CAROLINA PORTELA LUZ

**Preparação, caracterização e utilização dos radiofármacos
(¹⁸F)FAZA e [^{99m}Tc](O)HL91] para detecção de hipóxia em
cultura de células e em tumores em modelo animal**

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

Programa de Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Buchpiguel

**São Paulo
2013**

DEDICATÓRIA

Nada que eu te dedique é suficiente

Para o tanto que me destes

Nada que eu te dê é bastante

Para o tanto que me servistes

Nada que eu te sirva é justo

Para o tanto que me ensinastes

Nada que eu te aprenda é sábio

Do que o teu amor por mim

Foi assim que me dedicastes a vida

É assim que te dedico meu amor

A minha mãe... Simplesmente admirável.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por realizar milagres todos os dias em minha vida.

A minha família, mãe, pai, vó, Gustavo, Dany, Julia, João, Bianca, tia Li, Tio Si, Cris, por todo o apoio, paciência, valores que me ensinaram, por minha formação como pessoa, compreensão em muitos momentos de ausência, enfim por serem minha família, amo vocês.

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Alberto Buchpiguel, por todo apoio, confiança e por ter acreditado neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fabio Luiz Navarro Marques, por me ensinar que: “O prazer no trabalho sempre aperfeiçoa a obra” (Aristóteles). Sem palavras para descrever tudo que aprendi com você profissionalmente e como pessoa, agradeço pela amizade, inexorável paciência, otimismo e ensinamento.

Ao Prof. Dr. Roger Chammas, por todo apoio e ensinamento.

Ao Prof. Dr. Claudio Di Vitta, por todo apoio e asilo em seu laboratório.

A Profa. Dra. Neusa Bevilacqua, por todo carinho, atenção e amizade.

A Dr. Camila Machado, Dra. Josefina, Silvana Prando e Daniela Faria por toda ajuda na
realização deste trabalho.

A Monick Evangelista, minha fiel companheira neste trabalho, obrigada por todo o
ensinamento, horas de laboratório e grande incentivo na realização das etapas deste
trabalho.

Ao Adrino Radin por todo ensinamento.

A Josy e Marluce, por todo apoio, amizade, e grande ajuda na realização de muito
deste trabalho.

Ao Dr. Manuel Huila, por ter me ensinado o que é paciência, pelo carinho e atenção,
você é especial, *te quiero y a tu hermosa familia tambien.*

As amigas Cléia, New e Viviane, vocês são as melhores.

A Alyne, Danilo, Julia e Bruno pela cumplicidade e boas risadas.

Agradeço aos físicos, biomédicos, enfermeiros, farmacêuticos, engenheiros, médicos,
técnicos, auxiliares, recepcionistas e secretárias do centro de medicina nuclear, pelo
apoio e ensinamento.

Aos alunos do LIM 24, Rodrigo, Dra. Andréia, Dra. Luciana, Carol, Camila, pela ajuda na realização deste trabalho.

Aos alunos do LIM 13, Juliana e Mônica por toda ajuda na realização deste trabalho.

Ao pessoal do LIM31, Débora, Jorge e Andréia, por toda a paciência, ensinamento e muita ajuda na realização deste trabalho.

A todos os setores da Faculdade de Medicina de São Paulo (biotério, DIREXLIM, INRAD, secretaria da pós-graduação, secretaria da Oncologia, biblioteca) pelo fornecimento de materiais e informações para a realização deste trabalho.

A CAPES, CNPQ e FAPESP por todo o apoio financeiro.

A toda a minha família de república: Luciana, Laura, Ana Loira, Flavia, Ana Portuguesa, Ketí, Camilinha, Thais Panda e Thais Kids, por horas de bochecha doendo de tanto rir.

E aos amigos do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

EPÍGRAFE

“Aprender é a única coisa
de que a mente
nunca se cansa, nunca tem medo
e nunca se arrepende.”

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

Luz CP. Preparação, caracterização e utilização dos radiofármacos (^{18}F)FAZA e $[[^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{O})\text{HL91}]$ para detecção de hipóxia em cultura de células e em tumores em modelo animal [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Hipóxia é definida como a baixa teor de oxigênio. Nos tumores a principal causa da hipóxia é a isquemia, que ocorre em função do rápido crescimento da massa tumoral e diminuição ou obstrução dos vasos sanguíneos que irrigam o interior dos tumores. Como a hipóxia é uma das causas do aumento da resistência à radioterapia de radiação e algumas formas de quimioterapia, a identificação de tumores com regiões de hipóxia é de elevada relevância e a utilização de radiofármacos tem sido muito promissora, por ser um método não invasivo e que podem mapear diferentes alterações fisiológicas associadas à hipóxia. Neste trabalho sintetizamos o ligante $[[^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$, com rendimento final de síntese de 82,6% e preparamos o respectivo complexo de tecnécio, com eficiência de marcação maior que 97 %; também foi preparado o radiofármaco (^{18}F)FAZA, com eficiência de marcação de 17,9% e pureza radioquímica, após purificação, maior que 86 %. Estudos de captação em células de melanoma murino B16F10, apresentaram taxa de captação de 0,73%, em condições de normóxia e de 8,5 % em condições de hipóxia para o $[[^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$, sobe as mesmas condições, de 0,73% e 0,98%, para o (^{18}F)FAZA, respectivamente. Estudo de biodistribuição *ex vivo* mostraram taxa de captação em tumores da ordem de 4,3%

para o $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ e de 0,56% para o $(^{18}\text{F})\text{FAZA}$, a relação tumor/sangue foi de 2,6% e 2,5%, respectivamente. Para ambos os rins são a principal via de excreção. Análise, por autorradiografia, de cortes dos tumores mostraram claramente a concentração do $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ em regiões de hipóxia/necrose. Imagem da distribuição dos radiofármacos em camundongos C57/Bl6, com tumores de células B16F10, utilizando sistema híbrido PET/SPECT/CT dedicado a pequenos animais, mostraram que a concentração do $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ permitiu visualizar captação difusa em regiões do tumor, o mesmo foi observado para o $(^{18}\text{F})\text{FAZA}$, mas em uma taxa menor. Em conclusão, os resultados obtidos apresentam as possibilidades de preparação e utilização de dois radiofármacos, o $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ e o $(^{18}\text{F})\text{FAZA}$, como agentes marcadores para hipóxia, utilizando as técnicas de SPECT e PET para imagem. Todavia, novos estudos deverão ser realizados para determinação da especificidade desses radiofármacos em diferentes linhagens tumorais.

Descritores: Compostos radiofarmacêuticos; Neoplasias; Anóxia/diagnóstico; Melanoma experimental; Tecnécio/uso diagnóstico; Radioisótopos de flúor; Camundongos endogâmicos C57BL; Tomografia por emissão de pósitrons e tomografia computadorizada; Tomografia computadorizada de emissão de fóton único.

ABSTRACT

Luz CP. Preparação, caracterização e utilização dos radiofármacos (^{18}F)FAZA e $[[^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{O})\text{HL91}]$ para detecção de hipóxia em cultura de células e em tumores em modelo animal [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Hypoxia is a deficiency of oxygen in the cell. In tumors the primary cause of hypoxia is ischemia, which occurs due to the rapid growth of the tumor mass and reduction or blockage of the blood vessels decreasing nutrients and oxygen supply in more internal regions of the tumors. Once hypoxia is one cause of the increased resistance to radiation therapy and some forms of chemotherapy, their identification in tumors is highly relevant and use of radiopharmaceuticals has been very promising, because it is a noninvasive and can map different physiological changes associated with hypoxia. In this work, we synthesized the ligand $[[^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ given a final synthesis yield of 82.6% and prepared their technetium complex with the labeling efficiency greater than 97%, the (^{18}F)FAZA radiopharmaceutical was also prepared with labeling yield of 17.9% and marking radiochemical purity higher of 86 %, after purification. Uptake studies in murine B16F10 melanoma cells showed uptake rate of 0.73% in normoxic conditions and 8.5% in hypoxic conditions, for $[[^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$, and, under same conditions, 0.73% and 0.98%, for (^{18}F)FAZA. Ex vivo biodistribution study showed uptake rate in tumors of approximately 4.3% for $[[^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ and 0.56% for (^{18}F)FAZA, the tumor/blood ratio was 2.6% and 2.5% respectively. For both products the main route

of excretion was by the kidneys. Analysis by autoradiography of tumors sections clearly showed the concentration of $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ in hypoxia/necrosis regions. The distribution of radiopharmaceuticals in C57/Bl6 mice implanted with tumor B16F10 cells, using dedicated small animals hybrid system PET/SPECT/C, permitted to observe the uptake of the $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ in diffuses points in the tumor regions, the same was observed for the $(^{18}\text{F})\text{FAZA}$, but with lower intensity. In conclusion, the results obtained show possibilities for preparation and use of both radiopharmaceuticals, the $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ and $(^{18}\text{F})\text{FAZA}$ as agents for hypoxia marker, using the SPECT and PET image techniques. However, further studies should be conducted to determine the specificity of these radiopharmaceuticals in different tumor cell lines.

Descriptors: Radiopharmaceuticals; Neoplasms; Anoxia/diagnosis; Melanoma, experimental; Technetium/diagnostic use; Fluorine radioisotopes; Mice, inbred C57BL; Positron-Emission Tomography and Computed Tomography; Tomography, emission-computed, single photon.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	5
AGRADECIMENTOS	7
EPÍGRAFE	11
RESUMO	13
ABSTRACT	15
LISTA DE FIGURAS	23
LISTA DE TABELAS	27
1 – Introdução	29
1.1 – O que é o câncer, epidemiologia do câncer e formas de tratamento (1)	29
1.2 – A biologia das células tumorais e o crescimento de tumores	30
1.3 – Angiogênese	32
1.4 – O fenômeno da hipóxia no tratamento do câncer e métodos diagnósticos	35
1.4.1 – Agentes antineoplásicos biorredutíveis	36
1.5 – Radiofármacos	39
1.5.1 – O processo de produção dos radiofármacos	39
1.5.1.1 – Processos de obtenção de Moléculas com (¹⁸ F)Fluoreto	42
1.5.1.2 – Processos de Marcação de complexos de tecnécio-99m	44
1.6 – Radiofármacos para detecção de hipóxia	45

1.6.1 – Moléculas marcadas com (^{18}F)fluor	46
1.6.2 – Moléculas marcadas com Tc-99m.....	48
1.6.3 – Complexos de Tecnécio-99m não derivatizados de nitroimidazol	51
1.7 – O processo de aquisição de imagens e processamento em medicina nuclear..	52
1.7.1 – Como funciona a câmara de emissão de pósitrons tomográfica acoplada a um tomógrafo computadorizado (PET/CT)	52
1.7.2 – Como funciona a gama câmara acoplada a um tomógrafo computadorizado (SPECT/CT)	53
2 – Objetivos	55
2.1 – Objetivos gerais	55
2.2 – Objetivos específicos	55
3 – Materiais	57
3.1 – Equipamentos e Sistemas	57
3.2 – Reagentes e Solventes	59
4 – Métodos.....	61
4.1 – Síntese orgânica.....	61
4.1.1 – Síntese do cloreto de nitrosila (72)	61
4.1.2 – Síntese do 2-metil-2-butenos (73).....	63
4.1.3 – Síntese do 2-cloro-2-metil-3-nitrosobutano (74).....	63
4.1.4 – Síntese do ligante 4,9-diaza-3,3,10,10-tetrametildodecano-2,11-diona-dioxima (HL91) (75).....	64

4.2 – Preparação dos complexos de [^{99m}Tc]tecnécio e controles físico-químicos	65
4.2.1 – Preparação do complexo [^{99m}Tc](O) ₂ HL91] (75)	65
4.2.2 – Preparação dos complexos [^{99m}Tc](cys) ₂] e [^{99m}Tc](his) ₂] (76)	66
4.2.3 – Determinação da pureza radioquímica dos complexos de tecnécio	66
4.2.3.1 – Cromatografia camada delgada (CCD) e de papel para o [^{99m}Tc](O) ₂ HL91] (77).....	66
4.2.3.2 – Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para o [^{99m}Tc](O) ₂ HL91] (78).....	67
4.2.3.3 – Eletroforese em papel para o [^{99m}Tc](O) ₂ HL91], [^{99m}Tc](cys) ₂] e [^{99m}Tc](his) ₂] (79).....	67
4.2.4 – Determinação do coeficiente de partição (80)	68
4.2.5 – Avaliação da estabilidade do complexo [^{99m}Tc](O) ₂ HL91] em presença de cisteína e histidina (79, 81)	68
4.2.6 - Avaliação da ligação do complexo [^{99m}Tc](O) ₂ HL91] à proteínas plasmáticas e a soro albumina humano (82)	69
4.3 – Preparação do (^{18}F)FAZA	69
4.3.1 – Purificação do (^{18}F)FAZA	70
4.3.2 – Pureza radioquímica do (^{18}F)FAZA	71
4.3.3 – Determinação da Atividade Específica	71
4.4 – Estudos biológicos in vitro	72
4.4.1 – Cultura de células B16F10 (83-85)	72

4.4.2 – Avaliação do efeito citotóxico.....	73
4.4.3 – Obtenção de atmosfera hipóxica.....	74
4.4.4 – Quantificação de concentração do ácido láctico e de glicose, pressão de oxigênio e dióxido de carbono, e pH, do meio de cultura celular mantidos em condição de hipóxia e normóxia.....	75
4.4.5 – Captação dos radiofármacos	76
4.4.5.1 – Captação em condições de normóxia.....	77
4.4.5.2 – Captação em hipóxia.....	77
4.4.5.3 – Extrusão em normóxia	78
4.4.5.4 – Extrusão em hipóxia.....	78
4.4.6 – Viabilidade celular por azul de Tripan	79
4.5 – Estudos biológicos <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i>	80
4.5.1 – Modelo animal	80
4.5.2 - Implantação do tumor.....	81
4.5.3 – Biodistribuição <i>ex vivo</i> dos radiofármacos	81
4.5.3.1 – [^{99m}Tc](O) ₂ HL91]	81
4.5.3.2 – (^{18}F)FAZA.....	82
4.5.4 – Autorradiografia	82
4.5.5 – Biodistribuição <i>in vivo</i> por imagem [56].....	83
4.5.5.1 – Planar dinâmica/CT	83

4.5.5.2 – Aquisição de imagens SPECT/CT	84
4.5.5.3 – Aquisição de imagens PET/CT.....	84
4.5.5.4 – Processamento de imagens SPECT/CT e PET/CT	85
5 – Resultados e discussões	87
5.1 – Síntese do ligante	87
5.2 – Preparação dos complexos de [^{99m}Tc]tecnécio.....	91
5.2.1 – Preparação do complexo [^{99m}Tc](O) $_2$ HL91] [50]	91
5.2.3 – Controle de qualidade	92
5.2.3.1 – Cromatografia camada delgada (CCD) ou papel para o [^{99m}Tc](O) $_2$ HL91].....	93
5.2.3.2 – Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para o [^{99m}Tc](O) $_2$ HL91].....	98
5.3 – Determinação do coeficiente de partição	101
5.4 – Preparação dos complexos [^{99m}Tc](cys) $_2$] e [^{99m}Tc](his) $_2$].....	102
5.5 – Determinação da carga do complexo [^{99m}Tc](O) $_2$ HL91] e avaliação da estabilidade do complexo frente a L-cisteína e L-histidina por eletroforese.....	103
5.6 - Avaliação do [^{99m}Tc](O) $_2$ HL91] frente a proteínas plasmáticas e HSA (soroalbumina humano)	106
5.7 – Preparação do (^{18}F)FAZA.....	108
5.7.1 – Purificação do (^{18}F)FAZA	113
5.7.3 – Determinação da Atividade Específica	114

5.8.1 – Cultura de células B16F10	115
5.8.1 – Avaliação do efeito citotóxico do ligante HL91 em células B16F10.....	115
5.8.2 – Quantificação de concentração do ácido láctico e de glicose, pressão de oxigênio e dióxido de carbono, e pH, do meio de cultura celular mantidos em condição de hipóxia e normóxia.....	116
5.8.2 – Obtenção de atmosfera hipóxica	118
5.8.3 – Captação e extrusão dos radiofármacos	119
5.8.3.1 – Comparação da captação dos radiofármacos [^{99m}Tc](O) ₂ HL91] e (^{18}F)FAZA em condições de normóxia e hipóxia	120
5.8.3.2 – Comparação da extrusão dos radiofármacos em condições de normóxia e hipóxia.....	121
5.9 – Estudos biológicos ex vivo.....	123
5.9.1 – Biodistribuição <i>ex vivo</i> para [^{99m}Tc](O) ₂ HL91]	123
5.9.2 – Biodistribuição <i>ex vivo</i> para (^{18}F)FAZA	128
5.10 – Biodistribuição <i>in vivo</i> (imagem)	130
5.10.1 – Biodistribuição <i>in vivo</i> para [^{99m}Tc](O) ₂ HL91]	130
5.10.2 – Biodistribuição <i>in vivo</i> para (^{18}F)FAZA	132
5. 10.3 – Autorradiografia	133
6 - Conclusões.....	137
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	139

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mortalidade proporcional não ajustada por câncer, Brasil, homens e mulheres, entre 1980 e 2011 (1).	30
Figura 2. Hipóxia de um tumor sólido mostrando a diminuição da concentração de oxigênio, em relação à distância capilar.	33
Figura 3. Esquema descrevendo os passos responsáveis pela lesão celular em casos de hipóxia (14).	35
Figura 4. Esquema do equipamento de PET/CT, adaptado da ref. (67).	53
Figura 5. Equipamento SPECT/CT (Siemens).	54
Figura 6. Sistema de vidraria adaptada para a síntese do NOCl.	62
Figura 7. Sistema de vidraria adaptado para o refluxo e destilação do NOCl.	62
Figura 8. Plaqueamento de células para ensaio de MTT.	73
Figura 9. Esquema de adição dos produtos em diferentes concentrações, controle + e controle -, em placa para ensaio de MTT.	74
Figura 10. Câmara de hipóxia, e manômetro, indicando o volume dos gases utilizados – 19 L/min de N ₂ e 1 L/min de CO ₂	75
Figura 11. Esquema de um hemocitômetro, no qual devem ser contadas as células presentes apenas nos quadrantes identificados pela letra A.	80
Figura 12. Foto da síntese do Cloreto de Nitrosila (NOCl).	89
Figura 13. ¹ H-RMN do 4,9-diaza-3,3,10,10-tetrametildodecano-2,11-diona-dioxima (HL91).	90
Figura 14. Esquema de cromatografia camada delgada (CCD).	93
Figura 15. Corte da placa de CCD para contagem.	94

Figura 16. Cromatografias em papel. A) $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ em TLC-SG/NaCl 0,9%; B) $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ em W4/H ₂ O; C) $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_2$ em TLC-SG/NaCl 0,9%; D) $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_2$ em W4/H ₂ O; E) $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ em TLC-SG/NaCl 0,9%; e F) $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ em W4/H ₂ O.	97
Figura 17. Esquema do equipamento CLAE.	98
Figura 18. Cromatogramas de CLAE para os produtos: A) $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$; B) $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$; e C) $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}] + [^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ (coinjeção), em coluna C18 (4,6 x 250 mm x 4 μm) e fase móvel metanol:H ₂ O (6:4), com fluxo de 1 mL/min.	100
Figura 19. Eletroforese de fita.	104
Figura 20. Perfil da eletroforese dos produtos, A) $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$; B) $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2(\text{HL91})]$; C) $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{cys})_2]$; D) $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{his})_2]$; E) $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ na presença de L-cisteína após 4h a 37°C; e F) $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ na presença de L-histidina após 4h a 37°C.	106
Figura 21. Dados e gráfico da porcentagem de ligação do $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ em (1) proteínas plasmáticas e (2) HSA.	108
Figura 22. Reação de síntese do (¹⁸ F)FAZA a partir de seu precursor.	108
Figura 23. Cromatogramas (A) (¹⁹ F)FAZA – Padrão não radioativo detetado por UV a 340 nm; (B) Produto para reação para obtenção do (¹⁸ F)FAZA detetado por UV a 340 nm; (C) Produto para reação para obtenção do (¹⁸ F)FAZA detetado pela emissão de radiação; (D) (¹⁸ F)fluoreto detetado pela emissão de radiação.	110
Figura 24. Cromatograma em UV a 340 nm do precursor do AZA após etapa de hidrólise igual a realizada para a reação de fluoração.	111
Figura 25. Cromatogramas do produto de reação para obtenção do do (¹⁸ F)FAZA antes da fase de hidrólise. (A) Detecção por UV a 340 nm; (B) detecção por emissão de radiação.	112

