

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Ciências

Departamento de Química e Bioquímica



**LISBOA**

---

UNIVERSIDADE  
DE LISBOA

**Avaliação biológica de complexos catiónicos de  $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$  como sondas para detecção tumoral e monitorização funcional de resistência a múltiplos fármacos**

**Fernando Manuel Rodrigues Toscano**

Dissertação

Mestrado em Química Inorgânica Biomédica: Aplicações em Diagnóstico e  
Terapia

**2013**

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Ciências  
Departamento de Química e Bioquímica



**Avaliação biológica de complexos catiónicos de  $^{99m}\text{Tc(I)}$  como sondas para detecção tumoral e monitorização funcional de resistência a múltiplos fármacos**

**Fernando Manuel Rodrigues Toscano**

Dissertação

Mestrado em Química Inorgânica Biomédica: Aplicações em Diagnóstico e  
Terapia

Dissertação orientada por:

Doutora Filipa Fernandes Mendes (Orientadora Externa)

Professora Doutora Isabel Rego dos Santos (Co-orientadora Interna)

**2013**







Esta tese foi realizada no âmbito do Mestrado em Química Inorgânica Biomédica: Aplicações em Diagnóstico e Terapia, organizado pela Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, em parceria com o Instituto Tecnológico e Nuclear. Este Mestrado foi aprovado por deliberação n.º 723/2004, publicada no Diário da República, II Série, n.º123 de Maio de 2004.

O trabalho apresentado foi realizado no Grupo Ciências Radiofarmacêuticas na Unidade de Ciências Químicas e Radiofarmacêuticas do Instituto Tecnológico e Nuclear, sob a orientação da Doutora Filipa Fernandes Mendes.



## **Agradecimentos**

Os meus sinceros agradecimentos à Doutora Filipa Mendes, pela orientação, disponibilidade e apoio prestado para que esta tese pudesse ser concluída. O meu agradecimento também é extensível à Doutora Lurdes Gano por todo o seu apoio quer experimental quer teórico.

Os meus agradecimentos à Doutora Isabel Rego dos Santos como co-orientadora interna e pela dinâmica que introduz no grupo Ciências Radiofarmacêuticas. Quero também deixar o meu agradecimento a todos os investigadores e colaboradores deste grupo por me terem recebido.

Agradeço também à Teresa Pinto por toda o apoio na realização de todo o trabalho experimental.

A todas as minhas colegas que realizaram a parte experimental das suas teses no IST/ITN fica também o meu agradecimento.

Agradeço também à Doutora Célia Fernandes pela sua disponibilidade pela ajuda sempre preciosa para resolver os problemas relacionados com o HPLC.

O meu agradecimento por todo apoio dado pela Elisabete Correia na realização dos estudos de biodistribuição.

Também quero agradecer aos meus familiares que me muito me apoiaram em fases mais difíceis da vida.

Agradeço muito especialmente aos meus pais por todo o apoio que me deram para realizar este mestrado.

Fernando Toscano



## Resumo

Nesta tese estudaram-se os complexos catiónicos e lipofílicos  $^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP e  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP para avaliar o seu potencial como candidatos a sondas radioactivas para a detecção tumoral e detecção de resistência a múltiplos fármacos.

A avaliação destes compostos foi realizada através de estudos de captação *in vitro* e *in vivo*. Numa primeira fase, utilizaram-se diferentes linhas tumorais para avaliar a captação dos organocomplexos referidos. Os complexos  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi e  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmina actualmente utilizados em imagiologia clínica para estudos de perfusão do miocárdio e detecção tumoral foram utilizados em paralelo para efeitos comparativos.

Os ensaios de captação celular permitiram observar que o  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP é, de entre os 4 complexos estudados, o que apresenta taxas mais elevadas de captação celular, seguido do  $^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP. Foi também observado que a linha celular que sobre-expressa a glicoproteína-P (MCF-7\_Pgp) apresenta captações celulares mais baixas para todos os compostos utilizados. Estudou-se ainda os mecanismos pelos quais o complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP entra nas células tumorais. Verificou-se que a captação celular é influenciada por alterações dos valores de  $\Delta\psi_p$  e  $\Delta\psi_m$ , com um forte contributo do  $\Delta\psi_m$  na captação e retenção celulares.

Na segunda fase foram realizados estudos *in vivo*. Nestes estudos utilizaram-se as linhas celulares tumorais MCF-7, MCF-Pgp e MDA-MB-231 para induzir tumores em ratinhos. Os resultados não mostraram níveis de fixação tumorais significativos mas, como esperado, observou-se uma elevada fixação ao nível do músculo cardíaco. Na terceira fase, a técnica de western blot mostrou a expressão da Pgp em todos os extractos tumorais, mas não nos extractos dos homogenatos das linhas celulares utilizadas para induzir tumores nos ratinhos.



## **Abstract**

In this thesis we studied the lipophilic and cationic complexes  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP and  $^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP to evaluate their potential as candidates for radioactive probes for tumour detection and detection of multidrug resistance.

The evaluation of these compounds was performed by uptake studies *in vitro* and *in vivo*. In a first phase, individual tumour lines were used to assess uptake of the complexes above. The  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi and  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmin complexes currently used in medical imaging to study myocardial perfusion and tumour detection were used in parallel for comparative purposes.

Assays of cellular uptake allowed the observation that  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP is, among the four complexes studied, the one that presents higher rates of cellular uptake, followed by  $^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP. It was also observed that the cell lines overexpressing P-glycoprotein (MCF-7 Pgp) have the lowest cell uptake of all the compounds used. The mechanisms by which the  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP complex enters the tumour cells were also studied. It was found that the cellular uptake is influenced by changes in the  $\Delta\psi_p$  and  $\Delta\psi_m$  values, with a strong contribution from  $\Delta\psi_m$  in cellular uptake and retention.

In the second phase studies were performed *in vivo*. In these studies we used tumour cell lines MCF-7, MCF-7 Pgp and MDA-MB 231 to induce tumours in mice. The results showed no significant levels of tumour fixation but, as expected, there was a high level attachment to the heart muscle. In the third phase, the western blot showed expression of Pgp in all tumour extracts but not in extracts from homogenates of cell lines used to induce tumours in mice.



## **Palavras-Chave**

Complexos  $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$

Detecção tumoral

Captação celular

Mitocôndria

Sondas radioactivas

## **Keywords**

$^{99m}\text{Tc}$  complexes

Tumoral detection

Cellular uptake

Mitochondria

radioprobes



# Índice geral

	<b>Página</b>
Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Palavras-Chave	ix
Keywords	ix
Índice geral	xi
Lista de símbolos e abreviaturas	xiii
Objectivo	xv
<b>Capítulo 1: Introdução</b>	<b>1</b>
1.1. Radioactividade e Medicina	3
1.1.1. Fundamentos da Química e Radioquímica do Tecnécio	3
1.1.2. Radiofármacos de $^{99m}\text{Tc}$	6
1.1.3. Precursor <i>fac</i> - $^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ - características e síntese	10
1.2. Radiofármacos para detecção tumoral	12
1.2.1. Diferenças entre células normais e células tumorais	12
1.2.2. Detecção tumoral <i>in vivo</i>	13
1.2.2.1. Aspectos importantes na captação celular de radiofármacos	13
1.2.2.2. Radiofármacos em desenvolvimento e em uso clínico	16
1.3. Radiofármacos para monitorização de resistência a múltiplos fármacos	19
1.3.1. Células tumorais e resistência a fármacos	19
1.3.2. Detecção <i>in vivo</i> de MDR	21
<b>Capítulo 2: Resultados</b>	<b>25</b>
2.1. Estudos <i>in vitro</i> em linhas celulares	27
2.1.1. Avaliação da captação celular em linhas tumorais	27
2.1.2. Avaliação da captação celular em linhas tumorais resistentes a múltiplos fármacos	34

2.1.3. Avaliação do efeito do potencial de membrana plasmática e do potencial de membrana mitocondrial na captação celular	35
2.2. Estudos <i>in vivo</i> em pequenos roedores	39
2.2.1. Modelo animal	40
2.2.2. Biodistribuição e captação tumoral	41
2.3. Estudos de avaliação da expressão de proteínas de MDR	48
<b>Capítulo 3: Discussão Geral e Conclusões</b>	51
3. Discussão geral e Conclusões	53
<b>Capítulo 4: Materiais e Métodos</b>	59
4.1.1. Condição de manipulação de compostos de $^{99m}\text{Tc}$	61
4.1.2. Síntese do Precursor <i>fac</i> - $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$	61
4.1.3. Síntese e caracterização dos complexos $^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP e $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP	62
4.2. Estudos de captação celular	63
4.2.1. Linhas celulares	63
4.2.2. Cultura e manutenção de linhas celulares	64
4.2.3. Estudos de captação celular	65
4.2.4. Alteração do potencial de membrana plasmática e do potencial de membrana mitocondrial	66
4.3. Estudos <i>in vivo</i> - biodistribuição e fixação tumoral	69
4.3.1. Modelos animais – inoculação de ratinhos com linhas celulares tumorais	69
4.3.2. Ensaio de biodistribuição	69
4.4. Western blot	70
4.4.1. Lise celular/tumoral	70
4.4.2. Quantificação proteica	70
4.4.3. Western blot	70
<b>Capítulo 5: Bibliografia</b>	73
5. Bibliografia	75

## **Lista de símbolos e abreviaturas**

**a** - ano

**ADN** – ácido desoxirribonucleico

**ATP** – adenosina trifosfato

**BCRP**- proteína responsável pela multirresistência do cancro da mama

**Bz** - benzilo

**CCCP** – carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona

**DMBA** – 7, 12-dimetilbenzil- $\alpha$ -antraceno

**DMEM** – Dulbecco's Modified Eagle's medium

**DMEOP** - di-metóxi-tris-pirazolilmetano

**DMSO** – dimetilsulfóxido

**DTPA** – ácido dietilenoteriaminapentacético

**EDDA** – ácido etilenodiamino diacético

**EDTA** – ácido etilenodiaminotetracético

*fac* - facial

**FBS** – soro fetal bovino

**h** - hora

**HMDP** - hidroximetilenodifosfonato

**HMPAO** – hexametilpropileno amino oxima

**HPLC** – cromatografia líquida de alta pressão

**HYNIC** – ácido hidrazino nicotínico

**IST/ITN** – Instituto Superior Técnico/Instituto Tecnológico e Nuclear

**IV**- infravermelho

**MAG<sub>3</sub>** - mercaptoacetiltriglicina

**min** - minuto

**MDP** - metilenodifosfonato

**MDR** – resistência a múltiplos fármacos

**NAD(P)H** – fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

**log P** – logaritmo do **coeficiente de partição**

**PET** – tomografia por emissão de positrão

**Pgp** – glicoproteína-P

**Pz** - pirazolo

**RMN** – ressonância magnética nuclear

**RPMI** – Roswell Park Memorial Institute medium

**SPECT** – tomografia por emissão de fóton único

**t<sub>1/2</sub>** – tempo de semi-vida

**TMEOP** – tri-metóxi-tris-pirazolilmetano

**TPMP** - metiltrifenilfosfónia

**TPP** - tetrafenilfosfónio

**t<sub>R</sub>** – tempo de retenção

**UV-Vis** – ultravioleta-visível

**Δψ<sub>m</sub>** – potencial de membrana mitocondrial

**Δψ<sub>p</sub>** – potencial de membrana plasmática

**α** - alfa

**β** - beta

**μ** - miu

**γ** - gama

## Objectivo do trabalho

Os complexos  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi e  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmina utilizados em estudos de perfusão do miocárdio, apresentam um carácter catiónico e lipofílico, que leva à sua acumulação em células tumorais. Deste modo, surgiu também a possibilidade da sua utilização clínica para detecção tumoral por SPECT. Esta aplicação é fundamentada no potencial negativo aumentado das membranas plasmática e mitocondrial de células tumorais, o que favorece a entrada e retenção dos compostos.

À semelhança destas aplicações do  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi e da  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmina para além da cardiologia nuclear, pretende estudar-se o comportamento de outros complexos de Tc lipofílicos e catiónicos desenvolvidos no Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas, nomeadamente  $^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP e  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP.

Esta dissertação tem assim como principal objectivo a avaliação do comportamento biológico *in vitro* e *in vivo* destes complexos organometálicos de  $^{99m}\text{Tc(I)}$  de modo a avaliar o seu potencial interesse clínico no diagnóstico tumoral e como sondas para avaliação de fenótipo de resistência a múltiplos fármacos. Nesse sentido o trabalho foi dividido em 3 objectivos específicos:

- Na primeira fase estudar *in vitro* a captação celular dos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  em linhas celulares de origem tumoral *versus* linhas celulares tumorais resistentes a múltiplos fármacos. De modo a tentar perceber os mecanismos de captação do  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP realizar também ensaios de captação com vários modeladores.

- Numa segunda fase realizar estudos de biodistribuição e fixação tumoral em pequenos roedores. Deste modo pretendeu verificar-se se estes complexos têm potencial para uma possível aplicação clínica analisando o perfil de biodistribuição *in vivo*.

- Na terceira fase avaliar a expressão da glicoproteína-P em extractos proteicos isolados dos tumores ou em extractos de homogenatos celulares através da técnica de western blot.

# ***CAPÍTULO 1***

## *Introdução*



## 1.1. Radioactividade e Medicina

A Medicina Nuclear é um ramo da medicina que recorre à utilização de isótopos radioactivos para a obtenção de informação sobre o funcionamento de órgãos específicos de um indivíduo ou para o tratamento de uma doença.

Se considerarmos os isótopos radioactivos naturais a Medicina Nuclear terá tido o seu início em 1901 com a utilização do isótopo natural do rádio no tratamento de lesões cutâneas pelo médico francês Henri Danlos. A utilização de isótopos radioactivos artificiais surge na década de 30 do século XX, pois foi em 1934 em que o casal de radioquímicos franceses Frederic Joliot e Irene Curie Joliot produziu o primeiro radioisótopo artificial, o fósforo 30 ( $^{30}\text{P}$ ).

Considerando então os isótopos artificiais o início das aplicações médicas da radioactividade poderá ter tido o seu início com George Hevesy com a utilização de fósforo radioactivo em animais saudáveis no ano de 1935 ou então com Joseph Hamilton que terá tentado tratar doentes com leucemia recorrendo ao sódio 24 ( $^{24}\text{Na}$ ) em 1936. Foi por esta altura que foi introduzido o primeiro ciclotrão que permitiu produzir numerosos nuclídeos que foram aplicados às técnicas de diagnóstico e terapia. A Medicina Nuclear foi definida oficialmente em 1967, e desde essa altura este ramo da medicina mudou tendo sofrido muitas alterações. <sup>[1]</sup>

### 1.1.1. Fundamentos da Química e Radioquímica do Tecnécio

O elemento tecnécio (Tc) foi descoberto por Segrè e Perrier em 1937, quando estes 2 cientistas trabalhavam com um ciclotrão e estudavam a irradiação de um alvo metálico de molibdénio (Mo) com deuterões.

Este metal de transição localiza-se no grupo 7, posição 43 da tabela periódica e apresenta a configuração electrónica ( $[\text{Kr}]4d^5 5s^2$ ).

Este elemento possui 27 isótopos cujos números de massa variam de 90 a 110. Foi o primeiro elemento a ser produzido artificialmente. <sup>[1]</sup>

O tecnécio é de extrema importância especialmente devido ao facto de possuir 7 isótopos metaestáveis. Destes isótopos, o tecnécio 99 metaestável ( $^{99m}\text{Tc}$ ) é o mais utilizado em imagiologia dadas as suas propriedades físicas e químicas que são apropriadas para exames de diagnóstico com o recurso à técnica de tomografia computadorizada por emissão de fóton único (single photon emission computed Tomography - SPECT):

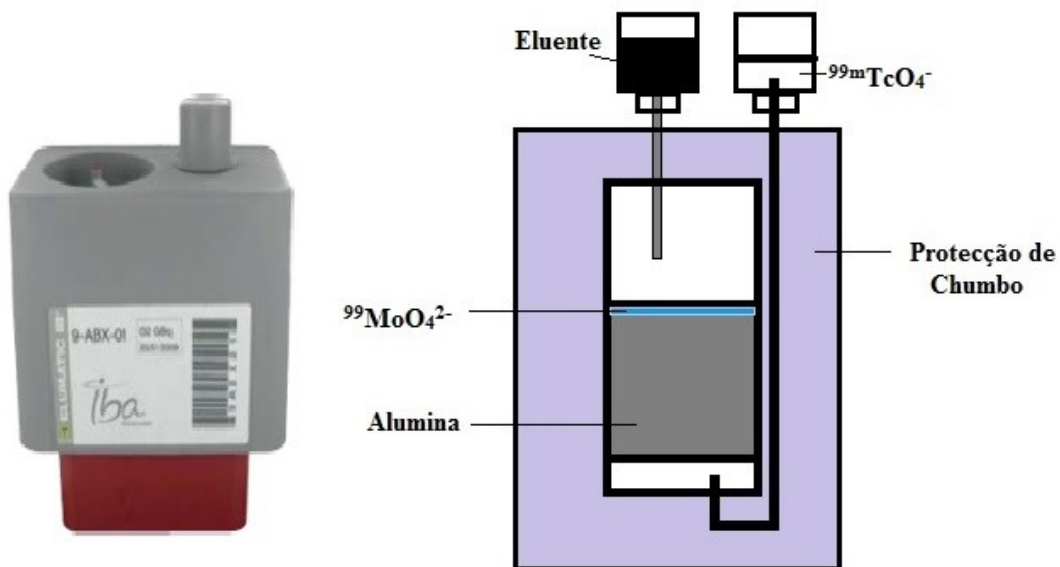
- Ser um emissor  $\gamma$  com uma energia de 142 keV, suficiente para atravessar os tecidos e órgãos e ser detectada numa câmara gama, permitindo imagens de elevada qualidade;
- Ser de fácil obtenção utilizando um gerador comercial portátil de  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ ;
- Ter um tempo de  $t_{1/2}$  de 6,02 horas o que o torna adequado para a síntese de radiofármacos, para realizar o controlo de qualidade através de HPLC, administrar ao doente e para a aquisição de imagens, assim como, minimizar a exposição do doente à dose de radiação;
- Possuir uma capacidade de coordenação alargada permitindo a preparação de uma grande diversidade de compostos distintos nas suas propriedades físico-químicas e biológicas.

O Tc apresenta estados de oxidação entre o -1 e o +7, podendo assim formar uma grande variedade de compostos que poderão possivelmente ser utilizados como radiofármacos. <sup>[1]</sup> Este elemento de transição possui propriedades semelhantes às do Rénio (Re), uma vez que os seus raios atómicos são semelhantes, devido à contracção dos lantanídeos. Destas propriedades salientam-se a geometria de coordenação e lipofilia. Apesar disso exibem algumas diferenças principalmente na capacidade de oxidação, apresentando o Re complexos mais facilmente oxidáveis, e de um modo geral, mais inertes do que os de Tc. <sup>[2]</sup>

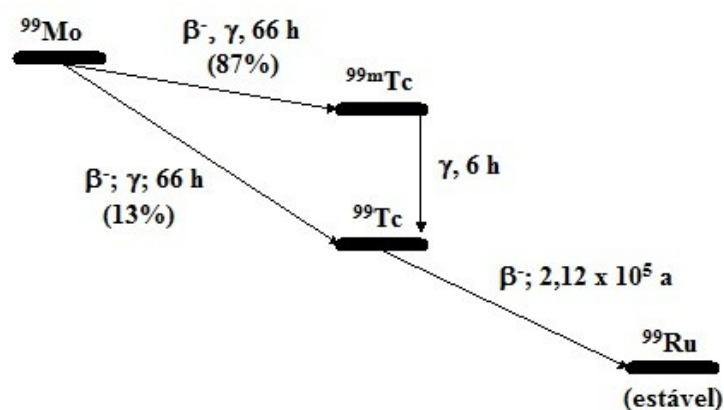
Os compostos com  $^{99m}\text{Tc}$  mais estudados até há relativamente pouco tempo eram aqueles em que o Tc se apresentava nos estados de oxidação +3 e +5. Nos últimos anos os complexos tricarbonilo de Tc(I) assumiram uma posição de destaque na investigação e desenvolvimento de novos radiofármacos. <sup>[3,4]</sup>

Como referido acima, o  $^{99m}\text{Tc}$  é obtido no estado de oxidação +7 sob a forma de pertecnetato  $[\text{TcO}_4]^-$ , por eluição do gerador de  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ . Este estado de oxidação é o mais estável em solução aquosa.

O gerador  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  (Figura 1.1) é constituído por uma coluna de alumina com  $[\text{MoO}_4^{2-}]$  adsorvido no seu topo. O tempo de semi-vida do  $^{99}\text{Mo}$  é de 66 horas decaindo por emissão  $\beta^-$  para o estado metaestável  $^{99m}\text{Tc}$  (87%) e para o estado fundamental  $^{99}\text{Tc}$  (13%) (Figura 1.2). O  $^{99}\text{Mo}$  sofre um decaimento contínuo para o isótopo  $^{99m}\text{Tc}$ , originando o aumento de concentração deste último até que se atinge um equilíbrio transitório após 22 horas. Através da eluição com uma solução aquosa de NaCl a 0,9% (soro fisiológico), o  $^{99m}\text{Tc}$  é separado e recolhido num frasco submetido a vácuo sob a forma de pertecnetato de sódio ( $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ ). O  $[\text{MoO}_4^{2-}]$ , mantém-se adsorvido na coluna de alumina, prosseguindo o processo de decaimento para  $[\text{MoO}_4^{2-}]$ , que pode ser eluído para ensaios posteriores.



**Figura 1.1.** Gerador isotópico de  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$



**Figura 1.2.** Esquematização do decaimento dos isótopos radioactivos no gerador  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ .

O  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  possui uma concentração baixa no eluído, que varia entre  $10^{-7}$  M a  $10^{-8}$  M, razão pela qual a síntese dos radiofármacos é realizada em soluções aquosas muito diluídas quando estas são obtidas directamente do gerador. [3-9]

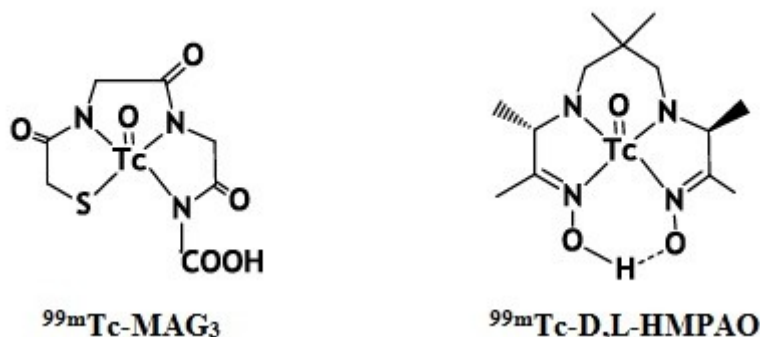
O  $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-]$  em solução aquosa diluída não permite a caracterização dos complexos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  por técnicas normalmente utilizadas em química inorgânica, tais como difracção de raios-X assim como a aplicação da ressonância magnética nuclear (RMN) e infravermelho (IV). Assim, a caracterização dos compostos contendo  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  é realizada recorrendo à técnica cromatográfica cromatografia líquida de alta pressão (high performance liquid chromatography - HPLC) com o recurso a um detector  $\gamma$  e o tempo de retenção comparado com o de complexos análogos de  $^{99}\text{Tc}$  ou de Re (detectores ultravioleta – visível UV-Vis). Devido ao tempo de semi-vida do  $^{99}\text{Tc}$  ( $t_{1/2} = 2,12 \times 10^5$  anos) ser muito elevado e deste ser um emissor  $\beta^-$ , o que implica maiores cuidados na manipulação e armazenamento, recorre-se usualmente aos análogos de Re para a identificação dos complexos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .

### 1.1.2. Radiofármacos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$

As aplicações clínicas iniciais do  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  em imagiologia encontram-se descritas a partir de 1960, quando se começou a utilizar o  $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-]$  para a obtenção de imagens

da tiróide (Shellabarger) e do cérebro (Harper e Lathrop).<sup>[10]</sup> No entanto a utilização do pertecnetato demonstrou ser muito limitada.

