCl 0,9 %	Solução de cloreto de sódio a 0,9 % ou solução fisiológica
NaOH	Hidróxido de sódio
PBS	Phosphor burffer saline (Tampão fosfato salina)
PET	Positron emission tomography (Tomografia por emissão de pósitrons)
pH	Potencial hidrogeniônico
Py	Piridina
RCF	Relative <i>centrifugal</i> force - Força centrífuga relativa
RMPI	Roswell Park Memorial Institute
RPM	Rotações por minuto

SFB	Soro fetal bovino
Sn²⁺	Íon estanhoso
SnCl₂	Cloreto estanhoso
SPECT	<i>Single-photon emission computed tomography</i> (Tomografia computadorizada por emissão de fóton único)
SPF	Specific pathogen free (Livre de patógenos específicos)
^{99m}TcO₂	Óxido de tecnécio de massa 99
^{99m}TcO₄⁻	Ânion de pertecnetato de massa 99
TM1M	Linhagem celular de melanoma murino
Whatman 3 MM	Papel Whatman 3 MM
Whatman 4	Papel Whatman 4
µm	Micrômetro
% DI	Porcentagem de dose injetada por órgão
% DI/g	Porcentagem de dose injetada por grama de órgão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	32
1.1 Complexos organometálicos em medicina.....	32
1.2 Tiossemicarbazonas e tiossemicarbazatos: Estrutura molecular e síntese	33
1.2.1 Tiossemicarbazonas em oncologia.....	35
1.3 Radiofármacos	38
1.3.1 Gálio em medicina nuclear	40
1.3.2 Índio em medicina nuclear	43
1.3.3 Tecnécio em medicina nuclear	46
1.3.4 Complexos metálicos radioativos das tiossemicarbazonas	49
2 OBJETIVOS	53
2.1 Objetivo geral	53
2.2 Objetivos específicos	53
3 MATERIAL E MÉTODOS	54
3.1 Material	54
3.1.1 Equipamentos e sistemas.....	54
3.1.2 Reagentes e solventes	55
3.1.3 Misturas e soluções	56
3.2 Métodos	56

3.2.1 Avaliação do efeito do pH e temperatura na obtenção de [[^{99m} Tc]tecnécio com tiossemicarbazonas	57
3.2.2 Preparação do complexo [[^{99m} Tc](bdtc)(Hbdtc)].....	58
3.2.3 Preparação do complexo [[^{99m} Tc]-bdtc].....	59
3.2.4 Preparação do complexo [¹¹¹ In-bdtc]	59
3.2.4.1 Sob aquecimento.....	60
3.2.4.2 À temperatura ambiente	60
3.2.5 Preparação do complexo [⁶⁷ Ga-bdtc]].....	60
3.3 Determinação de parâmetros físico-químicos dos complexos	61
3.3.1 Determinação da pureza radioquímica por cromatografia planar	61
3.3.2 Determinação da pureza radioquímica por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	62
3.3.3 Determinação do coeficiente de partição	63
3.3.4 Avaliação da estabilidade dos complexos na ausência ou presença de L-cisteína e L- histidina, a 37 °C	63
3.3.5 Avaliação da ligação dos complexos frente às proteínas plasmáticas e soroalbumina humana	64
3.4 Estudos biológicos <i>in vitro</i>	64
3.4.1 Cultura de células B16F10 e TM1M.....	64
3.4.2 Viabilidade celular por azul de tripan	65
3.4.3 Ensaio de captação e eliminação dos radiofármacos em células ...	66
3.4.3.1 Plaqueamento celular	66

3.4.3.2 Ensaio de captação	67
3.4.3.3 Ensaio de eliminação	68
3.4.3.3.1 Avaliação sequencial nos tempos de 15, 60 e 120 minutos .	68
3.4.3.3.2 Avaliação no tempo de 120 minutos	69
3.5 Estudos de biodistribuição <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i>	70
3.5.1 Modelo animal.....	70
3.5.2 Implantação do tumor	71
3.5.3 Biodistribuição <i>ex vivo</i> dos radiofármacos [^{99m} Tc]-bdtc) e [[^{99m} Tc]O(bdtc)(Hbdtc)]	71
3.5.4 Biodistribuição <i>in vivo</i> dos radiofármacos por imagem	72
3.5.5 Processamento de imagens SPECT/CT e PET/CT	73
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
4.1 Preparação dos complexos de [^{99m} Tc]tecnécio	74
4.1.1 Avaliação do efeito do pH e temperatura na obtenção de [[^{99m} Tc]tecnécio com H ₂ bdtc.	74
4.1.2 Preparação e controle de qualidade dos complexos [[^{99m} Tc]O(bdtc)(Hbdtc)] e [[^{99m} Tc]-bdtc]	79
4.2 Preparo e controle de qualidade do complexo de ¹¹¹ In	84
4.3 Preparo e controle de qualidade do complexo de ⁶⁷ Ga.....	85
4.4 Determinação do coeficiente de partição (LogP)	87
4.5 Estabilidade <i>in vitro</i> dos complexos de [^{99m} Tc]tecnécio na presença de L- cisteína, L-histidina, plasma e albumina	88

4.5.1 Estabilidade <i>in vitro</i> do complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$ na presença de L-cisteína, L-histidina, plasma humano e soro albumina humana.....	89
4.5.2 Estabilidade <i>in vitro</i> do complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$ na presença de L-cisteína, L-histidina, plasma humano e soro albumina humana	100
4.6 Estabilidade <i>in vitro</i> do complexo $[[^{111}\text{In}\text{-bdtc}]$ na presença de L-cisteína, L-histidina, plasma humano e soro albumina humana	107
4.7 Estabilidade <i>in vitro</i> do complexo $[[^{67}\text{Ga}\text{-bdtc}]$ na presença de L-cisteína, L-histidina, plasma humano e soro albumina humana	110
4.8 Ensaio de captação e eliminação celular dos compostos radioativos marcados	113
4.8.1 Ensaio de captação dos radiofármacos	113
4.8.2 Ensaio de eliminação dos radiofármacos.....	116
4.9 Biodistribuição <i>ex vivo</i>	119
4.9.1 Ensaio de biodistribuição <i>ex vivo</i> dos complexos de tecnécio em animal sadio.....	119
4.9.2 Ensaio de biodistribuição <i>ex vivo</i> dos radiofármacos em animais com tumores de células B16F10 e TM1M	125
5.1 Biodistribuição <i>in vivo</i>	137
5.1.1 Ensaio de biodistribuição <i>in vivo</i> $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$ e $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})]$ em animal sadio	137
5.1.2 Ensaio de biodistribuição <i>in vivo</i> $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$ em animal com tumor	139

5.1.3 Ensaio de biodistribuição <i>in vivo</i> [⁶⁸ Ga-bdtdc] em animal com tumor	140
6 CONCLUSÕES	141
7 PRÓXIMAS ETAPAS	144
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	144

1 INTRODUÇÃO

1.1 Complexos organometálicos em medicina

A química dos complexos organometálicos, ao menos na idade moderna, começou a ser desvendada em 1760 quando um farmacêutico do exército francês, preparou um líquido vermelho fulmegante e inflamável, proveniente da mistura As_2O_3 e $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$, dando origem aos compostos $[(\text{AsMe}_2)_2\text{O}]$ e outros derivados. Diversos outros compostos foram preparados nas décadas seguintes, mas foi em meados dos anos de 1950 que a química dos complexos organometálicos aplicados à medicina toma corpo e, desde então, esse campo de estudo é responsável por desvendar mecanismos biológicos mediados por metais ou desenvolvimento de medicamentos baseados em complexos organometálicos¹

No desenvolvimento de medicamentos é importante destacar a preparação e o uso da cisplatina [*cis*(diaminodicloro)platina(II)], desenvolvida nos anos de 1960, a qual apresentou grande eficácia no tratamento de tumores de ovário e testículo. Todavia, sua ampla utilização foi prejudicada pelos efeitos colaterais intensos, como o alto poder de toxicidade renal e neurológica, e por surgimento de um processo de resistência das células tumorais àquele composto².

Desde então, a pesquisa sobre complexos organometálicos vêm se desenvolvendo a passos largos, tanto na incorporação de novas moléculas orgânicas, também chamadas de ligantes, quanto na diversificação dos metais

utilizados na formação dos complexos, buscando aumentar o efeito terapêutico dos produtos, principalmente no tratamento do câncer³.

Duas classes de compostos que vem sendo bastante investigada são as tiossemicarbazona e ditiossemicarbazonas, às quais têm sido utilizados, na forma de moléculas orgânicas ou derivados organometálicos no tratamento de diversas doenças, devido ao seu potencial de ação como: antimalária⁴ antiviral⁵, fungicida⁶ e antichagásico⁷.

1.2 Tiossemicarbazonas e tiossemicarbazatos: Estrutura molecular e síntese.

Tiossemicarbazona é uma classe interessante de moléculas, multifuncional, com diferentes aplicações como medicamentos, tanto na sua forma orgânica quanto na forma de complexos organometálicos^{8,9}.

As tiossemicarbazonas possuem uma estrutura básica, $C=N-NHCS-NH_2$, quando não substituídas na posição N-4. (Figura 1), enquanto os tiossemicarbazato possuem a estrutura $C=N-NHCSS-R$. O átomo de enxofre em posição *anti*, caracteriza a importância de ligação de hidrogênio intramolecular entre o nitrogênio da imina e os hidrogênios da tioamida. Por outro lado, este arranjo estrutural muda significativamente se for adicionados grupos substituintes na posição N-4, favorecendo a conformação *sin* entre o átomo de nitrogênio da imina e o átomo de enxofre¹⁰ (figura 1).

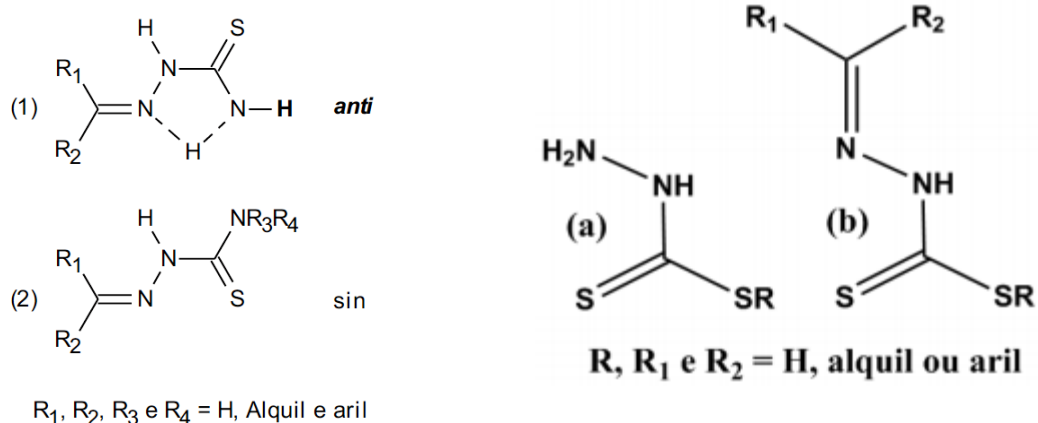


Figura 1. Estrutura da tiossemicarbazona (1,2) e tiossemicabazato (a,b).

As tiossemicarbazonas são obtidas de forma direta através do processo reativo de condensação quimiosseletiva com aldeídos e cetonas. Na forma indireta, com a utilização de hidrato de hidralazina. Possui baixo custo de síntese e economia de átomos¹⁰, uma vez que durante as sínteses, todos os átomos são incorporados às novas moléculas. Na figura 2 é apresentado o estudo retrossintético para demonstrar as possíveis formas de obtenção das tiossemicarbazonas que também podem ser aplicadas ao tiossemicarbazatos.

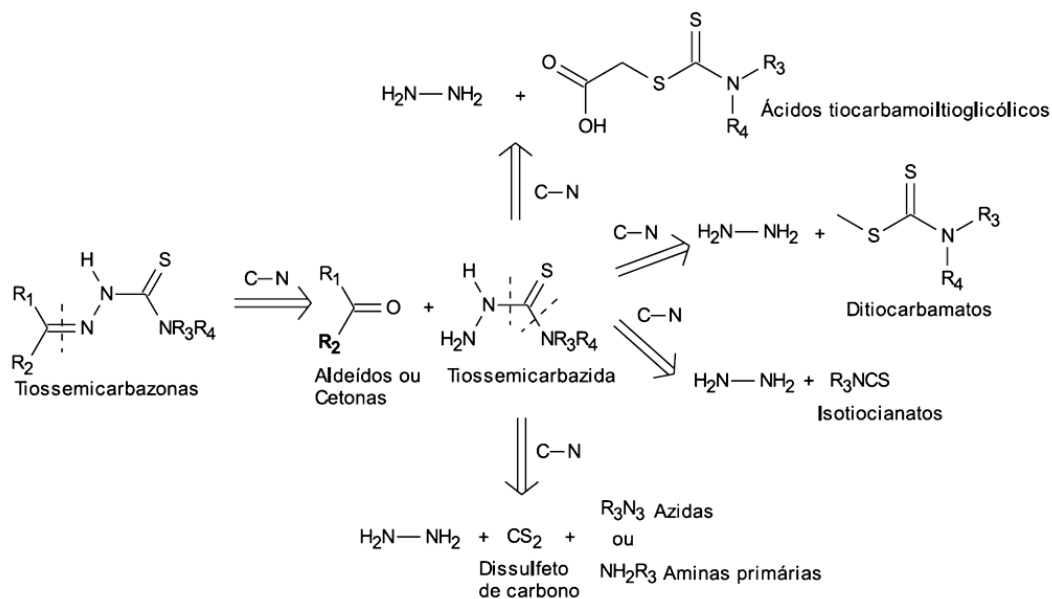


Figura 2. Análise retróssintética de tiossemicarbazonas.

1.2.1 Tiossemicarbazonas em oncologia

A partir dos anos de 1990, as tiossemicarbazonas passaram a ser investigadas com maior profundidade, como agentes para tratamento do câncer¹¹.

Um dos mecanismos de ação para essa classe de compostos é sua atuação como inibidores da enzima ribonucleotídeo redutase, que catalisam a conversão de nucleosídeos em desoxinucleotídeos, impedindo assim, a formação da molécula de DNA^{10,12}. Quando associado com metais, como cobre e ferro, atua como inibidores de topoisomerase II α , enzima responsável pela regulação da topologia do DNA no processo de replicação, transcrição, recombinação e remodelagem da cromatina¹³.

Estudos têm demonstrado que complexos metálicos de tiossemicarbazonas são potencialmente mais ativos contra células tumorais,

que as próprias moléculas orgânicas. Como exemplos, complexos de platina(II) e paládio(II)^{14,15}, mostraram-se eficazes no tratamento de neoplasias resistentes a cisplatina¹⁶, o mesmo ocorrendo para complexos contendo cobre e ferro¹⁷.

Complexos de cobre(II) possuem aspectos importantes para estudos antineoplásicos^{18,19,20,21}. Novos métodos ainda estão sendo revisados, mas um estudo utilizando complexo de cobre demonstrou promover, *in vitro*, a morte de células de leucemia humana, por apoptose¹⁸.

Compostos de zinco(II) demonstraram excelente atividade antiproliferativa *in vitro* contra as células de quatro linhagens de células humanas de câncer: HeLa (adenocarcinoma de colo), K562 mielóide (leucemia crônica), MDA-MB-361 e MDA-MB-453 (câncer de mama). O estudo mostrou que a tiossemicarbazona e os complexos de zinco foram 10 mil vezes mais potente que a cisplatina, mas os diferentes tipos de célula apresentaram diferentes suscetibilidades²².

Em outro estudo, desta vez utilizando estanho(IV) como metal, complexos de tiossemicarbazona tiveram o poder antiproliferativo alterado em várias linhagens tumorais, quando a estrutura foi modificada de um complexo diclorobistossemicarbazona para a estrutura clorodibenzilsemicarbazona²³.

Complexo de tiossemicarbazona com rutênio também possui atividade antitumoral contra algumas linhagens tumorais^{24,25,26}. Quando comparado à cisplatina, em um estudo utilizando linhagens de células humanas de tumor: MCF-7 e MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama), HCT 116 e HT-29 (ambas carcinoma colorretal), o complexo de rutênio foi mais ativo em todas as linhagens celulares²⁵.

Ferro (Fe^{3+}) é essencial para a progressão do ciclo celular e a síntese de DNA e, potencialmente, representa um novo alvo molecular para o desenvolvimento de novos agentes antitumorais. O aumento da captação e utilização desse metal ocorre em virtude dessas células possuírem níveis significativamente mais elevados de receptores de transferrina do que células saudáveis²⁷. O ligante Dp44mT complexado ao ferro é tão eficaz quanto a Triapina 3-AP (Figura 3) na inibição do crescimento de carcinoma do pulmão DMS-53, neuroepitelioma SK-N-MC e melanoma SK-Mel-28²⁸. Triapina 3-AP é um derivado de tiossemicarbazona, potente inibidor da enzima ribonucleotídeo redutase, que se encontra em estudo clínico de fase II, para tratamento de câncer metastático ou recorrente de cabeça e pescoço²⁹.

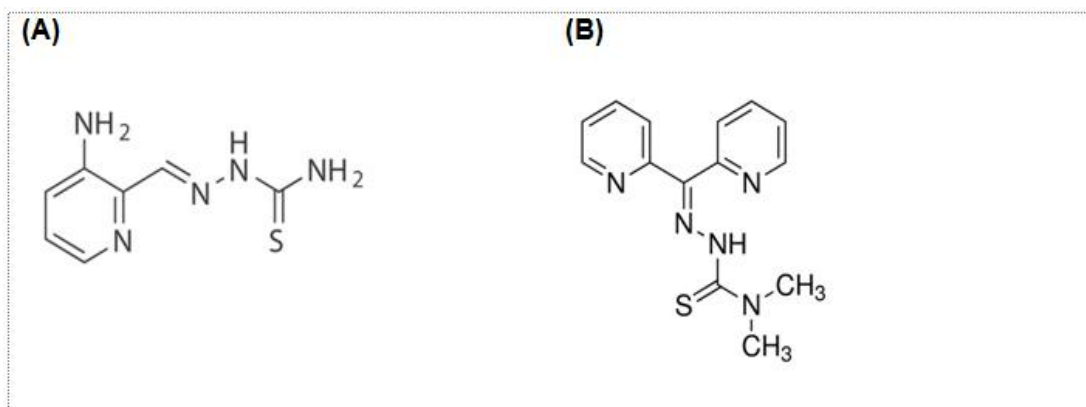


Figura 3. Estrutura da Triapina 3-AP (A) e do Dp44mT (B).

Complexos de gálio também exercem efeitos antiproliferativos inibindo o ferro(III)-dependente da enzima ribonucleotídeo redutase. Como descrito anteriormente, esta enzima catalisa a reação limitante na síntese de DNA. Além disso, é altamente ativada na proliferação das células tumorais e,

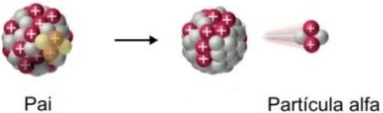
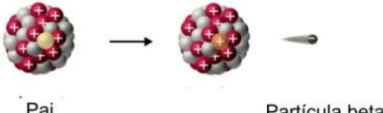
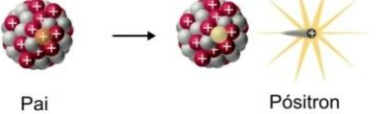
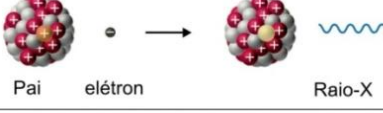
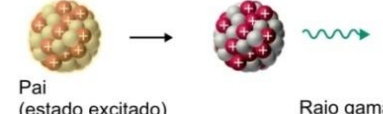
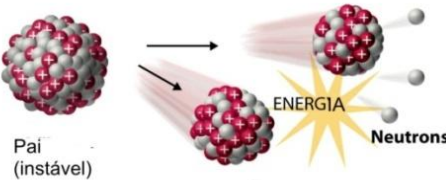
portanto, é considerado um excelente alvo para a quimioterapia de tumores
72,75.

1.3 Radiofármacos

Radiofármacos são preparações farmacêuticas que contêm um ou mais radioisótopos; por possuírem núcleos instáveis, sofrem decaimento radioativo emitindo radiação corpuscular (partícula) ou eletromagnética e são utilizados em medicina como agentes para tratamento do câncer³⁰ e diagnóstico de outras doenças como: doença arterial coronariana^{31,32}, demência, epilepsia, acidente vascular cerebral³³, além de exames de cintilografia renal para diagnóstico de nefrite³⁴.

O decaimento dos radioisótopos pode ocorrer por 6 formas diferentes, conforme apresentados na tabela 1. Os decaimentos alfa e beta dão origem às partículas alfa (He^{2+}) e beta (e^-), as quais são utilizadas em processos terapêuticos; a emissão de pósitron embora emita uma partícula [o pósitron ou elétron positivo (e^+)], este é rapidamente aniquilado dando origem à radiação gama, que juntamente com o decaimento por captura eletrônica e a emissão gama propriamente dita, fornecem radiação eletromagnética, a qual é utilizada em processo diagnóstico; a fissão espontânea dá origem a dois novos núcleos e nêutrons, os quais podem ser utilizados para produzir outros radioisótopos³⁵.

Tabela 1. Exemplos de formas de decaimento de radioisótopos.

Tipo de decaimento	Radiação emitida	Equação geral	Modelo
Decaimento alfa	${}^4_2\alpha$	${}^A_ZX \longrightarrow {}^{A-4}_{Z-2}X' + {}^4_2\alpha$	
Decaimento beta	${}^0_{-1}\beta$	${}^A_ZX \longrightarrow {}^A_{Z+1}X' + {}^0_{-1}\beta$	
Emissão de pósitron	${}^0_{+1}\beta$	${}^A_ZX \longrightarrow {}^A_{Z-1}X' + {}^0_{+1}\beta$	
Captura eletrônica	X rays	${}^A_ZX + {}^0_{-1}e \longrightarrow {}^A_{Z-1}X' + X \text{ ray}$	
Emissão gama	${}^0_0\gamma$	${}^A_ZX^* \xrightarrow{\text{relaxação}} {}^A_ZX' + {}^0_0\gamma$	
Fissão espontânea	Neutrons	${}^{A+B+C}_{Z+Y}X \longrightarrow {}^A_ZX' + {}^B_YX' + C^1_0n$	

FONTE: Adaptado de "Nuclear Decay Reactions" - <http://chemwiki.ucdavis.edu/>

Dentre os radioisótopos utilizados rotineiramente para terapia podemos citar os emissores beta ${}^{90}\text{Y}$, ${}^{153}\text{Sm}$, ${}^{177}\text{Lu}$ e ${}^{188}\text{Re}$, enquanto para diagnóstico podemos citar os emissores de pósitron ${}^{11}\text{C}$, ${}^{18}\text{F}$, ${}^{64}\text{Cu}$ e ${}^{68}\text{Ga}$, e os emissores de radiação gama (emissão gama ou captura eletrônica) ${}^{67}\text{Ga}$, ${}^{111}\text{In}$ e o ${}^{99m}\text{Tc}$, sendo este último, utilizado na maioria dos procedimentos diagnóstico em medicina nuclear³⁵.

Dentre os metais, ${}^{67}\text{Ga}$, ${}^{68}\text{Ga}$, ${}^{90}\text{Y}$ e ${}^{111}\text{In}$ tem uma química de coordenação muito parecida, assim radiofármacos preparados para diagnóstico

com ^{67}Ga , ^{68}Ga e ^{111}In poderiam ter o metal substituído por ^{90}Y e passar a ser utilizado para terapia; o mesmo acontece para $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e ^{188}Re . Além disso, a utilização de radioisótopos em substituição aos metais não radioativos de medicamentos pode ajudar a desenvolver estudos farmacocinéticos para esses fármacos ou potencializar efeitos terapêuticos associando a entrega de radiação beta ao tumor³⁶.

1.3.1 Gálio em medicina nuclear

Já foram identificados 30 isótopos de Ga, com massa atômica variando de 56 a 86. Todavia, somente aqueles compreendidos entre massa de 66 a 74 (tabela 2) possuem tempo de meia-vida física com potencial de aplicação na área médica ou biológica³⁷. Na prática são utilizados os radionuclídeos ^{67}Ga , um emissor gama e $t_{1/2} = 78$ h, permitindo obtenção de imagens SPECT, e o ^{68}Ga , um emissor de pósitron e $t_{1/2} = 68$ min, permitindo obtenção de imagens por PET³⁸.

Tabela 2. Alguns núclídeos de gálio e características físicas.

Símbolo do núclídeo	Z(p)	N(n)	Massa isotópica (u)	Meia-vida	Modo de decaimento	Núclídeo filho
⁶⁶ Ga	31	35	65,931589	9,49 h	β ⁺	⁶⁶ Zn
⁶⁷ Ga	31	36	66,9282017	3,26 d	EC	⁶⁷ Zn
⁶⁸ Ga	31	37	67,9279801	67,71min	β ⁺	⁶⁸ Zn
⁶⁹ Ga	31	38	68,9255736	Estável (60,11 %)		
⁷⁰ Ga	31	39	69,9260220	21,14(3) min	β ⁻ (99,59)	⁷⁰ Ge
					EC (0,41%)	⁷⁰ Zn
⁷¹ Ga	31	40	70,9247013	Estável (39,89 %)		
⁷² Ga	31	41	71,9263663	14,095 h	β ⁻	⁷² Ge
^{72m} Ga			119.66 keV	39,68 ms	IT	⁷² Ga
⁷³ Ga	31	42	72,9251747	4,86 h	β ⁻	⁷³ Ge
⁷⁴ Ga	31	43	73,926946	8,12 min	β ⁻	⁷⁴ Ge
^{74m} Ga			59.571 keV	9,5 s		

FONTE: Adaptado de "isotopes of gallium", http://en.wikipedia.org/wiki/Isotopes_of_gallium.

O ⁶⁷Ga, produzido em ciclotron através da reação (^{68enr}Zn(p,2n)⁶⁷Ga), tem sido rotineiramente utilizado em medicina nuclear e devido à sua meia-vida física de 3,26 dias, o que permite que seja distribuído para usuários distantes do centro de produção. As energias de emissão gama 93 keV (38%), 185 keV (24%) e 300 keV (16%), não são as ideais para as gamas câmaras disponíveis atualmente, mas permitem obter imagens satisfatórias³⁷.

O principal radiofármaco de gálio, o [⁶⁷Ga(cit)₂]³⁻, foi inicialmente desenvolvido para imagens de distúrbios ósseos, mas foi considerado pouco

eficiente, exceto em casos de osteomielite³⁹. O composto também tem sido utilizado para diagnóstico de linfomas, mesmo com imagens de baixa qualidade^{40,41}. O radiofármaco $[^{67}\text{Ga}(\text{cit})_2]^{3-}$ também tem sido utilizado na diferenciação de miocardite aguda em casos de infarto agudo do miocárdio⁴² e na diferenciação de nefrite intersticial aguda (NIA) e necrose tubular aguda (NTA)⁴³. O uso do $[^{67}\text{Ga}(\text{cit})_2]^{3-}$ deverá se manter por algum tempo, principalmente devido a falta de acesso ao ^{18}F FDG ou a tecnologia PET/CT⁴⁰.

Outro radionuclídeo, o ^{68}Ga , apresenta algumas características vantajosas, como a emissão de pósitron ($E_{\text{max}}=1,899$ keV) e possibilidade de ser obtido a partir de sistema gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$, o qual, apesar de conhecido desde os anos de 1960, ganhou versões comerciais para uso em clínicas de medicina nuclear, por volta dos anos de 2000⁴⁴.

Essa disponibilidade permitiu aumentar o número de pesquisas para utilização do ^{68}Ga na produção de radiofármacos, inclusive próprio $[^{68}\text{Ga}(\text{cit})_2]^{3-}$ em substituição a molécula marcada com o ^{67}Ga ⁴⁵, mas principalmente baseados em peptídeos, dos quais alguns, como o PSMA⁴⁶ e RGD⁴⁷ já são utilizados no diagnóstico em pacientes. Para a marcação de peptídeos é necessário acoplar a eles um quelante, assim, foram desenvolvidos diversas moléculas com propriedade de complexar o Ga (figura 4)⁴⁸.

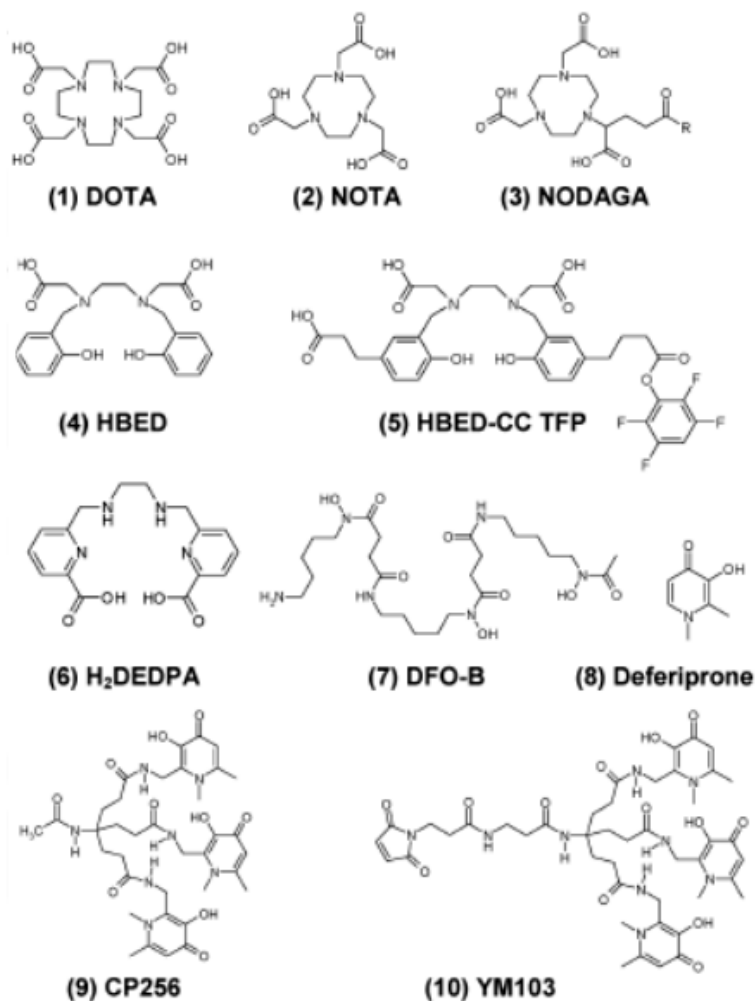


Figura 4. Quelantes utilizados para complexar gálio⁴⁸.

1.3.2 Índio em medicina nuclear

Já foram identificados 39 isótopos de In, com massa atômica variando de 56 a 86, todavia, somente aqueles compreendidos entre as massas 108 a 117 (tabela 3) possuem tempo de meia-vida física com potencial de aplicação na área médica ou biológica. Na prática é utilizado o radionuclídeo ¹¹¹In, um emissor gama [171 keV (90% abundance) e 245 keV (94% abundance)], $t_{1/2} = 2,8$ dias e produção em ciclotron [¹¹¹Cd(p, n)¹¹¹In]⁴⁹.

Tabela 3. Alguns nuclídeos de índio e características físicas.

Símbolo do nuclídeo	Z(p)	N(n)	Massa isotópica (u)	Meia-vida	Modo de decaimento	Nuclídeo filho
^{107}In	49	58	106.910295	32.4 min	β^+	^{107}Cd
$^{107\text{m}}\text{In}$				50.4 s	IT	^{107}In
^{108}In	49	59	107.909698	58.0 min	β^+	^{108}Cd
$^{108\text{m}}\text{In}$				39.6 min	β^+	^{108}Cd
^{109}In	49	60	108.907151	4.2 h	β^+	^{109}Cd
$^{109\text{m}1}\text{In}$				1.34 min	IT	^{109}In
$^{109\text{m}2}\text{In}$				209 ms		
^{110}In	49	61	109.907165	4.9 h	β^+	^{110}Cd
$^{110\text{m}}\text{In}$				69.1 min	β^+	^{110}Cd
^{111}In	49	62	110.905103	2.8047 d	EC	^{111}Cd
$^{111\text{m}}\text{In}$				7.7 min	IT	^{111}In
^{112}In	49	63	111.905532	14.97 min	β^+ (56%) β^- (44%)	^{112}Cd ^{112}Sn
$^{112\text{m}1}\text{In}$				20.56 min	β^+	^{112}Cd
$^{112\text{m}2}\text{In}$				690 ns		
$^{112\text{m}3}\text{In}$				2.81 μs		
^{113}In	49	64	112.904058	Estável (4,29 %)		
$^{113\text{m}}\text{In}$				1.6579 h	IT	^{113}In
^{114}In	49	65	113.904914	71.9 s	β^+ (99.5%) β^- (0.5%)	^{114}Cd ^{114}Sn
$^{114\text{m}1}\text{In}$				49.51 d	IT (96.75%) β^+ (3.25%)	^{114}In ^{114}Cd
$^{114\text{m}2}\text{In}$				43.1 ms	IT (96.75%) β^+ (3.25%)	^{114}In ^{114}Cd
$^{114\text{m}3}\text{In}$				4.3 μs		
^{115}In	49	66	114.903878	4.41×10^{14} a (75,71 %)	β^-	^{115}Sn
$^{115\text{m}}\text{In}$				4.486 h	IT (95%) β^- (5%)	^{115}In ^{115}Sn

Tabela 3. Alguns nuclídeos de índio e características físicas (continuação)

^{116}In	49	67	115.905260	14.10 s	β^- EC	^{116}Sn ^{116}Cd
$^{116\text{m}1}\text{In}$			127.267 keV	54.29 min		
$^{116\text{m}2}\text{In}$			289.660 keV	2.18 s		
^{117}In	49	68	116.904514	43.2 min	β^-	^{117}Sn
$^{117\text{m}}\text{In}$			315.302 keV	116.2 min	β^- (52.91%) IT (47.09%)	^{117}Sn ^{117}In

FONTE: Adaptado de "isotopes of indium", http://en.wikipedia.org/wiki/Isotopes_of_indium.

