

AVALIAÇÃO RADIOQUÍMICA DA MARCAÇÃO DE ANÁLOGO DA TIMIDINA COM PRECURSOR CARBONILA-TECNÉCIO-99m

Rodrigo L. S. R. Santos¹ e Bluma L. Faintuch¹

¹ Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN / CNEN - SP)
Av. Professor Lineu Prestes 2242
05508-000 São Paulo, SP
faintuch@ipen.br

ABSTRACT

Introduction: Uncontrollable proliferation of cells is a feature of malignant tumors. The use of radiopharmaceutical agents, produced by means of labelling of amino acids, peptides or nucleosides taken up or metabolized by those cells, represents an advance for tumoral imaging. Diagnostic images resulting from labelled thymidine analogs, one of the nucleosides incorporated into DNA but not RNA molecule, may outline rapidly dividing cells, thus permitting adequate treatment. Aims: This study had as a purpose to label thymidine with a carbonyl-99m-technetium precursor, radiochemically evaluating the product by different techniques, in order to define the resulting radiochemical species. Methods: The organometallic precursor was prepared following the Alberto et al (1998) protocol with few modifications. Briefly, NaBH₄ (5.5 mg), Na₂CO₃ (4.4 mg) and Na/K tartrate (20 mg) were weighted in a vial and submitted to CO gas pressure (1 atm) during 60 min. Then ^{99m}TcO₄⁻ (1110 MBq/1 mL) was added to the vial and heated at 75 °C for 30 min. The reaction was interrupted in ice bath and pH adjusted to 7 with a solution of 1N HCl/phosphate buffer 1 M (2:1). Finally, 450 uL of the precursor was added to the 10⁻⁴ M (25 µL) of the ligand and heated again (75 °C) during 60 min. Radiochemical evaluation of the precursor and also of the product was done using paper chromatography, ITLC-SG, HPLC and SepPak C18 ® column with different solvents mixtures. Results: The yield of ^{99m}Tc(CO)₃⁺ precursor was 97.1 ± 1.2% and of the product thymidine-^{99m}Tc(CO)₃⁺ it was 96.2 ± 0.8%. Radiochemical examination indicated that Whatman N.1 and TLC-Al system with MeOH/HCl 6 M (99.5:0.5) as well as TLC-Al with butanol were sufficient to identify impurities in the sample. These findings were confirmed by HPLC. The C18 SepPak ® filter was employed for assessment of the labeled product only, as it has the ability to separate radiochemical contaminants such as ^{99m}TcO₂, ^{99m}TcO₄⁻ and ^{99m}Tc(CO)₃⁺. However, it does not separate hydrophilic impurities such as pertechnetate and carbonyl, which are removed together. Conclusions: Both preparation of ^{99m}Tc(CO)₃⁺ precursor and labelling of thymidine was executed with high yield. A practical chromatographic routine for differentiation of radiochemical species could be successfully defined, paving the way for future standardization of methodology.

1. INTRODUÇÃO

O progresso em técnicas de diagnóstico em Medicina Nuclear através dos anos, principalmente desde a descoberta do isótopo tecnécio-99m (^{99m}Tc) em 1970 [1], é verdadeiramente notável. Este desempenho pode ser atribuído, sem dúvida, à versatilidade química do ^{99m}Tc. Ele é considerado o radiotraçador ideal devido às suas propriedades nucleares, as quais consistem na emissão de fóton gama de 140 keV de energia, com abundância de 89% e tempo de meia-vida de 6 horas. O seu uso também foi facilitado com o desenvolvimento de geradores molibdênio-99/tecnécio-99m (⁹⁹Mo/^{99m}Tc) e a formulação de kits liofilizados, tornando o seu uso uma realidade prática e conveniente em radiofarmácias hospitalares [2].

O uso de radiofármacos produzidos através da marcação de aminoácidos, peptídeos e nucleosídeos captados ou consumidos por células é um avanço na obtenção de imagens tumorais. Durante os últimos 20 anos, a pesquisa na área de desenvolvimento de radiofármacos de ^{99m}Tc tem sido direcionada ao desenvolvimento da química dos núcleos de tecnécio, mais precisamente do $[\text{}^{99m}\text{TcO}]^{3+}$ que apresenta um estado de oxidação +5. O Tc(V) havia dominado a literatura devido à sua química e sua biologia, exceto pelo destacado radiofármaco, MIBI- ^{99m}Tc , que é um composto de Tc(I) [1].

