Adriano Radin

**Preparo e avaliação de complexos de
[^{99m}Tc]tecnécio aquacarbonil contendo ligantes
1,2-diaminoetano-N-substituídos para detecção de
tumores**

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

Programa de: Oncologia

Orientador: Dr. Carlos Alberto Buchpiguel

São Paulo
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Radín, Adriano

Preparo e avaliação de complexos de [^{99m}Tc]tecnécio aquacarbonil contendo
ligantes 1,2-diaminoetano-N-substituídos para detecção de tumores / Adriano
Radín. -- São Paulo, 2010.

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

Orientador: Carlos Alberto Buchpiguel.

Descritores: 1.Tecnécio 99m 2.Neoplasias de mama 3.Melanoma experimental
4.Tricarbonil 5.Camundongos 6.In vitro

USP/FM/DBD-216/10

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus, pois estou aqui graças a ele.

Aos meus pais, Carlos e Rosana, pela educação, pelos valores, pelo respeito, pelo incentivo, por minha formação pessoal, enfim por serem meus pais.

Ao meu irmão, Renato, por seu companheirismo, atenção, pelos incentivos, seremos sempre irmãos.

A minha esposa Sheila, por seu companheirismo, cumplicidade, atenção e pelos incentivos.

Aos meus avós (*in memoriam*) Oswaldo e Antonia; João e Eva, pois me ensinaram que a vida não é feita apenas do presente.

Amo vocês.

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Alberto Buchpiguel, por ter acreditado neste trabalho e pelo voto de confiança.

Agradeço ao Dr. Fabio Luiz Navarro Marques, pelos ensinamentos, interesse, paciência, pela amizade, pelo voto de confiança.

Agradeço ao Prof. Dr. Roger Chammas pelos ensinamentos, apoio e acolhimento.

Agradeço a Profa. Dra. Maria Aparecida Nagai pelos ensinamentos, apoio e acolhimento.

Agradeço a Monick, pela ajuda, apoio e amizade.

Agradeço a Carolina, pela ajuda, apoio e amizade.

Agradeço a Josy, a Marluce, a Simone, e ao André pela ajuda na realização da parte técnica, pelo apoio e amizade

Agradeço aos físicos, biomédicos e médicos da clínica do centro de medicina nuclear, pelo apoio e acolhimento.

Agradeço aos alunos do grupo do Prof. Dr. Roger Chammas, Camila, Andréia e Rodrigo, pela ajuda na realização deste trabalho.

Agradeço aos alunos do grupo da Profa. Dra. Maria Aparecida Nagai, Michelly e Daniel, pela ajuda na realização deste trabalho.

Agradeço aos alunos do grupo da Prof. Dr. José Eduardo Krieger, Luciene e ao “Jaú” pela ajuda na realização deste trabalho.

Agradeço aos alunos do Prof. Dr. Durvanei do Instituto Butantã, Kleber e ao Thiago, pela ajuda apoio e amizade.

Ao pessoal do biotério da FMUSP, pelo fornecimento dos animais.

A todos que me ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

A FAPESP pelo apoio financeiro (Projeto 07/52431-4).

Sumário

1 Introdução	1
1.1 O [^{99m}Tc]tecnécio	2
1.2 Os radiofármacos de [^{99m}Tc]tecnécio	3
1.2.1 Preparo dos radiofármacos	3
1.2.2 Radiofármacos de [^{99m}Tc]tecnécio de primeira e segunda gerações	5
1.2.3 Radiofármacos de [^{99m}Tc]tecnécio de terceira geração	8
1.2.4 O complexo de [^{99m}Tc]tecnécio Aquacarbonil	10
1.3 Detecção de tumores utilizando complexos catiônicos de [^{99m}Tc]tecnécio	12
1.3.1 Modificações moleculares em complexos catiônicos de [^{99m}Tc]tecnécio e sua influência na detecção de tumores	14
2 Objetivo	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	20
3 Material e métodos	21
3.1 Material	21
3.1.1 Equipamentos e sistemas	21
3.1.2 Reagentes e solventes	22
3.1.3 Misturas e soluções	23
3.1.4 Células	24
3.1.5 Animais	24
3.1.6 Análise estatística	25
3.2 Métodos	25

3.2.1	Preparação do complexo $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tecnécio-triaqua-tricarbonil} - [[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$	25
3.2.2	Preparação do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{EN})_3(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ e estabilidade da ligação na presença de NH_3	26
3.2.3	Preparação dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$	26
3.3	Avaliação de parâmetros físico-químico dos complexos	27
3.3.1	Avaliação da eficiência de marcação e da pureza radioquímica	27
3.3.1.1	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	27
3.3.1.2	Eletroforese em papel dos complexos $[^{99m}\text{Tc}](\text{NH}_3)_3(\text{CO})_3]^+$, $[^{99m}\text{Tc}](\text{EN})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]$ e $[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$	27
3.3.2	Determinação do coeficiente de partição	28
3.3.3	Avaliação da estabilidade <i>in vitro</i> dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ em presença de cisteína ou histidina	28
3.3.4	Avaliação, <i>in vitro</i> , da captação celular dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$	29
3.3.4.1	Captação em células MCF-7 e MDA-MB-231 não aderidas, em meio de cultura sem SFB	29
3.3.4.2	Captação em células MCF-7 e MDA-MB-231 não aderidas, em meio de cultura suplementado com 10% de SFB	30
3.3.4.3	Captação em células MCF-7, MDA-MB-231 e B16F10 aderidas, em meio de cultura suplementado com 10% de SFB	30
3.3.4.4	Avaliação da taxa de eliminação em células MCF-7 e MDA-MB-231 não aderidas, em meio de cultura suplementado com 10% de SFB	31
3.3.4.5	Avaliação da taxa de eliminação em células MCF-7, MDA-MB-231 e B16F10 aderidas, em meio de cultura suplementado com 10% de SFB	32

3.3.4.6	Determinação da distribuição subcelular dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$	33
3.3.5	Avaliação da biodistribuição dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ em camundongos C57Bl6 com implantes de células B16F10	34
4	Resultados	36
4.1	Avaliação da eficiência de marcação e das características eletrônicas dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, utilizando eletroforese	36
4.2	Controle de qualidade dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ utilizando CLAE	45
4.2.1	Eficiência de marcação dos complexos	45
4.2.2	Estabilidade <i>in vitro</i> dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ em presença de cisteína ou histidina	48
4.3	Determinação do coeficiente de partição	54
4.4	Determinação da taxa de captação celular	54
4.4.1	Em células MCF-7 e MDA-MB-231 não aderidas, na ausência ou presença de SFB	54
4.4.2	Em células MCF-7, MDA-MB-231 e B16F10 aderidas, na presença de SFB	59
4.5	Determinação da taxa de eliminação	62
4.5.1	Eliminação em células MCF-7, MMDA-MB-231 e B16F10 aderidas ou não, na presença de SFB	62
4.6	Distribuição subcelular dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$	67
4.7	Avaliação da Biodistribuição <i>in vivo</i> dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$	68

5 Discussão	72
5.1 Parâmetros físico-químico	72
5.2 Parâmetros biológicos	81
6 Conclusões	86
7 Referências bibliográficas	88

Abreviações

μL	Microlitro
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
^{18}F	Isótopo de massa 18 do flúor
^{99}Mo	Isótopo de massa 99 do molibdênio
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	Isótopo metaestável de massa 99 do tecnécio
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO	Hexametilpropilenamina Oxima marcada com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tecnécio
^{111}In	Isótopo de massa 111 do índio
^{123}I	Isótopo de massa 123 do iodo
^{131}I	Isótopo de massa 131 do iodo
(^{111}In) -Somatostatina	Somatostatina marcada com índio-111
$(^{131}\text{I}/^{123}\text{I})$ metaiodobenzilguanidina	Metaiodobenzilguanidina marcada com (^{131}I) iodo ou com (^{123}I) iodo
(^{201}Tl) tálio	Isótopo de massa 201 do tálio
$([^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{O}_2)$	Óxido de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tecnécio
(^{99}Mo) molibdênio	Isótopo de massa 99 do molibdênio
$(\text{NaTc}^{+7}\text{O}_4)$	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ Pertecnetato de sódio
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ACM	Anticorpos monoclonais marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tecnécio
$[[^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$	Complexo de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tecnécio diamino-aqua-tricarbonil
$[[^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$	Complexo de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tecnécio mono-N-(4-metoxi)benzil-1,2-diaminoetano-aqua-tricarbonil
$[[^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$	Complexo de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tecnécio mono-N,N'-(4-metoxi)benzil-1,2-diaminoetano-aqua-tricarbonil
$[[^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$	Complexo de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tecnécio triaqua-tricarbonil
$[[^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{cys})(\text{CO})_3]$	Complexo de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tecnécio cisteína-tricarbonil
$[[^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{EN})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$	Complexo de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tecnécio mono-etilenodiamina-aqua-tricarbonil
$[[^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{furifosmin})]^+$	Furifosmin marcado com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tecnécio
$[[^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{his})(\text{CO})_3]$	Complexo de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tecnécio histidina-tricarbonil

$[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$	2-metoxiisobutilisonitrila de Cobre(I)
$[[^{99m}\text{Tc}]](\text{O})_2(\text{CMNS003})_2]^+$	tetrafluoroborato marcado com $[[^{99m}\text{Tc}]]$ tecnécio
$[[^{99m}\text{Tc}]](\text{O})_2(\text{CMNS005})_2]^+$	(dioxo)bis[N,N'-(4-metoxi)benzil]-1,2-diaminoetano marcado com $[[^{99m}\text{Tc}]]$ tecnécio
$[[^{99m}\text{Tc}]]\text{TcO}_4^-$	(dioxo)bis[N,N'-(3,4-dimetoxi)benzil]-1,2-diaminoetano marcado com $[[^{99m}\text{Tc}]]$ tecnécio
$[[^{99m}\text{Tc}]]$ tecnécio	Íon pertecnetato com isótopo de massa 99 metaestável do tecnécio
B16F10	Tecnécio 99 metaestável
Bq	Linhagem celular de melanoma murino
C	Becquerel = 1 desintegração por segundo
C18	Carbono
CH_3CN	Cadeia linear com 18 carbonos
CH_3OH	Acetonitrila
$[(\text{CHOH})_2.\text{COONa}.\text{COOK}.4\text{H}_2\text{O}]^+ \text{Cl}^-$	Metanol
CLAE	Tartarato duplo de sódio e potássio
cm	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMNS001	Centímetro
CMNS003	N -[(4-metoxi)benzil]-1,2-diaminoetano
CO	N,N'-bis-[(4-metoxi)benzil]-1,2-diaminoetano
CO_2	Monóxido de carbono ou carbonila
col	Dióxido de Carbono
Dp	Colaboradores
EDTA	Desvio padrão
e-ox	Ácido dietilenotriaminotetraacético
<i>fac</i>	Estado de oxidação
<i>fac</i> - $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3]^+\text{H}$	Isômero facial
FAPESP	Isômero facial do . marcado com $[[^{99m}\text{Tc}]]$ tecnécio
	Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
<i>g</i>	Força da gravidade
g	Gramma
H ₂ O	Água
HCl	Ácido clorídrico fumegante
¹ HRMN	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
IPEN	Instituto de Pesquisa e Energia Nuclear
keV	Kilo elétron-volt
Log P	Valor do coeficiente de partição
M	Molar
MBq	Megabequerel, unidade de radioatividade
MCF-7	Linhagem celular de adenocarcinoma de mama de epitélio diferenciado
mCi	MiliCurie
MDA-MB-231	Linhagem celular de adenocarcinoma de mama fibroblasto- <i>like</i>
<i>mer</i>	Isômero meridional
mg	Miligrama
mg/Kg	Miligrama por quilograma
MIBI	Metoxiisobutilisonitrila
min	Minuto
mL	Mililitro
mL/min	Mililitro por minuto
mm	Milimetro
mM	Milimol
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
Na ^{99m} TcO ₄	[^{99m} Tc]Pertecnetato de sódio
NaBH ₄	Boroidreto de sódio
NH ₄ OH	Hidróxido de amônio
NaOH	Hidróxido de sódio
NaCl 0,9 %	Solução fisiológica
O ou O ₂	Oxigênio
p	Nível estatístico de significância

PBS	Tampão fosfato salina
pH	Potencial hidrogeniônico
QEEL	Química Especializada Erich Ltda.
rpm	Rotações por minuto
RPMI	meio de cultura Roswell Park Memorial Institute
SFB	Soro fetal bovino
Sn^{2+}	Íon estanhoso
SnCl_2	Cloreto estanhoso
$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloreto estanhoso diidratado
Tc^{5+} , Tc^{4+} , Tc^{3+} ou Tc^{1+}	Íons Tecnécio em diversos estados de oxidação
TcHR	Forma hidrolisada e reduzida de tecnécio
TFA	Ácido trifluoroacético
TR	Tempo de Retenção
V	Volt

RESUMO

Nos últimos 15 anos a utilização do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ como intermediário para obtenção de radiofármacos de $[[^{99m}\text{Tc}]$ tecnécio, para aplicações em cardiologia, neurologia e oncologia tem se tornado mais intensa devido a facilidade de obtenção a partir de soluções aquosas e a facilidade de substituição das moléculas de H_2O por átomos ligantes de outras moléculas.

Neste projeto preparamos novos complexos do tipo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, onde (CMNS001) = N-[(4-metoxi)benzil]-1,2-diaminoetano e (CMNS003) = N,N'-bis-[(4-metoxi)benzil]-1,2-diaminoetano e avaliamos a captação desses complexos, mais o radiofármaco $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$, utilizado como referência, em linhagens tumorais de melanoma (B16F10) e de mama (MCF-7 e MDA-MB-231). A captação *in vitro* de ambos derivados $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ atingiu valores próximos a 5 % do total da dose inoculada, tendo sido superior ao 1 % obtidos com o $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$. A avaliação da distribuição subcelular mostrou concentração de dos novos complexos ocorre na fração da membrana, para a linhagem MDA-MB-231, enquanto para a linhagem B16F10 observamos uma concentração semelhante entre membrana celular e citoplasma, a concentração do $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ em maior proporção no citoplasma.

Estudo de biodistribuição em camundongos permitiram observar a captação máximo de 1,6 % da dose administrada por grama de tecido tumoral, para o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, enquanto que outros órgão como coração, pulmão e músculo, apresentaram captação da ordem de 5,6 %, 6,4% e 2 %, respectivamente. Os complexos desenvolvidos neste trabalho mostraram alta taxa de captação *in vitro*, mas que não foi reproduzida no modelo *in vivo*, o qual pode estar relacionado à baixa concentração dos complexos no interior das células e

a menor vascularização do tecido tumoral, com menor aporte dos complexos através do sistema sanguíneo.

SUMMARY

Over least 15 years the complex $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ has been used as an intermediary to obtain technetium radiopharmaceuticals for applications in cardiology, neurology and oncology. Two important characteristics of this molecule are the easily that compound is obtained from aqueous solutions and the ease of substitution of H_2O molecules by atoms of other ligand molecules.

In this project we prepared new complexes $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, where (CMNS001) = N-[(4-methoxy) benzyl]-1,2-diaminoethane, (CMNS003) = N,N'-bis-[(4-methoxy)benzyl]-1,2-diaminoethane, and assessed the uptake of these complexes in murine melanoma cancer cell B16F10 and breast cells MCF-7 and MDA-MD-231, and compared with $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ uptake. In vitro uptake for both new technetium complex reached values close to 5%, for all cell lines, whereas the $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ uptake was close to 1 %. The assessment of subcellular distribution showed high accumulation of the new complex in the membrane fraction, for MDA-MB-231, while for B16F10 accumulation occurred both in membrane and cytoplasm; the concentration of $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ was mainly in the cytoplasm portion. Biodistribution study in mice allowed to observe the capture of up to 1.6% of the administered dose per gram of tumor tissue for the complex $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, whereas other organs such as heart, lung and muscle, showed uptake of about 5.6%, 6.4% and 2%, respectively. The complexes in this work showed a high rate of uptake in vitro, but was not reproduced in vivo model, which can be related to low concentration of the complexes inside the cells and reduced vascularity of tumor tissue, with lower intake of complex through the blood system.

1 Introdução

A utilização de radioisótopos como auxiliares no diagnóstico do câncer tem se tornado uma rotina, principalmente em função da possibilidade de mensurar a atividade fisiológica das massas tumorais, permitindo concluir pela malignidade ou não do tumor^(1,2). Corroboram com esse fato o desenvolvimento tecnológico dos equipamentos de detecção, com melhor resolução espacial e qualidade das imagens⁽³⁾ e a disponibilidade de radiofármacos cada vez mais específicos e sensíveis para determinados tipos de tumores⁽⁴⁾.