Uma das principais aplicações do ^{111}In na medicina nuclear é na forma do radiofármaco [$^{111}\text{In}(\text{dota-octreotide})$], um peptídeo análogo da somatostatina, que se liga a receptores de somatostatina, comumente encontrado em vários tipos de tumores⁵⁰. Também é bastante utilizado na forma do complexo [$^{111}\text{In}(\text{oxina})_3$], na marcação de elementos sanguíneos⁵¹, como leucócitos ou células tronco⁵².

Recentemente, trabalhos vêm sendo desenvolvidos utilizando ^{111}In na marcação de anticorpos conjugados a ligantes DOTA ou DTPA (figura 5). A escolha deste radioisótopo se dá por sua disponibilidade e meia-vida física longa o suficiente para permitir acompanhar a cinética de acúmulo de anticorpos aos antígenos presentes nas células tumorais.

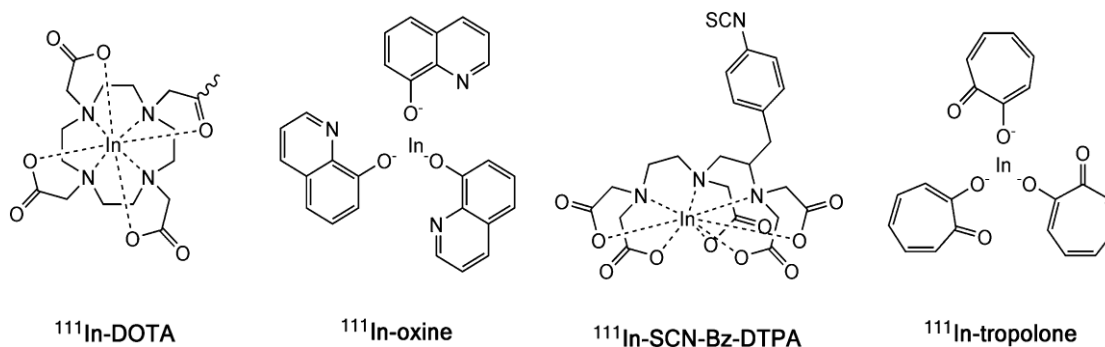


Figura 5. Alguns sistemas quelantes para índio.

1.3.3 Tecnécio em medicina nuclear

Já foram identificados 20 isótopos de Tc, com massa atômica variando de 85 a 104, todavia, somente aqueles compreendidos entre as massas 93 a 99 (tabela 4) possuem tempo de meia-vida física com potencial de aplicação na área médica ou biológica. Na prática é utilizado o radionuclídeo $^{99\text{m}}\text{Tc}$, um emissor gama (142 keV (100% abundância), $t_{1/2} = 6 \text{ h}$ e obtenção através do sistema gerador $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Figura 6)⁵³.

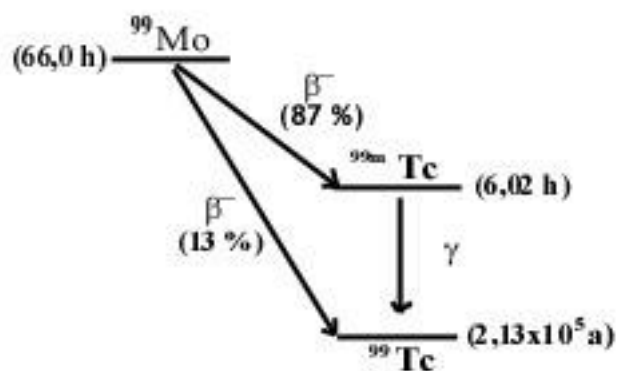


Figura 6. Esquema de decaimento⁶⁸ do ^{99}Mo ao $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Tabela 4. Alguns radionuclídeos de tecnécio e características físicas

Símbolo do nuclídeo	Z(p)	N(n)	Massa isotópica (u)	Meia-vida	Modo de decaimento	Nuclídeo filho
Energia de excitação						
⁹³ Tc	43	50	92.910249	2.75 h	β ⁺	⁹³ Mo
^{93m1} Tc			391.84 keV	43.5 min	IT (76.6%) β ⁺ (23.4%)	⁹³ Tc ⁹³ Mo
^{93m2} Tc			2185.16 keV	10.2 μs		
⁹⁴ Tc	43	51	93.909657	293 min	β ⁺	⁹⁴ Mo
^{94m} Tc			75.5 keV	52.0 min	β ⁺ (99.9%) IT (.1%)	⁹⁴ Mo ⁹⁴ Tc
⁹⁵ Tc	43	52	94.907657	20.0 h	β ⁺	⁹⁵ Mo
^{95m} Tc			38.89 keV	61 d	β ⁺ (96.12%) IT (3.88%)	⁹⁵ Mo ⁹⁵ Tc
⁹⁶ Tc	43	53	95.907871	4.28 d	β ⁺	⁹⁶ Mo
^{96m} Tc			34.28 keV	51.5 min	IT (98%) β ⁺ (2%)	⁹⁶ Tc ⁹⁶ Mo
⁹⁷ Tc	43	54	96.906365	2.6×10 ⁶ a	EC	⁹⁷ Mo
^{97m} Tc			96.56 keV	91.4 d	IT (99.66%) EC (.34%)	⁹⁷ Tc ⁹⁷ Mo
⁹⁸ Tc	43	55	97.907216	4.2×10 ⁶ a	β ⁻	⁹⁸ Ru
^{98m} Tc			90.76 keV	14.7 μs		
⁹⁹ Tc	43	56	98.9062547	2.111×10 ⁵ a	β ⁻	⁹⁹ Ru
^{99m} Tc			142.6832 keV	6.0058 h	IT (99.99%) β ⁻ (.0037%)	⁹⁹ Tc ⁹⁹ Ru

FONTE: Adaptado de "isotopes of technetium", http://en.wikipedia.org/wiki/Isotopes_of_tchnetium.

Enquanto gálio e índio são encontrados na natureza com estado de oxidação 3+, o tecnécio apresenta características químicas mais complexas, pois pode apresentar estados de oxidação 3-, 1-, e de 1+ a 7+, e números de coordenação variando de 4 a 10⁵⁴.

Para preparação dos complexos de Tc é necessário reduzi-lo, do seu estado de oxidação 7+ a valores menores, o que, na presença de quelantes e pH apropriado vai permitir a formação de diferentes complexos^{54,55}.

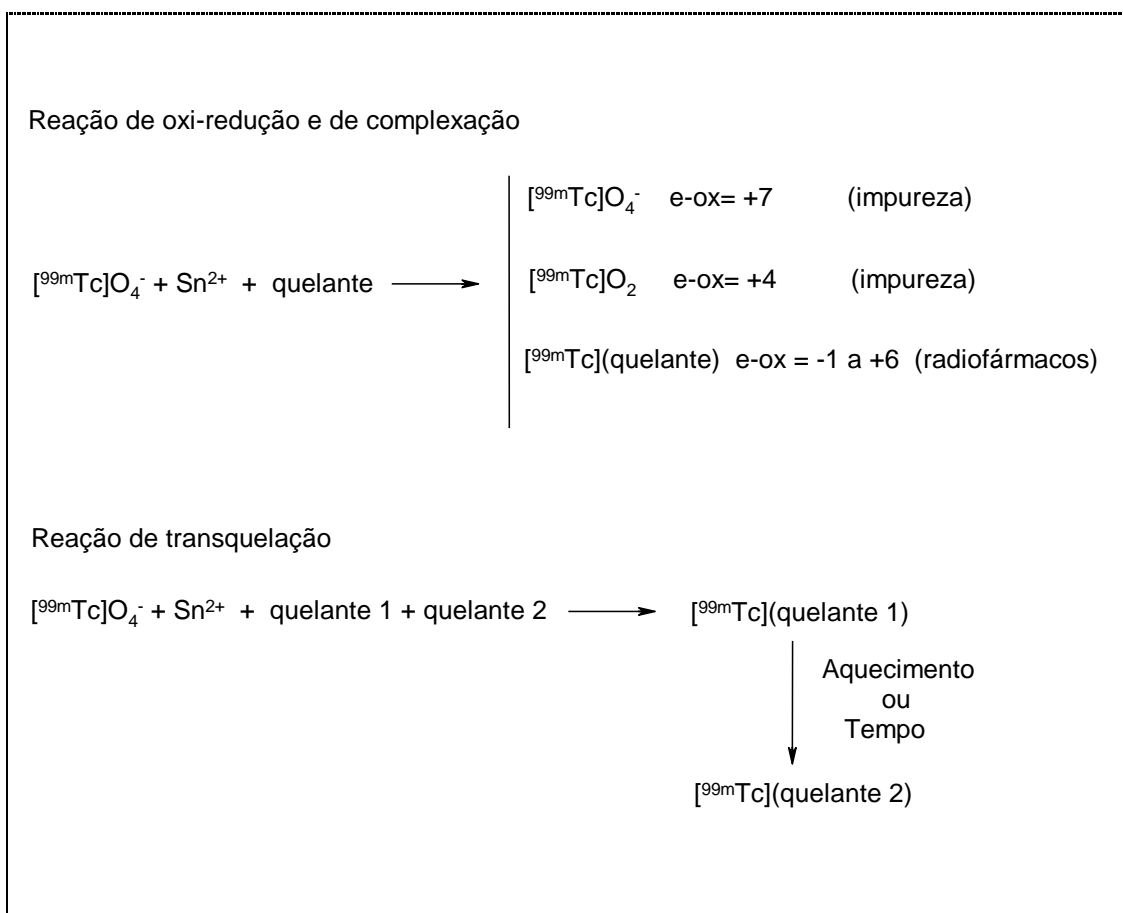


Figura 7. Esquema de obtenção dos radiofármacos de [^{99m}Tc]tecnécio por processo de marcação direta ou por transquelação (e-ox = estado de oxidação).

Com essa versatilidade, a preparação dos radiofármacos de [^{99m}Tc]tecnécio pode dar origem a diferentes tipos de complexos, com diferentes ligantes. Inicialmente foi utilizado na forma de complexos com agentes detoxificantes como o DMSA e o DTPA (um derivado de EDTA),

permitiram avaliar a estrutura e morfologia renal, e a filtração glomerular, respectivamente. Depois, a partir da década de 1980, novos quelantes foram sintetizados e novos radiofármacos passaram a ser produzidos (Figura 8) para a avaliação da função de diferentes órgãos, como o $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{HMPAO})]$ e o $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{ECD})]$, para estudos de perfusão cerebral, o $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{MAG}_3)]^-$, para substituir o $[[^{99m}\text{Tc}]\text{DTPA}]^-$ na avaliação da função renal, e o $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2(\text{tetrofosmin})_2]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$, para avaliação da perfusão do miocárdio, mas que também se mostraram úteis para localização de alguns tipos de tumores⁵⁶.

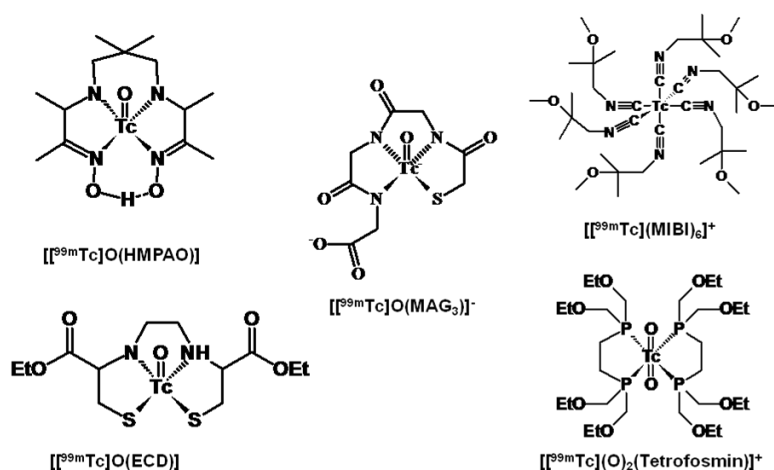


Figura 8. Estrutura de complexos de $[[^{99m}\text{Tc}]$ tecnécio utilizados em medicina nuclear⁵⁶.

1.3.4 Complexos metálicos radioativos das tiossemicarbazonas

Como visto anteriormente, as tiossemicarbazonas são ligantes muito versáteis, podendo ser neutros ou aniônicos. Uma das primeiras publicações

sobre complexos radioativos de tiossemicarbazonas foi publicado por Yokoyama e colaboradores⁵⁷, onde o [^{99m}Tc]tecnécio foi utilizado para complexar cetoxal-bis(tiossemicarbazona), em rendimento superior a 95 % e carga neutra, com o sistema renal como principal via de excreção. Outros complexos de [^{99m}Tc]tecnécio foram preparados em anos mais recentemente, como um derivado nitrofuril tiossemicarbazona com o núcleo fac-[^{99m}Tc](H₂O)₃(CO)₃ e avaliado para detecção de focos infecciosos, apresentando resultados semelhantes àqueles observados com ciprofluxacina também marcada com [^{99m}Tc]⁵⁸, outros derivados também foram preparados, juntamente com seus homólogos de rênio, tendo sido possível diferenciar processos infecciosos e inflamatórios⁵⁹. A preparação de complexos de tiossemicarbazonas com rênio tem sido realizado para poder caracterizar a estrutura dos complexos e ajudar a compreender os mecanismos biológicos observados com os compostos marcados com o [^{99m}Tc]tecnécio³⁸.

Também têm sido reportado a utilização de (⁶⁷Ga)gálio e (⁶⁸Ga)gálio na preparação de complexos. Um desses complexos é baseado em acetilacetato bis-tiossemicarbazona com ⁶⁷Ga, preparado com pureza radioquímica de 97 % e captação de aproximadamente 6 % do composto em tumor de fibrossarcoma⁶⁰; outros compostos derivados de acenaftenequinona complexados com ^{nat}Ga, para caracterização química, e ⁶⁸Ga, para estudos de captação em células de carcinoma mamário murino EMT6, entre outras, apresentaram captação 50 % maior em condições de hipóxia quando comparada a normóxia. Complexo de 2-acetilpiridine semicarbazona com ⁶⁸Ga apresentou captação em tumor de mama MDA-MB-231, xenografado em camundongos, da ordem de 11 %, após 2 horas da injeção⁶¹.

Existem 4 radioisótopos de cobre (^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{62}Cu e ^{64}Cu) emissores de pósitron possíveis de serem utilizados na preparação de radiotraçadores. Desses, ^{62}Cu apresenta energia de emissão alta, da ordem de 2,92 MeV, e meia-vida física de 9,7 min, e o ^{64}Cu apresenta energia de emissão baixa, da ordem de 0,65 MeV, e meia-vida física de 761,9 min, sendo os preferidos para estudos cuja cinética de distribuição seja rápida e longa, respectivamente⁶².

O isótopo ^{62}Cu é um emissor de pósitrons, formado à partir do decaimento de ^{62}Zn , possui tempo de meia-vida de aproximadamente 10 minutos, suficientes para aquisição de imagens de boa qualidade para estudos de perfusão miocárdica em condições de repouso e estresse (Yen et al, 2014).

O ^{62}Cu -PTSM (piruvaldeído bis(N^4 -metiltiossemicarbazonato)cobre(II)) foi preparado na década de 1990 e avaliado, em macacos, com potencial agente para marcação de perfusão cardíaca e os resultados mostraram que além da perfusão cardíaca o composto poderia ser utilizado para estudos de perfusão cerebral⁶³.

Ackerman e colaboradores⁶⁴ avaliaram ligantes mistos de tiossemicarbazona como potenciais agentes para estudos de perfusão miocárdica e durante os estudos demonstraram que a ligação de um dos complexos à albumina humana e canina eram diferentes, demonstrando a importância da intercomparação de estudos em diferentes espécies para o desenvolvimento de novos produtos.

Vários derivados de tiossemicarbazonas foram sintetizados e avaliados sobre potencial uso para diferenciação entre áreas de normóxia e hipóxia e o ^{64}Cu -ATS(diacetil bis(N^4 -metiltiossemicarbazonato)cobre(II)) demonstrou, *in vitro*, ser o complexo de escolha para aplicações *in vivo*⁶⁵.

Lihui e colaboradores mostraram que compostos de tiossemicarbazonas marcados com ^{64}Cu , além de serem radiotraçadores interessantes para a expressão de topoisomerase II em células EMT-6 (carcinoma mamário), B16F10 (melanoma) e CaSki (carcinoma epidermóide), foram tão eficientes quanto Etoposideo®, na inibição dessa enzima em células de leucemia linfocítica⁶⁶.

Por outro lado, não encontramos relatos sobre o uso de tiossemicarbazatos como complexos com metais radioativos.

Recentemente, o grupo do Prof. Dr. Victor Deflon, do Departamento de Química da Universidade de São Paulo, campus São Carlos, sintetizou novas tiossemicarbazonas e tiossemicarbazatos, dentre os quais o H_2bdtc (Figura 9) e preparou os respectivos complexos de rênio⁶⁷. Dada à semelhança química entre o rênio e o tecnécio, decidimos empreender esforços para preparar os complexos de $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]$ tecnécio das novas tiossemicarbazonas e tiossemicarbazatos⁶⁸, a fim de avaliar o comportamento biológico em modelos celulares e em animais.

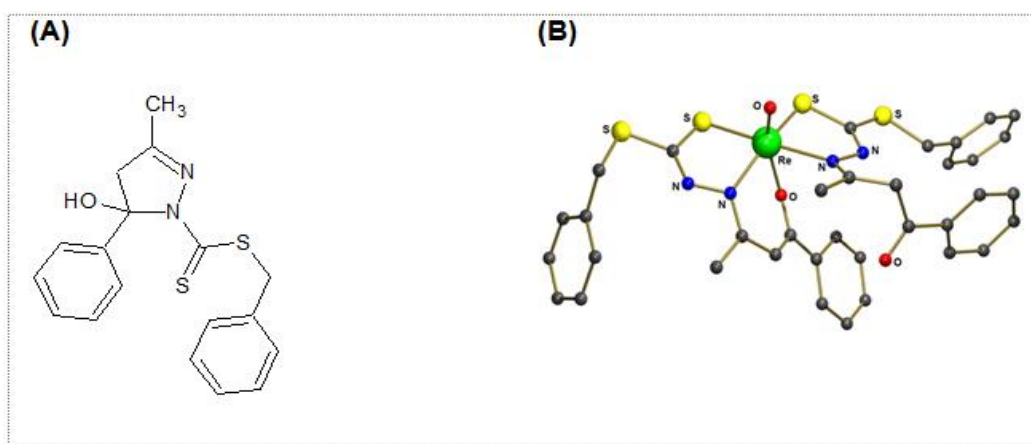


Figura 9. Estrutura dos ligantes (A) benzil-5-hidroxi-3-metil-5-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-carboditionato (H_2bdtc), (B) $[\text{ReO}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é estudar as condições de preparo e caracterização físico-química de complexos de derivados de tiossemicarbazonas e tiossemicarbazatos com ($^{67/68}\text{Ga}$)gálio, [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]tecnécio e (^{111}In)índio, e avaliar o potencial uso com agentes diagnóstico para detecção de tumores.

2.2 Objetivos específicos

- 1- Avaliar diferentes metodologias analíticas para determinação da pureza radioquímica dos complexos;
- 2- Avaliar a estabilidade dos complexos em condições de marcação e na presença de competidores como L-cisteína, L-histidina e soroalbumina;
- 3- Avaliar a taxa de captação dos complexos em cultura de células de melanoma B16F10 e TM1M;
- 4- Avaliar a biodistribuição dos complexos em animais por método *in vivo* e *ex vivo*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Equipamentos e sistemas

- Calibradores de doses, Victoreen, USA, modelo 34-056
- Calibradores de doses, Capintec, modelo CRC-15R
- Contador tipo poço, 1480 Automatic Gamma Counter Wallc wizard 3", PerkinElmer Precisely, Finlândia, 2005.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, Software Class-VP, Shimadzu Corporation, Japan.
- Flow Scintillation Analyzer, Radiomatic 610TR, Software ProFSA, PerkinElmer, USA.
- Cuba para eletroforese, Elphor, DR Bender & Dr Hobein, Karlsruhe München Zürich, conectada a uma fonte contínua E-C Apparatus, modelo nº FB105 LVD, EC 105.
- Vórtex, Quimis, São Paulo, modelo Q-220A.
- Agitador magnético com chapa aquecedora, Quimis, São Paulo, modelo Q-261-22.
- Balança analítica eletrônica, Mettler, Suíça, modelo AE 200.
- pHmetro, Micronal, São Paulo, modelo B374.
- Cabine de fluxo laminar, TROX®.

- Estufa para cultura de células (37 °C com 5 % CO₂), Sanyo, MCO-19AIC UV.
- Microscópio invertido, Leica.
- Banho-marias, Sociedade Fabbe Ltda., Brasil, modelo Robertshow.
- Centrífuga, Eppendorf®, modelo 5804-R.
- Coluna C18 (3,9 x 300 mm, 10 µm) - Synergi-Hidro-RP, Phenomenex - USA.
- Frascos de vidro tipo penicilina com 6 a 10 mL de capacidade (lavados com solução de HNO₃ a 15 %).
- Frascos de vidro com fundo cônico 2,5 mL, WHEATON GRAD V-VIAL®.

3.1.2 Reagentes e solventes

- Ligante H₂bdtc e padrão [ReO(bdtc)(Hbdtc)] preparados pelo grupo do Prof. Dr. Victor Marcelo Deflon - Instituto de Química - USP São Carlos.
- Ácido clorídrico fumegante (HCl), Merck
- Água (H₂O) purificada deionizada, sistema Milli-Q, Millipore Corporation
- Acetona grau PA (CH₃COCH₃), Nuclear.
- Acetona grau HPLC (CH₃COCH₃), Vetec.
- Acetonitrila grau PA (CH₃N), EM
- Cloreto estanoso diidratado (SnCl₂.2H₂O), Mallinkrodt.
- Cloridrato de L-cisteína monoidratada, InLab.
- Cloridrato de L-histidina monoidratada, Merck.

- Clorofórmio grau PA (CHCl_3), Nuclear.
- Dimetilssulfóxido - DMSO, (CH_3SOCH_3), Carlo Erba
- Etanol grau PA ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), Merck
- Metanol grau PA (CH_3OH), EM
- Metanol grau HPLC (CH_3OH), Vetec.
- n-Octanol grau PA ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{OH}$), Merck
- Solução fisiológica 0,9% (NaCl 0,9%), Baxter

3.1.3 Misturas e soluções

Todas as soluções aquosas foram preparadas com água purificada:

- Solução aquosa de HCl 10 mM e 100 mM
- Solução aquosa de meio de cultura RPMI-1640, suplementado com 5 % de SFB
- Solução aquosa de tripsina a 0,25 %
- Solução aquosa de corante azul de tripan 0,2 %
- Solução tampão fosfato (pH 7) 10 mM e 100 mM
- Solução tampão fosfato salina - PBS (10 mM Na_2HPO_4 , 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 2 mM KH_2PO_4 , pH 7,2)

3.2 Métodos

Todas as soluções aquosas utilizadas nos experimentos foram previamente nitrogenadas por período mínimo de 10 minutos.

3.2.1 Avaliação do efeito do pH e temperatura na obtenção de [^{99m}Tc]tecnécio com tiossemicarbazato

Em um frasco tipo penicilina foram dissolvidos 1 mg do ligante H_2bdtc em 1 mL de DMSO. Foram retirados 300 μL dessa solução e transferidos para outro frasco tipo penicilina e, em seguida, foram adicionados 300 μL de solução contendo 370 MBq (10 mCi) de [^{99m}Tc] O_4^- . O sistema foi mantido sob fluxo de nitrogênio e após 5 minutos foram adicionados 20 μL de solução de SnCl_2 recém preparada (2,5 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 μL de HCl 37% e 10 mL de H_2O purificada); a solução foi mantida em repouso e, após 5 minutos, foram adicionados 380 ou 640 μL de solução PBS 0,1 N, e o frascos foram mantidos à temperatura ambiente (22-25 $^\circ\text{C}$) ou aquecidos à temperatura de 97 $^\circ\text{C}$.

Tabela 5. Condições para reação entre [^{99m}Tc]tecnécio e H_2bdtc

Exp	pH	Tampão	Volume (μL)	Temperatura ($^\circ\text{C}$)

1	3	PBS 0,1 N	380	22-25
2	3	PBS 0,1 N	380	97
3	5	PBS 0,1 N	380	22-25
4	5	PBS 0,1 N	380	97
5	5,5	PBS 0,1 N	-	22-25
6	5,5	PBS 0,1 N	-	97
7	7	PBS 0,1 N	380	22-25
8	7	PBS 0,1 N	380	97
9	7	PBS 0,1 N	640	22-25
10	7	PBS 0,1 N	640	97

Os produtos da reação foram diluídos em H₂O à concentração de 3,7 MBq/mL (100 µCi/mL) e analisados por HPLC, conforme descrito em 3.3.2. Soluções contendo [^{99m}Tc]O₄⁻ e [ReO(bdtc)(Hbdtc)] também foram analisadas para estabelecimento de referências.

3.2.2 Preparação do complexo [^{99m}Tc](bdtc)(Hbdtc)

Em um frasco tipo penicilina foram dissolvidos 1 mg do ligante H₂bdtc em 1 mL de DMSO. Foram retirados 300 µL dessa solução e transferidos para outro frasco tipo penicilina e, em seguida, foram adicionados 300 µL de solução contendo 370 MBq (10 mCi) de [^{99m}Tc]O₄⁻. O sistema foi mantido sob fluxo de nitrogênio e após 5 minutos foram adicionados 20 µL de solução de SnCl₂ recém preparada (2,5 mg de SnCl₂.2H₂O, 10 µL de HCl 37% e 10 mL de H₂O

purificada); a solução foi mantida em repouso e, após 5 minutos, foram adicionados 640 μL de solução tampão fosfato 0,1 M (pH 7), para ajuste do pH.

3.2.3 Preparação do complexo $[[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$

Em um frasco tipo penicilina foram dissolvidos 1 mg do ligante H_2bdtc em 1 mL de DMSO. Foram retirados 300 μL dessa solução e transferidos para outro frasco tipo penicilina e, em seguida, foram adicionados 300 μL de solução contendo 370 MBq (10 mCi) de $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}_4^-$. O sistema foi mantido sob fluxo de nitrogênio e, após 5 minutos, foram adicionados 20 μL da solução de SnCl_2 recém preparada (2,5 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 μL de HCl 37% e 10 mL de H_2O purificada), aguardando mais 5 minutos e adicionando a marcação 380 μL de solução tampão fosfato 0,1 N (pH 7), a marcação foi finalizada após aquecimento de 100°C por 5 minutos. O pH final da marcação ficou entre 7 e 8.

3.2.4 Preparação do complexo $[\text{}^{111}\text{In}\text{-bdtc}]$

3.2.4.1 Sob aquecimento

Dez microlitros de solução contendo aproximadamente 11,1 MBq (0,3 mCi) de $^{111}\text{InCl}$ foi transferido para frasco de vidro com fundo cônico e a solução foi aquecida a 55°C sob fluxo N_2 . Após secagem, foi adicionado 1 mg do ligante, seguido da adição de 1 ml de etanol, o frasco foi fechado e a solução foi aquecida a 90°C , por 30 minutos.

3.2.4.2 À temperatura ambiente

Dez microlitros da solução do ligante H_2bdtc em CHCl_3 (10 mg/mL) foram adicionados em frasco de vidro com fundo cônico de 2,5 mL, seguido da adição de 10 μL de solução contendo 11,1 MBq (0,3 mCi) de $^{111}\text{InCl}_3$; o volume foi completado com 1 mL de etanol e o frasco foi mantida em temperatura entre 23 a 25°C , por 10 minutos.

3.2.5 Preparação do complexo [^{67}Ga -bdtc]

A solução de $^{67}\text{GaCl}_3$, foi transferida para um frasco de fundo cônico e foi concentrado até a secura, por aquecimento da solução a 55°C e fluxo de nitrogênio. Ao frasco foi adicionado 1 mg do ligante H_2bdtc e, posteriormente,

1 mL de etanol. A solução foi aquecida a 90 °C por 30 minutos, e depois deixada atingir a temperatura ambiente.

3.3 Determinação de parâmetros físico-químicos dos complexos

3.3.1 Determinação da pureza radioquímica por cromatografia planar

Uma gota do produto a ser analisado foi depositado a 1 cm da borda inferior de tiras de papel cromatográfico (8x1 cm) e essas foram colocadas em um tubo contendo as respectivas fases móveis, conforme tabela 6. Após a fase móvel ter percorrido 6 cm a partir do ponto de aplicação da amostra, a tira de papel foi retirada do tubo e deixada secar. A distribuição da radiação foi analisada colocando a tira de papel em um *scanner* de radiação ou cortando-a em 6 segmentos de 1 cm (nas extremidades os seguimentos tem 2 cm) e a radioatividade nos segmentos foi determinada em contador de poço. Em ambos os casos, a pureza foi determinada dividindo contagens na área do pico ou em cada segmento, pela contagem total do sistema.

Tabela 6. Sistemas cromatográficos utilizados na cromatografia planar para controle de qualidade dos complexos

Complexos	Sistema cromatográfico
$[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^- / [^{99m}\text{Tc}]\text{O}_2 /$ $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$ e $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$	Whatman 3 MM / Acetona Whatman 3 MM / NaCl 0,9 %
$^{111}\text{InCl}_3 / [^{111}\text{In-bdtc}]$	Whatman 4 / $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (75:25)
$^{67/68}\text{GaCl}_3 / [^{67/68}\text{Ga-bdtc}]$	Whatman 3 MM / Acetonitrila: H_2O (75:25)
$^{67}\text{GaCl}_3 / [^{67}\text{Ga}(\text{cit})_2]^{3-}$	Py: $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:2:4)
Todos os complexos para ITLC-SG impregnado com albumina 0,2 estabilidade em albumina ou % / $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (2:1:5) plasma	

3.3.2 Determinação da pureza radioquímica por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Amostras dos complexos foram diluídas à concentração de 3,7 MBq/mL (100 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$) e 10 μL dessas soluções foram injetadas em um cromatógrafo, equipado com uma coluna de C18 (3,9x300 mm, 10 μm). Foi utilizada a fase móvel acetona: $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (66:22:12), em fluxo de 1 mL/min, no modo isocrático.

3.3.3 Determinação do coeficiente de partição

Em tubos de ensaio foram adicionados 2,7 mL de solução NaCl 0,9%, 3,0 mL de n-octanol e 300 µL da solução do radiofármaco em análise. Os tubos foram tampados, agitados em vortex por 1 minuto e deixado em repouso por 10 minutos. Alíquotas de 1,0 mL de cada fase foram retiradas, transferidas para outros tubos e a radioatividade foi medida em um curiômetro. O coeficiente foi determinado dividindo o valor da atividade encontrada na fase orgânica (n-octanol) pelo valor da atividade na fase aquosa (NaCl 0,9%), sendo o resultado expresso como valor logarítmico do cociente (LogP).

3.3.4 Avaliação da estabilidade dos complexos na ausência ou presença de L-cisteína e L- histidina, a 37 °C

Em frascos de vidro foram colocados, independentemente 0,9 mL de solução salina, L-Cys.HCl.H₂O (1 mM) e L-His.HCl.H₂O (1 mM), preparadas em (H₂O) seguido de 100 µL dos complexos marcados. As soluções foram incubadas a 37 °C e nos tempos 15, 60 e 120 minutos, amostras foram retiradas e analisadas por cromatografia planar, conforme descrito em 3.3.1, ou por HPLC, conforme 3.3.2.

3.3.5 Avaliação da ligação dos complexos frente às proteínas plasmáticas e soroalbumina humana

Em um frasco de vidro tipo penicilina, foram adicionados 1 mL de plasma ou 1 mL de solução de albumina humana a 0,2%, seguido da adição de 100 µL da solução do complexos. Após incubação por períodos de 15, 60 e 120 minutos, uma alíquota de 100 µL foi retirada a cada tempo e avaliada por cromatografia planar, conforme descrito em 3.3.1.

3.4 Estudos biológicos *in vitro*

3.4.1 Cultura de células B16F10 e TM1M

Células B16F10 e TM1M foram cultivadas em garrafas plásticas de 150 cm², em 25 mL de meio de cultura RPMI suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) e mantidas em estufa a 37 °C, 5 % CO₂ e umidade a 95 %. A cada dois dias ou próximo a confluência de 90%, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com 5 mL de solução PBS, em seguida foram adicionados 3 mL de solução de tripsina a 0,25 % as garrafas foram mantidas em estufa por cerca de 2 minutos. Após a verificação do desprendimento total das células, utilizando um microscópio de foco invertido, foram acrescentados 3 mL de meio de cultura suplementado com SFB, a suspensão de células foi aspirada utilizando pipeta sorológica de 10 mL e

transferida para um tubo de fundo cônico de 15 mL. O tubo foi centrifugado por 5 minutos a 1200 rpm (259 rcf), o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em do meio de cultura e o volume foi dividido em outras duas garrafas.

As células TM1M foram cultivadas na presença de antibiótico (ampicilina:estreptomicina 10 mg/mL), o qual era retirado uma semana antes dos experimentos envolvendo os radiofármacos.

3.4.2 Viabilidade celular por azul de tripan

Foram adicionados 20 µL de uma suspensão de células em um tubo de microcentrífuga de 200 µL e em seguida, 20 µL de azul de tripan 0,2%. Dessa mistura foram transferidos 10 µL para a câmara de Neubauer, que foi levada ao microscópio invertido para contagem das células.

