

27/4/79



**MARCAÇÃO DA BLEOMICINA COM TECNÉCIO-99m PARA  
DIAGNÓSTICO EM MEDICINA NUCLEAR**

**José Carlos Nassuta**

**DISSERTAÇÃO E TESE - IEA 150  
IEA - DT - 150**

**FEVEREIRO/1979**

**CONSELHO DELIBERATIVO**

**MEMBROS**

Klaus Reinach – Presidente  
Roberto D'Utra Vaz  
Helcio Modesto da Costa  
Ivano Humbert Marchesi  
Admar Cervellini

**PARTICIPANTES**

Regina Elisabete Azevedo Beretta  
Flávio Gori

**SUPERINTENDENTE**

Rômulo Ribeiro Pieroni

DISSERTAÇÃO E TESE - IEA 150  
IEA - DT - 150

FEVEREIRO/1979

**MARCAÇÃO DA BLEOMICINA COM TECNÉCIO-99m PARA  
DIAGNÓSTICO EM MEDICINA NUCLEAR**

José Carlos Nassute

Disser-tação para obtenção do Título de "Mestre -  
Área Tecnologia Nuclear" - Orientador Dra. Constância  
Pagano Gonçalves da Silva. Apresentada e defendida  
em 17 de agosto de 1978, no Instituto de Energia Atômica.

INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA  
SÃO PAULO - BRASIL

Série DISSERTAÇÃO E TESE IEA

**INIS Categories and Descriptors**

**B13**

**C21**

**Bleomycin**

**Antimitotic drugs**

**Labelling**

**Technetium 99**

**Labelled compounds**

**Quality control**

**Distribution**

**Scintiscanning**

**Excretion**

---

**Nota: A redacção, ortografia e conceitos são de responsabilidade dos autores.**

## SUMÁRIO

	Página
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 – Uso de Radioisótopos em Medicina Nuclear .....	1
1.2 – Uso de Antibióticos-Antineoplásicos em Terapêutica e Diagnóstico .....	4
1.3 – Objetivos .....	6
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>6</b>
11.1 – Material .....	6
11.1.1 – Bleomicina .....	6
11.1.2 – Tecnécio-99m .....	7
11.1.3 – Cloreto Estanoso Bihidratado .....	7
11.1.4 – Animais .....	7
11.1.5 – Equipamentos .....	7
11.2 – Métodos .....	7
11.2.1 – Preparação da Solução de Cloreto Estanoso .....	7
11.2.2 – Preparação da Solução de Bleomicina .....	7
11.2.3 – Preparação dos “Kits” Bleomicina/Estanho .....	8
11.2.4 – Liofilização .....	8
11.2.5 – Marcação dos “Kits” com <sup>99m</sup> Tc .....	8
11.2.5.1 – Reação <sup>99m</sup> Tc/Sn(II)/Bleomicina .....	8
11.2.5.2 – Controle de Pureza Radioquímica .....	8
11.2.5.3 – Distribuição Biológica .....	8
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>RESULTADOS E CONCLUSÕES</b> .....	<b>8</b>
111.1 – Ensaios Preliminares .....	10
111.1.1 – Marcação de Bleomicina .....	10
111.1.2 – Estabilidade de BLM- <sup>99m</sup> Tc em Função do Tempo .....	10

III.1.3 – Estabilidade da BLM- <sup>99m</sup> Tc em Função do pH .....	10
III.2 – Marcação dos “Kits” .....	10
III.2.1 – Influência da Relação em Massa entre Estanho e a Bleomicina no Rendimento de Marcação .....	10
III.2.2 – Influência do pH no Rendimento de Marcação .....	10
III.2.3 – Influência do Tempo de Reação entre o Íon Pertecnetato e o “Kit” (Sn(II)/BLM), no Rendimento de Marcação .....	17
III.3 – Controle de Qualidade do Produto Marcado .....	17
III.3.1 – Controle de Pureza Radioquímica .....	17
III.3.2 – Estabilidade Físico-Química dos “Kits” .....	17
III.3.3 – Estabilidade da BLM- <sup>99m</sup> Tc em Função do Tempo .....	23
III.3.4 – Esterilidade do Produto Marcado .....	23
III.3.5 – Toxicidade da Bleomicina para Animais .....	23
III.3.6 – Distribuição Biológica .....	23
III.3.6.1 – Concentração do Produto Marcado em Tecidos Tumoriais .....	26
III.3.6.2 – Especificidade do Produto Marcado .....	26
III.4 – Conclusões .....	26
III.4.1 – Características dos “Kits” .....	26
III.4.2 – Marcação dos “Kits” .....	26
III.4.3 – Eliminação de Óxidos e Quelatos Insolúveis .....	31
III.4.4 – Distribuição Biológica .....	31
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	 31