Atualmente são disponíveis comercialmente, para o diagnóstico do câncer, radiofármacos como o cloreto de (^{201}Tl)tálio utilizado principalmente para detecção de tumores de pulmão e mama, o complexo (^{111}In)-Somatostatina para detecção de tumores de neuroendócrinos, a ($^{131}\text{I}/^{123}\text{I}$)metaiodobenzilguanidina para detecção de feocromocitomas e neuroblastomas, a 2-deoxi-2-(^{18}F)fluoro-D-glicose para avaliação de metabolismo de glicose em células e detecção de vários tipos de tumores, o $[[^{99\text{m}}\text{Tc}]^{(\text{V})}(\text{DMSA})_2]^-$ para detecção de câncer medular de tireóide, o $[[^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{OH})_2(\text{MDP})_2]^{X-}$ para detecção de tumores ósseos, os anticorpos monoclonais marcados com $[^{99\text{m}}\text{Tc}]$ tecnécio ou $[^{99\text{m}}\text{Tc}]$ -ACM (anticorpos monoclonais) para detecção de tumores específicos aos anticorpos, e os complexos catiônicos $[[^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ e $[[^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{tetrofosmin})_2]^+$ utilizados para detecção de tumores de mama, pulmão, cabeça, osso e sarcomas de tecidos moles.

Da lista anterior, respeitada a especificidade de cada um dos compostos, os radiofármacos de $[^{99\text{m}}\text{Tc}]$ tecnécio apresentam, em relação aos outros, a vantagem do baixo custo, da disponibilidade do radioisótopo nas clínicas de medicina nuclear e da possibilidade da preparação extemporânea a partir da reconstituição de kits

liofilizados; somam-se a isto, as características físicas do radioisótopo, relacionadas com a meia-vida física, a energia das emissões radioativas, a fácil disponibilidade, o baixo custo e a possibilidade de obtenção de uma infinidade de radiofármacos no exato momento do uso em uma clínica de medicina nuclear.

Todos estes fatores fazem com que os radiofármacos [^{99m}Tc]tecnécio sejam utilizados em mais de 80 % dos exames diagnósticos da Medicina Nuclear e sejam objetos de intensa atividade no que tange à pesquisa e desenvolvimento de novos produtos.

1.1 O [^{99m}Tc]tecnécio

O tecnécio foi descoberto em 1937, por Perrier e Segré⁽⁵⁾, e a caracterização do isótopo/isômero de massa 99/99m ocorreu em 1939 nos estudos de Seaborg⁽⁶⁾. Durante vários anos, estudos foram direcionados à caracterização físico-química do elemento, permitindo que hoje se saiba que o [^{99m}Tc]tecnécio decai por emissão de radiação gama (transição isomérica), com energia dos fótons de 140,5 keV (89%) e meia-vida física de 6,02 horas; também se sabe que o elemento, um metal, pode existir em diversos estados de oxidação e formar complexos com diferentes ligantes, ou moléculas orgânicas, de forma rápida, eficiente e em condições brandas⁽⁷⁾.

Esforços também foram empreendidos para viabilizar a disponibilização do radionuclídeo em larga escala e a vários locais. Em 1958, um grupo de pesquisadores da equipe do Brookhaven National Laboratory – USA anunciou o desenvolvimento de um sistema gerador baseado no decaimento do (^{99}Mo) molibdênio para [^{99m}Tc]tecnécio e separação cromatográfica das espécies.

Figura 1. Decaimento do [^{99}Mo]molibdênio a [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]tecnécio

Assim, em função da disponibilidade e das características físico-químicas tornou-se um radioisótopo com grande possibilidade para aplicação de procedimentos diagnósticos em medicina nuclear.

1.2 Os radiofármacos de [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]tecnécio

1.2.1 Preparo dos radiofármacos⁽⁸⁾

Os radiofármacos de [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]tecnécio são obtidos, principalmente, por um processo relativamente simples, o qual envolve a adição da solução de [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]pertecnetato de sódio ($\text{NaTc}^{+7}\text{O}_4$) a um conjunto de reativos contendo o agente redutor e o agente quelante – as espécies reativas do processo – e outros excipientes, que podem ser utilizados como tampão, pré-quelantes, agentes de massa/volume.

O mecanismo da reação de preparação envolve inicialmente uma reação de oxidação entre o radionuclídeo e o agente redutor (normalmente o íon Sn^{2+}),

concomitantemente com o processo de complexação, que nada mais é do que a ocupação dos orbitais vazios do elemento que está sendo reduzido, pelos pares de elétrons dos agentes quelantes.

Eventualmente, a velocidade com que um agente quelante reage com a espécie reduzida é lenta e isso leva a formação de uma impureza, o óxido de [^{99m}Tc]tecnécio ($[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{O}_2$), uma forma coloidal ou espécie hidrolisada e reduzida (TcHR). Esse problema pode ser resolvido com a introdução de uma segunda espécie reativa, a qual irá se ligar rapidamente ao [^{99m}Tc]tecnécio em processo de redução, mas cuja estabilidade de ligação é baixa; na presença do agente quelante que dará origem ao radiofármaco de interesse ocorre uma reação de troca levando à formação do produto mais estável, o que pode ocorrer espontaneamente, por mudança de pH do meio ou por aquecimento.

Figura 2. Esquema de obtenção dos radiofármacos de $[^{99m}\text{Tc}]$ tecnécio por processo de marcação direta ou por transquelação (e-ox = estado de oxidação).

Os principais estados de oxidação que o $[^{99m}\text{Tc}]$ tecnécio atinge ao ser reduzido são Tc^{5+} , Tc^{4+} , Tc^{3+} ou Tc^{1+} , dependendo do pH do meio reacional e do tipo de quelante que está sendo utilizado.

1.2.2 Radiofármacos de $[^{99m}\text{Tc}]$ tecnécio de primeira e segunda gerações^(9, 10)

Os primeiros complexos de $[^{99m}\text{Tc}]$ tecnécio preparados para utilização em medicina nuclear, obtidos no início dos anos de 1970, foram preparados utilizando quelantes contendo átomos de oxigênio, como no $[[^{99m}\text{Tc}](\text{OH})_2(\text{MDP})_2]^{x-}$; oxigênio e enxofre, como no caso do $[[^{99m}\text{Tc}]\text{DMSA}]^-$; oxigênio e nitrogênio, como no caso do

$[[^{99m}\text{Tc}]\text{DTPA}]^-$. Estes quelantes coordenam com o $[[^{99m}\text{Tc}]\text{tecnécio}$, mantendo o metal, principalmente, nos estados de oxidação 3+ e 4+.

A utilização dos radiofármacos de $[[^{99m}\text{Tc}]\text{tecnécio}$ da primeira geração estavam intrinsecamente relacionados ao fluxo sanguíneo e a alguns mecanismos gerais, como a complexação do $[[^{99m}\text{Tc}](\text{OH})_2(\text{MDP})_2]^{x-}$ ao cálcio ósseo, que pode ocorrer tanto em tecido normal quanto nos tumores ósseo, o processo de fagocitose pelo da $[[^{99m}\text{Tc}]\text{DISIDA}]^-$ pelas células de Kupffer e o processo de filtração glomerular do $[[^{99m}\text{Tc}]\text{DTPA}]^-$ (8).

Figura 3. Complexos de $[[^{99m}\text{Tc}]\text{tecnécio}$ desenvolvidos entre os anos de 1960 e 1980

Em meados dos anos de 1980, começou a ser desenvolvida uma nova classe de complexos, os quais são classificados de produtos de segunda geração, baseados em sistemas ligantes contendo quatro nitrogênios (N_4), ou sistemas contendo nitrogênio e enxofre (N_3S e N_2S_2). Neste sistema o metal apresenta estado

de oxidação 5+, e foi possível produzir os primeiros complexos neutro e lipofílico, com o $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{HMPAO})]$ e o $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{ECD})]$, capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e permitir avaliar a perfusão cerebral.

Na mesma época, outros sistemas quelantes foram desenvolvidos, com os complexos com fósforo, representado pelo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})_2(\text{Tetrofosmin})]^+$, e os complexos de isonitrila, representado pelo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$, em que o $[[^{99m}\text{Tc}]\text{tecnécio}$ apresenta estado de oxidação 1+. Esses dois radiofármacos, que são catiônicos, tornaram-se produtos de referência para estudos de perfusão do miocárdio.

Figura 4. Complexos de $[[^{99m}\text{Tc}]\text{tecnécio}$ desenvolvidos entre os anos de 1980 e 1990.

Nos produtos de segunda geração, ainda que o fluxo sanguíneo tenha papel importante, a captação dos radiofármacos já estavam relacionados a alguns mecanismos mais específicos, como a ação mais específica de arilesterases, em

detrimento de carboxilesterases ou colinoesterases, sobre a molécula de $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{ECD})]$ ⁽¹¹⁾ e a concentração do $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ relacionada com a interação com as mitocôndrias⁽¹²⁾.

1.2.3 Radiofármacos de $[[^{99m}\text{Tc}]\text{tecnécio de terceira geração}$

Com os avanços ocorridos na área do diagnóstico por imagem, em particular na área da instrumentação em medicina nuclear, o aprendizado obtido com os quelantes da segunda geração permitiu, ou provocou, o desenvolvimento dos produtos de terceira geração⁽¹³⁾, com o objetivo é de serem utilizados para detectar eventos específicos em nível celular, como a presença de receptores específicos ou a alteração no microambiente, principalmente, em tumores.

Nessa linha de raciocínio foram sintetizados quelantes do tipo amino (N) ou aminotiol (NS) conjugados a alguma molécula com reconhecida ação em tumores. Como exemplos, temos: 1) o complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{TAMX-DER})]$ que foi sintetizado para ser uma espécie que mimetizasse o tamoxifem e pudesse ser um marcador para a expressão de receptores de estrógeno⁽¹⁴⁾; 2) o complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{IBAZ-DER})]$ que buscava mimetizar a molécula IBAZ marcada com ^{123}I iodo e utilizada na detecção de melanoma⁽¹⁵⁾; 3) o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})(\text{BMS18321})]$ derivado do $(^{18}\text{F})\text{Fluornitroimidazol}$ utilizado na detecção de regiões de hipóxia em tumores⁽¹⁶⁾; 4) o derivado de $[[^{99m}\text{Tc}](\text{O})(\text{ECD-glicose})]$, utilizado como potencial substituto a $(^{18}\text{F})\text{FDG}$ na avaliação do consumo de glicose pelas células tumorais⁽¹⁷⁾. Além disso, esses grupos quelantes estão sendo utilizados para conjugação com biomoléculas, como peptídeos e proteínas. Todavia,

a introdução desses grupos as biomoléculas frequentemente requerem múltiplas etapas de síntese e pode ocorrer a perda do efeito biológico das biomoléculas^(18,19).

Por exemplo, de vários complexos de [^{99m}Tc]tecnécio preparados conjugados a moléculas de glicose^(20,21,22,23,24), os relatos encontrados na literatura indicam que apenas o complexo [^{99m}Tc]O(ECD-GLICOSE)] foi aprovado para estudos clínicos em fase I⁽²⁵⁾, após ter provado nos testes pré-clínicos a interação com glut e fosforilação por hexokinase, e distribuição em animais compatíveis com a proposta da molécula^(17,26).

Figura 5. Complexos de [^{99m}Tc]tecnécio bifuncionais desenvolvidos entre os anos de 1990 e 2010

1.2.4 O complexo de [^{99m}Tc]tecnécio Aquatricarbonil

Muito embora a química dos compostos carbonílicos de rênio e tecnécio já fosse conhecida desde os anos de 1950^(27, 28, 29) foi no final dos anos de 1990 e início de 2000 que ela ganhou grande impulso na área do desenvolvimento de radiofármacos, principalmente através dos trabalhos realizados por Alberto^(19,30), relacionados à produção do complexo $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ e, mais especificamente, o trabalho que relata a produção de um sistema para geração *in situ* de CO, a partir de *kits* liofilizados⁽³¹⁾.

Os atrativos para esta forma de complexo estão relacionados a fatores como: (1) pequena dimensão do núcleo $\text{fac-}[\text{}^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3]^+(32)$ permitindo a marcação de biomoléculas com baixo peso molecular e com alta atividade específica, (2) alta afinidade por átomos doadores, (3) fácil preparação a partir de solução aquosa, (4) fácil substituição das moléculas de água por outras moléculas contendo grupos funcionais como: aminas, iminas, tioéteres, tiols, fosfinas e carboxilatos^(30,33,34) (figura 6), (5) o núcleo $\text{fac-}[\text{}^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3]^+$ é quimicamente robusto favorecendo o desenvolvimento de drogas⁽³⁵⁾.

Figura 6. Complexos de $[\text{[}^{99\text{m}}\text{Tc}]$ tecnécio derivados do $[\text{[}^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$

No complexo $[\text{[}^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ o estado de oxidação do $[\text{[}^{99\text{m}}\text{Tc}]$ tecnécio é +1, sendo desta forma caracterizado como um ácido mole, e os ligantes H_2O e CO (carbonila) são considerados bases dura e mole, respectivamente. O complexo pode ser obtido em duas formas isoméricas, *fac* e *mer*, sendo a primeira formada preferencialmente devido à sua alta estabilidade cinética⁽³⁶⁾ e menor número de isômeros⁽³⁷⁾.

Figura 7. Isômeros do complexo ^{99m}Tc -triaqua-tricarbonil, sendo representado em verde ^{99m}Tc ; em vermelho O; em preto C; em azul turquesa H.

1.3 Detecção de tumores utilizando complexos catiônicos de ^{99m}Tc tecnécio

Os complexos catiônicos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{tetrofosmin})_2]^+$ (figura 1), preparados inicialmente para serem utilizados como agentes de perfusão miocárdica mostraram-se, no decorrer do tempo, úteis também para a detecção de vários tipos de tumores.

Do ponto de vista químico, cada um dos complexos difere do outro com relação ao tipo do ligante coordenado ao átomo de ^{99m}Tc tecnécio, ao arranjo espacial e ao estado de oxidação do metal. Por outro lado, todos têm em comum a presença de grupos alcooxila, o caráter catiônico do complexo e o comportamento lipofílico. Quanto aos mecanismos de concentração intracelular, já foram determinados diferentes mecanismos^(38,39) para os complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{tetrofosmin})_2]^+$. Assim, é de se esperar que cada complexo apresente diferenças quanto a detecção de diferentes tipos de tumores.

Estudos experimentais demonstraram que, além das diferenças de concentração de cada complexo em uma determinada linhagem de células, ainda foram observadas variações de um mesmo complexo em diferentes linhagens celulares. Por exemplo, estudo em células de sarcoma de tecidos moles⁽⁴⁰⁾ das linhagens SW 684 (fibrossarcoma), SW 872 (lipossarcoma), SW 982 (sarcoma sinovial) e SW 1353 (condrossarcoma), utilizando os radiofármacos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$, $[[^{99m}\text{Tc}](\text{tetrofosmin})_2]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{furifosmin})]^+$ demonstrou que, para o $[[^{99m}\text{Tc}](\text{furifosmin})]^+$, o comportamento de captação é semelhante em todas as linhagens, enquanto que para o $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ e o $[[^{99m}\text{Tc}](\text{tetrofosmin})_2]^+$ existem dois comportamentos cinéticos de captação, um associado às linhagens de fibrossarcoma e lipossarcoma, e outro associado às linhagens de sarcoma sinovial e condrossarcoma (figura 8).

Figura 8. Perfil de concentração dos radiofármacos o $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$, $[[^{99m}\text{Tc}](\text{tetrofosmin})_2]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{furifosmin})]^+$ em culturas de células de sarcomas de tecidos moles.

Estudo semelhante foi realizado em culturas de células de adenocarcinomas de mama da linhagem SK-BR-3 (pouco diferenciada epitelial) e da linhagem MCF-7 (diferenciada epitelial), e de sarcoma humano da linhagem SW 872 (lipossarcoma), demonstrando que em tumores de mama a captação do $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ é maior que dos outros radiofármacos, com modificação no perfil de distribuição na cultura de lipossarcoma, onde a captação do $[[^{99m}\text{Tc}](\text{furifosmin})]^+$ é maior ⁽⁴¹⁾.