O número de células em mililitros foi calculado segundo a equação 1 e a viabilidade celular em porcentagem, foi calculado segundo a equação 2:

$$\text{Equação 1: } n^{\circ} \text{ céls/mL} = \frac{n^{\circ} \text{ céls totais}}{4} \times f_d \times f_c$$

$$\text{Equação 2: } V = \frac{n^{\circ} \text{ céls viáveis}}{n^{\circ} \text{ céls totais}} \times 100$$

Sendo, número total de células contadas divididas por 4, referente ao número de quadrantes, fd: fator de diluição = 2 (suspensão celular e azul de Tripán 1:1), fc: fator de correção = 10^4 . A viabilidade celular foi determinada através da razão entre células viáveis (não coradas) e inviáveis (coradas em azul). O resultado foi corrigido para o volume total da suspensão, e o fator de diluição foi calculado para o ensaio desejado. Foram utilizadas células com viabilidade acima de 95%.

3.4.3 Ensaio de captação e eliminação dos radiofármacos em células

3.4.3.1 Plaqueamento celular

Garrafas de cultura com células na confluência de 90% tiveram as células desprendidas e centrifugadas. O pellet de células foi ressuspendido em 10 mL de meio de cultura. O número total de células foi determinado utilizando método de viabilidade por azul de tripan (item 3.4.2), e volumes foram transferidos lentamente para placas de 4 poços, na concentração de 5×10^5 células por poço; o volume foi completado com a adição lenta para 1 mL com meio de cultura e a placa foi agitada em leves movimentos circulares para que as células fossem espalhadas uniformemente nos poços. As placas foram mantidas em estufa em condições de cultura, por 24 horas.

3.4.3.2 Ensaio de captação

Três placas de cultura, com 4 poços cada, semeadas com 5×10^5 células e incubadas previamente por 24 horas, tiveram o meio de cultura aspirado e acrescido de 1 mL de meio novo, aproximadamente 1 hora antes do início dos experimentos.

Os radiofármacos foram diluídos à concentração de 3,7 MBq/mL (100 μ Ci/mL), 10 μ L da solução foram adicionados em cada poço e as placas retornaram à estufa de cultura, onde permaneceram, respectivamente, por tempos de 15, 60 e 120 minutos. Ao término de cada tempo, a solução de cada poço foi aspirada e transferida para um tubo plástico, compatível com o sistema de contagem de radiação; em seguida, os poços foram lavados duas vezes com 1 mL de solução PBS, sendo as soluções transferidas para outros tubos para contagem; finalmente, 1 mL de solução de NaOH 0,1 N ou tripsina 0,25 %, foi adicionada aos poços para lise ou despredimento das células, as quais também foram transferidas para tubos para contagem. Todas as ponteiros utilizadas para transferência das soluções entre os poços e os tubos, foram adicionadas aos respectivamente tubos e a radioatividade em cada um deles foi determinada em contador gama tipo poço.



Figura 10. Esquema de ensaios de captação celular

3.4.3.3 Ensaio de efluxo

Duas placas de cultura, com 4 poços cada, foram semeadas e incubadas previamente por 24 horas, tiveram o meio de cultura aspirado e acrescido de 1 mL de meio novo aproximadamente 1 hora antes do início dos experimentos. Os radiofármacos foram diluídos à concentração de 3,7 MBq/mL (100 μ Ci/mL) e 10 μ L da solução foram adicionados em cada poço e as placas retornaram à estufa de cultura, onde permaneceram por 120 minutos. A taxa de efluxo foi determinada por dois processos:

3.4.3.3.1 Avaliação sequencial nos tempos de 15, 60 e 120 minutos

Após o período de incubação dos radiofármacos (120 min), o meio de cultura dos poços foram retirados e acomodados em tubos de contagem, as células foram lavadas com 1 mL de PBS e essa solução também foi transferida para tubos de contagem, juntamente com as respectivas ponteiros. O poços foram repostos por mais 1 mL de meio, a placa foi levada novamente à estufa e o processo de retirada do meio de cultura, lavagem e reposição do meio repetido aos 15, 60 minutos e aos 120 minutos, após o tempo do primeiro processo de remoção do meio de cultura; no último tempo as células também foram removidas e adicionadas a tubos para determinação da radioatividade (Figura 11).

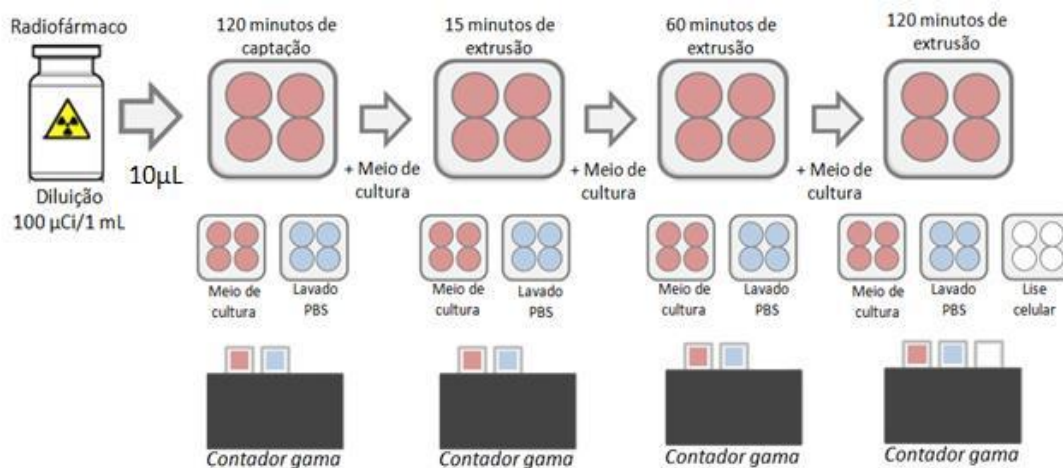


Figura 11. Ensaio de efluxo celular nos tempos de 15, 60 e 120 min, após incubação inicial por 120 min.

3.4.3.3.2 Avaliação no tempo de 120 minutos

Após o período de incubação dos radiofármacos de 120 min, o meio de cultura dos poços foi retirado e acomodados em tubos de contagem, as células foram lavadas com 1 mL de PBS e essa solução também foi transferida para tubos de contagem, juntamente com as respectivas ponteiros. Os poços foram preenchidos com mais 1 mL de meio de cultura e a placa foi levada novamente à estufa por um período de 120 minutos. Ao final, o meio de cultura foi removido e transferido para novos tubos de contagem, os poços foram lavados com PBS e as soluções de lavagem foram transferidas para outros tubos de contagem, por fim, as células foram lisadas com 1 mL de solução de NaOH 0,1 N para coleta das células e as soluções foram transferidas para tubo de

contagem, os quais foram analisados em um contador gama tipo poço (Figura 12).

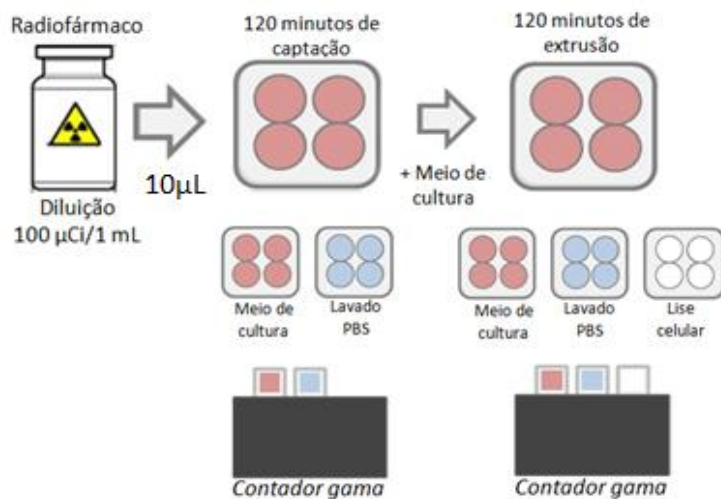


Figura 12. Ensaio de efluxo celular no tempo de 120 min, após incubação inicial por 120 min.

3.5 Estudos de biodistribuição *ex vivo* e *in vivo*

3.5.1 Modelo animal

Camundongos C57Bl/6 SPF (*Specific Pathogen Free*), provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP, foram agrupados em número de 6 animais e mantidos em micro-isoladoras acopladas em estantes com sistema de troca de ar (20 ciclos/h). A temperatura da sala foi mantida entre 20 °C e 23 °C, com ciclo de fotoperíodo de 12/12 horas, dentro do Biotério de Experimentação do Centro de Medicina Nuclear. Os animais receberam água e ração estéreis *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina-USP (CEP nº372/12).

3.5.2 Implantação do tumor

Células B16F10 e TM1M de melanoma foram desprendidas da garrafa de cultura e recolhidas em 2 frascos cônicos de 15 mL, cada frasco com 10 mL de meio de cultura, em seguida foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e o sedimentado foi ressuspendido com 3 mL de meio de cultura. Foram separadas 20 µL da suspensão de cada linhagem e a viabilidade celular foi avaliada utilizando solução azul de Tripán 0,2 % (3.4.2). As células foram mantidas em banho de gelo até serem inoculadas por administração intradérmica de 5×10^5 células/100 µL de NaCl 0,9 % de B16F10 no dorso superior direito, de 7 a 10 dias antes da aquisição da imagem, e de TM1M no dorso superior direito, de 10 a 14 dias antes da aquisição da imagem.

3.5.3 Biodistribuição *ex vivo* dos radiofármacos $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$ e $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$

Camundongos da linhagem C57Bl/6, machos, com aproximadamente 8 a 10 semanas de vida, com implantes de células B16F10 e TM1M,

apresentando tumores com volume da ordem de 10 a 12 mm³, foram mantidos em jejum de 6 horas. Os animais foram pesados em balança semi-analítica e aproximadamente 0,37 MBq (10 µCi) do radiofármaco foi injetado na veia da cauda; transcorrido os tempos de 15, 120 e 240 min, os animais, em número de 3 ou 4 para cada intervalo de tempo, foram anestesiados com isoflurano® e eutanasiados por remoção do coração. Imediatamente após a eutanásia, uma fração do sangue colhido em frascos de vidro e os tecidos e órgãos: cérebro, tireóide, coração, pulmão, rins, estômago, baço, fígado, intestino grosso, intestino delgado, osso, músculo e tumor foram excisados, pesados em balança analítica e a radioatividade nos órgãos e no sangue foi medida em contador gama, tipo poço. Os dados foram transferidos para planilha eletrônica e foram calculadas as relações de atividade radioativa por órgão e por grama de órgão.

Procedimento idêntico foi realizado para os animais isentos de tumor.

3.5.4 Biodistribuição *in vivo* dos radiofármacos por imagem

Os camundongos foram anestesiados com uma mistura de 3 % de isoflurano em oxigênio e foram administrados, por veia peniana, 74 MBq (2 mCi) do radiofármaco de interesse diluído em 100 uL de solução salina. Após 30 minutos ou 2 horas da administração do radiofármaco, os animais foram anestesiados e mantidos sob efeito da mistura de isoflurano®, posicionado em decúbito ventral e as imagens foram adquiridas utilizando pinhole de 5 furos e 12x10³ contagens/projeção. Posteriormente imagens tomográficas (CT) foram

obtidas em campo de visão máximo de 9,3 x 9,7 cm. Todas as imagens foram adquiridas em equipamento Triumph Trimodality (Gamma Medica-Ideas Inc., Sherbrooke, Canadá).

3.5.5 Processamento de imagens SPECT/CT e PET/CT

As imagens foram reconstruídas utilizando o método OSEM, com 5 interações para o SPECT. As 512 projeções adquiridas na tomografia computadorizada foram reconstruídas pelo método FBP (retroprojeção filtrada). As imagens passaram por processo de fusão com auxílio do software Amide.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Preparação dos complexos de [^{99m}Tc]tecnécio

4.1.1 Avaliação do efeito do pH e temperatura na obtenção de [^{99m}Tc]tecnécio com H₂bdtc.

A química do elemento tecnécio é bastante complexa, pois o metal exibe múltiplos estados de oxidação e de coordenação, os quais variam em função do agente redutor utilizado, do pH do meio reacional e do tipo do ligante.

Artigos publicados na literatura utilizando complexos de ⁹⁹Tc e ^{nat}Re, os quais permitem isolar e caracterizar as moléculas obtidas ou analisa-las por métodos espectroscópicos, tem demonstrando a multiplicidade de compostos que podem ser formados em uma mesma reação.

Como as tiossemicarbazonas são ligantes polidentados contendo átomos de enxofre, nitrogênio e oxigênio que podem se coordenar ao metal, simultaneamente ou seletivamente, decidimos avaliar o efeito do pH e temperatura na formação dos complexos^{60, 69}.

Várias marcações foram realizadas seguindo o procedimento descrito em 3.2.1. Ao final do processo de mistura dos reagentes foi adicionado solução tampão fosfato 0,1 N pH 3, pH 5 e pH 7, além de se manter o pH original, ao redor de 5,5, obtido no momento da formulação. Para todas as situações também foi avaliado o efeito da temperatura (ambiente ou aquecimento 90 °C/5

min) e para a preparação tamponada com pH 7, também foi avaliado o efeito do volume do tampão. Foram utilizados como referência o tempo de retenção do $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ e o do complexo $[\text{ReO}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$.

A marcação realizada em pH 3 mostrou, na análise por HPLC, a formação de três produtos, com tempos de retenção de 4,3 min (19,65 %) , 5 min (15,51 %) e 8,8 min (55,95 %) e após aquecimento da amostra os tempos de retenção são alterados para 2,3 min (18,33 %), 8,8 min (68,44 %) e 12,9 min (13,22 %) (figura 13). Quando a marcação foi tamponada a pH 5,0 outros produtos puderam ser observados, com tempo de retenção de 1,9 min (47,89 %) e 5,0 min (20,17 %); este caso o aquecimento apenas alterou a proporção dos produtos, respectivamente, para 58,89 % e 32,42 %. O composto com tempo de retenção de 1,9 min apresenta o mesmo tempo que o obtido para $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$, mas nenhum apresenta tempo de retenção de 3,2 min, obtido para o produto referência $[\text{ReO}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$.

A marcação realizada em pH 5,5, gerou 6 produtos com quantidades representativas, mas todos com valores abaixo de 50 % de pureza e nenhum correspondente ao produto de referência com $[\text{ReO}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$. O aquecimento alterou proporções dos compostos com tempo de retenção de 2,3 min e 7,8 min, dando origem a outros produtos com tempos de retenção diferentes (figura 13B).

A marcação em pH 7 embora também tenha fornecido vários produtos, permitiu obter dois deles em concentração superior a 85 %, influenciadas principalmente pela concentração do tampão na amostra, mas também sofrendo influência da temperatura. Quando foi utilizado 640 μL de solução tampão fosfato 0,1 M (pH 7), a temperatura ambiente, obtivemos um produto

com tempo de 2,3 min (8,49 %) e um principal, com tempo de retenção de 3,2 min (91,51 %), concordante com o tempo de retenção do produto referência [ReO(bdtc)(Hbdtc)], ao aquecê-lo o produto se degrada fornecendo os seguinte compostos de 2,3 min (3,53 %), 3,2 min (16,96 %) e 5,2 min (52,51 %). Ao diminuirmos a quantidade de tampão para 380 μ L, obtivemos produtos em 2,3 min (43,69 %), 16,8 min (30,69 %) e 24,2 min (25,52 %), ao ser aquecido toda essa mistura deu origem a 100 % do produto com tempo de retenção de 2,3 min (figura 13C).

Não encontramos na literatura outros relatos sobre efeito da variação do tampão na formação de diferentes complexos, de modo que a informação obtida neste trabalho pode ser importante no desenvolvimento de novos produtos, notadamente naqueles em que kits liofilizados são reconstituídos com a adição de tampões no momento da reconstituição.

Para compreender o que ocorre com o produto com tempo de retenção de 2,3 minutos, isolamos os dados na (figura 14, tabela 7), onde se pode observar efeitos de pH, temperatura e concentração do tampão na porcentagem de formação.

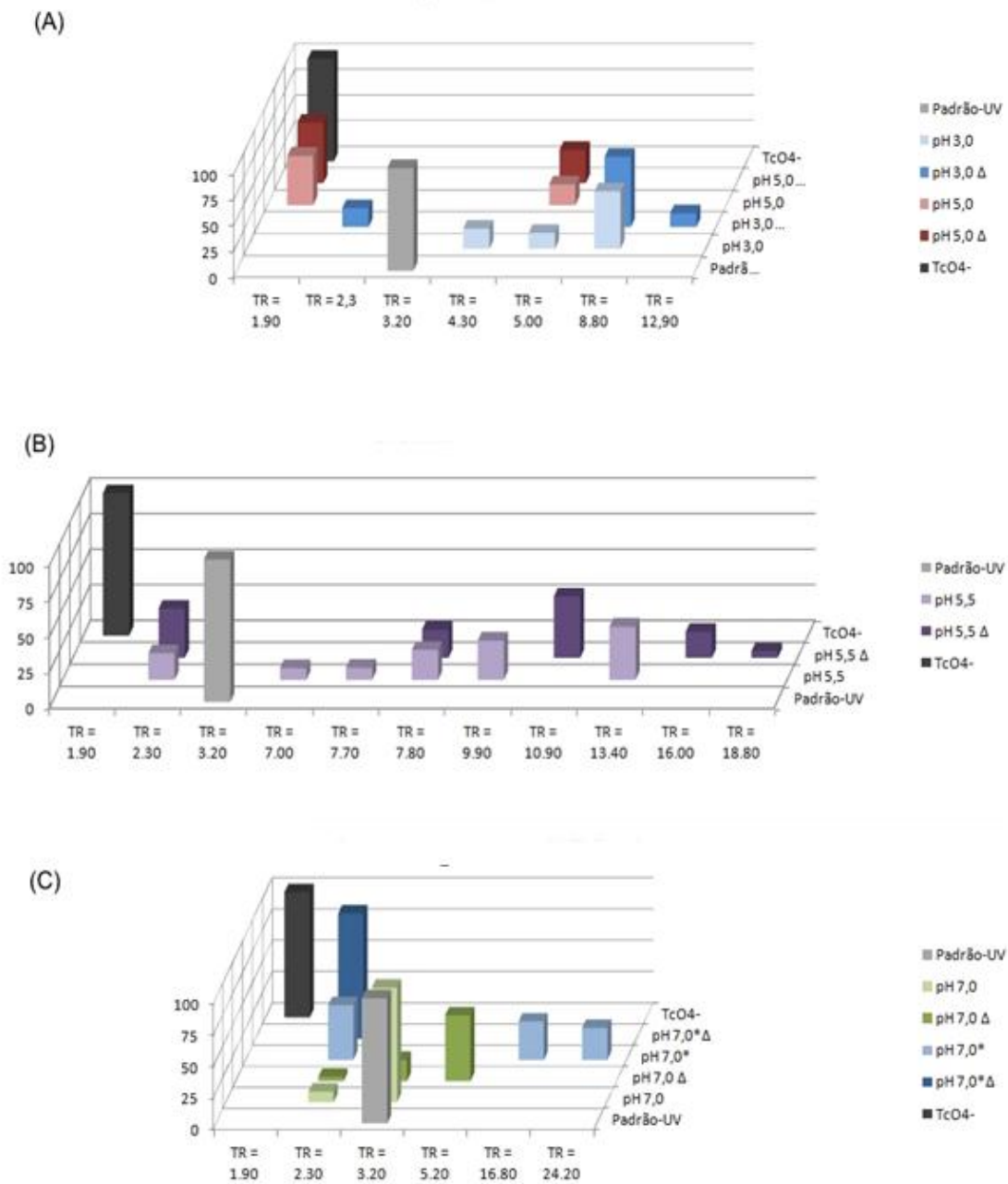


Figura 13. Cromatogramas **(A)** Marcação com variações de pH 3,0 - 5,0 e temperatura; **(B)** Marcação em pH 5,5 e variações de temperatura; **(C)** Marcação em pH 7, com variações de volume final de tampão (* 380 μ L ou 640 μ L) e temperatura.

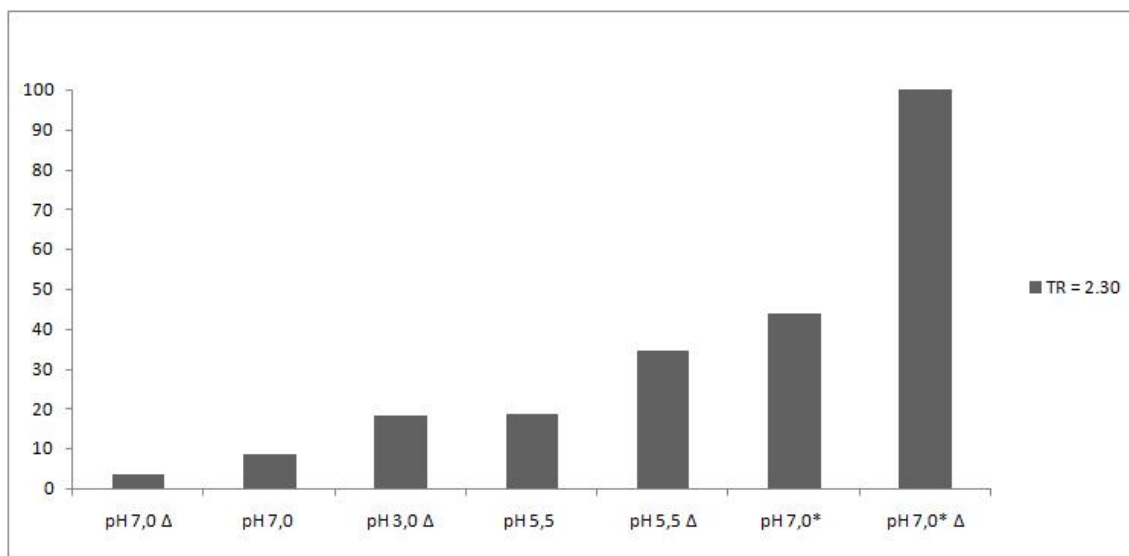


Figura 14. Rendimento do composto [^{99m}Tc]-bdtc] em função do pH, temperatura e volume de PBS 0,1 N (*380 μL ou 640 μL).

Tabela 7. Rendimento do composto [^{99m}Tc]-bdtc] em função do pH, temperatura e volume de PBS 0,1 N.

pH	Tampão	Volume		Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Rendimento
			(μL)		
pH 3,0	PBS 0,1 N		640	97	18.33%
pH 5,5	PBS 0,1 N		640	97	34.39%
pH 5,5	-		-	22-25	18.61%
pH 7,0*	PBS 0,1 N		380	97	100%
pH 7,0*	PBS 0,1 N		380	22-25	43.69%
pH 7,0	PBS 0,1 N		640	97	3.53%
pH 7,0	PBS 0,1 N		640	22-25	8.49%

Com excessão daquela estrutura que se pôde preparar um complexo de rênio e caracterizá-lo, todos os outros compostos demandariam um trabalho imenso para prepará-los e caracterizá-los do ponto de vista físico-químico e biológico. Desta maneira decidimos seguir o trabalho com o composto de estrutura conhecida e aquele que apresentou concentração de 100 %, com tempo de retenção de 2,3 min.

4.1.2 Preparação e controle de qualidade dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$ e $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$

Com base nos experimentos que permitiram definir pH, temperatura e quantidade de agente tamponante, novas preparações foram realizadas e, além da análise por HPLC, também foram realizadas análises por cromatografia em camada delgada, para permitir identificar a possível formação da espécie hidrolisada/reduzida $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_2$.

A análise por HPLC do produto de reação entre H_2bdtc e $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$, tampão fosfato 0,1 M (pH 7) e temperatura ambiente, permitiu observar a formação de dois produtos principais (figura 15A), aquele com tempo de retenção de 3,2 min (91,51 %), com retenção compatível com o produto referência $[\text{ReO}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$ (figura 15B) e outro com tempo de retenção de 2,3 min (8,49 %).

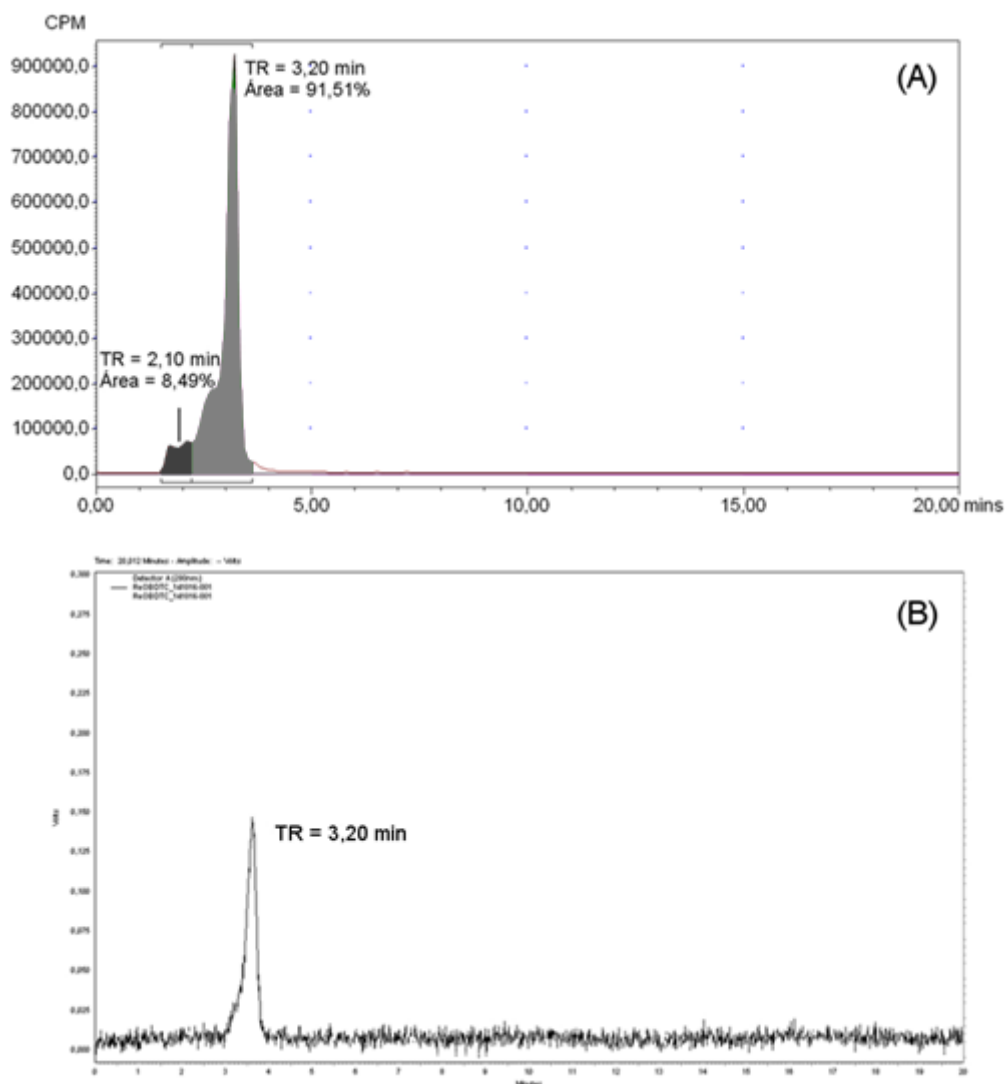


Figura 15. Cromatogramas em HPLC: (A) Complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$ por detecção em Flow Scintillation Analyzer, Radiomatic 610TR, processado em software ProFSA, PerkinElmer. (B) Padrão não radioativo $[\text{ReO}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$ detectado por UV a 180 nm, utilizando HPLC, Software Class-VP, Shimadzu.

Para avaliar a formação da espécie $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_2$ que não pode ser determinada em análise por HPLC utilizando colunas de fase reversa, uma vez que fica retida nela, foram utilizados os sistemas cromatográfico papel Whatman 3MM/NaCl 0,9 % e papel Whatman 3MM/acetona, nos quais as

impurezas $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ e $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_2$, independente da fase móvel, apresentam $R_f = 0,9-1,0$ e $R_f = 0-0,1$, respectivamente, enquanto complexos lipofílicos tendem a apresentar R_f próximo a zero, quando do uso de solução de NaCl 0,9 %, e R_f próximo a 1,0 quando do uso de fases móveis orgânicas, como acetona. Nesse cenário, foram determinadas concentrações médias de $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ na ordem de 0,18 % e de $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_2$ na ordem de 1,7 %, levando a eficiência de marcação de 98,12 %, conforme ilustrado nas figuras 16A e 16B.

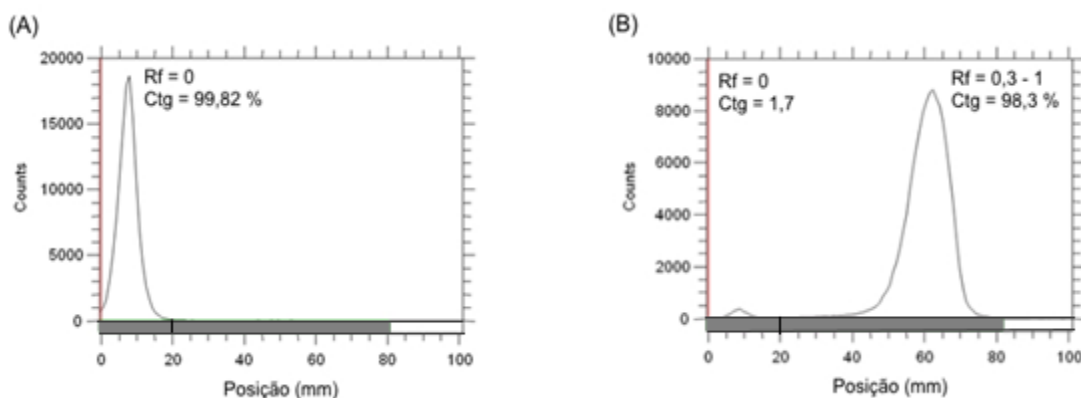


Figura 16. Cromatograma do complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$, obtido em: **(A)** Papel Whatman 3MM/NaCl 0,9 %; **(B)** Papel Whatman 3MM/acetona. A distribuição foi analisada em scanner detector AR-2000 RC Scanner Bioscan e processada usando WinScan Software.

Na formulação em que foi utilizado um volume menor (380 μL) de tampão fosfato 0,1 M (pH 7), com o objetivo de aumentar a concentração radioativa, o resultado da reação do H_2bdtc e $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$, sem aquecimento, analisada por HPLC permitiu observar 3 compostos (figura 17A), com tempo de retenção de 2,1 min (43,69 %), 16,8 min (30,79 %) e 24,2 min (25,52 %), que

depois de aquecido a 90 °C se tornam um, com tempo de retenção de 2,1 min (100 %) (figura 17B). A injeção de $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-]$ no HPLC, sob as mesmas condições de análise, mostrou que o produto apresenta tempo de retenção de 1,9 min, muito próximo aos 2,1 min obtidos para o complexo de $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$.

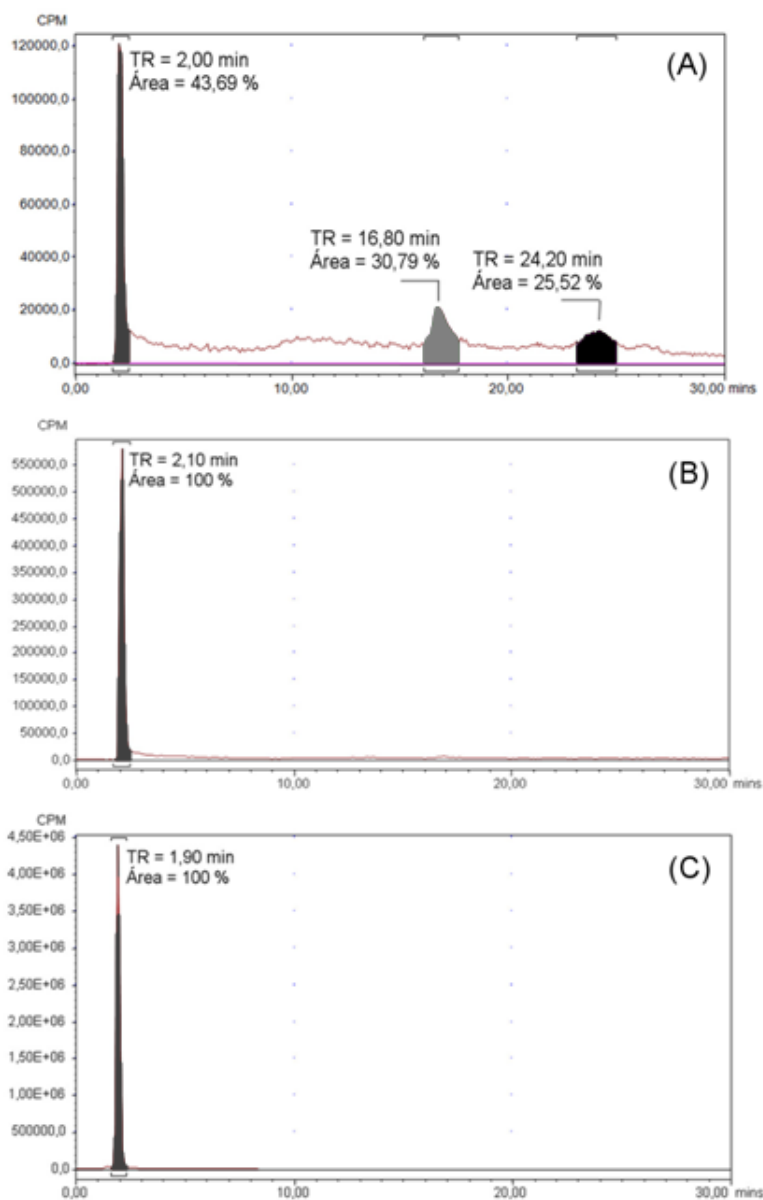


Figura 17. Cromatogramas **(A)** Complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$ marcado sem aquecimento; **(B)** Complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$ aquecido à 90 °C por 5 minutos; **(C)** Injeção de $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-]$. HPLC Flow Scintillation Analyzer, Radiomatic 610TR, software ProFSA, PerkinElmer.