Foi ainda nas décadas de 60 e 70 que surgiram diferentes radiofármacos de <sup>99m</sup>Tc que vieram permitir a avaliação de alterações do funcionamento de diversas estruturas e órgãos tais como o esqueleto, o fígado e os rins. Estes radiofármacos também permitiram o diagnóstico de diversas patologias. Estes radiofármacos foram desenvolvidos sem apoio da química de coordenação deste radionuclídeo, destacando-se o <sup>99m</sup>Tc-MDP (metilenodifosfonato), o <sup>99m</sup>Tc-HMDP (hidroximetilenodifosfonato) e o <sup>99m</sup>Tc-DTPA (ácido dietilenotriaminopentacético). Estes radiofármacos sem estrutura molecular conhecida são na sua grande maioria utilizados actualmente na prática clínica. Nas décadas que se seguiram a química de coordenação do Tc passou a dominar o desenvolvimento de radiofármacos de <sup>99m</sup>Tc. Dos radiofármacos desenvolvidos destacam-se os oxocomplexos de Tc (V) <sup>99m</sup>Tc-D,L-HMPAO (utilizado para estudos de perfusão cerebral) e o <sup>99m</sup>Tc-MAG<sub>3</sub> (estudo da função renal) cujas estruturas moleculares se encontram bem conhecidas e definidas, tendo ambos sido aprovados para o uso clínico (Figura 1.3).<sup>[11]</sup>

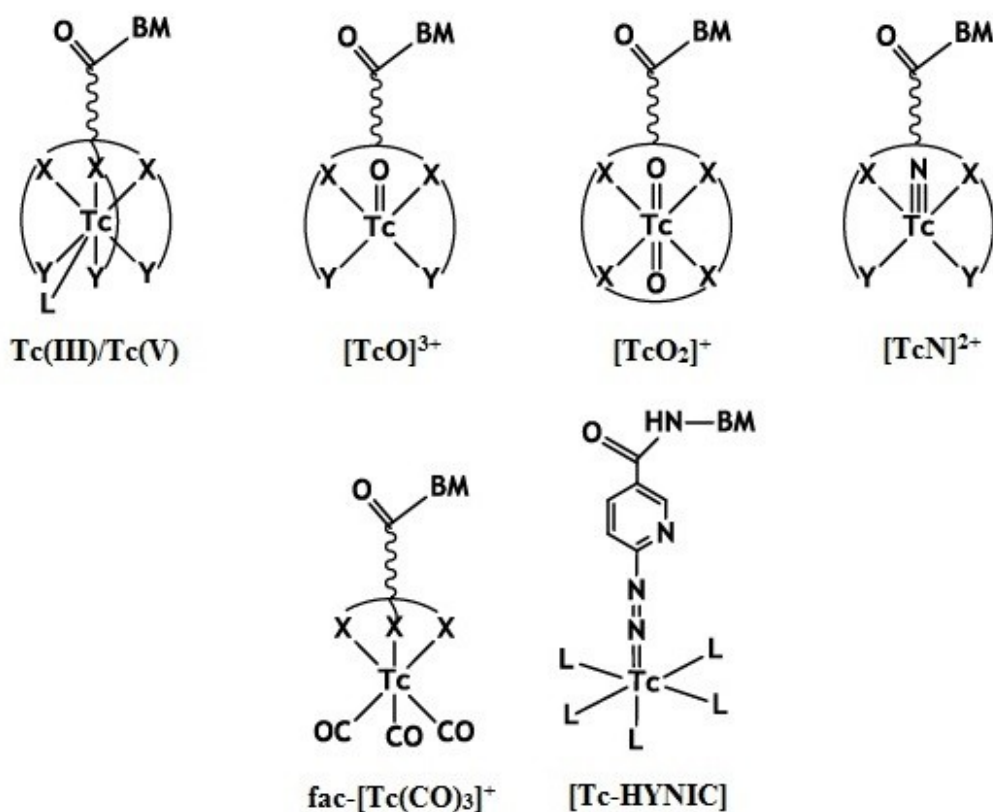


**Figura 1.3.** Representação das estruturas moleculares dos rádiofarmacos <sup>99m</sup>Tc-D,L-HMPAO e ) <sup>99m</sup>Tc-MAG<sub>3</sub> aprovados para a prática clínica.<sup>[11,12]</sup>

No século XXI têm vindo a desenvolver-se muitos trabalhos de investigação na química radiofarmacêutica com o intuito de desenvolver novos complexos de <sup>99m</sup>Tc funcionalizados com biomoléculas, de modo a tornarem-se mais específicos. Estes complexos de <sup>99m</sup>Tc investigados foram funcionalizados com biomoléculas como por exemplo, anticorpos monoclonais, antagonistas de receptores do sistema nervoso central e nucleósidos.<sup>[6,7,13-15]</sup> No entanto, apenas um número reduzido destes radiofármacos

investigados foi aprovado para a prática clínica. [16-19] Deste modo, parece ser fundamental o recurso à química inorgânica e organometálica para a obtenção de novos complexos, com o objectivo de se desenvolverem radiofármacos com elevada especificidade de modo a atingirem-se os alvos de uma forma mais criteriosa e eficaz.

Assim, diversos estudos que têm vindo a ser realizados com o recurso a diferentes centros metálicos e utilizando ligandos bifuncionais, para permitir uma coordenação eficaz do  $^{99m}\text{Tc}$  a diferentes biomoléculas (Figura 1.4). [6,20,21]



**Figura 1.4.** Centros metálicos principais de  $^{99m}\text{Tc}$  utilizados para desenvolver radiofármacos específicos (BM = biomolécula). [22]

Os oxocomplexos de Tc(V) contendo a unidade  $[\text{Tc} = \text{O}]^{3+}$  utilizados até à relativamente pouco tempo, eram os mais exaustivamente estudados para a marcação com biomoléculas. [8] Esta unidade é estabilizada geralmente por ligandos tetradentados dadores de electrões tais como N e S devido à partilha dos electrões desemparelhados. Estas unidades apresentam geralmente desvantagens relativamente à possível formação de estereoisómeros. [22] Os isómeros resultantes poderão apresentar diferentes

propriedades físico-químicas e um comportamento biológico diferente, podendo dessa forma reduzir a eficácia do radiofármaco. Para além das desvantagens já referidas, estes complexos podem levantar dificuldades na funcionalização dos ligandos tetradentados com as biomoléculas, que pode envolver diferentes estratégias de protecção e desprotecção de grupos funcionais. [15]

De forma a resolver algumas das dificuldades apresentadas relativamente à unidade  $[\text{Tc} = \text{O}]^{3+}$  foram introduzidos novos fragmentos metálicos com novas abordagens para a marcação de biomoléculas com o  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (Figura 1.4). Destas novas formas de abordar as dificuldades referidas surge então o HYNIC (ácido hidrazinonicotínico) e a abordagem organometálica. Estas baseiam-se em complexos com os centros metálicos  $[\text{Tc-HYNIC}]$  e  $fac\text{-}[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ , os quais têm vindo desempenhar nos últimos anos um papel cada vez mais importante na procura de novas abordagens radiofarmacológicas.

Na abordagem  $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC}]$  o ligando HYNIC pode coordenar-se ao ião metálico de 2 formas: a mono ou a bidentada. Para tal é necessário utilizar co-ligandos de forma a criar uma esfera de coordenação em torno do ião metálico, e obter complexos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  mais estáveis e facilmente funcionalizáveis com diferentes biomoléculas. Estes co-ligandos apresentam-se com átomos dadores de electrões tais como o N e o O. Nestes co-ligandos incluem-se o EDDA (ácido etilenodiamino diacético), o gluconato e o ácido nicotínico.

A vantagem desta abordagem é controlar a lipofilia e farmacocinética dos complexos com o recurso a diferentes combinações de co-ligandos. [15,23-25] No entanto, a natureza da ligação Tc-N na coordenação do HYNIC continua a não ser conhecida, constituindo assim uma desvantagem para a aplicação desta metodologia no desenvolvimento de radiofármacos.

Entre os fragmentos mais promissores encontra-se o  $fac\text{-}[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ , uma vez que apresenta características muito apropriadas para a conjugação com biomoléculas. [26,27] Esta unidade será abordada na secção que segue (secção 1.1.3).



Com a introdução desta via de síntese recorrendo ao boranocarbonato e devido às características que este apresenta, foi possível a introdução de uma formulação sob a forma de um *kit* liofilizado para a obtenção de precursor tricarbonilo. Este kit é comercializado para fins de investigação com o nome *Isolink* (Covidien, Petten, Holanda) (Figura 1.5), permitindo num único passo a preparação do aquo-complexo  $fac-[^{99m}Tc(H_2O)_3(CO)_3]^+$  de uma forma quantitativa, bastando para isso a adição do ião pertecnetato e posterior aquecimento a 100°C durante 20 minutos.

Os complexos  $fac-[M(H_2O)_3(CO)_3]^+$  ( $M = ^{99m}Tc, Re$ ) apresentam uma enorme vantagem destacando-se no desenvolvimento de novos radiofármacos devido à inércia dos ligandos CO e da versatilidade química do precursor originada pela presença das 3 moléculas de H<sub>2</sub>O que possuem uma elevada labilidade. Desta forma a fácil substituição dos ligandos H<sub>2</sub>O por ligandos com diferentes denticidades e características electrónicas e/ou estereoquímicas permite a preparação de um grande variedade de complexos. O fragmento  $fac-[^{99m}Tc(CO)_3]^+$  tem dimensões reduzidas e uma simetria quase esférica, formando tendencialmente complexos octaédricos bastante estáveis cinética e termodinamicamente. Todas estas características potenciam a sua utilização na concepção de radiofármacos, com o recurso a ligandos monodentados, bidentados e tridentados, com uma grande diversidade de átomos dadores (P, S, N, O, H) e a facilidade de funcionalização com o recurso a biomoléculas. [33-45] Quando comparado com outros centros metálicos de Tc, este fragmento organometálico apresenta uma lipofilia intrínseca superior, o que poderá implicar maior facilidade para atravessar a membrana celular por difusão.

Nos últimos anos têm sido desenvolvidos muitos complexos que possuem a unidade  $fac-[^{99m}Tc(CO)_3]^+$  para marcação de uma grande diversidade de biomoléculas, tais como, péptidos de dimensões reduzidas, açúcares, aminoácidos, nucleótidos ou antagonistas do sistema nervoso central. No entanto, apesar dos resultados promissores obtidos até ao momento, não se encontra em aplicação clínica nenhum radiofármaco contendo a unidade  $fac-[^{99m}Tc(CO)_3]^+$ .

## **1.2. Radiofármacos para detecção tumoral**

O diagnóstico da doença oncológica efectuado precocemente é de extrema importância para que a terapia possa ter sucesso e travar o desenvolvimento da doença para estágios mais avançados.

A capacidade de discernir células normais de células cancerígenas, que durante o processo de oncogénese sofrem alterações ao nível molecular e fisiológico, é fundamental. Seguindo esta linha de raciocínio diversos investigadores empreenderam esforços para desenvolver novos radiofármacos com capacidade selectiva de detecção de células tumorais.

Inicialmente o recurso a radiofármacos era limitado à detecção de alterações morfológicas, tal como a permeabilidade vascular ou alterações da actividade metabólica. Neste momento as abordagens centram-se na detecção da expressão de receptores e proteínas de transporte membranares como por exemplo a glicoproteína-P (proteína de efluxo existente na membrana plasmática). Para que tal abordagem possa ocorrer diversas biomoléculas foram marcadas de modo a se poder avaliar a sua potencial aplicação clínica.

Combinar a sensibilidade das técnicas nucleares com moléculas que apresentem especificidade biológica para as células tumorais, recorrendo aos conhecimentos da Biologia Molecular, será o maior desafio que se enfrenta na actualidade.

### **1.2.1. Diferenças entre células normais e células tumorais**

As células tumorais surgem devido a acumulação de mutações no ácido desoxirribonucleico (ADN). Este processo pode ser lento e levar inclusive vários anos estando dependente de diversos factores genéticos ou ambientais. O cancro surge devido a uma proliferação de células tumorais associada à autonomia de crescimento, à não resposta a sinais inibitórios, à capacidade de invasão de tecidos circundantes e devido ao seu potencial ilimitado de replicação.

As diferenças entre células normais e tumorais são muitas tanto ao nível morfológico como funcional e molecular. A proliferação das células tumorais é muito mais rápida do que nas células normais. As primeiras perdem a capacidade de aderência

dando origem à sua migração para tecidos vizinhos, ou através da corrente sanguínea (e sistema linfático) para regiões do organismo mais afastadas originando metástases ou tumores secundários. Adicionalmente, as células tumorais malignas têm a capacidade de segregar moléculas com a capacidade de estimular o crescimento de vasos sanguíneos podendo desta forma proliferar e promover a angiogénese. [46]

As células tumorais apresentam também um potencial de membrana mitocondrial mais negativo do que as células normais. [47]

### **1.2.2. Detecção tumoral *in vivo***

Considerando as características das células tumorais é de extrema importância o desenvolvimento de radiofármacos que as explorem, e deste modo obter compostos específicos para a detecção tumoral.

O facto de as células tumorais apresentarem um potencial de membrana mitocondrial mais negativo do que as mitocôndrias das células normais será uma das características a ter em conta. Assim, a concepção de radiofármacos como os catiões lipofílicos deslocalizados que se acumulam selectivamente nas mitocôndrias das células tumorais está despertar um enorme interesse na investigação do cancro.

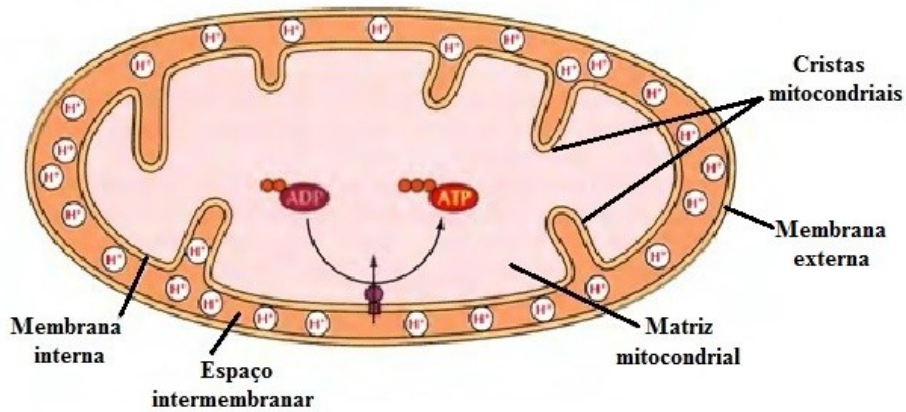
#### **1.2.2.1. Aspectos importantes na captação celular de radiofármacos**

Todas as células eucarióticas possuem no seu citoplasma mitocôndrias (organelos). Em condições aeróbicas estas são responsáveis pela produção de maior parte da energia sob a forma de ATP, essencial para o desempenho das funções celulares.

Estes organelos encontram-se presentes em maior número em células que apresentam maiores necessidades energéticas, como nas células do músculo cardíaco e do sistema muscular e de todo o sistema nervoso (nas extremidades dos axónios).

A actividade da mitocôndria depende da sua divisão em compartimentos especializados, os quais são delimitados por membranas. A mitocôndria possui 2 membranas, a membrana externa e a interna, delimitando 2 compartimentos, o espaço

intermembranar e a matriz mitocondrial (envolvida pela membrana interna). A membrana interna possui uma superfície superior à da membrana externa dado que se apresenta sob a forma de pregas ou cristas (Figura 1.6).



**Figura 1.6.** Estrutura da mitocôndria (imagem adaptada).<sup>[48]</sup>

A glucose é a principal fonte de energia das células uma vez que a sua degradação dá origem a  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  e ATP. A degradação da glucose ocorre em 3 etapas fundamentais: glicólise, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa. Nesta última etapa ocorre uma série de reacções de oxi-redução na membrana interna da mitocôndria que terminam com a redução do  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ . Nesta etapa em cada uma das reacções ocorre a transferência de electrões de um estado de alta energia para um estado de baixa energia, e conseqüentemente há libertação de energia para o sistema. A teoria quimiosmótica, define que esta energia é utilizada para bombear prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, estabelecendo desta forma um gradiente através da membrana interna. Esta distribuição de cargas através da membrana interna (matriz – lado negativo e espaço intermembranar – lado positivo) gera um gradiente electroquímico transmembranar (força motriz prótonica) que é utilizado para a posterior síntese de ATP. A força motriz prótonica gerada pela fosforilação oxidativa apresenta 2 componentes, a componente química ( $\Delta\text{pH}$ ) e a eléctrica. A componente eléctrica ou potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) é um indicador do estado da função bioenergética do organelo, uma vez que dele dependem a integração adequada das diversas vias metabólicas que convergem na mitocôndria.<sup>[49]</sup> O  $\Delta\psi_m$  é a principal força motriz responsável por gerar ATP através da fosforilação oxidativa, pela regulação dos

níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  na mitocôndria, pela formação de espécies reactivas de oxigénio e pela redução do NAD(P)H. [50]

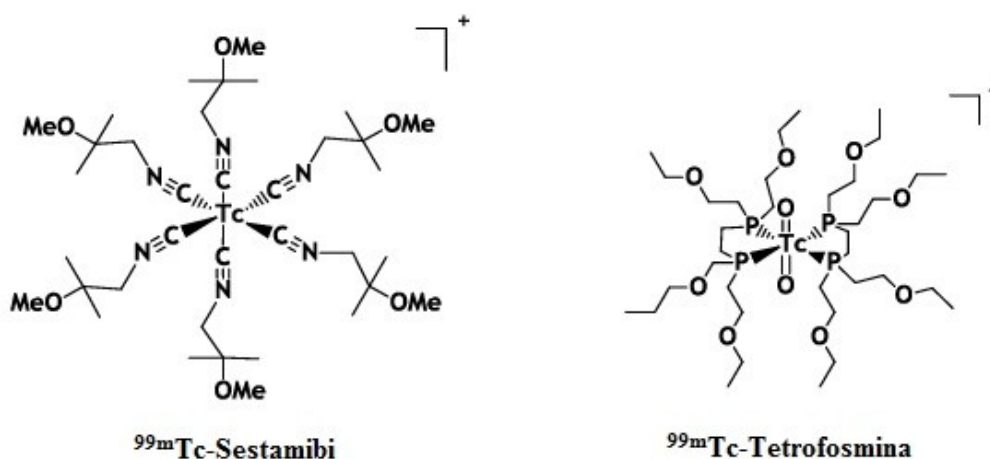
Tem-se vindo a demonstrar nos últimos anos o papel fundamental da disfunção mitocondrial em diversas doenças como por exemplo: o cancro, a diabetes e muitas das doenças degenerativas. No caso do cancro foram identificadas diferenças entre as mitocôndrias de células tumorais e células normais, principalmente na sua actividade metabólica, na sua composição molecular, no ADN mitocondrial e no potencial de membrana mitocondrial. [47,51,52] Tais alterações advêm das necessidades energéticas mais elevadas das células tumorais, assim como da sua capacidade de resistir à apoptose, processo no qual a mitocôndria está envolvida.

O  $\Delta\psi_m$  elevado prevalece no fenótipo das células tumorais o que as torna num dos principais objectos de estudo para o desenvolvimento de radiofármacos para detecção tumoral. [53] Esta diferença de extrema importância foi alvo do estudo com o recurso a catiões lipofílicos que se acumulam nas mitocôndrias. [54-56] Devido às propriedades lipofílicas destes compostos, estes conseguem atravessar a membrana mitocondrial interna sem o auxílio de iónoforos (moléculas que são solúveis em lípidos, permitindo o transporte de iões através da bicamada lipídica das membranas celulares). Por outro lado a carga positiva destes compostos permite a acumulação mitocondrial, devido ao valor negativo de  $\Delta\psi_m$ .

Considerando a equação de Nernst, a diferença é de 60 mV no  $\Delta\psi_m$  entre as células normais e as células tumorais, sendo teoricamente suficiente para uma acumulação aproximadamente dez vezes superior dos compostos catiónicos nas mitocôndrias das células tumorais relativamente às células normais. [51-53,57] O potencial de membrana plasmática ( $\Delta\psi_p$ ) também dá a sua contribuição neste processo uma vez que  $\Delta\psi_p$  oscila de -30 a -60 mV entre o espaço extracelular e o citoplasma. Desta forma há uma acumulação de espécies catiónicas no citoplasma, que conseqüentemente aumenta a disponibilidade destas espécies para a captação mitocondrial. O potencial de membrana plasmática é originado por vários factores, nomeadamente o transporte dos iões através da membrana celular e a selectividade à permeabilidade da membrana plasmática a esses iões. [50]

### 1.2.2.2. Radiofármacos em desenvolvimento e em uso clínico

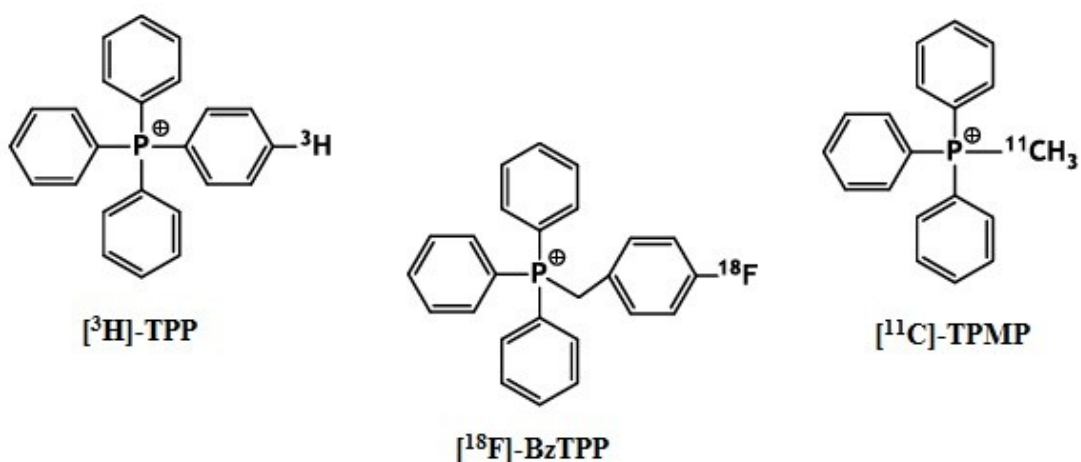
Aprovados para o uso clínico como agentes de perfusão cardíaca, os radiofármacos  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi e  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmina são catiões lipofílicos (Figura 1.7), que apresentam uma elevada captação e retenção no coração, fígado e músculos, devido ao facto das células destes órgãos se apresentarem com um elevado número de mitocôndrias. O complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi atravessa a membrana plasmática por transporte passivo devido à sua lipofilia acumulando-se nas mitocôndrias devido ao seu  $\Delta\psi_m$  mais negativo. O complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmina parece ficar mais retido no citoplasma. No entanto ambos têm sido utilizados para a detecção tumoral devido à sua elevada acumulação em células tumorais. [58,59]



**Figura 1.7.** Estruturas dos complexos  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi e  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmina.

Entretanto surgiram como alternativa ao  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi e  $^{99m}\text{Tc}$ -tetrofosmina, os catiões lipofílicos deslocalizados derivados do trifenilfosfônio, os quais têm vindo a assumir um papel de destaque na concepção de sondas radioactivas que têm como alvo as mitocôndrias de células tumorais. Temos como exemplo, o tetrafenilfosfônio (TPP) e o metiltrifenilfosfônio (TPMP) que foram marcados com diversos radionuclídeos ( $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{11}\text{C}$  e  $^3\text{H}$ ), úteis para SPECT e tomografia de emissão de positrões (Positron Emission Tomography – PET). [47,60-63]

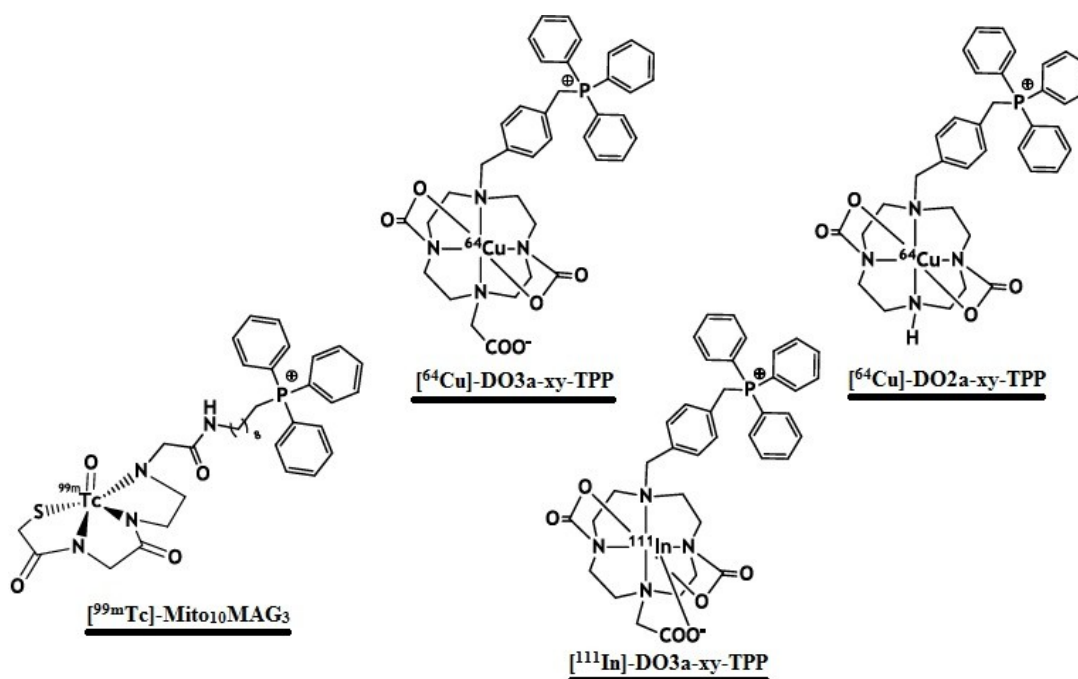
O  $^3\text{H}$ -tetrafenilfosfônio ( $^3\text{H}$ -TPP) foi um dos primeiros compostos a ser utilizado como catião lipofílico deslocalizado para a detecção tumoral (Figura 1.8). [64-66] Permitiu realizar estudos de biodistribuição em modelos animais, mas não tem o potencial de radiofármaco uma vez que o trítio é um emissor  $\beta^-$  com baixa energia e um tempo de semi-vida longo ( $t_{1/2} = 12,3$  anos). Apesar disso, apresentou resultados de biodistribuição em ratinhos normais e ratinhos com tumores induzidos com valores de captação superiores aos do  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi para o mesmo modelo animal. [66] Tais resultados conduziram a posteriores estudos com sais de fosfônio marcados com  $^{11}\text{C}$  ou  $^{18}\text{F}$ , tendo para tal sido sintetizados e avaliados os compostos  $^{11}\text{C}$ -trifenilmetilfosfônio ( $^{11}\text{C}$ -TPMP) [67,68] e o 4-( $^{18}\text{F}$ -benzil) trifenilfosfônio ( $^{18}\text{F}$ -BzTPP) (Figura 1.8). [69,70] Os estudos de biodistribuição com o composto  $^{18}\text{F}$ -BzTPP em ratinhos com tumores induzidos revelaram uma reduzida captação tumoral e uma considerável acumulação de radioactividade no coração e fígado. Com estes resultados este composto mostrou não ser útil para os objectivos traçados como radiofármaco para a detecção tumoral por PET. [71]



**Figura 1.8.** Estruturas de sondas radioactivas derivadas dos catiões lipofílicos deslocalizados de fosfônio para a detecção tumoral.