# MARCAÇÃO DA BLEOMICINA COM TECNÉCIO-99m PARA DIAGNÓSTICO EM MEDICINA NUCLEAR

José Carlos Nassute

## RESUMO

Estudou-se, ~~para avaliar~~ o rendimento de marcação de um anti-cancerígeno (bleomicina) com um radioisótopo de meia vida curta ( $^{99m}\text{Tc}$ ), usando como agente redutor o Sn(II).

Analisaram-se os parâmetros: o pH de marcação, a influência do tempo de reação e da massa de estanho no rendimento de marcação.

Para tornar mais prática a marcação, prepararam-se "kits" de Sn(II)/BLM, liofilizados em frascos evacuados.

Fiz-se controles de qualidade, que envolveram técnicas cromatográficas em papel, controle de esterilidade e ensaios "in vivo". Estes últimos foram efetuados em ratos sob sono barbitúrico, tanto em animais saudáveis como em animais portadores de tecidos tumorais.

Fiz-se um estudo de distribuição biológica, do tempo de concentração do produto nos tumores, do tempo e via de excreção, por meio de cintilogramas e cintifotos.

## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO

#### 1.1 - Uso de Radioisótopos em Medicina Nuclear

Durante a última década, com o desenvolvimento da tecnologia nuclear no campo da medicina, puderam os especialistas deste setor, contar com um número cada vez maior de radioisótopos primários ou "ligados" a moléculas, para uso em diagnóstico e terapêutica.

É no campo do diagnóstico que surge o maior número de radioisótopos, destacando-se entre estes os que se destinam à localização de processos tumorais e suas metástases. Nos últimos anos têm sido usados com relativo sucesso o  $^{57}\text{Co}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{197}\text{Hg}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{99m}\text{Tc}$  e outros<sup>(15)</sup>.

Entretanto, o uso de alguns radioisótopos torna-se limitado por causa de diversos fatores de ordem química, física ou biológica, a saber: toxicidade química, energia de radiação alta, meia-vida efetiva longa, afinidade do elemento com certos tipos de tecidos e por último a dificuldade de obtenção<sup>(18)</sup>.

Com o advento e aperfeiçoamento dos denominados geradores de radioisótopos de meia-vida curta, os centros de Medicina Nuclear, que por cause de distância dos reatores e ciclotrons viam suas atividades tolhidas, puderam desenvolver-se rapidamente.

Aprovada para publicação em Fevereiro/1979.

Dentre todos os pares (pai-filho) usados atualmente, vem-se destacando na preferência dos especialistas o  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  (22) por causa das características físicas e biológicas do  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (Figura 1.1). O  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  é eluído do gerador sob a forma de pertecnetato de sódio ( $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ ), que mostrou ser capaz de ligar-se à fração proteica do soro e concentrar-se em certos órgãos da cabeça e pescoço. O  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  sob a forma de pertecnetato é usado para cintilografia do cérebro, tireóide e glândulas salivares<sup>(17)</sup>.