A utilização dos sistemas cromatográfico papel Whatman 3MM/NaCl 0,9 % e papel Whatman 3MM/acetona, permitiu deminar que não havia o produto $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ presente na amostra (figura 18A), enquanto a espécie $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}_2$ foi encontrada na proporção de 4,24 % (figura 18B).

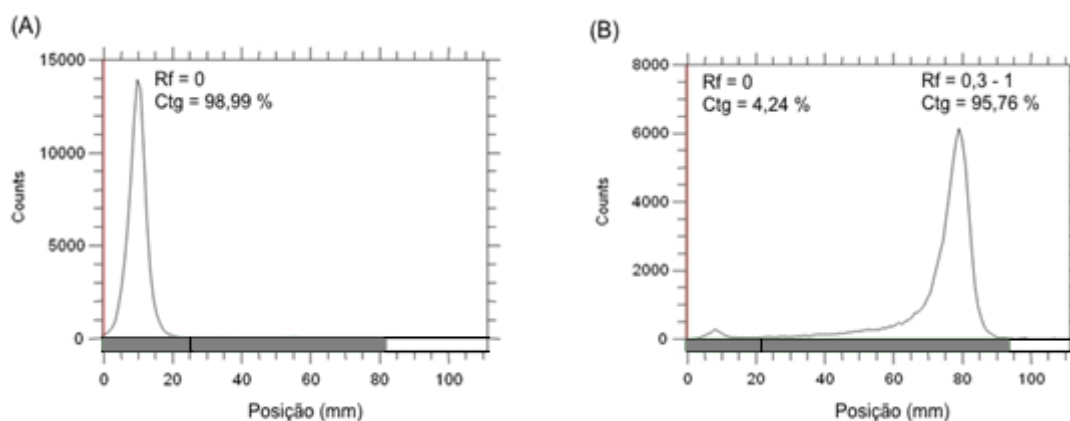


Figura 18. Cromatograma do complexo $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{-bdtc}$, obtida em: (A) Papel Whatman 3MM / NaCl 0,9 %; (B) Papel Whatman 3MM / acetona. A distribuição foi analisada em scanner detector AR-2000 RC Scanner Bioscan e processada usando WinScan Software.

Já havíamos apresentado na introdução a possibilidade das preparações dos complexos de $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{tecnécio}$ darem origem a isômeros estruturais^{70,71}, e a preparação de complexos não radioativos de rênio têm permitido entender a estrutura desses complexos. Durante o desenvolvimento da tese de doutorado de Fernandes⁷², no qual foram preparados complexos com o ligante H_2bdtc , o autor encontrou que quando foi preparado utilizando o metal Re foi possível isolar e caracterizar, por IR, $^1\text{H-RMN}$, $^{13}\text{C-RMN}$ e cristalografia de raio-X, apenas o complexo $[\text{ReO}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$; todavia,

quando foi utilizado o ^{99}Tc ($t_{1/2} = 2,1 \times 10^5$ anos) foi obtido o complexo $[[^{99}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})\text{Cl}]$, também caracterizado por métodos analíticos convencionais, mas como a preparação desse segundo composto ocorreu na Alemanha, não foi possível transportá-lo para o Brasil, para que fosse utilizado como referência.

Todos os resultados apresentados até aqui, mostram a fascinante e complexa química do elemento tecnécio, é a importância do desenvolvimento de padrões analíticos com rênio e utilização de diferentes métodos cromatográficos para comprovação dos resultados.

4.2 Preparo e controle de qualidade do complexo de ^{111}In

O complexo $[^{111}\text{In-bdte}]$ foi preparado como descrito na literatura⁷³. A reação ocorreu à temperatura ambiente e forneceu um produto com pureza superior a 98 %, conforme mostrado na figura 19B. Dado a condição branda com que o produto foi obtido e alto rendimento alcançado, não foram realizados outros estudos do processo de marcação.

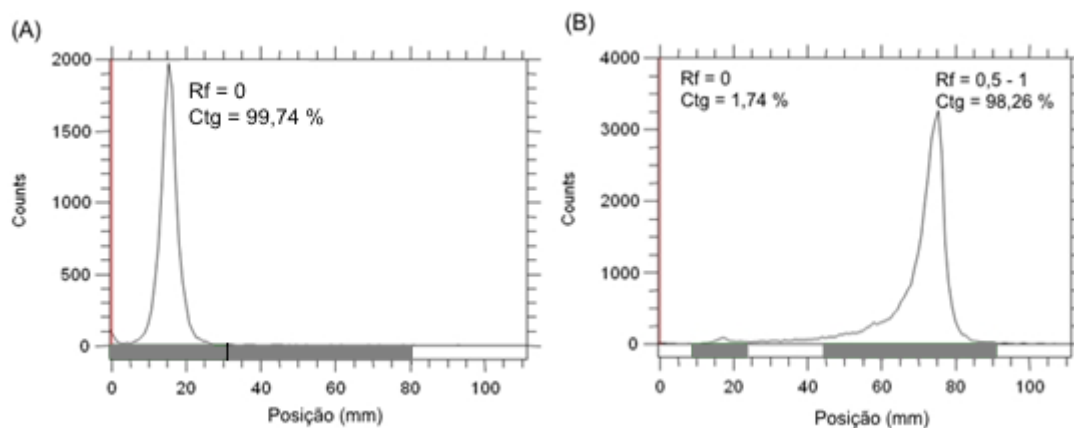


Figura 19. Cromatogramas **(A)** $^{111}\text{InCl}_3$ e **(B)** complexo $[^{111}\text{In-bdtc}]$, obtido em papel Whatman 4/ CHCl_3 :MeOH (75:25). A distribuição foi analisada em scanner detector AR-2000 RC Scanner Bioscan e processada usando WinScan Software.

4.3 Preparo e controle de qualidade do complexo de ^{67}Ga

A preparação do complexo $[^{67}\text{Ga-bdtc}]$ foi realizada seguindo os processos descritos na literatura⁶⁰. Todavia, ela foi mais trabalhosa, pois o ^{67}Ga fornecido pelo IPEN (também a cada 15 dias) estava na forma de $[^{67}\text{Ga}(\text{cit})_2]^{3-}$, o qual precisou ser hidrolisado e purificado em coluna de sílica-gel, para obtenção dele na forma de $^{67}\text{GaCl}_3$. A fração eluída da coluna com maior atividade radioativa foi separada e analisada por cromatografia planar, tendo sido observado mudança no perfil de migração, nas condições da análise, conforme demonstrado nas figuras 20A e 20B.

De posse daquele produto, o volume do eluato precisou ser reduzido, uma vez que o procedimento descrito na literatura para preparação desses complexos usualmente fazem uso de volumes pequenos de solvente.

O rendimento da reação com ^{67}Ga não foi tão alto quanto aquele obtido para o ^{111}In , ficando ao redor de 87 % (figura 21B) e pode estar associado a algum contaminante gerado no processo de hidrólise do $[\text{}^{67}\text{Ga}(\text{cit})_2]^{3-}$.

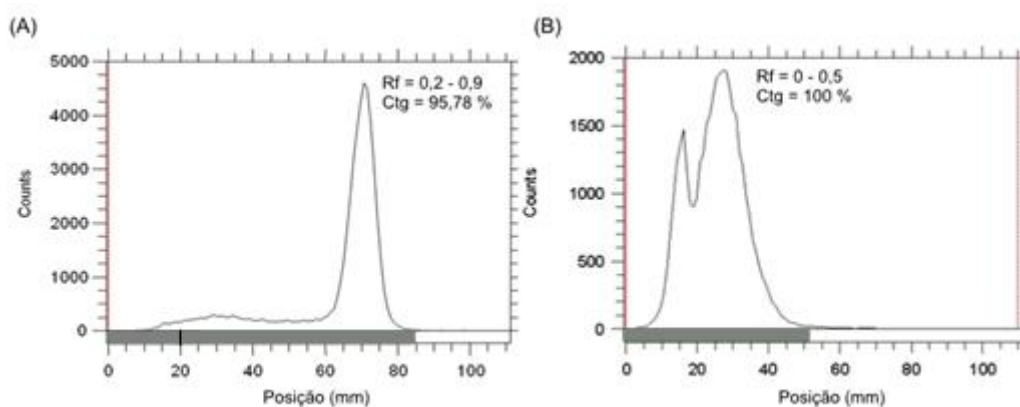


Figura 20. Cromatogramas **(A)** $[\text{}^{67}\text{Ga}(\text{cit})_2]^{3-}$ e **(B)** $^{67}\text{GaCl}_3$, obtido em papel Whatman 3MM/Py:EtOH:H₂O (1:2:4). A distribuição foi analisada em scanner detector AR-2000 RC Scanner Bioscan e processada usando WinScan Software.

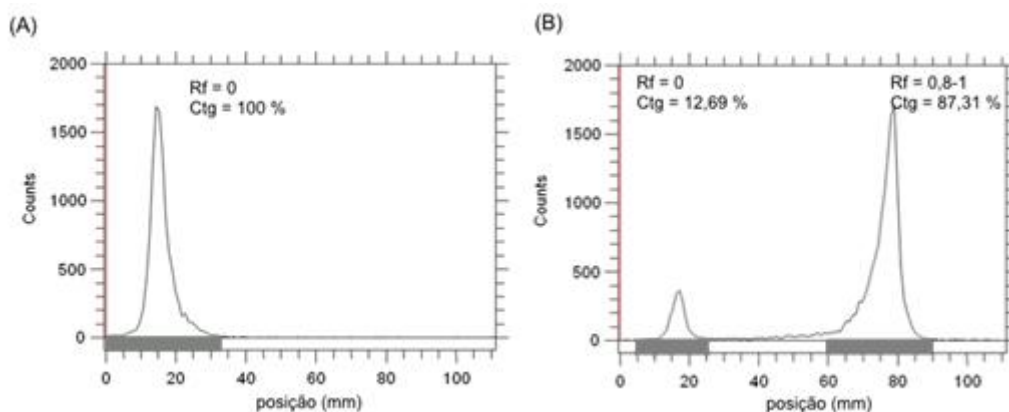


Figura 21. Cromatograma do: **(A)** $^{67}\text{GaCl}_3$ e **(B)** $[\text{}^{67}\text{Ga-bdte}]$, obtido em papel Whatman 3MM/Acetonitrila:H₂O (75:25). A distribuição foi analisada em scanner detector AR-2000 RC Scanner Bioscan e processada usando WinScan Software.

4.4 Determinação do coeficiente de partição (LogP)

O coeficiente de partição é uma medida utilizada para determinar o grau de hidrofobicidade de uma determinada substância, realizada agitando o composto que se pretende analisar em uma mistura de dois solventes imissíveis, um aquoso como H₂O, solução salina 0,9 % ou em PBS 0,1 N pH 7,4 e outro orgânico, normalmente n-octanol. O resultado da razão aquosa/orgânico é normalmente expresso na forma logarítmica (LogP). Nesse modelo, composto com LogP < 0 são considerados hidrofílicos, normalmente excretadas por via renal, e LogP>0 são considerados hidrofóbicos ou lipofílicos, que tendem a ser excretadas via sistema hepatobiliar, mas excreção renal também é possível.

No caso de pequenas moléculas (PM < 1 kDa) grau de lipofilicidade é importante para permitir que as moléculas ultrapassem a membrana celular e seja sequestrada no interior da células por algum mecanismo específico, principalmente no caso das células tumorais.

Os resultados da média de duas medidas de Log P para os complexos do ligante H₂bdtc com os metais ^{99m}Tc, ⁶⁷Ga e ¹¹¹In são apresentados na tabela

8.

Tabela 8. Valor do Log P dos complexos de H₂bdtc com radiometais, expressos como resultado da média de duas medidas.

Complexo	Log P
[[^{99m} Tc]O(bdtc)(Hbdtc)]	1,03
[[^{99m} Tc]-bdtc]	1,27
[⁶⁷ Ga-bdtc]	1,56*
[¹¹¹ In-bdtc]	0,903

* Medida única

Embora não pareça haver um valor de log P ideal para captação do radiocomplexos em tumores, moléculas lipofílicas tendem a se concentrar com maior intensidade no fígado⁷⁴, dificultando a visualização de tumores naquela região.

4.5 Estabilidade *in vitro* dos complexos de [^{99m}Tc]tecnécio na presença de L-cisteína, L-histidina, plasma e albumina

Complexos organo-metálicos são formados por ligações covalentes coordenadas, mais forte que as ligações iônicas, porém podem ser menos fortes que as ligações covalentes clássicas. Assim, é de fundamental importância determinar a estabilidade desses complexos em várias condições,

principalmente considerando o meio ambiente onde o produto será administrado, ou seja, o sangue. Na presença de aminoácidos como L-cisteína e L-histidina, que compõem diversos peptídeos e anticorpos foram realizados testes de estabilidade em solução de L-cisteína, L-histidina, soro albumina humana e plasma humano, para avaliar a estabilidade dos complexos e possíveis ligações às proteínas e aminoácidos encontrados na corrente sanguínea.

Normalmente são utilizadas concentrações de aminoácidos variando de 1 a 10 mM, contra concentração do complexo que variam de 10^{-4} a 10^{-5} mM. Santos e colaboradores estudaram a estabilidade de análogos de timidina marcados com [^{99m}Tc]tecnécio frente a concentrações de L-cisteína e L-histidina variando de 0,3 até 300 mM, e demonstrando que o complexo estudo permanece estável na primeira hora de incubação até a concentração de 30 mM. Todavia, após 4 horas, mesmo concentrações tão baixas quanto 0,3 mM já foram suficientes para degradar o complexo.

Em nosso trabalho utilizamos a concentração de L-cisteína e L-histidina na faixa de 1 mM.

4.5.1 Estabilidade *in vitro* do complexo [^{99m}Tc]O(bdtc)(Hbdtc) na presença de L-cisteína, L-histidina, plasma humano e soro albumina humana

Inicialmente realizamos o teste de estabilidade do complexo [^{99m}Tc]O(bdtc)(Hbdtc), utilizando tanto HPLC quanto cromatografia planar.

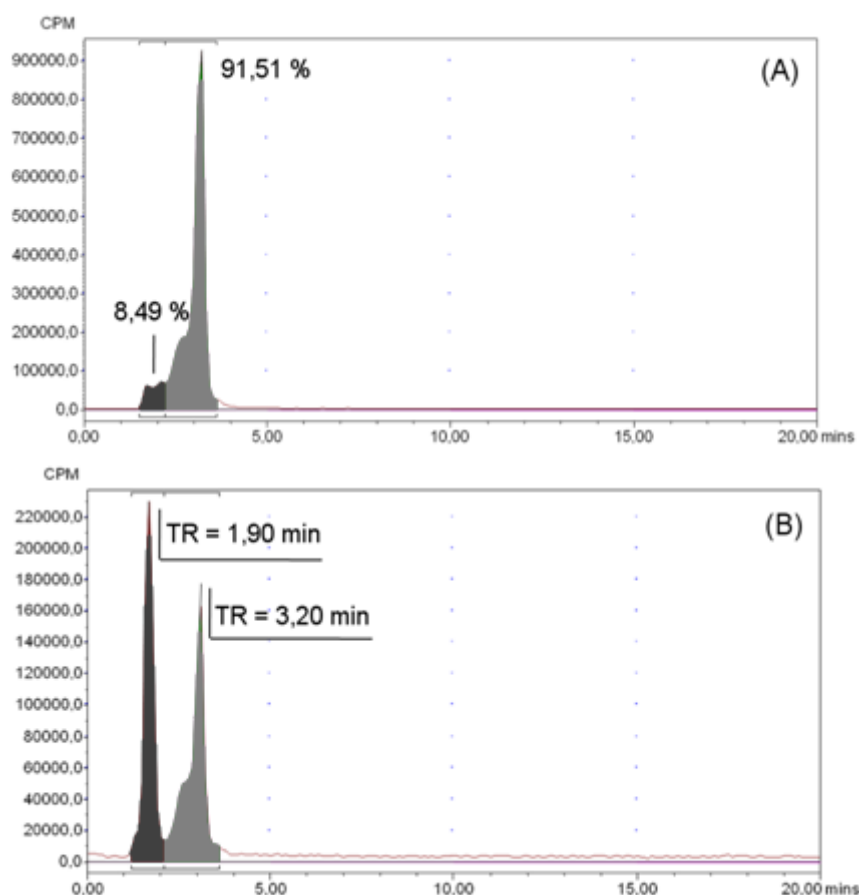


Figura 22. Cromatogramas **(A)** complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$ injetado no tempo 0; **(B)** Co-injeção do complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$ com $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-]$.

O composto marcado, inicialmente com pureza de 91,51 % determinada por HPLC (figura 23A), na presença de L-cisteína, diminuiu para 82,36 %, 75,45 % e 69,29 % após incubação por 1, 3 e 6 horas com L-cisteína, respectivamente (figuras 23B a 23D), com o aumento na concentração de um produto com tempo de retenção de 1,8 minutos. A cromatografia planar realizada paralelamente utilizando os sistemas Whatman 3MM/acetona e Whatman 3MM/NaCl 0,9 % (figura 24A e 24B), não permitiu observar o aparecimento das espécies $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-]$ $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_2]$ ou mesmo do um complexo

[[^{99m}Tc]-cisteína]⁻, pois este último seria hidrofílico e deveria permanecer na origem no sistema Whatman 3MM/acetona e migrar no Whatman 3MM/NaCl 0,9 %. Os dados sugerem que outra espécie contendo o ligante H₂bdtc pode ter sido formada, uma vez que o perfil de distribuição nos sistemas cromatográfico é compatível com um composto lipofílico.

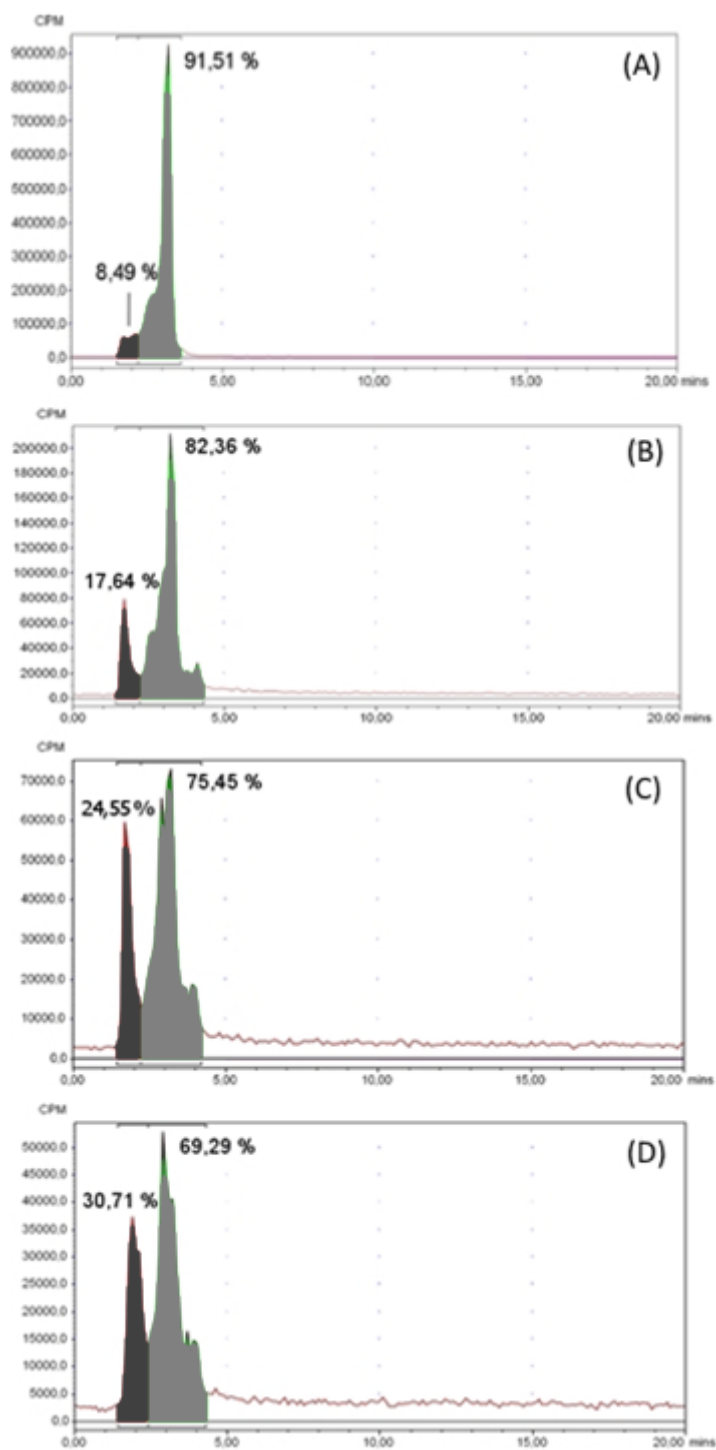


Figura 23. Cromatogramas do complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$ incubado na presença de L-cisteína 1 mM: **(A)** no tempo zero, **(B)** por 1 hora; **(C)** por 3 horas; **(D)** por 6 horas.

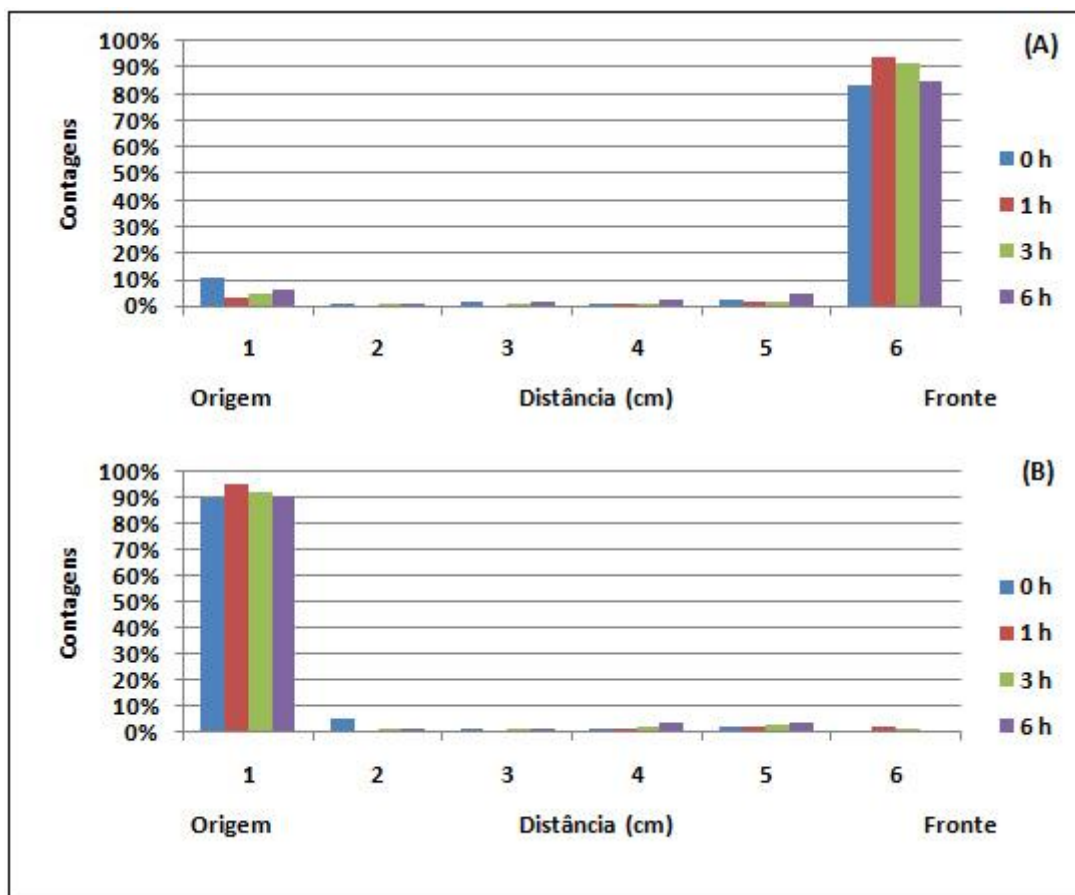


Figura 24. Estabilidade do complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$ incubado em solução de L-cisteína por 0, 1, 3 e 6 horas determinado por cromatografia planar em: **(A)** em papel Whatman 3MMMM/acetona; **(B)** papel Whatman 3MM/NaCl 0,9 %.

O teste de estabilidade na presença de histidina mostrou que o complexo é estável por um período de até 6 horas, mantendo rendimento acima de 95 % em todos os tempos de incubação, conforme análise realizada no HPLC (figura 25A,B,C).

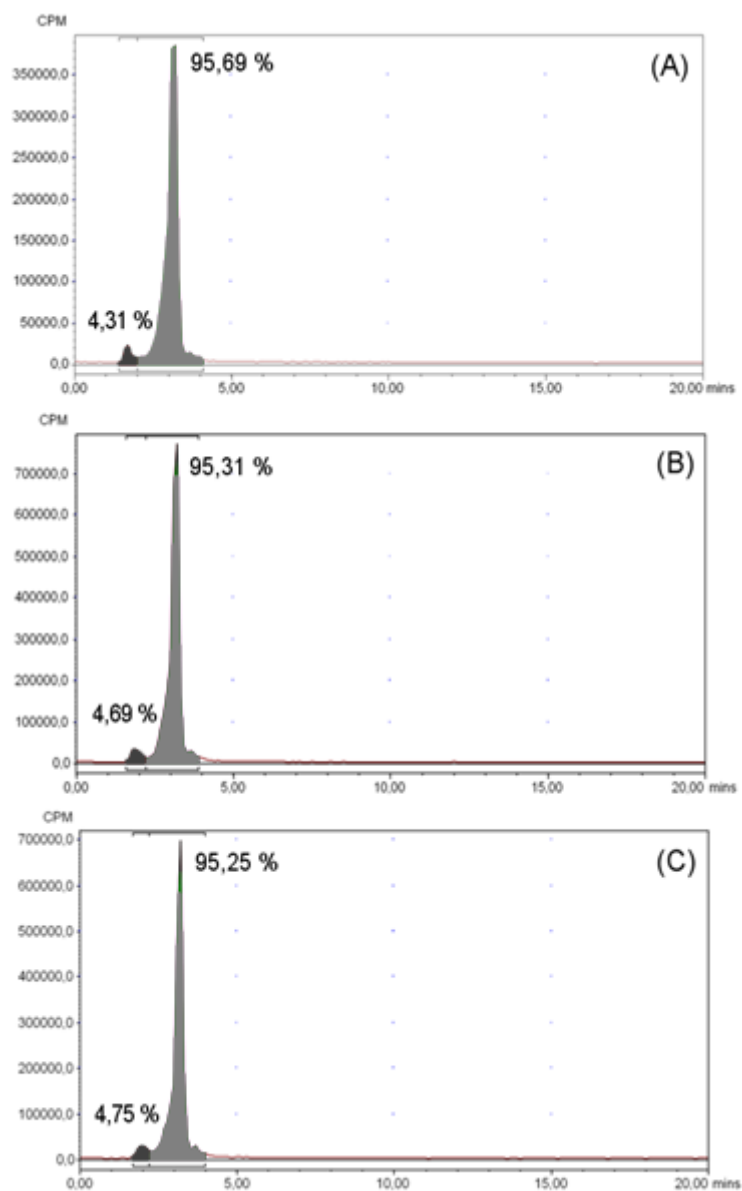


Figura 25. Cromatogramas do complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$ incubado na presença de L-histidina 1 mM: **(A)** por 1 hora; **(B)** por 3 horas; **(C)** por 6 horas.

Resultados semelhantes foram encontrados na cromatografia planar, mostrando a estabilidade do complexo na presença de histidina (figura 26A e 26B).

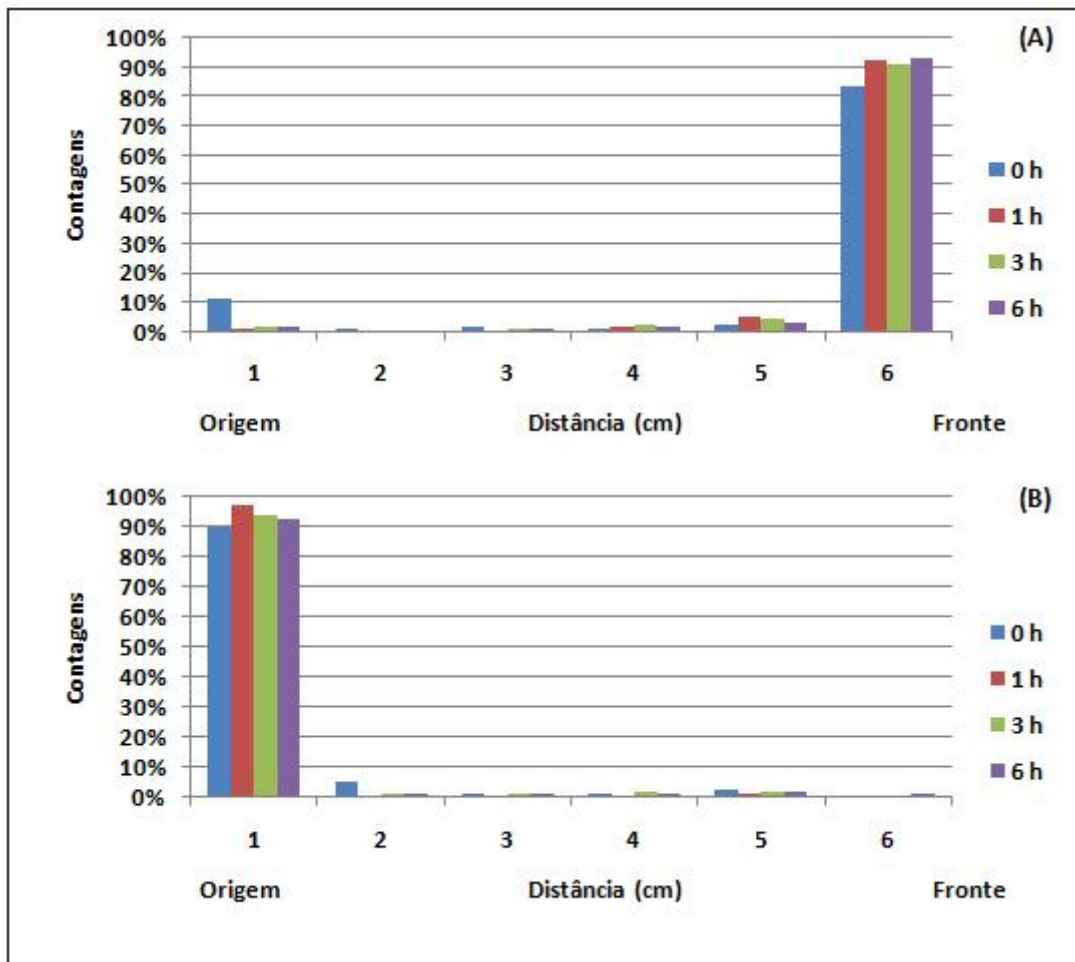


Figura 26. Estabilidade do complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$ incubado em solução de L-histidina por 0, 1, 3 e 6 horas determinado por cromatografia planar em: **(A)** em papel Whatman 3MMM/acetona; **(B)** papel Whatman 3MM/NaCl 0,9 %.

Finalmente, simulando o comportamento real, o teste de estabilidade foi realizado em plasma humano e em solução de soro albumina humana. Na falta de coluna cromatográfica para HPLC, com fase estacionária para análise por exclusão de tamanho, ideal para análise envolvendo macromoléculas, a estabilidade do complexo ou ligação às proteínas, foi avaliada por cromatografia planar incluindo, além dos sistemas Whatman 3MM/acetona e migrar no Whatman 3MM/NaCl 0,9 %, o sistema ITLC-SG impregnado com

albumina 0,2 % e fase móvel EtOH:NH₄OH:H₂O (2:1:5), o qual permite observar a migração de proteínas radiomarcadas⁷⁴.

A análise da estabilidade do complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$ no plasma, avaliada utilizando o sistema cromatográfico Whatman 3MM/acetona, mostrou que após 1 hora de incubação ocorreu diminuição da concentração da espécie radioquímica no fronte do sistema cromatográfico, passando de 91,7 %, no tempo zero (considerando os 2 últimos seguimentos da tira de papel), para 79,8 %, 55,4 % e 22,3 %, respectivamente para os tempos de incubação de 1, 3 e 6 horas, com aumento proporcional da concentração na origem do sistema (figura 27A), sugestível da formação da espécie $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_2$ ou da ligação às proteínas plasmáticas, a qual não deve migrar nesse sistema. No sistema Whatman 3MM/NaCl 0,9%, foi observado estabilidade da concentração de uma espécie radioquímica, em distância de migração de 5 a 6 cm, ao redor de 2 %, mas após 6 horas o valor aumenta para 13,4 % (figura 27B), evidenciando a formação da espécie $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$, ou alguma outra espécie hidrofílica.

Quando foi feita a análise no sistema ITLC-SG impregnado com albumina 0,2 %/ EtOH:NH₄OH:H₂O (2:1:5), o perfil cromatográfico foi muito diferente daquele observado nos dois primeiros. Enquanto no tempo 0 observamos migração de 59,2 % da radioatividade para o segmento de 6 cm, nos tempos seguintes a maior concentração da radioatividade ocorreu na origem do sistema (figura 27C). Caso ocorresse a transcomplexação do $[[^{99m}\text{Tc}]\text{tecnécio}$ para o plasma ou ligação do complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$ a este, deveríamos ter observado migração da radioatividade, uma vez que o sistema cromatográfico foi desenvolvido para esse fim. Todavia, observando o

perfil cromatográfico para o tempo 0 e os outros tempos fica evidente que ocorreu alguma modificação na estrutura do composto.