Recentemente surgiram complexos de  $^{64}\text{Cu}$  funcionalizados com catiões trifenilfosfônio para avaliação biológica (Figura 1.9). [72-76] Quando comparados com o  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi e  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Tetrofosmina, os complexos de  $^{64}\text{Cu}$  apresentaram uma captação mais selectiva pelas mitocôndrias tumorais em ratinhos atímicos com gliomas induzidos, apresentando razões tumor/coração superiores. [74] Ainda assim, estes

apresentam fixações ao nível do fígado e coração relativamente elevadas. Na avaliação biológica de complexos de  $^{111}\text{In}$  análogos (Figura 1.9) apresentam captações tumorais semelhantes. No entanto, a selectividade tumoral de complexos de  $^{111}\text{In}$  relativamente aos tecidos com um número elevado de mitocôndrias tal como o coração, é menor do que para os análogos de  $^{64}\text{Cu}$ . [72,73] Nestes estudos, é referido o carácter hidrofílico como o causador dos resultados obtidos para os complexos de  $^{64}\text{Cu}$  ( $\log P = -1,0$  a  $-3,0$ ). Assim este carácter hidrofílico origina uma maior dificuldade por parte dos complexos de  $^{64}\text{Cu}$  em transporem a membrana mitocondrial, fixando-se preferencialmente nas mitocôndrias de células tumorais que apresentam um valor de potencial de membrana mitocondrial mais elevado relativamente às células normais. [75]



**Figura 1.9.** Alguns exemplos de complexos metálicos utilizados como sondas radioactivas derivadas dos catiões fosfónio, para a detecção tumoral. [73-75,77]

Apenas recentemente se funcionalizaram dois tipos de complexos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  com derivados trifenilfosfónio. [77] O primeiro estudo relata um oxo-complexo de Tc(V) [ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]-Mito<sub>10</sub>-MAG<sub>3</sub> (Figura 1.9) cujo interesse para a imagiologia do cancro foi avaliado com o recurso a ratinhos nos quais foi induzido quimicamente cancro da mama utilizando 7,12-dimetilbenzil- $\alpha$ -antraceno (DMBA). O complexo estudado revelou uma

captação tumoral relativamente reduzida, tendo diminuído ao longo do tempo, o que se deve muito provavelmente ao efluxo ocasionado por proteínas de efluxo tais como a glicoproteína-P. No segundo estudo foram desenvolvidos complexos organometálicos de Tc(I) com derivados de trifenilfosfônio, que apresentaram valores de captação celular e mitocondrial moderados.

Os estudos com complexos funcionalizados com derivados do trifenilfosfônio como sondas radioactivas para a detecção de tumoral por SPECT é uma área de investigação que não se encontra ainda muito explorada. A investigação deste género de compostos poderá vir a ser um grande passo na oncologia nuclear, considerando a importância das mitocôndrias no fenótipo tumoral e tendo em consideração as características físicas do  $^{99m}\text{Tc}$  que são muito favoráveis como radionuclídeo para imagiologia por SPECT.

### **1.3. Radiofármacos para monitorização de resistência a múltiplos fármacos**

#### **1.3.1. Células tumorais e resistência a fármacos**

A quimioterapia é uma das formas de terapia mais importantes no tratamento da doença oncológica. No entanto, as células tumorais têm a capacidade de desenvolver resistência a fármacos e este é o maior obstáculo à eficácia das terapias que recorrem a fármacos. Com o decorrer dos tratamentos as células que por vezes inicialmente são sensíveis à terapia adquirem resistência aos mesmos. Desta forma os tratamentos perdem a sua eficácia. <sup>[78]</sup> Este fenómeno foi identificado por Dano decorria o ano de 1973, tendo sido designado por resistência a múltiplos fármacos (multidrug resistance - MDR). MDR é caracterizado pela ocorrência de resistência cruzada, ou seja, após a exposição a um determinado citotóxico as células tumorais adquirem resistência a outros agentes neoplásicos sem qualquer relação funcional ou estrutural com o inicialmente utilizado. <sup>[79]</sup>

Foram propostos vários mecanismos para tentar explicar a MDR intrínseca ou adquirida por parte das células tumorais. Destes mecanismos destaca-se a redução intracelular de citostáticos através de proteínas transmembranares dependentes de ATP, funcionando como bombas de efluxo. A primeira proteína a ser relacionada com MDR

pertencente à grande família de transportadores ABC (ATP – Binding cassette) foi a P-glicoproteína (Pgp). Esta proteína é constituída por 1280 aminoácidos com um peso molecular de 170 kDa sendo codificada pelo gene *MDR1*. Tem uma orientação transmembranar e é constituída por 2 unidades homólogas, possuindo cada uma 6  $\alpha$ -hélices transmembranares e uma região hidrofílica citosólica. Esta região serve como local de ligação de ATP. Esta proteína utiliza a energia libertada pela hidrólise da molécula de ATP para realizar a translocação do substrato através da membrana citoplasmática contra o gradiente de concentração. <sup>[80]</sup> Foram ainda identificadas como proteínas de MDR a proteína associada à multirresistência tipo 1 (MRP1) e a proteína responsável pela multirresistência do cancro da mama (BCRP). Estas proteínas estão associadas à diminuição da concentração intracelular de citostáticos e pela resistência cruzada a diferentes agentes neoplásicos. <sup>[81]</sup>

A multirresistência a fármacos pode ser ainda mediada por outros mecanismos para além da expressão de transportadores ABC, tais como a ocorrência de defeitos no processo de apoptose, a existência de mutações em genes específicos, a activação de sistemas de reparação do ADN, a perda de função supressora tumoral do gene 53, entre outros. <sup>[82]</sup>

A avaliação da MDR é de extrema importância para o planeamento terapêutico, uma vez que a selecção adequada dos doentes sensíveis à quimioterapia pode representar um aumento da eficácia terapêutica. Permite evitar efeitos tóxicos secundários associados à utilização dos citostáticos e uma melhor gestão de recursos financeiros associados a estas terapias. <sup>[83]</sup>

A expressão dos transportadores ABC nas células tumorais é avaliada através de técnicas da Biologia Molecular. Estas técnicas permitem determinar os níveis de expressão dos genes pela reacção em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction) e por análise da expressão de proteínas através da técnica Western Blot. Estas técnicas não fornecem informação sobre a actividade funcional dos genes, apenas relativamente à sua expressão. Os resultados são muitas das vezes pouco fiáveis quando os níveis de expressão são reduzidos e quando ocorrem reacções cruzadas entre anticorpos, apresentando baixa sensibilidade e especificidade. Por outro lado, são realizadas *ex vivo* com o recurso a amostras de tecidos tumorais recolhidos através de biópsias, sujeitando os doentes a sucessivos procedimentos invasivos.

### 1.3.2. Detecção *in vivo* de MDR

A utilização de técnicas de imagiologia nuclear permite a detecção *in vivo* não invasiva do fenótipo MDR em tumores. Estas técnicas têm sido estudadas e propostas como alternativa às técnicas referidas no parágrafo anterior. As técnicas SPECT e PET podem ser utilizadas para avaliar a MDR *in vivo*, analisando a captação de compostos radioactivos por parte das células tumorais dos tecidos ou órgãos. [84]

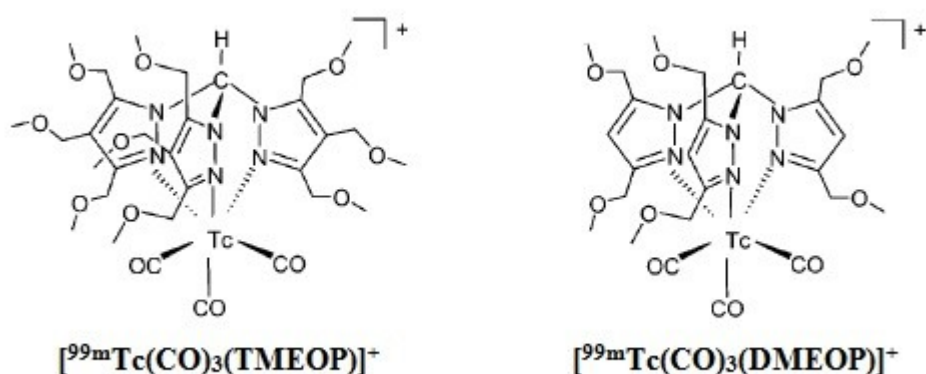
Os radiofármacos utilizados actualmente para estudos de perfusão do miocárdio  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi e  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmina podem também ser utilizados para estudar a MDR *in vivo*. Estudos realizados em modelos celulares demonstram que a cinética destes compostos é influenciada pela expressão dos transportadores ABC, assim sendo a sua captação e retenção celular poderá permitir inferir informação relativa ao estado de resistência das células tumorais aos agentes neoplásicos. Como já descrito, estes complexos são utilizados para perfusão do miocárdio e apesar de possuírem propriedades radiofarmacêuticas adequadas, apresentam uma elevada captação hepatobiliar que pode interferir na análise imagiológica, quer a nível cardíaco como tumoral.

Como tal, nos últimos anos tem-se recorrido a radioisótopos de  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{67/68}\text{Ga}$  e  $^{64}\text{Cu}$  para criar novas sondas para SPECT e PET de modo a avaliar a MDR. Têm sido testados novos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  na tentativa de obter uma especificidade mais elevada para as células tumorais assim como para melhorar as razões órgão/alvo. [60]

O  $^{99m}\text{Tc}$  tem sido o radionuclídeo mais utilizado em complexos em 3 estados de oxidação +1, +3 e +5.

Vários grupos de investigação prepararam complexos catiónicos e lipofílicos tricarbonilo de  $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$  partindo da unidade  $\text{fac}-[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  para os avaliarem como potenciais sondas para a obtenção de imagens do miocárdio. Tendo provavelmente como base o seu perfil biológico e de fixação cardíaca, e foi também ponderada a possível utilidade destes compostos para a avaliação funcional da MDR. [60]

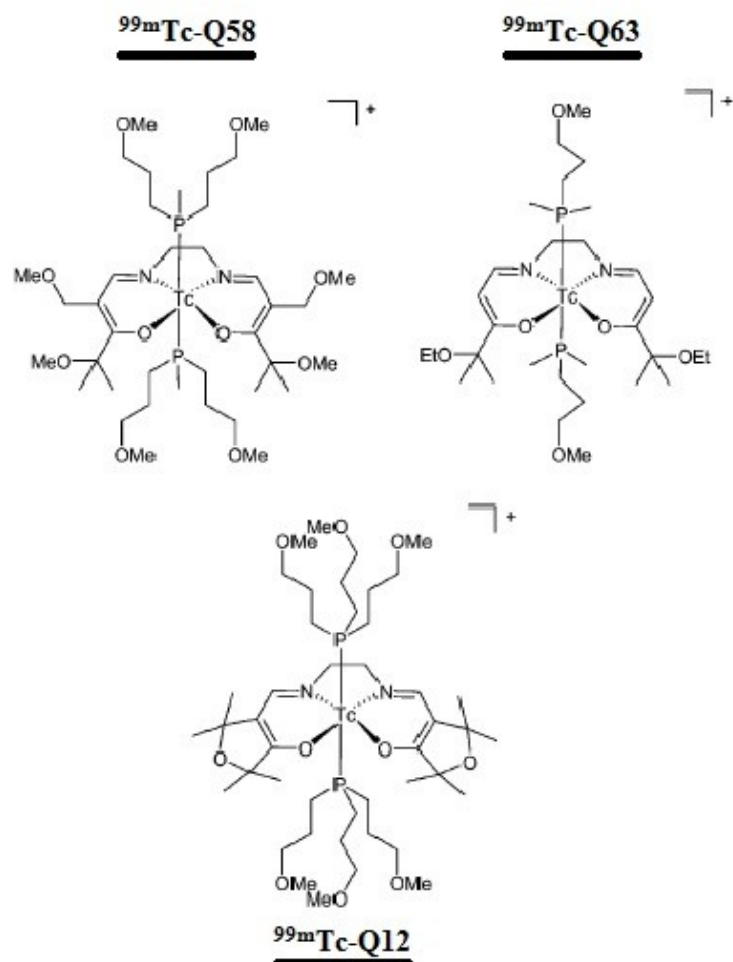
Recentemente o Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas do C2TN liderado pela Professora Doutora Isabel Rego Santos tem realizado diversos estudos com complexos catiónicos de tricarbonilo baseados em ligandos de pirazolo com o intuito de obter sondas para perfusão cardíaca.



**Figura 1.10.** Estruturas dos complexos  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{DMEOP})]^+$  e  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{TMEOP})]^+$ . <sup>[60]</sup>

Tendo como estrutura de partida o complexo tricarbonilo tris(pirazolil)metano  $\text{fac}-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{k}^3\text{-HC}(\text{pz})_3)]^+$ , foi preparada uma família de complexos por funcionalização do quelato tris(pirazolil)metano com diferentes grupos éter. Destes complexos destacam-se os que foram utilizados neste trabalho  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{DMEOP})]^+$  e  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{TMEOP})]^+$  (Figura 1.10).

Complexos de Tc(III), estabilizados por diferentes bases de Schiff e fosfinas hidrofóbicas foram também caracterizados e avaliados como agentes de perfusão cardíaca. O principal composto desta família é o Tc(III) (Q12), conhecido como  $^{99m}\text{Tc}$ -Furifosmina (Figura 1.11). A partir do  $^{99m}\text{Tc}$ -Q12 foram preparados outros 38 compostos com variantes estruturais com o recurso às bases de Schiff e fosfinas com diferentes grupos de substituintes. <sup>[60]</sup>



**Figura 1.11.** Estrutura química do complexos  $^{99m}\text{Tc-Q12}$ , e exemplos de alguns outros da sua série de tais como  $^{99m}\text{Tc-Q58}$  e  $^{99m}\text{Tc-Q63}$ . [60]

A acumulação do  $^{99m}\text{Tc-Q12}$  apresenta algumas semelhanças com o  $^{99m}\text{Tc-Sestamibi}$  e  $^{99m}\text{Tc-Tetrofosmina}$ . Após os estudos efectuados os investigadores concluíram que este composto era adequado para a obtenção de informação sobre o fenótipo MDR: Outros trabalhos foram desenvolvidos nesta área com oxocomplexos de Tc(V) e ainda complexos nitrído de Tc(V) para estudos de MDR. [60]



# ***CAPÍTULO 2***

## *Resultados*



## 2.1. Estudos *in vitro* em linhas celulares

Nesta secção apresentam-se os estudos de captação *in vitro* em linhas celulares tumorais humanas MCF-7, PC-3, A-2780, MDA-MB 231, Hela e A-431. Foi estudada também uma linha resistente a múltiplos fármacos, MCF-7 Pgp, assim como a linha celular não tumoral HEK.

Foram testados os complexos organometálicos catiónicos e lipofílicos de  $^{99m}\text{Tc(I)}$ ,  $^{99m}\text{Tc-TMEOP}$  e  $^{99m}\text{Tc-DMEOP}$ , para avaliação do seu potencial interesse no diagnóstico tumoral e como sondas para avaliação de fenótipo de resistência a múltiplos fármacos. Estes dois complexos contêm a unidade *fac*- $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  estabilizada por ligandos tridentados derivados do pirazolo. Utilizaram-se ainda os complexos  $^{99m}\text{Tc-Sestamibi}$  (estado de oxidação +1) <sup>[1]</sup> e  $^{99m}\text{Tc-Tetrofosmina}$  (estado de oxidação +5), pois estes complexos são actualmente utilizados na prática clínica de diagnóstico.

A avaliação do efeito do potencial de membrana plasmática e do potencial de membrana mitocondrial na captação celular, descrita na sub-secção 2.1.3, teve como objectivo avaliar os mecanismos de transporte envolvidos na captação celular dos complexos em estudo. <sup>[51-53,57]</sup>

### 2.1.1. Avaliação da captação celular em linhas tumorais

Efectuaram-se ensaios de captação celular, nas seguintes linhas celulares tumorais humanas: MCF-7 (cancro da mama), MCF-7 Pgp (cancro da mama, com sobre-expressão da glicoproteína-P) (ver secção 2.1.2), PC-3 (cancro da próstata), MDA-MB 231 (cancro da mama, dependente de estrogénios), A-2780 (cancro do ovário), A-2780 cis-R (cancro do ovário, resistente à cisplatina), Hela (cancro cervical), A-431 (carcinoma da epiderme da vulva), assim como numa linha celular não cancerígena HEK (células embrionárias do rim).

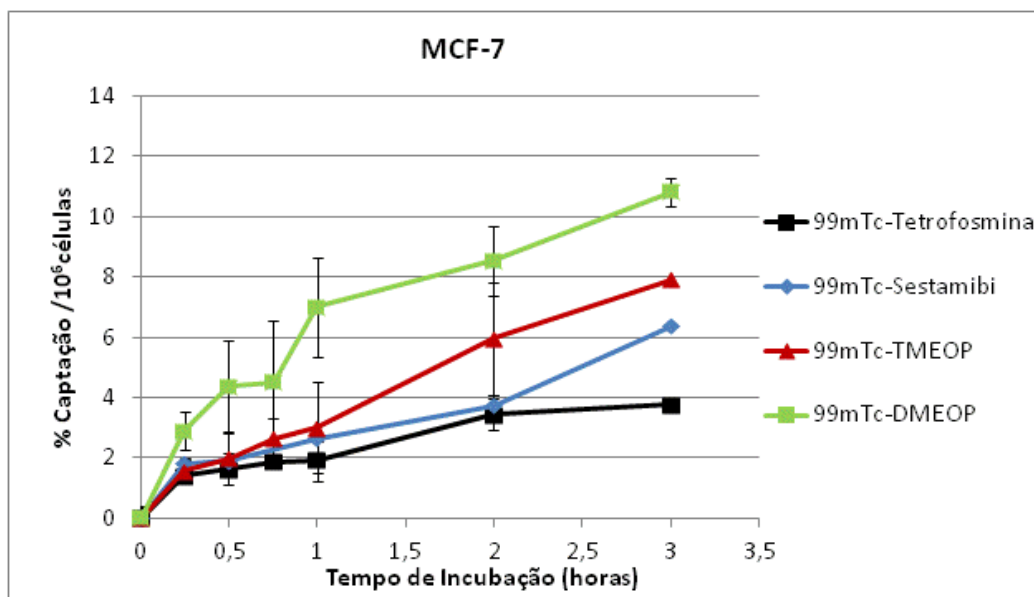
Em todas estas linhas celulares foram estudados os complexos  $^{99m}\text{Tc-DMEOP}$  e  $^{99m}\text{Tc-TMEOP}$ ; para além destes utilizaram-se ainda os complexos  $^{99m}\text{Tc-Tetrofosmina}$  e  $^{99m}\text{Tc-Sestamibi}$  apenas em algumas linhas celulares. A tabela 2.1 resume as linhas celulares e os complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  utilizados.

**Tabela 2.1:** linhas celulares versus complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  estudados.

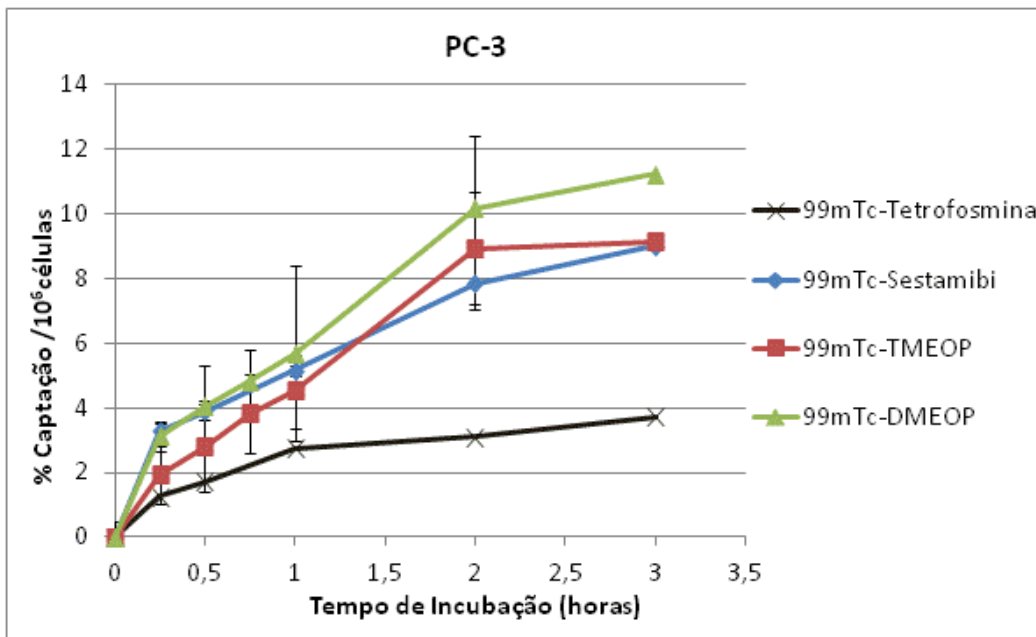
	$^{99m}\text{Tc-}$			
	<i>-DMEOP</i>	<i>-TMEOP</i>	<i>-Tetrofosmina</i>	<i>-Sestamibi</i>
<i>MCF-7</i>	X	X	X	X
<i>MCF-7 Pgp*</i>	X	X	X	X
<i>PC-3</i>	X	X	X	X
<i>MDA-MB 231</i>	X	X		
<i>A-2780</i>	X	X		
<i>A-2780 cisR</i>	X	X		
<i>HeLa</i>	X	X		
<i>A-431</i>	X	X		
<i>HEK</i>	X	X		

\* Esta linha celular será abordada na secção 2.1.2.

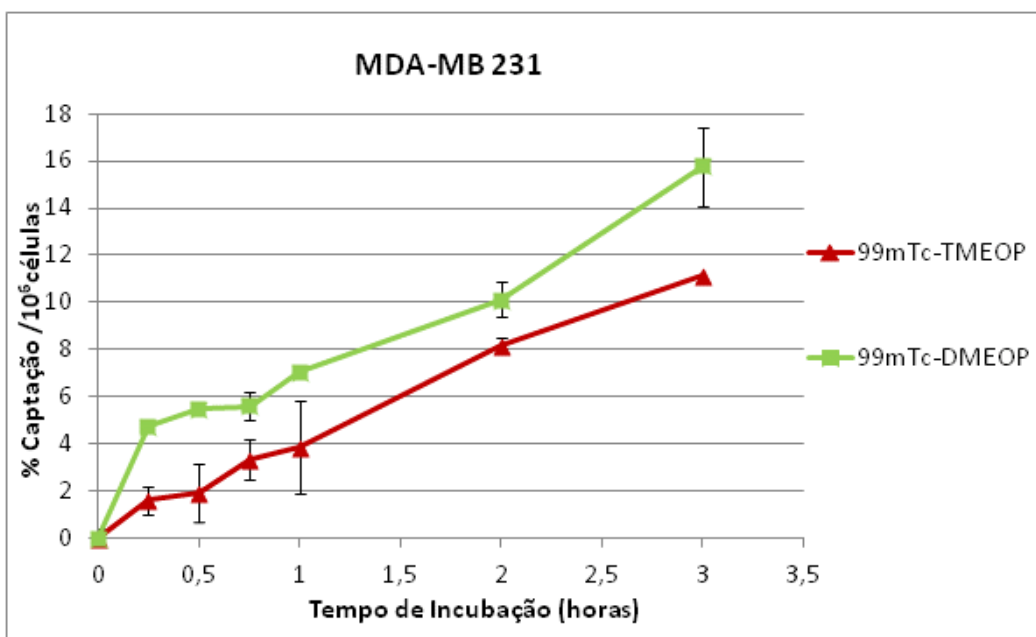
Nas figuras seguintes (Figuras 2.1 a 2.8), apresentam-se os gráficos das cinéticas de captação por milhão de células, obtidos para cada uma das linhas celulares com os respectivos complexos.