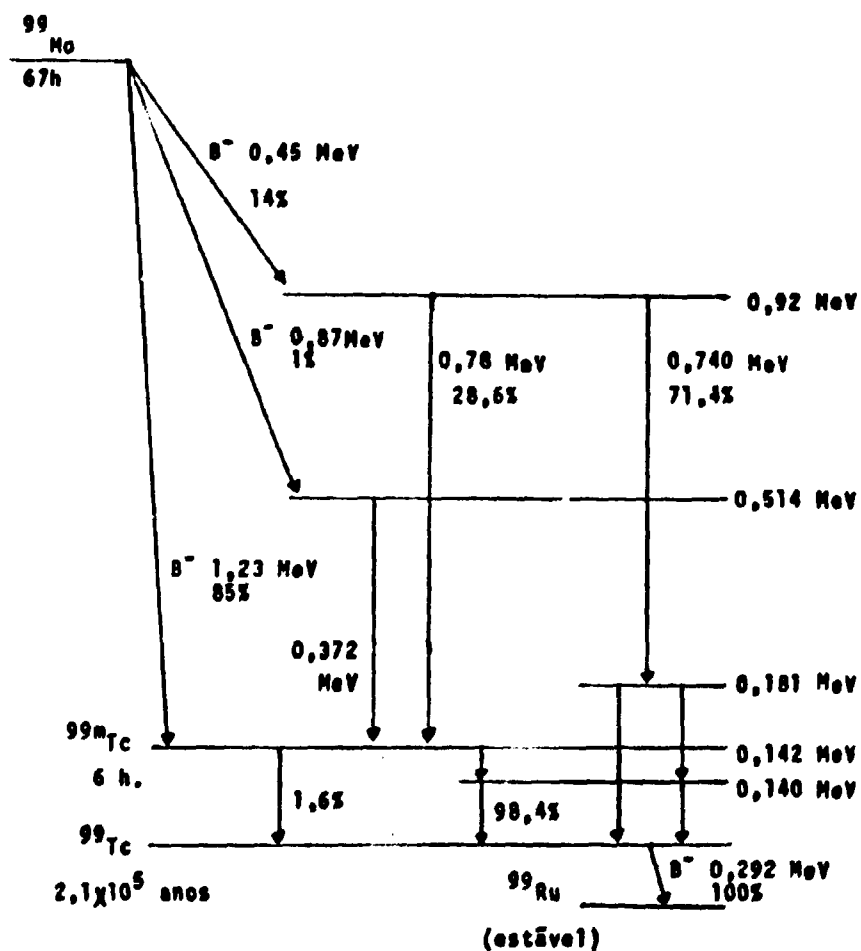


Figura 1.1 - Esquema de decaimento do  $^{99}\text{Mo}$



Posteriormente, prepararam-se colóides marcados com  $^{99m}\text{Tc}$ , usando-se gás sulfídrico<sup>(21)</sup> ou cloreto estanoso anidro, que se destinam a cintilografias hepáticas<sup>(10)</sup>.

O  $^{99m}\text{Tc}$  tem uma meia-vida de seis horas, sendo um mono-emissor gama de 140 keV, originando-se do decaimento do  $^{99}\text{Mo}$ . O  $^{99m}\text{Tc}$  por sua vez decai para o  $^{99}\text{Tc}$ , que por ter uma meia-vida de  $2,1 \times 10^5$  anos poderia ser um problema grave do ponto de vista da proteção radiológica. Entretanto, um mCi de  $^{99m}\text{Tc}$  produz somente  $3,3 \times 10^{-6}$   $\mu\text{Ci}$  de  $^{99}\text{Tc}$ , que decai por sua vez para  $^{99}\text{Ru}$  (estável) por emissão de elétrons. Supondo que toda a dose (1 mCi) ficasse retida indefinidamente no organismo, isso representaria expor o corpo inteiro a uma dose anual de  $1,5 \times 10^{-7}$  rads.

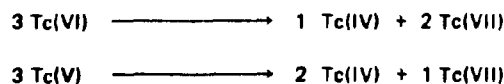
Pelo fato do íon pertecnetato ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) ter um raio iônico e carga igual ao íon iodeto, o comportamento biológico e distribuição no organismo humano são semelhantes. A distribuição do  $^{99m}\text{Tc}$  no organismo é rápida e se dá através do fluido extra-celular, concentrando-se na tireóide, glândulas salivares, plexo coróide e estômago. Verificou-se também que o íon pertecnetato é estável e não reage quando em contato com os sistemas biológicos.

