

## Estudos *in vitro* e *in vivo* de análogo da timidina marcada com complexo organometálico de tecnécio-99m para potencial uso em diagnóstico tumoral

Rodrigo Luis Silva Ribeiro Santos\*, Bluma Linkowski Faintuch, Rodrigo Teodoro

Centro de Radiofarmácia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN/CNEN

*Análogos da timidina têm sido marcados com diferentes radioisótopos devido ao seu potencial em monitorar a proliferação incontrolável de células. Considerando que o radioisótopo tecnécio-99m ainda mantém uma posição privilegiada devido às suas propriedades químicas e nucleares, este trabalho constituiu-se no desenvolvimento da marcação da timidina com o <sup>99m</sup>Tc, mediante o emprego de compostos organometálicos. Os objetivos principais foram a síntese do precursor carbonil-tecnécio-99m, marcação da timidina com este precursor, estudo da estabilidade, e avaliações radioquímicas e biológicas com animais sadios e portadores de tumor. A síntese do precursor organometálico e a marcação da timidina com este precursor foi realizada com ≥ 97% e ≥ 94% de pureza radioquímica, respectivamente, obtendo-se também uma boa estabilidade em até 6 h em temperatura ambiente. A transquelação frente aos aminoácidos cisteína e histidina apresentou perdas entre 8 e 11% para concentrações de até 300 mM. Os ensaios de biodistribuição em camundongos sadios indicaram que o complexo radiomarcado apresentou um rápido depuramento sanguíneo e baixa captação nos demais órgãos, com predominância de excreção da droga pelo sistema urinário e hepatobiliar. A captação tumoral foi de 0,28 e 0,18 %DI/g para tumor de pulmão e mama, respectivamente. Os resultados obtidos sugerem maiores investigações em outros análogos da timidina.*

### Uniterms

- Timidina
- Complexo organometálico
- Tecnécio-99m
- Diagnóstico tumoral

### \*Correspondência:

R. L. S. R. Santos  
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares -IPEN/CNEN  
Av. Professor Lineu Prestes, 2242  
05508-000 – São Paulo – SP, Brasil  
E-mail: rodrigoluis@yahoo.com

## INTRODUÇÃO

A Medicina Nuclear é uma especialidade médica que utiliza fontes abertas de radiação ionizante para fins diagnósticos e terapêuticos. O uso dessas fontes, conhecidas como radiofármacos, consiste na associação de um radionuclídeo a um fármaco que apresenta afinidade espe-

cífica em determinados órgãos ou tecidos do corpo humano. Um bom radiofármaco é aquele que apresenta uma farmacocinética ideal, caracterizada pelo baixo tempo de retenção no sangue e alta captação do órgão de interesse ou alta razão órgão/tecido (Egli *et al.*, 1999).

O progresso em técnicas de diagnóstico em Medicina Nuclear, desde a primeira aplicação do radioisótopo

tecnécio-99 meta estável ( $^{99m}\text{Tc}$ ) em 1960 (Banerjee *et al.* 2001), é verdadeiramente notável. Este desempenho pode ser atribuído, sem dúvida, as suas propriedades nucleares e químicas, as quais consistem na emissão de fóton gama com energia monocromática de 140 keV de energia (89% de abundância), ideal para aquisição de imagens cintilográficas. Seu tempo de meia-vida de aproximadamente 6 h é suficientemente longo para realizar a síntese do radiofármaco e suficientemente pequeno para minimizar a dose de radiação ao paciente (Banerjee *et al.*, 2005). O seu uso, também, foi muito facilitado com o desenvolvimento de geradores molibdênio-99/tecnécio-99m e a formulação de *kits* liofilizados, tornando o seu uso uma realidade em radiofarmácia hospitalar (Banerjee *et al.*, 2001; Faintuch, *et al.*, 2005). Em 2002, era usado em quase 85% dos exames de imagem diagnóstica cintilográficas realizados por ano (Jurisson, 2002; Fichna *et al.*, 2003).

A técnica de marcação com precursor esta fundamentada na síntese inicial de um complexo de  $^{99m}\text{Tc}$ , chamado de agente precursor, que somente depois se ligará à biomolécula desejada. Este método está sendo muito difundido devido ao advento dos experimentos de complexos organometálicos carbonílicos com o  $^{99m}\text{Tc}$  no estado de oxidação +I (Alberto *et al.*, 1995).

Pouca importância vinha sendo dada aos núcleos de  $^{99m}\text{Tc}$  em baixo estado de oxidação, valência +I, uma vez que o controle da reação e redução do Tc(VII) era muito trabalhoso e não apresentava muita estabilidade. Esta dificuldade foi superada com o auxílio da descoberta dos ligantes monodentados isonitrila que formam complexos organometálicos de Tc(I) bastante estáveis e solúveis em água (Banerjee *et al.*, 2005). Devido a esta descoberta, o  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{MIBI})_6]^+$  foi desenvolvido (Trop *et al.*, 1980) tornando-se o primeiro radiofármaco organometálico utilizado na Medicina Nuclear, mais tarde, patenteado com o nome de Cardiolite® pela empresa americana Dupont Pharma (Valliant *et al.*, 2002).

A síntese do conveniente precursor aquoso *fac*-triaquatricarboniltecnécio(I) foi realizada somente em 1998 (Alberto *et al.*, 1998), proporcionando assim grande impulso no desenvolvimento de novos radiofármacos. No presente trabalho, o nome deste complexo foi abreviado por carboniltecnécio-99m, cuja fórmula é  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  ou simplesmente  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  (FIG. 1).