Aos complexos organometálicos de ^{99m}Tc em baixo estado de oxidação vinha sendo dada pouca importância, até que Davison e col. descobriram que os ligantes monodentados isonitrila formam complexos organometálicos de Tc(I) bastante solúveis em água [2].

Procedimentos de marcação utilizando complexos organometálicos tornaram-se uma alternativa nova e valiosa [3].

Somente recentemente, com os experimentos de Alberto e col. (1997) [4-6] padronizando a redução do Tc(VII) a Tc(I) sob atmosfera de monóxido de carbono (CO), tem ressurgido a química do Tc(I). O procedimento consiste na carbonilação do ^{99m}Tc pela ação de borohidreto e monóxido de carbono, produzindo assim um composto organometálico $[\text{M}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^{+1}$ onde $\text{M} = ^{99m}\text{Tc}$, Fig. 1.

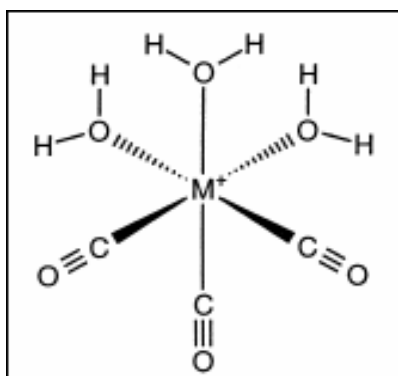


Figura 1. Molécula do precursor $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^{+1}$.

Compostos organometálicos são atraentes para a preparação de radiofármacos devido ao seu pequeno tamanho, resistência ao catabolismo e flexibilidade sintética. Complexos de núcleo metal-carbonila, $\text{M}(\text{CO})_3^+$, para uso como radiofármacos são tipicamente compostos de quelatos bidentados ou tridentados, frequentemente conjugados a alguma forma de agentes alvo [7].

Os ligantes substituem as moléculas de água presentes no composto organometálico ao mesmo tempo que protegem o metal (^{99m}Tc) no centro do complexo contra a trans-metalização ou reoxidação [3].

Imagens provenientes da marcação de análogos da timidina podem fornecer fortes evidências das células que estão se multiplicando de forma acentuada, possibilitando assim um tratamento adequado.

A timidina é conhecida como um nucleosídeo do DNA, que se forma quando a base nitrogenada timina, se liga a uma pentose, desoxirribose, por meio da ligação β -N-glicosídica. Timidina e análogos de timidina, marcados com radioisótopos, têm sido desenvolvidos para os mais diversos campos de pesquisa, principalmente para o uso em Medicina Nuclear. No campo da proteção radiológica, estudos têm sido desenvolvidos utilizando a timidina marcada com trítio (^3H), com a finalidade de comparar a eficácia de líquidos cintilantes biodegradáveis e não biodegradáveis, como pesquisado por Medeiros e col. (2003) [8].

A utilização da timidina marcada com trítio tem sido usada, também, como forma de avaliação dos resultados das pesquisas que utilizam vermes, como por exemplo, no estudo de antígenos recombinantes de *Trypanosoma cruzi*, realizado por Pereira e col. (2003) [9] e na regeneração hepática após hepatectomia parcial em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*, estudada por Soares e col. (1999) [10].

Netter e col. (2002) [11] estudaram a caracterização e atividade enzimática de análogos da timidina marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e ^{188}Re tricarbonila. Os complexos foram testados em timidina quinase viral e timidina quinase humana (TQh). Inibidores eficientes da TQh podem ser utilizados como marcadores de células em proliferação.

No presente estudo, o objetivo foi a marcação de análogo da timidina, Fig. 2, com o precursor carbonila-tecnécio-99m, e sua avaliação radioquímica utilizando diferentes sistemas cromatográficos, para melhor definição das várias espécies radioquímicas.