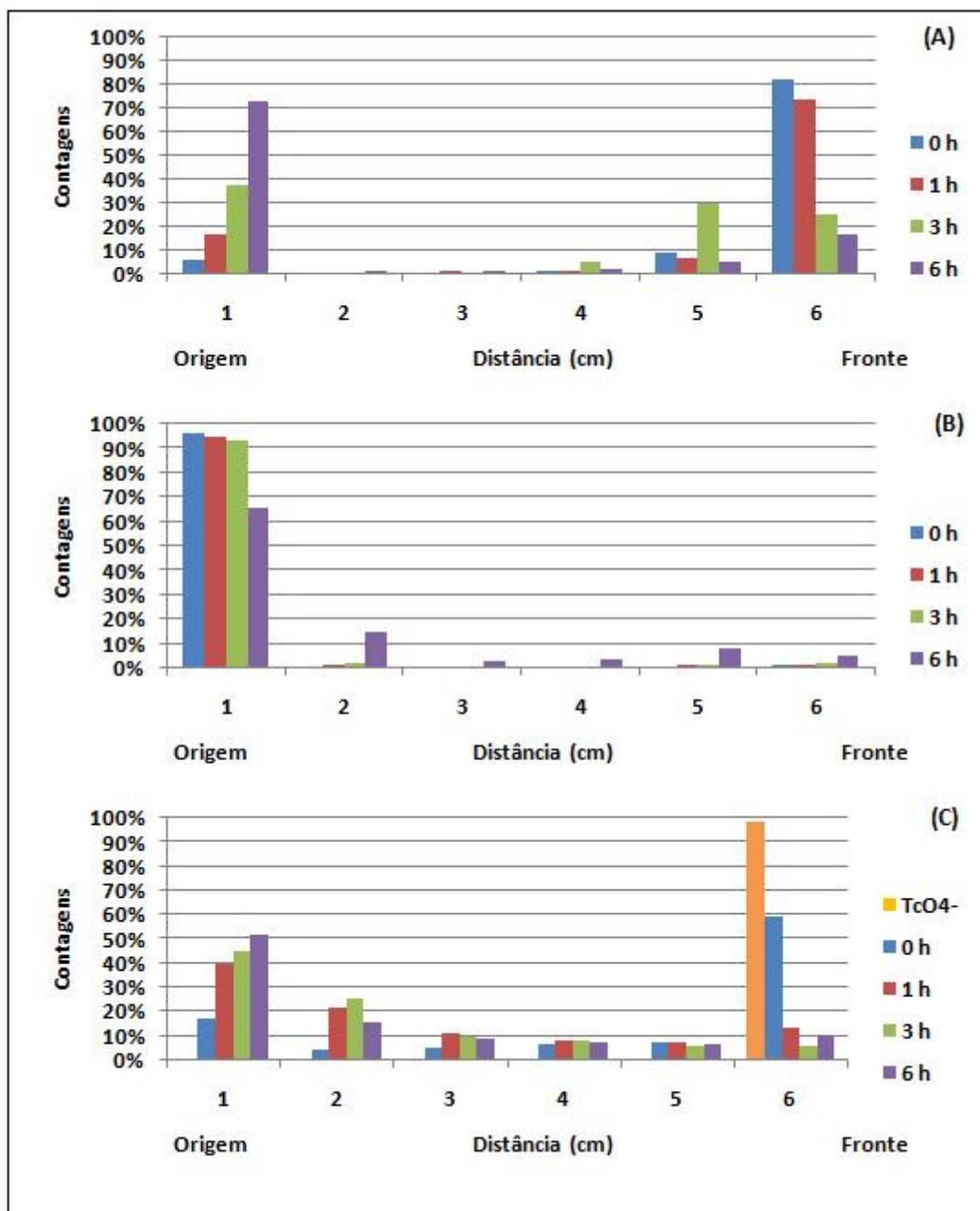


Figura 27. Cromatografia planar do complexo $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})$ incubado em plasma de sangue humano, por 0, 1, 3 e 6 horas em: **(A)** papel Whatman 3MM/acetona; **(B)** papel Whatman 3MM/NaCl 0,9 %; **(C)** ITLC-SG-Alb/EtOH:NH₄OH:H₂O (2:1:5), com $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ como referência.

O mesmo experimento realizado utilizando soro albumina humano apresentou resultado muito diferente. Nas cromatografias realizadas em papel Whatman 3MM/acetona (figura 28A) e papel Whatman 3MM/NaCl 0,9 % (figura 28B) não foram observadas alteração no perfil cromatográfico do composto comparando o tempo 0 do tempo de incubação por até 6 horas. Todavia, quando observado o perfil cromatográfico em ITLC-SG-Alb/EtOH:NH₄OH:H₂O (2:1:5) (figura 28C), fica evidente a modificação no perfil de eluição, permitindo concluir novamente, que ocorre alguma interação do [^{99m}Tc]O(bdtc)(Hbdtc) com a albumina, mas de forma relativamente diferente daquela observada para o plasma (figura 27C) , pois no tempo de 3 e 6 horas, a concentração na origem do sistema é pronunciada.

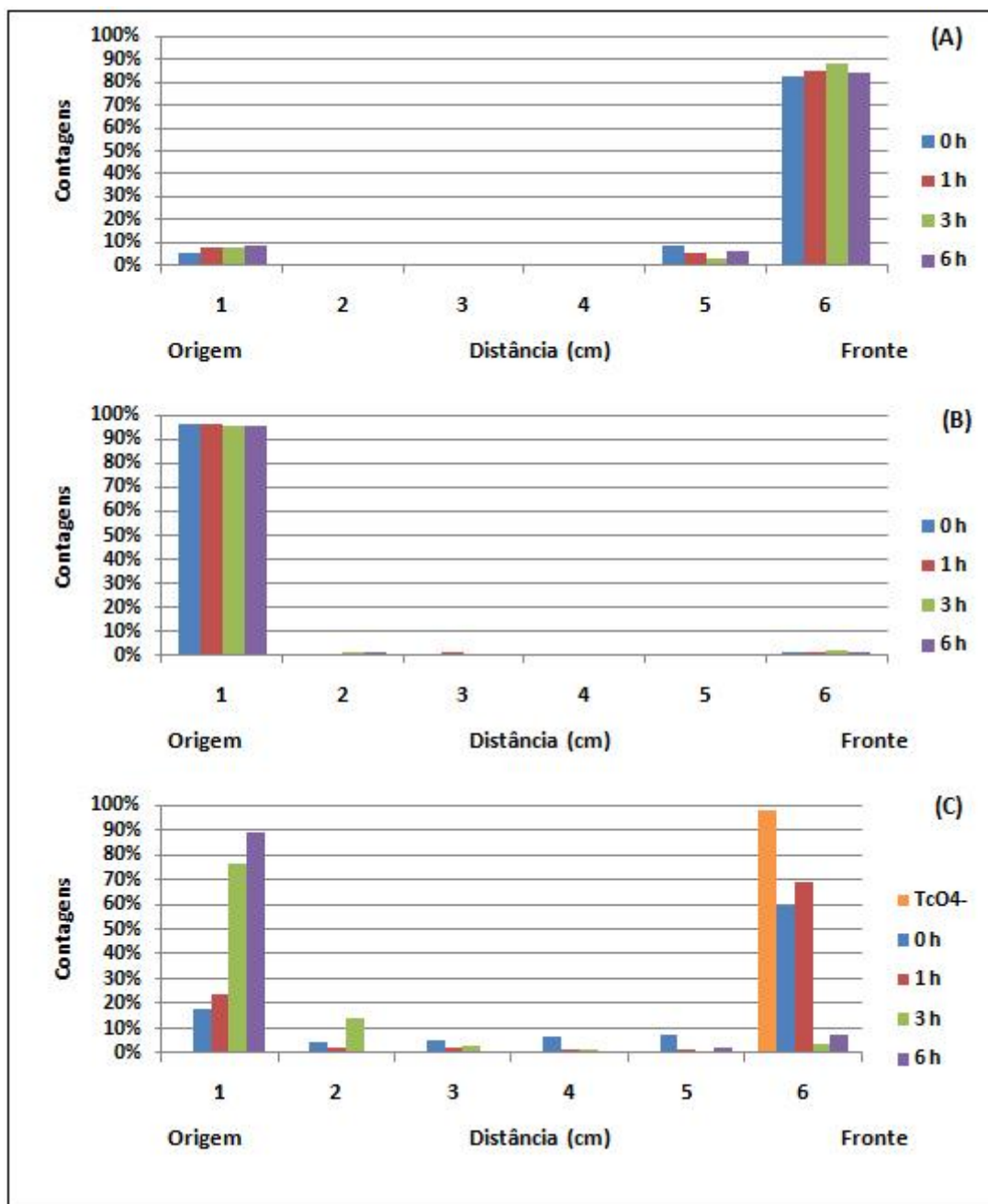


Figura 28. Cromatografia planar do complexo $[\text{[}^{99\text{m}}\text{Tc]O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$ incubado em solução de albumina humana a 0,2 %, por 0, 1, 3 e 6 horas em: (A) papel Whatman 3MM/acetona; (B) papel Whatman 3MM/NaCl 0,9 %; (C) ITLC-SG-Alb/EtOH:NH₄OH:H₂O (2:1:5), com $[\text{[}^{99\text{m}}\text{Tc]O}_4^-]$ como referência.

4.5.2 Estabilidade *in vitro* do complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$ na presença de L-cisteína, L-histidina, plasma humano e soro albumina humana

Como o tempo de retenção do complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$ é idêntico ao do $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-]$ os testes de estabilidade foram analisados exclusivamente por cromatografia planar.

O complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$ sofreu ataque da molécula de L-cisteína, uma vez que a concentração da espécie na origem do sistema cromatográfico (papel Whatman 3MM/acetona) aumentou para 3,6 %, 5,7 % e 11,6 %, nos tempos de incubação (figura 29A), sugestivo da formação da espécie coloidal $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_2]$ ou a formação do complexo com L-cisteína. Quando observado o sistema Whatman 3MM/NaCl 0,9 %, também é possível notar uma diminuição da radioatividade na origem do sistema e migração de um composto radioativo para o fronte da mesma; somando a radioatividade nos dois últimos seguimentos, observamos um aumento da concentração na faixa de 1,1 %, 5,3 % e 11 %, respectivamente para os tempos de 1, 3 e 6 horas (figura 29B). Os valores são idênticos aos observados no sistema utilizando acetona e assim podemos confirmar a formação da espécie $[[^{99m}\text{Tc}](\text{cisteine})_2]^-$.

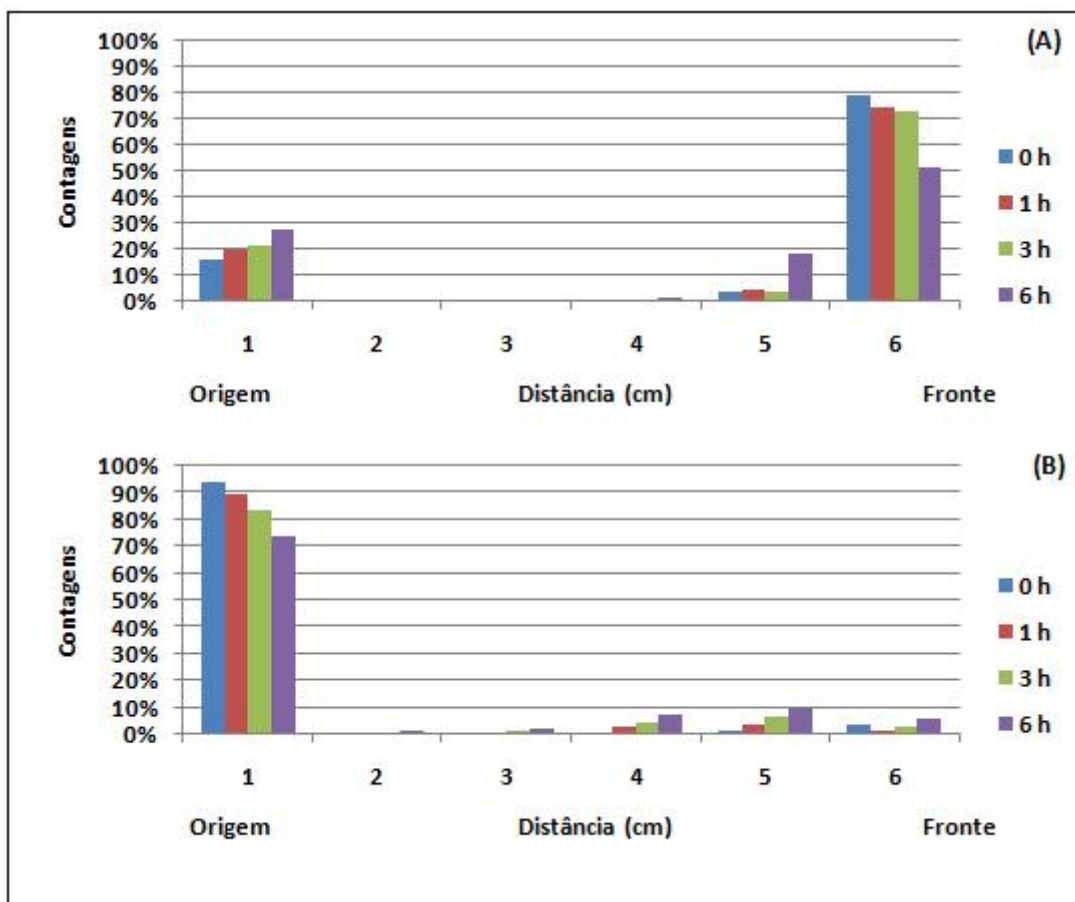


Figura 29. Cromatografia planar do: **(A)** complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$ em papel Whatman 3MM/acetona nos tempos 0, 1, 3 e 6 horas incubado em solução de L-cisteína; **(B)** complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$, em papel Whatman 3MM/NaCl 0,9 % nos tempos 0, 1, 3 e 6 horas incubado em solução de L-cisteína.

Com relação à incubação com histidina, o complexo mostrou-se aparentemente mais estável que com relação a L-cisteína, quando comparamos os dados na origem do sistema papel Whatman 3MM/acetona (figuras 29A e 30A). Todavia, quando olhamos o seguimento 5 cm na figura 30A e os seguimentos 4 a 6 cm na figura 30B, fica evidente que um novo composto está sendo formado, mas para este não é possível fazer ligações sobre sua estrutura.

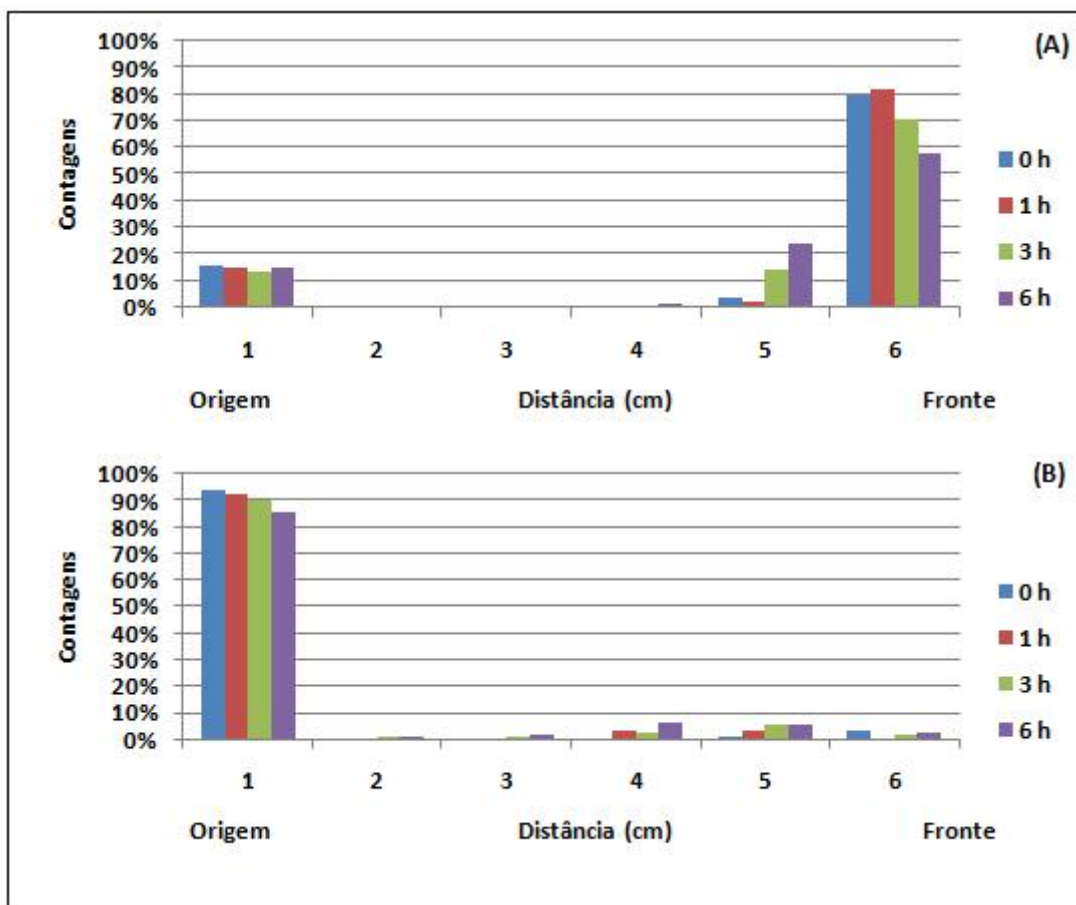


Figura 30. Cromatografia planar do: **(A)** Complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$ em papel Whatman 3MM/acetona nos tempos 0, 1, 3 e 6 horas incubado em solução de L-histidina; **(B)** complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$ em papel Whatman 3MM/NaCl 0,9 % nos tempos 0, 1, 3 e 6 horas incubado em solução de L-histidina.

A incubação em plasma humana permitiu observar rápida deterioração do complexo já a partir de 1 hora, conforme pode ser observado no sistema papel Whatman 3MM/acetona (figura 31A); a radioatividade na origem do sistema aumenta de 5,6 % no tempo 0, para 16,7 %, 38 % e 79,2 %, respectivamente para os tempos 1, 3 e 6 horas de incubação, compatível com a formação de $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_2$ ou integração do composto com a proteínas plasmáticas. No sistema papel Whatman 3MM/NaCl 0,9 %, a radioatividade na

origem do sistema diminui de 95 %, nos tempos 0, 1 e 3 h, para 65 %, no tempo de 6 h; o produto de degradação apresenta uma distribuição quase homogênea por toda a fita, não podendo ser caracterizado como $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$.

Quando a análise é realizada em ITLC-SG-Alb/EtOH:NH₄OH:H₂O (2:1:5) podemos observar diferentes estruturas sendo formadas no decorrer do tempo. Todavia, as estruturas não podem ser caracterizadas.

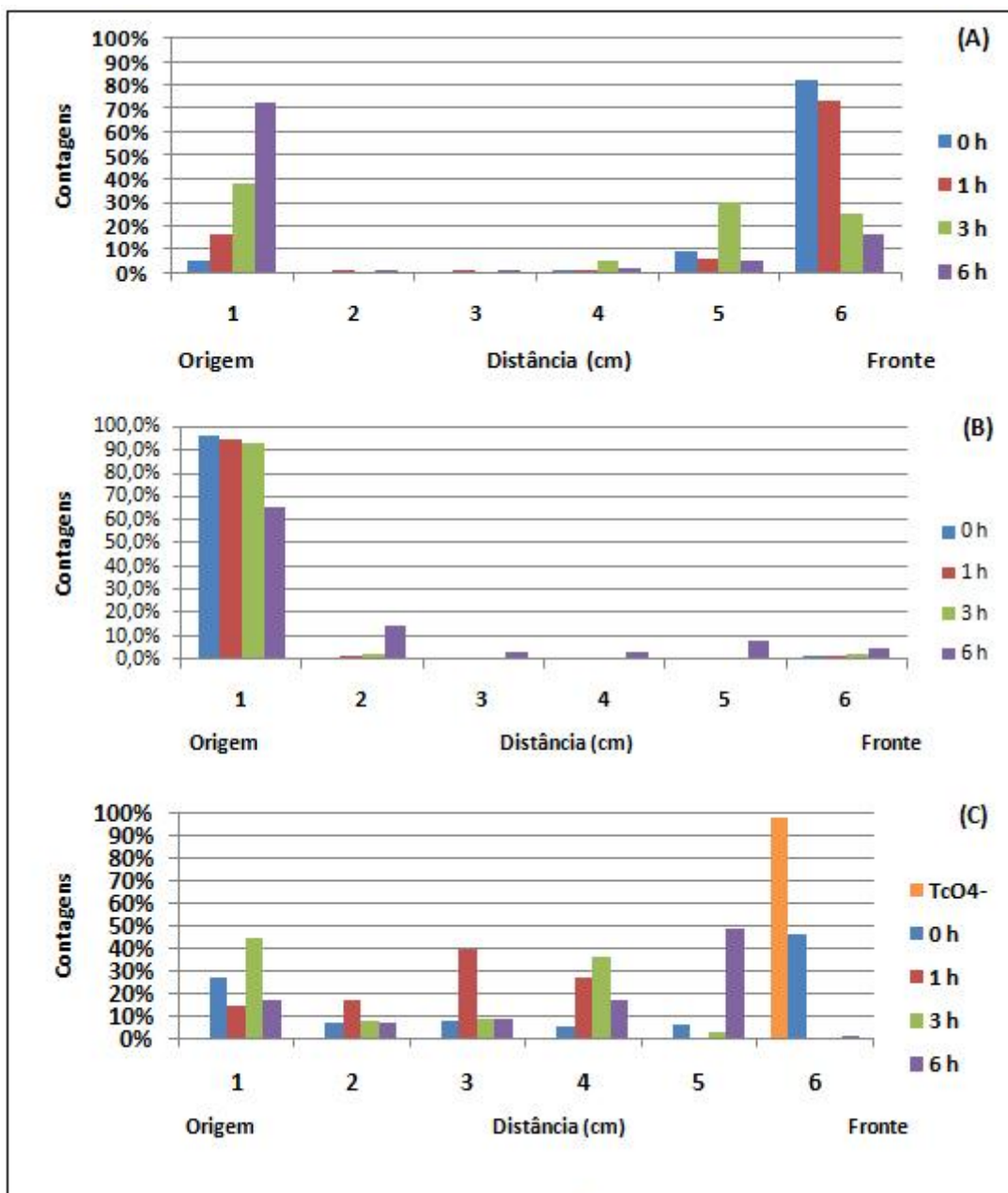


Figura 31. Cromatografia planar do complexo $[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}$ incubado em plasma de sangue humano, por 0, 1, 3 e 6 horas em: **(A)** papel Whatman 3MM/acetona; **(B)** papel Whatman 3MM/NaCl 0,9 %; **(C)** ITLC-SG-Alb/EtOH:NH₄OH:H₂O (2:1:5), com $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ como referência.

Na incubação em soro albumina humana o complexo apresentou maior estabilidade, uma vez que não foram observadas mudanças drásticas no perfil cromatográfico nos sistemas papel Whatman 3MM/acetona (figura 32A) e

papel Whatman 3MM/NaCl 0,9 % (figura 32B). Todavia, na análise utilizando o sistema de ITLC-SG-Alb/EtOH:NH₄OH:H₂O (2:1:5) (figura 32C) foi possível observar alteração do perfil cromatográfico do produto, com três fases distintas: no tempo 1 h, o produto se distribui por toda a fita, no tempo relativo a 3 horas ocorre concentração do produto na origem do sistema e no tempo de 6 horas parte dele volta a migrar para a região mais frontal do sistema.

Na impossibilidade de se ter moléculas com estrutura conhecida, apenas podemos inferir sobre a instabilidade da molécula, com formação de diferentes produtos.

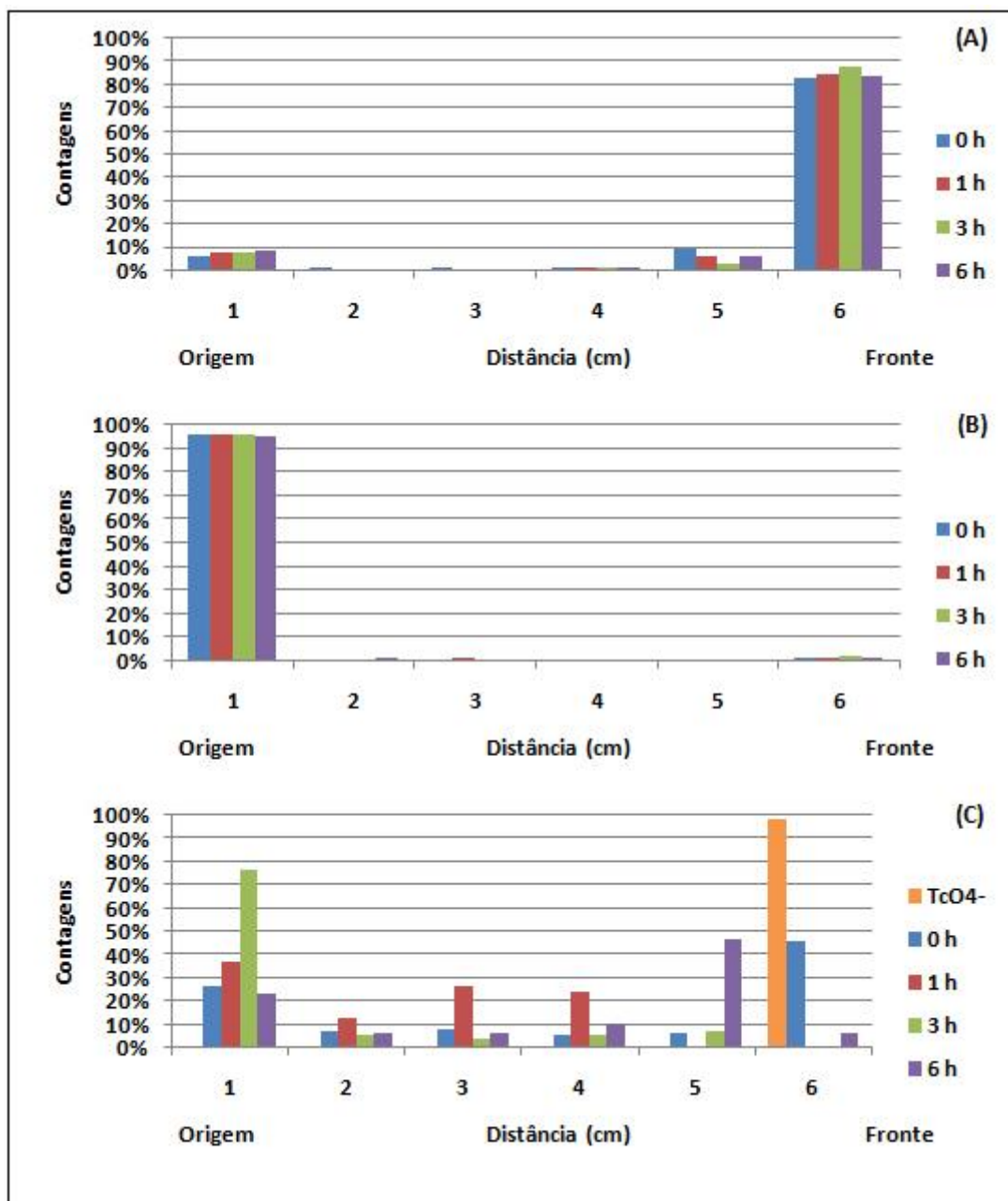


Figura 32. Cromatografia planar do complexo $[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}$ incubado em solução de albumina a 0,2 %, por 0, 1, 3 e 6 horas em: **(A)** papel Whatman 3MM/acetona; **(B)** papel Whatman 3MM/NaCl 0,9 %; **(C)** ITLC-SG-Alb/EtOH:NH₄OH:H₂O (2:1:5), com $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ como referência.

4.6 Estabilidade *in vitro* do complexo [^{111}In -bdtc] na presença de L-cisteína, L-histidina, plasma humano e soro albumina humana

O teste de estabilidade do complexo [^{111}In -bdtc] na presença de L-cisteína, mostrou completa desestruturação do complexo, já a partir da primeira hora de incubação, com toda radioatividade migrando do fronte para a origem do sistema papel Whatman 4/ CHCl_3 :MeOH (75:25) (figura 33A); na presença de histidina o complexo apresenta um comportamento diferente, com um inicial processo de degradação e aumento da reatividade na origem de 1,9 %, no tempo 0 para 28,8 % no tempo de 1 h, decaindo para 20,1 % e 9,3 %, nos tempos de 3 e 6 h.

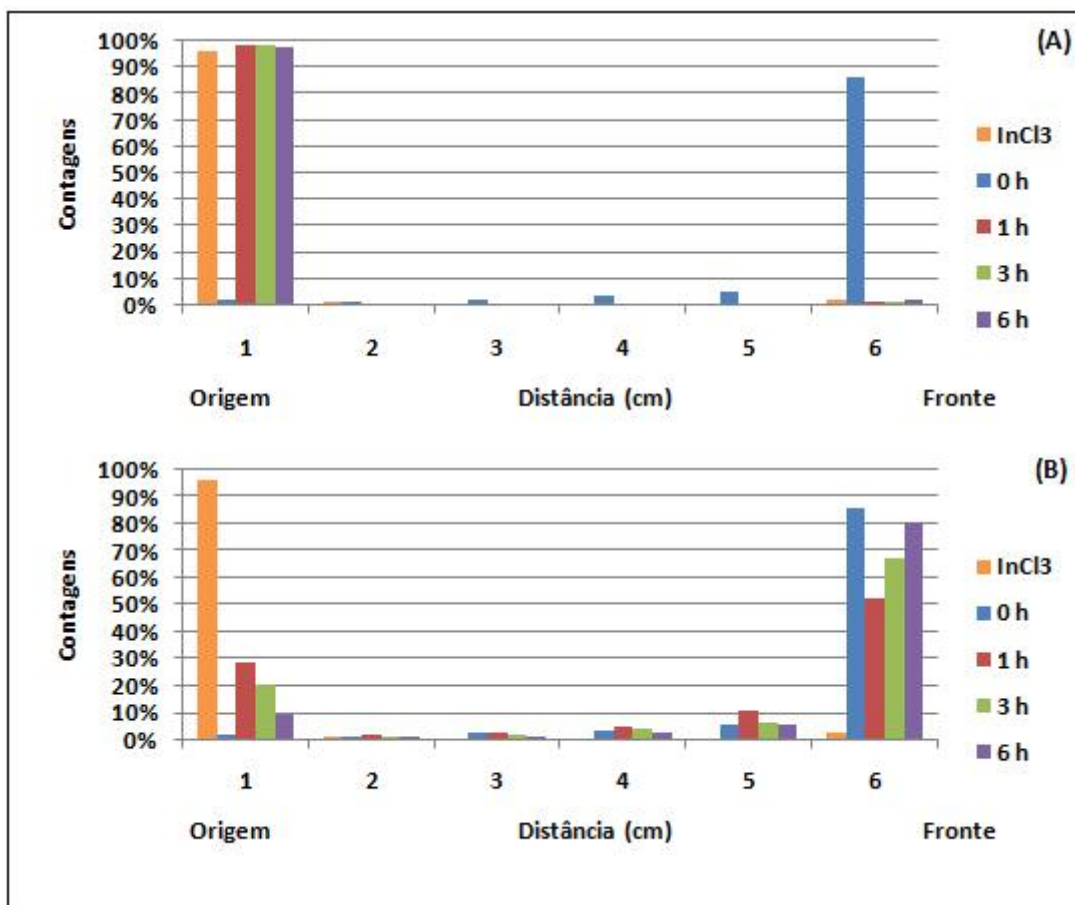


Figura 33. Cromatografia planar do: **(A)** complexo $[^{111}\text{In-bdte}]$ em papel Whatman 4/ $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (75:25) nos tempos 0, 1, 3 e 6 horas incubado em L-cisteína; **(B)** complexo $[^{111}\text{In-bdte}]$ em papel Whatman 4/ $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (75:25) nos tempos 0, 1, 3 e 6 horas incubado em L-histidina. $^{111}\text{InCl}_3$ foi utilizado como referência.

O complexo também teve a estabilidade avaliada na presença de plasma humano e soro albumina humana.

Utilizando o sistema cromatográfico ITLC-SG-Alb/ $\text{EtOH}:\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (2:1:5), foi determinado que tanto o complexo $[^{111}\text{In-bdte}]$ quanto o $^{111}\text{InCl}_3$ permanecem na origem do sistema, mas já na primeira hora de incubação há uma completa migração para o frente (figura 34A); na presença da albumina também é observada a degradação do produto, mas o perfil cromatográfico é

diferente daquele observado para o plasma, com o material se distribuindo ao longo da tira de ITLC-SG-Alb, e no fronte os valores atingem 46,6 %, 51,3 % e 55,2 %, após períodos de 1, 3 e 6 horas de incubação (figura 34B).

A mudança no perfil cromatográfico do complexo é compatível com a marcação das proteínas do plasma e da albumina, uma vez que no sistema ITLC-SG-Alb/EtOH:NH₄OH:H₂O (2:1:5) essas biomoléculas devem migrar para o fronte⁷⁴.