O núcleo organometálico  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  não foi desenvolvido para uma direta aplicação radiofarmacêutica como ocorre com o Cardiolite®, mas sim, para ser utilizado como um precursor na marcação de biomoléculas, conjugadas ou não com ligantes apropriados. Estes ligantes pode ser mono, bi e tridentado, os quais substituem os ligantes aqua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) presentes no complexo, protegendo

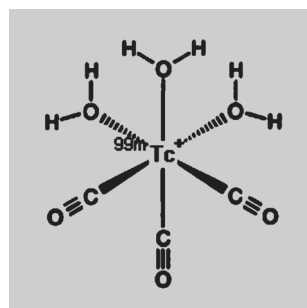


FIGURA 1 – Fórmula estrutural do precursor carboniltecnécio-99m

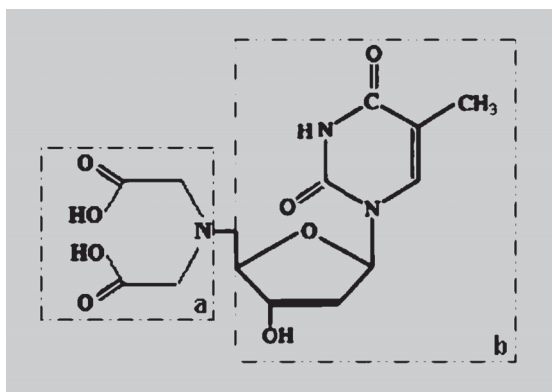
assim o metal central contra a transquelação ou reoxidação (Schibli *et al.*, 2002).

A primeira avaliação clínica em humanos do complexo carbonil-tecnécio-99m foi realizada com a marcação do peptídeo lantionine. Os resultados demonstraram seu potencial uso como agente renal, competindo, desta forma, com outros radiofármacos já disponíveis no mercado (Lipowska *et al.*, 2006).

Imagens provenientes da marcação de análogos da timidina podem fornecer fortes evidências das células que estão se multiplicando de forma acentuada, possibilitando assim o tratamento adequado (Schwartz *et al.*, 2004; Mankoff *et al.*, 1999).

A timidina (Figura 2) é um nucleosídeo do ácido desoxirribonucléico (DNA) formado por uma base nitrogenada, Timina, ligada a uma pentose (desoxirribose) através da ligação  $\beta$ -N-glicosídica. O processo de incorporação da timidina ao DNA é realizado em múltiplas etapas. A etapa inicial do seu metabolismo é a fosforilação da desoxitimidina para 5-desoxitimidina-monofosfato, que é catalisada pela enzima timidina quinase 1 (TQ<sub>1</sub>). Nesta etapa, o nucleosídeo se transforma em nucleotídeo, o qual não consegue atravessar a membrana celular e permanece retida na célula (Teng *et al.*, 2006). A etapa seguinte é a conversão de dTMP para 5-desoxitimidina-difosfato (dTDP) e, depois, para 5-desoxitimidina-trifosfato (dTTP) até a incorporação ao DNA (Schwartz *et al.*, 2004). Estudos demonstraram que a atividade da timidina quinase aumenta em dez vezes somente na síntese do DNA (Shields *et al.* 1998).

O aumento da atividade enzimática (quinase) está fortemente relacionado com a proliferação celular (Schwartz *et al.*, 2004) o que caracteriza a excelente ferramenta para a determinação de tumores biológicos (Mankoff *et al.*, 1999). Considerando este princípio, o monitoramento da timidina quinase está sendo largamente estudado, tanto em cultura celular (*in vitro*) como em animais (*in vivo*) (Shields *et al.*, 1990). Os altos níveis enzimáticos de timidina quinase ocorrem, principalmente, em câncer de mama (Lucignani, 2006), pescoço, rins (Mankoff *et al.*, 2000), pulmão, cólon, linfoma



**FIGURA 2** – Fórmula estrutural do nucleosídeo conjugado com o ligante (a) ligante tridentado ácido aminodiacético (IDA); (b) timidina

e sarcoma (Tseng *et al.*, 2005).

O uso da tomografia de emissão de pósitron (PET) para aquisição de imagens oncológicas é relativamente recente se comparada com as técnicas de diagnósticos, tais como a radiográfica (raios X), o ultra-som, a tomografia computadorizada e a ressonância magnética nuclear (RMN) (Wei *et al.*, 2005). Análogos da timidina estão entre os principais agentes utilizados e estudados para uso em PET (Shields *et al.*, 2006).

Considerando que o  $^{99m}\text{Tc}$  ainda mantém uma posição privilegiada devido às suas propriedades nucleares e à sua versatilidade química, o objetivo deste trabalho foi a marcação da timidina com este radioisótopo, a avaliação radioquímica e a investigação do seu potencial para o diagnóstico de tumores.

## MATERIAL E MÉTODOS

A biomolécula timidina conjugada com o ligante ácido aminodiacético (IDA) (Figura. 2) foi sintetizado pelo Centro de Radiofarmácia do Paul Scherrer Institute, Villigen, Suíça de acordo com a literatura (Schibli *et al.*, 2003). O pertecnetato de sódio foi eluído em 6 mL em solução de cloreto de sódio 0,9% a partir do gerador  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  produzido no Centro de Radiofarmácia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN) de São Paulo, Brasil. O gás monóxido de carbono, utilizado para a preparação do precursor carbonil-tecnécio-99m, foi obtido da White Martins, Brasil, com 99,5% de grau de pureza. Todos outros reagentes foram utilizados sem purificação e obtidos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda.

### Síntese do $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})(\text{H}_2\text{O})_3]^+$

O complexo organometálico foi preparado em duas

etapas seguindo o protocolo com pequenas modificações (Alberto *et al.*, 1998). Na primeira etapa, foram pesados, em um único frasco, 5,5 mg de borohidreto de sódio, 4 mg de carbonato de sódio e 20 mg de tartarato de sódio e potássio, e submetidos à pressão constante de monóxido de carbono (CO) durante 30 min. Na segunda etapa foi adicionado ao mesmo frasco, 1 mL de pertecnetato de sódio ( $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ ) com atividade de 1110 MBq (30 mCi) e aquecido durante 30 min à temperatura de 75 °C. A reação foi interrompida em banho de gelo e o pH ajustado para 7, com aproximadamente 200  $\mu\text{L}$  de uma mistura 1 N de ácido clorídrico e 1 M de tampão fosfato (2:1).