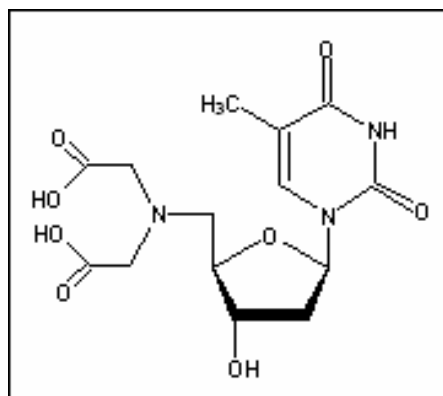


Figura 2. Análogo da Timidina conjugado com o ligante ácido aminodiacético.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O ligante timidina conjugado com o ligante ácido aminodiacético, Fig. 2, foi sintetizado pelo Centro de Radiofarmácia do Instituto Paul Scherrer, Villigen, Suíça. Pertecnato de sódio foi eluído em 6 mL em solução de cloreto de sódio 0,9% a partir do gerador $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ 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 carbonila-tecnécio-99m, foi obtido da White Martins. Todos outros reagentes foram utilizados sem purificação e obtidos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda.

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

O precursor organometálico foi preparado seguindo o protocolo de Alberto et al. (1998) [5] com pequenas modificações. Resumidamente, NaBH_4 (5,5 mg), Na_2CO_3 (4,4 mg) e Na/K tartarato (20 mg) foram introduzidos em um frasco e submetidos a uma pressão de 1 atm de CO durante 60 min. Depois, 1 mL de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ (1110 MBq) foi adicionado ao frasco 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 uma solução de HCl 1N e tampão fosfato 1M (2:1).

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

A marcação do análogo da timidina com carbonila-tecnécio-99m foi realizada utilizando 450 μL do precursor $[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ e 25 μL (10^{-4}M) do ligante em solução tampão PBS, aquecida a 75°C durante 60 min. A reação foi interrompida em banho de gelo.

2.3. Avaliação do rendimento de marcação

Para a avaliação do rendimento de marcação, foram realizadas cromatografia de papel e de camada delgada (ITLC-SG e TLC-Al) com vários solventes e misturas de solventes. Os diferentes sistemas utilizados estão apresentados na Tabela 1. As fitas de papel ou de camada delgada, após a corrida dos solventes, foram cortadas em segmentos de 1 cm e colocadas em tubos para contagem da radiação em equipamento tipo poço de NaI/Tl.

A definição radioquímica também foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Neste caso foram utilizadas 2 misturas de solventes: A - $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ 0,1% e B - Acetonitrila/TFA 0,1%. O gradiente utilizado começa com 95% A e 5% B no intervalo de 0 a 1 min. No intervalo de 1 a 25 min a proporção dos solventes é trocada linearmente para 30%A e 70%B. A partir de 26 min e até o final da corrida (30 min) a proporção é trocada novamente linearmente para 95%A e 5%B. O fluxo utilizado foi 1mL/min.

Na determinação da pureza radioquímica da timidina-carbonila-tecnécio-99m, além das determinações citadas acima, utilizou-se filtros de coluna C_{18} SepPak, fazendo-se a eluição das espécies com solventes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A preparação do precursor utilizando o gás monóxido de carbono é de fácil realização porém um pouco demorada. O estudo da avaliação radioquímica em diferentes sistemas cromatográficos foi necessário para que se separasse bem as diversas espécies radioquímicas.

Quando se utiliza o HPLC, não se consegue definir uma das impurezas normalmente presentes em marcações com o radioisótopo tecnécio, que é o $^{99m}\text{TcO}_2$. Por ser esta espécie um colóide, ele não é detectado no HPLC. Nas cromatografias por papel e de camada delgada, o $^{99m}\text{TcO}_2$ permanece sempre na origem da fita $R_f=0$, isto é, no ponto de aplicação da amostra. A outra impureza radioquímica é o íon pertecnetato que não se reduziu durante a reação. Na Tabela 1, pode-se observar os fatores de retenção para cada espécie radioquímica nos diferentes solventes e suportes utilizados.

Ainda na Tabela 1 é verificado que o pertecnetato, a carbonila e a timidina marcada não são separadas em muitos sistemas, impossibilitando a sua determinação, como é o caso dos sistemas 1, 2, 5 e 8. Em alguns sistemas os produtos apresentam grande arraste, caracterizando uma incompleta separação e prejudicando a determinação do fator de retenção (sistemas 9, 11 e 12).