Figura 26. Cromatograma em detetor de radiação do (^{18}F)FAZA após a purificação e evaporação da acetonitrila.....	114
Figura 27. Atividade específica do (^{18}F)FAZA	114
Figura 28. Taxa de sobrevivência de células incubadas com o ligante HL91.....	116
Figura 29. Experimento bioquímico apresenta as diferentes concentrações de Lactato e Glucose, pH e tensão de CO_2 e O_2 para meio RPMI 10% em condições de hipóxia e normóxia.	117
Figura 30. Diferença na coloração de células em hipóxia e normóxia.	118
Figura 31. Fluxograma do experimento de captação e extrusão.....	119
Figura 32. Captação de [$^{99\text{m}}\text{Tc}$](O) $_2$ HL91] em células B16F10.....	120
Figura 33. Captação de (^{18}F)FAZA em células B16F10.....	121
Figura 34. Extrusão de [$^{99\text{m}}\text{Tc}$](O) $_2$ HL91] em células B16F10.....	122
Figura 35. Captação de (^{18}F)FAZA em células B16F10.....	123
Figura 36. Biodistribuição <i>ex vivo</i> do [$^{99\text{m}}\text{Tc}$](O) $_2$ HL91], nos tempos de 05, 15, 30 e 60 minutos, valores apresentados em % cpm/g órgão.....	125
Figura 37. Gráfico da biodistribuição <i>ex vivo</i> do [$^{99\text{m}}\text{Tc}$](O) $_2$ HL91], nos tempos de 120 e 240 minutos, valores apresentados em % cpm/g órgão.....	127
Figura 38. Gráfico da biodistribuição do (^{18}F)FAZA em camundongos C57Bl/6 implantados com tumores derivados de células B16F10. Dados fornecidos em % de dose injetada por grama de órgão.....	129
Figura 39. Gráfico demonstrando as relações T/M e T/S ao longo do tempo de biodistribuição do (^{18}F)FAZA em camundongos C57Bl/6 implantados com tumores	

derivados de células B16F10. A relação é estabelecida em % de dose por grama de órgão.	129
Figura 40. Biodistribuição in vivo do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ em SPECT/CT, t= 2h.	131
Figura 41. Biodistribuição in vivo do $(^{18}\text{F})\text{FAZA}$ em PET/CT, t= 1h	132
Figura 42. Biodistribuição in vivo do $(^{18}\text{F})\text{FAZA}$ apresentando intensa captação na vesícula biliar (via de excreção) e baço necrótico.	133
Figura 43. Autorradiografia do tumor de células B16F10 com o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$	134
Figura 44. Autorradiografia do rim de camundongo C57/Bl com o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Radionuclídeos produzidos em reatores; tabela adaptada de (31).	40
Tabela 2. Radionuclídeos produzidos em aceleradores/cíclotron; tabela adaptada de (31).	41
Tabela 3. Radionuclídeos produzidos em gerador; tabela adaptada de (31).	41
Tabela 4. Biodistribuição <i>ex vivo</i> do [^{99m}Tc](O) ₂ HL91], nos tempos de 05, 15, 30 e 60 minutos, valores apresentados em % cpm/g órgão, n=3 para cada tempo.	124
Tabela 5. Biodistribuição <i>ex vivo</i> do [^{99m}Tc](O) ₂ HL91], razão entre os órgão de interesse (tumor/sangue e tumor/ músculo), valores apresentados em percentual (%).	126
Tabela 6. Biodistribuição <i>ex vivo</i> do [^{99m}Tc](O) ₂ HL91], nos tempos de 120 e 240 minutos, valores apresentados em % cpm/g órgão, n=3 para cada tempo.	127
Tabela 7. Biodistribuição <i>ex vivo</i> do [^{99m}Tc](O) ₂ HL91], razão entre os órgão de interesse (tumor/sangue e tumor/ músculo), valores apresentados em percentual (%).	128

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – O que é o câncer, epidemiologia do câncer e formas de tratamento (1)

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo.

As causas de câncer são variadas, podendo ser externas e relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural, ou internas ao organismo, as quais são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas, estando ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Esses fatores causais podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais.

De todos os casos, 80% a 90% dos cânceres estão associados a fatores ambientais. Alguns deles são bem conhecidos: o cigarro pode causar câncer de pulmão, a exposição excessiva ao sol pode causar câncer de pele, e alguns vírus podem causar leucemia. Outros estão em estudo, como alguns componentes dos alimentos que ingerimos, e muitos são ainda completamente desconhecidos.

O envelhecimento traz mudanças nas células que aumentam a sua suscetibilidade à transformação maligna. Isso, somado ao fato de as células das pessoas idosas terem sido expostas por mais tempo aos diferentes fatores de risco para câncer, explica em parte o porquê de o câncer ser mais frequente nesses indivíduos.

O surgimento do câncer depende da intensidade e duração da exposição das células aos agentes causadores de câncer. Por exemplo, o risco de uma pessoa desenvolver câncer de pulmão é diretamente proporcional ao número de cigarros fumados por dia e ao número de anos que ela vem fumando.

Figura 1. Mortalidade proporcional não ajustada por câncer, Brasil, homens e mulheres, entre 1980 e 2011 ([1](#)).

1.2 – A biologia das células tumorais e o crescimento de tumores

Estima-se que os seres humanos possuam aproximadamente 25.000 genes, sendo que dois grupos deles estejam intimamente ligados ao processo tumoral. Os proto-oncogenes que codificam uma série de enzimas que regulam o crescimento celular e a diferenciação, e os genes supressores de tumores, que tem a função de inibir o crescimento celular ([2](#)).

Os proto-oncogenes podem tornar-se oncogenes (promotores de tumor) através de mudanças na estrutura do gene, resultando na síntese de oncoproteínas que podem apresentar função aberrante, ou através de mudanças na regulação da

expressão gênica, resultando um aumento ou produção inadequada de proteínas promotoras de crescimento, com aumento da atividade enzimática, aumento da estabilidade da proteína com consequente aumento da sua atividade, entre outras (3).

As oncoproteínas participam na transdução de sinais durante várias etapas do ciclo celular. Existem 4 categorias de oncogenes que estão associados a divisão celular e desenvolvimento de câncer que são: fator de crescimento, receptor de fator de crescimento, proteínas envolvidas na transdução de sinais e proteínas reguladoras nucleares (4).

Na outra ponta do processo existem os genes supressores de tumor (anti-oncogenes) codificam proteínas que inibem a divisão celular. Os mecanismos pelos quais os genes supressores de tumor inibem a divisão celular são pouco conhecidos. Entretanto, evidências sugerem que os sinais que inibem a divisão celular originam-se fora da célula e utilizam-se de receptores de membrana, proteínas citoplasmáticas e proteínas nucleares para realizarem seus efeitos. Neste caso, alterações genéticas podem desregular a produção de proteínas plasmáticas, impedindo a sinalização para a parada do processo de multiplicação celular (5).

Assim, alterações nos proto-oncogenes e nos genes supressores de tumor podem provocar desenvolvimento de células com crescimento descontrolado e vários modelos para a cinética de crescimento tumoral são propostos, que vão do crescimento exponencial, passando pelo crescimento de superfície, crescimento sigmoide, crescimento atípico ou crescimento em multi etapas (6)

Um fato importante neste processo é que o crescimento acelerado demanda a criação de novos vasos sanguíneos para permitir um maior aporte de suprimento para

os tumores e ao processo de criação de vasos sanguíneos damos o nome de angiogênese (7).

1.3 – Angiogênese

A angiogênese existe nos tecidos normais do organismo em resposta a certos estímulos fisiológicos. Por exemplo, a angiogênese ocorre durante o processo inicial de cicatrização de uma ferida, ou durante a maturação dos folículos ovários. No entanto, ao contrário destes processos autolimitados e controlados no tempo, a angiogênese patológica intervém ativamente na patogênese de certas doenças, como as neoplasias malignas. Nesta condição patológica, a angiogênese persiste durante meses ou anos e raramente termina espontaneamente (8).

Está demonstrado que o crescimento progressivo dos tumores e a eventual migração de células tumorais para zonas distantes, um processo chamado metastização, são mecanismos dependentes, em larga escala, da angiogênese (7).

Uma questão importante na angiogênese tumoral é que os vasos podem ser formados com pequeno calibre, dificultando o aporte de sangue para células tumorais, levando a algumas alterações importantes como a diminuição na quantidade de oxigênio (hipóxia) para o processo de respiração celular e o aporte de suprimentos, como a glicose, o que leva as células a alterar seu ciclo de consumo do carboidrato, para o processo chamado de glicólise, onde somente duas moléculas de ATP são geradas e o processo metabólico para na produção de ácido pirúvico, fazendo com que

o pH na região tumoral seja ácido, alterando o microambiente tumoral e favorecendo o processo de proliferação (9)

Nos tumores a principal causa da hipóxia é a isquemia, que ocorre em função do rápido crescimento da massa tumoral e diminuição ou obstrução dos vasos sanguíneos que irrigam o interior dos tumores. Nestes casos, além da diminuição da concentração de oxigênio, há ainda uma diminuição de fornecimento de nutrientes, hormônios, fatores de crescimento e dissipação de produtos transportados pelo sangue (10).

Figura 2. Hipóxia de um tumor sólido mostrando a diminuição da concentração de oxigênio, em relação à distância capilar.

Fonte: Oliveira, 2002 (11).

Nas células a hipóxia causa, inicialmente, perda do processo de fosforilação oxidativa e da produção de ATP pelas mitocôndrias, impedindo que as células usem seu principal meio de obtenção de energia. A ausência de energia levará a uma série de mudanças metabólicas e morfológicas nas células, podendo levá-las à morte - necrose (12).

Inicialmente a atividade da ATPase Na^+/K^+ é bloqueada e isso leva à completa perda da homeostasia iônica da célula, ocorre influxo de Na^+ para o citoplasma e por osmose também ocorre entrada de água ([13](#)). Neste momento as células se tornam edemaciadas, com bolhas na membrana plasmática e desagregação de ribossomos do retículo endoplasmático rugoso.

A ausência de ATP leva a inatividade da bomba de Ca^{2+} e o aumento da concentração de Na^+ leva à inatividade do trocador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, com isso há aumento da quantidade de Ca^{2+} citoplasmático. No citoplasma o Ca^{2+} é responsável por ativar enzimas autolíticas como proteolases, endonucleases e fosfolipases danificando completamente a célula ([13](#)).

A digestão da célula pelas próprias enzimas lisossômicas também é ajudada pela redução do pH citosólico, que decorre da intensa atividade glicolítica anaeróbica da célula em busca de energia. Esta via leva ao acúmulo de ácido lático ([12](#)).

Uma célula que tenha sofrido lesão reversível causada pela hipóxia pode ser levada à morte caso a oferta de O_2 seja restabelecida de súbito. Esse fenômeno é chamado de lesão por reperfusão e é atribuído a realização da fosforilação oxidativa por mitocôndrias semi-danificadas por hipóxia, o que leva à intensa liberação de radicais livres, principalmente ânions superóxidos ([13](#)).

Figura 3. Esquema descrevendo os passos responsáveis pela lesão celular em casos de hipóxia (14).

1.4 – O fenômeno da hipóxia no tratamento do câncer e métodos diagnósticos

A detecção de hipóxia em tumores vem sendo amplamente discutida, pois é uma das causas do aumento da resistência à terapia de radiação e algumas formas de quimioterapia(15). Isto ocorre porque com a diminuição da concentração de moléculas de O_2 , também ocorre uma diminuição na concentração dos radicais livres produzidos pela radiação, tais como: os radicais peróxila ($ROO\bullet$), hidroxila ($HO\bullet$) e superóxido ($O_2\bullet$), os quais provocam danos severos ao DNA, levando à morte celular (11).

Um dos fatores que explica a resistência dos tumores sólidos à quimioterapia é a dificuldade do fármaco em alcançar as células em hipóxia. O agente quimioterápico deve vencer várias barreiras para conseguir alcançar as células em hipóxia em concentrações terapêuticas: 1) atingir os vasos sanguíneos do tumor; 2) atravessar a

parede destes vasos em direção ao interstício e 3) difundir pelo interstício em direção às células em hipóxia ([16](#)).

Além disso, as células em hipóxia, apesar de serem capazes de se dividir, apresentam ciclo celular prolongado e permanecem indefinidamente em repouso (fase G). Portanto pode-se esperar que estas sejam relativamente resistentes aos agentes quimioterápicos utilizados atualmente, uma vez que os mesmos são, em sua maioria, fármacos que interferem na divisão celular e atuam, principalmente, sobre células em rápida divisão ([17](#))

Existem vários métodos diretos e indiretos para medir a hipóxia ([18](#)). Até início dos anos de 1980, a única forma de se medir ou determinar regiões de hipóxia em tumores era por meio de métodos invasivos, como por exemplos: a introdução de eletrodos sensíveis de oxigênio (medem a pressão parcial de oxigênio – pO_2 – distribuído no tecido tumoral); a detecção por compostos nitroimidazóis, por fluorescência ou imunohistoquímica; ou através da análise dos danos no DNA (eletroforese do DNA extraído de biópsia do tecido, logo após a irradiação com 4 a 10 Gy) ([19](#)). Todavia, esses métodos não são os mais adequados para o uso clínico de rotina, por serem métodos incisivos, com biópsia e os resultados são tardios não sendo assim correspondentes fiéis no momento do tratamento ([17](#)).

1.4.1 – Agentes antineoplásicos biorredutíveis

Em 1972, Lin A.J. et al ([20](#)), levantaram a hipótese de que células em hipóxia poderiam apresentar maior capacidade de redução do que as células normalmente

oxigenadas. Foi proposto, então, que estas características das células em hipóxia poderiam ser exploradas no desenvolvimento de agentes antineoplásicos, os quais só tornariam citotóxicos após ativação metabólica pelas nitrorreductases celulares (20). Estes agentes antineoplásicos biorredutíveis são pró-farmacos, classificados como bioprecusores. Os bioprecusores são substâncias inativas (pró-farmacos) que, *in vivo*, sofrem metabolização, geralmente pelo sistema redox celular, dando origem a uma nova substância na forma ativa (fármaco)(21).

O conceito de ativação biorredutiva de substâncias em células em hipóxia tem sido extensivamente estudado (20), e três classes principais são bem conhecidas. A primeira é a dos antibióticos contendo uma função quinona, dos quais a mitomicina C (1) é o protótipo (22).

A segunda classe é a dos nitroimidazóis, que apresentaram toxicidade preferencial para células em hipóxia. Os principais representantes desta classe são o metronidazol (2) e o minonidazol (3) (23).

A terceira é a classe do di-N-óxidos de benzotriazinas, representada pela tirapazamina (1-4-di-N-óxido-3-amino-1,2,4-benzotriazina) (4) ([24](#)).

No final da década de 60, Adams, Fowler et al ([25](#)), foram os pioneiros na utilização de compostos com alta afinidade eletrônica como radiosensibilizadores (reagem com os radicais formados pela radiação) para células em hipóxia. Tais compostos teriam a capacidade de mimetizar os efeitos danosos do oxigênio ([25](#)). O sucesso de tratamento de tumores sólidos utilizando-se o metronidazol foi a confirmação in vivo daquela hipótese ([26](#)). Estes compostos foram desenvolvidos como radiosensibilizadores, mas, posteriormente, foi demonstrado que a exposição prolongada das células em hipóxia aos nitroaromáticos resulta na morte seletiva de tais células, mesmo na ausência de radiação ([27](#), [28](#)). Isso ocorre devido à redução metabólica dos nitroaromáticos a intermediários altamente reativos, sendo que os principais responsáveis pela ação citotóxica são o ânion nitro radical($\text{RNO}_2^{\cdot-}$) e a hidroxilamina (RNHOH) ([28](#)).

1.5 – Radiofármacos

Um radiofármaco é uma substância que, por sua forma farmacêutica, quantidade e qualidade de radiação, pode ser utilizada no diagnóstico e tratamento de seres vivos, qualquer que seja a via de administração utilizada. De forma mais simples, podemos dizer que radiofármacos são moléculas ligadas a elementos radioativos (radioisótopos ou radionuclídeos), constituindo dessa forma fármacos radioativos que são utilizados em uma especialidade médica denominada Medicina Nuclear. Os radiofármacos são utilizados em quantidades traços (traçadores radioativos) com a finalidade de diagnosticar patologias e disfunções do organismo. Em menor extensão, são aplicados na terapia de doenças, particularmente no tratamento de tumores radiosensíveis ([29](#)).

1.5.1 – O processo de produção dos radiofármacos

A produção de um radiofármaco envolve dois processos:

- A produção do radionuclídeo em que o fármaco se baseia.
- A preparação do fármaco (carreador deste radionuclídeo) e posterior complexação.

Com relação aos métodos de produção, os radionuclídeos podem ser obtidos de quatro maneiras diferentes:

Duas são originadas em reatores nuclear. A primeira é por separação dos elementos de fissão do ^{235}U , o que gera um grande número de radionuclídeos e o

processo de separação é extremamente complexo; o segundo é por bombardeamento de elementos estáveis por nêutrons, dando origem a radionuclídeos cuja principal característica é apresentarem excesso de nêutrons em seu núcleo, os quais tendem a alcançar a estabilidade emitindo partícula beta, algumas vezes associada à radiação gama (30).

Na tabela 01 são apresentados radionuclídeos produzidos em reatores, tanto pelos processos de ativação quanto por transmutação. Os mesmos produtos podem ser obtidos por separação dos produtos de fissão do ^{235}U .

Tabela 1. Radionuclídeos produzidos em reatores; tabela adaptada de (31).

Fonte	Radionuclídeo	Reação nuclear
Reator	^{131}I	$^{235}\text{U}(\text{n},\text{f})^{131}\text{I}$
		$^{130}\text{Te}(\text{n},\gamma)^{131}\text{Te} \xrightarrow{\beta^-} ^{131}\text{I}$
	^{32}P	$^{31}\text{P}(\text{n},\gamma)^{32}\text{P} / ^{32}\text{S}(\text{n},\text{p})^{32}\text{P}$
	^{67}Cu	$^{67}\text{Zn}(\text{n},\text{p})^{67}\text{Cu}$
	^{177}Lu	$^{176}\text{Lu}(\text{n},\gamma)^{177}\text{Lu}$
	^{89}Sr	$^{88}\text{Sr}(\text{n},\gamma)^{89}\text{Sr}$
	^{186}Re	$^{185}\text{Re}(\text{n},\gamma)^{186}\text{Re}$
	^{153}Sm	$^{152}\text{Sm}(\text{n},\gamma)^{153}\text{Sm}$
	^{99}Mo	$^{235}\text{U}(\text{n},\text{f})^{99}\text{Mo} /$ $^{98}\text{Mo}(\text{n},\gamma)^{99}\text{Mo}$

Outros radionuclídeos podem ser obtidos em aceleradores de partículas, do tipo ciclotron, onde elementos estáveis são bombardeados com íons positivos de hidrogênio, deutério ou hélio. A principal característica desses radionuclídeos é que eles decaem por emissão de pósitron ou por captura de elétrons, emitindo radiação gama no final. Na tabela 02 são apresentados exemplos de alguns radionuclídeos produzidos em ciclotrons.

Tabela 2. Radionuclídeos produzidos em aceleradores/cíclotron; tabela adaptada de (31).

Fonte	Radionuclídeo	Reação nuclear
Acelerador/ cíclotron	^{123}I	$^{121}\text{Sb}(\alpha, 2n)^{123}\text{I}$
	^{67}Ga	$^{68}\text{Zn}(p, 2n)^{67}\text{Ga}$
	^{111}In	$^{111}\text{Cd}(p, n)^{111}\text{In}$
	^{201}Tl	$^{203}\text{Tl}(p, 3n)^{201}\text{Pb} \rightarrow ^{201}\text{Tl}$
	^{11}C	$^{14}\text{N}(p, \alpha)^{11}\text{C}$
	^{13}N	$^{16}\text{O}(p, \alpha)^{13}\text{N} / ^{13}\text{C}(p, n)^{13}\text{N}$
	^{15}O	$^{14}\text{N}(d, n)^{15}\text{O} / ^{15}\text{N}(p, n)^{15}\text{O}$
	^{18}F	$^{18}\text{O}(p, n)^{18}\text{F}$
	^{124}I	$^{124}\text{Te}(d, 2n)^{124}\text{I}$
	^{211}At	$^{207}\text{Bi}(\alpha, 2n)^{211}\text{At}$
	^{64}Cu	$^{64}\text{Ni}(p, n)^{64}\text{Cu}$

O último método é aquele em que radionuclídeos decaem a um segundo radionuclídeo e é possível separá-los por um método físico ou químico. A este sistema de produção e separação é dado ao nome de sistema gerador de radionuclídeos. Na tabela 03 são apresentados alguns exemplos.

Tabela 3. Radionuclídeos produzidos em gerador; tabela adaptada de (31).