### Marcação da timidina com o $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})(\text{H}_2\text{O})_3]^+$

A marcação foi realizada com 50  $\mu\text{g}$  do ligante L (onde L = timidina-ácido aminodiacético) e 350  $\mu\text{L}$  do precursor carbonil-tecnécio-99m, previamente preparado. Após agitação, o frasco contendo a mistura foi aquecido durante 60 min à temperatura de 75 °C. A reação foi interrompida em banho de gelo.

### Avaliação radioquímica do precursor e do complexo radiomarcado

A avaliação radioquímica foi realizada por meio de técnicas de cromatografia de papel e camada delgada ascendente (Du *et al.*, 2001). Para a fase estacionária, foram utilizadas as fitas Whatmann N°1, ITLC-SG (*Instant Thin Layer Chromatography-Silica Gel*) e TLC-AL (*Thin Layer Chromatography-Alumin*). Para a fase móvel foram utilizados os solventes butanol, butanona e uma mistura de metanol e ácido clorídrico 6 M (99,5:0,5). As fitas de papel ou de camada delgada, após a corrida dos solventes, foram cortadas e colocadas em tubos para a contagem da atividade radioativa e determinação do  $R_f$  (fator de retenção – relação ou quociente das distâncias percorridas simultaneamente pelo soluto). O equipamento utilizado foi do tipo poço NaI(Tl), modelo D5002, cobra II, autogama, Packard, Camberra.

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

### Estudo *in vitro* da estabilidade radioquímica

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

### Desafio da cisteína e histidina

O estudo *in vitro* da estabilidade radioquímica frente aos aminoácidos cisteína e histidina, conhecido também como desafio da cisteína e histidina, foi determinado com o produto final purificado. Soluções de cisteína ou histidina foram preparadas com solução de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) nas concentrações 300, 30, 3 e 0,3 mM. Aliquotas de 100  $\mu\text{L}$  destas soluções foram misturadas a 100  $\mu\text{L}$  (0,3 mM) do complexo. Desta forma, as razões molares entre cisteína/complexo ou histidina/complexo foram de 1000:1, 100:1, 10:1 e 1:1. Todos os frascos, incluindo o frasco controle contendo apenas o complexo e o tampão fosfato, foram agitados e colocados em estufa a 37 °C. A avaliação radioquímica foi efetuada nos tempos de 1 e 4 h.

### Estudo *in vitro* da lipofilicidade do complexo radiomarcado

O estudo de lipofilicidade do  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{L})]^-$  foi realizado por meio do teste de coeficiente de partição (P), utilizando octanol e a água. Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  do complexo radiomarcado foi adicionada a um frasco contendo 1 mL de octanol e 1 mL de água. O frasco foi homogeneizado e centrifugado à velocidade de 1500 rpm durante 10 min à temperatura ambiente. Após a centrifugação, foi pipetado cuidadosamente, em triplicata, 100  $\mu\text{L}$  de cada fase e colocado em tubos para a contagem da atividade. O coeficiente de partição (P) foi calculado de acordo com a equação 1 e expresso em log P (Schibli *et al.*, 2002).

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

onde: cpm = contagem por minuto

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

Os estudos de biodistribuição animal do complexo radiomarcado foram executados com a aprovação do Comitê de Ética do IPEN/CNEN-SP e realizados com três espécies de animais: camundongos sadios machos *Swiss* (20-30 g);

camundongos machos *Nude* (15-20 g) portando tumor de pulmão (A549); e ratas *Sprague-Dawley* (230-260 g) portando tumor mamário desenvolvido pela técnica de indução da carcionogênese mamária (Barros *et al.*, 2004). Nos camundongos, o tumor de pulmão foi inoculado no subcutâneo da região dorsal e no caso das ratas ocorreu a existência de múltiplos tumores que cresceram ao longo da linha mamária, que vai da axila até a região inguinal.

Em todos os estudos, os animais foram pesados, a droga injetada pela veia caudal e os animais sacrificados após o tempo de estudo. Os tecidos e órgãos (sangue, coração, pulmão, rins, baço, estômago, pâncreas, fígado, intestino grosso e delgado, músculo, osso e tumor) foram retirados para a pesagem e contagem da atividade em contador tipo poço de NaI(Tl).

Foi realizada também uma análise estatística para os resultados de biodistribuição. Os dados, nos diversos tempos, foram comparados com auxílio do Teste “t” de *Student* para dados pareados (teste bi-caudado). O nível de significância adotado foi de 5% ( $P < 0,05$ ).

## RESULTADOS

### Síntese do $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ e marcação da timidina com o precursor<sup>2</sup>

A preparação do precursor organometálico,  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ , utilizando o gás CO foi de fácil execução, apesar de ser realizada em duas etapas. Os experimentos proporcionaram uma pureza radioquímica de  $97,0 \pm 1,2\%$  ( $n = 5$ ) para o precursor. Já a marcação do análogo da timidina com o precursor organometálico,  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{L})]^-$ , proporcionou uma pureza radioquímica de  $94,1 \pm 1,6\%$  ( $n = 5$ ).