1.3.1 Modificações moleculares em complexos catiônicos de $[[^{99m}\text{Tc}]$ tecnécio e sua influência na detecção de tumores

Uma vez que o radiofármaco $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ é utilizado rotineiramente para estudos de perfusão miocárdica e tendo o mesmo recebido aprovação do FDA para ser utilizada na detecção de tumores de mama, pesquisas têm sido realizadas visando encontrar novos arranjos moleculares para os complexos utilizando o ligante isonitrila e melhorar o comportamento da molécula em relação a detecção dos tumores.

Herman et al.⁽⁴²⁾ sintetizaram uma série de isonitrilas modificadas e utilizaram os complexos de $[[^{99m}\text{Tc}]$ tecnécio em células derivadas de fibroblastos de pulmão de hamster (linhagem V79) e uma sub-linhagem selecionada pelo cultivo continuado na presença de adriamicina (linhagem 77A), as quais expressavam, respectivamente, níveis modestos e intermediários de Pgp, uma proteína associada ao processo de resistência a múltiplas drogas e ainda avaliaram o efeito do Verapamil®, um modulador para a proteína, quanto à captação dos complexos na linhagem V79. Alguns dos compostos apresentaram resultados satisfatórios com maior

concentração celular em relação ao $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$, mas com menor capacidade de diferenciação, conforme apresentado no resumo a seguir (tabela 3).

Tabela 1 – Estruturas das metoxiarilisonitrilas e comportamento frente à presença de glicoproteína-P em células do tipo V79.

	R =	Grupo 1 $\text{N}\equiv\text{C}$	Grupo 2 $\text{CH}_2-\text{N}\equiv\text{C}$	Grupo 3 $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}\equiv\text{C}$
MIBI	Padrão	3,1	-	-
	Verapamil	102	-	-
	Razão	32,9	-	-
a	Padrão	36,4	138	160
	Verapamil	84,7	359	494
	Razão	2,33	2,60	3,01
b	Padrão	113	23,6	44
	Verapamil	397	36,2	146
	Razão	3,52	1,53	3,30
c	Padrão	8,3	144	-
	Verapamil	15,3	315	-
	Razão	1,84	2,19	-
d	Padrão	268	70,30	94,6
	Verapamil	790	57	101
	Razão	2,95	0,81	1,07
e	Padrão	50,10		
	Verapamil	93,90		
	Razão	1,87		

Barbarics et al.⁽⁴³⁾ que sintetizaram uma série de derivados de alquilisonitrilas (figura 9) e comparou o efeito da lipofilicidade das moléculas na concentração dos complexos em tumores⁽³⁹⁾. Os resultados confirmam que com o aumento da lipofilicidade expresso como (logP) há um aumento na relação entre captação

específica dos complexos a 37 °C e a captação não específica a 4 °C, até um patamar em que esse efeito é perdido. É interessante notar que para o MIBI e o EIBI o grau de especificidade não se relaciona somente com o aumento da lipofilicidade, podendo ser indicativo de que o arranjo espacial da molécula é também importante (tabela 2).

Figura 9. Novos ligantes baseados em isonitrilas para obtenção de complexos de [^{99m}Tc]tecnécio para detecção de tumores.

Tabela 2. Acúmulo de $[[^{99m}\text{Tc}](\text{isonitrilas})_6]^+$ em células CX-1.

Complexo	Log P	Acúmulo Total (37°C) (%)	Acúmulo Não Específico (4°C) (%)	AT/ANE
$[[^{99m}\text{Tc}](\text{MEI})_6]^+$	0,625	4,56±1,4	1,4±0,3	2,2
$[[^{99m}\text{Tc}](\text{MPI})_6]^+$	1,365	16,7±0,8	1,9±0,2	7,8
$[[^{99m}\text{Tc}](\text{RP-42})_6]^+$	1,980	13,6±0,4	3,5±0,2	2,9
$[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$	2,887	21,9±1,8	1,8±0,6	11,2
$[[^{99m}\text{Tc}](\text{EPI})_6]^+$	3,298	41,9±1,1	9,9±1,3	3,2
$[[^{99m}\text{Tc}](\text{DEEI})_6]^+$	4,791	49,6±3,4	7,6±1,1	5,8
$[[^{99m}\text{Tc}](\text{RP-311})_6]^+$	4,876	54,2±2,1	6,2±1,7	5,6
$[[^{99m}\text{Tc}](\text{EIBI})_6]^+$	4,900	79,1±1,8	4,2±0,7	16,2
$[[^{99m}\text{Tc}](\text{MMBI})_6]^+$	5,398	82,0±0,7	12,3±4,7	5,7
$[[^{99m}\text{Tc}](\text{MEBI})_6]^+$	6,652	93,4±3,9	57,1±1,6	0,6

Recentemente, Marques et al.⁽⁴⁴⁾ sintetizaram ligantes baseados em moléculas de benziletilenodiaminas, os quais foram utilizados para obtenção de complexos catiônicos, do tipo bis-diamino-dioxido, conforme apresentado na figura 10.

Os complexos foram testados em linhagem de melanoma murino B16F10, a qual expressa Pgp, e os resultados encontrados no estudo mostraram que o complexo $[[^{99m}\text{Tc}]](\text{O})_2(\text{CMNS003})_2]^+$ acumulou em células de melanoma de modo semelhante ao observado para o radiofármaco $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$, quando as células foram tratadas com Verapamil®.

Figura 10. Proposta de estrutura para os complexos de ^{99m}Tc tecnécio-bis-1,2-diaminoetano-dióxido, funcionalizados por grupos metoxiaril com potencial atividade para detecção de tumores.

2. Objetivo

2.1 Objetivo geral

Preparar novos complexos de $[^{99m}\text{Tc}]$ tecnécio mono-1,2-diaminoetano-aqua-tricarbonil funcionalizados por grupos metoxibenzil e o potencial de utilização dessas moléculas na detecção de tumores..

Figura 11. Proposta de estrutura para os complexos de $[^{99m}\text{Tc}]$ tecnécio mono-1,2-diaminoetano-aqua-tricarbonil funcionalizados por grupos metoxiaril com potencial atividade para detecção de tumores. **CMNS001** = N -[(4-metoxi)benzil]-1,2-diaminoetano, **CMNS003** = N,N'-bis-[(4-metoxi)benzil]-1,2-diaminoetano.

2.2 Objetivos específicos

- 1- Avaliar as condições de preparação do precursor $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ e dos complexos em estudo, e de dados físico-químicos.
- 2- Avaliar a estabilidade dos complexos em função das condições de armazenamento
- 3- Avaliar a captação dos complexos em diferentes linhagens celulares e em diferentes condições experimentais, como a utilização de células em suspensão ou aderidas as placas de cultivo.
- 4- Avaliar a distribuição subcelular dos complexos.
- 5- Avaliar a biodistribuição dos complexos em modelo animal com implante de células tumorais.

3 Material e métodos

3.1 Material

3.1.1 Equipamentos e sistemas

- Estufa HEPA CLASS 100 Thermo Electron Corporation.
- Centrifuga 5810 R Eppendorf.
- Centrifuga Fanen excelsa modelo 206 BL.
- 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.
- Câmara de cintilação Siemens, modelo LEM, equipada com colimador de baixa energia e todos os propósitos (LEAP), e imagens adquiridas pelo programa PIP Imagamma Acquisition Driver, National Institute of Oncology, Cuba, versão 1.1 - 1995,1997 e processadas por ImageJ, Wayne Rasband National Institutes of Health, USA, versão 1.30v - 2002.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência, Software Class-VP, Shimadzu Corporation, Japan.
- Flow Scintillation Analyzer, Radiomatic 610TR, Software ProFSA, PerkinElmer, USA.
- Coluna C18 (4,6x250 mm, 4 µm) – Synergi-Hidro-RP, Phenomenex -USA.

- Cuba para eletroforese, Elphor, Dr Bender & Dr Hobein, Karlsruhe München Zürich, conectada a uma fonte contínua E-C Apparatus, modelo nº FB105 LVD, EC 105.
- Vórtex, Quimis, São Paulo, modelo Q-220A.
- Agitador magnético com chapa aquecedora, Quimis, São Paulo, modelo Q-261-22.
- Balança semi-analítica eletrônica, Indústria e Comércio Eletro-Eletrônica Gehaka Ltda, São Paulo, modelo BG 1000.
- Balança analítica eletrônica, Mettler, Suíça, modelo AE 200.
- pHmetro, Micronal, São Paulo, modelo B374.
- Torpedo de monóxido de carbono, White Martins, São Paulo.
- Torpedo de nitrogênio, IBG Gases Especiais, São Paulo.
- Lacrador, Lutz Ferrando, São Paulo, modelo R2.
- Frascos de vidro tipo penicilina, Euroglass; rolhas plásticas e lacres de alumínio, Farmacap.
- Suportes cromatográficos (fitas cromatográficas):
papel W1, W & R Balston Ltd;
- Vidrarias em geral e instrumentos cirúrgicos.

3.1.2 Reagentes e solventes

- Ligante CMNS001 = N -[(4-metoxi)benzil]-1,2-diaminoetano
- Ligante CMNS003 = N,N'-bis-[(4-metoxi)benzil]-1,2-diaminoetano
- Boroidreto de sódio (NaBH_4), Aldrich
- Carbonato de sódio (Na_2CO_3), Baker Analyzed' Reagent

- Tartarato duplo de sódio e potássio $(\text{CHOH})_2 \cdot \text{COONa} \cdot \text{COOK} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, QEEL
- Ácido clorídrico fumegante (HCl), Merck
- Hidróxido de sódio (NaOH), Labsynth
- Cloreto estanoso diidratado $(\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$, Mallinkcrodt
- Solução fisiológica 0,9% (NaCl 0,9 %), IPEN e Laboratórios B. Braun S. A.
- Acetonitrila (CH_3CN), EM
- Metanol (CH_3OH), EM
- Água (H_2O) Milli Q
- Meio de cultura RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino 10% ou não
- $[\text{Re}(\text{CMNS001})(\text{CO})_3\text{Br}]$ foi preparado pelo grupo do Prof. Dr. Victor Marcelo Deflon – Instituto de Química – USP São Carlos

3.1.3 Misturas e soluções

- Solução de aquosa de TFA 0,1 % e 1 %.
- Solução de TFA em acetonitrila 0,1 % e 1 %.
- Solução aquosa de cloridrato de L-Cisteína 10 mM e 100 mM.
- Solução aquosa de cloridrato L-Histidina 10 mM e 100 mM.
- Solução de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1)
- Solução aquosa de HCl 10 mM e 100 mM.
- Solução tampão fosfato salina (PBS) 5 mM, 10 mM, 100 mM e 1M, pH 7,4
- Tripsina 0,05%
- PBS EDTA 0,5%.
- Todas as soluções aquosas foram preparadas com água destilada ou MilliQ.

3.1.4 Células

Células de câncer de mama das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 foram cultivadas em garrafas de 75 ou 125 cm², em meio RPMI 1640 (pH = 7,0), suplementado com 10 % de soro fetal bovino, em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂, a 37 °C. Quando do uso, as culturas de células foram lavadas com solução de EDTA (1mM) em PBS (pH 7,4), e removidas da garrafa de cultura pelo método enzimático, incubando-as em solução de tripsina por 2 minutos e, depois, com a adição do meio de cultura RPMI 1640 (pH = 7,0), suplementado, ou não, com 10 % de soro bovino fetal. O número de células foi estimado por contagem direta em hemocítômetro (câmara de Neubauer). A viabilidade celular foi avaliada por método de exclusão de azul Tripan.

3.1.5 Animais

Camundongos C57Bl6, machos, com aproximadamente 8 semanas de vida, pesando entre 14,65 e 26,65 g. Os experimentos com animais foram realizados com aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, segundo processo CapPesq 07/0774.

3.1.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA, com pós-teste de Tukey ou Bonferroni. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

3.2. Métodos

3.2.1 Preparação do complexo $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tecnécio-triaqua-tricarbonil}$ - $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ (19,45,46,47,48).

Em um frasco de vidro, do tipo penicilina, foram adicionados 5,5 mg de boroidreto de sódio, 4 mg de carbonato de sódio e 20 mg de tartarato duplo de sódio e potássio. A mistura foi diluída em 0,5 mL de água MilliQ, o frasco foi fechado com rolha de borracha e, através de um sistema de agulhas, o frasco foi saturado com monóxido de carbono (CO), com o fluxo de gás sendo mantido por 10 minutos. Em seguida foram adicionados 1,5 mL de solução de pertecnetato de sódio, com atividade entre 740 a 1480 MBq (20 a 40 mCi), o frasco foi lacrado com cinta de alumínio e a solução foi aquecida durante 35 minutos, à temperatura de 75 °C, e depois deixado atingir a temperatura ambiente. O pH da solução, inicialmente com o valor igual a 11, foi ajustado para 9, com a adição de 1 mL de HCl (0,1 N).

3.2.2 Preparação do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{EN})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ e estabilidade da ligação na presença de NH_3

Em 2 mL de solução de $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$, em pH 7,4, foram adicionados 10 μL de etilenodiamina e a solução foi aquecida a 75 °C durante 30 minutos, para a obtenção do composto $[[^{99m}\text{Tc}](\text{EN})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$. Desta solução foram tomados 500 μL , foram adicionados 50 μL de NH_4OH e a solução foi mantida à temperatura ambiente por 30 minutos. Outra solução foi preparada de modo semelhante, porém a solução final foi aquecida a 75 °C, durante 30 minutos.

3.2.3 Preparação dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$

Em um frasco de vidro, do tipo penicilina, foi adicionado 1 mg do ligante (CMNS001 ou CMNS003), diluído em 1,0 mL de PBS 100 mM (pH 7,4) e adicionado 0,2 mL de solução de $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ (pH 9,0). O frasco foi tampado com rolha de borracha, lacrado com cinta de alumínio e aquecido a 75 °C, por 30 minutos⁽⁴⁸⁾.

3.3 Avaliação de parâmetros físico-químico dos complexos

3.3.1 Avaliação da eficiência de marcação e da pureza radioquímica

3.3.1.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Amostras dos complexos foram injetadas em um cromatógrafo para CLAE, equipado com uma coluna de C18 (4,6x250 mm, 4 µm). Foram utilizadas as fases móveis: (A) Solução aquosa de TFA 0,05 % e (B) acetonitrila, utilizando o seguinte processo: 80 % da fase (A) de 0 a 1 minuto, gradiente linear de 1 a 10 minutos, partindo de 80 % da fase (A) até atingir a proporção 20:80 % (A:B), depois segue em modo isocrático de 10 a 25 minutos com a mesma proporção, e de 25 a 30 minutos retorna à condição inicial. O fluxo foi mantido a 1 mL/min durante a análise.

3.3.1.2 Eletroforese em papel dos complexos $[^{99m}\text{Tc}](\text{NH}_3)_3(\text{CO})_3]^+$, $[^{99m}\text{Tc}](\text{EN})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]$ e $[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$

A eletroforese foi realizada em uma cuba para eletroforese horizontal previamente lavada com água Milli-Q e preenchida em solução eletrolítica de PBS (50 mM, pH 7,4):metanol (1:1) ou PBS (50 mM, pH 7,4):acetonitrila (1:1). Fitas de papel Whatman nº1 com 1,5x28 cm foram umedecidas no próprio tampão e fixadas na cuba; uma gota do complexo radioativo foi depositada no meio da fita e a uma tensão de 275 V foi mantida por 2 horas. As fitas foram secadas, cortadas em segmentos de 1,0 cm e a radioatividade foi medida em contador de radiação gama,

tipo poço. Os resultados são apresentados como porcentagem da radioatividade total/cm.

3.3.2 Determinação do coeficiente de partição

Em tubos de ensaio foram adicionados 2,7 mL de água, 3,0 mL de n-octanol e, de forma independente, 0,3 mL da solução do $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ e ou dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$. Os tubos foram tampados, agitados em vortex 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 curiômetro. O coeficiente foi determinado dividindo o valor da atividade encontrada na fase orgânica (n-octanol) pelo valor da atividade na fase aquosa (água) e é expresso como o valor logarítmico deste cociente (LogP).

3.3.3 Avaliação da estabilidade *in vitro* dos complexos

$[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ em presença de cisteína ou histidina

Em frascos, tipo penicilina, foram adicionados 100 μL dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ e 900 μL de solução de cisteína (1 mM) ou histidina (1 mM). As soluções foram incubadas a 37 °C e nos tempos de 1, 4 e 24 horas, amostras foram retiradas e analisadas por (CLAE), em uma coluna de C18 (250x4,6 mm, 4 μm)⁽¹⁶⁾. As condições de trabalho são aquelas descritas em 3.3.1.1.