Fonte	Radionuclídeo	Reação nuclear
Gerador	^{99m}Tc	$^{99}\text{Mo}^{\beta^-} \rightarrow ^{99m}\text{Tc}$
	^{68}Ga	$^{68}\text{Ge}^{\text{CE}} \rightarrow ^{68}\text{Ga}$
	^{90}Y	$^{235}\text{U}(n, f)^{90}\text{Sr}^{\beta^-} \rightarrow ^{90}\text{Y}$
	^{188}Re	$^{187}\text{W}(n, \gamma)^{188}\text{W}^{\beta^-} \rightarrow ^{188}\text{Re}$
	^{212}Bi	$^{228}\text{Th} \rightarrow \dots \rightarrow ^{224}\text{Ra} \rightarrow ^{212}\text{Pb}^{\beta^-} \rightarrow ^{212}\text{Bi}$
	^{213}Bi	$^{229}\text{Th} \rightarrow \dots \rightarrow ^{225}\text{Ac}^{\alpha} \rightarrow ^{221}\text{Fr}^{\alpha} \rightarrow ^{217}\text{At}^{\alpha} \rightarrow ^{213}\text{Bi}$

1.5.1.1 – Processos de obtenção de Moléculas com (^{18}F)Fluoreto

O (^{18}F)fluor é o radionuclídeo frequentemente utilizado para imagem de diagnóstico em PET (*positron emission tomography*, ver seção 1.7.1), uma vez que as propriedades de decaimento fornecem vantagens significativas. Por exemplo, o radionuclídeo apresenta meia-vida física de 109,8 minutos embora curta, é suficiente para produção de moléculas marcadas, em unidades de ciclotron, e distribuição para hospital e clínicas localizadas distantes aos centros de produção; a baixa energia cinética das partículas de pósitrons emitidos pelo ^{18}F durante o decaimento nuclear (média de energia de 250 KeV, E_{max} 635 keV) e uma distância percorrida de menos de 0,3 mm de tecidos/mol, se traduz em uma alta resolução de imagem espacial ([30](#)).

No ciclotron o (^{18}F)fluor pode ser obtido de duas maneiras, na forma de (^{18}F)flúor, através de bombardeamento de nitrogênio com íons de hidrogênio, ou (^{18}F)fluoreto, através do bombardeamento H_2^{18}O .

No caso da obtenção de (^{18}F)fluoreto, objeto deste trabalho, o primeiro passo para as reações de (^{18}F)fluoreto é a remoção da [^{18}O]água utilizada na irradiação. O flúor é fortemente solvatado em água devido à forte ligação de hidrogênio e, portanto, torna-se pouco nucleofílico (Clark, 1980; Vlasov, 1993). Habitualmente, a solução de (^{18}F)fluoreto é passada por uma resina de troca iônica, onde o (^{18}F)fluoreto fica adsorvido e a água enriquecida é recuperado ([32-34](#)).

O (^{18}F)fluoreto adsorvido é então eluído do cartucho utilizando um eluente que contém normalmente uma solução aquosa de acetonitrila, com um sal de carbonato (K_2CO_3 , KHCO_3), acompanhada por um criptando como Kryptofix™ (K222) ou

tetrabutylamônio ([35](#), [36](#)). A solução é evaporada até à secura por aquecimento do recipiente de reação sob pressão reduzida. Alíquotas de acetonitrila adicionado durante a evaporação atinge condições azeotrópicas da mistura, facilitando, assim, o ciclo de secagem ([37](#)).

Nesta condição o íon fluoreto está na forma de um par iônico não solvatado e fortemente nucleofílico. O sólido pode então ser dissolvido em um solvente polar aprótico tal como acetonitrila, DMSO e DMF ([35](#)). Acetonitrila, em contraste de DMSO ou DMF, tem a vantagem de que ele pode ser facilmente removido por evaporação e também porque tende a proporcionar rendimento de marcação maior quando se comparam diferentes solventes ([38](#)). Nos últimos anos, a utilização de determinados solventes polares próticos, tem sido explorada e aplicados com sucesso em vários exemplos de ([39-41](#)).

Substituição nucleofílica com (^{18}F)fluoreto é, em geral, dividido em reações de substituição alifáticas e aromáticas. As reações alifáticas são realizadas geralmente em moléculas que possuem grupos de saída comuns, tais como ésteres de ácidos sulfônicos (por exemplo, triflatos, tosilatos ou mesilatos) ou halogenetos (Cl, Br ou I) através do mecanismo $\text{S}_{\text{N}}2$ ([42](#)). As reações de substituição nucleofílica aromática com (^{18}F)fluoreto é utilizada para a síntese de aril-(^{18}F)fluoreto ([43](#)) e um pré-requisito para este tipo de reação é que o anel aromático precisa de ser ativado pela presença de um ou mais grupos que retiram elétrons, como os grupo nitro, ciano, trimetilamônio e carbonila, posicionados nas posições orto- ou para- ao grupo de saída ([43](#), [44](#)).

Entre os emissores de pósitrons produzidos rotineiramente, com tempo de meia vida de 109,8 min faz com que precisemos de uma síntese do radiofármaco e

protocolos de imagem mais rápidos, todavia permite a distribuição de seus respectivos radiofármacos para serviços de medicina nuclear dentro de poucas horas de distância. A marcação de uma molécula com ^{18}F , em substituição de um átomo de hidrogênio, muitas vezes não se altera o tamanho ou forma da molécula, em geral, e compostos metabolicamente estáveis são obtidos (45).

1.5.1.2 – Processos de Marcação de complexos de tecnécio-99m

O Tecnécio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) é o radioisótopo mais utilizado em medicina nuclear para diagnóstico, estima-se que mais de 80% dos quase 25 milhões de estudos de medicina nuclear de diagnóstico realizados anualmente são feitas com este isótopo.

São conhecidos 28 isótopos de tecnécio, todos eles radioativos. ⁽¹⁰⁾ O de número de massa 99 apresenta 2 isômeros, um com meia vida-física de 6,02 h, decaimento por emissão de fótons com 140 keV (89 %) – (detectado por equipamento SPECT/CT, ver seção 1.7.2), proveniente da transição isomérica $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{99}\text{Tc}$, e outro com meia-vida de $2,1 \times 10^5$ anos e decaimento por emissão de partícula beta. Do ponto de vista químico ⁽¹¹⁾, apresentam as mesmas propriedades, em especial estados de oxidação 3-, 1-, 1+ a 7+, e números de coordenação de 4 a 10. Em função dessas características químicas e físicas, e da disponibilidade através de sistemas geradores (31).

O tempo de meia vida de 6 horas do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (radionuclídeo filho) do produto de longa duração do molibdênio-99 (radionuclídeo pai) com meia vida de 66 horas, é um dos principais fatores que favoreceram o uso universal deste radioisótopo. Por suas propriedades físico-químicas apresenta-se um quelante maleável a diversas estruturas químicas, portanto tão largamente utilizado para complexar com moléculas de propriedades farmacológicas e produção de diversos radiofármacos ([31](#)).

1.6 – Radiofármacos para detecção de hipóxia

As limitações das técnicas invasivas estimularam o desenvolvimento de radiofármacos para mensurar a hipóxia de modo não invasivo.

Segundo MEES et al., 2009 ([46](#)), existem vários pré-requisitos dos quais os radiofármacos para marcação de hipóxia devem obedecer: (1) Devem ser específicos para tecidos em hipóxia e, portanto, distinguir normóxia, hipóxia, anóxia ou necrose; (2) devem mostrar por imagem a hipóxia aguda e/ou a hipóxia crônica e, possivelmente, a distinção entre ambos; (3) devem ser simples, não tóxico, o processo de marcação deve ser fácil e de rápida execução, e possuir vida útil que possibilite

medições repetidas; (4) devem ser lipofílicos para ter uma biodistribuição homogênea em todos os tecidos, incluindo tumores, mas o mesmo deve possuir grupos funcionais que permitam uma rápida eliminação, diminuindo a exposição à radiação de tecidos normais; (5) não pode degradar-se *in vivo*, levando à não-especificidade do metabolismo do marcador e/ou do tecido inespecífico; (6) devem mostrar pO_2 intracelular e o fluxo sanguíneo ou alguma consequência bioquímica subsequente; (7) devem ser sensíveis aos níveis de pO_2 que sejam relevantes para o tratamento do tumor; (8) deve oferecer a capacidade de quantificar o nível de hipóxia (46).

Atualmente, nenhum dos marcadores de hipóxia disponíveis preenche completamente a todos esses requisitos.

1.6.1 – Moléculas marcadas com (^{18}F)fluor

O 2-nitroimidazol que havia sido avaliado terapeuticamente como um radiosensibilizador de citotoxina de células em hipóxia, foi marcado com (^{18}F)fluor (meia-vida=109min) para imagem tomográfica por emissão de positrons (PET) (47). O (^{18}F)fluoromisonidazol resultante (^{18}F)FMISO vem sendo extensivamente estudado em diversos modelos experimentais (48, 49), e há uma experiência clínica considerável com este composto. Por causa do padrão metabólico do (^{18}F)FMISO, um composto alternativo foi desenvolvido, o (^{18}F)fluoroetanidazole (50).

Análogos mais hidrofílicos, os (^{18}F)fluoroeritronitroimidazol, também foram preparados, como os nitroimidazóis $\text{E}^{18}\text{F1}$ e $\text{E}^{18}\text{F5}$, para que permitissem uma comparação direta entre as imagens de PET e medições em amostras ([51](#), [52](#)). O $\text{E}^{18}\text{F1}$ é preparado por substituição nucleofílica do precursor bromo pelo átomo de (^{18}F)fluor e mostra resultados promissores *in vitro* e em modelos animais. O $\text{E}^{18}\text{F5}$ provou ser mais difícil de preparar, mas pode ser sintetizado através de fluoração eletrofílica de um precursor de alilo. O $\text{E}^{18}\text{F5}$ se mostrou promissor para imagem de hipóxia tumoral em seres humanos ([53](#)).

Estudos têm demonstrado que o (^{18}F)FAZA, também um nitroimidazol, apresenta características farmacocinética superior quando comparado ao (^{18}F)FMISO, principalmente porque possui uma rápida eliminação de tecidos normais, o que permite uma melhor relação de captação entre tecido hipoxiado/tecido normal, com uma melhor eliminação do (^{18}F)FAZA através do sistema renal ([54](#)).

Estudos realizados com (^{18}F)FAZA em seres humanos demonstraram que a captação do radiofármaco em tumores foi compatível com as medições realizadas com eletrodos sensíveis à hipoxia e com a concentração do fluoróforo pimonidazol 46, um reconhecido marcador de hipóxia ([55](#)); também na localização de tumores de cabeça e pescoço obtidas de 11 pacientes foram concordantes com dados tomográficos e de ressonância magnética nuclear ([56](#)).

1.6.2 – Moléculas marcadas com Tc-99m

A aplicação clínica bem sucedida de compostos tais como (^{18}F)FMISO e (^{123}I)IAZA conduziu a tentativas para se obter informação semelhante com traçadores Tc-99m (meia-vida = 6 horas), que seriam mais disponíveis, baratos e convenientes para preparar. O primeiro composto promissor foi o [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]BMS181321, em que um 2-nitroimidazol foi acoplado a um quelante de propileno aminooxima (PnAO) ([57](#)). A marcação apresentou um rendimento elevado à temperatura ambiente, utilizando um kit liofilizado, onde a purificação não é necessária. O complexo é neutro e altamente lipofílico (octanol/água - LogP = 40). O ([$^{99\text{m}}\text{Tc}$]BMS181321) mostrou a acumulação selectiva e retenção em células tumorais hipóxicas *in vitro*, com um diferencial de hipóxia/aeróbia de 9 vezes após 2 horas ([58](#)). Acumulação também podem ser moduladas pela presença de compostos nitroaromáticos de diferentes afinidade electronicas ([59](#)).

Surpreendentemente, o 4- e 5-nitroimidazol, que têm afinidades mais baixas de elétrons, estimulam a acumulação de BMS181321. Em camundongos portadores de

tumores xenografados, o ($[^{99m}\text{Tc}]\text{BMS181321}$) apresentou razão de captação tumor/músculo da ordem de 3,5 a 4,0. No entanto, o produto apresentou razão tumor/sangue de aproximadamente 0,3, até 8 horas após a administração do radiofármaco. As limitações do ($[^{99m}\text{Tc}]\text{BMS181321}$) inclui a sua elevada lipofilicidade (resultando na lenta depuração do sangue e alta atividade concentrada nos intestinos) e da sua instabilidade química (60).

Tc-99m BMS181321

O BRU59-21, anteriormente conhecido como BMS194796, é um composto de segunda geração que faz uso de um quelante de oxa-PnAO. Esta mudança tem as vantagens de reduzir a lipofilicidade do complexo de $[^{99m}\text{Tc}]$ tecnécio, levando a obtenção de coeficiente de partição de valor aproximado a 11, e de permitir uma maior estabilidade química. As propriedades *in vitro* do ($[^{99m}\text{Tc}]\text{BRU59-21}$) são muito semelhantes aos do ($[^{99m}\text{Tc}]\text{BMS181321}$). Embora a absorção é um pouco menor, devido à lipofilicidade reduzida, os valores de captação hipóxia/normóxia são tão grandes como os observados com ($[^{99m}\text{Tc}]\text{BMS181321}$). Em camundongos, ($[^{99m}\text{Tc}]\text{BRU59-21}$) mostra depuração mais rápida dos tecidos e do sangue, mas pôde-se observar que a eliminação é ainda em grande parte através do fígado e intestinos. A acumulação absoluta em alguns modelos tumorais é menor do que a observada para o ($[^{99m}\text{Tc}]\text{BMS181321}$), em parte devido à lipofilicidade reduzida. Todavia a razão

tumor/musculo permaneceu praticamente igual e foi observado uma melhora na razão tumor/sangue passado dos 0,3 para o valor de 0,9 (59).

Os únicos dados encontrados na literatura foram de experimentos realizados em animais, não sendo encontrados relatos de estudos em seres humanos para o complexo ($[^{99m}\text{Tc}]$ BRU59-21).

As tentativas para preparar moléculas 2-nitroimidazóis marcadas com Tc-99m com baixos coeficientes de partição, menores do que a do ($[^{99m}\text{Tc}]$ BRU59-21) foram improdutivas. Uma série de 11 moléculas complexadas de Tc-99m através de quelantes peptídicos foram preparados e avaliados. Os coeficientes de partição variaram de 0,0002 à 5 e a acumulação em células hipóxicas *in vitro* foi correlacionado com o aumento do valor do coeficiente de partição, mas as diferenças de captação em células em hipóxia e normóxia foram baixos, não demonstrando seletividade. Quelantes de aminodioxima marcado com Tc-99m bis-2-nitroimidazóis com coeficientes de partição que variam de 0,1 à 108 foram sintetizados, mas não houve seletividade por células em hipóxia (61).

1.6.3 – Complexos de Tecnécio-99m não derivatizados de nitroimidazol

Durante a avaliação de uma série de mono e bis-2-nitroimidazóis acoplado a quelantes aminooxima, Tc-99m-butildiaminooxima (BnAO, HL91, Prognox [Nycomed Amersham, Little Chalfont, UK]), foi utilizado como um controle negativo (não marcado) do composto. Surpreendentemente o [^{99m}Tc]HL91 mostrou acumulação extremamente elevada e específica em células hipóxicas *in vitro* (62). Suas propriedades *in vivo* também foram favoráveis, com rápida excreção renal minimizando radiação de fundo.

Acredita-se que alguns complexos da série apresentem núcleos Tc=O e são altamente lipofílicos, por exemplo o hexametilpropileno-aminooxima [HMPAO]; enquanto que os outros têm núcleos O=Tc=O, apresentando baixa lipofilicidade, como por exemplo o BnAO (HL91) (63). O coeficiente de partição do [^{99m}Tc]HL91 é de 0,1, o qual é mais baixo do que os de ([^{99m}Tc]BMS181321) e ([^{99m}Tc]BRU59-21). Em geral, a acumulação de [^{99m}Tc]HL91 em células em normóxia é proporcionalmente menor do que a de ([^{99m}Tc]BMS181321) e ([^{99m}Tc]BRU59-21), e observa-se uma diferença de hipóxicas/normóxia de até 9 vezes dependendo do tipo de célula tumoral utilizada (64).

O coeficiente de partição inferior de [^{99m}Tc]HL91 contribui para as suas propriedades *in vivo*, com rápida depuração do sangue e dos tecidos, aproximadamente 75% de excreção renal (64). Também, por se tratar de um complexo cuja estrutura não contém grupo nitroimidazol, outro mecanismo de biorredução deve estar envolvido.

1.7 – O processo de aquisição de imagens e processamento em medicina nuclear

“Uma imagem de Medicina Nuclear é o mapa da distribuição do composto marcado com material radioativo dentro do paciente.” (Prof. Sérgio S. Furuie)

1.7.1 – Como funciona a câmara de emissão de pósitrons tomográfica acoplada a um tomógrafo computadorizado (PET/CT)

O primeiro protótipo do scanner PET / CT tornou-se operacional em 1998 ([65](#)). O projeto incorporou um scanner de tomografia computadorizada espiral com detectores de emissão de pósitrons tomográfica (PET) montado na parte traseira do conjunto de tomografia computadorizada rotativo (CT). Alinhando com precisão imagens de CT e PET, aumentando a qualidade de imagem clínica poderia e podendo ser adquiridos em um único exame, sem mover o paciente da maca. Resultados

promissores a partir da avaliação clínica deste dispositivo estimulou a demanda de profissionais de imagens médicas ([65](#), [66](#)).

Os primeiros scanners PET/CT comerciais apareceram na área clínica, em 2001, com os desenhos iniciais submetidos a uma série de melhorias desde então. Antes disso eram utilizados dois equipamentos para se conseguir resultado parecido, o PET e o CT ([67](#)).

O exame de PET/CT leva de 5 a 10 minutos, tempo de aquisição dentro do esperado, em comparação com os exames de 45 minutos que eram padrão para o equipamento somente de dispositivo PET ([67](#)).

Figura 4. Esquema do equipamento de PET/CT, adaptado da ref. ([67](#)).

1.7.2 – Como funciona a gama câmara acoplada a um tomógrafo computadorizado (SPECT/CT)

Em 2000, a GE Medical Systems lançou comercialmente o scanner de SPECT que integra uma câmara gama de ângulo variável de duas cabeça com um raios-X. Estudos de caso, relatam numerosas séries e maior precisão diagnóstica do SPECT, em condições tais como linfoma, infecção, doença óssea, tumores neuroendócrinos,

adenomas da paratireóide, o câncer de tireóide, tumores adrenais, hemangioma cavernoso, bem como com linfocintilografia, cintilografia de perfusão da artéria hepática e uma série de infecções comuns. Como esta câmera usa um dispositivo relativamente baixo de raio-X, desempenho de leitura (em comparação ao desempenho do CT), a aquisições de imagem são na ordem de 10 min e as imagens produzidas não são de alta qualidade para diagnóstico ([68-71](#)).

Em 2005, foi desenvolvido um scanner SPECT/CT, que apresentou resultados de aquisições muito mais rápidos de imagem (<1 min) e as imagens produzidas são de qualidade muito superior, e, portanto, produziram imagens de diagnóstico com qualidade superior ([68](#)).

Figura 5. Equipamento SPECT/CT (Siemens).

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho é preparar os radiofármacos [^{99m}Tc](O) $_2$ HL91] e $^{18}\text{FAZA}$ e comparar a captação dos mesmos em células de melanoma murino B16F10 e em tumores implantados em camundongos, sob condições de normóxia e hipóxia, utilizando técnicas *in vitro* e de imagem cintilográficas (PET/SPECT/CT).

2.2 – Objetivos específicos

Sintetizar e caracterizar o ligante diaminodioxima (HL91) e o complexo [Re(O)HL91].

Preparar os radiofármacos [^{99m}Tc](O) $_2$ HL91] e $^{18}\text{FAZA}$ e utilizá-los para estudo de captação em células tumorais sob condições de normóxia e hipóxia, correlacionando a captação com dados imunohistoquímicos e histopatológicos.

Comparar acúmulo dos radiofármacos $^{18}\text{FAZA}$ e [^{99m}Tc](O) $_2$ HL91] sob as mesmas condições, utilizando o ^{18}FDG como referência para localização do tumor.

Avaliar a biodistribuição e captação dos radiofármacos [^{99m}Tc](O) $_2$ HL91] e $^{18}\text{FAZA}$ em tumores implantados em camundongos.

Adequar protocolos de aquisição de imagem utilizando equipamento PET/SPECT/CT para estudos pré-clínicos.