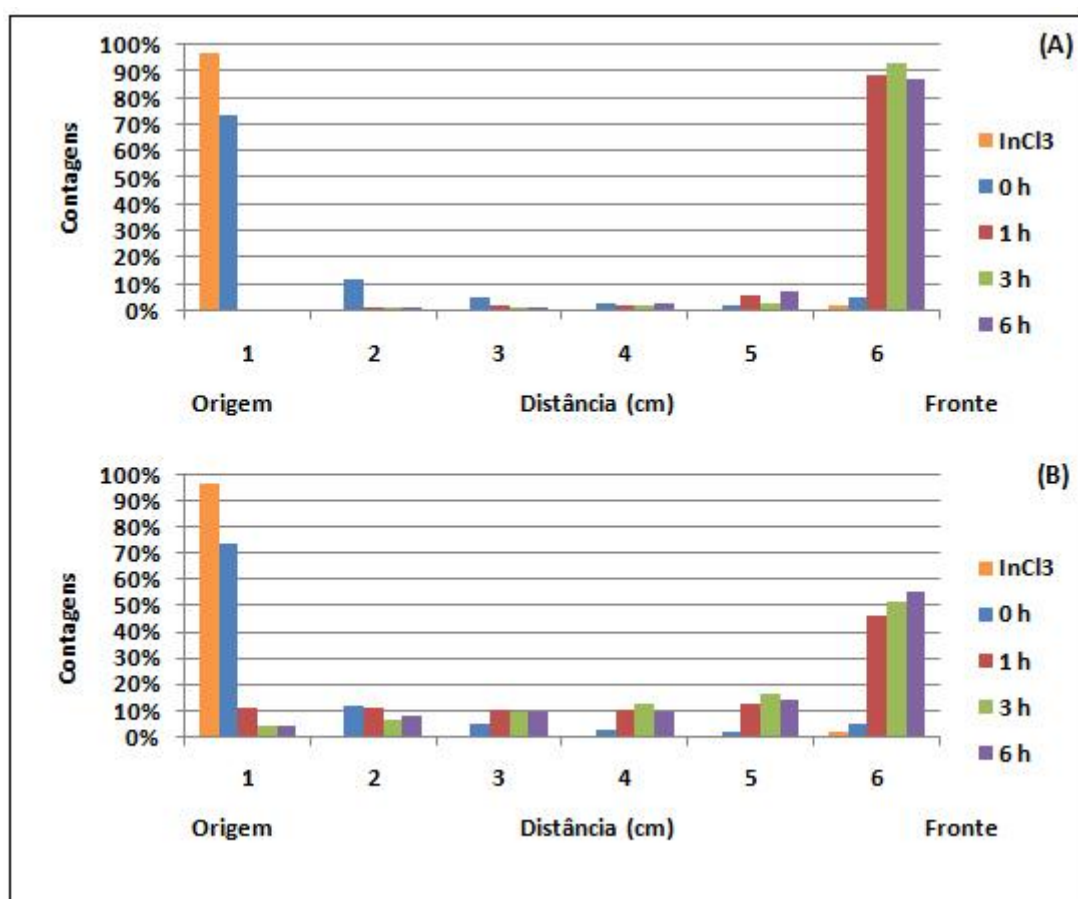


Figura 34. Cromatografia planar do complexo [¹¹¹In-bdct] não incubada (t= 0 h) e incubado em: **(A)** plasma humano e **(B)** solução de soro albumina humana a 0,2 %, por 1, 3 e 6 horas, e ¹¹¹InCl₃ em ITLC-SG-Alb/EtOH:NH₄OH:H₂O (2:1:5).

4.7 Estabilidade *in vitro* do complexo [^{67}Ga -bdtc] na presença de L-cisteína, L-histidina, plasma humano e soro albumina humana

Na avaliação da estabilidade do complexo [^{67}Ga -bdtc] na presença de L-cisteína foi demonstrado que o complexo também é instável, com a pureza radioquímica de diminuindo de 85,3 %, no tempo 0, para 81,8 % após 1 hora, 75,3 % após 3 horas e para 70,4 % no período de 6 horas de incubação, ou seja, um aumento de apenas 14,9 % na formação de outras espécies radioquímicas após 6 horas (figura 35A). No caso da L-histidina (figura 35B), a pureza radioquímica se manteve estável durante os 3 pontos de análise, com valores de 85,3 %, no tempo 0, e 85,3 %, 84,2 % e 85,2 %, nos tempos seguintes.

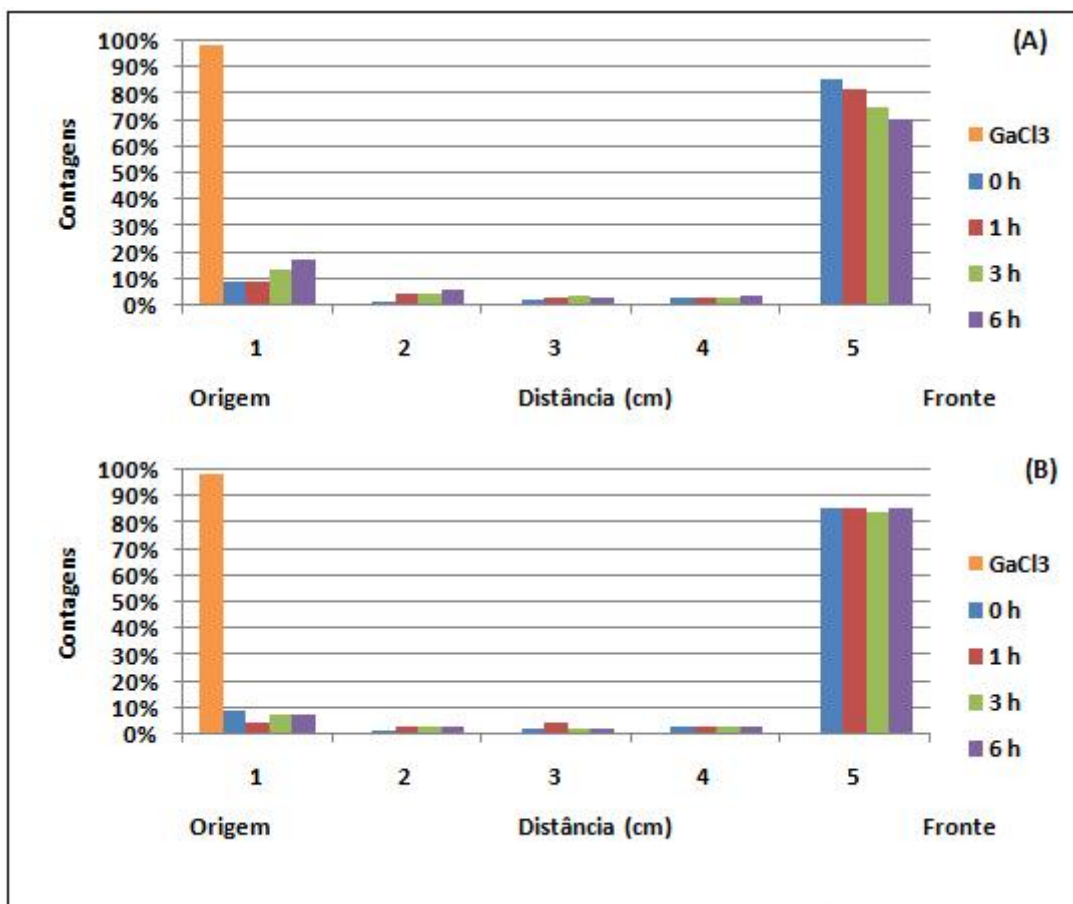


Figura 35. Cromatografia planar do: **(A)** $^{67}\text{GaCl}_3$ e complexo $[\text{}^{67}\text{Ga-bdtdc}]$ em papel Whatman 3 MM/AcN:H₂O (75:25) nos tempos 0, 1, 3 e 6 horas incubado em L-cisteína; **(B)** $^{67}\text{GaCl}_3$ e complexo $[\text{}^{67}\text{Ga-bdtdc}]$ em papel Whatman 3 MM/AcN:H₂O (75:25) nos tempos 0, 1, 3 e 6 horas incubado em L-histidina.

O complexo também teve a estabilidade avaliada na presença de plasma humano e soro albumina humana.

Utilizando o sistema cromatográfico ITLC-SG-Alb/EtOH:NH₄OH:H₂O (2:1:5), foi determinado que tanto o $^{67}\text{GaCl}_3$ como o complexo $[\text{}^{67}\text{Ga-bdtdc}]$ permanecem na origem do sistema, mas o complexo teve parte do material movendo-se nos seguimento iniciais da fita, esse efeito é pronunciado quando o complexo é incubado com plasma, onde a radioatividade atinge o fronte

(figura 36A). Na presença da albumina, o produto de degradação apresentou uma corrida pelo tira do papel bem definida, com aproximadamente 85 % da radioatividade no fronte, a partir de 3 horas de incubação (figura 36B)

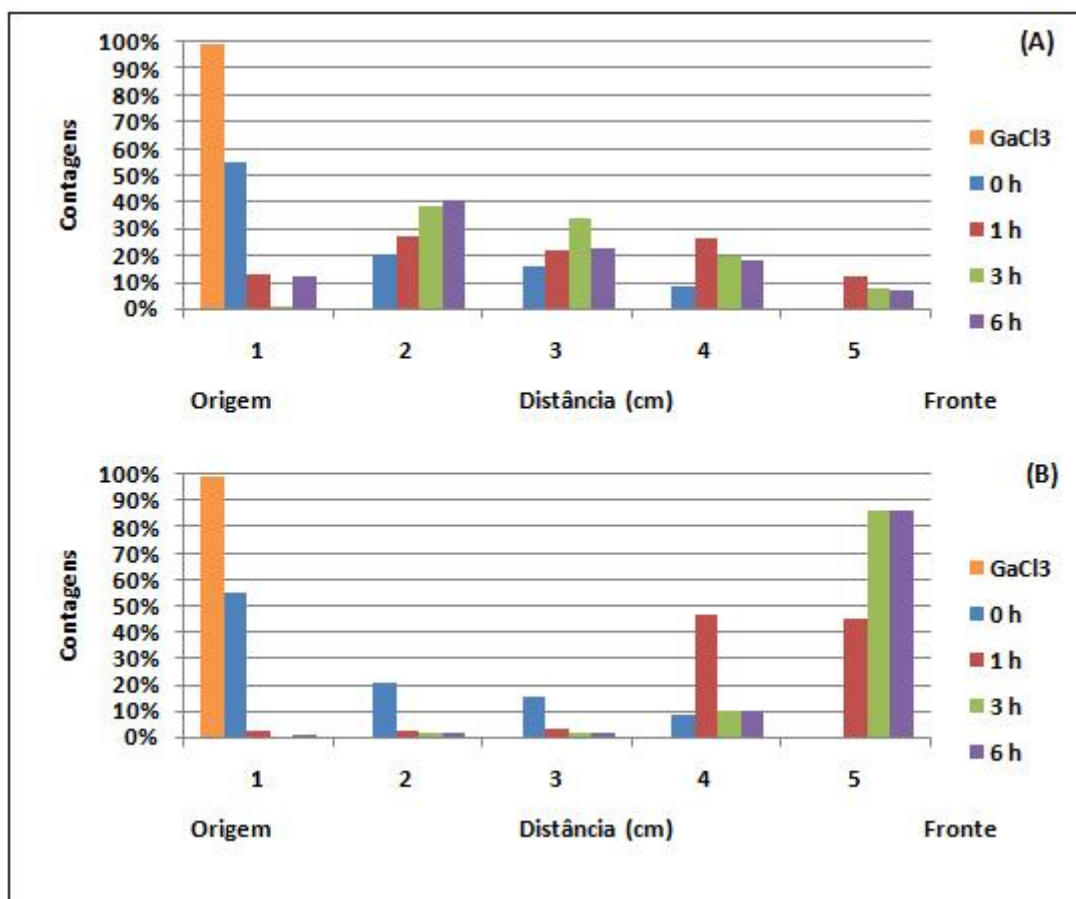


Figura 36. Cromatografia planar do complexo [⁶⁷Ga-bdte] não incubada (t= 0 h) e incubado em: **(A)** plasma humano e **(B)** solução de soro albumina humana a 0,2 %, por 1, 3 e 6 horas, e ⁶⁷GaCl₃ em ITLC-SG-Alb/EtOH:NH₄OH:H₂O (2:1:5).

Embora gálio e índio apresentem características químicas semelhantes, os complexos formados, apresentaram resultados diferentes, sendo o

complexo [^{111}In -bdtc] menos estável, na presença de L-cisteína e L-histidina, que seu homólogo [^{67}Ga -bdtc].

4.8 Ensaios de captação e eliminação celular dos compostos radioativos marcados

4.8.1 Ensaios de captação dos radiofármacos

A fim de avaliar o potencial de utilização do complexo como agente de detecção de tumores, ensaios de captação da molécula foram realizados em cultura de células de melanoma murino B16F10 e TM1M.

Para o complexo [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]-bdtc] a taxa de captação (figura 37A) nas células TM1M foram de $1,83 \pm 0,39 \%$, $0,83 \pm 0,22 \%$ e $0,65 \pm 0,17 \%$, respectivamente para os tempos de 15, 60 e 120 minutos, resultado estatisticamente diferente ($P < 0,05$) entre o tempo de 15 min e os outros dois tempos. Para as células B16F10 (figura 37B), para os mesmos intervalos de tempo, foram obtidos os valores: $1,48 \pm 0,36 \%$, $0,45 \pm 0,19 \%$ e $0,5 \pm 0,14 \%$, implicando em diferença ($P < 0,05$) entre o valor do tempo de 15 minutos e os outros dois tempos de análise. Quando comparamos as diferentes linhagens celulares, para o mesmo intervalo de tempo, não encontramos diferença estatística entre os resultados de captação.

Para o composto [$^{99\text{m}}\text{Tc}$](bdtc)(Hbdtc)], o percentual de captação nas células TM1M foram, nos tempos de 15, 60 e 120 minutos, respectivamente, $1,03 \pm 0,13\%$, $0,75 \pm 0,06\%$ e $0,7 \pm 0,08\%$, mostrando valores muito próximos

estatisticamente do composto $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$. Para células B16F10, seguindo o mesmo intervalo de tempo, os resultados foram: $0,85 \pm 0,24 \%$, $0,7 \pm 0,22 \%$, $0,63 \pm 0,05 \%$. Comparando as linhagens celulares e tempo de incubação, o composto $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$ teve captação levemente maior em TM1M e B16F10 nos primeiros 15 minutos quando comparado ao composto $[[^{99m}\text{Tc}](\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$.

A mudança do metal no complexo não alterou a captação do composto em relação ao observado para os radiofármacos de $[^{99m}\text{Tc}]$ tecnécio.

Houve inversão nos resultados de maior captação a qual foi observada nos primeiros 15 minutos nas linhagens TM1M e B16F10 em comparação com os dois metais. A captação em TM1M no composto $[^{111}\text{In}\text{-bdtc}]$ foi de $2,73 \pm 0,72 \%$, $1,88 \pm 0,75 \%$ e $1,03 \pm 0,13 \%$ e em B16F10 foi de $1,50 \pm 0,08 \%$, $1,08 \pm 0,13 \%$ e $0,78 \pm 0,22 \%$ nos tempos 15, 60 e 120 minutos, respectivamente. Para o complexo $[^{67}\text{Ga}\text{-bdtc}]$, os resultados foram $1,7 \pm 0,29 \%$, $1,6 \pm 0,24 \%$, $1,3 \pm 0,18 \%$ em TM1M e $0,8 \pm 0,05 \%$, $0,9 \pm 0,22 \%$, $1,1 \pm 0,52 \%$ em B16F10 nos tempos 15, 60 e 120 minutos respectivamente.

Nos primeiros 15 minutos de captação os valores encontrados no composto $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$, assemelham-se com os de $[^{67}\text{Ga}\text{-bdtc}]$ em células TM1M e com $[^{111}\text{In}\text{-bdtc}]$ em B16F10.

O composto $[[^{67}\text{Ga}]\text{-bdtc}]$ foi o único que manteve constância de captação acima de 1 % nos 3 tempos de incubação.

Como não se conhece o mecanismo específico de captação, o teste de captação celular foi baseado em análise do equilíbrio entre o material na célula e o material existente no meio de cultura, permitindo assim que as células captassem o radiofármaco e após substituição do meio de cultura por outro

isento de radiofármaco, fosse possível observar através da contagem radioativa dos componentes, o quanto desse radiofármaco foi incorporado às células.

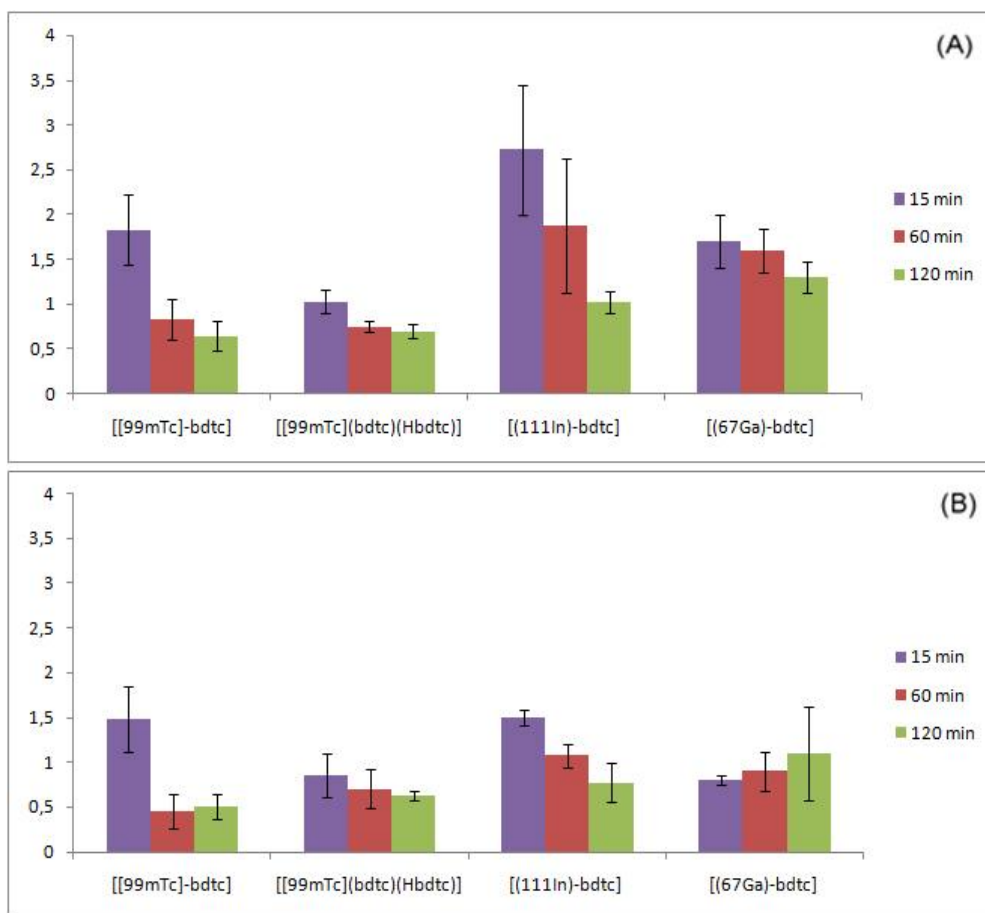


Figura 37. Taxa de captação dos radiofármacos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$, $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$, $[[^{111}\text{In}]\text{-bdtc}]$ e $[[^{67}\text{Ga}]\text{-bdtc}]$, em função do tempo, em células: (A) TM1M e (B) B16F10 (n=4).

4.8.2 Ensaio de eliminação dos radiofármacos

Nos experimentos avaliando a captação dos radiofármacos em células tumorais, *in vitro*, foi observado que os compostos apresentaram uma captação inicial (15 min) elevada e depois diminuíram continuamente nos tempos seguintes ou se mantiveram estáveis (figura 37). Para entender um pouco mais o fenômeno, as células foram incubadas na presença dos radiofármacos e depois de 120 min, o meio de cultura foi substituído, para eliminar o radiofármaco em solução que pudesse estar estabelecendo um equilíbrio dentro/fora das células.

Os resultados (figura 38) mostraram que na ausência dos radiofármacos no meio de cultura ocorreu uma intensa eliminação do complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$, no tempo de 15 min, restando apenas $32,8 \pm 17,9\%$ da captação inicial nas células TM1M, e esses valores foram baixando para $27,7 \pm 16,2\%$ e $20,2 \pm 1,9\%$, respectivamente nos tempos de 60 e 120 minutos. O mesmo comportamento foi observado para as células B16F10, com valores correspondentes a: $18,4 \pm 10,6\%$, $15,2 \pm 9,9\%$ e $9,2 \pm 5,0\%$, respectivamente para os tempos de 15, 60 e 120 min.

Para o composto $[[^{99m}\text{Tc}](\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$, apenas 45% da captação inicial permaneceu nas células TM1M, após 15 de incubação, e esses valores foram baixando para $25 \pm 2,4\%$ e $19 \pm 2,7\%$, respectivamente nos tempos de 60 e 120 minutos. O mesmo comportamento foi observado para as células B16F10, com valores correspondentes a: 42%, $25 \pm 6\%$ e $20 \pm 4,2\%$, respectivamente para os tempos de 15, 60 e 120 min.

Deste modo, comparando os dois complexos de [^{99m}Tc], fica claro a maior residência da espécie $[[^{99m}\text{Tc}](\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$ nas células tumorais, mas é importante lembrar que esse fração de permanência está associada a uma captação inicial de 0,6 % do complexo $[[^{99m}\text{Tc}]-\text{bdtc}]$ e 0,7 % do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$.

Os complexos $[^{111}\text{In}-\text{bdtc}]$ e $[^{67}\text{Ga}-\text{bdtc}]$ mostraram semelhança no comportamento no que tange a concentração nos intervalos de tempo e nas linhagens celulares.

O composto $[^{111}\text{In}-\text{bdtc}]$ manteve 63 % em TM1M e 57 % em B16F10 nos primeiros 15 minutos após 120 minutos de captação, e esses valores foram diminuindo para $44,1 \pm 3,3$ % $30,6 \pm 3,1$ % em TM1M e 39 ± 4 % e 22 ± 4 % em B16F10 após 60 e 120 minutos respectivamente. Perfil parecido foi observado em $[^{67}\text{Ga}-\text{bdtc}]$, cujos valores mostraram que 68 % do composto se manteve em TM1M e 63 % em B16F10 nos primeiros 15 minutos de eliminação seguidos de 120 minutos de captação, diminuindo para 44 ± 3 % e 29 ± 4 % em TM1M e 39 ± 3 % e 24 ± 3 % nos tempos de 60 e 120 minutos respectivamente.

Os ensaios de eliminação com os quatro compostos analisados mostraram diferenças entre metais, sendo que os compostos complexados com (^{67}Ga)gálio e (^{111}In)índio reteram maior quantidade de material nas linhagens celulares de melanoma murino que os compostos complexados com [^{99m}Tc]tecnécio, os quais tiveram mais de 50 % do radiofármaco eliminado nos primeiros 15 minutos.

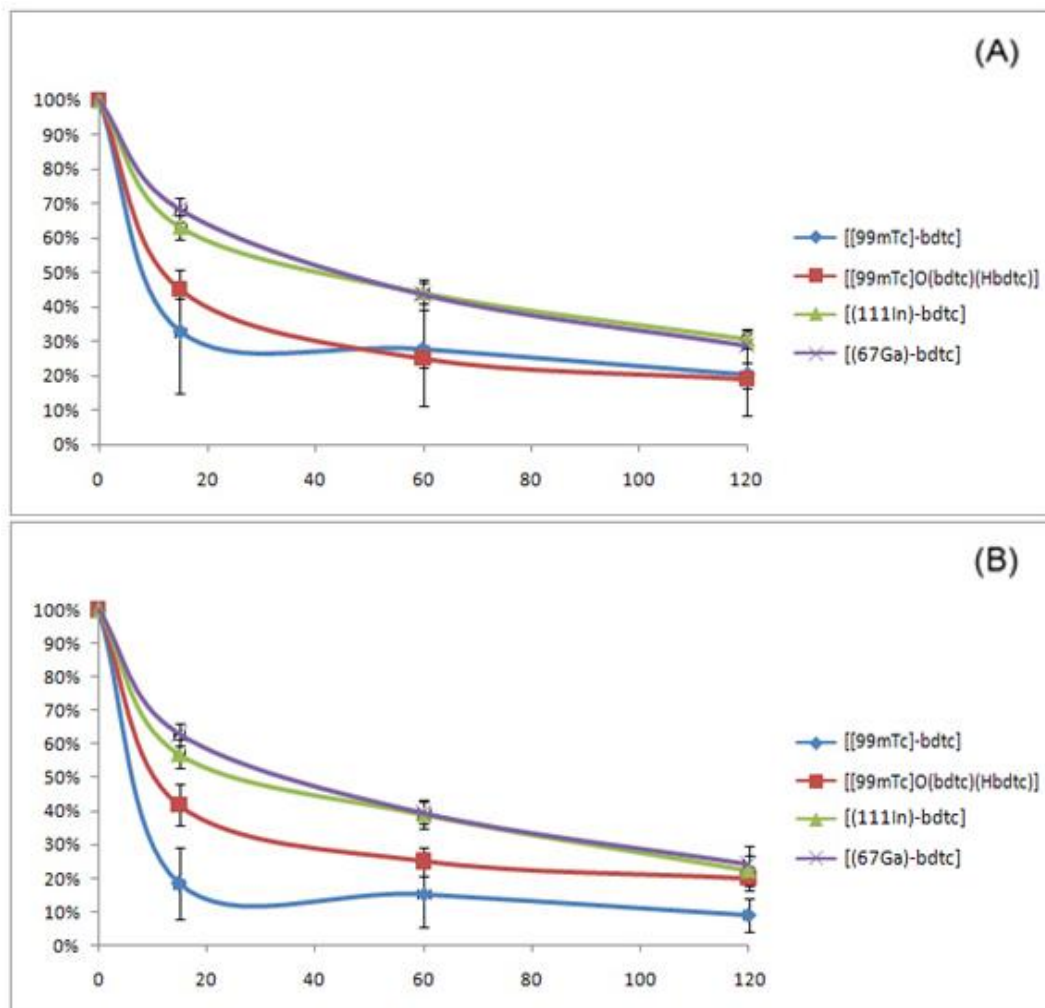


Figura 38. Taxa de eliminação dos radiofármacos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$, $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$, $[[^{111}\text{In}]\text{-bdtc}]$ e $[[^{67}\text{Ga}]\text{-bdtc}]$, após incubação inicial de 120 min, em função do tempo, em células: (A) TM1M e (B) B16F10.

4.9 Biodistribuição *ex vivo*

4.9.1 Ensaios de biodistribuição *ex vivo* dos complexos de tecnécio em animal sadio

Antes de avaliar os complexos de [^{99m}Tc]tecnécio em animais com implante de células tumorais, foram realizados estudos de biodistribuição em animais sadios. O complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$, mostrou intensa captação hepática (figura 39), em torno de 90 % nos primeiros 15 e 60 minutos, caindo para 60 % após 2 horas (tabela 9). Também foi observado captação no baço, que em porcentagem da dose por órgão, manteve índice de aproximadamente 7 % nos três tempos do estudo.

Não foram observadas captações na glândula tireóide e estômago, órgãos captantes de $[\text{Tc}]\text{O}_4^-$, e que pudessem indicar alguma degradação e reoxidação do [^{99m}Tc]tecnécio descomplexado e reduzido.

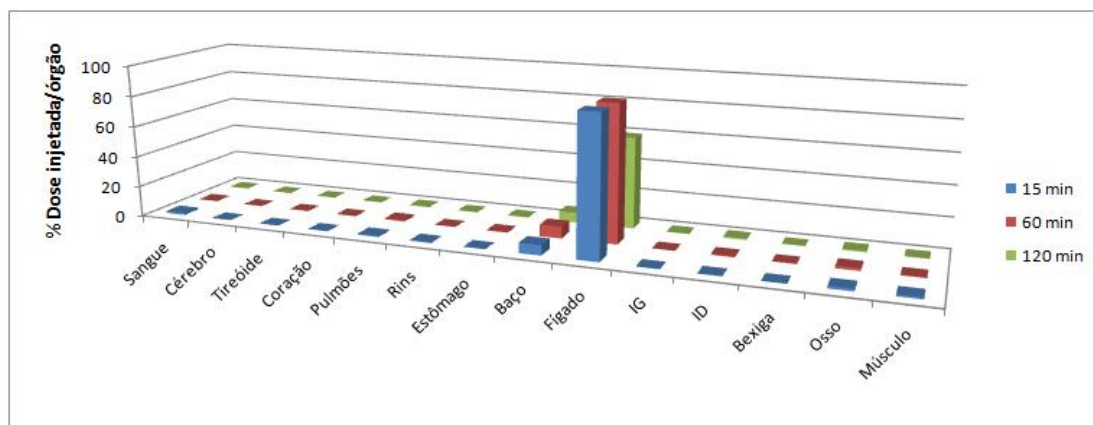


Figura 39. Biodistribuição ex vivo do $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$, em animais sadios (n=2-3), expressa em % da dose injetada/órgão (% DI).

Tabela 9. Biodistribuição ex vivo do $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$ em animais sadios (n=2-3), expressa em % de dose injetada/órgão (% DI).

Órgãos	15 min	60 min	120 min
Sangue	1,28 ± 1,31	0,28 ± 0,03	0,25 ± 0,05
Cérebro	0,03	0,01 ± 0,01	0
Tireóide	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0	0,01 ± 0,01
Coração	0,03	0,02 ± 0,01	0,01
Pulmões	0,83 ± 0,29	0,88 ± 0,23	0,42 ± 0,07
Rins	0,46 ± 0,08	0,13 ± 0,05	0,13 ± 0,02
Estômago	0,14 ± 0,07	0,37 ± 0,12	0,29 ± 0,06
Baço	6,56 ± 0,76	7,64 ± 0,66	6,56 ± 1,58
Fígado	89,47 ± 1,1	88,06 ± 1,7	59,22 ± 5,11
Intestino grosso	0,06 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,3 ± 0,04
Intestino delgado	0,11 ± 0,02	0,61 ± 0,16	0,94 ± 0,12
Bexiga	0,02 ± 0,01	0,12 ± 0,03	0,05 ± 0,06
Osso	1,49 ± 1,3	1,66 ± 1,28	0,9 ± 0,78
Músculo	1,12 ± 1,42	0,5 ± 0,21	0,33 ± 0,17

Quando a porcentagem de dose captada pelos órgãos foi corrigida para a massa em gramas, observamos que o principal órgão de captura é o baço,

com valores próximos a 80 %, enquanto a captação no fígado foi de aproximadamente 35 %, e os pulmões o equivalente a 3 %.

O composto $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$ apresentou perfil semelhante ao composto $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$, com a diferença de se manter constante na captação hepática nos três tempos analisados, ao redor de 80 %, enquanto a captação no baço foi de aproximadamente 10 % (tabela 10).

É sabido que fígado e baço são órgãos de depuração sanguínea e poderia estar havendo a quebra do complexo radioativo e o metal sendo sequestrado com mimético do ferro ou ainda, e principalmente no baço, o complexo estar sendo armazenado como uma reserva de ferro, mimetizando a bilirrubina.

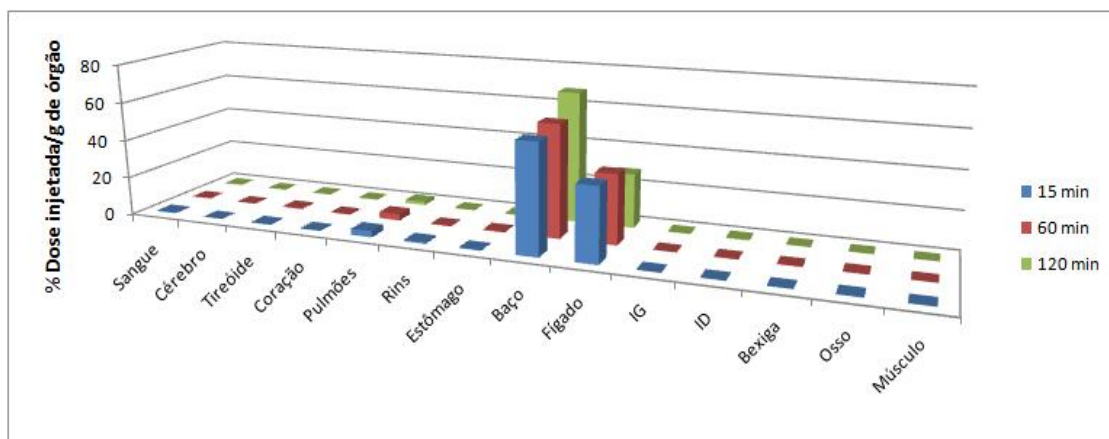


Figura 40. Biodistribuição ex vivo do $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$, em animais sadios (n=2-3), expressa % da dose injetada/g de órgão (% DI/g) (n=3-4).

Tabela 10. Biodistribuição ex vivo do $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$ em animais sadios (n=2-3), expressa em % de dose injetada/g órgão (% DI/g) (n=3-4).