O  $^{99m}\text{Tc}$  pode se apresentar em vários estados de oxidação, desde +7 a -1, sendo que os estados mais estáveis quimicamente falando são o +7 e +4. As formas mais reduzidas apresentam capacidade de complexar ou quelar com moléculas existentes no meio aquoso<sup>(16)</sup>.

O íon pertecnetato pode ser reduzido aos estados de oxidação seguintes:



O Tc(IV) é o mais estável depois do Tc(VII) sendo que os estados intermediários tendem a desproporcionar dando misturas de Tc(IV) e Tc(VII):



O tecnécio nos estados intermediários e nos estados de oxidação mais baixos podem existir em solução aquosa quando estabilizados como quelatos ou complexos.

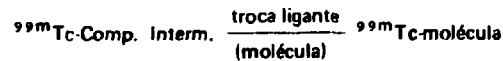
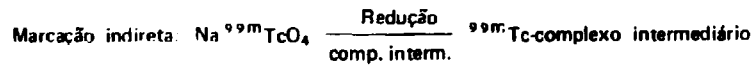
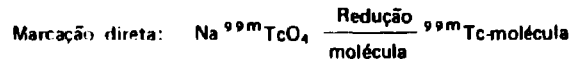
A ligação coordenada covalente é essencial para a existência em meio aquoso daqueles estados de oxidação, que a redução e a formação de complexos podem ser considerados como um processo simultâneo.

Os produtos de redução do pertecnetato dependem: da força do agente redutor, da afinidade de grupos complexantes disponíveis e da concentração desses grupos. Estes fatores relacionam-se de tal maneira que, em algumas reações de redução são produzidos estados múltiplos de oxidação.

Os íons  $\text{OH}^-$  e o  $\text{H}_2\text{O}$  têm grande afinidade por tecnécio reduzido competindo com outros grupos complexantes, sendo os produtos da reação influenciados pelo pH e talvez até mesmo pela força iônica do meio. A marcação de moléculas orgânicas ocorre quando o composto a ser marcado acha-se disponível para complexar com o tecnécio, à medida que ocorre a redução.

A marcação também pode ocorrer por uma troca de ligantes, em que a molécula a ser marcada desloca grupos de um complexo intermediário de Tc menos estável.

Portanto, esquematizando tem-se:



Os complexos de tecnécio reduzido têm tendência a hidrolizar-se formando compostos insolúveis como o dióxido de tecnécio ( $\text{TcO}_2$ ), ou a oxidar-se e desproporcionar reformando íons pertecnetato.

Os óxidos insolúveis concentram-se no fígado<sup>(20)</sup>, baço e no sistema retículo endotelial da medula óssea, enquanto que o íon pertecnetato vai para a tireóide, glândulas salivares, estômago e plexo coróide.

Ultimamente, o interesse dos cientistas voltou-se para compostos que tivessem propriedade de formar quelatos ou complexar com o  $^{99m}\text{Tc}$  e que fossem úteis para uso em provas funcionais ou cintilografias, a saber: ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), ácido dietilenotriamino pentaacético (DTPA), manitol, penicilamina-acetozolamina, citrato, tetraciclina, inulina, glucoheptonato, trifosfatos, polifosfatos, pirofosfatos e outros<sup>(4)</sup>.

O DTPA é usado para estudo da filtração glomerular nos rins<sup>(14)</sup>, o manitol e o gluconato para cintilografias renais<sup>(17)</sup>, o citrato e a inulina, também, são usados para estudo da filtração glomerular<sup>(11)</sup>, os fosfatos na visualização do esqueleto, a tetraciclina no diagnóstico tumoral e enfarte do miocárdio.