3 – MATERIAIS

3.1 – Equipamentos e Sistemas

- ^1H -RMN, Varian 300MHz (IQ-USP).
- Calibradores de doses, Victoreen, USA, modelo 34-056 e 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.
- Coluna de C18 (4,6 x 250 mm, 4 μm), Phenomenex.
- 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.
- 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.
- Torpedo de nitrogênio, IBG Gases Especiais, São Paulo, ONU 1066.
- Nitrogênio líquido,

- Scanner para detecção de radioatividade em placas de cromatografia, BioScan, modelo AR-2000;
- Frascos de vidro tipo penicilina, Euroglass; rolhas plásticas e lacres de alumínio, Farmacap.
- Suportes cromatográficos (tiras cromatográficas) e para eletroforese:
 - papel W4, W & R Balston Ltd;
 - ITLC-SG, Gellman Sciences Inc;
- Pistola de ar quente, Dekel, modelo Thermo Control Eletronic TA-1050.
- Castelos de chumbo
- Seringas, 1 e 3mL, BD Plastipak[®] e Injex Industria Cirurgica Ltda.
- Agulhas, 13 x 0,45 e 20 x 5,5, BD Precision Glide[™] e Solidor.
- Vidrarias em geral;
- Estufa, para cultura de células (37 °C com 5% CO₂);
- Cabine de fluxo laminar;
- Garrafa para cultura celular 75 cm², BD Falcon[™];
- Tubo tipo Falcon 15 mL, Corning[®] ;
- Ponteiras de 200 e 1000 uL com barreira, BioPointe Scientific[®] , EUA;
- Pipetador automático, HTL LAB Solutions, modelo SwiftPet;
- Micropipetas de 1000, 200 e 20 uL, Eppendorf[®] ;
- Microscópio de luz convencional, Nikon;
- Hemocitômetro,
- Pipetas volumétricas 5 e 10 mL;
- Pipetas Pasteur de vidro;

- Bomba a vácuo, Millipore, modelo Millivac;
- Freezer, -20 e -70 °C;
- Banho-marias, Sociedade Fabbe Ltda., Brasil, modelo Robertshow
- Centrífuga, CELM, Brasil, modelo LS-3 plus;
- Micro-centrífuga, Thermo Scientific, modelo Expresso Centrifuge (LIM 21);
- Contador manual de células;
- Cilindros de gás, N₂, CO₂,
- Filme para laboratório, Pechiney Plastic Packaging, EUA, modelo Parafilm[®] M.

3.2 – Reagentes e Solventes

- Nitrito de sódio, Synth.
- Ácido clorídrico, Merck.
- Cloreto de potássio, Synth.
- Cloreto de cálcio, Vetec.
- Gelo seco
- 2-metil-2-butanol, Merck.
- Ácido sulfúrico, Merck.
- Sulfato de cálcio, Synth.
- 1,4-dimetilbutano, Merck.
- Dimetilsulfóxido (DMSO), CarloErba.
- Tartarato de sódio, Kqueel.
- Carbonato de sódio, Baker.

- Água purificada, MilliQ.
- N-octanol, Merck.
- Cloreto estano (SnCl₂.2 H₂O), Mallinkcrodt.
- Cisteína HCl monoidratada, InLab.
- L-Histidina HCl monoidratada, Merck.
- Solução fisiológica 0,9% (NaCl 0,9 %), IPEN e Laboratórios B. Braun S. A.
- Acetona P.A., Nuclear.
- Água deionizada purificada (H₂O), Milli Q.
- Etanol P.A., Synth.
- Amônia P.A., Merck.
- Metanol P.A., Merck.
- Ácido Clorídrico fumegante, Merck.
- Metanol grau HPLC, EM.
- TFA (Ácido Trifluoroacético) grau HPLC, EM
- Acetonitrila grau HPLC, EM.
- Tris(hidroximetil)-aminometano, Merck.
- Soroalbumina humana liofilizada, CMN, lote 07/11/2007.
- Meio de cultura RPMI-1640, Cultilab, Brasil;
- Solução Soro Fetal Bovino, Invitrogen®;
- Solução de Tripsina/EDTA, Invitrogen®;
- PBS/EDTA (10 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄, 5 mM EDTA, pH 7,2);
- Corante Azul de Tripan 0,4%, Invitrogen®;

4 – MÉTODOS

4.1 – Síntese orgânica

4.1.1 – Síntese do cloreto de nitrosila ([72](#))

Quinze mililitros da solução de NaNO_2 , à 10 %, foram gotejados lentamente sobre 60 mL HCl concentrado. O NOCl gerado (na forma de gás castanho) foi secado passando-o por uma coluna empacotada sequencialmente com: nitrito de sódio (NaNO_2), cloreto de potássio hidratado (KCl) e cloreto de cálcio (CaCl_2), e recolhido em balão de vidro imerso em nitrogênio líquido ($\text{N}_{2(l)}$), mantido sob refluxo durante 30 minutos. O banho de nitrogênio líquido foi substituído por mistura de gelo seco/acetona e o NOCl foi destilado por aumento gradual da temperatura, sendo recolhido em balão de vidro imerso em mistura de gelo seco/acetona. O produto foi utilizado sem purificação prévia, em etapa posterior de reação.

Figura 6. Sistema de vidraria adaptado para a síntese do NOCl.

Figura 7. Sistema de vidraria adaptado para o refluxo e destilação do NOCl.

4.1.2 – Síntese do 2-metil-2-butenos (73)

Em balão de vidro contendo 100 ml do 2-metil-2-butanol foram adicionados, lentamente, 8 mL de ácido sulfúrico 33%, sob agitação constante. Ao final da adição, o 2-metil-2-butenos gerado foi destilação, recolhido em balão de vidro imerso em banho de gelo seco/acetona e redestilação, seguindo o mesmo procedimento. O produto obtido apresentou ponto de ebulição de 35-8 °C. O produto final foi seco em sulfato de cálcio (CaSO_4), foi filtrado e armazenado à temperatura variando de -8 a -2°C.

4.1.3 – Síntese do 2-cloro-2-metil-3-nitrosobutano (74)

Em um condensador dedo frio contendo 250 mL de 2-metil-2-butenos anidro, mantido em banho de gelo seco/acetona, foram adicionados aproximadamente 5 mL de NOCl (inicialmente mantido em banho de nitrogênio líquido e depois passado a banho de gelo). A transferência foi realizada em 1 hora e a solução foi mantida em banho de gelo seco/acetona por mais 2 horas. O sólido branco formado, em uma solução azul, foi filtrado a vácuo e lavado com metanol gelado. O produto da

nitrosilação (instável) foi transferido para um balão, secado em bomba de alto vácuo e utilizado sem purificação.

4.1.4 – Síntese do ligante 4,9-diaza-3,3,10,10-tetrametildodecano-2,11-diona-dioxima (HL91) (75)

Em balão de vidro contendo 100 mg de 2-cloro-2-metil-3-nitrosobutano, foram adicionados (gota a gota) 33 mg do 1,4-diaminobutano, dissolvido em 5 mL de metanol. Após a adição, o balão foi acoplado ao sistema de refluxo, permanecendo sob agitação e aquecimento de 60°C, durante 9 horas. O solvente foi evaporado a pressão reduzida e os cristais formados foram recristalizados em etanol. Rendimento: 64,6 %. (pf. 195-7 °C). ^1H -RMN δ (DMSO- d_6): 2,25 (m, 2H, NHCH_2CH_2), 1,53 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{NOH}$), 1,25 (m, 2H, NHCH_2CH_2), 1,05 (s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$).

4.2 – Preparação dos complexos de [^{99m}Tc]tecnécio e controles físico-químicos

4.2.1 – Preparação do complexo [^{99m}Tc](O)₂HL91 (75)

O complexo foi preparado a partir de solução extemporânea. Todas as soluções descritas a seguir foram purgadas com nitrogênio antes da utilização. Em um frasco de vidro, tipo pinicilina, 1 mg do ligante HL91 (4,9-diaza-3,3,10,10-tetrametildodecano-2,11-diona-dioxima) foi dissolvido em 0,5 mL de DMSO, seguido da adição de 0,2 mL de solução tartarato de sódio (10 mg/mL) e 1 mL de tampão carbonato de sódio (pH=10, 0,1 mol/L). Após homogeneização da solução foram adicionados 0,5 mL de solução de pertecnetato de sódio (Na^{99m}TcO₄), com atividade de 700 a 2100 MBq, seguido da adição de 0.1 mL de uma solução de cloreto estanhoso (SnCl₂) recém preparada (2,5 mg de SnCl₂, 10 µL de HCl conc. e 10 mL de H₂O purificada). Eficiência de marcação foi determinada conforme descrita no item 4.2.3.

4.2.2 – Preparação dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{cys})_2]$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{his})_2]$ (76)

Em frascos de vidro, tipo penicilina, foram adicionados 5 mg de cloridrato de cisteína ou cloridrato de histidina, separadamente. Em cada frasco ainda foram adicionados 1 mL de NaCl 0,9 % contendo de 200 a 700 MBq de solução de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$), em seguida, x mL de uma solução de cloreto estanhoso (SnCl_2) recém preparada (1 mg de SnCl_2 , 10 μL de HCl conc. e 10 mL de H_2O purificada). A complexação de cisteína e histidina com pertecnetato ($^{99m}\text{TcO}_4^-$), foi avaliado por eletroforese de papel, como apresentado no item 4.2.3.3.

4.2.3 – Determinação da pureza radioquímica dos complexos de tecnécio

4.2.3.1 – Cromatografia camada delgada (CCD) e de papel para o $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ (77)

A pureza de marcação foi determinada por dois sistemas de cromatografia ascendente: 1) TLC-SG/NaCl 0,9% e 2) Whatman4/ H_2O . Com o auxílio de uma seringa de insulina com agulha de calibre 0,5 x 15 mm, uma gota da solução do complexo

radioativo foi depositada a 1,0 cm da margem inferior de um suporte cromatográfico, com 8 cm de comprimento e 1 cm de largura. Este foi colocado em uma cuba contendo aproximadamente 1 mL da fase móvel apropriada onde o solvente percorreu 6,0 cm a partir do ponto de aplicação. Após a corrida, a distribuição da radioatividade na fita foi determinada em um *scanner* de radiação (Bioscan).

4.2.3.2 – Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para o $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ (78)

Amostra do complexo foi injetada em um cromatografo para CLAE equipado com uma coluna cromatográfica de fase reversa C18 (4,6x250mm, 4µm) e fase móvel composta de uma mistura de metano:água (6:4), bombeado no fluxo de 1 mL/min, em modo isocrático. A radioatividade foi detectada em detector para radiação, em fluxo (Perkin-Elmer).

4.2.3.3 – Eletroforese em papel para o $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$, $[[^{99m}\text{Tc}](\text{cys})_2]$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{his})_2]$ (79)

Em uma cuba para eletroforese horizontal, previamente lavada com água purificada e preenchida com solução eletrolítica de tampão Tris pH=8,6 (6,05 g de Tris, 121 mL de HCl 0,1M e 378 mL de H₂O destilada), foram umedecidas tiras de papel Whatman 3MM com 1,5X29 cm e fixadas na cuba. Uma gota das soluções de $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$, $[[^{99m}\text{Tc}](\text{cys})_2]$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{his})_2]$ e de Na^{99m}TcO₄, foi depositada no

meio de quatro tiras de papel, respectivamente; a energia foi ligada e mantida na tensão de 275 V, por 2 horas. As tiras foram secas e contadas em um *scanner* de radiação (Bioscan).

4.2.4 – Determinação do coeficiente de partição (80)

Em um tubo de ensaio foram adicionados 2,7 mL de NaCl 0,9 %, 3,0 mL de n-octanol e 0,3 mL da solução do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$. O tubo foi tampado, agitado em vórtex por 1 minuto e deixado em repouso de 15 a 20 minutos. Alíquotas de 1,0 mL de cada fase foram retiradas e a atividade foi medida em um calibrador de doses. O coeficiente de partição foi determinado dividindo o valor da atividade encontrada na fase orgânica (n-octanol) pelo valor da atividade na fase aquosa (água). O resultado é expresso como o valor logarítmico deste coeficiente (LogP).

4.2.5 – Avaliação da estabilidade do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ em presença de cisteína e histidina (79, 81)

Em um frasco de vidro, tipo pinicilina foram colocados 0,9mL de solução de cisteína 0,001M e adicionar 0,1mL de complexo marcado $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$. O mesmo processo de marcação foi utilizado para histidina. As soluções foram incubadas a 37 °C, durante 4 horas. A transquelação de cisteína/histidina com o radiofármaco $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$, foi avaliado por eletroforese em papel, como apresentado no item 4.3.3.

4.2.6 - Avaliação da ligação do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ à proteínas plasmáticas e a soro albumina humano (82)

Em um frasco de vidro, tipo penicilina, foram adicionados 100 μL de $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ e 1 mL de soro albumina humana reconstituída (1 g/mL). Após incubação por períodos de 5, 45, 120 e 240 minutos – uma alíquota de 100 μL foi retirada a cada tempo (em duplicata), misturadas a 200 μL de etanol em um microtubo e centrifugada a 5000 rpm, por 15 minutos. O sobrenadante e o precipitado foram separados e a atividade radioativa foi medida em calibrador de dose. O mesmo procedimento foi repetido para o plasma, que foi obtido através de coleta de sangue em tubo com vácuo para hemograma, com EDTA, e subsequente, centrifugação para separação dos componentes sanguíneos.

4.3 – Preparação do (^{18}F)FAZA

O carbonato de potássio (3,5g) e o Kryptofix 2.2.2[®] (15mg) foram solubilizados em uma mistura de solventes (100 μL água purificada e 900 μL acetonitrila). Em um filtro Waters Accell Plus QMA Cartridges Light, preconditionado (10 mL de bicarbonato de sódio 0,1 N, 10 mL de água purificada e 5 mL de acetonitrila), foi passada a solução

de (^{18}F)fluoreto (produzido na Unidade de Cíclotron do complexo HC-FMUSP), o líquido foi descartado e o (^{18}F)fluoreto retido no filtro foi eluído com a solução de carbonato e Kriptofix 2.2.2[®] previamente preparada. A solução recolhida em um frasco de vidro foi colocada em banho de óleo aquecido a 140°C; após a evaporação do solvente, o processo foi repetido mais duas vezes, com adição sequencial de 1 mL de acetonitrila anidra. O precursor (1-(2,3-diacetil-5-tosil-A-D-arabinofuranosyl)-2-nitroimidazol) (5 mg) foi solubilizado em 1 mL de DMSO anidro e adicionado ao frasco contendo o produto da evaporação. A solução permaneceu em aquecimento por 5 min, em banho de óleo mantido a 140°C, e depois resfriada a 30°C, em banho termostaticado. Ao frasco foram adicionados 0,5 mL NaOH 0,4 M, e a reação foi mantida por 2 min sob aquecimento. A solução foi neutralizada com 0,5 mL de solução de NaH_2PO_4 (0,3 M) e passada em coluna de Alumina N Cartridges Light, pré-condicionada com 10 mL de água purificada [25]. O produto impuro foi armazenado em frasco de vidro, protegido por blindagem de chumbo, até posterior purificação e análise.

4.3.1 – Purificação do (^{18}F)FAZA

A solução contendo o (^{18}F)FAZA foi purificado por CLAE, em uma coluna cromatográfica de fase reversa C18 Synergi 4 μ Hidro RP-80A (250 x 10,0 mm) eluída por fase móvel composta de uma mistura de Acetonitrila: NaH_2PO_4 5 mM (65:35), em fluxo de 4 mL/min. O produto da eluição foi monitorado por detector de UV ($\lambda = 340$ nm). Foram recolhidas frações de 1 em 1 min e aquelas radioativas (avaliadas por

calibrador de dose), compreendidas entre os tempos de 4 e 6 min foram misturadas, secadas por evaporação e reconstituída com 1 mL de solução salina (NaCl 0,9%). O produto foi analisado por CLAE para determinação da pureza radioquímica e atividade específica.

4.3.2 – Pureza radioquímica do (¹⁸F)FAZA

A fração radioativa recolhida no processo de purificação que apresentou maior atividade foi injetada em um cromatografo para CLAE equipado com uma coluna cromatográfica de fase reversa C18 Synergi-Hidro (4,6x250mm, 4µm) e fase móvel composta de uma mistura de NaH₂PO₄ 5 mM: etanol (95:5), bombeado no fluxo de 1 mL/min, em modo isocrático. Os compostos foram detectados simultaneamente com detector de UV ajustado para λ= 340nm e com detector de radiação gama, com análise em fluxo (Perkin-Elmer) .

4.3.3 – Determinação da Atividade Específica

Diferentes concentrações ($2,33 \cdot 10^{-3}$; $2,33 \cdot 10^{-4}$; $2,33 \cdot 10^{-5}$ e $2,33 \cdot 10^{-6}$ g.mol⁻¹) do padrão do (¹⁹F)FAZA foram injetada em um cromatografo para CLAE equipado com uma coluna cromatográfica de fase reversa C18 Synergi-Hidro (4,6x250mm, 4µm) e fase móvel composta de uma mistura de NaH₂PO₄ 5 mM: etanol (95:5), bombeado no fluxo de 1 mL/min, em modo isocrático. Os compostos foram detectados simultaneamente com detector de UV ajustado para λ= 340nm. Os picos do UV foram integrados para as

diferentes concentrações e uma curva de calibração foi construída. O pico da análise de pureza radioquímica feito anteriormente também foi integrado e o resultado foi colocado no gráfico, onde pudemos calcular a atividade específica de ^{18}F -FAZA que foi produzida, dada em MBq/ μmol .

4.4 – Estudos biológicos in vitro

4.4.1 – Cultura de células B16F10 ([83-85](#))

Células B16F10 foram cultivadas em garrafas plásticas de 75 cm², em 10 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 controlada. Em média, a cada dois dias, o meio contido na garrafa foi aspirado com o auxílio de pipeta Pasteur, encaixada em uma mangueira conectada à bomba de vácuo. A garrafa foi lavada com 5 mL de solução PBS/EDTA, o qual também foi aspirada. Em seguida, foram adicionados 2 mL de solução ATV (tripsina/EDTA) e a garrafa foi levada novamente à estufa por cerca de 2 min. Após a verificação do desprendimento total das células, avaliada com o auxílio de um microscópio, foram acrescentados 8 mL de meio de cultura suplementado, para inibir o efeito do ATV. A suspensão de células foi aspirada utilizando pipeta sorológica de 10 mL e transferida para um tubo do tipo Falcon de 15 mL. Este tubo, devidamente fechado, foi levado para centrifugação por 3 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em um meio suplementado.

4.4.2 – Avaliação do efeito citotóxico

A avaliação do efeito citotóxico do ligante sintetizado HL91 para posterior complexação com o radioisótopo, foi avaliado em células tumorais melanoma murino B16F10, feito por medida da taxa de sobrevivência das células tratadas, por meio de teste MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) (Plumb ET al. 1989).

Células B16F10 foram semeadas em placa de 96 poços (5000 céls/poço), os poços externos não foram plaqueados, como apresentado na figura 08.

Figura 8. Plaqueamento de células para ensaio de MTT.

Oito concentrações foram preparadas (0,01; 0,1; 1; 10; 100; 1000; 10000; 100000 nM) e adicionadas as células. Cada concentração foi adicionada a uma coluna da placa, feitos em sextuplicata. Em uma coluna foi feito o controle negativo para morte celular (somente adicionado meio de cultura RPMI 10%) e em outra o controle positivo para morte celular (DMSO 10%), esquema representado na figura 09.

	0,01	0,1	1	10	100	1x10 ³	1x10 ⁴	1x10 ⁵	RPMI	DMSO	
	1	2	3	4	5	6	7	8	C-	C+	
	↓										

Figura 9. Esquema de adição dos produtos em diferentes concentrações, controle + e controle -, em placa para ensaio de MTT.

Após 24 horas de incubação (95% O₂ e 5% CO₂ - 37°C) com as diferentes concentrações do produto, 10 µL de MTT (5mg/mL) em PBS 0,1N, foram adicionadas a todos os poços semeados da placa. Novamente a placa foi incubada durante 4 h. Após este período a placa foi centrifugada durante 1 min a 1500 rpm. O meio foi descartado e 100 µL de DMSO foram adicionados, homogenizado por 15 min e a placa foi lida em um equipamento UV-visível (Biotek – ELX 808) a 570 nm com referência a 630 nm. (OD₅₇₀ – OD₆₃₀).

4.4.3 – Obtenção de atmosfera hipóxica

A atmosfera hipóxica foi obtida através da regulação da entrada dos gases na câmara, utilizando manômetros, de modo a permitir uma proporção de 19 L/min de N₂ e 1 L/min de CO₂ (95 % N₂ e 5 % de CO₂) . A entrada de gás dura cinco minutos – para

preenchimento total da câmara. Após esse período as presilhas são fechadas e os tubos que permitem a entrada e saída dos gases são vedados com “parafilm”.

Figura 10. Câmara de hipóxia, e manômetro, indicando o volume dos gases utilizados – 19 L/min de N₂ e 1 L/min de CO₂.