Órgãos	15 min	60 min	120 min
Sangue	0,39 ± 0,41	0,08	0,08 ± 0,03
Cérebro	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01
Tireóide	0,25 ± 0,16	0,52 ± 0,19	0,17 ± 0,15
Coração	0,18 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,03
Pulmões	3,23 ± 1,02	3,33 ± 0,8	1,75 ± 0,18
Rins	0,82 ± 0,17	0,22 ± 0,07	0,24 ± 0,03
Estômago	0,29 ± 0,04	0,46 ± 0,10	0,38 ± 0,12
Baço	56,22 ± 3,75	58,28 ± 3,04	68,09 ± 8,87
Fígado	37,99 ± 4,12	35,94 ± 3,7	28,21 ± 8,65
Intestino grosso	0,04 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,21 ± 0,06
Intestino delgado	0,05 ± 0,01	0,27 ± 0,05	0,42 ± 0,11
Bexiga	0,03 ± 0,01	0,28 ± 0,04	0,18 ± 0,16
Osso	0,33 ± 0,29	0,34 ± 0,27	0,12 ± 0,1
Músculo	0,06 ± 0,08	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,01

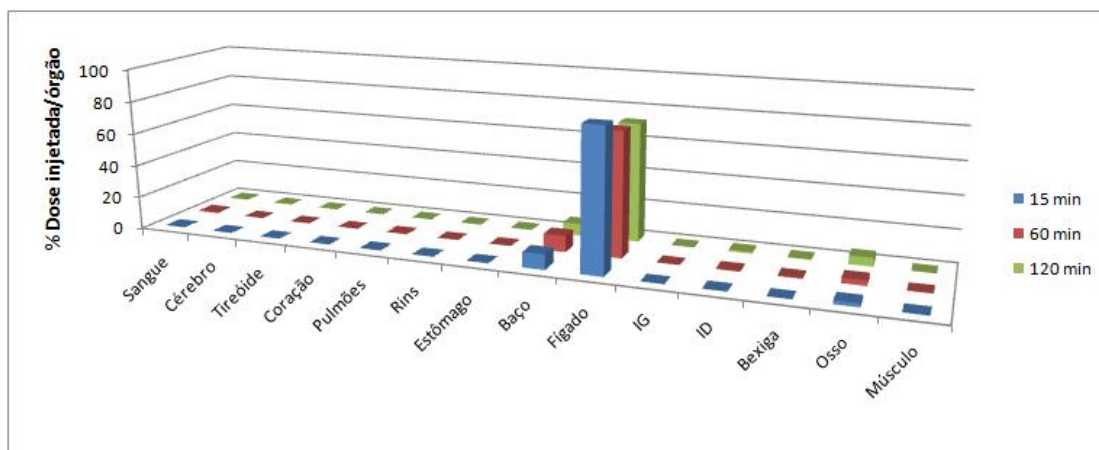


Figura 41. Biodistribuição ex vivo do $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$, em animais sadios ($n=2\text{-}3$), expresso em % da dose injetada/órgão (% DI) ($n=3\text{-}4$).

Tabela 4. Biodistribuição ex vivo do $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$ em animais sadios ($n=2\text{-}3$), expressa em % de dose injetada/órgão (% DI) ($n=3\text{-}4$).

Órgãos	15 min	60 min	120 min
Sangue	0,25 ± 0,03	0,66 ± 0,89	0,30 ± 0,1
Cérebro	0,04 ± 0,05	0	0
Tireóide	0,01 ± 0	0	0,01 ± 0
Coração	0,02 ± 0,01	0,02	0,03 ± 0,04
Pulmões	0,26 ± 0,14	0,25 ± 0,13	0,15 ± 0,11
Rins	0,12 ± 0,02	0,13 ± 0,03	0,14 ± 0,05
Estômago	0,07 ± 0,02	0,21 ± 0,07	0,39 ± 0,11
Baço	9,22 ± 2,15	9,90 ± 4,24	7,19 ± 2,42
Fígado	85,41 ± 6,81	75,22 ± 16,64	72,38 ± 21,51
Intestino grosso	0,02 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,19 ± 0,09
Intestino delgado	0,17 ± 0,07	0,57 ± 0,15	1,12 ± 0,22
Bexiga	0,05 ± 0,06	0,47 ± 0,30	0,56 ± 0,23
Osso	2,19 ± 1,58	3,20 ± 2,89	5,25 ± 6,58
Músculo	0,18 ± 0,23	0,18 ± 0,13	0,22 ± 0,17

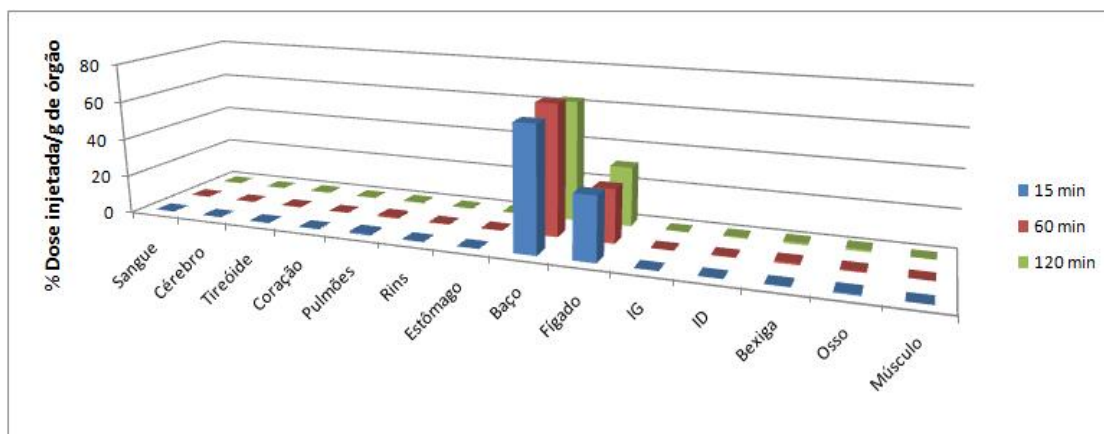


Figura 42. Biodistribuição *ex vivo* do [^{99m}Tc]-bdtc], em animais sadios (n=2-3), expresso em % de dose injetada/ g órgão (% DI/g) (n=3-4).

Tabela 5. Biodistribuição *ex vivo* do [^{99m}Tc]-bdtc], em animais sadios (n=2-3), expressa em % de dose injetada/grama de órgão (% DI/g) (n=3-4).

Órgãos	15 min	60 min	120 min
Sangue	0,07 ± 0,01	0,14 ± 0,13	0,1 ± 0,05
Cérebro	0,05 ± 0,06	0,01 ± 0,01	0
Tireóide	0,21 ± 0,12	0,17 ± 0,16	0,4 ± 0,12
Coração	0,10 ± 0,07	0,08 ± 0,03	0,27 ± 0,39
Pulmões	0,94 ± 0,53	0,92 ± 0,98	0,5 ± 0,23
Rins	0,18 ± 0,03	0,19 ± 0,09	0,24 ± 0,06
Estômago	0,1 ± 0,03	0,22 ± 0,07	0,62 ± 0,31
Baço	64,27 ± 3,73	67,87 ± 9,85	63,01 ± 10,99
Fígado	32,87 ± 3,02	27,77 ± 7,37	31,02 ± 10,9
Intestino grosso	0,01 ± 0,01	0,05 ± 0,04	0,15 ± 0,1
Intestino delgado	0,08 ± 0,04	0,24 ± 0,07	0,61 ± 0,09
Bexiga	0,25 ± 0,16	1,05 ± 0,62	1,12 ± 0,61
Osso	0,71 ± 0,33	0,7 ± 0,19	1,16 ± 0,82
Músculo	0,01 ± 0,01	0,01	0,02 ± 0,01

4.9.2 Ensaio de biodistribuição *ex vivo* dos radiofármacos em animais com tumores de células B16F10 e TM1M

Os resultados dos testes de captação do radiofármacos *in vitro* demonstraram que, embora baixa, os complexos se concentraram na células tumorais e nos ensaios de biodistribuição *in vivo*, em camundongos saudáveis, foi possível constatar a intensa captação das moléculas em fígado e baço.

Se por um lado, esses resultados separadamente não são animadores, a associação dos mesmos pode ser interessante, pois a intensa captação hepática concomitante com baixa captação nos outros órgãos, tecidos e fluídos, poderia permitir a detecção de tumores (fora da região do fígado) mesmo em baixas taxas de captação.

Nos novos experimentos de biodistribuição, ambas as linhagens tumorais (B16F10 e TM1M) foram inoculadas em lados opostos dorso dos camundongos para avaliação pareada.

Quando considerado a % DI, a captação hepática se manteve em torno de 80 % com o composto $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$ (tabela 13) e ao redor de 60 % para o $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$ (tabela 15) nos três tempos analisados, com exceção de uma baixa captação no baço, para o composto $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$ todos os outros dados de biodistribuição são comparáveis àqueles obtidos nos animais saudáveis.

Quando os resultados são corrigidos para o peso dos órgãos (% DI/g), o que se observada é uma intensa captação dos compostos no baço, o equivalente a aproximadamente 60 % para o complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$ (tabela 14) e de 50 % para o complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$ (tabela 16).

Do ponto de vista específico dos tumores, a linhagem B16F10 apresentou captação de $0,88 \% \pm 0,38 \%$, $0,33 \% \pm 0,21 \%$ e $0,52 \% \pm 0,17 \%$, para os tempos de 15, 60 e 120 minutos, respectivamente, resultados de 2 a 4 vezes maior que aquela observada para a linhagem TM1M, $0,21 \% \pm 0,16 \%$, $0,21 \% \pm 0,11 \%$ e $0,25 \% \pm 0,12 \%$, para os mesmos tempos, na comparação por % dose injetada/órgão (tabela 12). Quando é aplicada a correção % dose injetada/g órgão (tabela 13), a razão diminui para 1 a 2 vezes.

Para o complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$ não se observa diferença significativa na captação entre as duas linhagens tumorais, tanto na relação % dose injetada/órgão (tabela 15) quanto por grama de órgão (tabela 16). A taxa é muito baixa, a tal ponto que não se pode garantir a captação do radiofármaco ou se apenas representa a perfusão sanguínea intensa existente nos tumores.

Esses resultados corroboram todos os experimentos de estabilidade e ensaios *in vitro*, mostrando a diferença nas estruturas dos complexos.

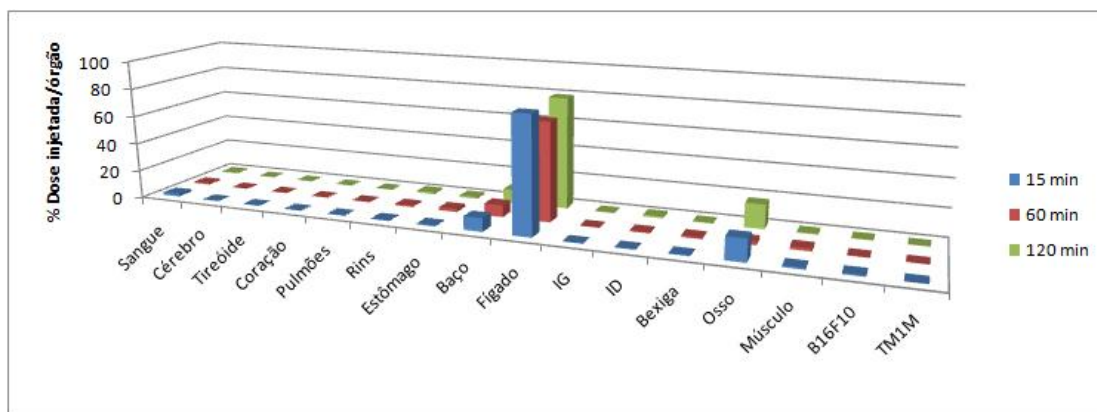


Figura 43. Biodistribuição *ex vivo* do $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdte})(\text{Hbdte})]$ em animais com tumores B16F10 e TM1M ($n=2-3$), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por órgão (% DI)

Tabela 13. Biodistribuição *ex vivo* do $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdte})(\text{Hbdte})]$ em animais com tumores B16F10 e TM1M ($n=2-3$), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por órgão (% DI).

Órgãos	15 min	60 min	120 min
Sangue	1,91 ± 0,73	0,96 ± 0,40	0,65 ± 0,10
Cérebro	0,02 ± 0,01	0,01	0,01 ± 0,01
Tireóide	0,01	0,02	0,02
Coração	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,01 ± 0,01
Pulmões	0,19 ± 0,02	0,29 ± 0,15	0,12 ± 0,04
Rins	0,52 ± 0,08	1,10 ± 1,09	1,48 ± 1,45
Estômago	0,62 ± 0,75	2,19 ± 2,01	1,34 ± 0,37
Baço	9,42 ± 2,02	8,37 ± 2	9,47 ± 2,02
Fígado	81,95 ± 3,07	69,66 ± 14,27	78,98 ± 3,31
Intestino grosso	0,11 ± 0,03	0,19 ± 0,06	0,47 ± 0,23
Intestino delgado	0,33 ± 0,07	0,69 ± 0,09	1,35 ± 0,22
Bexiga	0,49 ± 0,39	1,20 ± 1,11	0,55 ± 0,10
Osso	15,52 ± 22,92	2,42 ± 2,13	17,05 ± 27,96
Músculo	1,17 ± 0,12	1,91 ± 2,54	0,76 ± 0,7
B16F10	0,88 ± 0,38	0,33 ± 0,21	0,52 ± 0,17
TM1M	0,21 ± 0,16	0,21 ± 0,11	0,25 ± 0,12

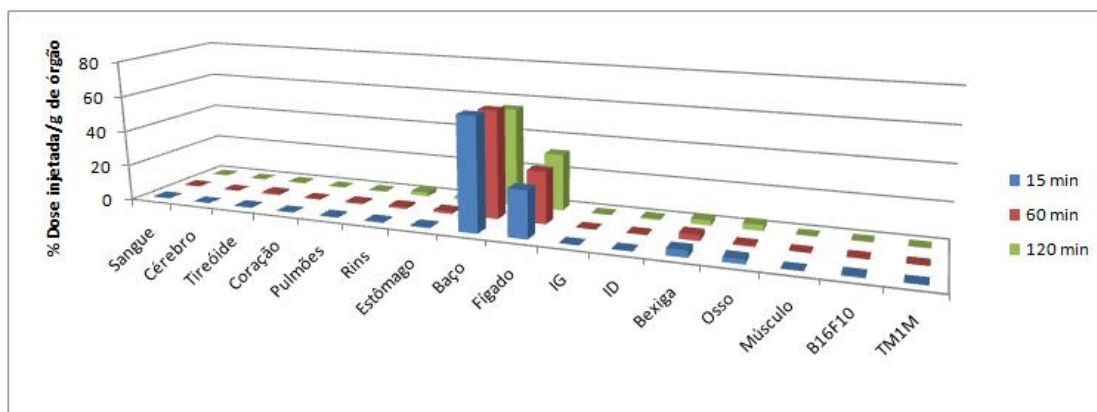


Figura 44. Biodistribuição ex vivo do $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$ em animais com tumores B16F10 e TM1M ($n=2-3$), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por grama de órgão (% DI/g).

Tabela 14. Biodistribuição ex vivo do $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$ em animais com tumores B16F10 e TM1M ($n=2-3$), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por grama de órgão (% DI/g).

Órgãos	15 min	60 min	120 min
Sangue	0,41 ± 0,15	0,30 ± 0,11	0,17 ± 0,04
Cérebro	0,02 ± 0,01	0,01	0,02 ± 0,01
Tireóide	0,51 ± 0,15	1,08 ± 0,46	0,45 ± 0,24
Coração	0,21 ± 0,05	0,2 ± 0,09	0,06 ± 0,04
Pulmões	0,54 ± 0,19	0,82 ± 0,52	0,48 ± 0,24
Rins	0,6 ± 0,04	1,3 ± 1,04	2,15 ± 0,25
Estômago	0,7 ± 0,73	1,42 ± 0,94	1,42 ± 0,01
Baço	62,83 ± 3,09	60,11 ± 6,74	55,46 ± 2,9
Fígado	26,34 ± 4,53	29,07 ± 4,95	31,91 ± 2,73
Intestino grosso	0,07	0,1 ± 0,03	0,24 ± 0,02
Intestino delgado	0,14 ± 0,04	0,32 ± 0,08	0,74 ± 0,1
Bexiga	3,83 ± 3,49	3,34 ± 2,31	2,9 ± 0,2
Osso	2,58 ± 3,9	0,71 ± 0,36	3,26 ± 0,16
Músculo	0,05 ± 0,01	0,12 ± 0,15	0,04 ± 0,01
B16F10	0,71 ± 0,73	0,31 ± 0,09	0,25 ± 0,05
TM1M	0,32 ± 0,19	0,22 ± 0,05	0,20 ± 0,06

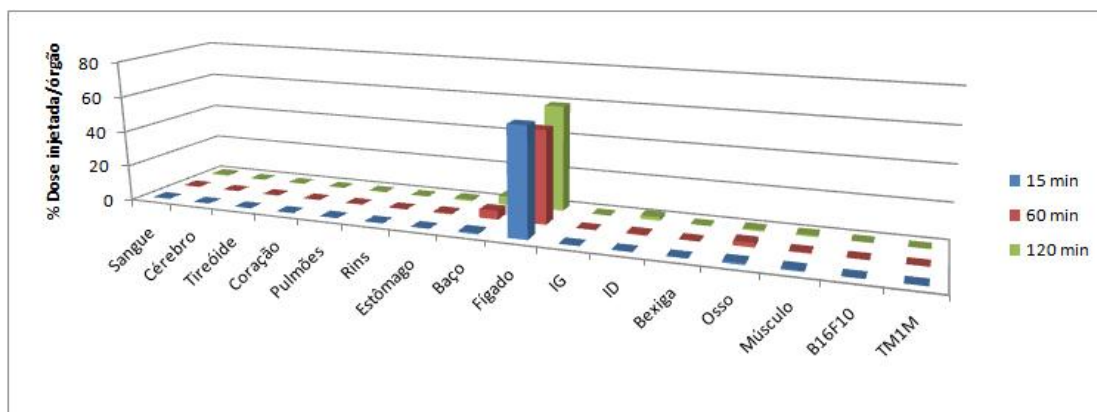


Figura 45. Biodistribuição ex vivo do $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$ em animais com tumores B16F10 e TM1M ($n=2-3$), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por órgão (% DI).

Tabela 15. Biodistribuição ex vivo do $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$ em animais com tumores B16F10 e TM1M ($n=2-3$), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por órgão (% DI).

Órgãos	15 min	60 min	120 min
Sangue	0,20 ± 0,04	0,23 ± 0,04	0,7 ± 0,09
Cérebro	0	0	0
Tireóide	0	0	0,01
Coração	0,02	0,01	0,02
Pulmões	0,19 ± 0,11	0,1 ± 0,11	0,18 ± 0,1
Rins	0,21 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,21 ± 0,06
Estômago	0,04 ± 0,02	0,65 ± 0,02	0,95 ± 0,17
Baço	0,87 ± 0,16	4,85 ± 0,16	4,91 ± 1
Fígado	60,07 ± 15,2	51,91 ± 15,2	59,1 ± 2,44
Intestino grosso	0,02	0,03	0,04 ± 0,05
Intestino delgado	0,04 ± 0,02	0,63 ± 0,02	1,93 ± 0,13
Bexiga	0,01	0,08	0,01 ± 0,02
Osso	1,03 ± 1,01	2,48 ± 1,01	0,81 ± 0,25
Músculo	0,68 ± 0,21	0,45 ± 0,21	0,86 ± 0,51
B16F10	0,03 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,17
TM1M	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,02

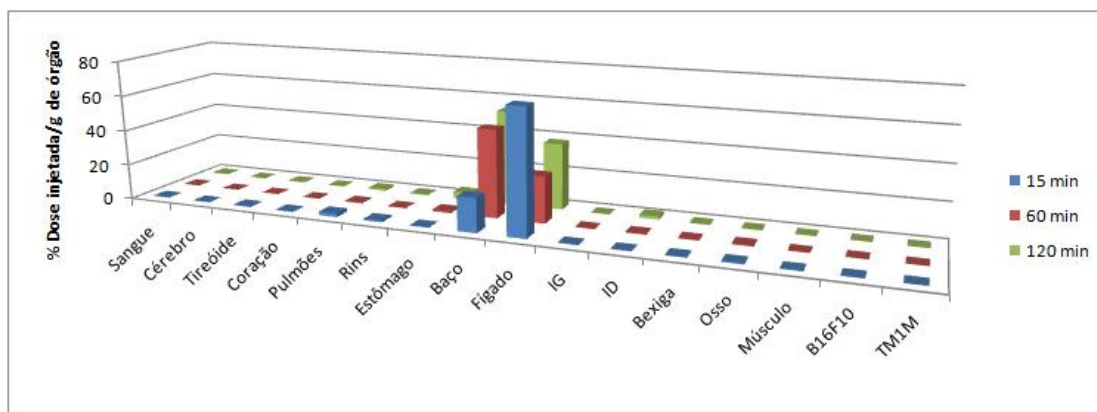


Figura 46. Biodistribuição ex vivo do $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$ em animais com tumores B16F10 e TM1M (n=2-3), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por grama de órgão (% DI/g).

Tabela 16. Biodistribuição ex vivo do $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$ em animais) com tumores B16F10 e TM1M (n=2-3), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por grama de órgão (% DI/g).

Órgãos	15 min	60 min	120 min
Sangue	0,18 ± 0,07	0,08 ± 0,01	0,32 ± 0,02
Cérebro	0,02	0	0,01
Tireóide	0,44 ± 0,19	0,11 ± 0,02	0,22 ± 0,01
Coração	0,27 ± 0,16	0,08 ± 0,01	0,19 ± 0,02
Pulmões	1,98 ± 0,27	0,59 ± 0,03	1,03 ± 0,36
Rins	1 ± 0,58	0,29 ± 0,15	0,5 ± 0,04
Estômago	0,3 ± 0,26	1,17 ± 0,72	4,01 ± 1,46
Baço	19,24 ± 10,85	49,56 ± 26,36	53,63 ± 7,11
Fígado	69,64 ± 22,37	26,16 ± 1,41	37,59 ± 6,21
Intestino grosso	0,04 ± 0,03	0,03	0,05 ± 0,07
Intestino delgado	0,06 ± 0,01	0,42 ± 0,02	1,73 ± 0,11
Bexiga	0,26 ± 0,04	0,28 ± 0,21	0,2 ± 0,28
Osso	0,51 ± 0,3	0,63 ± 0,62	0,25 ± 0,03
Músculo	0,11 ± 0,03	0,03 ± 0,01	0,07 ± 0,03
B16F10	0,07	0,04 ± 0,01	0,08
TM1M	0,08 ± 0,02	0,03	0,08 ± 0,01

Nos experimentos de biodistribuição *ex vivo* e *in vivo* foi utilizado ^{68}Ga .

Diferentemente do que foi observado para os complexos de [$^{99\text{m}}\text{Tc}$], onde basicamente foram observadas captação hepática e esplênica, os complexos de [^{68}Ga -bdtc] e [^{111}In -bdtc], apresentaram comportamento mais heterogêneo, a começar pela concentração plasmática. Nos complexos de [$^{99\text{m}}\text{Tc}$] a concentração dos complexos no sangue foram menores que 1 % já nos primeiros 15 minutos, no complexo [^{111}In -bdtc] o valor diminui de $15,53 \pm 1,08$ %, aos 15 minutos até $9,39 \pm 3,83$ % aos 120 minutos (tabela 18) e para o complexo [^{67}Ga -bdtc] a concentração inicia em $22,34 \pm 2,85$ %, aos 15 minutos, e decai a $12,54 \pm 7,24$ %, aos 120 minutos (tabela 20), sempre considerando a % DI/g. Fígado e baço acumulam menos complexos quando comparado ao [$^{99\text{m}}\text{Tc}$] e os rins passam a apresentar trânsito ou acúmulo, por exemplo, para o complexo de ^{111}In a concentração aos 15 minutos é de $24,47 \pm 2,95$ % caindo para $16,49 \pm 6,05$ % aos 120 minutos, enquanto que para o ^{68}Ga o valor passa de $7,63 \pm 1,07$ % para $14,6 \pm 3,77$ %, para o mesmo intervalo de tempo.

Com relação aos tumores, as taxas de captação são maiores que aquelas observadas para os complexos de [$^{99\text{m}}\text{Tc}$], mas aqui há de se considerar que a quantidade de sangue circulante com os complexos de ^{111}In e ^{68}Ga é relativamente grande e o que se pode estar medindo é o sangue contido nos tumores.

Na tabela 21 é possível comparar a relação tumor/sangue (% DI/g) dos dois complexos e nos diferentes tempos. Observa-se um lento aumento na razão entre as contagens, mas os valores permanecem muito baixo, quando comparado com outros radiofármacos usualmente utilizados para detecção de

tumores, como o ^{18}F FDG ($4,12 \pm 0,62 \%$), (^{11}C)metionina ($1,26 \pm 0,26 \%$) e [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]-MIBI ($4,49 \pm 1,31 \%$) entre outros⁷⁶.

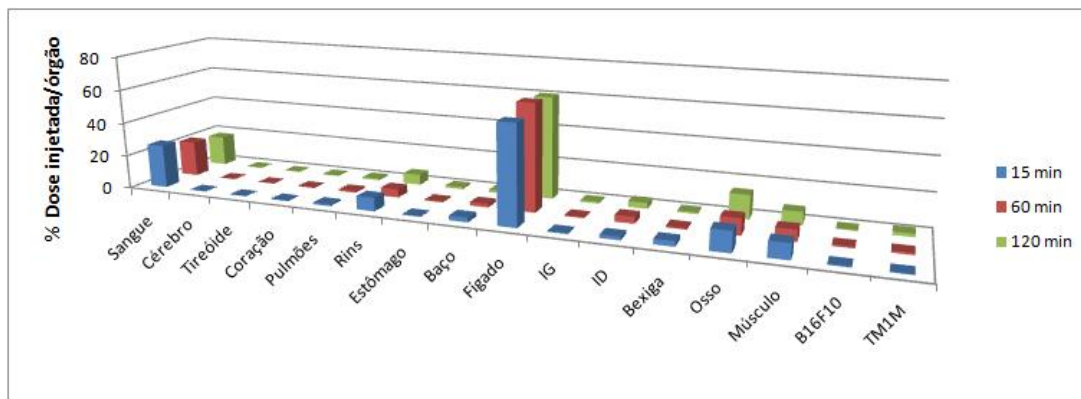


Figura 47. Biodistribuição ex vivo do $[^{111}\text{In-bdct}]$ em animais com tumores B16F10 e TM1M ($n=2-3$), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por órgão (% DI).

Tabela 6. Biodistribuição ex vivo do $[^{111}\text{In-bdct}]$ em animais com tumores B16F10 e TM1M ($n=2-3$), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por órgão (% DI).

Órgãos	15 min	60 min	120 min
Sangue	25,74 ± 0,81	21,13 ± 3,63	17,91 ± 5
Cérebro	0,1 ± 0,09	0,09	0,09 ± 0,03
Tireóide	0,07 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,06 ± 0,03
Coração	0,35	0,33 ± 0,09	0,36 ± 0,11
Pulmões	1,12 ± 0,08	1,06 ± 0,47	1,04 ± 0,26
Rins	7,92 ± 1,35	4,97 ± 0,56	6,20 ± 1,33
Estômago	0,37 ± 0,05	0,68 ± 0,3	1,23 ± 1,22
Baço	2,67 ± 0,26	2,13 ± 0,22	1,6 ± 0,61
Fígado	57,81 ± 6,73	62,79 ± 1,33	60,43 ± 4,48
Intestino grosso	0,6 ± 0,03	0,64 ± 0,1	1,02 ± 0,2
Intestino delgado	1,97 ± 0,46	3,92 ± 0,73	3,41 ± 0,73
Bexiga	3,01 ± 3,83	0,98 ± 0,68	1,07 ± 0,64
Osso	11,9 ± 0,69	9,59 ± 0,44	14,11 ± 3,15
Músculo	8,94 ± 1,62	6,68 ± 0,18	7,54 ± 2,07
B16F10	0,68 ± 0,52	0,90 ± 0,46	0,58 ± 0,35
TM1M	0,48 ± 0,04	1,11 ± 0,65	1,89 ± 1,18

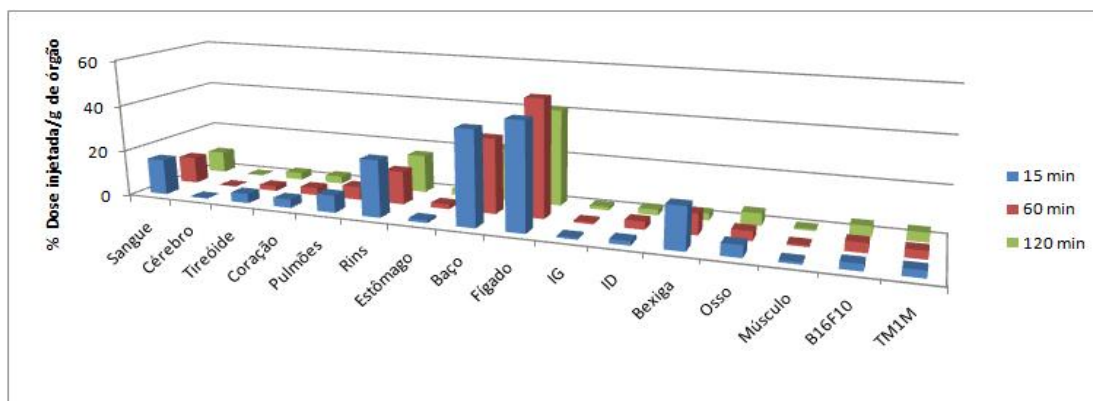


Figura 48. Biodistribuição ex vivo do $[^{111}\text{In-bdte}]$ em animais com tumores B16F10 e TM1M ($n=2-3$), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por grama de órgão (% DI/g).

Tabela 20. Biodistribuição ex vivo do $[^{111}\text{In-bdte}]$ em animais com tumores B16F10 e TM1M ($n=2-3$), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por grama de órgão (% DI/g).

Órgãos	15 min	60 min	120 min
Sangue	15,53 ± 1,08	11,57 ± 1,75	9,39 ± 3,83
Cérebro	0,28 ± 0,07	0,23 ± 0,01	0,22 ± 0,11
Tireóide	4,11 ± 0,27	2,12 ± 0,38	3,01 ± 1,11
Coração	3,74 ± 0,13	3,22 ± 0,66	3,2 ± 1,25
Pulmões	7,44 ± 0,2	5,74 ± 0,09	4,99 ± 1,52
Rins	24,47 ± 2,95	14,48 ± 0,96	16,49 ± 6,05
Estômago	1,18 ± 0,08	2,02 ± 0,67	2,68 ± 2,17
Baço	40,64 ± 3,12	32,23 ± 8,06	22,97 ± 10,42
Fígado	45,76 ± 2,85	50,43 ± 0,57	41,49 ± 10,45
Intestino grosso	0,72 ± 0,13	0,87 ± 0,08	1,39 ± 0,74
Intestino delgado	1,78 ± 0,39	3,38 ± 0,59	2,41 ± 0,62
Bexiga	17,84 ± 20,25	8,95 ± 2,73	2,87 ± 0,54
Osso	5,03 ± 0,48	4,05 ± 0,04	5,12 ± 1,78
Músculo	0,99 ± 0,14	0,75 ± 0,01	0,73 ± 0,29
B16F10	2,85 ± 0,06	4,12 ± 0,28	4,35 ± 1,22
TM1M	2,99 ± 0,33	3,43 ± 0,33	4 ± 1,26

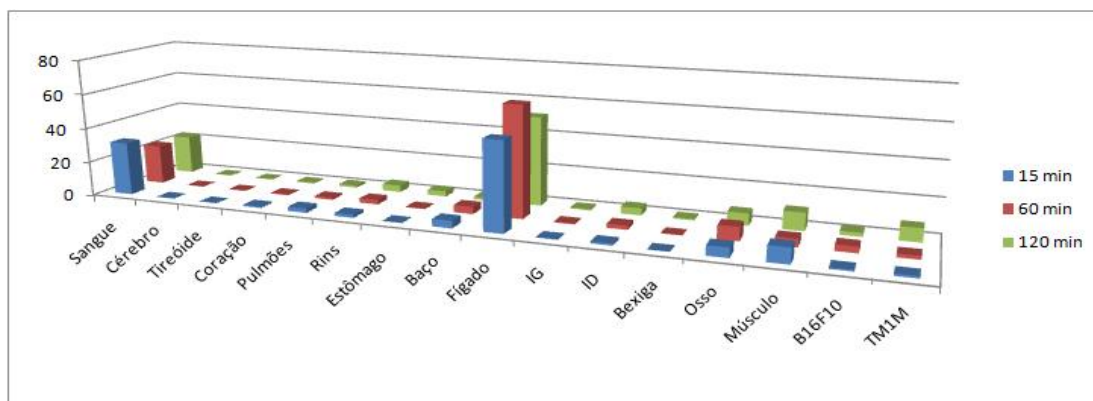


Figura 49. Biodistribuição ex vivo do $[^{68}\text{Ga-bdctc}]$ em animais com tumores B16F10 e TM1M ($n=2-3$, $*=1$), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por órgão (% DI).

Tabela 7. Biodistribuição ex vivo do $[^{68}\text{Ga-bdctc}]$ em animais com tumores B16F10 e TM1M ($n=2-3$, $*=1$), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por órgão (% DI).