3.3.4 Avaliação, *in vitro*, da captação celular dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$

3.3.4.1 Captação em células MCF-7 e MDA-MB-231 não aderidas, em meio de cultura sem SFB

Em placas de cultura com 96 poços foram adicionados, por poço, aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células de MCF-7 ou MDA-MB-231 suspensas em 0,2 mL de meio de cultura RPMI sem SFB. Em seguida, foram adicionados 10 μL das soluções de $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ e dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, de modo que grupos de células, em triplicata, tenham ficado expostos aos compostos radioativos por 5, 20, 40 e 60, em estufa mantida sob atmosfera ambiente, a 37 °C. Ao final do tempo as placas foram centrifugadas por 2 min, a 2000 rpm, os sobrenadantes foram removidos e transferidos para tubos de contagem com correspondência a cada poço. Os botões de células foram ressuspensos em 0,2 mL de PBS e centrifugados sob as condições anteriores, os sobrenadantes foram removidos e depositados junto aqueles obtidos na etapa anterior. O processo foi repetido e, finalmente, os botões de células foram ressuspensos e transferidos para tubos de contagem. A quantidade de radiação nas amostras foi determinada em contador de radiação gama, tipo poço. A porcentagem de captação dos complexos foi determinada pela razão entre a contagem dos tubos das soluções contendo células, pela soma das contagens dos tubos com os sobrenadantes e os contendo células.

3.3.4.2 Captação em células MCF-7 e MDA-MB-231 não aderidas, em meio de cultura suplementado com 10% de SFB

O mesmo procedimento descrito em 4.3.4.2 foi realizado, exceto que as células foram incubadas em meio de cultura contendo soro fetal bovino a 10 %.

3.3.4.3 Captação em células MCF-7, MDA-MB-231 e B16F10 aderidas, em meio de cultura suplementado com 10% de SFB

Em placas de culturas com 96 poços foram adicionados, por poço, aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células de MCF-7, MDA-MB-231 ou B16F10 suspensas em 0,2 mL de meio de cultura RPMI suplementado com 10 % de SFB. As placas foram mantidas em estufa de cultura, por 24 horas, e depois foram adicionados 10 μ L das soluções dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ ou $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, de modo que grupos de células, em triplicata, tenham ficado expostas aos compostos radioativos por 10, 30, e 60 minutos, em estufa mantida sob atmosfera ambiente, a 37 °C. Ao final de cada tempo, os sobrenadantes foram removidos e transferidos para tubos de contagem com correspondência a cada poço. Os poços foram lavados com 0,2 mL de PBS (pH 7,4), os sobrenadantes foram removidos e depositados com aqueles obtidos na etapa anterior; foram adicionados 50 μ L de tripsina por poço e as placas foram mantidas a 37 °C, por 5 minutos. As células foram removidas e transferidas para outro tubo de contagem, os poços foram lavados com 0,2 mL de EDTA (1 mM), em PBS (pH 7,4), e as soluções retiradas foram depositadas nos mesmos tubos das células removidas anteriormente. A

quantidade de radioatividade nos sobrenadantes e nas células foi determinada em contador de radiação gama, tipo poço. A porcentagem de captação dos complexos foi determinada pela razão entre a contagem dos tubos das soluções contendo células, pela soma das contagens dos tubos com os sobrenadantes e os contendo células.

3.3.4.4 Avaliação da taxa de eliminação em células MCF-7 e MDA-MB-231 não aderidas, em meio de cultura suplementado com 10% de SFB

Em placas de 96 poços foram adicionados, por poço, aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células de MCF-7 ou MDA-MB-231 suspendidas em 0,2 mL de meio de cultura RPMI suplementado com 10 % de SFB. Em seguida, foram adicionados 10 μ L das soluções dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, em cada poço, e o sistema foi mantido em incubação por 60 minutos, em estufa sob atmosfera ambiente, a 37 °C. Após este período, as placas foram centrifugadas por 2 min, a 2000 rpm, os sobrenadantes foram descartados e 0,2 mL de meio de cultura RPMI suplementado com 10% de SFB foram adicionados a cada poço. As suspensões foram incubadas por 10, 30 e 60 minutos, na mesma condição utilizada anteriormente. Ao final de cada tempo, as placas foram centrifugadas por 2 min a 2000 rpm, os sobrenadantes foram removidos e transferidos para tubos de contagem com correspondência a cada poço. Os botões de células foram ressuspensos em 0,2 mL de PBS e centrifugadas por 2 min a 2000 rpm, os sobrenadantes foram removidos e depositados com aqueles obtidos na etapa anterior; sendo este processo repetido mais uma vez. A quantidade de radiação nos

sobrenadantes e nos botões de células foi determinada em contador de radiação gama, tipo poço. A porcentagem de eliminação dos complexos foi determinada pela razão entre a contagem dos tubos das soluções contendo células, pela soma das contagens dos tubos com os sobrenadantes e os contendo células.

3.3.4.5 Avaliação da taxa de eliminação em células MCF-7, MDA-MB-231 e B16F10 aderidas, em meio de cultura suplementado com 10% de SFB

Em placas de 96 poços foram adicionados, por poço, aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células de MCF-7, MDA-MB-231 e B16F10 suspendidas em 0,2 mL de meio de cultura RPMI suplementado com 10% de SFB. As placas foram mantidas em estufa de cultura, por 24 horas, e a cada poço foram adicionados 10 μ L das soluções dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ ou $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, e as placas foram incubadas por 60 minutos, a 37 °C em estufa sob atmosfera ambiente. Após esse tempo, os sobrenadantes foram removidos e desprezados, e as células foram lavadas duas vezes com PBS (pH 7,4). Aos poços foram adicionados 0,2 mL de meio de cultura RPMI suplementado com 10% de SFB, sendo estas suspensões incubadas por 10, 30, 60 minutos, na mesma condição utilizada anteriormente. Ao final dos tempos os sobrenadantes foram removidos e transferidos para tubos de contagem com correspondência a cada poço, os poços foram lavados com 0,2 mL de PBS (pH 7,4), os sobrenadantes foram removidos e depositados com aqueles obtidos na etapa anterior. A cada poço foram adicionados 50 μ L de tripsina e as placas foram mantidas a 37°C, por 5 minutos. As células foram removidas e transferidas para outro tubo de contagem. Os poços foram lavados com 0,2 mL de

solução de EDTA (1 mM) em PBS (pH 7,4) e as soluções retiradas foram depositadas nos mesmos tubos das células removidas na etapa anterior. A quantidade de radiação nos sobrenadantes e nos botões de células foi determinada em contador de radiação gama, tipo poço. A porcentagem de eliminação dos complexos foi determinada pela razão entre a contagem dos tubos das soluções contendo células, pela soma das contagens dos tubos com os sobrenadantes e os contendo células.

3.3.4.6 Determinação da distribuição subcelular dos complexos

Aproximadamente 37 MBq (1 mCi) dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ foram adicionados a garrafas de cultura celular de 75 mm² e 125 mm² contendo células aderidas de MDA-MB-231 ou B16F10, em meio de cultura RPMI suplementado com 10% de SFB, e as mesmas foram mantidas em estufa a 37 °C por 1 hora, sob atmosfera de CO₂. Após este período, o meio de cultura foi descartado, as células foram lavadas com PBS e esta solução também foi descartada. As células foram retiradas das garrafas de cultura e homogeneizadas em 2 mL de tampão contendo: 20 mM de Tris HCl pH 7,5, 2mM de EDTA, 10 mM de EGTA, 250 mM de sacarose, (preparado na hora do uso), as células foram transferidas para tubos e centrifugadas por 30 minutos a $1 \times 10^5 g$, a 4 °C. O sobrenadante, contendo o citoplasma, foi separado e a fração insolúvel (pellet) foi dissolvida em 2 mL de tampão com 1% Triton X-100 e centrifugada por 30 minutos, a $1 \times 10^5 g$, a 4 °C. O sobrenadante contendo a membrana celular foi separado e o

pellet, contendo o núcleo, foi dissolvido em 2 mL de PBS (pH 7,4) ^(49,50). As frações foram contadas em contador de radiação gama, tipo poço. A porcentagem dos complexos em cada compartimento celular foi determinada pela razão entre a contagem de cada tubo soma da contagem de todos os tubos de um experimento.

3.3.5 Avaliação da biodistribuição dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]^+$ em camundongos C57Bl6 com implantes de células B16F10.

Células de melanoma murino B16F10, em número de 5×10^4 ou 5×10^5 , foram implantadas, por via subcutânea, em camundongos da raça C57Bl6, machos, com aproximadamente 8 semanas de vida. Decorridos de 10 a 14 dias da inoculação das células, os animais foram enviados para o experimento de biodistribuição. A alimentação foi interrompida 6 horas antes da realização dos experimentos e água foi fornecida sem restrição durante todo o experimento. Os animais foram divididos em dois grupos, foram pesados em balança semi-analítica e aproximadamente 0,37 MBq (10 μCi) de cada complexo radioativo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ foi injetado na veia da cauda dos animais dos diferentes grupos. Transcorridos os intervalos de 15, 60, 120 e 240 minutos da administração do complexo, os animais (três para cada intervalo de tempo) foram anestesiados com administração intraperitonal de uma mistura de xilazina e ketamina (10 e 100 mg/kg), depois decapitados e o sangue colhido em frascos heparinizados. Imediatamente após a decapitação, os tecidos e órgãos: cérebro, tireóide, coração, pulmão, rins, baço, fígado, estômago, intestino grosso, intestino delgado, músculo, fêmur e tumor foram

retirados, pesados em balança analítica, e a radioatividade nos órgãos e no sangue foi medida em contador de radiação gama, tipo poço. A cauda foi retirada para correção da dose administrada.

4. Resultados

4.1 Avaliação da eficiência de marcação e das características eletrônicas dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]^+$ utilizando eletroforese

Para a utilização da eletroforese como método de análise, inicialmente avaliamos o perfil do íon $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4]^-$, uma molécula reconhecidamente aniônica, e o perfil do $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$, uma molécula reconhecidamente aniônica. Como esperado, o $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4]^-$ migrou a uma distância de 7 a 9 cm, em direção ao anodo, e o $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ migrou de 1 a 5 cm em direção ao catodo, conforme figura 12.

Figura 12. Gráfico da eletroforese do $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4]^-$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$, realizada em papel Whatman nº 1 (28x1,5 cm), em solvente PBS (50 mM, pH 7,4):Metanol (1:1), a 275V por 2 horas.

A eficiência da preparação do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ foi determinada inicialmente por eletroforese em PBS (50 mM, pH 7,4):Metanol (1:1). Foi observado que 79,92 % e 2,39 % da radioatividade migram, respectivamente, de 1 a 3 cm e de 7 a 8 cm em direção ao anodo, e 13,03 % da radioatividade permaneceu no local de aplicação da amostra, conforme apresentado na figura 13.

Utilizando o íon pertecnetato como referência (figura 12), pudemos determinar que a radioatividade encontrada à distância entre 7 a 8 cm em direção ao anodo, trata-se deste composto, o qual foi utilizado para a preparação do $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$. A radioatividade encontrada entre a origem e a distância de 3 cm em direção ao anodo, não pode ser atribuída ao produto de interesse, uma vez que este deveria migrar em direção ao catodo.

Figura 13. Gráfico da eletroforese do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$, realizada em papel Whatman nº1 (28x1,5 cm), em solução de PBS (50 mM, pH 7,4):Metanol (1:1), a 275 V por 2 horas.

Experimentos realizados por Seifert e col^(17,18) demonstraram que as moléculas de água do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ podem ser substituídas por átomos de cloro, através da reação com íons cloreto existente na solução fisiológica utilizada no eluato de $^{99m}\text{TcO}_4^-$. Do mesmo modo, Chen e col⁽²⁰⁾ relataram que as

moléculas de água do mesmo complexo também podem ser substituídas por moléculas de acetonitrila, solvente utilizado na fase móvel de CLAE.

Para verificar o fato, substituímos o metanol por acetonitrila, na solução utilizada para eletroforese. O perfil da eletroforese para o mesmo complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ foi modificado radicalmente, onde a detecção da radioatividade foi de, 39,11 %, migrou de 1 a 8 cm em direção ao anodo, 30,29 % permaneceu na origem do sistema e 27,79 % migrou em direção ao catodo, indicando a presença de carga positiva no complexo (figura 14).

Figura 14. Gráfico da eletroforese do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$, realizada em papel Whatman nº 1 (29x1,5 cm), em solução de PBS (50 mM, pH 7,4):Acetonitrila (1:1), a 275 V por 2 horas.

Uma vez que o objetivo deste trabalho foi preparar complexos de $[[^{99m}\text{Tc}]$ tecnécio utilizando ligantes derivados de etilenodiamina substituídas, decidimos inicialmente preparar um modelo com a molécula de etilenodiamina (EN), para obter o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})(\text{EN})(\text{CO})_3]^+$. A análise por eletroforese, utilizando a solução de PBS (50 mM. pH 7,4):metanol (1:1) mostrou a existência de três produtos principais sendo 19,52 % do produto com migração de 1 a 3 cm em direção ao anodo, caracterizando um produto com carga negativa, 15,99 % permaneceu na origem caracterizando um produto com carga neutra, e 62,06 %

migrou de 1 a 3 cm em direção ao catodo, confirmando a obtenção de um complexo catiônico (figura 15).

Figura 15. Gráfico da eletroforese do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})(\text{EN})(\text{CO})_3]^+$, realizada em papel Whatman nº 1 (28x1,5 cm), em solvente PBS (50 mM, pH 7,4):Metanol (1:1), a 275 V por 2 horas.

Considerando a capacidade do íon Cl^- e da acetonitrila em substituir a molécula de H_2O no complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$, deixamos o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{EN})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ em contato com solução de NH_4OH à temperatura ambiente. Nesta condição, 11,35 % do produto migrou de 1 a 3 cm em direção ao anodo, 9,89 % permaneceram na origem, 60,61 % migraram de 1 a 3 cm e 17,47 % migraram de 4 a 6 cm em direção ao catodo (figura 16).

Figura 16. Gráfico da eletroforese do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{EN})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, exposto a NH_4OH , à temperatura ambiente, realizada em papel Whatman nº 1 (28x1,5 cm), em solvente PBS (50 mM, pH 7,4):Metanol (1:1), a 275 V por 2 horas.

Quando a solução de $[[^{99m}\text{Tc}](\text{EN})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ e NH_4OH foi aquecida a 75 °C, um novo perfil eletroforético foi obtido. Apenas 3,93 % migraram em direção ao anodo, 1,68 % permaneceram na origem, 12,46 % migraram de 1 a 3 cm em direção ao catodo e outros 80,87 % migraram a 4 e 5 cm na mesma direção (figura 17).

Figura 17. Gráfico da eletroforese do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{EN})(\text{CO})_3(\text{NH}_2)]^+$, exposto a NH_4OH , e aquecida a 75 °C, realizada em papel Whatman nº 1 (28x1,5 cm), em solvente PBS (50 mM, pH 7,4):Metanol (1:1), a 275 V por 2 horas.

A partir desse novo perfil colocamos o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ na presença de NH_4OH , à temperatura ambiente e a 75 °C.

Na análise por eletroforese, utilizando solução de PBS (50 mM, pH 7,4):metanol(1:1), observamos que o produto da reação na temperatura ambiente, apresentou distribuição de 29,86 % da radioatividade de 1 a 4 cm em direção ao anodo, 13,71 % permaneceu na origem e 51,97 % migrou de 4 a 5 cm em direção ao catodo (figura 18). No experimento em que a reação com NH_4OH foi realizada a 75 °C, apenas 2,31 % permaneceu na origem, 86,96 % da radioatividade migrou de 4 a 5 cm em direção ao catodo (figura 19), e o restante da atividade foi distribuída em vários seguimentos da fita.

Figura 18. Gráfico da eletroforese do complexo $[[^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{NH}_3)_3(\text{CO})_3]^+$, obtido da reação com NH_4OH , à temperatura ambiente, realizada em papel Whatman nº1 (28x1,5 cm), em solução de PBS (50mM, pH 7,4):Metanol (1:1), a 275 V por 2 horas.

Figura 19. Gráfico da eletroforese do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{NH}_3)_3(\text{CO})_3]^+$, obtido da reação com NH_4OH , com aquecimento, realizada em papel Whatman nº 1 (28x1,5 cm), em solvente PBS (50 mM, pH 7,4):Metanol (1:1), a 275 V por 2 horas.