4.4.4 – Quantificação de concentração do ácido láctico e de glicose, pressão de oxigênio e dióxido de carbono, e pH, do meio de cultura celular mantidos em condição de hipóxia e normóxia

Para o ensaio foram utilizadas 1 placa para hipóxia e 1 placa para normóxia, onde 3 poços foram semeados de cada placa, de forma semelhante ao que foi feito para o ensaio de captação em normóxia e hipóxia. Após as células aderirem na placa *overnight*, o meio dos poços foi trocado (1 mL), a placa designada ao experimento de normóxia voltou a estufa (95 % O₂ e 5 % de CO₂) e a de hipóxia foi colocada em câmara selada de hipóxia (95 % N₂ e 5 % de CO₂) e ambas permaneceram em 37°C por 24 h.

Após esse tempo, 400 μ L do meio de cada poço foram retirados e colocados em tubos Eppendorf selados. Também, foram preparados três tubos contendo 400 μ L do meio utilizado para cultivo das células, mantido em geladeira, em condições normais de atmosfera. As amostras foram quantificadas em equipamento Radiometer 300.

4.4.5 – Captação dos radiofármacos

Garrafas de cultura com células na confluência maior que 80 % tiveram as células desprendidas, conforme descrito no item 4.4.1, e centrifugadas. O botão de células resultante foi ressuspendido em 5 mL de meio. O número total de células foi determinado utilizando método de viabilidade por azul de tripan (item 4.4.4), e volumes foram transferidos lentamente para placas de 24 poços, na concentração de 1×10^5 células por poço; o volume foi completado com a adição lenta de 0,5 mL de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após todos os poços necessários estarem semeados, a placa foi agitada em leves movimentos circulares para que as células fossem espalhadas uniformemente nos poços. A placa foi levada para estufa, onde permaneceu durante o período noturno. Após esse período, o meio de cada poço foi aspirado, repostado com 1 mL de RPMI 10%, e mantido em estufa até o momento do ensaio de captação e/ou extrusão.

4.4.5.1 – Captação em condições de normóxia

Cem microlitros da solução dos radiofármacos (0,46 a 0,64 MBq) foram adicionados em cada poço, de modo a se ter triplicata de amostras, em ordem decrescente aos tempo de incubação de 15, 120 e 240 min para o [^{99m}Tc](O) $_2$ HL91] e 15, 60 e 180 min para o (^{18}F)FAZA, sendo a placa levada novamente à estufa. Após, o término do tempo de incubação, o meio de cada poço foi retirado com o auxílio de uma micropipeta e transferido para um tubo de contagem. Os poços foram lavados com alíquota de 1 mL de solução PBS 0,1N e transferidas para um novo tubo de contagem, juntamente com a ponteira. Em cada poço foi adicionado 1 mL de NaOH 0,1N e a placa levada à estufa por 5 minutos, a fim de romper a membrana plasmática das células. A suspensão foi recolhida com o auxílio da micropipeta e transferida para um novo tubo de contagem. Os conjuntos de tubos (meio + lavado + células) foram levados para contagem, em contador gama, tipo poço.

4.4.5.2 – Captação em hipóxia

Os experimentos foram iniciados conforme descritos nos itens 4.4.2, porém, antes da adição dos radiofármacos, três placas contendo células foram mantidas por 24 horas, em uma câmara de hipóxia (item 4.4.3).

Cem microlitros da solução dos radiofármacos (0,46 a 0,64 MBq) foram adicionados em cada poço, de modo a se ter triplicata de amostras, em ordem decrescente aos tempo de incubação, nos tempo de 15, 120 e 240 min para o

$[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ e 15, 60 e 180 min para o $(^{18}\text{F})\text{FAZA}$, as câmaras foram abertas e as placas foram processadas conforme foi descrito em 4.2.2.1, e os conjuntos de tubos (meio, lavado e células) foram levados para contagem em contador gama, tipo poço.

4.4.5.3 – Extrusão em normóxia

Para o ensaio de extrusão sob condições de normóxia, foram utilizadas 1 placa por tempo, onde 3 poços foram semeados, de forma semelhante ao que foi feito para o ensaio de captação em normóxia.

Porém, após a adição do radiofármaco aos poços, as placas voltaram à estufa para um tempo máximo de captação de 240 min para o $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ e 180 min para o $(^{18}\text{F})\text{FAZA}$. Após esse período o meio dos poços foram trocados por mais um 1 mL de meio RPMI 10%, e as células incubadas nos tempos de extrusão de 15, 120 e 240 min para o $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ e 15, 60 e 180 min para o $(^{18}\text{F})\text{FAZA}$.

Após os tempos de extrusão as placas foram processadas conforme foi descrito anteriormente, e os conjuntos de tubos (meio, lavado e células) foram levados para contagem em contador gama, tipo poço.

4.4.5.4 – Extrusão em hipóxia

Para a extrusão em hipóxia foi realizado o mesmo procedimento de preparação das placas utilizado no experimento de captação em hipóxia.

Porém, após a adição do radiofármaco aos poços, as placas voltaram à câmara

de hipóxia para um tempo máximo de captação de 240 min para o [^{99m}Tc](O) $_2$ HL91] e 180 min para o (^{18}F)FAZA. Após esse período o meio dos poços foram trocados por mais um 1 mL de meio RPMI 10%, e as células incubadas nos tempos de extrusão de 15, 120 e 240 min para o [^{99m}Tc](O) $_2$ HL91] e 15, 60 e 180 min para o (^{18}F)FAZA, as placas foram separadas por tempo em três diferentes câmaras de hipóxia e criado nova atmosfera.

Após os tempos de extrusão as placas foram processadas conforme foi descrito anteriormente, e os conjuntos de tubos (meio, lavado e células) foram levados para contagem em contador gama, tipo poço.

4.4.6 – Viabilidade celular por azul de Tripán

À 20 μL de uma suspensão de células foram adicionados 20 μL de solução de azul de Tripán Blue 0,4 %, a mistura foi homogeneizada e aproximadamente 10 μL foram transferidos para um hemocitômetro, até preencher o espaço. O hemocitômetro foi levado ao microscópio óptico e foram contadas as células dos 4 quadrantes laterais “A” (Figura 11), considerando as células posicionadas sobre as linhas de borda superior e esquerda, desconsiderando as posicionadas sobre as linhas de borda inferior e direita, sendo a média calculada pela equação $m = x \div 4$, onde x = somatório do número de células dos quadrantes. O número de células em mL foi calculado segundo a equação 1, onde: fd = fator de diluição (= 2, pois a suspensão é misturada com o Tripán em igual proporção, 1:1) e fc = fator de correção (= 10^4 , valor convencional). A viabilidade celular foi determinada através da razão entre células

vivas e células mortas (coradas em azul). O resultado, então, é corrigido para o volume total da suspensão, e o fator de diluição foi calculado para o ensaio desejado.

Equação 1:
$$n^v \frac{\text{cél}}{\text{mL}} = m . fd . fc$$

Figura 11. Esquema de um hemocitômetro, no qual devem ser contadas as células presentes apenas nos quadrantes identificados pela letra A.

4.5 – Estudos biológicos *in vivo* e *ex vivo*

4.5.1 – Modelo animal

Os animais *Specific Pathogen Free* (SPF) C57Bl/6, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP, foram agrupados em número de 6 animais e mantidos em micro-isoladoras acoplados 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.

4.5.2 - Implantação do tumor

Células B16F10 foram desprendidas da garrafa de cultura e recolhidas em 2 frascos tipo Falcon de 15 mL, em seguida foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi ressuspensionado com 5 mL de meio de cultura sem soro e novamente centrifugado; o procedimento foi repetido mais uma vez. As células foram ressuspensionadas em 5 mL de meio e alíquotas de 20 µL foram separadas e homogeneizadas com igual quantidade de solução azul de Tripán 0,4 % e contadas em hemocítômetro. As células foram mantidas em banho de gelo, foram inoculadas nos camundongos, em volumes de 100 µL ($2-5 \times 10^5$ células), sendo alguns na região inguinal e outros no dorso.

4.5.3 – Biodistribuição *ex vivo* dos radiofármacos

4.5.3.1 – $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$

Camundongos da linhagem C57Bl/6, machos, com aproximadamente 8 semanas de vida, implantados a 7 dias com células B16F10 (4.8), apresentando

tumores com 7 a 10 mm³ na região intramuscular da coxa esquerda, foram mantidos em jejum de 6 horas. Os animais foram pesados em balança semi-analítica e aproximadamente 0,37 MBq (1mCi) 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 administração intra peritoneal com 100 µL ketamina/xilazina (1:1), decapitados e o sangue colhido em frascos de vidro. Imediatamente após a decapitação, 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 eletrônico e foram calculados as relações de atividade radioativo por órgão e por grama de órgão.

4.5.3.2 – (¹⁸F)FAZA

Procedimento idêntico ao descrito em 4.5.3.1 foi realizado para o (¹⁸F)FAZA, exceto que os animais foram sacrificados nos tempos de 15, 60 e 180 min após a administração do radiofármaco.

4.5.4 – Autorradiografia

Tumores excisados dos animais de experimentação foram rapidamente congelados meio de inclusão para criostato ([86](#)) e cortados em criostato, nas espessuras de 10 µm e 100 µm, e fixados em lamínas de vidro.

As laminas com os cortes de 100 μm foram expostos em placa de fósforo, Storage phosphor screen SD230-Kodak (Japão), protegida da luz. Após 3 h, para o $[[^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$, a placa de fósforo foi revelada em scanner próprio. As imagens foram processadas utilizando o software ImageQuant 5.0 Molecular Dynamics.

4.5.5 – Biodistribuição in vivo por imagem [56]

4.5.5.1 – Planar dinâmica/CT

Camundongos da linhagem C57Bl/6, machos, com aproximadamente 8 semanas de vida, implantados a 14 dias com células B16F10 (4.5.2), apresentando tumores de aproximadamente 10 mm^3 localizados em região ingnal, foram mantidos em jejum de 6 horas. Os animais foram injetados com 100 μL do radiofármaco $[[^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$, com atividade de 74 MBq (2,0 mCi), pela veia da cauda do animal e, imediatamente após a injeção, foram anestesiados com: (A) mistura de isoflurano em oxigênio, em fluxo contínuo; (B) 10 μL de ketamina/xilazina (1:10) diluída em igual volume de solução fisiológica. Os animais foram posicionados em decúbito ventral na maca do equipamento e foram adquiridas imagens cintilográficas dinâmicas por 1 hora (61 quadros). Após a imagem dinâmica, foi realizada uma imagem do tipo CT.

4.5.5.2 – Aquisição de imagens SPECT/CT

Os ratos foram anestesiados com uma mistura de 3 % de isoflurano em oxigênio e 74 MBq (2 mCi) do radiofármaco ^{99m}Tc -MDP, diluído em 100 uL de solução salina, foi administrado pela veia caudal dos animais. Duas horas após a 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 matrix 60x60 ou pinhole de 5 furos e 12×10^3 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).

4.5.5.3 – Aquisição de imagens PET/CT

O processo inicial de manipulação dos animais foi idêntico ao descrito anteriormente, exceto que foram administrados 37MBq (1 mCi) do radiofármaco ^{18}F FDG e foram aguardados 60 min antes do início da aquisição da imagem, utilizando anel de detectores de 1536 detectores LYSO e LGSO, com dimensões de $2 \times 2 \times 12 \text{ mm}^3$. Posteriormente imagens tomográficas (CT) foram obtidas em campo de visão máximo de 9,3 x 9,7 cm.

4.5.5.4 – Processamento de imagens SPECT/CT e PET/CT

As imagens foram reconstruídas utilizando o método OSEM, com 5 e 20 iterações para o SPECT e PET, respectivamente. 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.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 – Síntese do ligante

O ligante 4,9-diaza-3,3,10,10-tetrametildodecano-2,11-diona-dioxima (HL91) é um produto patenteada, todavia não é comercializado pela Nicomed Amershan, Buckinghamshire, Englanda qual detém a patente até hoje. Após vários contatos com a empresa decidimos então por uma rota de síntese diferente daquela relatado por Sun, 2010 ([75](#)) representado na figura XX, que realizou a síntese como no modelo a seguir, onde (a) I_2 , destilação; (b) HCl concentrado, nitrito de isoamila, 0–5°C, 2 h; (c) butano-1,4-diamina, CH_3OH , refluxo, 15 h.

A não disponibilidade destes reagentes em nosso laboratório e de colaboradores, fez com que pensássemos em utilizar outra rota, com reagentes comerciais de fácil obtenção e mais baratos. A rota de síntese apresentada a seguir foi a utilizada.

Primeiramente realizamos a desidratação do álcool 2-metil-2-butanol onde se obtêm isômeros, o 2-metil-1-butenos que apresenta ponto de ebulição de 31,1°C e o 2-metil-2-butenos que é de 38,5°C. Por apresentarem temperaturas de ebulição muito próximas foi necessário redestilar o produto. Em ambas as destilações foram recolhidas três frações, da qual somente redestilamos e posteriormente utilizamos a fração nº 2, a qual foi recolhida em maior volume e temperatura entre 38-39°C. Após o termino da destilação o produto foi mantido a -18°C, sob o abrigo da luz. O rendimento apresentado foi de 62%, o que é compatível com o apresentado na literatura [48], aproximadamente 66% de pureza do isômero 2-metil-2-butenos.

A segunda etapa da síntese foi produzir o NOCl que é um gás, muito tóxico, e sua preparação é complexa, pois precisa passar por uma sequência de sais inorgânicos, para permitir sua purificação e secagem, tendo depois de ser recolhido em banho de gelo seco/acetona. Na preparação padrão, seguindo as quantidades descritas no

material e métodos, foi possível obter aproximadamente 5 mL do produto. O produto é muito instável e deve ser mantido a -80°C , na ausência desta condição, tivemos que utilizar o produto no mesmo dia da sua preparação.

Figura 12. Foto da síntese do Cloreto de Nitrosila (NOCl).

Para a preparação do 2-cloro-2-metil-3-nitrosobutano, a terceira etapa da síntese, foi necessário utilizar um excesso do 2-metil-2-butenos para certificarmos-nos de que todo o NOCl produzido fosse consumido na reação, uma vez que, como explicado anteriormente, este não pôde ser quantificado. O 2-metil-2-butenos é um líquido transparente, quando iniciamos a reação com o NOCl, a solução fica azul e um precipitado branco se forma. O precipitado foi filtrado (toda a vidraria utilizada nesta etapa foi mantida em gelo seco por 10 min antes de serem utilizadas) e lavado com metanol, também gelado previamente. Esta etapa foi realizada rapidamente, pois o 2-

cloro-2-metil-3-nitrosobutano é instável e deve ser mantido a -80°C em gelo seco/acetona até sua utilização. Este reagente também teve de ser utilizado no mesmo dia de sua preparação.

O 4,9-diaza-3,3,10,10-tetrametildodecano-2,11-diona-dioxima foi preparado pela adição lenta (gota a gota) do 1,4-dimetilbutano, diluído em metanol, sob excesso do 2-cloro-2-metil-3-nitrosobutano, também diluído em metanol. Mantido sob refluxo por 9 horas. Durante o refluxo já podemos observar a formação de cristais brancos. O rendimento da reação foi de 2,34 g (64,6%), com ponto de fusão e espectro de ressonância magnética nuclear de prótons (^1H -RMN) em concordância com os dados da literatura ([75](#)).

Figura 13. ^1H -RMN do 4,9-diaza-3,3,10,10-tetrametildodecano-2,11-diona-dioxima (HL91).

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

5.2.1 – Preparação do complexo [$^{99m}\text{Tc}(\text{O})_2\text{HL91}$] [50]

A preparação do complexo [$^{99m}\text{Tc}(\text{O})_2\text{HL91}$] foi realizada de modo pouco usual para os complexos de [^{99m}Tc]tecnécio utilizado em medicina nuclear. Inicialmente o ligante HL91 necessitou ser dissolvido em DMSO, uma vez que não conseguimos reproduzir o procedimento anteriormente descrito por (75), o qual dissolveu o ligante em um sistema aquoso tamponado. Outra condição pouco usual é a realização da complexação em pH=10, condição em que o SnCl_2 se hidrolisa; deste modo, a solução de SnCl_2 foi preparada em solução de HCl e adicionada no frasco de marcação, somente após todos os outros reagentes terem sido adicionados.

A maioria dos autores relatou utilizarem-se de *kits* contendo o ligante HL91, agente redutor e solução tampão, liofilizados (78, 87, 88). Também foram feitos teste para a produção de *kits*, todavia nenhuma das tentativas apresentou eficiência de marcação >85%.

Os compostos marcados com [^{99m}Tc]tecnécio preparados a partir de "ligantes" não radioativos e pertecnetato (TcO_4^-) geralmente dependem da eficiência e concentração do agente redutor em quantidade adequada para reduzir o

radionuclídeo. Qualquer desbalanço nas quantidades do agente redutor e também do ligante ou pH podem levar a formação de impurezas radioquímicas, uma determinada pela não redução do $\text{Na}[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}_4$ e outra quando a redução não é acompanhada da complexação, formando o $[\text{Tc}^{99\text{m}}]\text{O}_2$ (óxido de tecnécio). Deste modo, é importante a realização de controle de qualidade no final do processo.

5.2.3 – Controle de qualidade

O controle de qualidade é definido como o conjunto de medidas destinadas a verificar a qualidade de cada lote de medicamento e outros produtos, para o atendimento às normas de atividade, pureza, eficácia e inocuidade. Um dos principais objetivos é fornecer produtos de alta qualidade, preparados de acordo com as Boas Práticas de Fabricação (BPF).

Todos os procedimentos de controle de qualidade que são aplicados a fármacos tradicionais podem ser aplicados a radiofármacos, somando-se a eles a determinação da pureza radioquímica e radionuclídica. Mas há de se levar em conta que, como os radiofármacos contêm produtos radioativos, o tempo de utilização dos mesmos tende a ser curto, variando de minutos a poucos dias. Deste modo, os métodos de análise devem ser rápidos para permitir a liberação do produto para administração aos pacientes seja feita no menor tempo possível ([89](#)).

5.2.3.1 – Cromatografia camada delgada (CCD) ou papel para o $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$

Para determinar a pureza radioquímica de radiofármacos, aplica-se uma pequena amostra do material a ser analisado numa extremidade de fita (ou placa, para CCD). A fase móvel (solvente) se desloca através da fase estacionária por ação da capilaridade ([89](#)). A figura abaixo apresenta as fases da cromatografia de camada delgada.

Figura 14. Esquema de cromatografia camada delgada (CCD).

No nosso trabalho, inicialmente validamos os sistemas cromatográficos TLC-SG/NaCl 0,9% e Whatman4/H₂O, analisando amostras de $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-]$ e $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_2]$ (preparado pela reação de $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-]$ com Sn^{2+} na ausência de ligante). Foi demonstrado que $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-]$ migra ao frente e $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_2]$ permanece na origem independentemente do sistema utilizado, conforme demonstrado na figura 16. Com isto pudemos proceder a análise do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$, cujo comportamento

é diferente em cada sistema, pois o complexo migra no sistema TLC-SG/NaCl 0,9% e permanece na origem no sistema Whatman4/H₂O permitindo, deste modo, caracterizar e quantificar as impurezas.

Os radiofármacos estão presentes em 10⁻⁹ M nas soluções na qual são preparados, portanto o método comum de coloração da fita como revelação não pode ser aplicada, utilizamos então a radiação para localizar o radiofármaco na fita, cortando-a e a radiação é medida em contador gama (89).

Figura 15. Corte da placa de CCD para contagem.

O calculo para determinar o percentual de impurezas radioquímicas é expressa conforme equações 1 e 2, que expressam o fator de retardamento da amostra (Rf) [].

$$(1) \text{ Radioatividade na origem (\% [99mTc]O2) } = \frac{\text{Radioatividade na origem}}{\text{Radioatividade (origem+fronte)}} \times 100$$

$$(2) \text{ Radioatividade no frente (\% Na[99mTc]O4) } = \frac{\text{Radioatividade no frente}}{\text{Radioatividade (origem+fronte)}} \times 100$$

A pureza radioquímica (eficiência de marcação) pode ser determinada pela equação de balanço de massa (equação 3). A radioatividade é medida através de um contador de radiação gama [].

$$(3) \text{ Percentual de pureza radioquímica (\%)} = 100 - (\% \text{ Na}[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}_4) - (\%[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}_2)$$

Calculo de impurezas radioquímicas:

E - $[[^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ em TLC-SG/NaCl 0,9%

$$\text{Radioatividade na origem (\%}[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}_2) = \frac{\text{Radioatividade na origem}}{\text{Radioatividade (origem + frente)}}$$

$$\text{Radioatividade na origem (\%}[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}_2) = \frac{40934}{(40934 + 2341598)} \times 100$$

$$\text{Radioatividade na origem (\%}[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}_2) = 1,72\%$$

F - $[[^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ em $\text{W}_4/\text{H}_2\text{O}$

$$\text{Radioatividade no frente (\%Na}[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}_4) = \frac{\text{Radioatividade no frente}}{\text{Radioatividade (origem+frente)}} \times 100\%$$

$$\text{Radioatividade no frente (\%Na}[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}_4) = \frac{38896}{(3062749 + 38896)} \times 100$$

$$\text{Radioatividade no frente (\%Na}[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}_4) = 1,25\%$$

$$\text{Percentual de pureza radioquímica (\%)} = 100 - (\% \text{ Na}[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}_4) - (\%[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}_2)$$

$$\text{Percentual de pureza radioquímica (\%)} = 100\% - 1,25\% - 1,72\%$$

$$\text{Percentual de pureza radioquímica (\%)} = 97,03\%$$

A eficiência de marcação foi determinada por CCD (TLC-SG/NaCl 0,9%) e papel (Whatman4/H₂O), apresentando marcação superior a 97 %, conforme demonstrado nos cromatogramas E e F, da figura 16 e por cálculos.