Órgãos	15 min	60 min*	120 min
Sangue	30,88 ± 11,73	22,81	22,51 ± 2,53
Cérebro	0,14 ± 0,05	0,11	0,16 ± 0,03
Tireóide	0,05	0,04	0,1 ± 0,01
Coração	0,83 ± 0,23	0,49	0,55 ± 0,1
Pulmões	2,49 ± 0,97	1,21	1,25 ± 0,15
Rins	1,83 ± 0,56	2,66	3,93 ± 1,46
Estômago	0,24 ± 0,02	0,46	3,05 ± 0,03
Baço	4,19 ± 2,03	4,21	1,52 ± 0,96
Fígado	50,69 ± 16,87	63,91	51,42 ± 20,72
Intestino grosso	0,25 ± 0,05	0,47	0,72 ± 0,16
Intestino delgado	1,15 ± 0,4	2,38	4,06 ± 0,6
Bexiga	0,09 ± 0,04	0,07	0,83 ± 0,78
Osso	5,56 ± 1,04	7,74	6,89 ± 3,75
Músculo	8,81 ± 6,48	4,45	10,27 ± 3,64
B16F10	0,87 ± 0,11	3,56	2,22 ± 0,17
TM1M	1,2 ± 0,82	2,04	7,77 ± 6,68

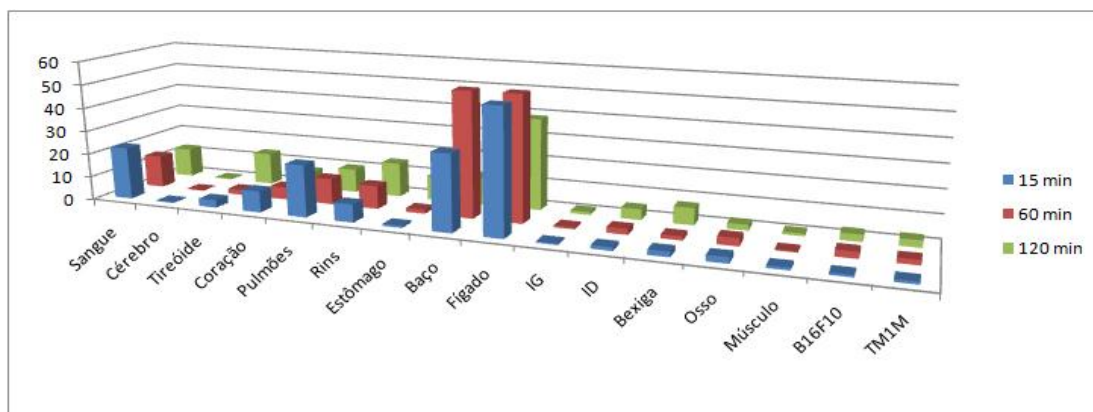


Figura 50. Biodistribuição ex vivo do $[^{68}\text{Ga-bdct}]$ em animais com tumores B16F10 e TM1M ($n=2-3$, $^*=1$), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por grama de órgão (% DI/g).

Tabela 8. Biodistribuição ex vivo do $[^{68}\text{Ga-bdct}]$ em animais com tumores B16F10 e TM1M ($n=2-3$, $^*=1$), no tempos de 15, 60 e 120 minutos expressa em % da dose injetada por grama de órgão (% DI/g).

Órgãos	15 min	60 min*	120 min
Sangue	22,34 ± 2,85	13,86	12,54 ± 7,24
Cérebro	0,43 ± 0,04	0,29	0,43 ± 0,4
Tireóide	3,21 ± 1,15	2,21	13,68 ± 16,64
Coração	9,08 ± 0,34	5,3	7,2 ± 5,69
Pulmões	22,10 ± 2,58	10,97	10,1 ± 1,29
Rins	7,63 ± 1,07	9,86	14,6 ± 3,77
Estômago	0,87 ± 0,05	1,67	10,27 ± 13,71
Baço	32,17 ± 19,03	52,97	11,54 ± 5,32
Fígado	52,36 ± 6,2	53,06	38,79 ± 11,51
Intestino grosso	0,60 ± 0,07	0,84	1,23 ± 0,80
Intestino delgado	1,44 ± 0,25	2,43	4,52 ± 3,74
Bexiga	2,15 ± 1,58	1,71	7,15 ± 1,77
Osso	2,51 ± 0,97	3,29	2,41 ± 1,99
Músculo	1,08 ± 0,97	0,5	1,05 ± 0,6
B16F10	0,92 ± 0,02	2,74	2,93 ± 0,89
TM1M	1,09 ± 1,07	2,09	2,96 ± 0,90

Tabela 9. Relação tumor/sangue (% ID/g) dos complexos [^{111}In -bdtc] e [^{68}Ga -bdtc] para as linhagens de melanoma murino B16F10 e TM1M

	15 min	60 min	120 min
	[^{111}In -bdtc]		
B16F10	0,18 ± 0,02	0,34 ± 0,02	0,49 ± 0,13
TM1M	0,19 ± 0,01	0,25 ± 0,06	0,44 ± 0,06
	[^{68}Ga -bdtc]		
B16F10	0,04 ± 0,01	0,2	0,26 ± 0,08
TM1M	0,05 ± 0,04	0,15	0,26 ± 0,08

5.1 Biodistribuição *in vivo*

5.1.1 Ensaio de biodistribuição *in vivo* [[$^{99\text{m}}\text{Tc}$]O(bdte)(Hbdte)] e [[$^{99\text{m}}\text{Tc}$]O(bdte)] em animal sadio

As imagens de SPECT/CT de animais sadios demonstraram aquilo que se havia observado no estudo de biodistribuição *ex vivo*, que é uma concentração elevada na região do fígado e baço, com quase nenhuma captação em outras regiões do corpo (figuras 51 e 52), conforme dados obtidos nos experimentos *ex vivo*.

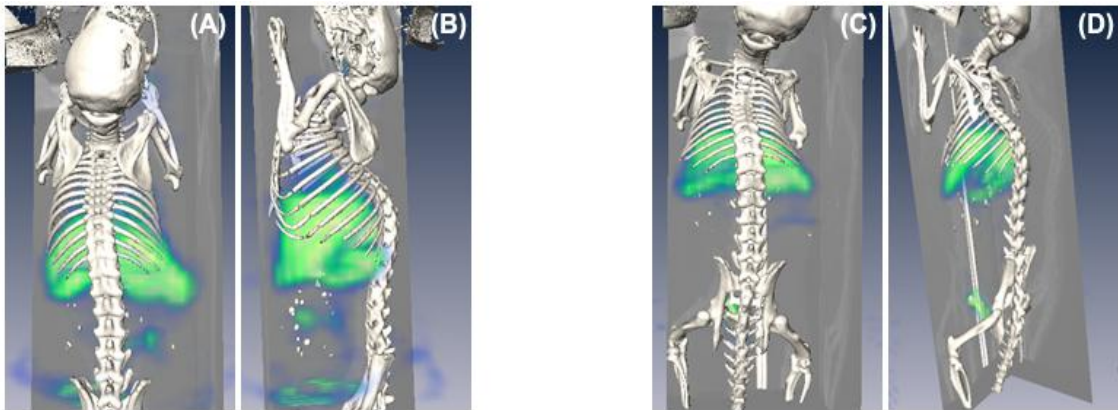


Figura 51. Imagens tomográficas SPECT/CT após: (A); (B) 1 hora e (C); (D) 2 horas da injeção do composto $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$

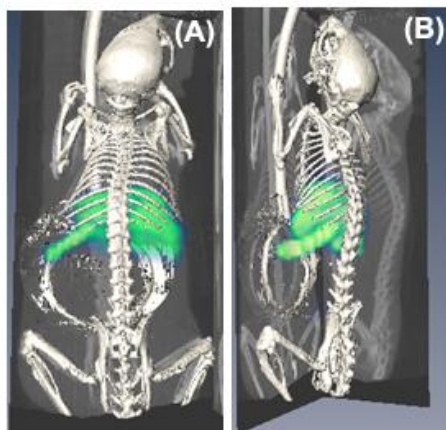


Figura 52. Imagem SPECT/CT após 1 hora da injeção do composto $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$

5.1.2 Ensaios de biodistribuição *in vivo* [^{99m}Tc]O(bdtc)(Hbdtc)] em animal com tumor

Na imagem obtida com o animal inoculado com duas linhagens tumorais obtivemos um resultado interessante. As imagens da figura 53 mostram claramente alguns pontos de captação sobre o tumor TM1M, localizado no dorso superior esquerdo [E] do animal, enquanto não se observa captação no lado direito [D], onde foram inoculadas células B16F10. Também é possível observar alguma captação na região torácica e da coluna superior do animal.

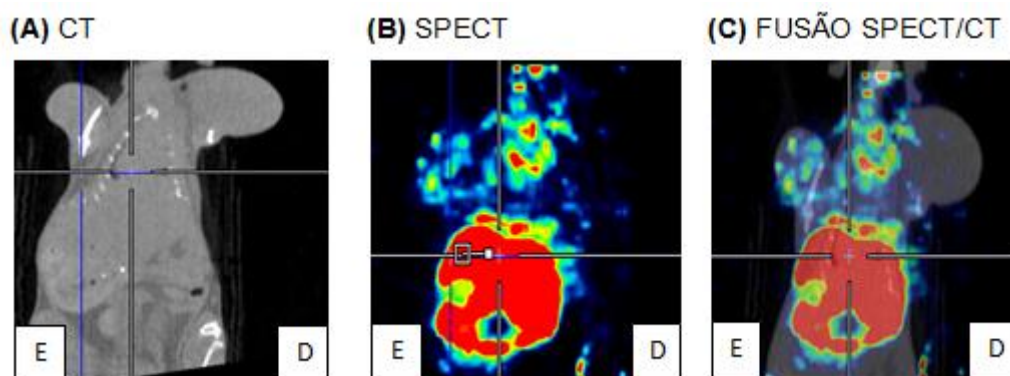


Figura 53. Imagem planar de camundongo C57/Bl6 com implante de células TM1M lado esquerdo e B16F10 lado direito: (A) por tomografia computadorizada (CT); (B) por SPECT 2 horas após administração do [^{99m}Tc]O(bdtc)(Hbdtc)]; (C) fusão de imagens CT e SPECT.

5.1.3 Ensaios de biodistribuição *in vivo* [^{68}Ga -bdtc] em animal com tumor.

Os ensaios de captação *in vivo* do [^{68}Ga -bdtc], mostraram através das imagens realizadas em PET/CT, intensa captação hepática e na bexiga; captação difusa no tumor de células B16F10 [D] e captação nula no tumor de células TM1M [E] (figura 54), corroborando o dado da biodistribuição *ex vivo*, associando a captação tumoral à alta taxa do radiofármaco no sangue.

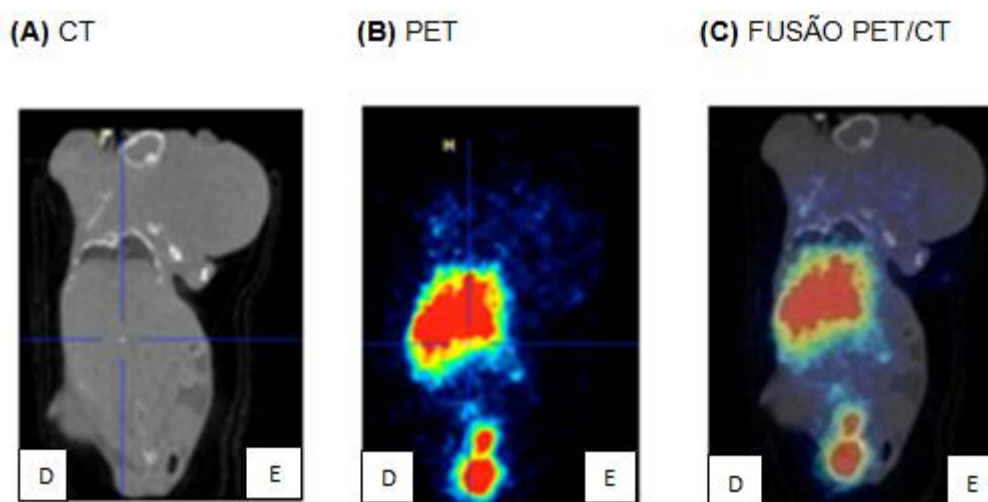


Figura 54. (A) (CT) do animal com tumor TM1M lado esquerdo e B16F10 lado direito. (B) PET do animal com tumor TM1M lado esquerdo e B16F10 lado direito. (C) PET/CT do animal com tumor TM1M lado esquerdo e B16F10 lado direito

As imagens com o complexo [$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -bdtc] e [^{111}In -bdtc] não apresentaram qualidade suficiente para serem apresentadas.

6 CONCLUSÕES

Na preparação dos complexos de [^{99m}Tc]tecnécio pudemos observar a complexidade das reações que envolvem o metal, o qual possui múltiplos estados de oxidação e número de coordenação, com um ligante multidentado contendo oxigênio, nitrogênio e enxofre, o efeito que pH, temperatura e volume de agente tamponante levava na formação de diferentes compostos. Todavia foi possível obter dois produtos, o $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{bdtc})(\text{Hbdtc})]$ e o $[[^{99m}\text{Tc}]\text{-bdtc}]$, com alta pureza radioquímica.

Os dois complexos de [^{99m}Tc]tecnécio mostraram-se estáveis na presença de L-cisteína e L-histidina, mas reagiram na presença de proteínas plasmáticas e albumina, mas esse processo precisa ser melhor avaliado.

A preparação dos complexos [$^{67}\text{Ga}\text{-bdtc}$] e [$^{111}\text{In}\text{-bdtc}$] foi mais simples, gerando apenas um produto para cada um dos metais. Ensaio de estabilidade mostraram que o composto [$^{111}\text{In}\text{-bdtc}$] não é estável na presença de L-cisteína nos tempos de incubação analisados, perfil diferente observado na presença de L-histidina, em que o composto não sofre desestruturação expressiva. Quando o composto é incubado em plasma humano, é possível verificar a ligação do complexo com as proteínas plasmáticas e soro albumina humana. O complexo [$^{67}\text{Ga}\text{-bdtc}$] mostra-se mais estável tanto na presença de L-cisteína e L-histidina, mas reage também com plasma humano e albumina humana, de modo semelhante ao observado para o complexo [$^{111}\text{In}\text{-bdtc}$].

A captação dos complexos de [^{99m}Tc]tecnécio foi baixa em cultura de células TM1M e B16F10, e os resultados sugerem que pode haver um processo de saturação de receptores ou metabolização dos compostos, uma

vez que, no decorrer do tempo, ao invés de haver uma aumento na captação, observamos a diminuição dos compostos ligados às células.

Os estudos de biodistribuição dos complexos de [^{99m}Tc]tecnécio em animais, apresentaram como resultado uma alta e persistente captação no fígado e baço, acima de 90 %.

A captação nos tumores foi extremamente baixa, menor que 1 % para os complexos de [^{99m}Tc] e em torno de 2 % para os complexos de ^{68}Ga e ^{111}In , mas quando se estabelece a relação tumor/sangue o valor fica entre 0,2 e 0,4 %, não indicado para estudos de imagem.

7 PRÓXIMAS ETAPAS

As próximas etapas para este projeto serão:

- 1- Avaliar o efeito fisiológico que leva a alta concentração no fígado e baço, dos complexos preparados.
- 2- Preparar novos complexos a partir de derivados de tiossemicarbazonas mais hidrofílicos e avaliar a biodistribuição e aplicações na detecção de tumores e diferenciação entre processos inflamatórios/infecciosos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Astruc Didier. *Organometallic chemistry and catalysis*. New York: Springer; 2007.
2. Wong E, Giandomenico CM. Current Status of Platinum-Based Antitumor *Drugs*. *Chem Rev* (Washington) 1999, 99(9):2451-2466.
3. Gasser G. et al. Organometallic anticancer compounds. *J Med Chem* 2011, 54:3–25.
4. Ratchanok P. et al. Synthesis, Cytotoxic and Antimalarial Activities of Benzoyl Thiosemicarbazone Analogs of Isoquinoline and Related Compounds. *Molecules*. 2010, 15(2): 988-996.
5. Glisoni R. J et al. Antiviral activity against the hepatitis C virus (HCV) of 1-indanone thiosemicarbazones and their inclusion complexes with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Eur J Pharm Sci*. 2012, 47(3):596-603.
6. Reis C. D; Despaigne R. A. A; Silva G. J; Silva F. N; Structural Studies and Investigation on the Activity of Imidazole-Derived Thiosemicarbazones and Hydrazones against Crop-Related Fungi. *Molecules*. 2013, 18:12645-12662.
7. Moreira M. R. D. et al. Conformational restriction of aryl thiosemicarbazones produces potent and selective anti-Trypanosoma cruzi compounds which induce apoptotic parasite death. *Eur J Med Chem*. 2014, 75:467–478.

8. Beckford A. F. Organometallic Ruthenium Complexes of Novel Thiosemicarbazones. *Journal of the Arkansas Academy of Science*. 2006, 60:27-31.
9. Genova P. et al. Toxic effects of bis(thiosemicarbazone) compounds and its palladium(II) complexes on herpes simplex virus growth. *Toxicol and Appl Pharmacol*. 2004, 197:107-112.
10. Tenório RP, Goes AJS, de Lima JG, de Faria AR, Alves AJ, de Aquino TM. Tiossemicarbazonas: Métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. *Quím Nova* (São Paulo) 2005; 28(6):1030-1037.
11. Beraldo H.; Semicarbazonas e tiossemicarbazonas: O amplo perfil farmacológico e usos clínicos. *Quím. Nova*. (São Paulo) 2004; 27(3):461-471.
12. Finch AR, Liu MC, Grill SP, Rose WC, Loomis R, Vasquez KM, et al. Triapine (3-Aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone): A Potent Inhibitor of Ribonucleotide Reductase Activity with Broad Spectrum Antitumor Activity. *Bioch Pharmacol* (New York) 2000; 59(8):983-991.
13. Bacher F. Enyed EA, Nagy NV, Rockenbauer A, Bognar GM, Troind R, et al. Copper(II) Complexes with Highly Water-Soluble L- and D-Proline-Thiosemicarbazone Conjugates as Potential Inhibitors of Topoisomerase II α . *Inorg Chem* (Waterloo) 2013; 52:8895-8908.
14. Matesanz AI, Perez JM, Navarro P, Morino JM, Colacio E, Souza P. Synthesis and characterization of novel palladium(II) complexes of bis(thiosemicarbazone). Structure, cytotoxic activity and DNA binding of Pd(II)-

benzyl bis(thiosemicarbazone). *J Inorg Biochem* (New York) 1999; 76(1):29-37.

15. Quiroga AG, Perez JM, Lopez-Solera I, Montero EI, Masaguer JR, Alonso C, et al. Binuclear chloro-bridged palladated and platinated complexes derived from p-isopropylbenzaldehyde thiosemicarbazone with cytotoxicity against cisplatin resistant tumor cell lines. *J Inorg Biochem* (New York) 1998a;69(4):275-281.

16. Quiroga AG, Perez JM, Montero EI, Masaguer JR, Alonso C, Navarro-Manninger C. Palladated and platinated complexes derived from phenylacetaldehyde thiosemicarbazone with cytotoxic activity in cis-DDP resistant tumor cells. Formation of DNA interstrand cross-links by these complexes. *J Inorg Biochem.* (New York) 1998b;70(2):117-123.

17. Yu Y, Rahmanto YS, Hawkins CL, Richardson DR. The Potent and Novel Thiosemicarbazone Chelators Di-2-pyridylketone-4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone and 2-Benzoylpyridine-4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone Affect Crucial Thiol Systems Required for Ribonucleotide Reductase Activity. *Mol Pharmacol* (Bethesda,MD) 2011; 79(6):921–931.

18. Gokhale N, Padhye S, Rathbone D, Billington D, Lowe P, Schwalbe C, et al. The crystal structure of first copper(II) complex of a pyridine-2-carboxamidrazone - a potential antitumor agent. *Inorg Chem Comm* (New York) 2001; 4(1):26-29.

19. Changzheng L, Jigui W, Liufang W, Min R, Naiyong J, Jie G. Synthesis, characterization and antitumor activity of copper(II) complex with nicotinamido-

4-bis(2 chloroethyl)aminobenzaldimine. *J Inorg Biochem* (New York) 1999; 73(4):195-202.

20. Silveira V C. Double-strand DNA cleavage induced by oxindole-Schiff base copper(II) complexes with potential antitumor activity. *J Inorg Biochem.* (New York) 2008, 102:1090–1103.

21. Fernandes C, Parrilha GL, Lessa JA, Santiago LJM, Kanashiro MM, Boniolo FS, et al. Synthesis, crystal structure, nuclease and in vitro antitumor activities of a new mononuclear copper(II) complex containing a tripodal N₃O ligand. *Inorg Chim Acta* (Lauasanne) 2006; 359(10):3167–3176.

22. Stanojkovic TP, Kovala-Demertzi D, Primikyri A, Garcia-Santos I, Castineiras A, Juranic A, et al. Zinc(II) complexes of 2-acetyl pyridine 1-(4-fluorophenyl)-piperazinyl thiosemicarbazone: Synthesis, spectroscopic study and crystal structures – Potential anticancer drugs. *J Inorg Biochem* (New York) 2010; 104(4):467-476.

23. Teoh SG, Ang SH, Fun HK, Ong CE. Synthesis, crystal structure and biological activity of thiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone and its tin complexes. *J Organ Chem* (New York) 1999; 580(1):17–21.

24. Kannan S, Sivagamasundari M, Ramesh R, Liu Y. Ruthenium(II) carbonyl complexes of dehydroacetic acid thiosemicarbazone: Synthesis, structure, light emission and biological activity. *J Organ Chem* (Washington) 2008; 693(13):2251–2257.

25. Floyd A. Organometallic ruthenium complexes with thiosemicarbazone ligands: Synthesis, structure and cytotoxicity of [(g6-p-cymene)Ru(NS)Cl]⁺(NS

= 9-anthraldehyde thiosemicarbazones). *Inorg Chem Comm.* (New York) 2009, 12: 1094-1098.

26. Floyd A. Synthesis and characterization of mixed-ligand diimine-piperonal thiosemicarbazone complexes of ruthenium(II): Biophysical investigations and biological evaluation as anticancer and antibacterial agents. *J Mol Struct.* (Amsterdam) 2011, 992: 39-47.

27. Rao VA, Klein SR, Agama KK, Toyoda E, Adachi N, Pommier Y, et al. The Iron Chelator Dp44mT Causes DNA Damage and Selective Inhibition of Topoisomerase II α in Breast Cancer Cells. *Cancer Res* (Philadelphia) 2009; 69(3):948-957.

28. Whitnall M, Howard J, Pnka P, and Richardson DR. A class of iron chelators with a wide spectrum of potent antitumor activity that overcomes resistance to chemotherapeutics. *Proc Natl Acad Sci USA* (Washington). 2006; 103(40): 14901-14906.

29. Nutting CM, van Herpen CML, Miah AB, Bhide SA, Machiels JP, Buter J, et al. Phase II study of 3-AP Triapine in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oncol* (Dordrecht) 2009; 20(7):1275-1279.

30. Oliveira et al. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. *Braz J Pharm Scienc.*(São Paulo) 2006, 42:2.

31. Aaron L. et al. Radiopharmaceutical Agents for Myocardial Perfusion Imaging. *Contemporary Reviews in Cardiovascular Medicine*, (Boston) 2008; 118:1668-1674.

32. Oyebola O. S. et al. New SPECT and PET Radiopharmaceuticals for Imaging Cardiovascular Disease. *BioMed Research International*. (Canada) 2014. ID 942960, 24 pages.
33. Valotassiou V. Radiopharmaceuticals in neurological and psychiatric disorders. *Curr Clin Pharmacol*. (Greece) 2008, 3(2):99-107.
34. Murari SB, Gadepalli T, Rao VP, Ram R. Renal scintigraphy in diagnosis and management of nephroptosis. *Indian Journal of Nuclear Medicine : IJNM : The Official Journal of the Society of Nuclear Medicine*, (India). 2012; 27(1):52-54.
35. "Nuclear Reactions and Nuclear Decay Reactions" disponível em: (http://chemwiki.ucdavis.edu/Core/Physical_Chemistry/Nuclear_Chemistry/Nuclear_Reactions) Acessado em 18 de março de 2015.
36. Montenegro A N. Synthesis, characterization, reactivity and computational studies of new rhenium(I) complexes with thiosemicarbazone ligands derived from 4-(methylthio)benzaldehyde. *Polyhedron* (New York) 2011; 30:2146–2156.
37. "isotopes of gallium", American wikipedia, acessado em 18/03/2015. Disponível em: http://en.wikipedia.org/wiki/Isotopes_of_gallium.
38. Montenegro A. N.; Synthesis and characterization of thiosemicarbazone derivatives of 2-chloro-4-hydroxy-benzaldehyde and their rhenium(I) complexes. *Polyhedron* (New York) 2009; 28:3915–3922.

39. Alazraki N, Fiere J, REsnick D. Chronic Osteomyelitis: Monitoring by ^{99m}Tc Phosphate and ^{67}Ga Citrate Imaging. *Am J Roentgenol* (Leesburg), 1985. 145:767-771.
40. Hoppe T. Richard et al. *Hodgkin lymphoma*, 2^a Ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2007.
41. Iagaru A, Goris ML, Gambhir SS. Perspectives of Molecular Imaging and Radioimmunotherapy in Lymphoma. *Radiol Clin North Am* (Philadelphia) 2008; 46(2):243-252.
42. Hung MY, Hung MJ, Cheng CW. Use of Gallium 67 Scintigraphy to Differentiate Acute Myocarditis from Acute Myocardial Infarction. *Tex Heart Inst J* (Houston) 2007; 34(3):305-9.
43. Joaquim IA, Mendes GEF, Ribeiro PFF, Baptista MAF, Burdmann EA. Ga-67 scintigraphy in the differential diagnosis between acute interstitial nephritis and acute tubular necrosis: an experimental study. *Nephrol Dial Transplant* (Berlin). 2010; 25(10):3277-3282.
44. Decristoforo C. Gallium-68 - A New Opportunity For PET Available From a Long Shelflife Generator - Automation and Applications. *Curr Radiopharm* (Sharjah) 2012; 5(3):212-220.
45. Jensen SB, Nielsen KM, Mewis D, Kaufmann J. Fast and simple one-step preparation of ^{68}Ga citrate for routine clinical PET. *Nucl Med Commun* (London) 2013; 34(8):806-812.

46. Ambrosini V, Campana D, Polverari G, Peterle C, Diodato S, Ricci C, et al. Prognostic Value of Ga-68-DOTANOC PET/CT SUVmax in Patients with Neuroendocrine Tumors of the Pancreas. *J Nucl Med* (Chicago) 2015; 56(12):1843-1848.
47. Chakraborty S, Chakravarty R, Vatsa R, Bhusari P, Sarma HD, Shukla J, et al. Toward realization of 'mix-and-use' approach in ^{68}Ga radiopharmacy: preparation, evaluation and preliminary clinical utilization of ^{68}Ga -labeled NODAGA-coupled RGD peptide derivative. *Nucl Med Biol* (Oxford) 2016; 43:116-123.
48. Berry DJ, Ma Y, Ballinger JR, Tavaré R, Koers A, Sunassee K, et al. Efficient bifunctional gallium-68 chelators for positron emission tomography: tris(hydroxypyridinone) ligands. *Chem Commun* (London) 2011; 47:7068–7070.
49. "isotopes of indium", American wikipedia, acessado em 18/03/2015. Disponível em: http://en.wikipedia.org/wiki/Isotopes_of_indium.
50. Sollini M, Erba PA, Fraternali A, Casali M, Di Paolo ML, Froio A, et al. PET and PET/CT with ^{68}Ga -Labeled Somatostatin Analogues in Non GEP-NETs Tumors. *The Scientific World Journal* (Cairo) 2014; ID: 194123, 19 páginas.
51. Roca M, de Vries EFJ, Jamar F, Israel O, Signore A. Guidelines for the labelling of leucocytes with ^{111}In -oxine. *Eur J Nucl Med Mol Imag* (Berlin) 2010; 37(4):835–41.
52. Martin PKM, Stilhano RS, Samoto VY, Takiya CM, Peres GB, Michelacci YMCS, et al. Mesenchymal Stem Cells Do Not Prevent Antibody Responses

against Human α -L-Iduronidase when Used to Treat Mucopolysaccharidosis Type I. *Plos One* (San Francisco) 2014; 9:e 92420.

53. "isotopes of technetium", American Wikipédia, acessado em 18/03/2015. Disponível em: http://en.wikipedia.org/wiki/Isotopes_of_technetium.

54. Jurisson S, Berning D, Jia W, Ma O. Coordination Compounds in Nuclear Medicine. *Chem Rev* (Washington) 1993; (3)93:1137-1156.

55. Abram U, Alberto R. Technetium and Rhenium - Coordination Chemistry and Nuclear Medical Applications. *J Braz Chem Soc* (São Paulo) 2006; 17:1486-1500.

56. Jürgens S, Herrmann WA, Kuhn FE. Rhenium and technetium based radiopharmaceuticals: Development and recent advances. *J Organomet Chem* (Lausanne) 2014; 751:83-89.

57. Yokoyama A, Terauchi Y, Horiuchi K, Tanaka K, Odori T, Morita R, Mori T, Torizuka K. Technetium-99m-Kethoxal-bis(thiosemicarbazone), an Uncharged Complex with a Tetravalent ^{99m}Tc State, and Its Excretion into the Bile. *J Nucl Med* (Chicago) 1976; 17:816-19.

58. Halder KK, Nayak DK, Baishya R, Sarkar BR, Sinha S, Ganguly S, et al. ^{99m}Tc -labeling of ciprofloxacin and nitrofuryl thiosemicarbazone using fac- $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]$ core: evaluation of their efficacy as infection imaging agents. *Metallomics* (London) 2011; 3(10):1041-1048.

59. Nayak DK, Baishya R, Natarajan R, Senc T, Debnath MC. Tricarbonyl $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ and $\text{Re}(\text{I})$ -thiosemicarbazone complexes: synthesis, characterization

and biological evaluation for targeting bacterial infection. *Dalton Trans* (Cambridge) 2015; 44(36):16136-16148.

60. Jalilian AR, Mehdipour P, Akhlaghi M, Yousefnia H, Moradkhani S. Evaluation of a [^{67}Ga]-Thiosemicarbazone Complex as Tumor Imaging Agent. *Sci Pharm* (Wien) 2009; 77(2):343–354.

61. Al-Hokbany NS, Alotaibi B, Amer SB, Okarvi SM, Al-Jammaz I. Synthesis and *In Vitro* and *In Vivo* Evaluation of a New ^{68}Ga -Semicarbazone Complex: Potential PET Radiopharmaceutical for Tumor Imaging. *J Chem* 2014; ID 616459, 6 páginas.

62. Williams HA, Robinson S, Julyan P, Zweit J, Hastings D. A comparison of PET imaging characteristics of various copper radioisotopes. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (Berlin) 2005; 32(12):1473–1480

63. Green MA, Mathias CJ, Welch MJ, McGuire AH, Perry D, Fernandez-Rubio F, et al. Copper- ^{62}Zn -Labeled Pyruvaldehyde Bis(N^4 -methylthiosemicarbazonato)copper(II): Synthesis and Evaluation as a Positron Emission Tomography Tracer for Cerebral and Myocardial Perfusion. *J Nucl Med* (Chicago) 1990; 31(12):1969-1996.

64. Ackerman LJ, West DX, Mathias CJ, Green MA. Synthesis and Evaluation of Copper Radiopharmaceuticals with Mixed Bis(thiosemicarbazone) Ligands. *Nucl Med Biol* (Oxford) 1999; 26(5):551-554.

65. Dearling JLJ, Lewis JS, Mullen GED, Welch MJ, Blower PJ. Copper bis(thiosemicarbazone) complexes as hypoxia imaging agents: structure-activity relationships. *J Biol Inorg Chem* (Berlin) 2002; 7(3):249-259.

66. Lihui W. et al. ^{64}Cu -Azabicyclo[3.2.2]Nonane Thiosemicarbazone Complexes: Radiopharmaceuticals for PET of Topoisomerase II Expression in Tumors. *J Nucl Med (Chicago)*. 2006; 47:2034-2041
67. Lafratta AE. Avaliação das condições de preparo de complexos de tecnécio- $^{99\text{m}}$ com derivados de tiosemicarbazonas. Monografia FMUSP 2012.
68. Marques FLN, Okamoto MRY, Buchpiguel CA. Alguns aspectos sobre geradores e radiofármacos de tecnécio- $^{99\text{m}}$ e seus controles de qualidade. *Radiol Bras (São Paulo)* 2001; 34:233-239.
69. Feng Y, Kunos CA, Xu Y. Determination of triapine, a ribonucleotide reductase inhibitor, in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr (Chichester)* 2015; 29(9):1380-1387.
70. Vanbilloen HP, Cleynhens BJ, Verbruggen AM. Synthesis and Biological Evaluation of the Four Isomers of Technetium- $^{99\text{m}}$ Labeled Ethylenecysteamine Cysteine ($^{99\text{m}}\text{Tc-ECC}$), the Mono-acid Derivative of $^{99\text{m}}\text{Tc-L,L-ethylenedicysteine}$. *Nucl Med Biol (Oxford)* 2000; 27(2):207-214.
71. Kieffer DM, Cleynhens BJ, Vanbilloen HP, Rattat D, Terwinghe CY, Mortelmans L,b et al. Synthesis and biological evaluation of a technetium- $^{99\text{m}}$ (I)-tricarbonyl-labelled phenyltropane derivative. *Bioorg Med Chem Lett (New York)* 2006; 16(2):382–386.
72. Fernandes AGA. Quelato-complexos de rênio e tecnécio com potencial aplicação medicinal. TESE IQSC-USP, 2012.

73. Chakrabortya S, Dasa T, Sarmab HD and Banerjee S. Effect of lipophilicity on biological properties of ^{109}Pd -porphyrin complexes: a preliminary investigation. *J Porphyr Phthalocya* (Chichester) 2012; 16:64–71.
74. Sapienza MT, Marques FLN, Okamoto MRY, Hironaka FH, Buchpiguel CA. Anti-CEA Monoclonal Antibody: Technetium-99m Labeling and the Validation Process of a Scintigraphic Animal Model with a Non-celular Antigenic Implant. *Cell Mol Biol* (Noisy-le-Grand) 2002; 48(5):511-516.
75. Arion VB. Synthesis, structure, spectroscopic and in vitro antitumour studies of a novel gallium(III) complex with 2-acetylpyridine 4N-dimethylthiosemicarbazone. *J Inorg Biochem* (New York) 2002; 91: 298–305.
76. Amano S, Inoue T, Tomiyoshi K, Ando T, Endo K. In Vivo Comparison of PET and SPECT Radiopharmaceuticals in Detecting Breast Cancer. *J Nucl Med* (Chicago) 1998; 39(8):1424-1427.