Os complexos objetos deste trabalho $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, onde CMNS = CMNS001 e CMNS003, também foram avaliados por eletroforese.

Para o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ na análise por eletroforese utilizando a solução de PBS (50mM, pH 7,4):metanol (1:1), observamos que 77,68 % da radioatividade migrou de 1 a 3 cm em direção ao anodo (figura 16), indicando a presença de uma carga negativa no complexo, 12,64 % permaneceu na origem e 4,72 % migrou em direção ao catodo, indicando a presença de uma carga positiva (figura 20). Todavia, quando a eletroforese do mesmo complexo foi realizada utilizando solução de PBS (50 mM, pH 7,4):acetonitrila (1:1), observamos uma inversão no perfil de carga da molécula com 9,41 % da atividade migrando de 1 a 4 cm em direção ao anodo, 12,71 % permaneceu na origem e 75,69 % migrou de 1 a 4 cm em direção ao catodo (figura 21), indicando a presença de uma carga positiva no complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, como o esperado.

Figura 20. Gráfico da eletroforese do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{CO})_3(\text{Cl})]^-$, realizada em papel Whatman nº 1 (29x1,5 cm), em solução de PBS (50 mM, pH 7,4): Metanol (1:1), a 275 V por 2 horas.

Figura 21. Gráfico da eletroforese do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{CO})_3(\text{AcN})]^+$, realizada em papel Whatman nº1 (29x1,5 cm), em solução de PBS (50 mM, pH 7,4):Acetonitrila (1:1), a 275 V por 2 horas.

Quando os mesmos experimentos foram conduzidos para o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, no sistema PBS (50 mM, pH 7,4):metanol (1:1) foi observado que 48,76 % do produto radioativo migrou de 1 a 9 cm em direção ao anodo, 46,76 % permaneceu na origem e 3,63 % migrou de 1 a 2 cm em direção ao catodo (figura 22). Quando foi utilizada a solução de PBS (50 mM, pH 7,4):Acetonitrila (1:1), observamos que 10,11 % do produto radioativo migrou de 1 a

4 cm em direção ao anodo, 76,04 % permaneceu na origem e 8,82 % migrou de 1 a 4 cm em direção ao catodo (figura 23).

Figura 22. Gráfico da eletroforese do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ realizada em papel Whatman nº 1 (29x1,5 cm), em solução de PBS (50 mM, pH 7,4):Metanol (1:1), a 275 V por 2 horas.

Figura 23. Gráfico da eletroforese do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ realizada em papel Whatman nº 1 (29x1,5 cm), em solução de PBS (50 mM, pH 7,4):Acetonitrila (1:1), a 275 V por 2 horas.

4.2 Controle de qualidade dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ utilizando CLAE

4.2.1 Eficiência de marcação dos complexos

A eficiência de marcação dos complexos foi avaliada por CLAE, após a preparação dos mesmos, e o perfil cromatográfico para as diferentes espécies é apresentado na figura 24.

Figura 24. Radiocromatograma de: (A) $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}_4^-$, (B) $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$, (C) $[[^{99m}\text{Tc}](\text{cys})(\text{CO})_3]$, (D) $[[^{99m}\text{Tc}](\text{his})(\text{CO})_3]$, (E) $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, (F) $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$.

Os valores da concentração radioativa para as diferentes espécies, obtidos da integração das áreas dos picos na análise por CLAE, são apresentados na tabela 3, e mostram a média para os compostos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$.

Tabela 3. Valor médio da eficiência de marcação dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, realizados em **n** amostras.

Concentração das espécies radioativas $\pm$ desvio padrão (%) em função do tempo de retenção						
Tempo (min)	4,1	9,9	---	---	---	---
Complexo						
$[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ n = 10	1,9 $\pm$ 1,7	98,1 $\pm$ 1,7	---	---	---	---
Tempo (min)	---	11,1	12,8	14,2	---	---
Complexo						
$[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ n = 3	---	86,6 $\pm$ 8,3	6,2 $\pm$ 1,9	7,1 $\pm$ 2,3	---	---
Tempo (min)	4,1	12,1	12,5	13,6	15,3	16,4
Complexo						
$[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ n = 3	1,2 $\pm$ 0,5	4,1 $\pm$ 0,2	11,6 $\pm$ 1,3	63,7 $\pm$ 2,0	11,4 $\pm$ 1,3	7,8 $\pm$ 0,7

n = número de amostras

Para efeito da caracterização estrutural do complexo de $[[^{99m}\text{Tc}]$ tecnécio, o complexo de rênio $[\text{Re}(\text{CMNS001})\text{Br}(\text{CO})_3]^+$ foi preparado e caracterizado e co-injetado com o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$. O tempo de retenção observado para o complexo de rênio, registrado no detector de ultravioleta (260 nm), e para o de $[[^{99m}\text{Tc}]$ tecnécio, registrado no detector de cintilação, foram idênticos, indicando a similaridade entre as estruturas (figura 25).

Figura 25. Análise por CLAE da injeção simultânea dos complexos $[\text{Re}(\text{CMN001})\text{Br}(\text{CO})_3]^+$ e $[[^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{CMN001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, com detecção em ultravioleta (260 nm) e contador de cintilação, respectivamente.

4.2.2 Estabilidade *in vitro* dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ em presença de cisteína ou histidina

Considerando que depois de administrado em pacientes os radiofármacos entram na corrente sanguínea e lá estão expostos a diferentes moléculas foi necessário avaliar a estabilidade desses complexos contra potenciais agentes quelantes, como as moléculas de cisteína e histidina presentes nas proteínas.

Assim, após a obtenção do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, este foi analisado por CLAE, indicando a presença de 86,6 % do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, com TR = 11,1 min, e dois outros picos TR = 12,8 e 14,2 min.

O complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ foi incubado na presença de cisteína por 60 e 240 minutos, a 37 °C, e foi observado uma alteração da composição do produto principal, com a pureza radioquímica aumentando de 86,6 %, para 94 %, com o desaparecimento de dois subprodutos com tempo de retenção de 12,8 e 14,4 minutos (tabela 4 e figura 26-A,B e C).

O mesmo procedimento foi realizado utilizando a histidina e, neste caso, juntamente com desaparecimento dos sinais retenção de 12,8 e 14,4 minutos, observamos o surgimento de sinal com tempo de retenção de 2,5 minutos (tabela 5 e figura 27-A,B e C).

Tabela 4. Estabilidade in vitro do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ em presença de cisteína, em função do tempo de incubação.

Concentração de espécies radioativas (%) por tempo de retenção			
Tempo (min)	11,1	12,8	14,2
0	86,6	6,2	7,1
60	93,3	2,45	4,2
240	94,6	---	5,4

Figura 26. Radiocromatograma do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ realizado: **(A)** após o preparo, **(B)** após incubação com cisteína por 60 min, **(C)** após incubação com cisteína por 240 min.

Tabela 5. Estabilidade in vitro do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ em relação a histidina em função do tempo de incubação.

Concentração de espécies radioativas (%) por tempo de retenção				
Tempo (min)	2,5	11,10	12,8	14,2
0	---	86,6	6,2	7,1
60	3,6	96,3	---	---
240	5,3	94,6	---	---

Figura 27. Radiocromatograma do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ realizado: **(A)** após o preparo, **(B)** após incubação com histidina por 60 min, **(C)** após incubação com histidina por 240 min.

Após a obtenção do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, este foi analisado por CLAE, indicando a presença de múltiplos picos, na região entre 12,1 min e 16,4 min, com predominância de um pico com tempo de retenção de 13,3 min (tabela 6 e figura 28-A).

O complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ foi incubado na presença de cisteína por 60 e 240 minutos, a 37 °C, e foi observado uma alteração da composição do produto principal, com a pureza radioquímica aumentando de 61,4 %, para 81,4 %, para aquele que consideramos o produto principal a 13,3 min, em função da diminuição da concentração ou com desaparecimento de subprodutos (tabela 5 e figura 28-A,B e C).

O mesmo procedimento foi realizado utilizando a histidina e, neste caso, o complexo mostrou-se instável, pois observamos o surgimento de sinal intenso com tempo de retenção de 21,1 min, após 60 minutos de incubação com a histidina, e a degradação total do complexo principal, após 240 min de incubação (tabela 6 e figura 29-A,B e C).

Tabela 6. Estabilidade in vitro do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ em relação a cisteína, em função do tempo de incubação.

Concentração de espécies radioativas (%) por tempo de retenção						
Tempo (min)	4,1	12,1	12,5	13,3	15,3	16,4
0	1,2	4,34	11,6	61,4	12,7	8,6
60	2,7	3,0	---	59,1	---	---
240	---	---	---	81,4	---	---

Figura 28. Radiocromatograma do $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ realizado: (A) após o preparo, (B) após incubação com cisteína por 60 min., (C) após incubação com cisteína por 240 min.

Tabela 7. Estabilidade in vitro do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ em relação a histidina, em função do tempo de incubação.

Concentração de espécies radioativas (%) por tempo de retenção							
Tempo (min)	4,1	12,1	12,5	13,3	15,3	16,4	21,1
0	1,2	4,34	11,6	61,4	12,7	8,6	---
60	0,9	1,8	---	36,5	7,4	---	39,83
240	---	---	---	---	---	---	---

Figura 29. Radiocromatograma do $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ realizado: **(A)** após o preparo, **(B)** após incubação com histidina por 60 min., **(C)** após incubação com histidina por 240 min.

4.3 Determinação do coeficiente de partição

Para podermos correlacionar propriedades físico-químicas com as propriedades biológicas, determinamos a lipofilicidade dos complexos, através do método do coeficiente de partição e o resultado, na forma de logaritmo (Log P), é apresentado na tabela 8.

Tabela 8. Resultado do coeficiente de partição, expresso como média $\pm$ DP do Log P de 3 amostras.

Complexo	Log P
$[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$	$1,330 \pm 0,127$
$[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$	$0,266 \pm 0,075$
$[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$	$0,718 \pm 0,018$

4.4 Determinação da taxa de captação celular

4.4.1 Em células MCF-7 e MDA-MB-231 não aderidas, na ausência ou presença de SFB

Os experimentos realizados para avaliar a taxa captação dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ mostrou que a concentração dos complexos desenvolvidos neste projeto apresentou um processo crescente de concentração nas células no decorrer do

tempo. Nas células MCF-7 a captação do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ foi de $5,88 \pm 0,65$ %, aos 5 minutos, aumentando significativamente para $15,79 \pm 2,87$ % ($p < 0,05$), aos 60 minutos. O mesmo ocorreu para o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, onde a captação inicial foi de $12,19 \pm 2,98$ %, aos 5 minutos, aumento significativamente para $23,08 \pm 0,22$ % ($p < 0,05$) aos 60 minutos.

Com relação aos dois complexos, a concentração de $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ foi significativamente maior que a da outra espécie, nos tempos de 5 minutos ($p < 0,05$) e 60 minutos ($p < 0,05$). Por outro lado, a concentração do $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ praticamente não se alterou, permanecendo ao redor dos 3 % durante todo o estudo, conforme pode ser observado nas figuras 30.

Figura 30. Avaliação da captação dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$, em células MCF-7 não aderidas, em meio de cultura sem SFB, mantidas a 37°C , em função do tempo.

A mudança na linhagem celular de MCF-7 para MDA-MB-231 alterou relativamente pouco o perfil de captação dos compostos, mantendo as diferenças

estatisticamente significantes entre a captação aos 5 minutos e 60 minutos para o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ ($6,99 \pm 1,15$ %; $13,83 \pm 2,95$ %; $p=0,02$), com o mesmo ocorreu para o complexo com $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ ($8,84 \pm 0,97$ %; $18,89 \pm 0,99$ %; $p<0,05$). Com relação a captação entre os complexos, não foi observada diferença estatisticamente significativa na captação para o tempo de 5 minutos ($p>0,5$), mas a diferença foi observada para o tempo de 60 minutos ($p<0,05$). Também, neste experimento, a captação do $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ foi baixa e não variou significativamente no decorrer do tempo (figura 31).

Figura 31. Avaliação da captação dos complexos $\diamond [[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, $\blacksquare [[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ e $\Delta [[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$, em células MDA-MB-231 não aderidas, em meio de cultura sem SFB, mantidas a 37°C , em função do tempo.

Considerando que nos sistemas vivos, os radiofármacos são distribuídos pelo corpo através da corrente sanguínea, realizamos outro experimento, introduzindo 10% de SFB no meio de cultura utilizado para o estudo de captação (figura 32). Como no estudo anterior, a captação dos complexos é dependente do tempo de

incubação e existe diferença estatística dos valores para o complexo com $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ nos tempos de 10 e 60 minutos ($2,20 \pm 0,53$ %, $7,59 \pm 1,30$ %, $p < 0,05$) e para o complexo com $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ nos mesmos tempos ($10,87 \pm 1,65$ %, $18,53 \pm 2,79$ %, $p < 0,05$). Quando foi comparada a relação entre a diferença de captação entre os dois complexos, foi observada diferença significativa nos tempos de 10 minutos e 60 minutos ($p < 0,05$).

Figura 32. Avaliação da captação dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$, em células MCF-7 não aderidas, em meio de cultura suplementado com 10 % de SFB, mantidas a 37°C, em função do tempo.

O mesmo experimento foi realizado para a linhagem MDA-MB-231 (figura 33) e observamos que a concentração dos complexos não foi tempo dependente como observado no experimento anterior com a mesma linhagem, porém na ausência de SFB, evidenciando a influencia do mesmo na captação celular, embora a captação aumente aos 30 minutos, observamos que ela não se altera após 30 minutos para os complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$

($p>0,05$), assim como permanece constante para o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ ($p>0,05$)

Figura 33. Avaliação da captação dos complexos $\diamond [[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, $\blacksquare [[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ e $\Delta [[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$, em células MDA-MB-231 não aderidas, em meio de cultura suplementado com 10 % de SFB, mantidas a 37°C, em função do tempo.

Quando foi avaliada a diferença entre a captação nas condições do meio sem SFB e com 10 % de SFB (figuras 30 e 32), para a linhagem MCF-7, foi observado que a concentração do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, na presença de SBF a captação do complexo com foi significativamente menor nos tempos de 10 minutos, quando comparado ao experimento onde o meio não continha SFB ($5,88 \pm 0,53$ %, $2,20 \pm 0,53$ %, $p<0,05$), o mesmo ocorrendo para o tempo de 60 minutos ($15,79 \pm 2,34$ %, $7,59 \pm 1,30$ %, $p<0,05$). Por outro lado, não foram observadas diferenças significantes para o complexo com $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, nos tempos de 10 minutos ($12,19 \pm 2,43$ %, $10,87 \pm 1,65$ %, $p>0,05$) e 60 minutos ($23,08 \pm 0,15$ %, $18,53 \pm 2,79$ %, $p>0,05$).

Quando analisamos a mesma situação para a linhagem MDA-MB-231 (figuras 31 e 33), observamos o mesmo comportamento, com a captação de $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ na presença de SFB sendo significativamente menor nos tempos de 10 minutos, quando comparado ao experimento onde o meio não continha SFB ($7,0 \pm 1,1\%$, $3,0 \pm 0,5\%$, $p < 0,05$), o mesmo ocorrendo para o tempo de 60 minutos ($13,8 \pm 3,0\%$, $5,6 \pm 1,6\%$, $p < 0,05$). Por outro lado, não foram observadas diferenças significantes para o complexo com $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, nos tempos de 10 minutos ($8,8 \pm 0,9\%$, $10,7 \pm 0,5\%$, $p > 0,05$) e 60 minutos ($18,9 \pm 1,0\%$, $16,8 \pm 3,7\%$, $p > 0,05$).

4.4.2 Em células MCF-7, MDA-MB-231 e B16F10 aderidas, na presença de SFB

Tentando mimetizar um sistema mais próximo ao que se espera encontrar em tumores sólidos, realizamos novo experimento utilizando células MCF-7 aderidas aos poços de cultura, utilizando meio de cultura com 10 % de SFB (figura 34). O efeito do tempo na captação dos complexos seguiu os padrões observados anteriormente, com a captação aos 60 minutos sendo significativamente maior que aos 10 minutos para os complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS}^{001-3})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$. Todavia, o efeito desse novo sistema foi uma diminuição significativa na captação do complexo com $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, aos 60 minutos, quando comparado com o valor do experimento realizado com célula em suspensão (aderida = $4,30 \pm 0,22\%$, suspensão = $7,59 \pm 1,30\%$, $p < 0,05$). Uma diminuição mais acentuada ocorreu para o complexo com $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, tanto aos 10 minutos quando o valor diminuiu de $10,87 \pm 1,65\%$ nas células em suspensão, para $2,53 \pm 0,17\%$ nas células aderidas

($p=0,011$), quanto aos 60 minutos quando o valor diminuiu de $18,53\pm 2,39\%$ para $4,09\pm 0,06\%$ ($p<0,05$). enquanto que para o MIBI o valor permaneceu dentro de uma faixa de 0,8 a 1,3 % ($p>0,5$).