Figura 16. Cromatografias em papel. A) $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ em TLC-SG/NaCl 0,9%; B) $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ em W₄/H₂O; C) $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_2$ em TLC-SG/NaCl 0,9%; D) $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_2$ em W₄/H₂O; E) $[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}$ em TLC-SG/NaCl 0,9%; e F) $[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}$ em W₄/H₂O.

5.2.3.2 – Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para o $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$

Outro método também utilizado para caracterizar o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$, complementar à cromatografia em papel, foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

O método de análise CLAE utiliza pressão elevada para forçar a passagem de solvente através de colunas analíticas contendo partículas muito finas, capazes de proporcionar separações eficientes.

O equipamento para CLAE (figura 17) é composto dos seguintes equipamentos: reservatórios de fase móvel, sistemas de bombeamento, medidor de pressão, válvula de injeção, injetor automático, coluna cromatográfica, detector e sistema de aquisição e tratamento de dados.

Figura 17. Esquema do equipamento CLAE.

Para análise do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ utilizamos uma coluna cromatográfica de fase reversa C18 (4,6x250mm, 4 μm), acoplado a um sistema de detecção radioativa. Foi utilizada a fase móvel metanol:H₂O (6:4) com fluxo de 1 mL/min.

Nos cromatogramas (figura 8), obtidos em CLAE, podemos observa-se o $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-]$ apresenta tempo de retenção de 4,4 min, enquanto para o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ o tempo é de 7,6 min. Na análise por HPLC dois fatos devem ser considerados: o primeiro é que o íon $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-]$ apresenta pequena variação no tempo de retenção quando ele é analisado individualmente ou em mistura com o analito (figura 8 A e C), e o segundo é que a espécie coloidal $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_2]$ não é eluída da coluna, sendo obrigatório a otimização de algum outro método analítico (ex. cromatografia em papel) para se conhecer a concentração desta impureza e definir a real pureza do produto marcado.

Figura 18. Cromatogramas de CLAE para os produtos: A) $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$; B) $[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}$; e C) $[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91} + [^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ (coinjeção), em coluna C18 (4,6 x 250 mm x 4 μm) e fase móvel metanol: H_2O (6:4), com fluxo de 1 mL/min.

5.3 – Determinação do coeficiente de partição

O coeficiente de partição (P) é definido como a relação das concentrações da substância em óleo e em água. Para a determinação do valor de P se misturam quantidade conhecida da substância, um solvente orgânico imiscível com água (n-octanol, clorofórmio, éter etílico, etc), que mimetiza a fase oleosa, e uma solução aquosa (água, NaCl 0,9%) e, após a separação das fases orgânica e aquosa, determina-se a quantidade de substância presente em cada uma das fases. Para se calcular P utiliza-se a seguinte expressão:

$$P = \frac{\text{concentração da substância na fase orgânica}}{\text{concentração da substância na fase aquosa}}$$

No caso de radiofármacos a quantidade de substância em cada fase é determinada pela radioatividade, medida em contador de tipo poço ou calibrador de dose.

Para estudos de atividade biológicos o coeficiente de partição (P) é aplicado como o Log do coeficiente de partição (LogP). Uma vez no organismo vivo as substâncias distribuem-se entre estruturas apolares (membranas celulares, por exemplo) e as soluções aquosas (plasma sanguíneo, linfa, fluidos intracelulares). Se $\text{LogP} = 0$, então tem tanta afinidade para a fase orgânica pela fase aquosa. Se $\text{LogP} < 0$ a substância é mais hidrofílica, e o inverso, se $\text{LogP} > 0$ a substância é hidrofóbica.

Para podermos avaliar e correlacionar propriedades físico-químicas com propriedades biológicas, a lipofilicidade do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ foi determina

pela razão de n-octanol/NaCl 0,9%, em 3 diferentes amostras. O coeficiente de partição, na forma de logaritmo (LogP) que foi de $0,12 \pm 0,01$, concordando com o dado da literatura [8]

5.4 – Preparação dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{cys})_2]$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{his})_2]$

Em geral é desejável que os radiofármacos sejam estáveis tanto in vitro, durante seu armazenamento antes do uso, quanto in vivo, ou seja, que uma vez injetados permaneçam na mesma forma química. Ocorre que, principalmente para os complexos metálicos, existe no organismo uma grande quantidade de agentes quelantes, como a L-cisteína e a L-histidina presentes nos anticorpos e peptídeos.

A L-histidina e a L-cisteína são aminoácidos presentes nas proteínas dos seres vivos. Também são agentes quelantes com capacidade de formar complexos com o ^{99m}Tc tecnécio (76).

Deste modo, para avaliar o efeito da estabilidade do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$, preparamos com complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{cys})_2]$ - e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{his})_2]$ - para tê-los como referências nos estudo posteriores.

5.5 – Determinação da carga do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ e avaliação da estabilidade do complexo frente a L-cisteína e L-histidina por eletroforese.

A eletroforese é o movimento de partículas dispersas em relação a um fluido sob a influência de um campo elétrico espacialmente uniforme ([90](#)). Causada pela presença de uma interface carregada entre a superfície das partículas e do fluido envolvente. Base de uma série de técnicas analíticas utilizadas em bioquímica para as moléculas separar por tamanho, carga ou afinidade de ligação.

Na eletroforese as partículas em suspensão têm uma carga elétrica de superfície, fortemente afetada pela espécie adsorvida ([91](#)), em que um campo elétrico externo exerce uma força eletrostática de Coulomb. De acordo com a teoria de camada dupla, em todas as cargas de superfície de fluidos são “peneirados” por uma camada difusa de íons, que tem a mesma carga absoluta, mas de sinal oposto em relação a carga de superfície. O campo elétrico também exerce uma força sobre os íons na camada difusa, que tem sentido oposto ao que atuam sobre a carga de superfície. Esta última força não é realmente aplicado à partícula, mas sobre os íons na camada difusa localizada a alguma distância a partir da superfície da partícula, e uma parte percorre o caminho para os extremos através de interação com o suporte. Esta parte da força é também chamada de força de retardo de eletroforese.

Para este experimento utilizamos a eletroforese de papel com cuba horizontal, todavia há outras opções como a eletroforese de gel, capilar, vertical, 2D entre outras ([92-95](#)) .

Cada substância apresenta um perfil característico, no caso da eletroforese de fita, percorre o comprimento da fita migrando para o polo inverso a sua carga.

Figura 19. Eletroforese de fita.

A estabilidade do complexo foi avaliada por eletroforese em solução eletrolítica de tampão Tris pH=8,6, em fita de papel Whatman 3MM com 1,5x29 cm, e a fonte de corrente contínua foi mantida a 275 V, por 2 horas. As fitas inicialmente com 29 cm de comprimento, foram avaliadas em “scanner” para radiação e não apresentaram nenhuma contagem nos 4 centímetros das extremidades de ambos os lados, que foram cortados, para a melhor visualização da parte central da fita.

O $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$ utilizado como referência, uma vez que sua carga negativa é conhecida, migrou 8 cm no sentido do ânodo.

O complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ permaneceu na região central da fita não apresentando carga para o complexo (neutro).

Os complexos $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{cys})_2]^-$ e $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{his})_2]^-$ também migraram em sentido do polo positivo, percorrendo distância de 4-6 cm e 3-5 cm, respectivamente para cada complexo, caracterizando a carga negativa.

Como discutido no item 5.2, a pureza radioquímica do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ foi inicialmente determinada com sendo >98%, e a estabilidade do complexo à 37 °C e na ausência de outros ligantes, foi avaliada após 4 horas da marcação, sem que tivesse sido observada alteração na sua pureza. Quando a estabilidade do complexo foi avaliada na presença de L-cisteína e L-histidina adicionadas logo ao final da marcação, no tempo de 4h à 37°C, observamos o pico retido na origem, com a aproximadamente 90% da atividade total, o qual classificamos como sendo o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$, e outro que percorreu a distância de 8 cm, identido ao $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4]^-$. Com não foi observado picos característicos dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{cys})_2]^-$ e $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{his})_2]^-$, o resultado sugere que o $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ sofre decomposição ao invés de tranqueação, conforme pode ser observado na figura 10.

Figura 20. Perfil da eletroforese dos produtos, A) $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$; B) $[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2(\text{HL91})$; C) $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{cys})_2$; D) $[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{his})_2$; E) $[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}$ na presença de L-cisteína após 4h a 37°C; e F) $[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}$ na presença de L-histidina após 4h a 37°C.

5.6 - Avaliação do $[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}$ frente a proteínas plasmáticas e HSA (soroalbumina humano)

O plasma sanguíneo é o componente líquido do sangue, no qual as células sanguíneas estão suspensas. O plasma é um líquido de cor amarelada e é o maior componente do sangue, compondo cerca de 80% de seu volume total.

O teor de proteínas plasmáticas no plasma é de aproximadamente 7 a 7,5g/dL. As proteínas plasmáticas, assim, compreendem a maior parte dos sólidos do plasma. Essas proteínas, na realidade, são uma mistura complexa incluindo não só as proteínas simples mas, também, proteínas mistas ou conjugadas como as glicoproteínas e vários tipos de lipoproteínas. As proteínas séricas compreendem principalmente as frações albumina e globulina do plasma. A fração albumina das proteínas do soro é a mais abundante das proteínas séricas, representando quase 50 % do total, sendo sintetizada no fígado.

Como o $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ mostrou-se relativamente estável na presença de L-cisteína e L-histidina, passamos a avaliar o efeito de ligação do complexo em proteínas plasmática, de plasma obtido de voluntários, e também na presença de solução de albumina humana (HSA) preparada no laboratório.

Os resultados (tabela 1) demonstraram diferença na taxa de ligação quando foi utilizado plasma e quando foi utilizado solução de albumina humana. Os resultados da ligação do complexo com o plasma variou de aproximadamente 20 % a 11 %, com o progredir do tempo, enquanto que com o uso da albumina este valor variou de aproximadamente 60 % a 54 %.

Estes resultados demonstram que o estudo de ligação de fármacos ou radiofármacos a proteínas específicas ou ao plasma, precisam ser conduzidos com cautela, uma vez nem sempre os resultados são semelhantes.

Figura 21. Dados e gráfico da porcentagem de ligação do $[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}$ em (1) proteínas plasmáticas e (2) HSA.

5.7 – Preparação do $(^{18}\text{F})\text{FAZA}$

O $(^{18}\text{F})\text{FAZA}$ foi preparado, como representado na figura 16, segundo procedimento descrito na literatura para um processo de marcação não automatizado, ou seja, todas as etapas da reação foram realizadas manualmente. Devemos lembrar que, diferentemente do processo de produção da $(^{18}\text{F})\text{FDG}$, em que o produto final pode ser obtido puro após passagem em uma série de filtro sep-pak, o produto de reação para obtenção do $(^{18}\text{F})\text{FAZA}$ precisa ser purificado por HPLC.

Figura 22. Reação de síntese do $(^{18}\text{F})\text{FAZA}$ a partir de seu precursor.

Inicialmente, após ao final da reação, o produto foi analisado em HPLC, com passagem da amostras simultaneamente em detetor de UV (picos em 6,2; 16,3 e 21,5 minutos) e de radiação (picos em 3,5; 8,0; 16,2 e 25,5 minutos). Além disto,

previamente foram analisados, por UV a 340 nm, uma amostra do produto de referência, no qual o flúor é o isótopo estável, e uma amostra do fluoreto radioativo. Todos os cromatogramas são apresentados na figura X, e fica evidente a obtenção do (^{18}F)FAZA (detetor de radiação) quanto comparado ao tempo de retenção de 15,5 minutos do (^{19}F)FAZA padrão.

Figura 23. Cromatogramas (A) (^{19}F)FAZA – Padrão não radioativo detetado por UV a 340 nm; (B) Produto para reação para obtenção do (^{18}F)FAZA detetado por UV a 340 nm; (C) Produto para reação para obtenção do (^{18}F)FAZA detetado pela emissão de radiação; (D) (^{18}F)fluoreto detetado pela emissão de radiação.

Nos cromatogramas do produto de reação obtidos tanto em UV quanto por radiação foram registrados outros picos além do produto de interesse. O (^{18}F)fluoreto radioativos foi identificado e tem tempo de retenção próximo aos 25 minutos. Todavia faltava identificar os outros picos, então fizemos as análises de outros possíveis subprodutos de cada etapa da reação, a saber: precursor hidrolisado (AZA) e a solução de reação antes da etapa de hidrólise – aqui denominado de (^{18}F)FAZAOAc.

No caso do AZAOAc o precursor da reação foi injetado no HPLC e registrado em UV a 340 nm, conforme figura 18. O tempo de retenção obtido foi de 21,8, concordante com o pico observado no cromatograma de reação analisado em UV.

Figura 24. Cromatograma em UV a 340 nm do precursor do AZA após etapa de hidrólise igual a realizada para a reação de fluoração.

Também uma alíquota da reação de fluoração do AZA foi retirada antes da etapa de hidrólise e analisada em HPLC nos detetores de UV e radiação. No caso do registro em UV foi detetado um pico com tempo de retenção de em 6,1 minutos, sugerindo tratar-se do produto objeto de substituição do grupo tosilato por nucleófilo, provavelmente a H_2O , gerando o AZAOAc. Descartamos tratar-se do precursor TsAZAOAc integro, uma vez que o mesmo não apresenta absorção a 340 nm. O

registro no detector de radiação mostrou aquilo que já parece ser o produto final (^{18}F)FAZA, com tempo de retenção em 16,3 minutos, e outros três picos com tempos de retenção em 3,5; 7,0 e 9,0 minutos. O produto com tempo de retenção em 3,5 minutos não pode ser identificado e ele permanece como contaminante, mesmo após a etapa de purificação, como veremos mais adiante; os outros dois picos sugerem ser o (^{18}F)FAZAOAc com diferentes graus de hidrólise, o que vemos no cromatograma da reação geral como um pico entre 6 e 10 minutos, o qual é eliminado no processo de purificação.

Figura 25. Cromatogramas do produto de reação para obtenção do do (^{18}F)FAZA antes da fase de hidrólise. (A) Detecção por UV a 340 nm; (B) detecção por emissão de radiação.

5.7.1 – Purificação do (^{18}F)FAZA

Para a purificação do produto desejado – (^{18}F)FAZA, utilizamos o mesmo tipo de coluna em sua versão semi-preparativa como fase móvel acetonitrila:tampão fosfato 5 mM (65:35), em mesma coluna C18, diferenciando apenas o fato de ser semi-preparativa – ao contrário do que é relatado nos artigos, onde se usa como fases móveis soluções de etanol:tampão fosfato ou metanol:tampão fosfato ([54](#), [55](#), [96](#)) uma vez que estes sistemas não estavam nos permitido isolar o produto.

Devido a impossibilidade de acompanhar o registro da saída do material radioativo diretamente no detetor de radiação, devido a alta atividade da amostra e sensibilidade do detetor, as frações foram coletadas manualmente em frações de 4 mL/min e o produto eluído nos tempos de 5 e 6 minutos, que era a sequência que continha a maior radioatividade, foram misturadas e reanalisadas, utilizando o procedimento padrão.

Para se ter certeza do produto eluído na coluna semi-preparativa, amostra do padrão (^{19}F)FAZA foi eluída nas mesmas condições.

Uma vantagem ao utilizarmos essa nova fase móvel, foi permitir a evaporação mais rápida do solvente e a reformulação do produto final em um volume adequado aos estudos biológicos a serem realizados posteriormente.

A pureza radioquímica aumentou de 44,80 % para 86,72 %. Neste ponto, o rendimento de reação foi de <17,9% (não corrigido para o decaimento).

Figura 26. Cromatograma em detetor de radiação do $(^{18}\text{F})\text{FAZA}$ após a purificação e evaporação da acetonitrila.

5.7.3 – Determinação da Atividade Específica

Denominada como a radioatividade do radionuclídeo relacionada à massa unitária do elemento ou composto analisado ([29](#))

Concentrações conhecidas e calculadas a partir da integral dos picos de CLAE, foram transferidas para a figura 27. A partir destas concentrações e da integral do pico de CLAE do $(^{18}\text{F})\text{FAZA}$ produzido, a atividade específica da injeção no final da síntese foi de 333 MBq /mmol como apresentado no gráfico a seguir:

Figura 27. Atividade específica do $(^{18}\text{F})\text{FAZA}$

5.8.1 – Cultura de células B16F10

Melanoma é um tipo de câncer de pele bastante agressivo, que apresenta pior prognóstico quando existe metástase nos linfonodos drenantes. A incidência de melanoma vem crescendo com o decorrer dos anos ([97](#)), inclusive no Brasil. Em 2005, a incidência de melanoma chegou a 5,2 por 100 mil habitantes ([98](#)).

Atualmente, a estratégia de diagnóstico padrão é a cirurgia, seguida de biópsia, sendo desejável o desenvolvimento e validação de técnicas não invasivas ([98](#)).

A linhagem celular selecionada para o presente experimento será melanoma murino B16F10, que já foi utilizada pelo grupo de pesquisa do Centro de Medicina Nuclear da Faculdade de Medicina USP, pois seu cultivo em laboratório apresenta rápida proliferação, é facilmente transplantada em camundongos C57/Bl e possui alta capacidade de disseminação metastática ([99](#)).

5.8.1 – Avaliação do efeito citotóxico do ligante HL91 em células B16F10

O MTT é um sal de tetrazólio que ao ser reduzido por enzimas desidrogenases de células metabolicamente viáveis formam cristais de Formazán. Esses cristais são insolúveis em soluções aquosas e apresentam pico de absorção em 570nm. As amostras foram medidas em UV-visível a 570nm. A fração de sobrevivência foi calculada como porcentagem do controle negativo de morte celular (media da absorbância do controle = 100% de sobrevivência).

Para todas as concentrações avaliadas, considerando o desvio padrão de cada uma (n=8), assumimos que em nenhum dos pontos houve morte significativa das células como apresentado no figura 28.

Figura 28. Taxa de sobrevivência de células incubadas com o ligante HL91.

5.8.2 – Quantificação de concentração do ácido láctico e de glicose, pressão de oxigênio e dióxido de carbono, e pH, do meio de cultura celular mantidos em condição de hipóxia e normóxia

Como descrito anteriormente por Szabó, 2005 ([13](#)), nas células em condição de hipóxia (aumento da tensão de CO_2 e diminuição de O_2), há um aumento na concentração de enzimas autolíticas devido a grande concentração de Ca^{2+} intracelular. A digestão das células pelas próprias enzimas também é ajudada pela redução do pH citosólico, que decorre da intensa atividade glicolítica anaeróbica da célula em busca de energia (aumento de consumo de glicose). Onde, este processo leva ao acúmulo de ácido láctico.

Este experimento bioquímico mostra as diferentes concentrações de lactato e glucose, pH e tensão de CO_2 e O_2 , presentes em meio RPMI 10% exposto à diferentes placas, semeadas com células, uma mantida em hipóxia e outra em normóxia durante 24h. O padrão utilizado foi o próprio RPMI suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) preparado, estéril e mantido a -2°C .

As figuras a seguir podemos ver que o pH de células em hipóxia é mais baixo que o pH fisiológico do meio RPMI 10%, e também mais baixo comparado a normóxia. O consumo de glicose por células em hipóxia é inversamente proporcional à produção de lactato, respectivamente inverso ao resultado para o meio RPMI 10% e em quantidade maior do que em normóxia. Comportamento também apresentado pelas tensões de O_2 e CO_2 , inversamente proporcionais, mostrando principalmente a baixa concentração de O_2 em hipóxia.

Figura 29. Experimento bioquímico apresenta as diferentes concentrações de Lactato e Glucose, pH e tensão de CO_2 e O_2 para meio RPMI 10% em condições de hipóxia e normóxia.

5.8.2 – Obtenção de atmosfera hipóxica

A atmosfera hipóxica foi obtida através da regulação da entrada dos gases na câmara, utilizando manômetros, de modo a permitir uma proporção de 19 L/min de N₂ e 1 L/min de CO₂ (95 % N₂ e 5 % de CO₂) , como descrito anteriormente (item 4.4.2).