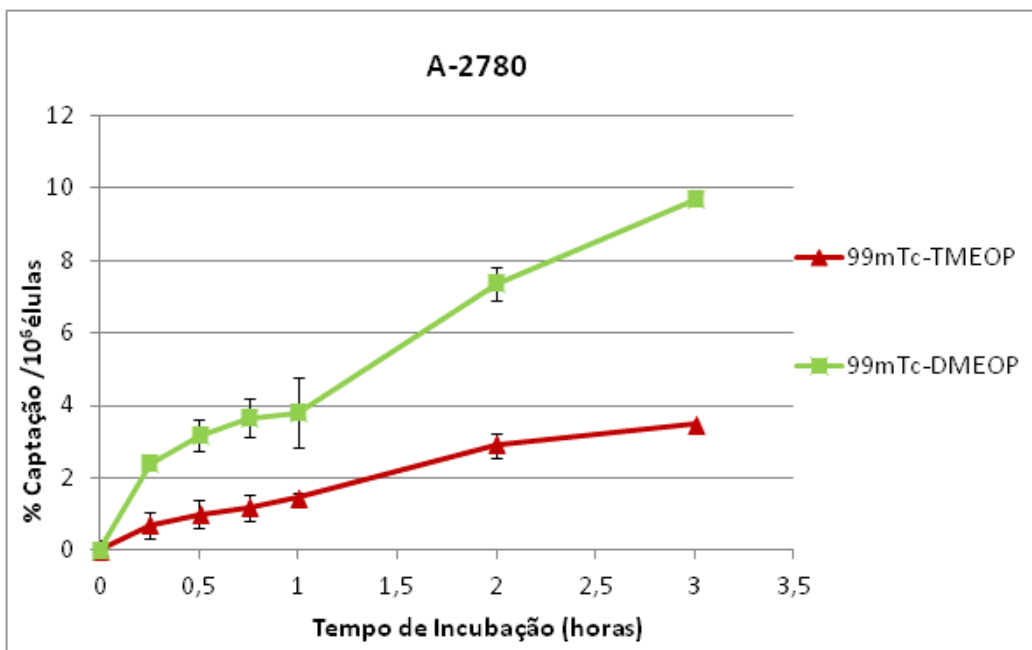
**Figura 2.1:** Cinética de captação por milhão de células para os complexos  $^{99m}\text{Tc-DMEOP}$ ,  $^{99m}\text{Tc-TMEOP}$ ,  $^{99m}\text{Tc-Tetrofosmina}$  e  $^{99m}\text{Tc-Sestamibi}$ , na linha celular MCF-7.



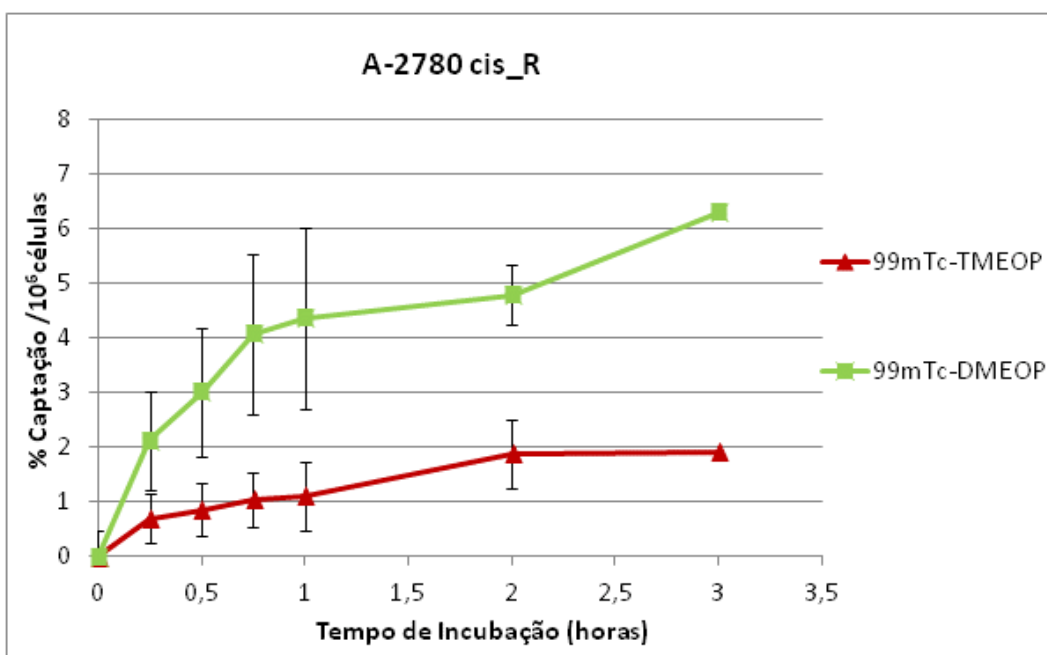
**Figura 2.2:** Cinética de captação por milhão de células para os complexos  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP,  $^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP,  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmina e  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi na linha celular PC-3.



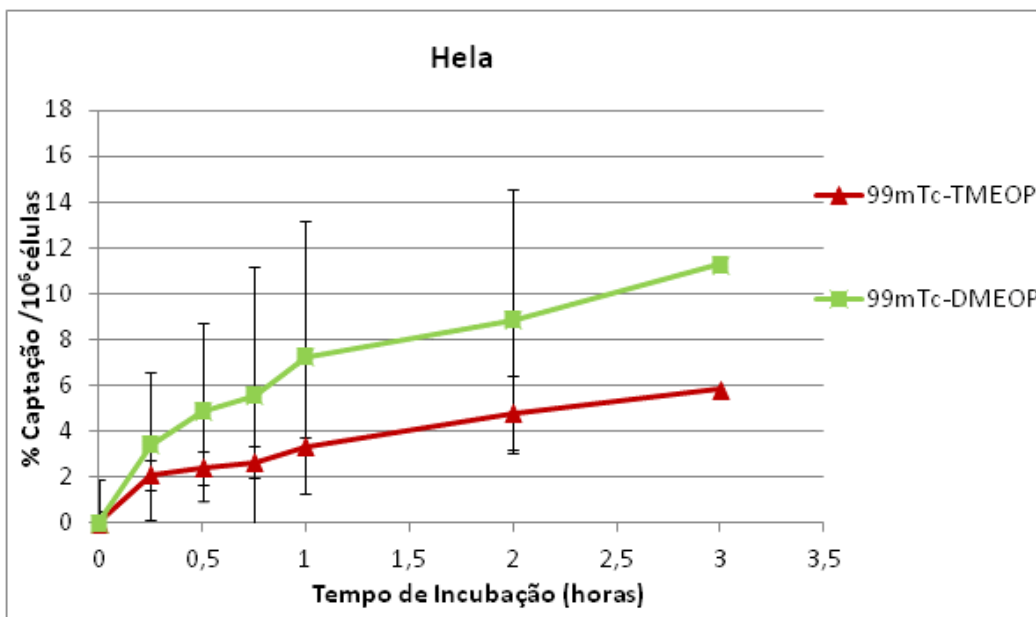
**Figura 2.3:** Cinética de captação por milhão de células para os complexos  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP e  $^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP na linha celular MDA-MB 231.



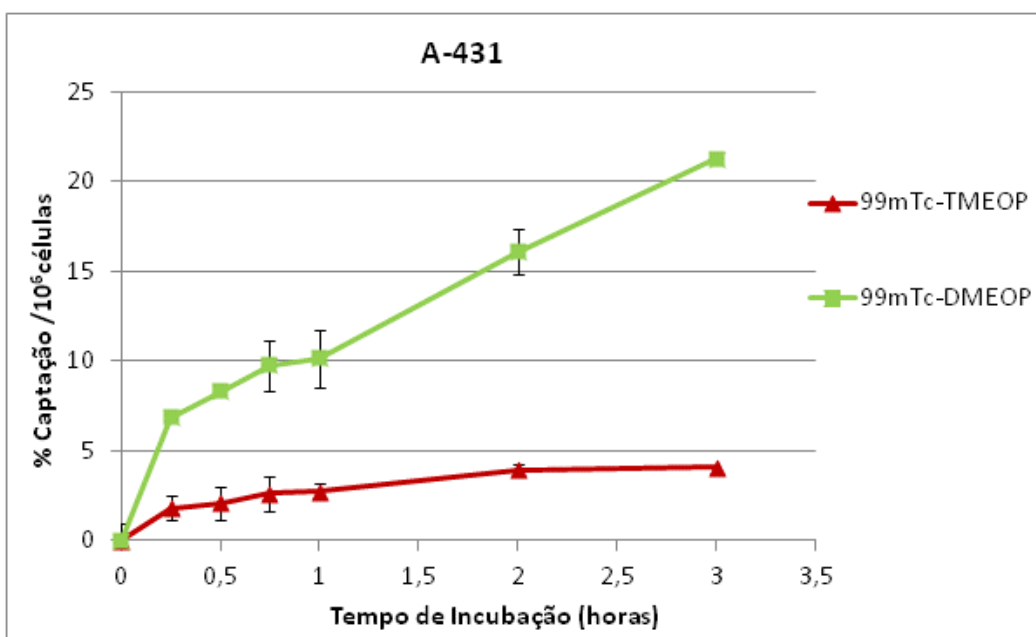
**Figura 2.4:** Cinética de captação por milhão de células para os complexos  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP e  $^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP na linha celular A-2780.



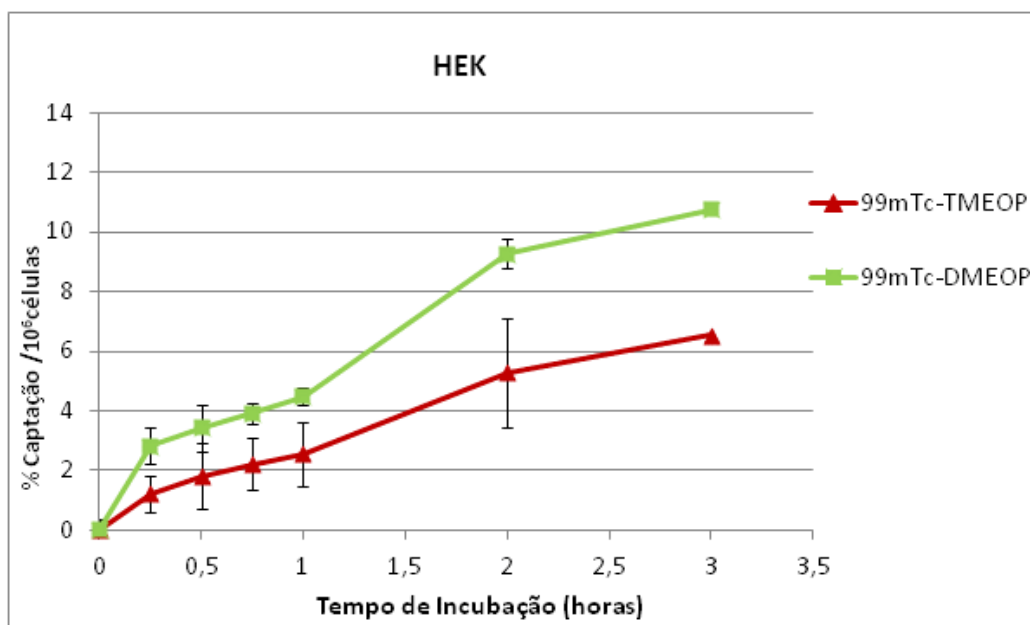
**Figura 2.5:** Cinética de captação por milhão de células para os complexos  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP e  $^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP na linha celular A-2780 cisR.



**Figura 2.6:** Cinética de captação por milhão de células para os complexos  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP e  $^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP na linha celular Hela.



**Figura 2.7:** Cinética de captação por milhão de células para os complexos  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP e  $^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP na linha celular A-431.



**Figura 2.8:** Cinética de captação por milhão de células para os complexos  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP e  $^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP na linha celular HEK.

Na linha celular MCF-7 (Figura 2.1) os complexos  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP e  $^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP apresentaram valores moderadamente elevados de captação, principalmente para o primeiro que se destacou com uma captação aproximadamente 2% mais elevada do que o segundo. Em relação aos complexos actualmente utilizados na prática clínica, nesta linha celular a  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmina apresentou a taxa mais baixa de captação, apesar da evolução na primeira hora ter sido bastante similar ao  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi.

Na linha celular PC-3 (Figura 2.2), o complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmina, apresentou uma vez mais a taxa de captação mais reduzida, enquanto o  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi, apresenta um comportamento semelhante ao  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP, até à 1ª hora (com valores apenas ligeiramente mais reduzidos). Tal como ocorreu para a linha celular MCF-7 este último complexo apresenta os valores de captação mais elevados. A partir da 2ª hora o  $^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP surgiu como o 2º complexo com a maior taxa de captação.

Considerando a taxa de captação por milhão de células para os 4 complexos nas 2 primeiras linhas celulares apresentadas, pode concluir-se que o que apresentou maior captação é indiscutivelmente o  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP, seguido do  $^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP e  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi, tendo o complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmina a mais reduzida taxa de captação.

Na linha celular, MDA-MB 231 (Figura 2.3), em que apenas se utilizaram os  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP e  $^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP, o primeiro complexo apresentou uma taxa de captação mais elevada, quando comparado com  $^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP.

Quando se comparam as taxas de captação na linha celular A-2780 (Figura 2.4), com a linha semelhante mas resistente à cisplatina (Figura 2.5), nesta última verificaram-se taxas de captação inferiores para os vários complexos estudados. A variante da linha celular A-2780 resistente à cisplatina, apresenta entre outras propriedades a capacidade de efluxo da cisplatina, e ainda a capacidade de reparação de lesões originadas por esta no ADN celular. [85]

Na linha celular Hela (Figura 2.6) as taxas de captação dos 2 complexos foram semelhantes às restantes linhas celulares estudadas, com as diferenças características na captação dos 2 complexos. O desvio padrão poder-se-á dever ao facto de haver apenas 2 ensaios que se apresentaram divergentes. No entanto, num deles ter-se-á eliminado células durante o procedimento de remoção do meio de cultura, o que levou à redução do número de células no ensaio.

Na linha celular HEK (Figura 2.8) os complexos  $^{99m}\text{Tc-DMEOP}$  e  $^{99m}\text{Tc-TMEOP}$  apresentaram uma taxa de captação elevada, semelhante à verificada nas linhas celulares tumorais. Este resultado poderá ser devido ao facto de esta linha HEK apesar não ser de origem tumoral, ser embrionária e por isso ter também um metabolismo muito activo.

Em resumo, das linhas celulares estudadas, salientam-se as taxas de captação relativamente baixas para ambos os complexos, observadas na linha A-2780 cisR (Figura 2.5), quando comparada com as restantes linhas celulares. As linhas em que se verificaram as taxas de captação mais elevadas para o complexo  $^{99m}\text{Tc-DMEOP}$  foram a A-431 (Figura 2.7) e MDA MB 231 (Figura 2.3), com valores às 3 horas de  $21,27\% \pm 1,25$  e  $15,78\% \pm 0,74$ , respectivamente.

De um modo geral o complexo  $^{99m}\text{Tc-DMEOP}$  apresentou-se como o complexo com maior potencial para a detecção tumoral pois é o que revelou as mais elevadas taxas de captação em todas as linhas celulares estudadas.

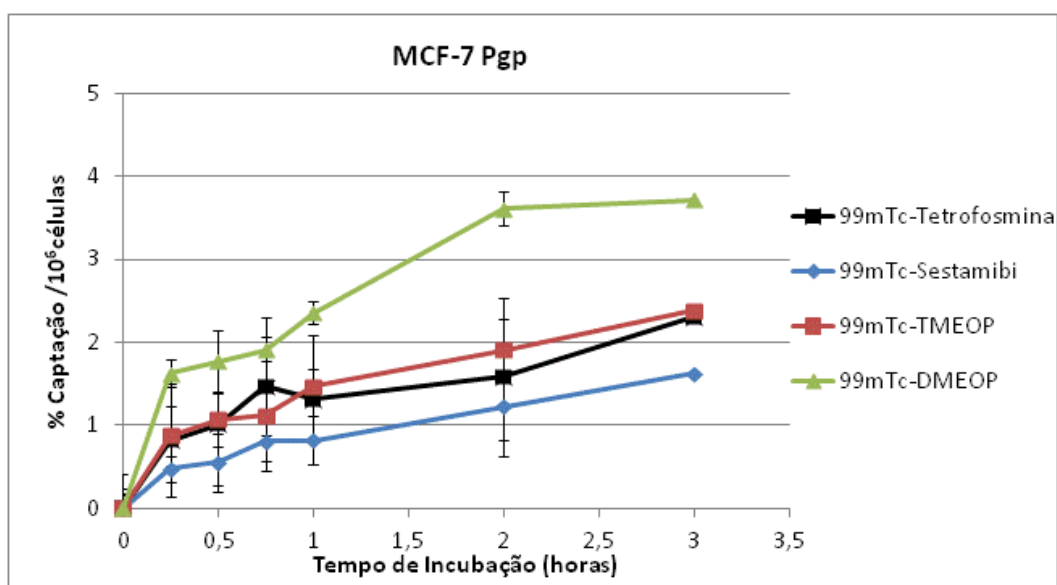
Os complexos estudados apresentam todos carga positiva (catiónicos) [60], e deste modo a lipofilia poderá ser um factor importante para explicar as diferenças observadas na sua captação por células tumorais. O  $\log P$  do complexo  $^{99m}\text{Tc-TMEOP}$  é  $0,61 \pm 0,04$  e do  $^{99m}\text{Tc-Sestamibi}$   $1,29 \pm 0,15$  [84,86], no entanto apesar deste último apresentar um valor superior de lipofilia, não se verificaram taxas de captação superiores para ele nas linhas celulares testadas. A excepção verificou-se na linha celular PC-3, observando-se valores ligeiramente mais elevados para o  $^{99m}\text{Tc-Sestamibi}$ , apenas na primeira hora e

meia. A lipofilia do  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP é  $0,58 \pm 0,013$  [86], sendo o complexo cuja taxa de captação é superior em todas as linhas celulares estudadas. O valor mais reduzido em termos de lipofilia é 0,5 [86] para o complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmina, o que poderá explicar as reduzidas taxas de captação celular obtidas para este complexo.

### 2.1.2. Avaliação da captação celular em linhas tumorais resistentes a múltiplos fármacos

A resistência a múltiplos fármacos é responsável pela falta de resposta de tumores a uma gama alargada de agentes quimioterapêuticos. A sua avaliação *in vivo* através da monitorização do fenótipo da resistência a múltiplos fármacos com o recurso a sondas radioactivas é de extremo interesse. Deste modo avaliou-se a utilidade dos complexos  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP e  $^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP para a monitorização funcional de resistência a múltiplos fármacos.

Selecionou-se a linha celular MCF-7 Pgp, de origem tumoral com resistência a múltiplos fármacos para avaliar as taxas de captação dos complexos. Esta linha celular apresenta como principal característica a sobre-expressão da glicoproteína-P, responsável pelo efluxo de fármacos e outros compostos exógenos.



**Figura 2.9:** Cinética de captação por milhão de células dos complexos  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP,  $^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP,  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmina e  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi, na linha celular MCF-7 Pgp.

Os resultados obtidos para a linha celular MCF-7 Pgp evidenciaram percentagens de captação reduzidas para todos os complexos estudados. De notar que o  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi e  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmina apresentaram valores muito reduzidos, quando comparados com os outros dois complexos. Observou-se uma vez mais que o complexo que apresenta a taxa de captação mais elevada é o  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP.

Os valores obtidos para as células MCF-7 Pgp, são mais reduzidos do que os obtidos para a mesma linha sem a sobre-expressão da Pgp. Como exemplo verificou-se uma captação às 3 horas para o complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP de  $3,72\% \pm 0,20$  para a linha celular MCF-7 Pgp, e de  $10,83\% \pm 1,15$  para a MCF-7.

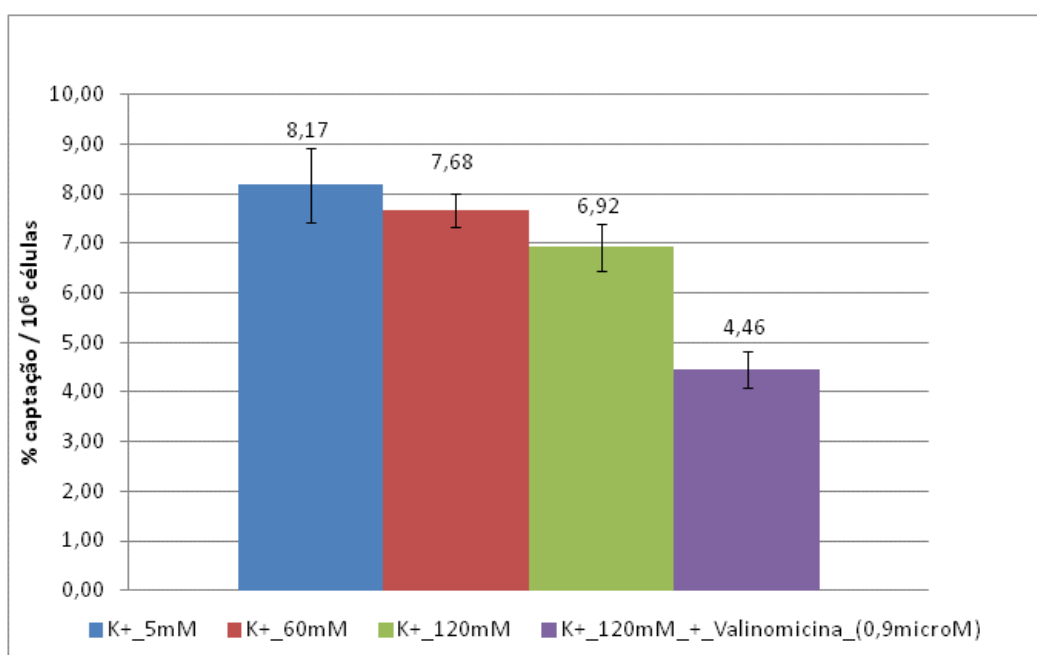
### **2.1.3. Avaliação do efeito do potencial de membrana plasmática e do potencial de membrana mitocondrial na captação celular**

Como referido na introdução os catiões lipofílicos tendem a ser captados pelas células tumorais devido ao potencial negativo da membrana plasmática ( $\Delta\psi_p$ ). Este potencial negativo, que é gerado principalmente pelo movimento de iões  $\text{K}^+$  do citoplasma para o espaço extracelular através dos canais de  $\text{K}^+$ , favorece a acumulação destes catiões lipofílicos no citoplasma aumentando desta a forma a disponibilidade destes para a captação mitocondrial. Por outro lado, é também conhecido que o potencial negativo da membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) das células tumorais é superior ao das células normais, devido às exigências energéticas superiores das primeiras.

Para a avaliação do efeito do  $\Delta\psi_p$  e  $\Delta\psi_m$  na captação celular dos complexos estudados e de forma a obter alguma informação adicional sobre os mecanismos de captação celular, utilizaram-se como modelos a linha celular MCF-7 e o  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP. Assim realizaram-se ensaios nos quais foram provocadas alterações e em alguns casos o colapso dos potenciais  $\Delta\psi_p$  e  $\Delta\psi_m$ .

Recorreu-se primeiramente a ensaios que permitiram diminuir de uma forma gradual o  $\Delta\psi_p$ . Para tal, incubaram-se as células MCF-7 em meios de cultura com

concentrações crescentes de  $K^+$  (5, 60 e 120 mM). Considerou-se como normal uma concentração extracelular (i.e. no meio de cultura) de  $K^+$  5 mM. Na presença de uma concentração 120 mM de  $K^+$  estabelece-se um equilíbrio entre a concentração interna e externa de  $K^+$  o que origina a despolarização da membrana plasmática. Para a concentração 120 mM de  $K^+$ , o estudo foi também efectuado na presença de valinomicina. A valinomicina é um iónoforo (molécula com elevada solubilidade em lípidos, que permite o transporte de iões através da membrana celular) de  $K^+$ , que aumenta a permeabilidade da membrana ao  $K^+$ . Para concentrações elevadas de  $K^+$  no meio extracelular o  $\Delta\psi_p$  deve ser próximo de zero. Desta forma, a adição da valinomicina não altera o  $\Delta\psi_p$ , mas leva sim ao colapso do  $\Delta\psi_m$  devido ao desacoplamento da cadeia de transporte de electrões associado à fosforilação oxidativa. [49,71,87-93]



**Figura 2.10:** Captação celular por milhão de células do complexo  $^{99m}\text{Tc-DMEOP}$  na linha celular MCF-7, em soluções tampão ( $\text{pH}\approx 7,4$ ) com diferentes concentrações de  $K^+$  e ainda na presença da valinomicina, ao fim de 1 h.

Observou-se que à medida que a concentração do ião  $K^+$  no meio extracelular aumenta, a captação do complexo diminuiu cerca de 15%, de  $8,17\% \pm 0,75$  para  $6,92\% \pm 0,48$ . Com a adição da valinomicina o efeito observado é a redução da taxa de captação para quase metade da taxa observada para 5 mM, de  $8,17\% \pm 0,75$  para  $4,46\%$

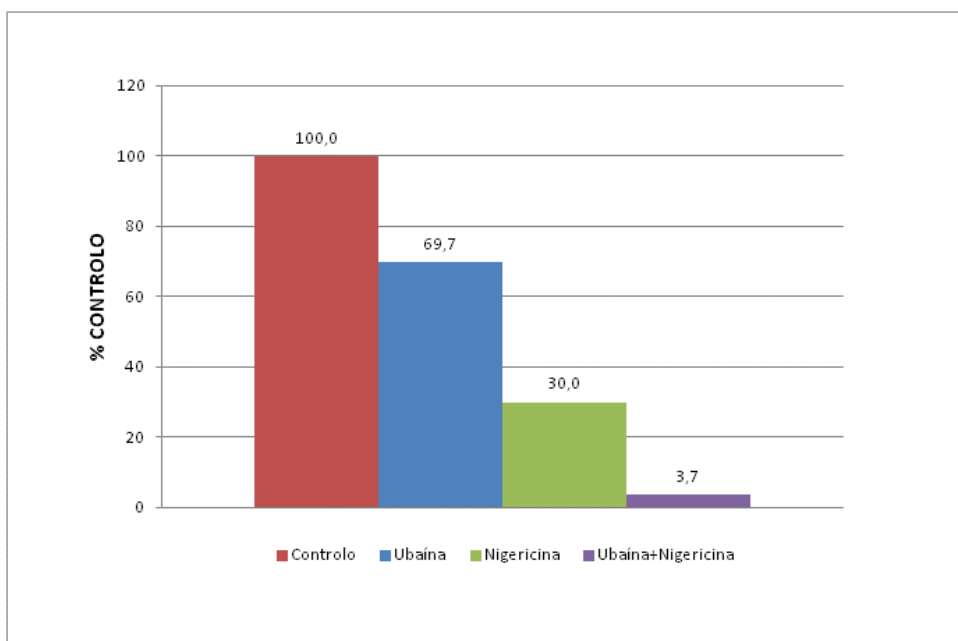
$\pm 0,36$ . Esta observação sugere que o  $\Delta\psi_m$  é também um factor importante na captação celular deste complexo.