Figura 34. Avaliação da captação dos complexos $\blacklozenge$ $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, $\blacksquare$ $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ e $\triangle$ $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$, em células MCF-7 aderidas, em meio de cultura suplementado com 10 % de SFB, mantidas a 37°C , em função do tempo.

Observamos para a captação dos complexos em células da linhagem MDA-MB-231 (figura 35), um comportamento diferente do observado na linhagem MCF-7 onde a captação do complexo com $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ em células aderidas e não aderidas, $3,7\pm 0,3$ e $5,6\pm 1,6\%$, respectivamente, não apresentou diferença significativa, aos 60 minutos. Por outro lado, para o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ o padrão de diminuição de captação foi observado entre as células aderidas e não aderidas, aos 10 minutos quando o valor diminuiu de $10,7\pm 0,5\%$ para $2,8\pm 0,02\%$ ($p<0,05$), e aos 60 minutos quando o valor diminuiu de

16,8±3,7% para 2,4±0,7% ($p<0,05$). No caso do $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ o valor permaneceu dentro de uma faixa de 0,9 a 1,2 % ($p>0,05$).

Figura 35. Avaliação da captação dos complexos $\diamond [[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, $\blacksquare [[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ e $\Delta [[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$, em células MDA-MB-231 aderidas, em meio de cultura suplementado com 10 % de SFB, mantidas a 37°C, em função do tempo.

O mesmo experimento foi realizado para avaliar a captação dos complexos nas células da linhagem B16F10 aderidas aos poços de cultura, utilizando meio de cultura com SFB 10% (figura 36). O complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ mostrou um aumento significativo na captação entre todos os tempos (10, 30 e 60 minutos) ($p<0,05$). Já para o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ observamos um aumento significativo na captação entre os tempos de 10 e 60 minutos ($p<0,05$). A captação do $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ foi baixa, da ordem de 0,4 %, e não variou significativamente no decorrer do tempo ($p>0,05$).

Figura 36. Avaliação da captação dos complexos $\diamond$ $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, $\blacksquare$ $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ e $\triangle$ $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$, em células B16F10 aderidas, em meio de cultura suplementado com 10 % de SFB, mantidas a 37°C, em função do tempo.

4.5 Determinação da taxa de eliminação

4.5 Eliminação em células MCF-7, MDA-231 e B16F10 aderidas ou não, na presença de SFB.

Os experimentos realizados para avaliar a taxa de eliminação dos complexos das células da linhagem MCF-7 não aderidas (figura 37), mostrou que todo o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ captado pelas células MCF-7 permaneceu ligado a elas por até 60 minutos ($p > 0,05$), enquanto que para o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ observamos uma diminuição na concentração da ordem de 40% aos 60 minutos ($p < 0,5$), em meio de cultura na ausência do complexo.

No entanto, quando o experimento foi realizado com células aderidas (figura 38), observamos a permanência dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ por pelo menos 60 minutos, pois não observamos a eliminação dos mesmos.

Figura 37. Avaliação da eliminação dos complexos $\blacklozenge$ $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, $\blacksquare$ $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ e $\triangle$ $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$, em células MCF-7 não aderidas, em meio de cultura suplementado com 10 % de SFB, mantidas a 37°C, em função do tempo.

Figura 38. Avaliação da eliminação dos complexos $\diamond$ $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, $\blacksquare$ $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ e Δ $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$, em células MCF-7 aderidas, em meio de cultura suplementado com 10 % de SFB, mantidas a 37°C, em função do tempo.

No entanto quando realizamos o experimento para com a linhagem celular MDA-MB-231 nas mesmas condições (figuras 39 e 40), observamos que o fenômeno ocorrido nos primeiros 10 minutos foi semelhante ao observado anteriormente, e a eliminação do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ não sofreram alterações ao longo do estudo, indicando a permanência dos complexos ligados as células por até 60 minutos ($p > 0,05$), o mesmo foi observado para o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ ($p > 0,05$). No entanto quando o experimento foi realizado com células aderidas (figura 40) observamos uma eliminação significativa de todos os complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, onde aproximadamente 24% e 40% do complexo extrui das células após 60 minutos ($p < 0,05$), fato semelhante ocorre para o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$, onde aproximadamente 25% do complexo extrui das células após 60 minutos ($p < 0,05$).

Figura 39. Avaliação da eliminação dos complexos $\diamond$ $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, $\blacksquare$ $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ e $\triangle$ $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$, em células MDA-MB-231 não aderidas, em meio de cultura suplementado com 10 % de SFB, mantidas a 37°C, em função do tempo.

Figura 40. Avaliação da eliminação dos complexos $\diamond$ $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, $\blacksquare$ $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ e $\triangle$ $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$, em células MDA-MB-231 aderidas, em meio de cultura suplementado com 10 % de SFB, mantidas a 37°C, em função do tempo.

Os experimentos realizados para avaliar a taxa de eliminação dos complexos das células da linhagem B16F10 aderidas (figura 41), mostrou que 20% do

complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ captado pelas células é extruído até 60 minutos ($p < 0,05$), enquanto que para o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ captado pelas células permaneceu ligado a elas por até 60 minutos ($p > 0,05$). Para o complexo MIBI observamos um comportamento semelhante ao complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ onde 19% do complexo é extruído até 60 minutos ($p < 0,05$), observamos que não houve diferença estatisticamente significativa na eliminação entre os complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$. No entanto, o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ apresenta uma eliminação maior em relação aos outros complexos nos tempos de 30 e 60 minutos ($p < 0,05$).

Figura 41. Avaliação da eliminação dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$, em células B16F10 aderidas, em meio de cultura suplementado com 10 % de SFB, mantidas a 37°C, em função do tempo.

4.6 Distribuição subcelular dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$

O experimento realizado para avaliar a distribuição subcelular dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ nas células da linhagem B16F10, mostrou que os dois complexos estão presentes em altas proporções na membrana celular e citoplasma, mais especificamente de 42 % e 53 %, respectivamente para o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, e de 48 % e 42 %, respectivamente, para o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$; a concentração no núcleo é baixa, da ordem de 5 % e 10 %, para os dois complexos, respectivamente. Para o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ observamos 95 % da concentração do complexo no citoplasma, 4,9 % na membrana celular e 0,1 % no núcleo.

Figura 42. Avaliação da concentração subcelular dos complexos $\blacklozenge [[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, $\blacksquare [[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ e $\Delta [[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$, em células MCF-7.

No entanto quando realizamos o experimento com células da linhagem MDA-MB-231, observamos uma maior captação dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ na membrana celular, 60,6% e 64,7% respectivamente, e também alta concentração no núcleo, da ordem de 12,3% e 25,2%, para os respectivos complexos. O complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ apresenta maior captação no citoplasma 67,9%, porém a captação foi intensa na membrana, da ordem de 31,5%, e 0,6% no núcleo.

Figura 43. Avaliação da concentração subcelular dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$, em células MDA-MB-231.

4.6 Avaliação da biodistribuição *in vivo* dos complexos

Na análise da biodistribuição do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, cujo os resultados foram corrigidos para % de dose / g órgão, observamos uma depuração sanguínea intensa, com o produto se acumulando em órgão como a

tireóide e coração, principalmente, mas também no osso e no músculo. As vias de excreção são a renal e a gastrointestinal, com acúmulo intenso nos rins após 4 horas da administração do complexo. A captação no tumor ficou abaixo daquela observado para o tecido muscular.

Figura 44. Avaliação da biodistribuição do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ em camundongos C57Bl6 implantados com células B16F10, em função do tempo.

Tabela 9. Biodistribuição pelo método invasivo em camundongos, do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ nos intervalos de 30 e 120 minutos, após administração do radiofármaco, expressos como porcentagem da média e desvio padrão da dose injetada/grama de órgão.

Órgãos	%Dose/órgão			
	30 min	60 min	120 min	240 min
Sangue	$2,16 \pm 0,54$	$1,28 \pm 0,05$	$0,92 \pm 0,11$	$0,74 \pm 0,06$
Cérebro	$0,16 \pm 0,03$	$0,21 \pm 0,02$	$0,17 \pm 0,02$	$0,17 \pm 0,02$
Tireóide	$2,66 \pm 0,62$	$3,26 \pm 0,10$	$2,98 \pm 0,36$	$2,56 \pm 0,26$
Coração	$5,70 \pm 1,91$	$6,43 \pm 1,31$	$6,41 \pm 0,97$	$5,00 \pm 0,38$
Pulmão	$5,90 \pm 1,00$	$5,60 \pm 0,74$	$3,83 \pm 0,21$	$2,81 \pm 0,04$
Rim	$18,52 \pm 7,55$	$19,80 \pm 1,65$	$13,76 \pm 1,41$	$9,69 \pm 0,46$
Estômago	$2,44 \pm 0,64$	$6,31 \pm 2,07$	$6,42 \pm 2,63$	$2,94 \pm 0,16$
Baço	$3,90 \pm 1,32$	$3,48 \pm 0,09$	$2,86 \pm 0,28$	$2,22 \pm 0,25$
Fígado	$13,20 \pm 5,14$	$15,57 \pm 2,21$	$13,16 \pm 0,70$	$10,38 \pm 0,20$
I. Grosso	$1,78 \pm 0,70$	$2,83 \pm 0,80$	$5,79 \pm 3,77$	$22,19 \pm 0,73$
I. Delgado	$6,89 \pm 3,44$	$14,60 \pm 2,20$	$20,92 \pm 0,57$	$11,33 \pm 0,69$
Osso	$1,77 \pm 0,47$	$1,97 \pm 0,06$	$1,94 \pm 0,66$	$1,55 \pm 0,25$
Músculo	$1,60 \pm 0,57$	$2,00 \pm 0,08$	$2,23 \pm 0,38$	$2,04 \pm 0,23$
Tumor	$1,44 \pm 0,46$	$1,61 \pm 0,26$	$1,21 \pm 0,20$	$1,17 \pm 0,19$

Na biodistribuição do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ observamos uma depuração sanguínea mais intensa que aquela observada para o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$. As captações nos órgãos como tireóide, coração, pulmão, osso e músculo também são persistente no passar do tempo, mas é percentualmente menor que aquela observada para o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$. A concentração nos tumores é menor, mas a relação com o músculo e o osso é maior, melhorando o contraste em um processo de imagem.

Figura 45. Avaliação da biodistribuição em camundongos C57Bl6 implantados com células B16F10 do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ em função do tempo.

Tabela 10. Biodistribuição pelo método invasivo em camundongos, do complexo de $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ nos intervalos de 30 e 120 minutos, após administração do radiofármaco, expressos como porcentagem da média e desvio padrão da dose injetada/grama de órgão.

Órgãos	%Dose/órgão			
	30 min	60 min	120 min	240 min
Sangue	1,35 ± 0,16	0,83 ± 0,11	0,61 ± 0,06	0,41 ± 0,01
Cérebro	0,19 ± 0,04	0,23 ± 0,03	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,01
Tireóide	2,07 ± 0,33	4,41 ± 1,22	3,85 ± 0,41	3,17 ± 1,25
Coração	2,21 ± 0,72	2,54 ± 0,46	2,44 ± 0,22	2,18 ± 0,02
Pulmão	3,90 ± 1,29	4,48 ± 1,54	2,51 ± 0,43	1,63 ± 0,25
Rim	6,28 ± 2,70	8,50 ± 1,09	6,62 ± 0,65	4,62 ± 0,80
Estômago	2,60 ± 0,35	3,17 ± 0,65	4,05 ± 1,65	3,77 ± 1,00
Baço	2,68 ± 0,96	2,89 ± 0,62	2,21 ± 0,06	1,76 ± 0,52
Fígado	11,09 ± 2,44	10,81 ± 2,61	9,62 ± 0,86	6,39 ± 0,90
I. Grosso	0,67 ± 0,36	1,50 ± 1,30	2,81 ± 0,71	17,24 ± 5,97
I. Delgado	6,33 ± 1,94	9,68 ± 1,66	12,45 ± 0,98	6,47 ± 1,07
Osso	0,67 ± 0,22	1,02 ± 0,12	0,68 ± 0,09	0,63 ± 0,05
Músculo	0,62 ± 0,22	0,76 ± 0,16	0,70 ± 0,04	0,75 ± 0,09
Tumor	0,49 ± 0,20	0,84 ± 0,28	0,62 ± 0,14	0,58 ± 0,07

5 Discussão

5.1 Parâmetros físico-químicos

O $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ pode ser obtido a partir de um kit liofilizado comercializado pela empresa Mallinckrodt onde para obtenção do $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ basta adicionar o TcO_4^- e aquecer^(31,51,52) ou por preparação extemporânea, a partir da reação de TcO_4^- com boroidreto de sódio, em atmosfera de CO^(19,45,46). A preparação extemporânea apresenta a limitação da instabilidade do boroidreto em solventes próticos, mas com o cuidado de se evitar o uso de sal de boroidreto hidratado ou de se trabalhar em tempos curtos, o produto geralmente é obtido com alta eficiência de marcação, com valores semelhantes àqueles obtidos com o kit liofilizado (tabela 2).

O principal problema encontrado em nosso trabalho foi a carga negativa observado do estudo de eletroforese para os complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ (figura 13), $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ (figura 20) e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ (figura 22), quando utilizado do solução de PBS (50mM, pH 7,4):metanol (1:1).

Os trabalhos apresentados na literatura a respeito da preparação de radiofármacos de ^{99m}Tc tecnécio derivados da espécie $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CO})_3]$ relatam que a preparação é originada do processo de transquelação do complexo catiônico $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$. Todavia, Seifert e col^(53,54) demonstraram que na presença de íons Cl^- a molécula de H_2O de um complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{bidentado})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ pode ser substituída, dando origem ao complexo neutro $[[^{99m}\text{Tc}](\text{bidentado})(\text{CO})_3(\text{Cl})]^0$. Como o produto é resultado de uma reação de equilíbrio, a remoção dos íons Cl^- do

meio regenera o complexo catiônico, conforme foi demonstrado pelos autores na análise por eletroforese do complexo.

Esse fenômeno poderia explicar o caráter negativo observado para o $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ que, nas condições da eletroforese, poderia ter mais de uma molécula de H_2O substituída por íons Cl^- , dando origem a espécies do tipo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_2(\text{CO})_3(\text{Cl})]^0$, $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3(\text{Cl})_2]^-$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{Cl})_3]^{2-}$. Essas espécies podem ser encontradas no resultado da eletroforese apresentado na figura 13.

Inicialmente, encontramos a espécie neutra retida na origem (0 cm), a espécie com uma carga negativa migrando entre 1 e 3 cm em direção ao anodo, quando foi utilizado o PBS 50mM:metanol (1:1) como a solução para eletroforese. A observação da complexo com carga positiva somente foi possível com a utilização da solução de PBS 50 mM:acetonitrila (1:1) como solução (figura 14).

É muito provável que Seifert^(53,54) tenha se equivocado em suas conclusões e ao invés de uma reação reversível, o que deva ter ocorrido foi a substituição das moléculas de H_2O ou Cl^- por molécula de acetonitrila (CH_3CN), conforme foi demonstrado por Chen et al.⁽⁵⁵⁾. Estes autores realizarem espectrometria de massa do complexo $[\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ após este ter sido analisado por CLAE, utilizando acetonitrila (CH_3CN) na fase móvel, e determinaram que as moléculas de H_2O foram substituídas por moléculas de CH_3CN , o qual atua como um ligante neutro, dando origem a compostos do tipos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_2(\text{CH}_3\text{CN})]^+$, $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})(\text{CH}_3\text{CN})_2(\text{CO})_3]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CH}_3\text{CN})_3(\text{CO})_3]^+$.

Considerando essas reações de substituições e que CH_3CN é um solvente tóxico e que sua utilização para administração em seres humanos não é recomendada, decidimos avaliar outro ligante que pudesse fazer o mesmo papel da CH_3CN e que pudesse ser administrado em seres humanos.