Como apresentados no experimento anterior, podemos diferenciar células mantidas em hipóxia ou em normóxia avaliando diferentes parâmetros bioquímicos, mas quando em cultura, a diferença entre uma placa que foi mantida em hipóxia de outra mantida em normóxia pode ser observada por diferença de coloração.

Figura 30. Diferença na coloração de células em hipóxia e normóxia.

Células em hipóxia tornam-se mais ácidas ao longo do tempo, consequentemente, o meio ao qual estão condicionadas também. O meio RPMI 10%, o qual as células do experimento foram condicionadas, sofrem descoloração em pH mais ácido, a figura 30, a seguir apresenta duas placas, uma mantida em hipóxia por 24 h e outra em normóxia. Na placa de hipóxia podemos ver a descoloração.

Neste modelo celular seguimos com os experimentos de captação e extrusão.

5.8.3 – Captação e extrusão dos radiofármacos

Os experimentos seguiram o fluxograma apresentado a seguir:

Figura 31. Fluxograma do experimento de captação e extrusão.

5.8.3.1 – Comparação da captação dos radiofármacos [^{99m}Tc](O)₂HL91 e (^{18}F)FAZA em condições de normóxia e hipóxia

Como discutido anteriormente o mecanismo de retenção do radiofármaco [^{99m}Tc](O)₂HL91, intracelular não é conhecido, acreditasse que devido ao dois oxigênios apresentados na estrutura, ambos sofram redução pelas enzimas reductase, permanecendo, assim retido na célula (100).

Todavia, independentemente do mecanismo o que já se conhece é que a captação do [^{99m}Tc](O)₂HL91 pode ser até 10 vezes superior em células em hipóxia do que em normóxia, conforme descrito por Abrantes et al, 2010 (78), e Sun et al., 2010 (75). Isso pôde ser provado através do experimento realizado neste trabalho, onde na avaliação da captação em três tempos (15, 120 e 240 min), pudemos observar que as condições de hipóxia aumentaram significativamente a absorção do [^{99m}Tc](O)₂HL91 nas células, em comparação com as células em normóxia.

Figura 32. Captação de [^{99m}Tc](O)₂HL91 em células B16F10.

Já para o estudo com o radiofármaco (^{18}F)FAZA não observamos o mesmo comportamento, tendo uma captação superior apenas para o primeiro tempo de 15 min diferenciando hipóxia e normóxia, porém para os outros tempos a captação foi igual e/ou maior em condições de normóxia/hipóxia.

A estabilidade do produto não foi avaliada no momento do experimento podendo entre o tempo de síntese e utilização (aproximadamente de 2h), ter degradado, o experimento será deverá ser reavaliado em estudos futuros.

Figura 33. Captação de (^{18}F)FAZA em células B16F10.

5.8.3.2 – Comparação da extrusão dos radiofármacos em condições de normóxia e hipóxia

A eliminação ocorre por diferentes vias e varia conforme as características físico-químicas da substância a ser excretada. O 100% do produto considerado na

extrusão é o que permaneceu retido na célula depois do tempo de incubação com o radiofármaco.

A extrusão do $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ foi diferente do esperado, onde deveria ocorrer uma depuração ao longo do tempo, o que observamos foi uma captação persistente que talvez seja devido ao fármaco estar ligado a membrana plasmática das células, o qual deverá ser melhor investigado em estudos futuros.

Figura 34. Extrusão de $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ em células B16F10.

Na extrusão do $(^{18}\text{F})\text{FAZA}$ foi observado uma depuração ao longo do tempo, como esperado para ambos os estudos, tanto em hipóxia quanto em normóxia. Outro detalhe importante a ser observado é o percentual do radiofármaco em condição de hipóxia quatro vezes maior que em normóxia para o tempo de 15 min.

Figura 35. Captação de (^{18}F)FAZA em células B16F10.

5.9 – Estudos biológicos ex vivo

No desenvolvimento de radiofármacos os estudos de biodistribuição *ex vivo* e *in vivo* são de fundamental importância para conhecer o comportamento da molécula e sua efetividade para uma determinada aplicação.

5.9.1 – Biodistribuição *ex vivo* para [$^{99\text{m}}\text{Tc}$](O)₂HL91]

Embora existam vários artigos tratando da síntese, marcação e estudos de captação do [$^{99\text{m}}\text{Tc}$](O)₂HL91] em modelos celulares *in vitro*, existe somente um artigo que mostra a utilização da molécula para imagem em camundongos, mas a qualidade da imagem é baixa. Deste modo, os estudos realizados neste trabalho vão carecer de comparação por falta de dados externos.

Durante o estudo de biodistribuição *ex vivo*, onde o radiofármaco foi administrado e os animais foram sacrificados em intervalos de tempo definido, ocorreu um problema com o padrão de contagem de modo que a análise da biodistribuição teve que ser feita de modo relativo, somando-se o total de contagem obtida nos órgãos, tornando-se uma análise semiquantitativa. Os resultados apresentados na tabela 1 e figura 12 referem-se à biodistribuição do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$, sendo os valores apresentados como percentual de contagem por grama de órgão (% cpm/g órgão).

Tabela 4. Biodistribuição *ex vivo* do $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$, nos tempos de 05, 15, 30 e 60 minutos, valores apresentados em % cpm/g órgão, n=3 para cada tempo.

	5 min	15 min	30 min	60 min
sangue	14,84±2,48	11,46±2,67	6,25±0,56	3,87±,90
cérebro	0,38±0,15	0,29±0,06	0,21±0,04	0,16±0,44
tireóide	6,59±1,05	5,14±1,70	4,22±2,16	3,08±0,70
coração	5,50±0,31	5,28±1,49	2,37±0,27	1,69±2,00
pulmão	8,99±1,34	7,45±1,49	4,34±2,18	3,01±0,24
rins	26,36±3,72	37,18±6,19	34,28±2,19	27,2±2,79
estômago	5,53±1,74	3,49±0,50	7,46±3,34	6,21±2,96
baço	3,85±0,97	3,69±0,36	1,9±1,63	1,83±0,07
figado	5,38±0,54	6,60±0,80	17,59±3,56	17,60±1,92
int grosso	7,17±4,45	1,83±0,22	1,76±0,31	6,33±4,78
int delgado	3,52±0,62	4,88±0,82	11,08±1,79	23,45±1,06
osso	5,85±1,03	6,54±0,67	4,20±2,61	2,90±0,58
músculo	2,45±0,93	2,44±0,40	1,26±0,61	0,85±1,21
tumor	3,60±0,33	3,69±1,13	3,07±0,65	1,81±1,58

Figura 36. Biodistribuição *ex vivo* do $[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}$, nos tempos de 05, 15, 30 e 60 minutos, valores apresentados em % cpm/g órgão.

A depuração sanguínea do complexo parece ser um pouco lenta, pois após de 60 min a concentração relativa é de 3,6%. Órgãos de grande perfusão sanguínea, como coração e pulmão, apresentam perfil de contagem de dose similar ao que é observado para o sangue, mostrando que não ocorre captação efetiva. Embora neutro, o complexo tem baixa lipofilicidade e não é captado no cérebro. Uma das vias de excreção é o sistema renal, mas não por filtração glomerular, pois a captação do radiofármaco nos rins permanece intensa durante o tempo de análise; outra via é o sistema gastrointestinal, com o crescente acúmulo do radiofármaco no intestino grosso.

O radiofármaco apresenta captação tumoral relativamente alta (tabela 2), da ordem de 3 % nos tempos iniciais (5-30 minutos) uma boa relação com a captação no músculo, com a taxa de tumor/músculo variando de 1,47 a 2,43, permitindo a observação de regiões de contraste nas imagens. Por outro lado, a relação com o

sangue é baixa, menor que 0,5 %, mas se observa que entre os tempos de 5 e 60 minutos o valor dobrou, passando de 0,24 para 0,46.

Tabela 5. Biodistribuição *ex vivo* do [^{99m}Tc](O) $_2$ HL91], razão entre os órgão de interesse (tumor/sangue e tumor/ músculo), valores apresentados em percentual (%).

	5 min	15 min	30 min	60 min
Tumor/sangue	0,24	0,32	0,49	0,46
Tumor/músculo	1,47	1,51	2,43	2,12

A hipótese para a baixa razão entre os órgão de interesse como o tumor/sangue, foi o tempo de captação (máximo de 60 min) *versus* o tempo de depuração sanguínea, então refizemos o experimento com os tempos de 120 e 240 min. Os resultados estão apresentados no figura 38, correspondente da tabela 06.

Onde apresenta um acúmulo persistente no sangue nos dois tempos com concentração relativa de 1,5%, porém metade do observado no tempo de até 1 h do experimento anterior. Órgãos de excreção ainda apresentam excesso de acúmulo, como fígado, intestino grosso/ delgado, estômago e rins.

Figura 37. Gráfico da biodistribuição *ex vivo* do $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$, nos tempos de 120 e 240 minutos, valores apresentados em % cpm/g órgão.

Tabela 6. Biodistribuição *ex vivo* do $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$, nos tempos de 120 e 240 minutos, valores apresentados em % cpm/g órgão, n=3 para cada tempo.

	120 min	240 min
sangue	1,09 ± 0,45	1,54 ± 0,91
cérebro	0,21 ± 0,03	0,16 ± 0,02
tireóide	2,1 ± 0,57	0,89 ± 0,44
coração	1,12 ± 0,29	0,56 ± 0,08
pulmão	1,66 ± 0,26	0,76 ± 0,50
rins	4,32 ± 1,23	3,12 ± 0,41
estômago	4,44 ± 1,36	5,41 ± 2,20
baço	1,71 ± 0,32	1,33 ± 0,26
fígado	10,0 ± 0,79	7,76 ± 6,38
IG	9,0 ± 1,49	32,9 ± 12,1
ID	17,5 ± 1,99	21,9 ± 10,6
osso	0,99 ± 0,18	0,79 ± 0,52
músculo	0,83 ± 0,27	0,54 ± 0,33
tumor	2,89 ± 0,54	2,66 ± 0,06

Tabela 7. Biodistribuição *ex vivo* do [^{99m}Tc](O) $_2$ HL91], razão entre os órgão de interesse (tumor/sangue e tumor/ músculo), valores apresentados em percentual (%).

	120 min	240 min
Tumor/sangue	3,01± 1,33	2,46 ± 0,93
Tumor/músculo	2,34 ± 0,24	1,94 ± 0,31

Yutani ET al, 1999 ([86](#)), descreveu que para tumor de Walker-256 implantados em ratos Wistar, a captação máxima no tumor ocorreu em 2h ($0.897 \pm 0.118 \% \text{ID}$) e depois deste tempo observa uma decaimento de atividade gradual no tumor.

5.9.2 – Biodistribuição *ex vivo* para (^{18}F)FAZA

Ao utilizarmos o (^{18}F)FAZA, produto referência para detecção de regiões de hipóxia, vimos uma captação alta em osso e músculo (figura 44), o que não era esperado, já que Souvatzoglou, 2007 relata haver uma baixa captação nesses tecidos ([101](#)). No entanto a captação em rins, fígado e trato gastrointestinal condiz com o relatado na literatura ([56](#), [101](#))

As relações T/M e T/S para o (^{18}F)FAZA podem ser visualizadas na figura 45, e demonstram a especificidade desse radiofármaco.

Figura 38. Gráfico da biodistribuição do (^{18}F)FAZA em camundongos C57Bl/6 implantados com tumores derivados de células B16F10. Dados fornecidos em % de dose injetada por grama de órgão.

Figura 39. Gráfico demonstrando as relações T/M e T/S ao longo do tempo de biodistribuição do (^{18}F)FAZA em camundongos C57Bl/6 implantados com tumores derivados de células B16F10. A relação é estabelecida em % de dose por grama de órgão.

5.10 – Biodistribuição *in vivo* (imagem)

5.10.1 – Biodistribuição *in vivo* para [^{99m}Tc](O)₂HL91]

Uma das grandes vantagens dos radiofármacos é poder acompanhar, por imagem e “em tempo real” a biodistribuição *in vivo*. Para este estudos foi selecionado o animal que possuía o tumor apalpáveis, de aproximadamente 7 mm³.

Optamos por utilizar como de anestesia, o isoflurano/oxigênio. Relatado na literatura por Kersemans ET al, 2011 , indicando que a captação dos radiofármacos marcadores de hipóxia pode ser alterada dependendo do anestésico utilizado, . e a xilazina/ketamina (1:10 – diluído 3 vezes do volume inicial).

As imagens de SPECT/CT referente aos tempos de 120 e 240 minutos após a administração do [^{99m}Tc](O)₂HL91]. Na imagem por CT pudemos delimitar a região do tumor. Na imagem cintilográfica realizada com o 2 horas o complexo [^{99m}Tc](O)₂HL91] foi retido no tumor, como pode ser observa nas imagens de SPECT/CT (figura 41).

Figura 40. Biodistribuição in vivo do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ em SPECT/CT, $t=2\text{h}$.

Houve um acúmulo aparente do radiofármaco no abdome decorrente da via excreção gastrointestinal e renal do próprio radiofármaco, concomitante com o observado na biodistribuição *ex vivo* e com dados da literatura ([102](#), [103](#)), onde no tempo de 2h os órgãos fígado, estômago, intestinos e rins, ainda tem uma captação muito alta. Porém os rins além de um órgão de excreção para o radiofármaco $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$, apresenta uma área de hipóxia na medula renal ([104](#)), talvez por isso deva ter um *clearance* mais tardio.

5.10.2 – Biodistribuição *in vivo* para (^{18}F)FAZA

Nas imagens de PET, a captação foi claramente visível em tumores para o marcador [$^{99\text{m}}\text{Tc}$](O)₂HL91], como discutido anteriormente, mesmo que em menor intensidade o [^{18}F]FAZA também apresentou captação no tempo de 1 h. Todavia, diversos autores já relataram a inespecificidade do [$^{99\text{m}}\text{Tc}$](O)₂HL91] ([88](#), [105](#), [106](#)), podendo marcar tanto áreas de hipóxia tanto quanto área de necrose, em contrapartida há vários relatos ([56](#), [107](#)) apresentando somente áreas de hipóxia marcadas pelo (^{18}F)FAZA.

Figura 41. Biodistribuição *in vivo* do (^{18}F)FAZA em PET/CT, t= 1h .

Um achado neste animal foi a captação de uma região no abdome, a qual não representava nenhum órgão de excreção. Fizemos então a excisão dos órgão (24 h após a imagem) para se certificar de qual seria o órgão, encontramos um baço em estado avançado de necrose. Provavelmente devido a captação apenas de áreas de hipóxia. Outra região com intensa captação foi a vesícula biliar, via de excreção do (^{18}F)FAZA ([56](#), [101](#)).

Figura 42. Biodistribuição in vivo do $(^{18}\text{F})\text{FAZA}$ apresentando intensa captação na vesícula biliar (via de excreção) e baço necrótico.

5. 10.3 – Autorradiografia

O complexo $[[^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ se mostrou um bom marcador de regiões de hipóxia – não específico. Assim foi apresentado também por diversos autores que correlacionaram áreas de hipóxia (hipercaptantes), com diversas outras doenças ([86](#), [103](#), [105](#), [108](#)).

Podemos observar na figura 33 (A), as áreas mais captantes tendem ao tom azul escuro. Comparando a imagem da autorradiográfica com a foto do corte do tumor, vemos que a área onde há sangue, ou perfusão sanguínea, corresponde com a

área de menor captação do radiofármaco, e o contrário ocorre no lado oposto do tumor.

O processo se repete para outro corte de tumor, onde as coloração está apresentada em escala invertida, e o mesmo comportamento se repete, onde talvez tenha uma área de hipóxia podemos observar intensa captação, e onde potencialmente há aporte sanguíneo há uma captação muito baixa.

Figura 43. Autorradiografia do tumor de células B16F10 com o complexo $[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}$.

Como sabidamente sabe-se que a medula do rim pode apresenta regiões de hipóxia, também fizemos a autorradiografia com os mesmo procedimentos, onde podemos também visualizar algumas regiões hipercaptantes.

Figura 44. Autorradiografia do rim de camundongo C57/Bl com o complexo $[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}$.

6 - CONCLUSÕES

A síntese do ligante é um método complexo, e apresentou ao final um rendimento relativamente baixo, mas foi realizado em vidraria adaptada, e que ajustando alguns parâmetros como tempo de reação e temperatura potencialmente pode melhorar.

O complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ é de fácil preparação, apresenta ótimo rendimento, mas ainda deve ser otimizado para minimizar a quantidade de massa do ligante utilizada.

O complexo apresentou carga neutra por eletroforese, e não há relatos desta metodologia na literatura. A eficiência de marcação por cromatografia em camada delgada apresentou valores superior a 98 %, em concordância com o obtido por CLAE. Deste modo, considerando os quesitos eficácia, tempo de análise e custo, o sistema em camada delgada pode ser utilizado na rotina.

A utilização da eletroforese como meio de avaliar a estabilidade dos complexos de $[[^{99m}\text{Tc}]$ tecnécio com o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$, frente a cisteína e histidina, foi eficiente, mas deve ser acompanhada de uma avaliação por CLAE, sistema rotineiramente aceito para o estudos de estabilidade, mas que ainda deverá ser desenvolvido. Os resultados também demonstraram que os complexos são estáveis (90%) até 4 horas em contato com aminoácidos.

Os testes de ligação dos complexos de $[[^{99m}\text{Tc}]$ tecnécio ao plasma ou à albumina demonstraram que o complexo se liga a albumina, sendo pouco provável a transquelação dada a estabilidade dele frente a L-cisteína e L-histidina. Todavia, a taxa

de ligação ao plasma ou à albumina são diferentes, demonstrando a impossibilidade de se utilizar um componente ou outro como similares.

Os estudos de captação *in vitro* demonstraram a dependência da condição de hipóxia para a captação do $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ e parcialmente para o $(^{18}\text{F})\text{FAZA}$.

Os estudos de biodistribuição *ex vivo* permitiram estabelecer que o sistema gastrointestinal é a principal via de excreção para os $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ enquanto que para o $(^{18}\text{F})\text{FAZA}$ a eliminação renal também é intensa. As relações tumor/músculo e tumor/sangue são de 2,34 e 3,01 para o $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$, as 120 minutos e de 1,38 e 1,39, respectivamente para o $(^{18}\text{F})\text{FAZA}$, aos 60 minutos, valores que são considerados aceitáveis quando da relação órgão alvo/órgão não alvo.

Ambos os radiofármacos foram capazes de demonstrar captação não homogênea nos tumores, sugerindo tratar-se de áreas de hipóxia. Todavia, a captação do $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ foi mais intensa, pode estar relacionada também a acúmulo em regiões de necrose.

As imagens por autorradiografia permitiram determinar captação do $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2\text{HL91}]$ com diferentes intensidades no tecido, mas a impossibilidade de obter dados histoquímicos e imunohistoquímico comprometeram a análise dos dados.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INCA. (Instituto Nacional de Câncer) www.inca.gov.br. 2013 [cited 10/08/13].
2. Weinberg RA. The biology of cancer: Garland Science New York; 2007.
3. Medical N. <http://www.news-medical.net/health/What-are-Proto-Oncogenes.aspx> 2013 [cited 09/08/2013].
4. Enholm B, Paavonen K, Ristimäki A, Kumar V, Gunji Y, Klefstrom J, et al. Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene*. 1997;14(20):2475-83.
5. Ferluga J. Potential role of anti-oncogenes in ageing. *Mechanisms of ageing and development*. 1990;53(3):267-75.
6. Lutz W, Krajewska B. Oncoproteins and anti-oncoproteins in blood serum as biomarkers of early health effects induced by occupational and environmental carcinogens]. *Medycyna pracy*. 1996;47(5):511.
7. Harris AL. Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2(1):38-47.
8. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407(6801):249-57.
9. Angio W. <http://www.angioworld.com/cancer.htm>. 2013 [cited 10/08/2013].
10. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer research*. 1989;49(23):6449-65.
11. de Oliveira RB, Alves RJ. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. *Química nova*. 2002;25(6/A):976-84.
12. Anderson K, Jajeh J, Guinan P, Rubenstein M. In vitro effects of dichloroacetate and CO₂ on hypoxic HeLa cells. *Anticancer research*. 2009;29(11):4579-88.
13. Szabó C. Mechanisms of cell necrosis. *Critical care medicine*. 2005;33(12):S530-S54.
14. Almeida LMd. Esquema descrevendo os passos responsáveis pela lesão celular em casos de hipóxia. http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Les%C3%A3o_por_hip%C3%B3xia.png. 2013 [cited 10/08/2013].
15. Vaupel P, Harrison L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *The oncologist*. 2004;9(Supplement 5):4-9.
16. Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute*. 2007;99(19):1441-54.
17. Lee B-F, Chiu N-T, Hsia C-C, Shen L-H. Accumulation of Tc-99m HL91 in Tumor Hypoxia: *In Vitro* Cell Culture and *In Vivo* Tumor Model. *The Kaohsiung journal of medical sciences*. 2008;24(9):461-72.
18. Chapman JD. Hypoxic sensitizers--implications for radiation therapy. *The New England journal of medicine*. 1979;301(26):1429-32.
19. Ballinger JR, editor. Imaging hypoxia in tumors. *Seminars in nuclear medicine*; 2001: Elsevier.