Tabela 1. Fase móvel, fase sólida e fatores de retenção para as diferentes espécies radioquímicas

Sistemas	Fitas	Solventes	R_f			
			$^{99m}\text{TcO}_2$	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$	Timidina- $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$
1	Whatman	MeOH/HCl conc (99:1)	0	0,7/0,8	0,9/1,0	0,8/0,9
2	ITLC-SG	MeOH/HCl conc (99:1)	0	0,9/1,0	0,9/1,0	0,9/1,0
3	ITLC-Al	MeOH/HCl conc (99:1)	0	0,8/0,9	0,4/0,5	0,9/1,0
4	Whatman	MeOH/HCl 6M (99,5:0,5)	0	0,4/0,5	0,7/0,8	0,7/0,8
5	ITLC-SG	MeOH/HCl 6M (99,5:0,5)	0	0,9/1,0	0,9/1,0	0,9/1,0
6	ITLC-Al	MeOH/HCl 6M (99,5:0,5)	0	0,8/0,9	0/0,1	0,7/0,8
7	Whatman	MeOH/HCl 1M (100:4)	0	0,5/0,6	0,7/0,8	0,7/0,8
8	ITLC-SG	MeOH/HCl 1M (95:5)	0	0,9/1,0	0,9/1,0	0,9/1,0
9	Whatman	Butanol	0	0/0,1	0,8/1,0	0/0,2
10	ITLC-Al	Butanol	0	0,9/1,0	0/0,2	0/0,2
11	Whatman	Butanona	0	0,8/0,9	0/0,1	0/0,1
12	ITLC-SG	Butanona	0	0,9/1,0	0,9/1,0	0/0,2
13	ITLC-Al	Butanona	0	0,9/1,0	0/0,3	0/0,2

Para determinar as impurezas $^{99m}\text{TcO}_2$ e $^{99m}\text{TcO}_4^-$ na preparação da carbonila foi utilizado o sistema 4. Para a confirmação destas mesmas impurezas e mais o precursor que não se ligou à timidina foram utilizados os sistemas 4, 6 e 10. No 4 foi verificado o $^{99m}\text{TcO}_2$ ($R_f=0$), no sistema 10 foi verificado o $^{99m}\text{TcO}_4^-$ livre ($R_f=0,9/1$) e no sistema 6 foi determinado o precursor tricarbonila ($R_f=0/0,1$).

O precursor tricarbonila mostrou um rendimento radioquímico de $97,1 \pm 1,2\%$ e a timidina-carbonila-tecnécio-99m foi de $96,2 \pm 1,2\%$. Estes resultados foram confirmados em HPLC, Fig. 3. Os tempos de retenção para o $^{99m}\text{TcO}_4^-$, $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$, timidina- $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ foram 5,3 min, 17,1 min e 14,8 min respectivamente.

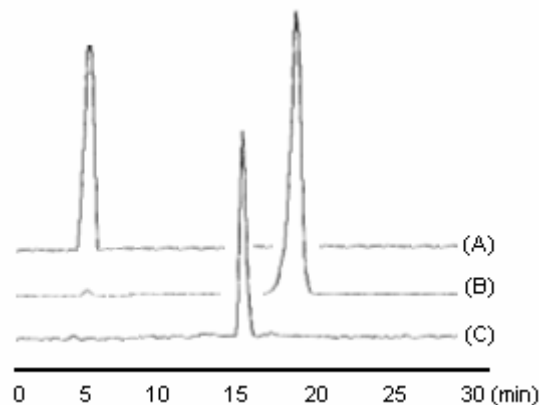


Figura 3. Radiocromatogramas do $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (A), $^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3^+$ (B) e Timidina- $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ (C).

O uso do filtro C_{18} SePak® foi utilizado somente para avaliação do produto radiomarcado timidina- $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$, pois separa o mesmo das impurezas radioquímicas como $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$. Todavia, não separa individualmente os contaminantes hidrofílicos como pertecnetato e carbonila, que são removidos conjuntamente.