### Avaliação radioquímica do precursor e do complexo radiomarcado

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

Analisando-se a Tabela I pôde-se observar que com os três sistemas pode se ter bem definidas e isoladas cada espécie radioquímica. No sistema 1, foi definido o  $^{99m}\text{TcO}_2$  ( $R_f = 0$ ), no sistema 2, o precursor  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  ( $R_f = 0/0,1$ ), e no sistema 3, o  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  ( $R_f = 0,9/1$ ). A porcentagem

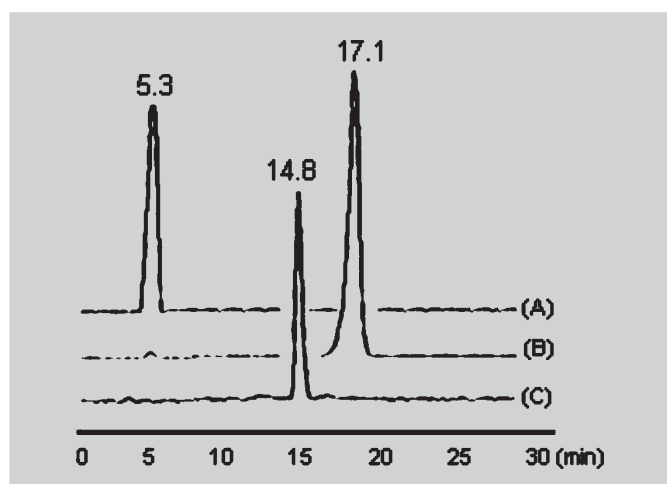
**TABELA I** – Fase móvel, fase estacionária e fatores de retenção das diferentes espécies radioquímicas

Sistemas	Fase Estacionária	Fase Móvel	$R_f$			
			$^{99m}\text{TcO}_2$	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^{+}$	$[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{L})]^{-}$
1	Whatman	MeOH/HCl 6M (99,5:0,5)	0	0,4/0,5	0,7/0,8	0,7/0,8
2	TLC-Al	MeOH/HCl 6M (99,5:0,5)	0	0,8/0,9	0/0,1	0,7/0,8
3	TLC-Al	Butanol	0	0,9/1,0	0/0,2	0/0,2

Nota:  $R_f$  = fator de retenção; MeOH = metanol; HCl = ácido clorídrico

da pureza radioquímica do  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{L})]^{-}$  foi determinada subtraindo todas as impurezas radioquímicas presentes da porcentagem total.

O controle de qualidade do precursor e do complexo radiomarcado também foi realizado em HPLC para alguns ensaios, sendo que no radiocromatograma (FIGURA 3), podem-se observar os tempos de retenção para as três espécies radioquímicas,  $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^{-}$ ,  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^{+}$  e  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{L})]^{-}$ , que foram, respectivamente, 5,3 min, 17,1 min e 14,8 min.

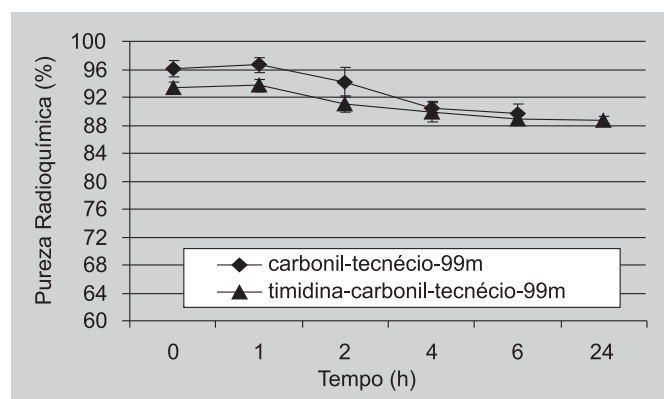
**FIGURA 3** – Radiocromatogramas do  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  (A),  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^{+}$  (B) e  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{L})]^{-}$  (C)

#### Estudo *in vitro* da estabilidade radioquímica

Os resultados do estudo *in vitro* da estabilidade radioquímica do precursor e do complexo radiomarcado (Figura 4) demonstraram que ambos apresentaram uma boa estabilidade de até 6 h. O complexo radiomarcado também apresentou ser bastante estável por 24 h.

#### Desafio da cisteína e histidina

O desafio da cisteína e histidina também confirmaram uma relativa estabilidade radioquímica do complexo radiomarcado frente a estes aminoácidos (Tabelas II e III).

**FIGURA 4** – Estabilidade radioquímica do precursor organometálico e do complexo radiomarcado (n = 5)**TABELA II** – Estabilidade do complexo radiomarcado em função da cisteína

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

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

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

Com relação ao estudo de estabilidade com a

**TABELA III** – Estabilidade do complexo radiomarcado em função da histidina

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

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

histidina, os resultados obtidos assemelham-se bastante aos obtidos com a cisteína, isto é, uma perda de oito pontos percentuais com 1 h de incubação e de onze pontos percentuais com 4 h de incubação em soluções de concentrações de até 300 mM.

#### Estudo *in vitro* da lipofilicidade do complexo radiomarcado

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

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

Os resultados do estudo da biodistribuição do complexo radiomarcado injetado em camundongos *Swiss* sadios, em termos de porcentagem de dose injetada por grama (%DI/g), encontram-se na Tabela IV.

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

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

Os resultados da biodistribuição em ratas *Sprague-Dawley* com tumor de mama (Tabela VI) mostraram que a

captação tumoral foi de 0,18 %DI/g (1 h) e 0,15 %DI/g (2 h) com excreção renal da droga. A razão tumor/sangue e tumor/músculo para os estudos de 1 h e 2 h foram 0,7 e 2,3, e 0,6 e 2,1, respectivamente.

## DISCUSSÃO

Estudos de otimização da síntese do precursor organometálico e da marcação do análogo da timidina com este precursor foram realizados previamente, podendo definir os parâmetros que realmente influenciavam no rendimento do precursor e do complexo radiomarcado, obtendo-se resultados em níveis de 97% de pureza radioquímica para o precursor. Para o complexo radiomarcado a pureza radioquímica foi de 94% e a atividade específica em 2,7 GBq/μmol.