O estudo foi realizado reagindo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ com NH_3 ($\text{NH}_4\text{OH} \leftrightarrow \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}$), inicialmente à temperatura ambiente, o que levou a formação de uma espécie catiônica, supostamente $[[^{99m}\text{Tc}](\text{NH}_3)_3(\text{CO})_3]^+$, na concentração de 51,97%, mas ainda com moléculas com carga negativa e neutra (figura 18). Quando uma preparação semelhante foi aquecida, obtivemos aproximadamente 87% do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{NH}_3)_3(\text{CO})_3]^+$ (figura 19).

No passo seguinte, preparamos o complexo com etilenodiamina não substituída para obtenção do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{EN})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$. Na análise por eletroforese deste complexo obtivemos 62,06 % de uma espécie com carga positiva (figura 15). O complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})(\text{EN})(\text{CO})_3]^+$ foi então colocado na presença de NH_4OH , esperando substituir a molécula de H_2O ou de Cl^- (proveniente da solução fisiológica utilizada para extrair o $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ou do HCl utilizado para neutralizar a reação de complexação) por NH_3 . Os resultados não foram muito satisfatórios uma vez que as espécies com carga negativa e neutra diminuíram relativamente pouco, em torno de 15%, com aparente conversão da espécie para o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{NH}_3)_3(\text{CO})_3]^+$ (figura 16).

Para tentar acelerar o processo, aquecemos a reação anterior, que havia sido realizada à temperatura ambiente, mas isso acabou por degradar quase que todo o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{EN})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, gerando o $[[^{99m}\text{Tc}](\text{NH}_3)_3(\text{CO})_3]^+$ em uma concentração de 80,87% (figura 17).

O efeito da substituição da molécula de H_2O por íons Cl^- também foi observado para os complexos de interesse $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]^+$, mas esse efeito não é suficiente para explicar a carga negativa nesses complexos, uma vez que existe somente uma molécula de H_2O a ser substituída, o que dá origem a uma espécie neutra do tipo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_2(\text{CO})_3(\text{Cl})]^0$.

No caso dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, os nitrogênios da etilenodiamina que podem ter pKa de 9,98 diminuído para 9,68 em função da presença do grupo benzila, o que pode ser acentuado pelo efeito indutivo (- I) do grupo p-metoxi neste grupo. Corrobora com esta hipótese o fato de que para o complexo com etilenodiamina não substituída $[[^{99m}\text{Tc}](\text{EN})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ foram observadas a formação de uma pequena quantidade de espécie com carga negativa na eletroforese (figura 15).

Figura 46. Esquema do processo de polarização da molécula N-[(4-metoxi)benzil]-1,2-diaminoetano, gerada pelo efeito indutivo (- I) do grupo metoxila.

Figura 47. Valores de pKa para diferentes aminas⁽⁵⁶⁾.

Outro efeito que pode estar associado está relacionado com a formação do complexo e o estado de oxidação do $[^{99m}\text{Tc}]$ tecnécio^(57,58). Por exemplo, nos complexos preparados por Marques⁽⁴⁴⁾ utilizando os mesmos ligantes, mas obtendo complexos com o metal apresentando estado de oxidação 5+, a carga do complexo é positiva, em concordância com a não desprotonação dos grupos amina (figura 05).

Um exemplo clássico de como a estrutura do complexo pode alterar o pKa de um grupo está no complexo $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{ECD})]$, onde estão presentes dois grupos amina coordenados com o $[^{99m}\text{Tc}]$ tecnécio e para se obter um complexo estável apenas um dos grupos amina perde um próton.

Figura 48. Representação do complexo de $[[^{99m}\text{Tc}]\text{O}(\text{ECD})]$

O efeito da substituição das moléculas de H_2O ou íon Cl^- por CH_3CN também foi observado para os complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$.

Conforme já foi discutido anteriormente a obtenção do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ foi obtido em alto rendimento ($\sim 97\%$). Para os complexos obtidos a partir do processo de transquelação, os resultados foram satisfatórios para o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, com rendimento próximo a 90 %, porém, foram insatisfatórios para o produto $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, se considerarmos a área correspondente ao pico principal ($\text{TR} = 13,3 \text{ min}$, figura 29A). Todavia, se consideramos que os picos adjacentes possam ser isômeros estruturais

do composto principal, uma vez que isso é possível para amina secundárias^(59,60), teríamos algo em torno de 85 a 90 % de eficiência de marcação.

Segundo modelos computacionais obtidos em software não específico⁽⁶¹⁾ poderíamos ter ao mínimo três isômeros estruturais, com os grupos 4-metoxi-benzil posicionados acima e abaixo de um plano formado pelos átomos N,N,CO,CO, ou posicionados acima desse plano, tendo a molécula de H₂O como vizinha, ou posicionados abaixo do plano, tendo a molécula de CO como vizinha (figura 49), enquanto que o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ poderia apresentar dois isômeros principais, com o grupo 4-metoxi-benzil podendo estar, segundo um plano formado pelos, ora voltado para o lado do grupos CO, ora voltado para a molécula de H₂O (figura 50).

Figura 49. Ilustrando os possíveis isômeros do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, onde cinza = carbono, azul claro = hidrogênio, azul escuro = nitrogênio, vermelho = oxigênio e verde = tecnécio ou rênio.

Figura 50. Ilustrando os possíveis isômeros do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, onde cinza = carbono, azul claro = hidrogênio, azul escuro = nitrogênio, vermelho = oxigênio e verde = tecnécio ou rênio.

Todavia, a confirmação desta suposição somente será possível com a preparação dos complexos de rênio utilizando o mesmo ligante, para posterior separação e caracterização de cada complexo utilizando a difração de raio-X. E ainda assim, artefatos podem ser gerados, pois as condições para a preparação de

complexos de tecnécio, para uso em imagem, são diferentes daquelas utilizadas para obtenção dos correspondentes padrões de rênio^(48,62).

Outra etapa do trabalho foi conhecer a estabilidade dos complexos quando eles foram expostos à presença de cisteína e histidina, aminoácidos presentes nas proteínas que podem estar presentes na circulação sanguínea e que podem formar complexos com $[^{99m}\text{Tc}]$ tecnécio, através de reação de transquelação.

No teste realizado o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ mostrou-se estável por, pelo menos, até 4 horas, em concordância com outros relatos envolvendo ligantes diamino⁽⁴⁸⁾. Não é possível explicar o desaparecimento dos compostos com TR = 12,8 min, no experimento com cisteína (tabela 4, figura 26), uma vez que não foi observada a formação de nenhum outro subproduto como, por exemplo, o derivado de cisteína $[[^{99m}\text{Tc}](\text{cys})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$. Tampouco, é possível explicar o desaparecimento dos compostos com TR = 12,8 e 14,2 min, no experimento com histidina (tabela 5, figura 27), uma vez que o novo produto formado TR = 2,5 min não tem correspondência com nenhum possível produto caracterizado neste trabalho (figura 24).

No teste de estabilidade para o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ os resultados foram bem diferentes àqueles obtidos para $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$. O complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ com uma mistura de múltiplos picos e na presença da cisteína, vários desses picos tiveram sua intensidade diminuída ou sumiram, ainda que neste caso tenha sido possível observar o aparecimento de um pequeno pico associado ao complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{cys})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, com TR = 4,5 min (tabela 6, figura 28). Por sua vez, na presença de histidina, o complexo mostrou-se extremamente instável ao ponto que,

após 4 horas, quase não foi possível observar a presença do mesmo, quando considerado o total de contagens observado (tabela 7, figura 29).

Os resultados do coeficiente de partição foram comparados àqueles obtidos por Marques⁽⁴⁴⁾ e col., que preparou complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS})_2(\text{O})_2]^+$ utilizando os mesmos ligantes CMNS001 e CMNS003 (figura 10). Como era de se esperar, em função da eliminação de um grupo etilenodiamina em nossos complexos, os valores de Log P obtidos foram menores que os obtidos por Marques.

5.2 Parâmetros biológicos

Os ensaios biológicos foram realizados para permitir avaliar o potencial das moléculas quanto ao uso na detecção de tumores, *in vitro* e *in vivo*.

Inicialmente, avaliamos como os novos complexos se comportariam em relação às células tumorais de mama da linhagem MCF-7, muito utilizadas em experimentos envolvendo estudo de radiofármacos^(40,63,64), e outra linhagem de tumor de mama, a MDA-MB-231, a qual difere da anterior por seu poder tumorigênico⁽⁶⁵⁾, e na linhagem de melanoma murino B16F10, utilizada anteriormente por Marques e col.⁽⁴⁴⁾. Também avaliamos como o efeito da forma em que as células são utilizadas nos experimentos (em suspensão ou aderidas) e a presença ou não de soro fetal bovino no meio de cultura.

Barbarics e col.⁽⁴³⁾ haviam demonstrado que quanto maior o grau de lipofilicidade, maior a taxa de captação do radiofármacos por ele estudado, mas a estrutura das moléculas podem levar a uma captação mais específica. Seguindo

este raciocínio deveríamos ter captação diferenciada para os dois novos complexos desenvolvidos neste trabalho e o $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$, o qual foi utilizado como referência, em função do grande número de trabalho publicados utilizando este radiofármaco.

Os resultados confirmaram em parte a primeira hipótese uma vez que na maioria dos casos a captação do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, mais lipofílico, foi maior que a do $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ (figuras 30 a 33), porém isto também dependeu da condição experimental (figuras 32 e 34) e da linhagem tumoral (figuras 34, 35 e 36). Por sua vez, o $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ que tem grau de lipofilicidade maior que os outros dois complexos, foi o que captou menos.

Assim, observamos que o processo de captação de uma molécula pelas células tumorais pode depender do grau de lipofilicidade e também da estrutura dessas moléculas, que pode ditar os mecanismos de internalização ou de fixação dos complexos nas células.

A partir deste ponto, avaliamos o processo da eficácia de captação, através da análise da eliminação dos complexos. Em todos os experimentos realizados, entre o tempo zero, o qual representa o tempo imediatamente posterior ao processo de remoção do meio de cultura contendo os complexos radioativos e de duas lavagens com PBS (pH 7,4), e o tempo de 10 minutos ocorre uma transferência de algo em torno de 50 % da concentração radioativa, das células para o meio de cultura, exceto para o experimento envolvendo a linhagem MCF-7 não aderida (figura 37) onde esse valor está da ordem de 80 a 95 %. Depois desse evento inicial, os complexos, de forma geral, permanecem ligados as células por até 60 minutos (figura 37 a 39) ou apresentam uma taxa de excreção mais suave (figuras 40 e 41).

O processo de eliminação é um processo natural, cuja intensidade depende do tipo molécula e da linhagem celular⁽⁴⁰⁾.

Assim, considerado a captação e eliminação de cada complexo, tornou-se necessário conhecer a localização subcelular de cada molécula. Os experimentos realizados demonstraram que o $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$ concentra-se principalmente no citoplasma, onde também estão as mitocôndrias⁽³⁸⁾, mas a concentração foi dependente do tipo de linhagem celular, com uma concentração aumentada na membrana da célula B16F10, o que pode refletir um número menor de mitocôndrias viáveis⁽³⁸⁾ ou a ação da Pgp existem na membrana dessas células⁽⁴⁴⁾. Para os complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ a taxa de distribuição das moléculas foi relativamente similar, tanto para o tipo de molécula quanto para o tipo de célula (figuras 42 e 43), com exceção de que a concentração no núcleo das células MDA-MB-231 foi significativamente maior que a observada para a linhagem B16F10.

Prosseguimos os estudos avaliando o efeito da condição experimental na captação dos complexos, ou seja, se as células estão em suspensão ou aderidas, e se o meio de cultura é ou não suplementado com SFB, uma vez que essas situações são reportadas na literatura^(40,64).

Inicialmente avaliamos o efeito do SFB presente no meio de cultura sobre a captação. O SFB é uma fonte de nutriente para as células e nele estão presentes diversas moléculas que precisam ser internalizadas e que podem alterar a disponibilidade de receptores ou canais na membrana. Os resultados mostraram que existe influência do soro na captação celular do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, com a diminuição da captação deste complexo nas células mantidas com SFB; o mesmo efeito não foi observado para o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ o qual teve a taxa de captação praticamente

inalterada nas células mantidas sem ou com SFB, o mesmo ocorrendo para o mibi (figuras 30 a 34). Esse comportamento nos leva a considerar que os compostos com maior lipofilicidade apresentam uma maior facilidade para a internalização nas células, sendo pouco afetados pelos componentes do SFB, o que não ocorre para o $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$.

No outro experimento que visou avaliar o efeito das células estarem aderidas ou não, observamos uma significativa redução na taxa de captação de todos os complexos quando as células estão aderidas. Esses resultados foram concordantes com o esperado, uma vez que o uso do sistema aderido deve mimetizar, em parte, o comportamento do tumor sólido, onde o acesso das drogas é dificultado pela aglomeração celular ⁽⁵⁾

Por fim, a eficácia dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ foi avaliada em modelo animal, utilizando implantes da linhagem MCF-7.

Os resultados mostraram que a captação do complexo com $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ foi superior aquela obtida para o complexo com $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ (tabela 09 e 10), diferentemente do que havia sido observado nos estudos *in vitro*, quando a taxa de captação de $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ foi igual ou superior àquela observada para $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ (figuras 30 a 34). Todavia, o fato relevante foi a baixa concentração dos complexos no tumor, da ordem de 1,71 % para o complexo contendo o ligante CMNS001, e de 0,53 % para o complexo contendo o ligante CMNS003, além da inespecificidade, uma vez que células do tecido muscular captaram na mesma faixa de valores aos 120 minutos, respectivamente, 0,42 % e 2,17 %, enquanto que a captação foi muito superior em órgãos como coração: 6,07

% e 1,56 %; pulmão: 3,28 % e 1,92 %; tireóide: 3,27 % e 1,99 %, respectivamente., foi superior. Este fato pode ser justificado, em parte, pelo aporte de sangue nesses órgãos, o qual deve ser maior que aquele fornecido ao tumor⁽⁶⁶⁾. Além disso, a rápida depuração sanguínea.

6. Conclusões

1) A preparação do complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ ocorre em alto rendimento e o processo de transquelação para obtenção dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMN}^{\text{S001-3}})(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})]^+$ é eficiente. A preparação de kits liofilizados para obtenção do $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ deve ser um objetivo futuro.

2) A presença de íons cloreto ou outros ligantes pode alterar a carga dos complexos, por substituição da molécula de H_2O inicialmente presente nos complexos. Devido a isto a carga dos complexos pode sofrer alterações devido ao meio em que se encontram. Deste modo, é desejável a preparação de ligantes tridentados para substituição de todas as moléculas de H_2O presentes no $[[^{99m}\text{Tc}](\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$.

3) O complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ é estável por pelo menos 4 horas na presença de cisteína e histidina, já o complexo $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$, é instável na presença desses aminoácidos.

4) O acúmulo dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ em células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 é influenciado pelas condições a qual as células são mantidas, mesmo assim foi superior ao $[[^{99m}\text{Tc}](\text{MIBI})_6]^+$, tornando esses complexos potenciais modelos a novos radiofármacos.

5) Através do fracionamento subcelular dos complexos $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS001})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ e $[[^{99m}\text{Tc}](\text{CMNS003})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$ nas células de

câncer de mama MDA-MB-231 e B16F10 o acúmulo foi encontrado na sua maioria na membrana celular, facilitando o desligamento dos complexos das células.

6) O acúmulo dos complexos (in vivo) mostrou-se inespecífico devido a alta captação em tecidos como tireóide, coração, pulmão, rim, fígado e intestinos, e uma baixa captação no tumor.

7 Referências bibliográficas

1. Keidar Z, Israel O, Krausz Y. SPECT/CT in tumor imaging: Technical aspects and clinical applications. *Semin Nucl Med* 2003; 33:205-18.
2. Israel O, Mor M, Gaitini D, Keidar Z, Guralnik L, Engel A, et al. Combined functional and structural evaluation of cancer patients with a hybrid camera-based PET/CT system using ¹⁸F-FDG. *J Nucl Med* 2002; 43:1129-36.
3. Giokaris ND, Loudos GK, Maintas D, Papapanagiotou D, Nikita KS, Uzunoglu NK, et al. Imaging of breast phantoms using a high-resolution position sensitive photomultiplier tube. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section A*. 2003; 497: 141-9.
4. Murray IPC, Ell PJ. *Nuclear Medicine in Diagnosis and Treatment*. Ed. Churchill Livingstone – Edinburgh, 1994.
5. Perrier C, Segré E. Some Chemical Properties of Element 43. *J Chem Phys* 1937; 5: 712-6.
6. Seaborg GT, Segré E. Nuclear Isomerism in Element 43. *Phys Rev* 1939; 55: 808-14.
7. Molinski VJ. A review of ^{99m}Tc generator technology. *Int J Appl Radiat Isot* 1982; 33: 811-9.
8. Sampson CB. *Textbook of Radiopharmacy: Theory and Practice*. v. 3, 2^o ed. Luxemburgo: Jordon and Breach Publishers. 1994, 32, p. 121-123.
9. Jurisson S, Berning D, Jia W, Ma D. Coordination Compounds in Nuclear Medicine. *Chem Rev* 1993; 93: 1137-56.
10. Banerjee S, Pillai MRA, Ramamoorthy N. Evolution of Tc-99m in Diagnostic Radiopharmaceuticals. *Semin Nucl Med* 2001; 31: 260-77.