Numa segunda fase realizaram-se ensaios em que foram efectuados estudos de captação celular em meio de cultura com os iónoforos nigericina, ubaína e com o CCCP (carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona), com o objectivo de avaliar a contribuição do  $\Delta\psi_p$  e do  $\Delta\psi_m$  na captação do complexo.

A nigericina permite a substituição electricamente neutra do  $K^+$  por  $H^+$ , conduzindo ao colapso do gradiente de  $H^+$  da membrana mitocondrial interna e à hiperpolarização da mesma. Este ionóforo causa também a hiperpolarização da membrana plasmática.<sup>[94]</sup> Juntamente com a nigericina, adicionou-se ubaína ao meio de cultura com o intuito de eliminar a hiperpolarização da membrana plasmática, pois inibindo o mecanismo de transporte activo associado à bomba  $Na^+/K^+$ , ocorre um aumento da concentração intracelular de  $Na^+$  e a alteração da permeabilidade da membrana plasmática a iões.<sup>[95,96]</sup>

O inibidor CCCP inibe a fosforilação oxidativa, por desacoplamento do gradiente de prótons ao longo da membrana mitocondrial interna, consequentemente conduz ao colapso do potencial de membrana mitocondrial.<sup>[97]</sup>

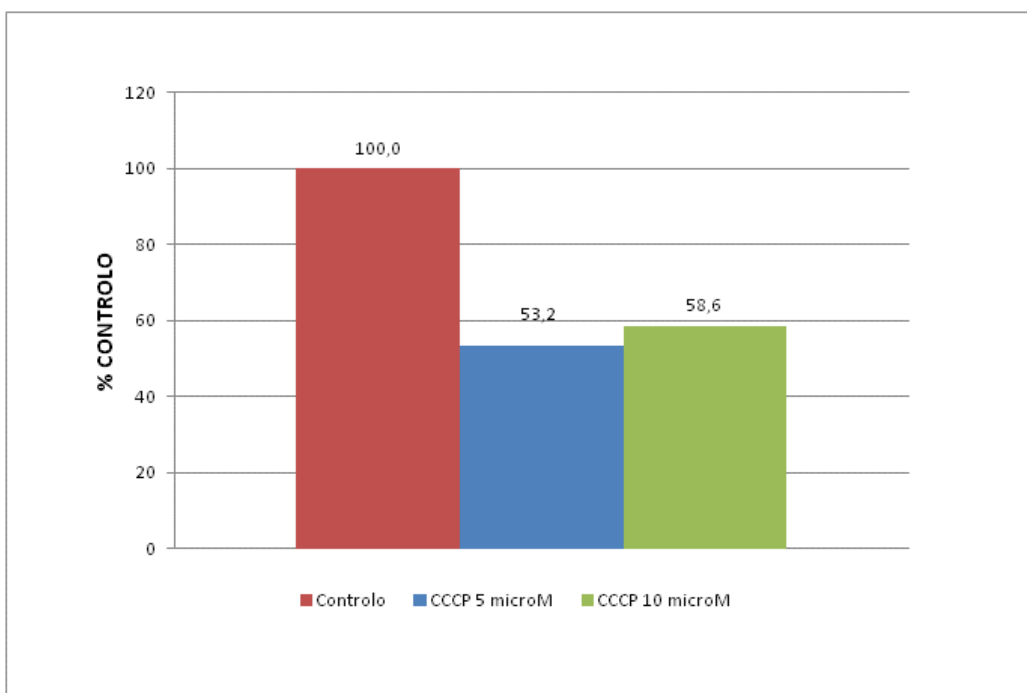
Amiloride, cloroquina e quinacrina têm como principal acção a inibir a acidificação. Amiloride tem como principal campo de acção os canais de  $Na^+$  que são os responsáveis pelo transporte dos iões  $Na^+/H^+/K^+$  inibindo a isoforma da bomba de  $Na^+/H^+$ .<sup>[98,99]</sup> Cloroquina e quinacrina a sua acção é ao nível dos canais catiónicos de  $Ca^{2+}$  e  $Na^+$  da membrana plasmática, o que altera a cinética de penetração por exemplo do  $K^+$  para o meio intracelular.<sup>[100]</sup> A cloroquina para além de actuar ao nível dos canais catiónicos também promove a plasmólise, ou seja a saída de  $H_2O$  para meio extracelular.



**Figura 2.11:** Percentagem de captação celular do complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP na linha celular MCF-7 relativamente ao controlo, após incubação de 1 hora com ubaína, ubaína+nigericina e nigericina

A adição da nigericina (Figura 2.11) diminuiu acentuadamente a captação celular cerca de 70% relativamente ao controlo. Este resultado não se encontra dentro do esperado, pois o efeito combinado da hiperpolarização mitocondrial e da hiperpolarização da membrana plasmática deveria levar a um aumento da captação do complexo.

Na presença de nigericina, a adição da ubaína, que elimina apenas a hiperpolarização da membrana plasmática, levou a uma diminuição da captação celular de cerca de 96% relativamente ao controlo. Quando foi apenas adicionada ubaína também se verificou uma redução na captação celular relativamente ao controlo em cerca de 30%.



**Figura 2.12:** Percentagem de captação celular do complexo  $^{99m}\text{Tc-DMEOP}$  na linha celular MCF-7 relativamente ao controlo, após incubação de 1 hora com CCCP 5  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ .

A adição de CCCP numa concentração de 5  $\mu\text{M}$  levou a uma diminuição da captação celular em cerca de 47% relativamente ao controlo e a adição de 10  $\mu\text{M}$  levou a uma redução na captação celular em cerca de 41%, o que é consistente com o facto de existir contribuição do  $\Delta\psi\text{m}$  na captação celular do composto (Figura 2.12).

Os modeladores, amiloride cloroquina e quinacrina, apresentaram taxas de captação aproximadamente idênticas às do grupo de controlo, não se revelando importantes neste estudo apesar das suas propriedades.

## 2.2. Estudos *in vivo* em pequenos roedores

Após os estudos de avaliação da captação em linhas celulares em cultura (*in vitro*), procedeu-se ao estudo em modelos animais (pequenos roedores), onde é possível obter informação relativamente à biocinética dos complexos num modelo biológico com as interações complexas inerentes a um sistema vivo em pleno funcionamento.

Estes estudos permitem obter informação sobre o perfil farmacocinético dos complexos em estudo através da sua distribuição nos órgãos principais em função do

tempo pós-administração assim como da determinação das taxas de fixação e de eliminação da circulação sanguínea e dos órgãos ou tecidos alvo. Permitem ainda determinar a estabilidade *in vivo* dos compostos no modelo animal utilizado.

### 2.2.1. Modelo animal

De modo a poder efectuar os estudos de biodistribuição, desenvolveu-se um modelo de xenotransplante em ratinhos fêmea imunodeficientes da estirpe BALB/c nu/nu da Charles River (Figura 2.13), Esta é uma estirpe adequada para a indução de tumores a partir das linhas celulares de carcinoma de origem humana anteriormente estudadas MCF-7, MCF-7 Pgp e MDA-MB 231. Os tumores foram induzidos por inoculação subcutânea de uma suspensão celular na região dorsal dos ratinhos (tal como se descreve na secção 4.3.1) com 5 a 6 semanas de idade e com peso variável na ordem dos 12 g - 14 g. Após 3 a 4 semanas os tumores tornaram-se bem evidentes permitindo a realização dos ensaios de biodistribuição. Quando se efectuaram os ensaios o peso dos ratinhos variava entre os 15 g e os 21 g. A massa tumoral variava entre as dezenas de miligrama e as centenas de miligrama, sendo os tumores de peso mais elevado os da linha celular MDA-MB 231. Todos os procedimentos que envolveram a manipulação dos ratinhos foram realizados por investigadores e técnicos devidamente acreditados e de acordo com a legislação europeia em vigor que estabelece as normas éticas de protecção e bem estar animal durante toda a experimentação.



**Figura 2.13:** Ratinho fêmea da estirpe BALB/c nu/nu com tumor induzido na região dorsal, 4 semanas após inoculação.

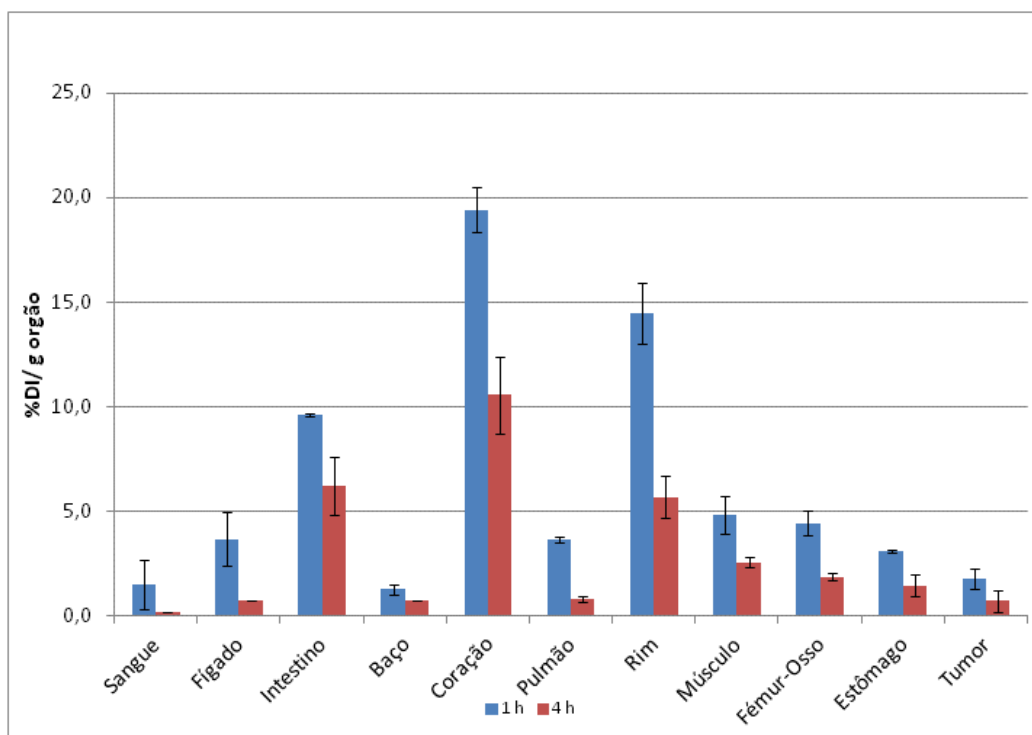
### 2.2.2. Biodistribuição e captação tumoral

A biodistribuição foi realizada, como referido anteriormente, em ratinhos fêmea imunodeficiente BALB/c nu/nu, por administração endovenosa na veia da cauda do complexo radioactivo  $^{99m}\text{Tc-TMEOP}$ , nos quais foram previamente induzidos xenotransplantes das linhas celulares MCF-7, MCF-7 Pgp e MDA-MB 231. Efectuaram-se os estudos de biodistribuição 1 hora e 4 horas após injeção do composto.

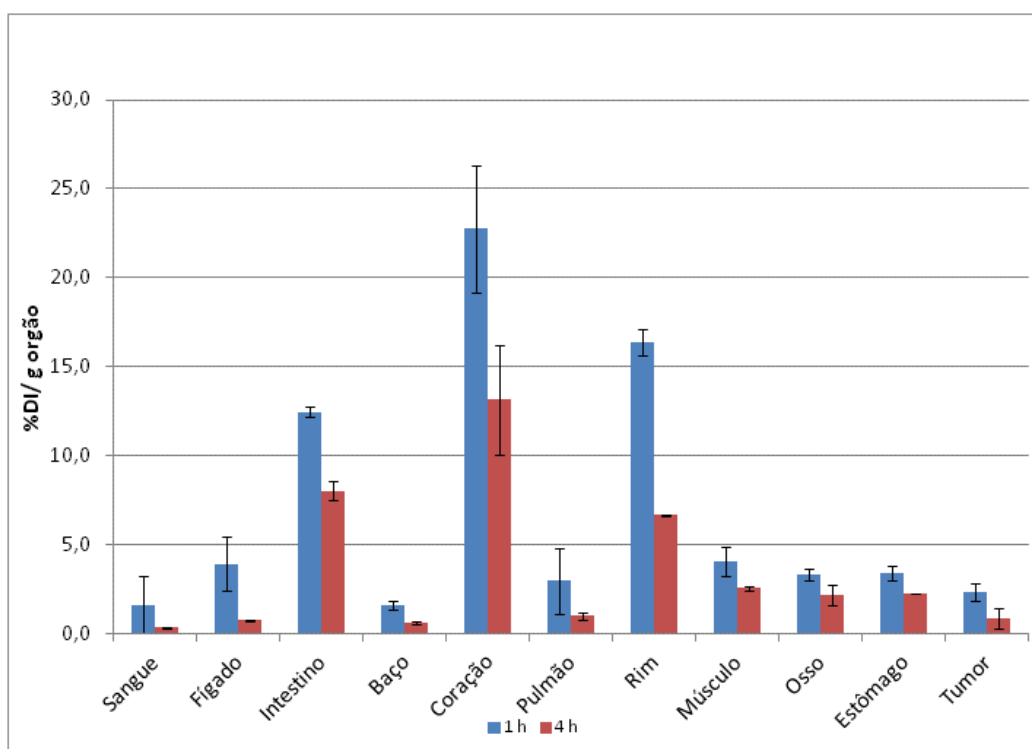
Os resultados destes ensaios foram comparados com os dados obtidos de ensaios de biodistribuição anteriores realizados nas mesmas condições experimentais, em animais da mesma estirpe sem tumor. Com o complexo  $^{99m}\text{Tc-DMEOP}$  efectou-se apenas um ensaio preliminar num ratinho com tumor induzido com células MCF-7, 1 hora após administração. Estes estudos permitiram a determinação das taxas de fixação e depuração nos vários órgãos e tecidos, incluindo a corrente sanguínea e os tecidos muscular e ósseo, a velocidade de excreção total, assim como a identificação das vias de excreção responsáveis pela eliminação dos complexos e também a sua possível afinidade para os órgãos alvo, ou seja para o tumor e o coração. Estes parâmetros são de elevada importância na avaliação do potencial interesse destes novos complexos para a detecção e monitorização tumoral.

Os resultados da biodistribuição foram calculados em percentagem de dose injectada por grama de órgão (%DI/ g órgão) e os resultados da excreção em percentagem de dose injectada (%DI).

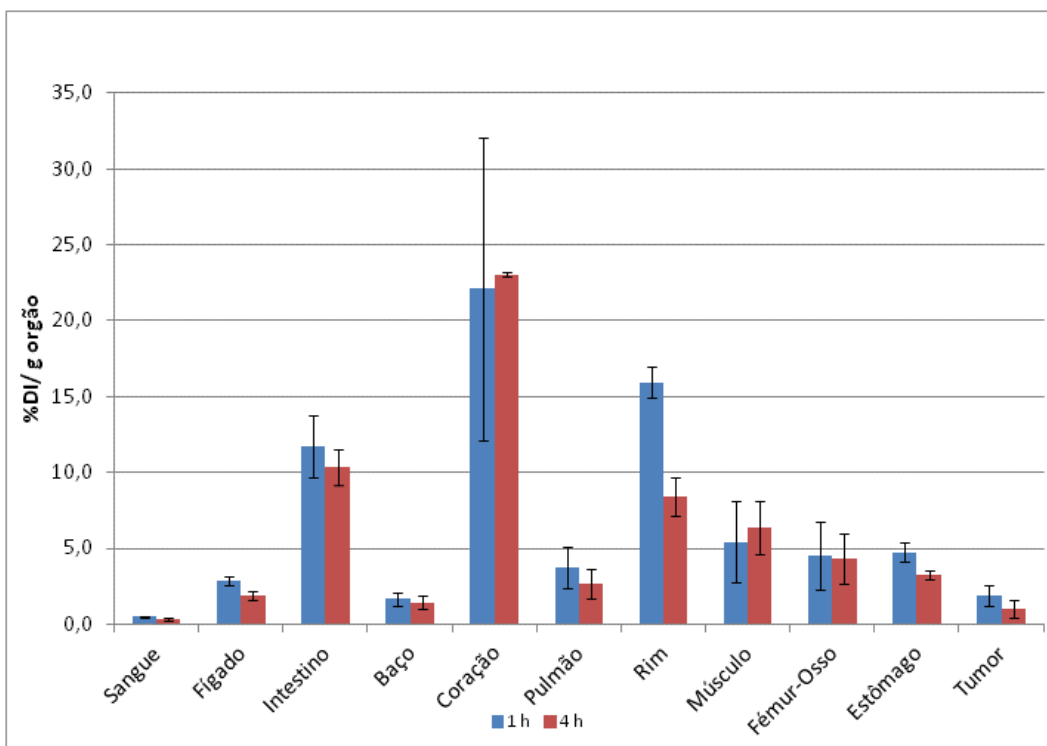
Os gráficos que se seguem representam os resultados dos ensaios de biodistribuição para os animais nos quais foram induzidos tumores com origem nas linhas celulares MCF-7, MCF-7 Pgp, MDA-MB 231 (Figuras 2.14, 2.15 e 2.16, respectivamente) e para os ratinhos sem tumor (Figura 2.17), 1 e 4 horas após administração do complexo  $^{99m}\text{Tc-TMEOP}$ . Encontram-se também representados na forma gráfica os resultados obtidos para a excreção (Figura 2.18) total e as razões tumor/sangue e tumor/músculo (Figura 2.19). O gráfico com as razões tumor/sangue e tumor/músculo incluem também o estudo com o complexo  $^{99m}\text{Tc-DMEOP}$ .



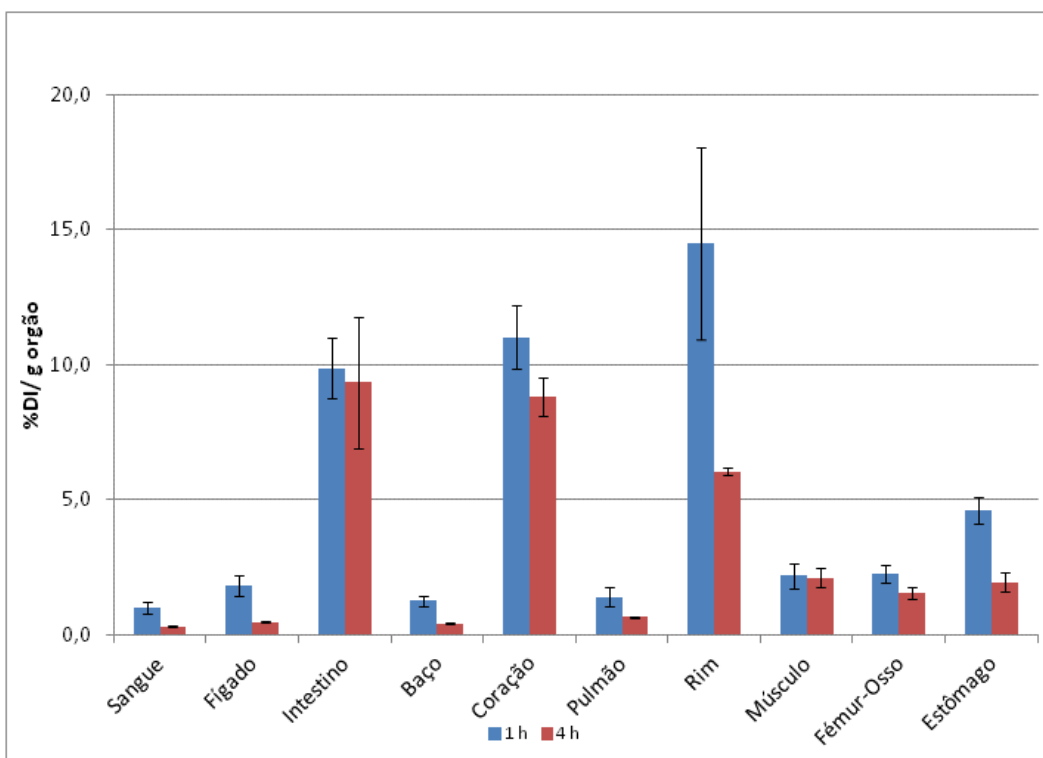
**Figura 2.14:** Biodistribuição do complexo  $^{99m}\text{Tc-TMEOP}$  (%DI/g órgão) após 1 e 4 horas nos ratinhos inoculados com células MCF-7.



**Figura 2.15:** Biodistribuição do complexo  $^{99m}\text{Tc-TMEOP}$  (%DI/ g órgão) após 1 e 4 horas nos ratinhos inoculados com células MCF-7 Pgp.



**Figura 2.16:** Biodistribuição do complexo  $^{99m}\text{Tc-TMEOP}$  (%DI/g órgão) após 1 e 4 horas nos ratinhos inoculados com células MDA-MB 231.



**Figura 2.17:** Biodistribuição do complexo  $^{99m}\text{Tc-TMEOP}$  (%DI/ g órgão) após 1 e 4 horas nos ratinhos sem tumor induzido.

A análise dos resultados dos diversos ensaios realizados revelam um perfil de distribuição que apresenta a mesma tendência, uma depuração sanguínea relativamente rápida e uma elevada fixação cardíaca, tal como esperado dos resultados anteriormente descritos para estes complexos em modelos animais saudáveis tanto de rato como de ratinho. [86] Esta elevada captação está directamente relacionada com o carácter catiónico e lipofílico destes complexos. Para além da fixação cardíaca observou-se ainda uma acumulação radioactiva dos 2 compostos estudados nos órgãos relacionados com as principais vias de excreção (fígado, intestinos e rins). Relativamente a estas vias observou-se uma contribuição importante da via de eliminação renal, evidente na percentagem de radioactividade no rim à 1 hora e que diminui às 4 horas embora se observe também o envolvimento da via hepatobiliar uma vez que se detecta fixação ao nível do fígado que rapidamente passa para os intestinos. Pelos dados representados graficamente e pela análise da tabela 2.2 (apresentada a seguir) pode afirmar-se que uma fracção dos complexos é rapidamente captada pelo fígado sendo depois eliminada pelo intestino. Observa-se também alguma acumulação de actividade no estômago 1 h após administração dos complexos que diminui às 4 horas sugerindo que os complexos são estáveis à reoxidação *in vivo*.

Relativamente à fixação tumoral as percentagens médias de fixação do  $^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP são muito semelhantes nos ratinhos com xenotransplantes induzidos pelas diferentes linhas celulares e sempre inferiores a 2,5%. Estas percentagens diminuem pelo menos para metade às 4 horas indicando que os complexos não conseguem acumular-se nas células tumorais. A maior percentagem à 1 hora pode ser consequência da maior actividade na circulação sanguínea. Do ensaio com o complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP a percentagem de fixação é ligeiramente superior à observada para o complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP nas mesmas condições experimentais, mas mesmo assim ambos apresentam valores de actividade detectada reduzidos.

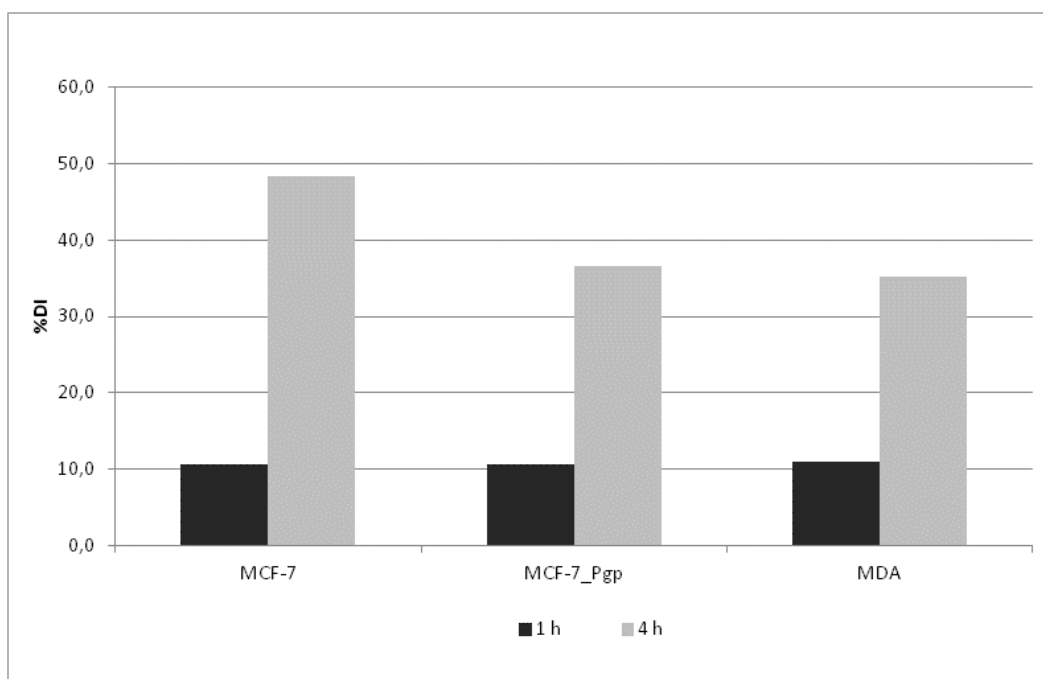
O tumor induzido com origem na linha celular MCF-7 Pgp que sobre-expressa a glicoproteína-P, responsável pelo efluxo de fármacos, apresenta valores médios de captação do complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP (Figura 2.15) semelhantes aos tumores induzidos pelas células MCF-7 que não expressam esta proteína o que sugere que nestes modelos animais o complexo não consegue reconhecer a Pgp, contrariamente ao que tinha sido observado nos ensaios de captação nas linhas celulares *in vitro*.