O precursor organometálico e o complexo radiomarcado apresentaram boa estabilidade em temperatura ambiente em até 6 h após o preparo. Houve uma perda de dez pontos percentuais para o precursor e de cinco pontos percentuais para o complexo radiomarcado. Não houve perda adicional para o complexo radiomarcado para um intervalo de 24 h. Para o precursor, este último tempo não foi avaliado uma vez que o mesmo não é utilizado em intervalos muito longos. No entanto, estudos asseguraram sua estabilidade em até 24 h (Schibli *et al.*, 2002).

Muitos compostos radiomarcados decompõem-se por ação da radiação emitida pelo próprio radionuclídeo. Este efeito, chamado de radiólise, pode acontecer quando a atividade específica do composto é muito elevada. A radiólise pode provocar a quebra da ligação química entre o radionuclídeo e a molécula ou interagir com o solvente formando radicais livres, que também podem ter efeito nocivo para o composto radioativo, promovendo o aparecimento de impurezas radioquímicas (Oliveira *et al.*, 2006). Não foi observado um aumento significativo de impurezas devido à radiólise durante o período de incubação do complexo radiomarcado para o estudo de estabilidade (Figura 4).

O teste desafio da cisteína e histidina foi realizado com a finalidade de se verificar a estabilidade ou a força da ligação entre a biomolécula e o seu radioisótopo. Apesar deste ensaio ser realizado *in vitro*, ele pode simular a estabilidade do radiofármaco *in vivo*, uma vez que pequenas concentrações dos aminoácidos cisteína e histidina são encontradas no organismo.

Nos ensaios de estabilidade realizados com cisteína com 1 h de incubação (Tabela II), pôde-se verificar que houve uma pequena transquelação do complexo radiomarcado quando utilizado concentrações de cisteína em até 30 mM. Porém, com concentrações de 300 mM, a pureza radioquímica foi inferior aos 90%. Em teoria, este estudo indicou que o complexo radiomarcado não apresentaria transquelação *in vivo*, uma vez

**TABELA IV** – Biodistribuição (%DI/g)<sup>a</sup> do complexo radiomarcado em camundongos *Swiss* sadios em função do tempo

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

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

Nota: (a) valores representam média ± desvio-padrão (n = 5); (b) %DI/mL; (c) P < 0,05 em relação ao tempo de 5 min; (d) P < 0,05 em relação ao tempo de 15 min; (e) P < 0,05 em relação ao tempo de 1 h; (f) P < 0,05 em relação ao tempo de 2 h; (g) P < 0,05 em relação ao tempo de 4 h.

que a concentração de cisteína no organismo é muito baixa, sendo que no plasma humano ela varia entre 0,03 e 0,108 mM (Bogdan *et al.*, 2001; Medical, 2006). Quando a análise dos dados é feita em relação ao tempo de incubação de 4 h, pôde-se constatar um pequeno decréscimo na estabilidade se comparado com os resultados de uma hora.

O desafio da histidina indicou resultados muitos parecidos com os obtidos com a cisteína, apesar de apresentar uma perda de cinco pontos percentuais com uma concentração de 30 mM de histidina para 1 h de incubação e uma perda de sete pontos percentuais para 4 h de incubação. A concentração de histidina no organismo também é baixa, variando no plasma humano entre 0,026 e 0,12 mM (Medical, 2006).

Os resultados obtidos com os desafios da cisteína e histidina estão em concordância com outro estudo realizado com o precursor organometálico marcado com o ligante IDA (Schibli *et al.*, 2000).

O coeficiente de partição é uma das principais propriedades físico-químicas de um fármaco, pois a sua farmacocinética e biodistribuição *in vivo* dependem da sua característica hidrofílica ou lipofílica (Kothari *et al.*, 2003). Quanto maior o log P, maior a afinidade da substância pela fase orgânica. No entanto, substâncias hidrofílicas costumam apresentar uma depuração sanguínea mais rápida e uma excreção renal (Lodish *et al.*, 2002). Como já era esperado, o complexo  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{L})]^-$  apresentou um baixo caráter lipofílico (log P = -1,48), ou seja, é um composto

**TABELA V** – Biodistribuição do complexo radiomarcado em camundongos *Nude* portando célula tumoral de pulmão (A549) 2 h após a administração da droga

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

Nota: (a) valores representam médias ± desvio-padrão (n = 5); (b) %DI/mL; (c) do peso do camundongo.

**TABELA VI** – Biodistribuição (%DI/g)<sup>a</sup> do complexo radiomarcado em ratas *Sprague-Dawley* com tumor de mama em função do tempo após a administração da droga

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

Nota: (a) valores representam médias ± desvio-padrão (n = 3); (b) %DI/mL; (c) do peso do camundongo; (d) P < 0,05 em relação ao tempo de 1 h.

hidrofílico, sendo este resultado próximo ao obtido em outro estudo de marcação com o ligante IDA (Schibli *et al.*, 2000).

Analisando-se o estudo de biodistribuição de camundongos sadios (TAB. IV), pôde-se observar que a maior

captação da droga ocorreu nos rins (27,50 %DI/g) com 5 min após sua administração, indicando início precoce da excreção renal. Pôde-se verificar, também, que a depuração dos rins foi muito rápida, sendo que mais de 95% da atividade presente no órgão foi eliminada após 1 h. Após 24 h da administração da droga, a atividade nos rins era de apenas 0,20 %DI/g.

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

Até o tempo de 2 h, verificou-se que a captação no intestino delgado era maior que a captação no intestino grosso, sendo que a partir de 4 h ocorreu a inversão.