20. Lin AJ, Cosby LA, Shansky CW, Sartorelli AC. Potential bioreductive alkylating agents. 1. Benzoquinone derivatives. *Journal of medicinal chemistry*. 1972;15(12):1247-52.
21. Brown JM. SR 4233 (tirapazamine): a new anticancer drug exploiting hypoxia in solid tumours. *British journal of cancer*. 1993;67(6):1163.
22. Rockwell S. Cytotoxicities of mitomycin C and X rays to aerobic and hypoxic cells *in vitro*. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*. 1982;8(6):1035-9.
23. Sheldon P, Hill S. Hypoxic cell radiosensitizers and local control by X-ray of a transplanted tumour in mice. *British journal of cancer*. 1977;35(6):795.
24. Zeman EM, Brown JM, Lemmon MJ, Hirst VK, Lee WW. SR-4233: a new bioreductive agent with high selective toxicity for hypoxic mammalian cells. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*. 1986;12(7):1239-42.
25. Adams G. Chemical radiosensitization of hypoxic cells (abstract). *British medical bulletin*. 1973;29(1):48-53.
26. Rauth A, Kaufman K. In vivo testing of hypoxic radiosensitizers using the KHT murine tumour assayed by the lung-colony technique. *British Journal of Radiology*. 1975;48(567):209-20.
27. Taylor YC, Rauth AM. Differences in the toxicity and metabolism of the 2-nitroimidazole misonidazole (Ro-07-0582) in HeLa and Chinese hamster ovary cells. *Cancer research*. 1978;38(9):2745-52.
28. La-Scalea MA. Comportamento voltamétrico e mecanismo de ação biológica de nitroimidazóis; Mechanism of biological action and voltammetric behaviour of nitroimidazoles. *Rev farm bioquim Univ São Paulo*. 1998;34(2):59-75.
29. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home>. [cited 10/08/2013].
30. Mather SJ. Innovation in radiopharmacy: progress and constraints? *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2001;28(4):405-7.
31. Santos RLSR, Faintuch BL, Teodoro R. Estudos *in vitro* e *in vivo* de análogo da timidina marcada com complexo organometálico de tecnécio-99m para potencial uso em diagnóstico tumoral. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2008;44:85-95.
32. Schlyer DJ, Bastos MA, Alexoff D, Wolf AP. Separation of [¹⁸F] fluoride from [¹⁸O] water using anion exchange resin. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation Part A Applied Radiation and Isotopes*. 1990;41(6):531-3.
33. Asti M, Grassi E, Sghedoni R, De Pietri G, Fioroni F, Versari A, et al. Purification by ozonolysis of ¹⁸O enriched water after cyclotron irradiation and the utilization of the purified water for the production of [¹⁸F]-FDG (2-deoxy-2-[¹⁸F]-fluoro-D-glucose). *Applied radiation and isotopes*. 2007;65(7):831-5.
34. Lee SJ, Oh SJ, Chi DY, Kang SH, Kil HS, Kim JS, et al. One-step high-radiochemical-yield synthesis of [¹⁸F] FP-CIT using a protic solvent system. *Nuclear medicine and biology*. 2007;34(4):345-51.
35. Hamacher K, Coenen HH, Stöcklin G. Efficient stereospecific synthesis of no-carrier-added 2-[¹⁸F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose using aminopolyether supported

nucleophilic substitution. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*. 1986;27(2):235-8.

36. Pomper MG, Katzenellenbogen JA, Welch MJ, Brodack JW, Mathias CJ. 21-[¹⁸F] fluoro-16. alpha.-ethyl-19-norprogesterone. Synthesis and target tissue selective uptake of a progestin receptor-based radiotracer for positron emission tomography. *Journal of medicinal chemistry*. 1988;31(7):1360-3.

37. Jewett DM, Toorongian SA, Bachelor MA, Kilbourn MR. Extraction of [¹⁸F] fluoride from [¹⁸O] water by a fast fibrous anion exchange resin. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation Part A Applied Radiation and Isotopes*. 1990;41(6):583-6.

38. Block D, Coenen HH, Stöcklin G. The NCA nucleophilic ¹⁸F-fluorination of 1, N-disubstituted alkanes as fluoroalkylation agents. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. 1987;24(9):1029-42.

39. Kim DW, Ahn D-S, Oh Y-H, Lee S, Kil HS, Oh SJ, et al. A new class of S_N2 reactions catalyzed by protic solvents: facile fluorination for isotopic labeling of diagnostic molecules. *Journal of the American Chemical Society*. 2006;128(50):16394-7.

40. Lee J, Kim M, Hong CK, Shim SE. Measurement of the dispersion stability of pristine and surface-modified multiwalled carbon nanotubes in various nonpolar and polar solvents. *Measurement Science and Technology*. 2007;18(12):3707.

41. Kim CS, Lee S, Gomez ED, Anthony JE, Loo Y-L. Solvent-dependent electrical characteristics and stability of organic thin-film transistors with drop cast bis (triisopropylsilylethynyl) pentacene. *Applied Physics Letters*. 2008;93:103302.

42. Young TE, Amstutz E. Halogen Reactivities. Certain Heterocyclic Iminohalide Systems1. *Journal of the American Chemical Society*. 1951;73(10):4773-5.

43. Toorongian SA, Mulholland GK, Jewett DM, Bachelor MA, Kilbourn MR. Routine production of 2-deoxy-2-[¹⁸F] fluoro-d-glucose by direct nucleophilic exchange on a quaternary 4-aminopyridinium resin. *International journal of radiation applications and instrumentation Part B Nuclear medicine and biology*. 1990;17(3):273-9.

44. Dolle RE, Bourdonnec BL, Goodman AJ, Morales GA, Thomas CJ, Zhang W. Comprehensive survey of chemical libraries for drug discovery and chemical biology: 2008. *Journal of combinatorial chemistry*. 2009;11(5):739-90.

45. Varagnolo L, Stokkel M, Mazzi U, Pauwels E. ¹⁸F-labeled radiopharmaceuticals for PET in oncology, excluding FDG. *Nuclear medicine and biology*. 2000;27(2):103-12.

46. Mees G, Dierckx R, Vangestel C, Van de Wiele C. Molecular imaging of hypoxia with radiolabelled agents. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2009;36(10):1674-86.

47. Grunbaum Z, Freau SJ, Krohn KA, Wilbur DS, Magee S, Rasey JS. Synthesis and characterization of congeners of misonidazole for imaging hypoxia. *J Nucl Med*. 1987;28(1):68-75.

48. Rasey JS, Grunbaum Z, Magee S, Nelson NJ, Olive PL, Durand RE, et al. Characterization of radiolabeled fluoromisonidazole as a probe for hypoxic cells. *Radiation research*. 1987;111(2):292-304.

49. Rasey JS, Nelson NJ, Chin L, Evans ML, Grunbaum Z. Characteristics of the binding of labeled fluoromisonidazole in cells in vitro. *Radiation research*. 1990;122(3):301-8.
50. Rasey JS, Hofstrand PD, Chin LK, Tewson TJ. Characterization of [18F] fluoroetanidazole, a new radiopharmaceutical for detecting tumor hypoxia. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*. 1999;40(6):1072-9.
51. Kachur AV, Dolbier Jr WR, Evans SM, Shiue C-Y, Shiue GG, Skov KA, et al. Synthesis of new hypoxia markers EF1 and [¹⁸F]-EF1. *Applied radiation and isotopes*. 1999;51(6):643-50.
52. Yang DJ, Wallace S, Cherif A, Li C, Gretzer MB, Kim EE, et al. Development of F-18-labeled fluoroerythronitroimidazole as a PET agent for imaging tumor hypoxia. *Radiology*. 1995 Mar;194(3):795-800.
53. Evans SM, Kachur AV, Shiue C-Y, Hustinx R, Jenkins WT, Shiue GG, et al. Noninvasive Detection of Tumor Hypoxia Using the 2-Nitroimidazole [¹⁸F] EF1. *Journal of Nuclear Medicine*. 2000;41(2):327-36.
54. Sorger D, Patt M, Kumar P, Wiebe LI, Barthel H, Seese A, et al. [18F] Fluoroazomycinarabinofuranoside (18FAZA) and [18F] Fluoromisonidazole (18FMISO): a comparative study of their selective uptake in hypoxic cells and PET imaging in experimental rat tumors. *Nuclear medicine and biology*. 2003;30(3):317-26.
55. Busk M, Horsman MR, Jakobsen S, Keiding S, van der Kogel AJ, Bussink J, et al. Imaging hypoxia in xenografted and murine tumors with 18F-fluoroazomycin arabinoside: a comparative study involving microPET, autoradiography, PO2-polarography, and fluorescence microscopy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2008 Mar 15;70(4):1202-12.
56. Souvatzoglou M, Grosu A, Röper B, Krause B, Beck R, Reischl G, et al. Tumour hypoxia imaging with [18F] FAZA PET in head and neck cancer patients: a pilot study. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2007;34(10):1566-75.
57. Linder KE, Chan YW, Cyr JE, Malley MF, Nowotnik DP, Nunn AD. TcO (PnAO-1-(2-nitroimidazole))[BMS-181321], a new technetium-containing nitroimidazole complex for imaging hypoxia: synthesis, characterization, and xanthine oxidase-catalyzed reduction. *Journal of medicinal chemistry*. 1994;37(1):9-17.
58. Ballinger JR, Kee JWM, Rauth AM. In vitro and in vivo evaluation of a technetium-99m-labeled 2-nitroimidazole (BMS181321) as a marker of tumor hypoxia. *The Journal of nuclear medicine*. 1996;37(6):1023-31.
59. Melo T, Duncan J, Ballinger JR, Rauth AM. BRU59-21, a second-generation 99mTc-labeled 2-nitroimidazole for imaging hypoxia in tumors. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2000;41(1):169-76.
60. Barron B, Grotta J, Lamki L, Villar C, Ephron V, Patel D, et al., editors. Preliminary experience with technetium-99m BMS-181321, a nitroimidazole, in the detection of cerebral ischemia associated with acute stroke 1996: *Journal of Nuclear Medicine*: 37, 5 (suppl), p.1218.
61. Melo T, Ballinger JR, Rauth AM. Role of NADPH: cytochrome P450 reductase in the hypoxic accumulation and metabolism of BRU59-21, a technetium-99m-nitroimidazole for imaging tumor hypoxia. *Biochemical pharmacology*. 2000;60(5):625-34.

62. Nicolini M, Bandoli G, Mazzi U. Technetium and Rhenium in Chemistry and Nuclear Medicine 4: S.G.E.; 1995.
63. Brauers G, Archer C, Burke J. The chemical characterization of the tumor imaging agent ^{99m}Tc -HL91. *Eur J Nucl Med*. 1997;24:943.
64. Zhang X, Melo T, Ballinger J, Rauth A. Studies of ^{99m}Tc -BnAO (HL-91): a non-nitroaromatic compound for hypoxic cell detection. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*. 1998;42(4):737-40.
65. Beyer T, Townsend DW, Brun T, Kinahan PE, Charron M, Roddy R, et al. A combined PET/CT scanner for clinical oncology. *Journal of Nuclear Medicine*. 2000;41(8):1369-79.
66. Kluetz PG, Meltzer CC, Villemagne VL, Kinahan PE, Chander S, Martinelli MA, et al. Combined PET/CT imaging in oncology: impact on patient management. *Clinical Positron Imaging*. 2000;3(6):223-30.
67. Blodgett TM, Meltzer CC, Townsend DW. PET/CT: Form and Function1. *Radiology*. 2007;242(2):360-85.
68. Schillaci O. Hybrid SPECT/CT: a new era for SPECT imaging? *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2005;32(5):521-4.
69. Buck AK, Nekolla S, Ziegler S, Beer A, Krause BJ, Herrmann K, et al. Spect/Ct. *Journal of Nuclear Medicine*. 2008;49(8):1305-19.
70. Bockisch A, Freudenberg LS, Schmidt D, Kuwert T, editors. Hybrid imaging by SPECT/CT and PET/CT: proven outcomes in cancer imaging. *Seminars in nuclear medicine*; 2009: Elsevier.
71. Mariani G, Bruselli L, Kuwert T, Kim EE, Flotats A, Israel O, et al. A review on the clinical uses of SPECT/CT. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2010;37(10):1959-85.
72. Bailer JC. *Inorganic Synthesis IV*. Mc Graw-Hill Book Company, Inc 1953.
73. Voguel AI. *A text book of Practical Organic Chemistry*. 3ed. Longmans, Green and Cabritol London: 1956.
74. Murmann RK. *Coordination Compounds*. 1956:521.
75. Sun X, Chu T, Wang X. Preliminary studies of ^{99m}Tc -BnAO and its analogues: synthesis, radiolabeling and in vitro cell uptake. *Nuclear medicine and biology*. 2010;37(2):117-23.
76. Johannsen B, Syhre R, Spies H, Münze R. Chemical and biological characterization of different Tc complexes of cysteine and cysteine derivatives. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*. 1978;19(7):816.
77. Siim BG, Laux WT, Rutland MD, Palmer BN, Wilson WR. Scintigraphic imaging of the hypoxia marker ^{99m}Tc -labeled 2, 2'-(1, 4-diaminobutane) bis (2-methyl-3-butanone) dioxime (^{99m}Tc -labeled HL-91; Prognox): noninvasive detection of tumor response to the antivasculature agent 5, 6-dimethylxanthenone-4-acetic acid. *Cancer research*. 2000;60(16):4582-8.
78. Abrantes AM, Serra MES, Gonçalves AC, Rio J, Oliveirosa B, Laranjoa M, et al. Hypoxia-induced redox alterations and their correlation with ^{99m}Tc -MIBI and ^{99m}Tc -HL-91 uptake in colon cancer cells. *Nuclear Medicine and Biology*. 2010;37:125-32.
79. Krohn KA, Jansholt A-L. Radiochemical quality control of short-lived radiopharmaceuticals. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes*. 1977;28(1-2):213-27.

80. Li L, Xu Y, Su Z. The correlation of serum protein association and cellular uptake with lipophilicity and polarity of the backbone substituents of the technetium-99m-amine-oxime chelates. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. 2007;50(2):91-5.
81. Stalteri MA, Bansal S, Hider R, Mather SJ. Comparison of the Stability of Technetium-Labeled Peptides to Challenge with Cysteine. *Bioconjugate Chemistry*. 1998 1999/01/01;10(1):130-6.
82. Xavier C, Giannini C, Gano L, Maiorana S, Alberto R, Santos I. Synthesis, characterization, and evaluation of a novel 99mTc (CO) 3 pyrazolyl conjugate of a peptide nucleic acid sequence. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2008;13(8):1335-44.
83. Aguiar R. Condutas na cultura celular. POP: 1.1. São Paulo: Faculdade de Medicina da USP. 2009, novembro:1-10.
84. Aguiar R. Pré-lavagem e descarte de materiais. POP: 1.2. São Paulo: Faculdade de Medicina da USP. 2009, novembro:1-8.
85. Aguiar R. Cultura de linhagens celulares aderentes. POP: 1.7.1. São Paulo: Faculdade de Medicina da USP. 2009, novembro:1-9.
86. Yutani K, Kusuoka H, Fukuchi K, Tatsumi M, Nishimura T. Applicability of 99mTc-HL91, a putative hypoxic tracer, to detection of tumor hypoxia. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*. 1999;40(5):854.
87. Lee WH, Kwak D, Anthony JE, Lee HS, Choi HH, Kim DH, et al. The Influence of the Solvent Evaporation Rate on the Phase Separation and Electrical Performances of Soluble Acene-Polymer Blend Semiconductors. *Advanced Functional Materials*. 2012;22(2):267-81.
88. Liu M, Ma Z, Guo X, Zhu J, Su J. Technetium-99m-labelled HL91 and technetium-99m-labelled MIBI SPECT imaging for the detection of ischaemic viable myocardium: a preliminary study. *Clinical physiology and functional imaging*. 2012;32(1):25-32.
89. Almeida ÉVd. Desenvolvimento e validação de metodologia para radiofármacos de Tecnécio- 99m empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) [dissertação]. . São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2009 [acesso 2013-08-19] Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85131/tde-24092009-142057/>.
90. Dukhin AS, Goetz PJ. *Ultrasound for Characterizing Colloids Particle Sizing, Zeta Potential Rheology*; Elsevier Science; 2002.
91. Hanaor D, Michelazzi M, Leonelli C, Sorrell CC. The effects of carboxylic acids on the aqueous dispersion and electrophoretic deposition of ZrO₂. *Journal of the European Ceramic Society*. 2012;32(1):235-44.
92. He L, Natan MJ, Keating CD. Surface-enhanced Raman scattering: A structure-specific detection method for capillary electrophoresis. *Analytical chemistry*. 2000;72(21):5348-55.
93. Pohl HA. Some effects of nonuniform fields on dielectrics. *Journal of Applied Physics*. 1958;29(8):1182-8.
94. Aaij C, Borst P. The gel electrophoresis of DNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*. 1972;269(2):192-200.

95. Meyers JA, Sanchez D, Elwell LP, Falkow S. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *Journal of Bacteriology*. 1976;127(3):1529-37.
96. Kurihara H, Honda N, Kono Y, Arai Y. Radiolabelled agents for PET imaging of tumor hypoxia. *Current medicinal chemistry*. 2012;19(20):3282-9.
97. Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, McWilliams RR, Kottschade LA, Creagan ET, et al., editors. *Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis*. Mayo Clinic Proceedings; 2007: Elsevier.
98. de Souza APD, Borges T, Bonorino C. Expressão elevada de HspBP1 em células de melanoma murino impede o crescimento tumoral in vivo. IV Mostra de Pesquisa da Pós-Graduação – PUCRS, 2009.
99. JUNQUEIRA GJ. Modelo experimental de metástases pulmonares de melanoma murino B16-F10 em camundongos C57BL/6N com células tronco mesenquimais de pulmão de camundongo C57BL/6N transgênico: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL; 2005.
100. Jia H-M, Fang D-C, Feng Y, Zhang J-Y, Fan W-B, Zhu L. The interconversion mechanism between TcO₃⁺ and TcO₂⁺ core of 99mTc labeled amine-oxime (AO) complexes. *Theoretical Chemistry Accounts*. 2008;121(5-6):271-8.
101. Beck R, Röper B, Carlsen JM, Huisman MC, Lebschi JA, Andratschke N, et al. Pretreatment 18F-FAZA PET predicts success of hypoxia-directed radiochemotherapy using tirapazamine. *Journal of Nuclear Medicine*. 2007;48(6):973-80.
102. Jiang X-D, Dai P, Qiao Y, Wu J, Song D-A, Li S-Q. Clinical study on the recombinant human endostatin regarding improving the blood perfusion and hypoxia of non-small-cell lung cancer. *Clinical and Translational Oncology*. 2012;14(6):437-43.
103. Suzuki T, Nakamura K, Kawase T, Kubo A. [Biodistribution of hypoxic marker, 99mTc-HL91 (4, 9-diaza-3, 3, 10, 10-tetramethyldodecan-2, 11-dione dioxime)] Kaku igaku The Japanese journal of nuclear medicine. 2001;38(4):333-41(abstract).
104. Machado FG. Efeito da administração de sunitinibe como terapia anti-angiogênica em ratos submetidos à ablação renal de 5/6 [tese]. São Paulo: , Faculdade de Medicina; 2012 [acesso 2013-08-19] Disponível em: <http://www.tesesuspbr/teses/disponiveis/5/5148/tde-13062012-141239/>. 2012.
105. Tatsumi M, Yutani K, Kusuoka H, Nishimura T. Technetium-99m HL91 uptake as a tumour hypoxia marker: relationship to tumour blood flow. *European journal of nuclear medicine*. 1999;26(2):91-4.
106. Yao Z, Qu W, Zhou Y, Zhu M, Zhu L. 99mTc-HL91" hot spot" imaging of mice bearing human carcinoma by gamma camera and the effects of tumor necrosis on imaging. *Chinese medical journal*. 2000;113(5):404.
107. Hayashi K, Furutsuka K, Takei M, Muto M, Nakao R, Aki H, et al. High-yield automated synthesis of [¹⁸F] fluoroazomycin arabinoside ([¹⁸F] FAZA) for hypoxia-specific tumor imaging. *Applied radiation and isotopes*. 2011;69(7):1007-13.
108. Suzuki T, Nakamura K, Kawase T, Kubo A. Monitoring of response to radiation therapy for human tumor xenografts using 99mTc-HL91 (4, 9-diaza-3, 3, 10, 10-tetramethyldodecan-2, 11-dione dioxime). *Annals of nuclear medicine*. 2003;17(2):131-8.