**Tabela 2.2:** Resultados de biodistribuição e excreção total dos complexos  $^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP e  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP, expressos em %DI/g órgão e %DI, respectivamente.

Orgão	$^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP						$^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP
	MCF-7		MCF-7 Pgp		MDA-MB 231		MCF-7
	<u>1 h</u>	<u>4 h</u>	<u>1 h</u>	<u>4 h</u>	<u>1 h</u>	<u>4 h</u>	<u>1 h</u>
Sangue	1,51 ± 1,19	0,17 ± 0,02	1,62 ± 1,58	0,32 ± 0,06	0,48 ± 0,05	0,35 ± 0,10	0,35
Fígado	3,67 ± 1,26	0,73 ± 0,01	3,90 ± 1,53	0,73 ± 0,03	2,88 ± 0,33	1,90 ± 0,31	1,60
Intestino	9,63 ± 0,07	6,21 ± 1,40	12,46 ± 0,31	8,03 ± 0,51	11,73 ± 2,04	10,31 ± 1,17	7,56
Baço	1,25 ± 0,26	0,73 ± 0,01	1,56 ± 0,26	0,60 ± 0,11	1,67 ± 0,44	1,45 ± 0,40	1,25
Coração	19,40 ± 1,07	10,57 ± 1,84	22,74 ± 3,60	13,16 ± 3,08	22,10 ± 9,99	23,04 ± 0,14	13,69
Pulmão	3,66 ± 0,13	0,79 ± 0,15	2,94 ± 1,84	0,97 ± 0,23	3,77 ± 1,35	2,67 ± 0,97	2,04
Rim	14,44 ± 1,47	5,68 ± 1,03	16,38 ± 0,76	6,65 ± 0,03	15,95 ± 0,99	8,44 ± 1,25	19,75
Músculo	4,84 ± 0,90	2,57 ± 0,26	4,07 ± 0,83	2,54 ± 0,14	5,44 ± 2,68	6,37 ± 1,78	2,43
Fémur-Osso	4,43 ± 0,57	1,85 ± 0,17	3,32 ± 0,33	2,16 ± 0,61	4,50 ± 2,21	4,32 ± 1,66	2,56
Estômago	3,09 ± 0,09	1,45 ± 0,52	3,40 ± 0,38	2,26 ± 0,01	4,74 ± 0,62	3,24 ± 0,29	5,25
Tumor	1,79 ± 0,49	0,71 ± 0,54	2,33 ± 0,52	0,86 ± 0,59	1,90 ± 0,66	1,01 ± 0,62	2,76
Excreção (%DI)	10,70 ± 2,31	48,30 ± 6,15	10,70 ± 1,84	36,60 ± 2,67	11,05 ± 2,38	35,20 ± 2,18	17,54

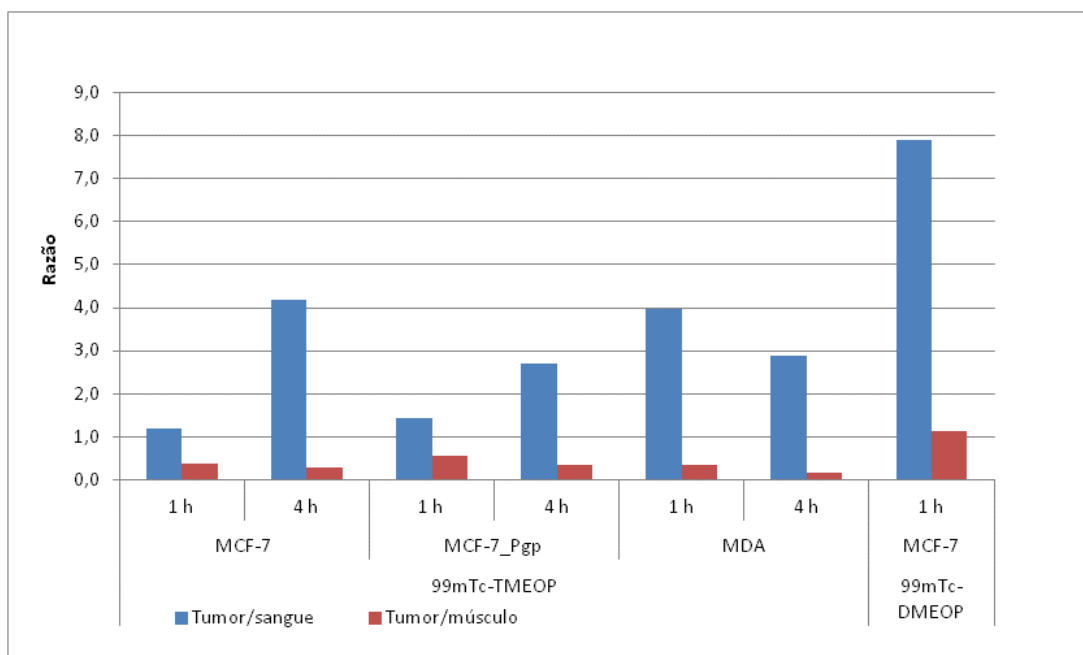


A fixação nos diversos tecidos e órgãos diminui de um modo geral do período de 1 hora para as 4 horas, conseqüentemente a excreção total aumenta, tal como se pode verificar na tabela anterior, assim como na Figura 2.18, que se segue. Destes resultados pode afirmar-se que a percentagem de excreção embora aumentando com o tempo pós-administração é moderada, conseqüência do envolvimento do tracto hepatobiliar.



**Figura 2.18:** Excreção total do complexo  $^{99m}\text{Tc-TMEOP}$  nos ratinhos inoculados com as linhas tumorais MCF-7, MCF-7 Pgp e MDA-MB 231, expressa em %DI, período de 1 e 4 horas após administração.

De seguida apresenta-se também o gráfico (Figura 2.19) com as razões de radioatividade tumor/sangue e tumor/músculo dos 2 complexos em estudo para os modelos animais com tumores induzidos com diferentes linhas tumorais.



**Figura 2.19:** Razões de radioatividade tumor/sangue e tumor/músculo dos complexos  $^{99m}\text{Tc-TMEOP}$  e  $^{99m}\text{Tc-DMEOP}$  para os ratinhos inoculados com as linhas tumorais MCF-7, MCF-7 Pgp e MDA-MB 231, 1 e 4 horas após administração.

Relativamente aos resultados obtidos para a excreção total, pode observar-se que a percentagem de  $^{99m}\text{Tc-TMEOP}$  excretada é semelhante nos modelos animais com os diversos tumores induzidos à 1 hora e às 4 horas (Figura 2.18). O ensaio realizado com o complexo  $^{99m}\text{Tc-DMEOP}$  apresenta quase o dobro do valor da %DI da excreção (17,54%) quando comparado com o  $^{99m}\text{Tc-TMEOP}$  ( $10,70\% \pm 2,31$ ) para o mesmo período de tempo (1 hora) sugerindo uma taxa de eliminação mais rápida o que melhora o perfil de biodistribuição do complexo para diagnóstico.

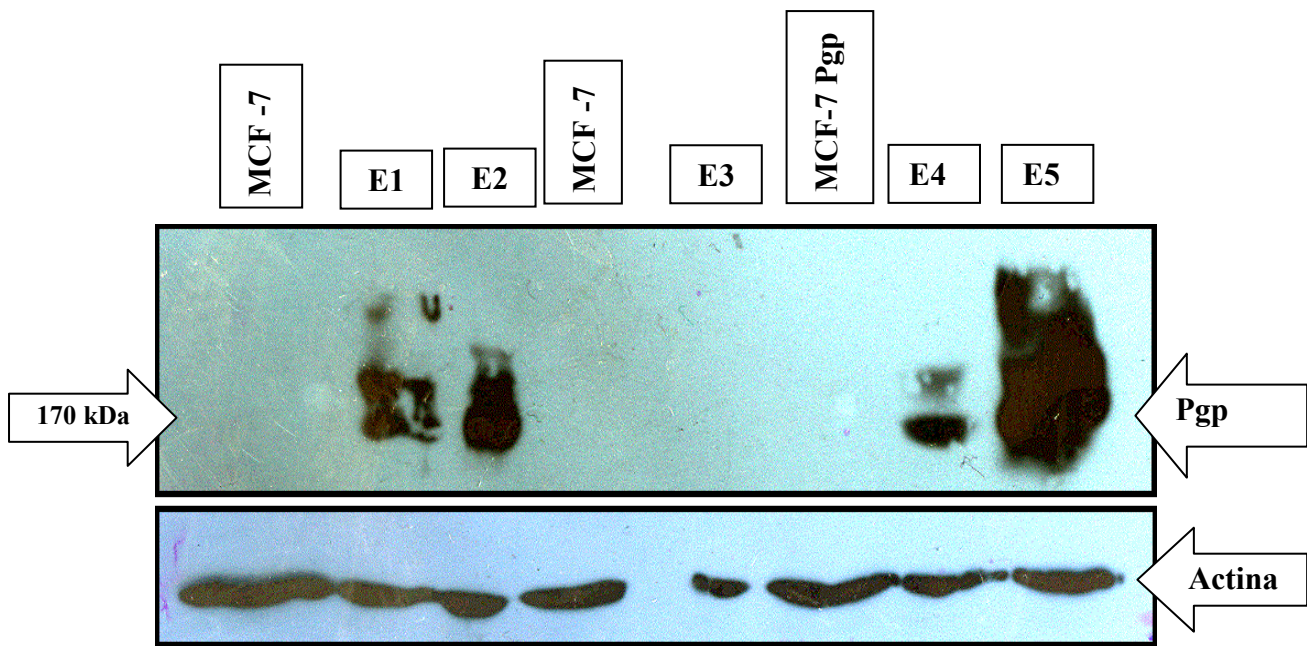
As razões de radioatividade tumor/sangue e tumor/músculo apresentadas no gráfico da Figura 2.19, são relativamente reduzidas. No entanto observam-se algumas diferenças para o composto  $^{99m}\text{Tc-TMEOP}$ , principalmente na razão tumor/sangue ao fim de 1 hora que varia entre 1,19 e 3,96. Estas razões aumentam às 4 horas devido essencialmente à depuração sanguínea. Relativamente ao  $^{99m}\text{Tc-DMEOP}$ , esta razão é mais elevada mas o resultado tem de ser validado com novos ensaios envolvendo maior número de animais.

A razão de radioatividade tumor/músculo é muito baixa para todos os modelos de xenotransplante situando-se abaixo de 1.

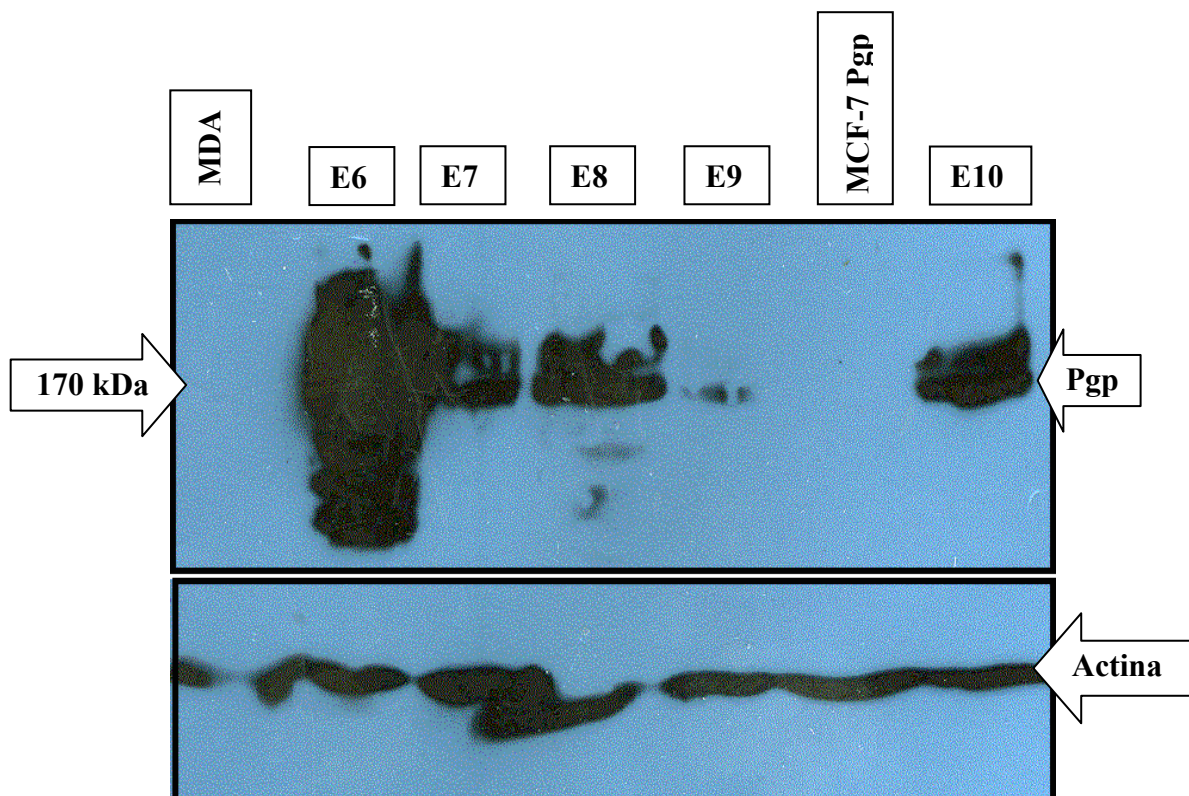
### **2.3. Estudos de avaliação da expressão de proteínas de MDR**

Nestes estudos recorreu-se à técnica de western blot para a detecção de proteínas em homogenatos de células ou em extractos de tecidos biológicos. Esta técnica permite-nos avaliar a expressão de proteínas envolvidas na resistência das células a múltiplos fármacos. Nos estudos efectuados a nossa atenção focou-se numa destas proteínas responsável pelo efluxo de drogas e presente ou sobre-expressa em células de origem tumoral, a glicoproteína-P. De modo a verificar se esta proteína se encontrava presente em algumas das linhas celulares utilizadas para os estudos de captação *in vitro*, assim como em extractos dos tumores induzidos nos ratinhos, utilizou-se um anticorpo específico para a glicoproteína-P.

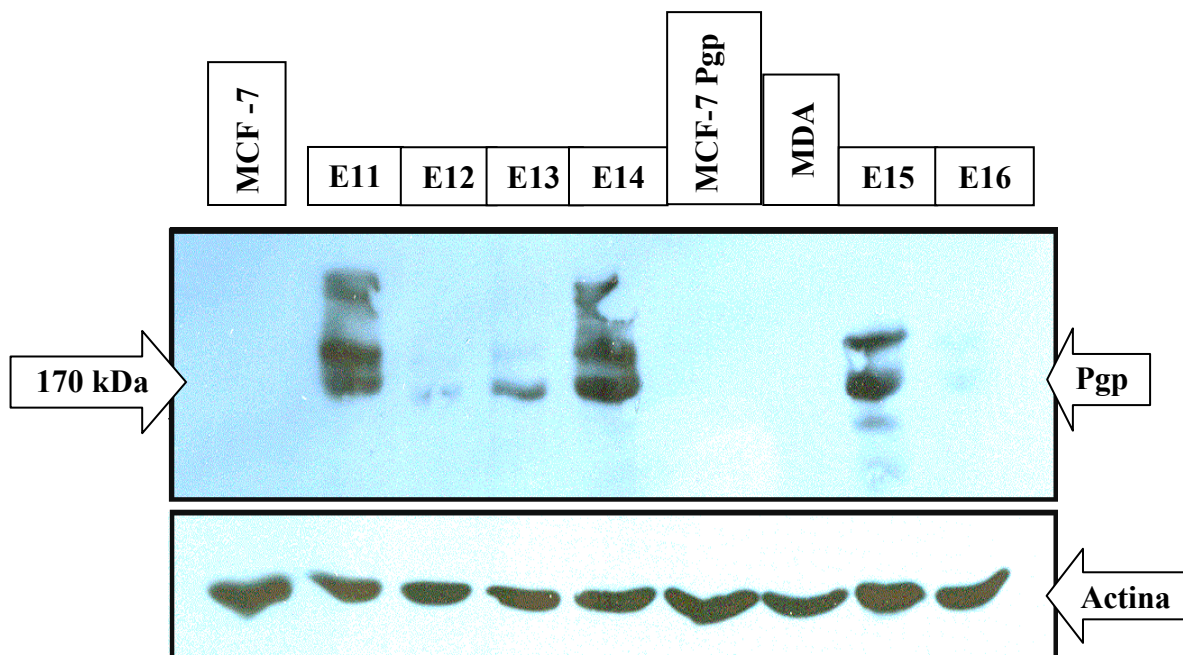
De forma a separar as proteínas (previamente desnaturadas) de acordo com a sua massa, esta técnica recorre à electroforese em gel de acrilamida (ver secção 4.4.3). Posteriormente as proteínas são transferidas para uma membrana de nitrocelulose, onde a proteína alvo é identificada utilizando os anticorpos específicos. De modo a avaliar a expressão desta proteína relacionada com a resistência a múltiplos fármacos utilizaram-se os homogenatos das linhas celulares MCF-7, MCF-7 Pgp e MDA-MB 231 utilizadas para a inoculação dos ratinhos e extractos dos tumores isolados dos ratinhos.



**Figura 2.20:** Western blot com homogenatos das células MCF-7, MCF-7 Pgp e extractos dos tumores com origem nas mesmas linhas. Extractos E1, E2 e E3 - tumores com origem na linha celular MCF-7 e extractos E4, E5 - tumores com origem na linha celular MCF-7 Pgp.



**Figura 2.21:** Western blot com homogenatos das células MDA-MB 231, MCF-7 Pgp e extractos tumorais com origem nas mesmas linhas. Extractos E6, E7, E8 e E9 - tumores com origem na linha celular MDA-MB 231 e extracto E10 - tumor com origem na linha celular MCF-7 Pgp.



**Figura 2.22:** Western blot com homogenatos das células MDA-MB 231, MCF-7, MCF-7 Pgp e extractos tumorais com origem nas mesmas linhas. Extractos E11 e E12 - tumores com origem na linha celular MCF-7; Extractos E13 e E14 tumores com origem na linha celular MCF-7 Pgp; Extractos E15 e E16 tumores com origem na linha celular MDA-MB 231.

Na análise destes resultados nota-se a ausência da banda correspondente à Pgp no homogenato celular da linha celular MCF-7 Pgp. Esta ausência poderá ter ocorrido devido a algum problema durante o manuseamento desta amostra, talvez provocado por tempo excessivo fora do gelo.

Relativamente aos extractos tumorais estes apresentam de um modo geral bandas com arrastamento ou difusas. Isto poder-se-á dever ao excesso de proteína adicionado no caso dos extractos tumorais ou então excesso de anticorpo específico. A grande maioria dos extractos apresenta uma banda na região correspondente à massa molecular da Pgp (170 kDa).

Os homogenatos celulares não apresentaram bandas para a Pgp, enquanto todos os extractos tumorais apresentaram as bandas correspondentes à expressão dessa proteína.

# ***CAPÍTULO 3***

*Discussão geral*  
*e*  
*Conclusões*



### 3. Discussão geral e conclusões

Estes estudos tiveram como objectivo o estudo biológico *in vitro* e *in vivo* dois complexos de  $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$  com carácter catiónico e lipofílico para a avaliação do seu potencial interesse clínico no diagnóstico tumoral e como sondas para a avaliação do fenótipo de resistência a múltiplos fármacos.

Assim o plano de trabalho foi definido essencialmente em 2 fases onde a primeira foi dedicada aos estudos *in vitro*, nomeadamente estudos de captação dos complexos em várias linhas celulares, assim como estudos com recurso a modeladores dos potenciais membranares para elucidar os mecanismos de captação envolvidos.

A segunda fase foi dedicada aos estudos *in vivo*, com os estudos de biodistribuição em ratinhos nude mice. Por fim foi realizada a avaliação da expressão da proteína de efluxo glicoproteína-P em homogenatos das células e em extractos dos tumores isolados dos ratinhos.

Na primeira fase utilizaram-se várias linhas celulares tumorais humanas assim como uma linha não tumoral como referência.

Relativamente às linhas tumorais, os estudos de captação demonstraram que a linha MDA-MB 231 é a que apresenta os valores mais elevados de captação para os complexos utilizados neste trabalho.

As linhas celulares MCF-7 Pgp e A-2780 cisR, tal como já era esperado devido às suas propriedades, apresentaram as mais reduzidas taxas de captação quando consideramos apenas os 2 complexos  $^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP e  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP. A primeira linha celular, porque sobre-expressa uma proteína responsável pela resistência a múltiplos fármacos, dando origem ao efluxo dos referidos compostos. A segunda linha apesar de ser resistente à cisplatina parece também originar o efluxo destes compostos.

Os compostos utilizados actualmente na prática clínica  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmina e  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi para estudos perfusão do miocárdio apresentaram de um modo geral as mais reduzidas taxas de captação para as linhas celulares em que foram testados juntamente com os 2 compostos até agora referidos. Salienta-se ainda que existiu uma excepção pois o  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi apresenta taxas de captação médias para a linha celular PC-3.

Estes estudos revelaram que o  $^{99m}\text{Tc-TMEOP}$  e o  $^{99m}\text{Tc-DMEOP}$  apresentaram taxas de captação mais elevadas em relação aos outros 2 compostos utilizados (nas mesmas linhas celulares).

Comparando o  $^{99m}\text{Tc-TMEOP}$  e o  $^{99m}\text{Tc-DMEOP}$ , verificou-se que o primeiro apresenta as taxas de captação mais elevadas. Nesta fase o  $^{99m}\text{Tc-DMEOP}$  apresenta-se com o maior potencial relativamente ao objectivo deste trabalho.

Salienta-se ainda que nestes estudos os desvios padrão em alguns casos são bastante elevados. Isto foi devido ao procedimento experimental que poderia ser melhorado com o recurso a um polímero que permite uma melhor fixação das células, impedindo que durante o processo de remoção do meio de cultura sejam removidas.

Os ensaios em que se estudou o efeito na captação celular da variação de concentrações de  $\text{K}^+$  assim como com a adição do iónoforo valinomicina, revelaram a importância do potencial de membrana plasmática,

Relativamente aos mecanismos de captação, quando se utilizaram soluções com concentrações de 5mM, 60 mM, 120 mM de  $\text{K}^+$  e 120 mM + valinomicina, observou-se um decréscimo na captação do complexo com o aumento da concentração de potássio.

Para a concentração de  $\text{K}^+$  120 mM + valinomicina, a presença deste iónoforo tem como efeito o aumento da permeabilidade da membrana plasmática ao  $\text{K}^+$ . Como para concentrações mais elevadas de  $\text{K}^+$  no meio extracelular o potencial de membrana plasmática reduz-se para valores próximos de zero, a valinomicina irá originar um colapso no potencial de membrana mitocondrial devido ao desacoplamento do sistema de transporte de electrões e consequente inibição da fosforilação oxidativa. Isto origina o colapso do potencial de membrana mitocondrial reflectindo-se nos valores de captação que foram reduzidos para cerca de 50% relativamente aos valores normais, ou seja, relativamente aos valores para a concentração de 5 mM de  $\text{K}^+$ .

Seguidamente foi feita a alteração dos potenciais membranares, através da acção dos moduladores nigericina e ubaína. A nigericina é responsável pela hiperpolarização das membranas mitocondrial e plasmática, através da substituição electricamente neutra do  $\text{K}^+$  por  $\text{H}^+$ . Desta forma seria de esperar um aumento na captação do complexo relativamente ao controlo, mas, ao contrário, verifica-se uma diminuição acentuada. Esta diminuição será possivelmente devida a um problema experimental que levou à utilização de uma concentração de nigericina inferior à prevista teoricamente.

Em paralelo com a nigericina, as células MCF-7 foram também incubadas com ubaína. Este iónoforo actua como inibidor do mecanismo de transporte activo associado à bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  aumentando a concentração intracelular de  $\text{Na}^+$  e alterando a permeabilidade da membrana plasmática a iões. Os valores de captação obtidos nas células incubadas exclusivamente com ubaína foram inferiores aos do controlo o que é aceitável.

As células foram ainda incubadas simultaneamente com nigericina e ubaína, de forma à ubaína eliminar a hiperpolarização da membrana plasmática causada pela nigericina. Os valores de captação celular sofreram uma redução muito acentuada (cerca de 94% relativamente ao controlo), contudo este valor pode estar afectado pela concentração de nigericina utilizada no ensaio. De acordo com a bibliografia, o esperado seria que nos ensaios realizados com nigericina ocorreria um aumento da captação celular do complexo, que diminuiria com a adição de ubaína. Assim os valores de captação quando se utilizou conjuntamente nigericina e ubaína deveriam situar-se entre os obtidos para o controlo e apenas com nigericina.

Por último as células foram incubadas com duas concentrações diferentes de CCCP,  $5\mu\text{M}$  e  $10\mu\text{M}$ . O CCCP funciona como inibidor da fosforilação oxidativa, induzindo o colapso do potencial da membrana mitocondrial, através do desacoplamento do gradiente de prótons na membrana mitocondrial interna. A introdução deste iónoforo resultou numa diminuição dos valores de captação celular, o que confirma a importância do potencial da membrana mitocondrial na captação do composto. No entanto, com o CCCP a  $5\mu\text{M}$  e  $10\mu\text{M}$ , seria de esperar uma diminuição da captação com o aumento da concentração, mas esta apresenta valores bastante semelhantes para as 2 concentrações.