Sabe-se que, quando um radiofármaco apresenta <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> livre, o mesmo é transportado para o estômago, aumentando assim a captação radioativa deste órgão, prejudicando muitas vezes a qualidade da imagem. A captação de 4,73 %DI/g presente no estômago em 5 min não indica, necessariamente, a presença de <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> livre, pois uma das vantagens da técnica do precursor organometálico é, justamente, a sua elevada estabilidade (Schibli *et al.*, 2002). Entretanto, a hipótese de transquelação com proteínas plasmáticas só seria confirmada por meio de ensaios de estabilidade em plasma ou ligação às proteínas, não realizados neste trabalho. No entanto, pode-se observar pelo teste de estabilidade (Figura 4) que o complexo radiomarcado apresentou um teor de pureza radioquímica da ordem de 92% no tempo zero, justificando provavelmente a captação encontrada neste órgão.

Não se pode desconsiderar, também, a possibilidade da formação de metabólitos, característica comum da timidina devido ao seu rápido metabolismo *in vivo* (Schwartz *et al.*, 2003). De qualquer forma, a depuração no estômago também foi rápida, após 1 h da administração da droga restava apenas 15% da atividade inicial do órgão.

De modo geral, os outros órgãos e tecidos também apresentaram uma rápida depuração e não apresentaram expressivas retenções da atividade. Para o tecido sanguíneo, mais de 97% da atividade inicial já havia sido eliminada após 2 h da administração da droga. Outras investigações da biodistribuição do precursor organometálico, marcado com o ligante IDA, também apresentaram boa depuração em todos os órgãos e tecidos com 24 h (Schibli *et al.*, 2000).

Os dois modelos de tumor – mama e pulmão – foram escolhidos por estarem entre os tipos de câncer que mais afetam a sociedade, e também por sua afinidade com o nucleosídeo timidina (Netter *et al.*, 2002; Wells *et al.*, 2005).



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

Já na análise dos resultados da biodistribuição das ratas com tumor de mama (Tabela VI), pôde-se verificar que a maior retenção ocorreu nos rins, indicando a predominância pela excreção da droga pela via urinária, conforme já previsto no estudo anterior de animais sadios. O intervalo de apenas uma hora para este estudo não demonstrou diferenças significativas na avaliação. A captação da droga no tumor foi baixa, porém a relação tumor/músculo superior a 1,5, indica um provável agente diagnóstico (Phillips, 1999).

A captação do radiofármaco depende do fluxo sanguíneo, perfusão tecidual, permeabilidade capilar e capacidade de difusão (Oliveira *et al.*, 2006). A solubilidade está relacionada com a distribuição e localização da droga no organismo. Substâncias lipofílicas difundem-se melhor na membrana celular e, conseqüentemente, maior será a sua localização no órgão alvo (Zhang *et al.*, 2002). Esta pode ser, então, uma possível explicação para a baixa captação tumoral nos modelos investigados, uma vez que a droga é hidrofílica.

A conjugação de agentes quelantes na timidina em outra posição se não a 5' da pentose, pode proporcionar a redução das ligações da enzima TQ<sub>1</sub> (Schibli *et al.*, 2003). No entanto, é nesta posição que ocorre a fosforilação da timidina, a qual inicia o seu metabolismo até a incorporação no DNA (Lodish *et al.*, 2002). No presente trabalho, a timidina foi conjugada com o ligante IDA nesta importante posição, a qual pôde impossibilitar a sua incorporação ao DNA. Esta pode ser outra possível justificativa para a baixa captação nos tumores investigados.

Conclui-se que a marcação do nucleosídeo timidina utilizando a técnica do precursor organometálico carboniltecnécio-99m pode ser executada com bons resultados possibilitando um grande potencial para o diagnóstico, favorecido pela atuação da timidina nos processos celulares vitais, como a sua incorporação ao DNA e a possibilidade da elevada atividade enzimática (timidina quinase), característica da proliferação celular. No entanto, este benefício que o nucleosídeo timidina oferece – elevada atividade enzimática – foi provavelmente prejudicado devido à posição onde o ligante foi conjugado, diminuindo desta forma a captação radioativa nos tumores. Sendo assim, estudos ainda serão realizados com novos análogos da timidina com a finalidade de se buscar melhores resultados.

## ABSTRACT

### **Studies *in vitro* and *in vivo* of thymidine analog labeled with organometallic complex of technetium-99m for potential use in tumor diagnosis**

*Thymidine analogs have been labeled with different radioisotopes due to their potential in monitoring the uncontrollable cell proliferation. Considering that the radioisotope technetium-99m still keeps a privileged position as a marker due to its chemical and nuclear properties, this work was designed to develop a new technique of labeling of thymidine analog with <sup>99m</sup>Tc, by means of the organometallic compounds. The aims of this research were: synthesis of the organometallic precursor technetium-99m-carbonyl, thymidine labeling with this precursor, study of stability, and radiochemical and biological evaluation with healthy and tumor-bearing animals. The organometallic precursor and the labeling of thymidine with this precursor were resulted with a radiochemical pureness of  $\geq 97\%$  and  $\geq 94\%$ , respectively, with good radiochemical stability up to 6 h in room temperature. The cysteine and histidine challenge indicated losses between 8 and 11% for concentrations until 300 mM. The biodistribution assay in healthy mice revealed rapid blood clearance and low uptake by general organs with renal and hepatobiliary excretion. The tumor concentration was of 0.28 and 0.18 %ID/g for lung and breast cancer, respectively. The results imply more studies in other thymidine analogs.*

**UNITERMS:** *Thymidine/analog. Organometallic complex. Technetium-99m. Tumor diagnosis.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Brasil, por ter concedido o apoio financeiro para realização do presente trabalho, e ao Dr. Roger Schibli, do Centro de Radiofarmácia do Paul Scherrer Institute (Suíça), pela doação da biomolécula.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTO, R.; SCHIBLI, R.; EGLI, A.; SCHUBIGER, P. A.; HERMANN, W. A.; ARTUS, G.; ABRAM, V.; KADEN, T. A. Metal carbonyl syntheses XXVII. Low-pressure carbonylation of [MoCl<sub>4</sub>]- and [MoO<sub>4</sub>]-. The technetium(I) and rhenium(I) complexes [Net<sub>4</sub>]<sub>2</sub>[MCl<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub>]. *J. Org. Chem.* v. 492, p. 217-224, 1995.