No caso do produto em estudo, eluiu-se primeiramente as espécies hidrofílicas, como $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3^+$ com água. Em seguida foi eluído o produto com etanol 70%. No próprio filtro ficou retido a espécie coloidal $^{99m}\text{TcO}_2$. As atividades dos eluídos e do filtro foram medidas em calibrador de dose.

4. CONCLUSÕES

O preparo do precursor e a marcação do análogo da timidina com a carbonila-tecnécio-99m apresentaram alto rendimento, $97,1 \pm 1,2\%$ para o precursor e $96,2 \pm 1,2\%$ para a marcação da timidina. Conseguiu-se definir sistemas cromatográficos (4 e 10) para a avaliação radioquímica das diferentes espécies relacionadas. Estudos de avaliação biológica deverão dar continuidade ao estudo.

REFERÊNCIAS

1. S. Jurisson, J. D. Lydon, "Potencial Technetium small molecule radiopharmaceutical", *Chem. Rev.*, **99**, pp. 2205-2218 (1999).
2. S. Banerjee, M. R. A. Pillai, N. Ramamoorthy, "Evaluation of Tc-99m in diagnostic radiopharmaceuticals", *Seminars in Nucl. Med.*, **31**, pp. 260-277 (2001).
3. R. Schibli, P. A. Schubiger, "Current use and future potential of organometallic radiopharmaceuticals", *Eur. J. Nucl. Med.*, **29**, pp. 1529-1542 (2002).
4. R. Alberto, R. Schibli, D. Angst, et al., "Application of technetium and rhenium carbonyl chemistry to nuclear medicine", *Transition Met. Chem.*, **22**, pp. 597-601 (1997).
5. R. Alberto, R. Schibli, A. Egli, A. P. Schubiger, "A novel organometallic aqua complex of technetium for the labeling of biomolecules: synthesis of $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ from $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$ in aqueous solution and its reaction with a bifunctional ligand." *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, pp. 7987-7988 (1998).
6. R. Alberto, A. Egli, R. Schibli, R. Waibel, U. Abram, T. A. Kaden, et al. "From $[\text{TcO}_4]^-$ to a organometallic aqua-ion: synthesis and chemistry of $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ ", *Technetium, rhenium and other metals in chemistry and nuclear medicine*, M. Nicolini, M. Vederico, Padova, Italy, **5**, pp. 27-34 (1999).
7. J. F. Valliant, P. Morel, P. Schaffer, O. O. Sogbein, K. A. Stephenson, A. Green, R. Chankalai, "The synthesis and characterization of Re And Tc carbonate complexes", *Technetium, rhenium and other metals in chemistry and nuclear medicine*, M. Nicolini, M. Vederico, Padova, Italy, **6**, pp. 55-61 (2002).
8. R. B. Medeiros, R. O. Godinho, M. F. S. S. Mattos, "Comparison of the efficacy of biodegradable and non- biodegradable scintillation liquids on the counting of tritium- and $[\text{}^{14}\text{C}]$ -labeled compounds", *Brazilian J. Medical and Biol. Research*, **36**, pp. 1733-1739 (2003).
9. V. R. A. Pereira, V. M. B. Lorena, M. Nakazawa, A. P. G. Silva, U. Montarroyos, R. Correa-Oliveira, Y. M. Gomes, "Evaluation of the immune response to CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi* in C57BL/6 mice", *Rev. da S. Brasileira de Med. Tropical*, **36**, pp. 435-440 (2003).
10. G. Costa, J. R. Cunha-melo, B. G. Aguiar, S. C. Gonçalves, N. H. Toppa, P. M. Z. Coelho, "Hepatic regeneration after partial hepatectomy in mice infected with *Schistosoma mansoni*, at the acute and chronic phases of the disease", *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, **41**, pp. 225-258 (1999).
11. M. Netter, R. Schibli, M. Birringer, L. Scapozza, A. Schubiger, "First synthesis, characterization and enzyme activity studies of Re- and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tricarbonyl-complex of thymidine analogues", *Technetium, rhenium and other metals in chemistry and nuclear medicine*, M. Nicolini, M. Vederico, Padova, Italy, **6**, pp. 317-322 (2002).