Os estudos efectuados na presença dos diferentes ionofóros mostraram que a captação celular é influenciada por alterações dos valores de  $\Delta\psi_p$  e  $\Delta\psi_m$ , verificando-se um forte contributo do  $\Delta\psi_m$  na captação e retenção celulares deste complexo em células MCF-7.

Os estudos de biodistribuição dos complexos  $^{99\text{m}}\text{Tc-TMEOP}$  e  $^{99\text{m}}\text{Tc-DMEOP}$  realizados, em ratinhos imunodeficientes da estirpe Balb/c com e sem xenotransplantes revelaram um perfil semelhante ao anteriormente descrito para estes complexos em diferentes modelos animais de rato e ratinho da estirpe CD-1. Tal como em animais

saudáveis, os complexos apresentaram uma elevada fixação cardíaca devida ao seu carácter catiónico e lipofílico, uma rápida depuração da maioria dos órgãos incluindo sangue e músculo e uma moderada excreção da radioactividade total, que envolve simultaneamente as vias de eliminação renal e hepatobiliar.

Relativamente à captação tumoral, os ratinhos inoculados com a linha celular MCF-7 Pgp apresentaram percentagens de fixação tumoral do  $^{99m}\text{Tc-TMEOP}$  ao fim de 1 hora mais elevadas ( $2,33\% \pm 0,52$  em %DI/g tumor) do que os animais com tumor induzido pela linha celular MCF-7 ( $1,79\% \pm 0,49$  em %DI/g tumor). Os ratinhos inoculados com a linha MDA-MB 231 apresentaram uma captação de  $1,90\% \pm 0,66$  em %D/g tumor. No entanto ao fim de 4 horas após a administração a percentagem de actividade localizada no tumor diminui cerca de 2 a 3 vezes em qualquer dos modelos animais.

O  $^{99m}\text{Tc-DMEOP}$  apresentou nos ratinhos inoculados com a linha MCF-7 um valor de captação mais elevado ( $2,76$  em %DI/g tumor) quando comparado com o obtido para a mesma linha com o  $^{99m}\text{Tc-TMEOP}$  ao fim de 1 hora pelo que este estudo preliminar deverá ser validado por experiências com um maior número de ratinhos com xenotransplantes.

Dos estudos de biodistribuição sobressai o comportamento biológico do complexo  $^{99m}\text{Tc-TMEOP}$ , nos ratinhos inoculados com as 3 linhas celulares estudadas (MCF-7, MCF-7 Pgp e MDA-MB 231), que revelaram uma fixação muito elevada no coração, confirmando o seu potencial para efectuar estudos de perfusão cardíaca, tal como com o  $^{99m}\text{Tc-DMEOP}$  que apresenta resultados semelhantes. Devido ao facto do coração possuir grandes necessidades energéticas, as células cardíacas têm em média um número mais elevado de mitocôndrias, que explica a elevada fixação dos complexos neste órgão. No entanto a expectativa de obter um complexo  $^{99m}\text{Tc}$  catiónico e lipofílico útil para detecção tumoral não foi concretizada devido à reduzida fixação e retenção no tumor. Consequentemente as razões de radioactividade tumor/órgãos circundantes, essenciais para um bom agente para visualização de tumores também foram muito baixas. Por outro lado o complexo  $^{99m}\text{Tc-TMEOP}$  também não demonstrou capacidade para detectar o fenótipo de resistência a múltiplos fármacos devido à expressão da glicoproteína-P uma vez que não se observou diminuição na percentagem de complexo acumulado nos tumores induzidos por linhas celulares com sobre-expressão desta proteína.

Os estudos através da técnica de western blot para a avaliação da expressão da Pgp revelaram que esta se encontra presente em quase todos os extractos dos tumores analisados, o que poderá explicar as percentagens de fixação mais reduzidas dos compostos estudados.

O  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP apresenta-se como o complexo mais promissor pois foi o que apresentou as mais elevadas taxas de captação em todas as linhas celulares nos estudos *in vitro*, assim como a fixação tumoral mais elevada nos estudos efectuados em ratinhos nude.



# ***CAPÍTULO 4***

*Materiais*

*e*

*Métodos*



#### 4.1.1. Condição de manipulação de compostos de $^{99m}\text{Tc}$

Todos os compostos radioactivos foram manipulados de acordo com as regras de protecção e segurança radiológica, na presença de aparelhos de detecção de radiação, em laboratórios com sistemas de ventilação adequada e com pressão negativa relativamente ao exterior. Foram utilizados contentores de chumbo com a espessura apropriada, para a manipulação dos frascos contendo soluções radioactivas, com o objectivo de proteger os operadores da radioactividade emitida. Todas as manipulações foram efectuadas com luvas de protecção, recorrendo a uma parede de chumbo com vidro, impregnado de sais de chumbo.

Durante a fase experimental deste trabalho, recorreu-se ainda a detectores de radiação individuais, de peito e extremidades, para a rastreabilidade da dose de radiação absorvida, a qual foi obtida pela leitura periódica dos detectores.

#### 4.1.2. Síntese do Precursor *fac*- $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$

##### $^{99m}\text{Tc}$

O pertecnetato de sódio ( $\text{Na}[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]$ ) utilizado foi obtido através da eluição de gerador  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  (Elumatic, Suíça).

##### *Kit Isolink*

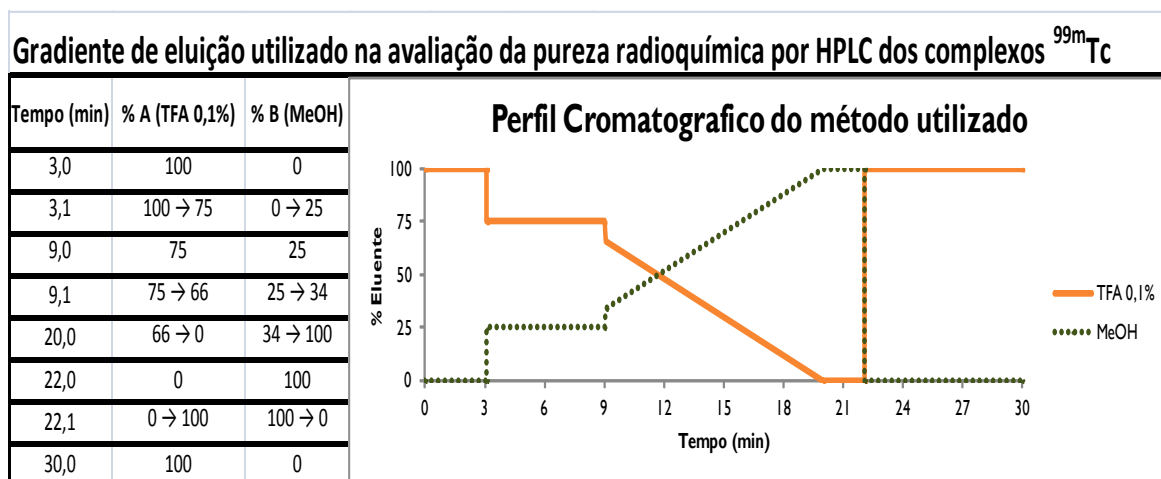
Para a preparação dos complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  utilizou-se o precursor  $^{99m}\text{Tc}$ -tricarbonilo, preparado a partir de um *kit* disponível na forma de liofilizado: *kit Isolink* (Mallinckrodt, Holanda), com a seguinte composição: 4,5 mg de boranocarbonato de sódio; 2,85 mg de tetraborano de sódio  $10\cdot\text{H}_2\text{O}$ ; 8,5mg de tartarato de sódio  $2\cdot\text{H}_2\text{O}$  e 7,15mg de carbonato de sódio.

A síntese do precursor foi realizada pela adição ao *kit Isolink* de aproximadamente 2 mL de eluído do gerador de  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ , sob a forma de pertecnetato de sódio (adição efectuada sob atmosfera de azoto).

A reacção decorreu numa placa de aquecimento a  $100^\circ\text{C}$ , durante 30 minutos. De seguida acertou-se o pH a 4, com uma solução de ácido clorídrico 1M. A pureza

radioquímica do precursor  $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ , foi controlada por HPLC com uma coluna de fase reversa, sob as condições descritas na tabela 4.1.

**Tabela 4.1:** Gradiente de eluição utilizado na análise por HPLC.



#### 4.1.3. Síntese e caracterização dos complexos $^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP e $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP

A preparação dos complexos  $^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP e  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP, foi efectuada partindo do precursor e dos ligandos correspondentes de modo descrito abaixo.

Os ligandos utilizados, TMEOP e DMEOP, encontravam-se liofilizados em frascos de vidro selados, onde foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  do precursor. A reacção de formação dos complexos foi realizada a 100°C, pH 4 durante 30 e 45 min para o  $^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP e  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP respectivamente. A avaliação da pureza radioquímica dos complexos foi efectuada por HPLC, recorrendo a uma coluna de fase reversa, tal como na preparação do precursor.

Na tabela 4.2., encontram-se os complexos utilizados neste estudo, bem como as condições reaccionais de marcação para a obtenção dos mesmos.

**Tabela 4.2:** Condições experimentais de síntese dos complexos  $^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP e  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP e os seus tempos de retenção. <sup>[86]</sup>

Complexo	Rendimento %	[Ligando]/M	Tempo (min)	T/°C	t <sub>R</sub>
$^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP	≥98	$5 \times 10^{-3}$	30	100	23
$^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP	96	$1 \times 10^{-3}$	45	100	22

Os complexos  $^{99m}\text{Tc}$ -Tetrofosmina e  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi, foram gentilmente cedidos pela unidade de Medicina Nuclear do Hospital de Santa Maria, onde foram preparados.

## 4.2. Estudos de captação celular

### 4.2.1. Linhas celulares

Neste trabalho, utilizaram-se as seguintes linhas celulares humanas:

- i) Adenocarcinoma da mama, MCF-7,
- ii) Adenocarcinoma do ovário MDA-MB-231,
- iii) Adenocarcinoma da próstata PC-3,

adquiridas na *American Type Culture Collection* (ATCC, Barcelona, Espanha);

- iv) Adenocarcinoma da mama com sobreexpressão da P-glicoproteína, MCF-7 Pgp (cedidas pelo Professor David Piwnicka-Worms, da *Washington University School of Medicine*, St Louis, Missouri, EUA)
- v) Carcinoma da epiderme da vulva A-431,
- vi) Carcinoma cervical Hela,
- vii) Carcinoma do ovário A-2780 e A-2780 cisR (resistente à cisplatina),

adquiridas na *European Collection of Cell Cultures* (ECACC, Londres, Reino Unido);

- viii) Células embrionárias do rim humano, HEK, adquiridas na *European Collection of Cell Cultures* (ECACC, Londres, Reino Unido);

#### 4.2.2. Cultura e manutenção de linhas celulares

Todas as linhas celulares foram cultivadas de acordo com as normas de assepsia, recomendadas, numa Hotte de fluxo laminar, utilizando os meios de cultura DMEM GlutaMaxI (*Invitrogen*, Reino Unido) ou RPMI 1640 (*Invitrogen*) (ver Tabela 4.3.), suplementados com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS) (*Invitrogen*) previamente inativado pelo calor e 1% (v/v) de Penicilina (100 U/mL)/Estreptomicina ( 10 µg/mL) (*Invitrogen*).

**Tabela 4.3:** Linhas celulares e respectivos meios de cultura utilizados.

Linha celular	DMEM	RPMI
MCF-7	X	
MCF-7 Pgp	X	
MDA-MB 231	X	
PC-3		X
A-431	X	
Hela	X	
A-2780		X
A-2780 cisR		X
HEK	X	

Todas as linhas celulares foram incubadas em atmosfera húmida com 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C (*Heraeus*, Germany). Os meios de cultura, foram mudados de acordo com o crescimento de cada linha celular (diariamente ou de 2 em 2 dias).

Para manutenção e propagação das culturas celulares, em cada fase de crescimento o meio de cultura foi removido e as células lavadas com PBS (a pH 7,2). As células foram incubadas (aproximadamente 5 min) com 1 mL de tripsina-EDTA (*Gibco*), de modo a que se soltassem do frasco. Após esta incubação, adicionaram-se 3

mL de meio de cultura de forma a inactivar a tripsina. As células foram então transferidas para outro frasco de cultura ao qual se adicionou mais meio para crescimento da cultura, ou usadas para ensaios de captação, após a contagem de células e determinação de viabilidade.

### **4.2.3. Estudos de captação celular**

Todas as células utilizadas nos ensaios de captação celular encontravam-se em fase de crescimento logarítmico. A contagem de células, que precedeu os estudos de captação, foi realizada logo após a tripsinização e inactivação com meio. Para determinação da viabilidade celular recorreu-se ao método de exclusão com azul tripano.

Adicionaram-se 25 $\mu$ L de azul tripano 0,4% (Sigma Chemical, St Louis, EUA), ao mesmo volume de suspensão celular. Esta suspensão corada foi então colocada numa câmara de Neubauer e observada num microscópio óptico. Este método tem como princípio a entrada do corante apenas nas células não viáveis, devido a possuírem a membrana danificada. Estas células coram de azul, enquanto as viáveis permanecem não coradas. A viabilidade expressa-se em percentagem de células não coradas relativamente ao número total de células.

Uma vez efectuada a contagem e determinação da viabilidade celular, foram preparadas suspensões celulares nos respectivos meios de cultura, com concentrações de  $1,5 \times 10^5$ - $2,0 \times 10^5$  células/mL. As suspensões resultantes foram de seguida distribuídas por placas de 24 poços (500  $\mu$ L/poço), tendo sido incubadas por um período de aproximadamente 24 h, em estufa com atmosfera húmida 95% ar e 5% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C, antes da realização dos ensaios de captação celular.

Os estudos de captação dos complexos radioactivos foram efectuados após remoção dos meios de cultura, seguida da incubação dos complexos diluídos nos respectivos meios (~37 kBq/mL) nas linhas celulares escolhidas. Os períodos de incubação foram de 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2h e 3 h, a 37 °C e sob atmosfera húmida de 5% CO<sub>2</sub>.

Após cada período de incubação, removeu-se o meio de cultura e as células lavadas com 500  $\mu$ L de PBS, mantido num banho com gelo (4°C), sendo de seguida lisadas com 500

$\mu\text{L}$  de uma solução NaOH 1M. Recolheram-se os lisados celulares e a sua actividade foi medida num contador gama (Berthold, LB2111, Germany). Realizaram-se 4 replicados (quatro poços) para cada tempo de incubação.

Para o cálculo da % de captação celular, recorreu-se à seguinte expressão:

$$\% \text{ Captação celular} = \frac{\text{Actividade medida no lisado celular (cpm)}}{\text{Actividade total (cpm)}} \times 100$$

Recorrendo aos dados obtidos experimentalmente, traçaram-se as curvas de % captação (por milhão de células) versus tempo de incubação.

#### **4.2.4. Alteração do potencial de membrana plasmática e do potencial de membrana mitocondrial**

Para estes ensaios utilizou-se a linha celular MCF-7, tendo-se recorrido a protocolos descritos na literatura. <sup>[71,88,90,91]</sup> Efectuaram-se estudos de captação celular em soluções tampão a diferentes concentrações de  $\text{K}^+$  (5, 60, 120 mM). Considerou-se como concentração normal extracelular (i.e. no meio de cultura) 5 mM de  $\text{K}^+$ . <sup>[101,102]</sup> Para a concentração de 5 mM de  $\text{K}^+$ , preparou-se uma solução tampão com a seguinte composição (mM): NaCl (145), KCl (5,4),  $\text{CaCl}_2$  (1,2),  $\text{MgSO}_4$  (0,8),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (0,8), dextrose (5,6), HEPES (5) e 1% (v/v) de soro bovino fetal com um pH no final de 7,4.

Na preparação das soluções de 60 e 120 mM de  $\text{K}^+$ , substituiu-se o NaCl por aspartato- $\text{K}^+$ , na concentração pretendida de modo a evitar a intumescência citosólica e mitocondrial. <sup>[90]</sup> Nestas soluções a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  foi ainda diminuída para 0,1 mM e o  $\text{Cl}^-$  foi mantido a uma concentração de 20 mM. As soluções stock de valinomicina, nigericina, ubaína, amiloride, cloroquina, quinacrina e CCCP foram preparadas em DMSO.

Para os estudos de captação celular removeu-se o meio de cultura e as células foram incubadas sob atmosfera húmida 95% ar e 5%  $\text{CO}_2$  em diferentes condições experimentais (ver Figura 4.1).

Na placa 1, as células foram incubadas com o complexo em estudo diluído nas soluções tampão com as diversas concentrações de  $K^+$  (5, 60, 120 mM) (poços 1-3) num volume total de 500  $\mu$ L. Ao poço 4 adicionou-se valinomicina (5 $\mu$ L, de modo a que a percentagem de DMSO não excedesse 1%), juntamente com 500  $\mu$ L do complexo na solução tampão com a concentração de  $K^+$  de 120 mM. Após o período de incubação, procedeu-se tal como foi descrito na secção 4.2.3, para se efectuar a medição da actividade num contador gama.

Os modeladores valinomicina, nigericina, ubaína, amiloride, cloroquina, quinacrina e CCCP foram diluídos em meio de cultura contendo o complexo  $^{99m}Tc$ -DMEOP e adicionados às células durante 1 hora (placas 2 e 3).

Foram utilizados 5  $\mu$ L (de forma a que a percentagem de DMSO não excedesse 1%) de soluções de ubaína (100  $\mu$ M), ubaína + nigericina (100  $\mu$ M +  $\sim$ 1,3  $\mu$ M), nigericina ( $\sim$ 1,3  $\mu$ M), CCCP (5  $\mu$ M e 10  $\mu$ M), amiloride (100  $\mu$ M), cloroquina (100  $\mu$ M), quinacrina (1  $\mu$ M). Após a incubação, procedeu-se da forma que foi descrita anteriormente para os ensaios de captação. Poderá ter ocorrido um erro experimental que levou à utilização de uma concentração de nigericina inferior à prevista teoricamente.



### **4.3. Estudos *in vivo* - biodistribuição e fixação tumoral**

#### **4.3.1. Modelos animais – inoculação de ratinhos com linhas celulares tumorais**

Para os estudos de biodistribuição utilizaram-se ratinhos *imunodeficientes da estirpe* BALBC nu/nu, da Charles River. Os animais foram mantidos em gaiolas ventiladas com filtro, manipulados numa câmara de fluxo laminar e mantidos com uma dieta alimentar e água esterilizadas sem restrições.

Suspensões de linhas celulares com viabilidade acima dos 90% ( $1 \times 10^7$  células) num volume de cerca de 150  $\mu$ L de uma mistura 1:1 de soro fetal bovino e “BD Matrigel TM Basement Membrane Matrix” (BD Biosciences), foram administradas subcutaneamente na região dorsal de cada ratinho.

Os ratinhos foram convenientemente monitorizados, ou seja, pesados e os tumores avaliados a cada 2 dias. Os tumores atingiram a dimensão apropriada em média ao fim de 4 semanas.

#### **4.3.2. Ensaio de biodistribuição**

Os complexos  $^{99m}\text{Tc}$ -TMEOP e  $^{99m}\text{Tc}$ -DMEOP (1,85 – 9,25 MBq em 150  $\mu$ L), foram injectados na veia da cauda dos ratinhos com tumor induzido. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical após 1 e 4 horas e a dose radioactiva administrada, a radioactividade do animal sacrificado e da cauda, foram medidas numa câmara de ionização (Aloka, Curiemiter IGC-3, Tokyo, Japan). A diferença de radioactividade no animal após a injeção e no momento de sacrificio foi assumida como devida à excreção total.

Os órgãos principais, bem como o tumor foram removidos, pesados e a sua actividade medida num contador gama. A acumulação de radioactividade nos tecidos foi expressa em percentagem de dose injectada por grama de órgão (% DI/g de órgão) e dose injectada por órgão (% DI/órgão).

Estes estudos foram realizados em colaboração com a Doutora Lurdes Gano e Elisabete Correia (IST/ITN).

## **4.4. Western blot**

### **4.4.1. Lise celular/tumoral**

A lise das células foi efectuada utilizando o reagente “CellLytic – MT Extraction” (Sigma-Aldrich), suplementado com um cocktail de inibidores de proteases (Roche).

Para cada cultura, o meio foi removido, as células lavadas com PBS e de seguida incubadas com a solução de lise (de um modo geral utilizou-se 125 µL de CellLytic – MT por 10<sup>6</sup> células). De seguida as células foram incubadas durante 15 min no gelo. Os lisados celulares foram então recolhidos e centrifugados 10 min a 14000 g a 4°C, tendo-se recolhido o sobrenadante no final. Os lisados que iriam ser utilizados em ensaios posteriores foram armazenados a -80 °C.

Para a lise tumoral, os tumores removidos durante os ensaios de biodistribuição (armazenados a -80 °C), foram descongelados num banho de gelo, lavados com PBS (previamente arrefecido), cortados e homogeneizados num micro-homogeneizador com o reagente CellLytic – MT complementado com cocktail de inibidores de proteases . Os lisados foram centrifugados 10 min a 14000 g a 4°C, tendo-se recolhido o sobrenadante de cada amostra, que foi armazenado a -80°C para os ensaios posteriores.

### **4.4.2. Quantificação proteica**

Para a quantificação das proteínas totais utilizou-se o *kit DC* “Protein Assay” (Biorad, Hercules, California, EUA), baseado no método de Lowry modificado. Utilizou-se como padrão para a curva de calibração albumina de soro bovino ultrapura (Biorad).

### **4.4.3. Western blot**

O método de western blot foi utilizado para a avaliação dos níveis de expressão da proteína Pgp. Foram utilizados extractos das linhas celulares MDA-MB 231, MCF-7,

MCF-7 Pgp. Foram também analisados extractos proteicos dos tumores de animais inoculados com células das MDA-MB 231, MCF-7, MCF-7 Pgp, em paralelo com extractos proteicos obtidos a partir de alíquotas das células inoculadas.

Alíquotas de extractos proteicos das células (100 µg) e dos lisados tumorais (50 µg) foram sujeitas a electroforese num gel 7% de SDS-poliacrilamida . Os géis foram posteriormente transferidos para uma membrana de nitrocelulose (Semi-Dry Transfer UN – TE 70 PWR – Amersham - Biosciences). A membrana foi incubada à temperatura ambiente com agitação 50 rpm com uma solução de PBS suplementado com 0,1 % (v/v) Tween20 (PBS-T), contendo 5 % de leite magro em pó, com o objectivo de bloquear os locais não específicos de ligação. Após este processo, a membrana foi então incubada com os anticorpos - primários específicos para a Pgp (1:500, monoclonal de ratinho, C219, Abcam, Cambridge, Reino Unido) e para a actina (1:15000, monoclonal de ratinho, AC-40, Sigma Aldrich), durante a noite a 4 °C. No dia seguinte as membranas foram lavadas com PBS-T e incubadas durante 40 min, com o anticorpo secundário (1:3000,IgG-HRP de cabra, Biorad). As membranas foram de seguida incubadas com o kit “SuperSignal WestPico Substrate” (Thermo Scientific) seguindo as especificações do produto, para a detecção do sinal em chapas radiográficas.



# ***CAPÍTULO 5***

## *Bibliografía*



## 5. Bibliografia

- [1] Kowalsky, RJ and Falen, S, *Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy & Nuclear Medicine*, **2004**, APha Publications, 2<sup>nd</sup> edition.
- [2] Dilworth, J. R.; Parrot, S. J., “The biomedical chemistry of technetium and rhenium”, *Chem Soc Rev*, **1998**, 27, 43-55
- [3] Alberto, R; McCleverty, JA and Meyer, TJ, *Technetium*, in *Comprehensive Coordination Chemistry II*, **2003**, Pergamon, Oxford, p. 127-270
- [4] Abram, U and Alberto, R, *Technetium and Rhenium - Coordination Chemistry and Nuclear Medical Applications*, Journal of Brazilian Chemical Society, **2006**, p. 1486-1500
- [5] Dilworth, J and Parrott, S, *The biomedical chemistry of technetium and rhenium*, Chemical Society Reviews, **1998**, 27 (1), p. 43-55
- [6] Bartholomal, MD; Louie, AS; Valliant, JF and Zubieta, J, *Technetium and Gallium Derived Radiopharmaceuticals: Comparing and Contrasting the Chemistry of Two Important Radiometals for the Molecular Imaging Era*, Chemical Reviews, **2010**, 110 (5), p. 2903-2920
- [7] Bhattacharyya, S and Dixit, M, *Metallic radionuclides in the development of diagnostic and therapeutic radiopharmaceuticals*, Dalton Transactions, **2011**, 40 (23), p. 6112-6128
- [8] Liu, S and Edwards, DS, *<sup>99m</sup>Tc-Labeled Small Peptides as Diagnostic Radiopharmaceuticals*, Chemical Reviews, **1999**, 99 (9), p. 2235-2268
- [9] Oliveira, R; Santos, D; Ferreira, D; Coelho, P and Veiga, F, *Preparações Radiofarmacêuticas e suas aplicações*, Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, **2006**, 42, p. 151-165
- [10] Richards, P., “*Technetium-99m: the early days*” *Technetium in chemistry and nuclear medicine*, **1990**, vol.3. Ed.Nicolini M., Bandoli G., Mazzi U., Cortina international, Verona, p 5-9
- [11] Welch, MJ and Redvanly, CS, *Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications*, **2002**, New York, Wiley.
- [12] Clarke, MJ and Sadler, PJ, *Metallopharmaceuticals II: Diagnosis and Therapy (Topics in Biological Inorganic Chemistry)*, **1999**, Springer.