- ALBERTO R.; SCHIBLI, R.; EGLI, A.; SCHUBIGER, P. A. A novel organometallic aqua complex of technetium for the labeling of biomolecules: synthesis of  $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$  from  $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$  in aqueous solution and its reaction with a bifunctional ligand. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 120, n. 31, p. 7987-7988, 1998.
- BANERJEE, S.; PILLAI, M. R. A.; RAMAMOORTHY, N. Evaluation of Tc-99m in diagnostic radiopharmaceuticals. *Semin. Nucl. Med.*, v. 31, n. 4, p. 260-277, 2001.
- BANERJEE, S. R.; MARESCA, K. P.; FRANCESCONI, L.; VALLIANT, J.; BABICH, J. W.; ZUBIETA, J. New directions in the coordination chemistry of  $^{99m}\text{Tc}$ : a reflection on technetium core structures and a strategy for new chelate design. *Nucl. Med. Biol.* v. 32, p. 1-20, 2005.
- BOGDAN, J. A.; NAZARIO-LARRIEU, J.; SARWAR, J.; ALEXANDER, P.; BLAKE, M. S. Bordetella pertussis Autoregulates Pertussis Toxin Production through the Metabolism of Cysteine. *Infect. Immun.*, v. 69, n. 11, p. 6823-6830, 2001.
- DU, J.; HILTUNEN, J.; MARQUEZ, M.; NILSSON, S.; HOLMBERG, A. R. Technetium-99m labelling of glycosylated somatostatin-14. *Appl. Radiat. Isot.* v. 55, p. 181-187, 2001.
- EGLI, A.; ALBERTO, R.; TANNAHILL, L.; SCHIBLI, R.; ABRAM, U.; SCHAFFLAND, A.; WAIBEL, R.; TOURWÉ, D.; JEANNIN, L.; ITERBEKE, K.; SCHUBIGER, P. A. Organometallic  $^{99m}\text{Tc}$ -aquaion labels peptide to an unprecedented high specific activity. *J. Nucl. Med.*, v. 40, p. 1913-1917, 1999.
- FAINTUCH, B. L.; SANTOS, R. L. S. R.; SOUZA, A. L. F. M.; HOFFMAN, T. J.; GREELEY, M.; SMITH, C. J.  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-Bombesin (7-14) $\text{NH}_2$ : Radiochemical Evaluation with Co-ligands EDDA (EDDA 5 Ethylenediamine-N,N'-diacetic Acid), Tricine, and Nicotinic Acid. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic and Nano-Metal Chemistry*, v. 35, p. 43-51, 2005.
- FICHNA, J.; JANECKA, A. Synthesis of Target-Specific Radiolabeled Peptides for Diagnostic Imaging. *Bioconjug. Chem.*, v. 14, p. 3-17, 2003.
- JURISSON, S. S. Tc and Re Peptide Chemistry: Direct Labeling. In: NICOLINI, M.; MAZZI, U. (Eds.). *Technetium, rhenium and other methals in chemistry and nuclear medicine*. Padova: SGEEditoriali, 2002. v. 6, p. 15-21.
- KOTHARI, K. K.; RAGHURAMAN, K.; PILLARSETTY, N. K.; HOFFMAN, T. J.; OWEN, N. K.; KATTI, K. V. VOLKERT, W. A. Syntheses, in vitro and in vivo characterization of a  $^{99m}\text{Tc}$ -(I)-tricarbonyl-benzylamino-dihydroxymethyl phosphine ( $\text{NP}_2$ ) chelate. *Appl. Radiat. Isot.*, v. 58, p. 543-549, 2003.
- LIPOWSKA, M.; HE, H.; MALVEAUX, E.; XU, X.; MARZILLI, L. G.; TAYLOR, A. First Evaluation of a  $^{99m}\text{Tc}$ -Tricarbonyl Complex,  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{LAN})$ , as a New Renal Radiopharmaceutical in Humans. *J. Nucl. Med.*, v. 47, p. 1032-1040, 2006.
- LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L., MATSUDARA, P., BALTIMORE, D.; DARNELL, J. *Biologia Celular e Molecular*. 4. ed. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter Ltda., 2002. p. 100-116.
- LUCIGNANI, G. Imaging in cancer therapy and drug development. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, v. 33, p. 386-388, 2006.
- MANKOFF, D. A.; SHIELDS, A. F.; LINK, J. M.; GRAHAM, M. M.; MUZI, M.; PETERSON, L. M.; EARY, J. F.; KROHN, K. A. Kinetic Analysis of 2-[ $^{11}\text{C}$ ]Thymidine PET Imaging Studies: Validation Studies. *J. Nucl. Med.*, v. 40, p. 614-624, 1999.
- MANKOFF, D. A.; DEHDASHITI, F.; SHIELDS, A. F. Characterizing tumors using metabolic imaging: PET imaging of cellular proliferation and tumor receptors. *Neoplasia*, v. 2, p. 71-88, 2000.
- MEDICAL ENCYCLOPEDIA. Medline Plus, National Library of Medicine, Maryland (EUA), 2006. Disponível em: <<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003361.htm>>. Acesso em: 16 dez. 2006.
- NETTER, M.; SCHIBLI R.; BIRRINGER, M.; SCAPOZZA, L.; SCHUBIGER, A. First Synthesis, Characterization and Enzyme Activity Studies of Re- and  $^{99m}\text{Tc}$ -tricarbonyl-complex of Thymidine Analogues, In: NICOLINI, M.; MAZZI, U. (Eds.). *Technetium, rhenium and other methals in chemistry and nuclear medicine*. Padova: SGEEditoriali, 2002. v. 6, p. 317-322.

- OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; FERREIRA, D.; COELHO, P.; VEIGA, F. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v. 42, n. 2, p. 151-165, 2006.
- PHILLIPS, W. T. Delivery of gamma-imaging agents by liposomes. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 37, p. 13-32, 1999.
- SCHIBLI, R.; LA BELLA, R.; ALBERTO, R.; GARCIA-GARAYOA, E.; ORTNER, K.; ABRAM, U.; SCHUBIGER, P. A. Influence of the Denticity of Ligand Systems on the Vitro and in Vivo Behavior of  $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ -Tricarbonyl Complex: A hint for the Future Functionalization of Biomolecules. *Bioconjug. Chem.*, v. 11, p. 345-351, 2000.
- SCHIBLI, R.; SCHUBIGER, P. A. Current use and future potential of organometallic radiopharmaceuticals. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 29, p. 1529-1542, 2002.
- SCHIBLI, R.; NETTER, M.; SCAPOZZA, L.; BIRNINGER, M.; SCHELLING, P.; DUMAS, C.; SCHOCH, J.; SCHUBIGER, P. A. First organometallic inhibitors for human thymidine kinase: synthesis and in vitro evaluation of rhenium(I)- and technetium(I)-tricarbonyl complexes of thymidine. *J. Org. Chem.*, v. 68, p. 67-74, 2003.
- SCHWARTZ, J.; TAMURA, Y.; JORDAN, R.; GRIERSON, J. R.; KROHN, K. A. Monitoring Tumor Cell Proliferation by Targeting DNA Synthetic Process with Thymidine and Thymidine Analogs. *J. Nucl. Med.*, v. 44, p. 2027-2032, 2003.
- SCHWARTZ, J. L.; TAMURA, Y.; JORDAN, R.; GRIERSON, J. R.; KRONH, K. A. Effect of p53 activation on cell growth, thymidine kinase -1 activity, and 3'-deoxy-3' fluorothymidine uptake. *Nucl. Med. Biol.*, v. 31, p. 419-423, 2004.
- SHIELDS, A. F.; LIM, K.; GRIERSON, J.; LINK, J.; KROHN, K. A. Utilization of Labeled Thymidine in DNA Synthesis: Studies for PET. *J. Nucl. Med.*, v. 31, p. 337-342, 1990.
- SHIELDS, A. F.; GRIERSON, J. R.; DOHMEN, B. M.; MACHULLA, H. J.; STAYANOFF, J. C.; LAWHORN-CREWS, J. M.; OBRADOVICH, J. E.; MUZIK, O.; MANGNER, T. J. Imaging proliferation in vivo with [ $^{18}\text{F}$ ]FLT and positron emission tomography. *Nat. Med.*, v. 4, n. 11, p. 1334-1336, 1998.
- SHIELDS, A. Positron Emission Tomography Measurement of Tumor Metabolism and Growth: Its Expanding Role in Oncology. *Mol. Imag. Biol.*, v. 8, p. 141-150, 2006.
- TENG, B.; WANG, S.; FU, Z.; DANG, Y.; WU, Z.; LIU, L. Semiautomatic synthesis of 3'-Deoxy-3'-[ $^{18}\text{F}$ ]fluorothymidine using three precursors. *Appl. Radiat. Isot.*, v. 61, p. 187-193, 2006.
- TROP, H. S.; DAVISON, A.; JONES, A. G.; DAVIS, M. A.; SZALDA, D. J.; LIPPARD, S. J. Synthesis and physical properties of hexakis(isothiocyanato)technetate(III) and (IV) complex. Structure of the  $[\text{Tc}(\text{NCS})_6]_3^-$  ion. *Inorg. Chem.*, v. 19, p. 1105-1110, 1980.
- TSENG, J. R.; DANDEKAR, M.; SUBBARAYAN, M.; CHENG, Z.; PARK, J. M.; LOUISE, S.; GAMBHIR, S. S. Reproducibility of 3'-Deoxy-3'- $^{18}\text{F}$ -Fluorothymidine MicroPET Studies in Tumor Xenografts in Mice. *J. Nucl. Med.*, v. 46, p. 1851-1857, 2005.
- VALLIANT, J. F.; MOREL, P.; SCHAFFER, P.; SOGBEIN, O. O.; STEPHENSON, K. A.; GREEN, A.; CHANKALAI, R. The synthesis and characterization of Re and Tc carbonate complexes. In: NICOLINI, M.; MAZZI, U. (Eds.). *Technetium, rhenium and other metals in chemistry and nuclear medicine*. Padova: SGEditoriali, 2002. v. 6, p. 55-61
- VERBRUGGEN, A. M. Technetium radiopharmaceuticals, current situation and perspectives. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TRENDS IN RADIOPHARMACEUTICALS, IAEA-CN-130/001, 2005. *Resumo*. Vienna: International Atomic Energy Agency, 2005. p. 1.
- WEI, L.; BABICH, J.; ECKELMAN, W. C.; ZUBIETA, J. Rhenium Tricarbonyl Core Complexes of Thymidine and Uridine Derivatives. *Inorg. Chem.*, v. 44, p. 2198-2209, 2005.
- WELLS, P.; GUNN, R. N.; STELL, C.; RANICAR, A. S.; BRADY, F. 2-[ $^{11}\text{C}$ ]Thymidine Positron Emission Tomography Reproducibility in Humans. *Clin. Cancer Res.*, v. 11, p. 4341-4347, 2005.
- ZHANG, J. B.; WANG, X. B.; LI, C. Y. Synthesis and biodistribution of a new  $^{99m}\text{Tc}$  nitrido complex for cerebral imaging. *Nucl. Med. Biol.*, v. 29, p. 665-669, 2002.

Recebido para publicação em 29 de março de 2007.  
Aceito para publicação em 13 de outubro de 2007.