11. Inoue Y, Momose T, Ohtake T, Nishikawa J, Sasaki Y. Metabolism of technetium-99m-L,L-ethyl cysteinyl dimer in rat and cynomolgus monkey tissue. *J Nucl Med* 1997; 38: 1733-7.
12. Carvalho PA, Chiu ML, Kronauge JF, Kawamura M, Jones AG, Holman BL, Piwnicka-Worms F. Subcellular Distribution and Analysis of Technetium-99m-MIBI in Isolated Perfused Rat Hearts. *J Nucl Med* 1992; 33: 1516-21.
13. Banerjee SR, Maresca KP, Francesconi L, Valliant J, Babich JW, Zubieta J. New directions in the coordination chemistry of ^{99m}Tc : a reflection on technetium core structures and a strategy for new chelation design. *Nucl Med Biol* 2005; 32: 1-20.
14. Bell RA, Dickson KC, Valliant JF. The total synthesis of a technetium chelate – tamoxifen complex. *Can J Chem* 1999; 77:146-54.
15. Friebe M, Mahmood A, Spies H, Berger R, Johannsen B, Mohammed A, et al. ‘3+1’ Mixed-Ligand Oxotechnetium(V) Complexes with Affinity for Melanoma: Synthesis and Evaluation in Vitro and in Vivo. *J Med Chem* 2000; 43: 2745-52.
16. 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. *J Nucl Med* 1996; 37: 1023-31.
17. Yang DJ, Kim C-G, Schechter NR, Azhdarinia A, Yu D-F, Oh C-S, et al. Imaging with ^{99m}Tc ECDG targeted at the multifunctional glucose transport system: feasibility study with rodents. *Radiology* 2003; 226:465-73.
18. Tisato F, Porchia M, Bolzati C, Refosco F, Vittadini A. The preparation of substitution-inert ^{99}Tc metal-fragments: Promising candidates for the design of new ^{99m}Tc radiopharmaceuticals. *Coord Chem Rev* 2006; 250: 2034-45.
19. Alberto R, Schibli R, Egli A, Schubiger A.P, Abram U, Kaden TA. A Novel Organometallic Aqua Complex of Technetium for the Labeling of Biomolecules:

- Synthesis of $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{O})_3]^+$ from $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$ in Aqueous Solution and Its Reaction with a Bifunctional Ligand. *J Am Chem Soc* 1998; 120: 7987-8.
20. Schibli R, Dumas C, Petrig J, Spadola L, Scapozza L, Garcia-Garayoa E, et al. Synthesis and in vitro characterization of organometallic rhenium and technetium glucose complexes against Glut-1 and hexokinase. *Bioconj Chem* 2005; 16: 105-12.
 21. Chen Y, Huang ZW, He L, Zheng SL, Li JL, Qin DL. Synthesis and evaluation of a technetium-99m-labeled diethylenetriaminepentaacetate-deoxyglucose complex ($[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{-DTPA-DG}$) as a potential imaging modality for tumors. *Appl Radiat Isot* 2006; 64: 342-7.
 22. de Barros ALB, Cardoso VN, Mota LG, Leite EA, Oliveira MC, Alves RJ. A novel D-glucose derivative radiolabeled with technetium-99m: Synthesis, biodistribution studies and scintigraphic images in an experimental model of Ehrlich tumor. *Bioorg Med Chem Letters* 2010; 20: 2478-80.
 23. Bowen ML, Lim NC, Ewart CB, Misri R, Ferreira CL, Haveli U, Adam MJ, Orvig C. Glucosamine conjugates bearing N,N,O-donors: potential imaging agents utilizing the $[\text{M}(\text{CO})_3]$ core (M=Re, Tc). *Dalton Trans* 2009; 42: 9216-27.
 24. Ferreira CL, Marques FLN, Okamoto MRY, Otake AH, Sugai Y, Mikata Y, Storr T, Bowen M, Yano S, Adam MJ, Chammas R, Orvig C. Cationic technetium and rhenium complexes with pendant carbohydrates. *Appl Radiat Isot* 2010; 68: 1087-93.
 25. Schechter NR, Erwin WD, Yang DJ, Kim E, Munden RF, Forster K, et al. Radiation dosimetry and biodistribution of 99m-ethylene dicysteine-deoxyglucose in patients with non-small-cell lung cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2009; 36:1583-91.
 26. Yand D, Yukihiro M, Yu D-F, Ito M, Oh C-S, Kohanim S, et al. Assessment of Therapeutic Tumor Response Using $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Ethylenedicysteine-Glucosamine. *Cancer Bioth Radiopharm* 2004; 4: 443-56.

27. Green MLH, Wilkinson G. π -*cyclo*-Pentadienylrhenium Carbonyl Compounds. J Chem Soc 1958: 4314-7.
28. Klaui W, Okuda J, Scott M, Valderrama M. Synthesis and Characterization of Manganese and Rhenium Tricarbonyl Complexes with (O,O,O)-Donor Ligands. J Organomet Chem 1985; 280: C26-30.
29. Louie BM, Rettig SJ, Storr A, Trotter J. Rhenium and manganese carbonyl compounds incorporating tridentate chelating pyrazolyl gallate ligands. Can J Chem 1985; 63: 2261-72.
30. Schibli R, La Bella R, Alberto R, Garcia-Garayoa E, Ortner K, Abram U, Schubiger PA. Influence of the Denticity of Ligand Systems on the in Vitro and in Vivo Behavior of $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ -Tricarbonyl Complexes: A Hint for the future Functionalization of Biomolecules. Bioconjug Chem 2000; 11: 345-51.
31. Alberto R, Ortner K, Wheatley N, Schibli R, Schubiger AP. Synthesis and Properties of Boranocarbonate: A Convenient in Situ CO Source for the Aqueous Preparation of $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$. J Am Chem Soc 2001; 123: 3135-6.
32. Jaouen G, Top S, Vessikes A, Alberto R. New paradigms for synthetic pathways inspired by bioorganometallic chemistry. J Organomet Chem 2000; 600: 23-36
33. Papagiannopoulou D, Makris G, Tsoukalas C, Raptopoulou CP, Terzis A, Pelecanou, et al. Rhenium(I) and technetium(I) fac-M(NOS)(CO)₃ (M= Re, ^{99m}Tc) tricarbonyl complexes, with a tridentate NOS bifunctional agent: Synthesis, structural characterization, and radiochemistry. Polyhedron, 2010, 29:876-80.
34. Chen X, Guo Y, Zang Q, Hao G, Jia H, Liu B. Preparation and biological evaluation of ^{99m}Tc -CO-MIBI as myocardial perfusion imaging agent. J Organomet chem. 2008; 693: 1822-28.

35. Lazarova N, Babich J, Valliant J, Schaffer P, James S, Zubieta J. Thiol- and Thioether-Based Bifunctional Chelates for the $\{M(CO)_3\}^+$ Core (M) Tc, Re). *Inorg Chem* 2005, 44: 6763-70.
36. Mundwiler S, Kündig M, Ortner K, Alberto R.. A new [2 + 1] mixed ligand concept based on $[^{99m}Tc(OH_2)_3(CO)_3]^+$: a basic study. *J Chem Soc. Dalton Trans.* 2004: 1320-8.
37. Bandoli G, Tisato F, Dolmella A, Agostini S. Structural overview of technetium compounds (2000–2004). *Coord Chem Rev* 2006, 250: 561-73.
38. Crane P, Laliberté R, Heminway S, Thoolen M, Orlandi C. Effect of mitochondrial viability and metabolism on technetium-99m-sestamibi myocardial retention. *Eur J Nuc Med* 1993; 20: 20-5.
39. Platts EA, North TL, Pickett RD, Kelly JD. Mechanism of uptake of technetium-tetrofosmin. 1. Uptake into isolated adult-rat ventricular myocytes and subcellular-localization. *J Nucl Cardiol* 1995; 2: 317-26.
40. Rodrigues M, Chehne F, Kalinowska W, Zielinsk C, Sinzinger H. Comparative ^{99m}Tc -MIBI, ^{99m}Tc -tetrofosmin and ^{99m}Tc -furifosmin uptake in human soft tissue sarcoma cell lines. *Eur J Nucl Med* 2000; 27: 1839-43.
41. Rodrigues M, Chehne F, Sinzinger H. In vitro adsorption of ^{99m}Tc -MIBI, ^{99m}Tc -tetrofosmin and ^{99m}Tc -furifosmin and $^{99m}TcO_4^-$ onto tubes. *Nucl Med Comm* 2001; 22: 105-10.
42. Herman LW, Sharma V, Kronauge JF, Barbarics E, Herman LA, Piwnica-Worms D. Novel Hexakis(areneisonitrile)technetium(I) Complexes as Radioligands Targeted to the Multidrug Resistance P-Glycoprotein. *J Med Chem* 1995; 38: 2955-63.

43. Barbarics E, Kronauge JF, Davison A, Jones AG. Uptake of cationic technetium complexes in cultured human carcinoma cells and human xenografts. *Nucl Med Biol* 1998; 25: 667-73.
44. Marques FLN. Preparo e avaliação de novos complexos catiônicos de [^{99m}Tc]tecnécio para detecção de células tumorais, 2007. 102 p. Tese (Doutorado em Oncologia), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo 2007.
45. Kothari K, Prasad S, Korde A, Mukherjee A, Mathurb A, Jaggib M, Venkatesha M, Pillaic M.R.A., Mukherjeeb R, Ramamoorthyc N. $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-VIP}$ analogues: Preparation and evaluation as tumor imaging agent. *Appl Rad Isot* 2007; 65: 382-6.
46. Samuel G, Kothari K, Banerjee S, Das T, Subramanian S, Kameshwaran M, Pillai MRA, Venkatesh M. On the ^{99m}Tc -labeling of isoniazid with different ^{99m}Tc cores *J Label Compd Radiopharm* 2005; 48: 363–77.
47. Satpati D, Mallia M, Kothari K, Pillai MRA. Comparative evaluation of [$^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3$] $^+$ precursor synthesized by conventional method and by using carbonyl kit. *J Label Compd Radiopharm* 2004; 47: 657-68.
48. Storr T, Obata M, Fisher CL, Bayly SR, Green DE, Brudzińska I, Mikata Y, Patrick BO, Adam MJ, Yano S, Orvig C. Novel Carbohydrate-Appended Metal Complexes for Potential Use in Molecular Imaging. *Chem Eur J* 2005, 11, 195 – 203.
49. Inagaki K, Iwanaga Y, Sarai N, Onozawa Y, Takenaka H, Mochly-Rosen D, Kihara Y. Tissue Angiotensin II During Progression or Ventricular Hypertrophy to Heart Failure in Hypertensive Rats; Differential Effects on PKC α and PKC β . *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 1377-85.
50. Oliveira RSF, Ferreira JCB, Gomes ERM, Paixão NA, Rolim NPL, Medeiros A, Guatimosim S, Brum PC. Cardiac anti-remodelling effect of aerobic training is

- associated with a reduction in the calcineurin/NFAT signalling pathway in heart failure mice. *J Physiol* 2009; 587: 3899-910.
51. Vanbilloen HP, Eraets K, Evens N, Terwinghe C, Rattat D, Bormans G, Mortelmans L, Verbruggen AM. Preparation, characterization and biological evaluation of $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -labelled cyclic polyamines. *J Label Compd Radiopharm* 2005; 48: 1003-11.
 52. Zhang X, Zhou P, Liu J, Huang Y, Lin Y, Chen Y, Gu T, Yang W, Wang X. Preparation and biodistribution of ^{99m}Tc -tricarbonyl complex with 4-[(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl]-dithioformate as a potential 5-HT_{1A} receptor imaging agent. *Appl Radiat Isot* 2007; 65: 287-92.
 53. Seifert S, Künstler JU, Gupta A, Funke H, Reich T, Hennig C, Roßberg A, Pietzsch HT, Alberto R, Johannsen B. EXAFS analyses of technetium(I) carbonyl complexes - stability studies in solutions. *Radiochim. Acta* 2000; 88: 239-45.
 54. Seifert S, Künstler JU, Gupta A, Funke H, Reich T, Pietzsch HT, Alberto R, Johannsen B. Reactivity of technetium(I) thioether carbonyl complexes towards Histidine-an EXAFS study in solution. *Inorg Chim Acta* 2001; 322: 79–86.
 55. Chen X, Guo Y, Liu B. Caution to HPLC analysis of tricarbonyl technetium radiopharmaceuticals: An example of changing constitution of complexes in column. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43 (2007) 1576–1579.
 56. Jencks WP. Eberly College of Science: Departmente of Chemistry: Disponível em: http://research.chem.psu.edu/brpgroup/pKa_compilation.pdf Acesso em 20 de agosto de 2008.
 57. Cantorias MV., C. Howell RC., Todaro L., Cyr JE., Berndorff D., Rogers RD., Francesconi LC., MO Tripeptide Diastereomers (M = $^{99/99m}\text{Tc}$, Re): Models To

- Identify the Structure of ^{99m}Tc Peptide Targeted Radiopharmaceuticals. *Inorg Chem.* 2007, 46(18): 7326–7340.
58. Hansen L., Lipowska M., Mele'ndez E., Xu X., Hirota S., Taylor AT., Marzilli LG. Factors Influencing the pK_a of Ligated Amines and the Syn/Anti Isomerization in Cysteine-Based $\text{Re(V)dO(N}_2\text{S}_2\text{)}$ Radiopharmaceutical Analogues As Revealed by a Novel Dominant Tautomer in the Solid State. *Inorg. Chem.* 1999, 38, 5351-5358.
59. Lipowska M, Cini R, Tamasi G, Xu X, Taylor A, Andrew T, et al. Complexes Having the $\text{fac-}\{M(\text{CO})_3\}^+$ Core ($M = \text{Tc, Re}$) Useful in Radiopharmaceuticals: X-ray and NMR Structural Characterization and Density Functional Calculations of Species Containing Two sp^3 N Donors and One sp^3 O Donor. *Inorg Chem* 2004; 43: 7774-83.
60. Alberto R, N'Dongo HP, Clericuzio M, Bonetti S, Gabano E, Cassino C, et al. Functionalized thymidine derivatives as carriers for the γ -emitter technetium tricarbonyl moiety. *Inorg Chim Acta* 2009; 362: 4785-90.
61. ACD/ChemSketch Freeware, Product version: 10.00: Advanced Chemistry Development, inc. 2006.
62. Verduyck T, Kieffer D, Huyghe D, Cleynhens B, Verbeke K, Verbruggen, et al. Identity confirmation of ^{99m}Tc -MAG3, ^{99m}Tc -Sestamibi and ^{99m}Tc -ECD using radio-LC-MS. *J Pharm Biom Anal* 2003; 32: 669-78.
63. Denoyer D, Perek N, Le Jeune N, Frère D, Dubois F. The Multidrug Resistance of *In Vitro* Tumor Cell Lines Derived from Human Breast Carcinoma MCF-7 Does Not Influence Pentavalent Technetium-99m-Dimercaptosuccinic Acid Uptake. *Cancer Bioth Radiopharm* 2003; 18: 791-801.

64. Rodrigues M, Chehne F, Kalinowska W, Berghammer P, Zielinski C, Sinzinger H. Uptake of ^{99m}Tc -MIBI and ^{99m}Tc -Tetrofosmin into Malignant Versus Nonmalignant Breast Cell Lines. *J Nucl Med* 2000; 41: 1495-9.
65. Kulp KS, Berman ESF, Knize MG, Shattuck DL, Nelson EJ, Wu L, et al. Chemical and biological differentiation of three human breast cancer cell types using time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Anal Chem* 2006; 78: 3651-8.
66. Bouzin C; Feron O. Targeting tumor stroma and exploiting mature tumor vasculature to improve anti-cancer drug delivery. *Drug Resist Updates* 2007; 10:109-20.