- [13] Zeglis, BM and Lewis, JS, *A practical guide to the construction of radiometallated bioconjugates for positron emission tomography*, Dalton Transactions, **2011**, 40 (23), p. 6168-6195
- [14] Pimlott, SL and Sutherland, A, *Molecular tracers for the PET and SPECT imaging of disease*, Chemical Society Reviews, **2011**, 40 (1), p. 149-162
- [15] Correia, JDG; Paulo, A; Raposinho, PD and Santos, I, *Radiometallated peptides for molecular imaging and targeted therapy*, Dalton Transactions, **2011**, 40 (23), p. 6144-6167
- [16] Cyr, JE; Pearson, DA; Manchanda, R; De Rosch, MA; Rutkowski, JV; Nelson, CA; Moyer, BR; Lister-James, J and Dean, RT, *Characterization and radiolabeling chemistry of TC 99m depreotide: A somatostatin receptor binding tumor imaging agent*, Journal of Nuclear Medicine, **1999**, 40 (5), p. 321
- [17] Taillefer, R; Nicodemus, CF; Lister-James, J and Dean, RT, *Tc-99m apcitide (Acutect (TM)): Sensitivity and specificity for imaging acute deep vein thrombosis*, Journal of Nuclear Medicine, **1999**, 40 (5), p. 40
- [18] Francesconi, LC; Zheng, Y; Bartis, J; Blumenstein, M; Costello, C and De Rosch, MA, *Preparation and Characterization of [99TcO] Apcitide: A Technetium Labeled Peptide*, Inorganic Chemistry, **2004**, 43 (9), p. 2867-2875
- [19] Wegener, WA; Petrelli, N; Serafini, A and Goldenberg, DM, *Safety and Efficacy of Arcitumomab Imaging in Colorectal Cancer After Repeated Administration*, Journal of Nuclear Medicine, **2000**, 41 (6), p. 1016-1020
- [20] Banerjee, SR; Maresca, KP; Francesconi, L; Valliant, J; Babich, JW and Zubietta, J, *New directions in the coordination chemistry of 99mTc: a reflection on technetium core structures and a strategy for new chelate design*, Nuclear Medicine and Biology, **2005**, 32 (1), p. 1-20
- [21] Mendez-Rojas, MA; Kharisov, BI and Tsivadze, AY, *Recent advances on technetium complexes: coordination chemistry and medical applications*, Journal of Coordination Chemistry, **2006**, 59 (1), p. 1-63
- [22] Liu, S, *The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals*, Chemical Society Reviews, **2004**, 33 (7), p. 445-461
- [23] Shi, J; Jia, B; Liu, Z; Yang, Z; Yu, Z; Chen, K; Chen, X; Liu, S and Wang, F, *99mTc-Labeled Bombesin(7-14)NH<sub>2</sub> with Favorable Properties for SPECT Imaging of Colon Cancer*, Bioconjugate Chemistry, **2008**, 19 (6), p. 1170-1178

- [24] Faintuch, BL; Santos, R; Souza, A; Hoffman, TJ; Greeley, M and Smith, CJ, *Tc-99m-HYNIC-Bombesin (7-14)NH<sub>2</sub>: Radiochemical evaluation with co-ligands EDDA (EDDA = ethylenediamine-N,N'-diacetic acid), tricine, and nicotinic acid*, *Synthesis and Reactivity in Inorganic Metal-Organic and Nano-Metal Chemistry*, **2005**, 35 (1), p. 43-51
- [25] Edwards, DS; Liu, S; Barrett, JA; Harris, AR; Looby, RJ; Ziegler, MC; Heminway, SJ and Carroll, TR, *New and Versatile Ternary Ligand System for Technetium Radiopharmaceuticals: Water Soluble Phosphines and Tricine as Coligands in Labeling a Hydrazinonicotinamide-Modified Cyclic Glycoprotein IIb/IIIa Receptor Antagonist with <sup>99m</sup>Tc*, *Bioconjugate Chemistry*, **1997**, 8 (2), p. 146-154
- [26] Jurisson, SS and Lydon, JD, *Potential Technetium Small Molecule Radiopharmaceuticals*, *Chemical Reviews*, **1999**, 99 (9), p. 2205-2218
- [27] Hom, RK and Katzenellenbogen, JA, *Technetium-99m-labeled receptor-specific small-molecule radiopharmaceuticals: Recent developments and encouraging results*, *Nuclear Medicine and Biology*, **1997**, 24 (6), p. 485-498
- [28] Miessler, G and Tarr, D, *Inorganic Chemistry*, 2nd Edition ed, **1999**, New York, Prentice Hall.
- [29] Dias, AR, *Ligação Química*, **2006**, Lisboa, IST Press.
- [30] Alberto, R; Schibli, R; Egli, A; Schubiger, AP; Abram, U and Kaden, TA, *A Novel Organometallic Aqua Complex of Technetium for the Labeling of Biomolecules: Synthesis of [<sup>99m</sup>Tc(OH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> from [<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>]<sup>-</sup> in Aqueous Solution and Its Reaction with a Bifunctional Ligand*, *Journal of the American Chemical Society*, **1998**, 120 (31), p. 7987-7988
- [31] Alberto, R; Ortner, K; Wheatley, N; Schibli, R and Schubiger, AP, *Synthesis and Properties of Boranocarbonate: A Convenient in Situ CO Source for the Aqueous Preparation of [<sup>99m</sup>Tc(OH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup>*, *Journal of the American Chemical Society*, **2001**, 123 (13), p. 3135-3136
- [32] Malone, LJ and Manley, MR, *Hydrolysis of carbon monoxide borane*, *Inorganic Chemistry*, **1967**, 6 (12), p. 2260-2262
- [33] Malone, LJ and Parry, RW, *The preparation and properties of the boranocarbonates*, *Inorganic Chemistry*, **1967**, 6 (4), p. 817-822

- [34] Schibli, R; La Bella, R; Alberto, R; Garcia-Garayoa, E; Ortner, K; Abram, U and Schubiger, PA, *Influence of the Denticity of Ligand Systems on the in Vitro and in Vivo Behavior of  $^{99m}\text{Tc}(I)$ -Tricarbonyl Complexes: A Hint for the Future Functionalization of Biomolecules*, *Bioconjugate Chemistry*, **2000**, 11 (3), p. 345-351
- [35] Garcia, R; Paulo, A.; Domingos, A.; Santos, I; Ortner, K and Alberto, R, *Re and Tc Complexes Containing B-H Agostic Interactions as Building Blocks for the Design of Radiopharmaceuticals*, *Journal of the American Chemical Society*, **2000**, 122 (45), p. 11240-11241
- [36] Maria, L; Paulo, A.; Santos, IC; Santos, I; Kurz, P; Spingler, B and Alberto, R, *Very Small and Soft Scorpionates: Water Stable Technetium Tricarbonyl Complexes Combining a Bis-agostic ( $f\hat{U}3\text{-H, H, S}$ ) Binding Motif with Pendant and Integrated Bioactive Molecules*, *Journal of the American Chemical Society*, **2006**, 128 (45), p. 14590-14598
- [37] Garcia, R; Paulo, A; Domingos, Â and Santos, I, *Rhenium(I) organometallic complexes with novel bis(mercaptoimidazolyl)borates and with hydrotris(mercaptoimidazolyl)borate: chemical and structural studies*, *Journal of Organometallic Chemistry*, **2001**, 632 (1-2), p. 41-48
- [38] Banerjee, SR; Levadala, MK; Lazarova, N; Wei, L; Valliant, JF; Stephenson, KA; Babich, JW; Maresca, KP and Zubieta, J, *Bifunctional Single Amino Acid Chelates for Labeling of Biomolecules with the  $\{\text{Tc}(\text{CO})_3\}^+$  and  $\{\text{Re}(\text{CO})_3\}^+$  Cores. Crystal and Molecular Structures of  $[\text{ReBr}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{NCH}_2\text{C}_5\text{H}_4\text{N})]$ ,  $[\text{Re}(\text{CO})_3\{(\text{C}_5\text{H}_4\text{NCH}_2)_2\text{NH}\}]\text{Br}$ ,  $[\text{Re}(\text{CO})_3\{(\text{C}_5\text{H}_4\text{NCH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CO}_2\text{H}\}]\text{Br}$ ,  $[\text{Re}(\text{CO})_3\{X(Y)\text{NCH}_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3\}]\text{Br}$  ( $X = Y = 2\text{-pyridylmethyl}$ ;  $X = 2\text{-pyridylmethyl}, Y = 2\text{-(1-methylimidazolyl)methyl}$ ;  $X = Y = 2\text{-(1-methylimidazolyl)methyl}$ ),  $[\text{ReBr}(\text{CO})_3\{(\text{C}_5\text{H}_4\text{NCH}_2)\text{NH}(\text{CH}_2\text{C}_4\text{H}_3\text{S})\}]$ , and  $[\text{Re}(\text{CO})_3\{(\text{C}_5\text{H}_4\text{NCH}_2)\text{N}(\text{CH}_2\text{C}_4\text{H}_3\text{S})(\text{CH}_2\text{CO}_2)\}]$ , *Inorganic Chemistry*, **2002**, 41 (24), p. 6417-6425*
- [39] Vitor, RF; Alves, S; Correia, JDG; Paulo, A and Santos, I, *Rhenium(I)- and technetium(I) tricarbonyl complexes anchored by bifunctional pyrazole-diamine and pyrazole-dithioether chelators*, *Journal of Organometallic Chemistry*, **2004**, 689 (25), p. 4764-4774

- [40] Alves, S; Paulo, A; Correia, JDG; Gano, L; Smith, CJ; Hoffman, TJ and Santos, I, *Pyrazolyl Derivatives as Bifunctional Chelators for Labeling Tumor-Seeking Peptides with the fac-[M(CO)3]<sup>+</sup> Moiety (M = <sup>99m</sup>Tc, Re): Synthesis, Characterization, and Biological Behavior*, *Bioconjugate Chemistry*, **2005**, 16 (2), p. 438-449
- [41] Alves, S; Correia, JDG; Santos, I; Veerendra, B; Sieckman, GL; Hoffman, TJ; Rold, TL; Figueroa, SD; Retzlöff, L; McCrate, J; Prasanphanich, A and Smith, CJ, *Pyrazolyl conjugates of bombesin: a new tridentate ligand framework for the stabilization of fac-[M(CO)3]<sup>+</sup> moiety*, *Nuclear Medicine and Biology*, **2006**, 33 (5), p. 625-634
- [42] Garcia, R; Gano, L; Maria, L; Paulo, A; Santos, I and Spies, H, *Synthesis and biological evaluation of tricarbonyl Re(I) and Tc(I) complexes anchored by poly(azolyl)borates: application on the design of radiopharmaceuticals for the targeting of 5-HT1A receptors*, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **2006**, 11 (6), p. 769-782
- [43] Moura, C; Fernandes, C; Gano, L; Paulo, A; Santos, IC; Santos, I and Calhorda, MJ, *Influence of the ligand donor atoms on the in vitro stability of rhenium(I) and technetium (I)-<sup>99m</sup> complexes with pyrazole-containing chelators: Experimental and DFT studies*, *Journal of Organometallic Chemistry*, **2009**, 694 (6), p. 950-958
- [44] Fernandes, C; Santos, IC; Santos, I; Pietzsch, H-J; Kunstler, J-U; Kraus, W; Rey, A; Margaritis, N; Bourkoula, A; Chiotellis, A; Paravatou-Petsotas, M and Pirmettis, I, *Rhenium and technetium complexes bearing quinazoline derivatives: progress towards a <sup>99m</sup>Tc biomarker for EGFR-TK imaging*, *Dalton Transactions*, **2008**, (24), p. 3215-3225
- [45] Alberto, R, *The Chemistry of Technetium–Water Complexes within the Manganese Triad: Challenges and Perspectives*, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2009, **2009** (1), p. 21-31
- [46] Junqueira, L. C.; Carneiro, J.; *Biologia celular e molecular*, Guanabara & Koogan, **2005**, 8ª edição
- [47] Pathania, D; Millard, M and Neamati, N, *Opportunities in discovery and delivery of anticancer drugs targeting mitochondria and cancer cell metabolism*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2009**, 61 (14), p. 1250-1275

- [48] Cooper, G. M.; Hausman, R.E.; *The cell - a molecular approach*, ASM Press, **2007**, 4th edition
- [49] Nelson, D and Cox, M, *Lehninger Principles of Biochemistry, 3rd Ed*, **2000**, New York, EUA, Worth Publishers.
- [50] Lodish, H; Berk, A; Zipursky, SL; Matsudaira, P; Baltimore, D and Darnell, J, *Molecular Cell Biology*, 4th Edition ed, **2000**, New York, W. H. Freeman.
- [51] Duchen, MR, *Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology*, *Molecular Aspects of Medicine*, **2004**, 25 (4), p. 365-451
- [52] Kroemer, G; Dallaporta, B and Resche-Rigon, M, *The Mitochondrial Death/Life Regulator in Apoptosis and Necrosis*, *Annual Review of Physiology*, **1998**, 60 (1), p. 619-642
- [53] Modica-Napolitano, JS and Singh, K, *Mitochondria as targets for detection and treatment of cancer*, *Expert Reviews in Molecular Medicine*, **2002**, 4 (09), p. 1-19
- [54] Lichtshtein, D; Kaback, HR and Blume, AJ, *Use of a lipophilic cation for determination of membrane potential in neuroblastoma-glioma hybrid cell suspensions*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1979**, 76 (2), p. 650-654
- [55] Hockings, PD and Rogers, PJ, *The measurement of transmembrane electrical potential with lipophilic cations*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1996**, 1282 (1), p. 101-106
- [56] Huang, S-G, *Development of a High Throughput Screening Assay for Mitochondrial Membrane Potential in Living Cells*, *Journal of Biomolecular Screening*, **2002**, 7 (4), p. 383-389
- [57] Modica-Napolitano, JS and Aprille, JR, *Delocalized lipophilic cations selectively target the mitochondria of carcinoma cells*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2001**, 49 (1-2), p. 63-70
- [58] Gommans, GMM; van der Zant, FM; van Dongen, A; Boer, RO; Teule, GJJ and de Waard, JWD, *99mTechnetium-sestamibi scintimammography in non-palpable breast lesions found on screening X-ray mammography*, *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, **2007**, 33 (1), p. 23-27

- [59] Usmani, S; Khan, HA; Niaz, K; Uz-Zaman, M; Niyaz, K; Javed, A; al Mohannadi, S; al Huda, FA and Kamal, S, *Tc-99m-methoxy isobutyl isonitrile scintimammography: imaging postexcision biopsy for residual and multifocal breast tumor*, Nuclear Medicine Communications, **2008**, 29 (9), p. 826-829  
810.1097/MNM.1090b1013e328302c328306
- [60] Mendes, F; Paulo, A and Santos, I, *Metalloprobes for functional monitoring of tumour multidrug resistance by nuclear imaging*, Dalton Transactions, **2011**, 40 (20), p. 5377-5393
- [61] Fuster, D; Vinolas, N; Mallafre, C; Pavia, J; Martin, F and Pons, F, *Tetrofosmin as predictor of tumour response*, Quarterly Journal of Nuclear Medicine, **2003**, 47 (1), p. 58-62
- [62] Mohan, HK and Miles, KA, *Cost-Effectiveness of 99mTc-Sestamibi in Predicting Response to Chemotherapy in Patients with Lung Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis*, Journal of Nuclear Medicine, **2009**, 50 (3), p. 376-381
- [63] Ross, M; Kelso, G; Blaikie, F; James, A; Cochemé, H; Filipovska, A; Da Ros, T; Hurd, T; Smith, R and Murphy, M, *Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology*, Biochemistry (Moscow), **2005**, 70 (2), p. 222-230
- [64] Min, J-J; Biswal, S; Deroose, C and Gambhir, SS, *Tetraphenylphosphonium as a Novel Molecular Probe for Imaging Tumors*, Journal of Nuclear Medicine, **2004**, 45 (4), p. 636-643
- [65] Madar, I; Weiss, L and Izbicki, G, *Preferential Accumulation of 3H-Tetraphenylphosphonium in Non-Small Cell Lung Carcinoma in Mice: Comparison with 99mTc-MIBI*, Journal of Nuclear Medicine, **2002**, 43 (2), p. 234-238
- [66] Steichen, JD; Weiss, MJ; Elmaleh, DR and Martuza, RL, *Enhanced in vitro uptake and retention of 3H-tetraphenylphosphonium by nervous system tumor cells*, Journal of Neurosurgery, **1991**, 74 (1), p. 116-122
- [67] Krause, BJ; Szabo, Z; Becker, LC; Dannals, RF; Scheffel, U; Seki, C; Ravert, HT; Dipaola, AF, Jr. and Wagner, HN, Jr., *Myocardial perfusion with [<sup>11</sup>C]methyl triphenyl phosphonium: measurements of the extraction fraction and myocardial uptake*, J Nucl Biol Med, **1994**, 38 (3), p. 521-526

- [68] Madar, I; Anderson, JH; Szabo, Z; Scheffel, U; Kao, P-F; Ravert, HT and Dannals, RF, *Enhanced Uptake of [<sup>11</sup>C]TPMP in Canine Brain Tumor: A PET Study*, Journal of Nuclear Medicine, **1999**, 40 (7), p. 1180-1185
- [69] Madar, I; Ravert, HT; Du, Y; Hilton, J; Volokh, L; Dannals, RF; Frost, JJ and Hare, JM, *Characterization of Uptake of the New PET Imaging Compound 18F-Fluorobenzyl Triphenyl Phosphonium in Dog Myocardium*, Journal of Nuclear Medicine, **2006**, 47 (8), p. 1359-1366
- [70] Ravert, HT; Madar, I and Dannals, RF, *Radiosynthesis of 3-[<sup>18</sup>F]fluoropropyl and 4-[<sup>18</sup>F]fluorobenzyl triarylphosphonium ions*, Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals, **2004**, 47 (8), p. 469-476
- [71] Madar, I; Ravert, H; Nelkin, B; Abro, M; Pomper, M; Dannals, R and Frost, J, *Characterization of membrane potential-dependent uptake of the novel PET tracer 18F-fluorobenzyl triphenylphosphonium cation*, European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, **2007**, 34 (12), p. 2057-2065
- [72] Zhou, Y and Liu, S, *<sup>64</sup>Cu-Labeled Phosphonium Cations as PET Radiotracers for Tumor Imaging*, Bioconjugate Chemistry, **2011**, p. null-null
- [73] Yang, C-T; Li, Y and Liu, S, *Synthesis and Structural Characterization of Complexes of a DO3A-Conjugated Triphenylphosphonium Cation with Diagnostically Important Metal Ions*, Inorganic Chemistry, **2007**, 46 (21), p. 8988-8997
- [74] Wang, J; Yang, C-T; Kim, Y-S; Sreerama, SG; Cao, Q; Li, Z-B; He, Z; Chen, X and Liu, S, *<sup>64</sup>Cu-Labeled Triphenylphosphonium and Triphenylarsonium Cations as Highly Tumor-Selective Imaging Agents*, Journal of Medicinal Chemistry, **2007**, 50 (21), p. 5057-5069
- [75] Kim, Y-S; Yang, C-T; Wang, J; Wang, L; Li, Z-B; Chen, X and Liu, S, *Effects of Targeting Moiety, Linker, Bifunctional Chelator, and Molecular Charge on Biological Properties of <sup>64</sup>Cu-Labeled Triphenylphosphonium Cations*, Journal of Medicinal Chemistry, **2008**, 51 (10), p. 2971-2984
- [76] Yang, C-T; Kim, Y-S; Wang, J; Wang, L; Shi, J; Li, Z-B; Chen, X; Fan, M; Li, J-J and Liu, S, *<sup>64</sup>Cu-Labeled 2-(Diphenylphosphoryl)ethyltriphenylphosphonium Cations as Highly Selective Tumor Imaging Agents: Effects of Linkers and Chelates on Radiotracer Biodistribution Characteristics*, Bioconjugate Chemistry, **2008**, 19 (10), p. 2008-2022

- [77] Li, Z; Lopez, M; Hardy, Ml; McAllister, DM; Kalyanaraman, B and Zhao, M, *A <sup>99m</sup>Tc-Labeled Triphenylphosphonium Derivative for the Early Detection of Breast Tumors*, *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, **2009**, 24 (5), p. 579-587
- [78] Goldstein, L.J., Galski, H., Fojo, A., Willingham, M. et. Al., *Expression of a multidrug resistance gene in human cancers*. *J Natl Cancer Inst* 81: **1989**, 116-124
- [79] Dano, K. *Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells*. *Biochim Biophys Acta* 323: **1973**, 466-483
- [80] Juliano, R.L. and Ling. V., *A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutant*. *Biochim Biophys Acta* 455: **1976**, 152-162
- [81] Doyle, L.A. and Ross, D., *Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2)*. *Oncogene* 22: **2003**, 7340-7358
- [82] Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T., and Housman, D.E., *p-53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents*. *Cell* 74: **1993**, 957-967
- [83] V.Sharma, *Bioconjugate Chem.*, **2004**,15,1464-1474
- [84] Mendes F.,Gano L.,Fernades C.,Paulo A.,Santos I,*Studies of myocardial uptake and excretion mechanisms of a novel <sup>99m</sup>Tc heart perfusion agent*. *Nuclear Medicine and Biology*, **2012**, 39, 207-213
- [85] Parker, R.J.; Eastman A.; Bostick-Bruton F.; Reed, E., *Acquired Cisplatin Resistance in Human Ovarian Cancer Cells Is Associated with Enhanced Repair of Cisplatin-DNA Lesions and Reduced Drug Accumulation*, *The American Society for Clinical Investigation, Inc.*,**1991**,87, 772-777
- [86] Leonor Maria; Célia Fernandes; Raquel Garcia, Lurdes Gano; António Paulo; Isabel C. Santos and Isabel Santos; *Tris(pyrazolyl)methane <sup>99m</sup>Tc tricarbonyl complexes for myocardial imaging; Communication for Dalton Transactions*, *The Royal Society of Chemistry* **2009**, p. 603-606
- [86'] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=4274>
- [87] Modica-Napolitano, JS and Aprille, JR, *Basis for the Selective Cytotoxicity of Rhodamine 123*, *Cancer Research*, **1987**, 47 (16), p. 4361-4365

- [88] Davis, S; Weiss, MJ; Wong, JR; Lampidis, TJ and Chen, LB, *Mitochondrial and plasma membrane potentials cause unusual accumulation and retention of rhodamine 123 by human breast adenocarcinoma-derived MCF-7 cells*, Journal of Biological Chemistry, **1985**, 260 (25), p. 13844-13850
- [89] Bussolati, O; Laris, PC; Longo, N; Dall'Asta, V; Franchi-Gazzola, R; Guidotti, GG and Gazzola, GC, *Effect of extracellular potassium on amino acid transport and membrane potential in fetal human fibroblasts*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, **1986**, 854 (2), p. 240-250
- [90] Chiu, ML; Kronauge, JF and Piwnica-Worms, D, *Effect of Mitochondrial and Plasma Membrane Potentials on Accumulation of Hexakis (2-Methoxyisobutylisonitrile)Technetium(I) in Cultured Mouse Fibroblasts*, Journal of Nuclear Medicine, **1990**, 31 (10), p. 1646-1653
- [91] Piwnica-Worms, D; Kronauge, J and Chiu, M, *Uptake and retention of hexakis (2-methoxyisobutyl isonitrile) technetium(I) in cultured chick myocardial cells. Mitochondrial and plasma membrane potential dependence*, Circulation, **1990**, 82 (5), p. 1826-1838
- [92] Johnson, LV; Walsh, ML; Bockus, BJ and Chen, LB, *Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy*, The Journal of Cell Biology, **1981**, 88 (3), p. 526-535
- [93] Safiulina, D; Veksler, V; Zharkovsky, A and Kaasik, A, *Loss of mitochondrial membrane potential is associated with increase in mitochondrial volume: Physiological role in neurones*, Journal of Cellular Physiology, **2006**, 206 (2), p. 347-353
- [94] Reed, PW, *Ionophores*, Methods Enzymol, **1979**, 55, p. 435-454
- [95] Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W., *Fundamentals of biochemistry*, Jonh Wiley & Sons, Inc, **1999** (p 272-273).
- [96] Kim, D.; Smith, T. W., *Effects of amiloride and oubain on contrarctile state, Ca and Na fluxes, and Na content in cultured chick heart cells*, *Mol Pharmacol*, **1986**, 29, 363-371.
- [97] Hanstein, WG, *Uncoupling of oxidative phosphorylation*, Biochim Biophys Acta, **1976**, 456 (2), p. 129-148
- [98] Escobales, N.; Canessa, M., *Amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> transport in human red cells: evidence for Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange system*, *J Membrane Biol*, **1986**, 90, 21-28

- [99] Bend, D.J., *Amiloride: a molecular probe of sodium transport in tissues and cells*, *Am J Physiol*, **1982**, 242, 131-145
- [100] Weiss, E.; Lang, H.; Bernhardt, I., *Inhibitors of the  $K^+(Na^+)/H^+$  exchange of human red blood cells*. *Bioelectrochemistry*, **2004**, 62: 135-140.
- [101] Williams, JA, *Origin of transmembrane potentials in non-excitabile cells*, *Journal of Theoretical Biology*, **1970**, 28 (2), p. 287-296
- [102] Horres, CR; Aiton, JF and Lieberman, M, *Potassium permeability of embryonic avian heart cells in tissue culture*, *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, **1979** , 236(3), 1