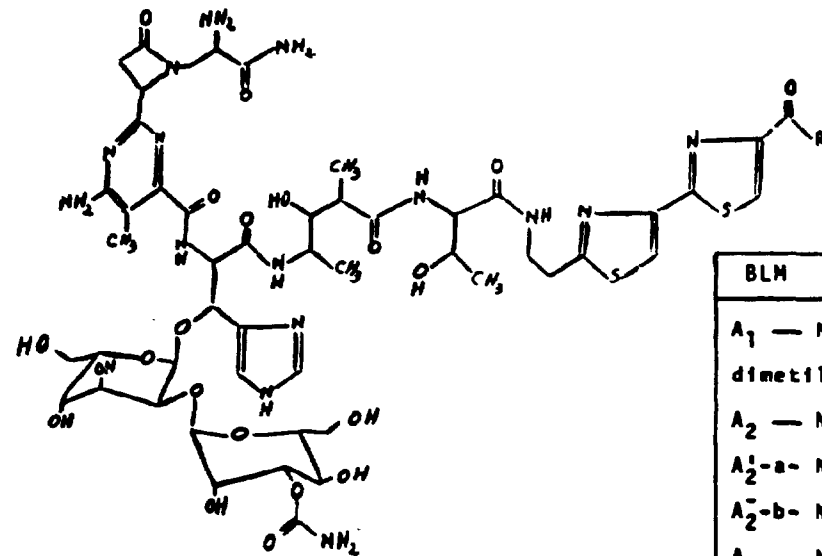
## 1.2 – Uso de Antibióticos-Antineoplásicos em Terapêutica e Diagnóstico

Na segunda metade da década de 1950, durante a investigação sobre a obtenção de alguns grupos de antibióticos de alto peso molecular, (mais de 1000) verificou-se que o da bleomicina tinha capacidade peculiar de inibir o desenvolvimento de tumores em animais, principalmente do tipo do Carcinoma de Ehrlich.

Grande parte desses antibióticos é extraída de várias cepas ou linhagens de um gênero de fungo denominado *Streptomyces*. Assim do "*Streptomyces verticillus*", obtém-se a bleomicina<sup>(23)</sup>.

A bleomicina, dentre todos os produtos do grupo da fleomicina, é que mostra maior estabilidade em pH alcalino e ácido. Quimicamente, a bleomicina é uma mistura complexa de moléculas diversas denominadas:  $A_1$ ,  $A_2$ , Dimetil- $A_2$ ,  $A'_{2-a}$ ,  $A'_{2-b}$ ,  $A'_{2-c}$ ,  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_4$ ,  $A_6$  e  $A_8$ . Fundamentalmente, trata-se de uma estrutura polipeptídica (glicopeptídeo), à qual se ligam vários radicais amínicos, que definem as características de cada bleomicina.

Pelo fato do composto ser uma mistura com porcentagens diferentes das várias bleomicinas, conforme sua origem, o peso molecular está em torno de 1400/1600. A Figura 2.2 apresenta a fórmula da bleomicina.



R = Radicais Amínicos

BLM	Radical Amínico
A <sub>1</sub>	NH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -SO-CH <sub>3</sub>
dimetil A <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -S-CH <sub>3</sub>
A <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -S-(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> X <sup>-</sup>
A <sub>2</sub> <sup>1</sup> -a	NH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>
A <sub>2</sub> <sup>1</sup> -b	NH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>
A <sub>5</sub>	NH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub>
A <sub>6</sub>	NH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -NH <sub>2</sub>
B <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -NH-C-NH <sub>2</sub>   NH
B <sub>4</sub>	NH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -NH-C-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -NH-C-NH <sub>2</sub>     NH NH

Figura 2.2 - Fórmula estrutural da Bleomicina

O produto apresenta alta especificidade em inibir o desenvolvimento de tumores em tecidos de origem célula-epitelial (ectoderma). Apesar das pesquisas não terem chegado a conclusões definitivas, já se pode afirmar que o sítio da ação da bleomicina está localizado ao nível da síntese do ácido desoxirribo-nucleico (ADN), bloqueando-a nos núcleos das células tumorais de modo específico<sup>(8)</sup>.

A bleomicina "in natura", isto é, antes de ser purificado por cromatografia em alumina, apresenta-se quelada com átomos de cobre na proporção de 0,08%. Verificou-se, também, que todas as espécies de bleomicina têm uma absorção semelhante na região ultravioleta, com um máximo situado entre 244 nm e 295 nm<sup>(23)</sup>. Observou-se que a dose letal média (LD<sub>50</sub>) para camundongos é de 125 mg/kg e para ratos é de 312 mg/kg.

Outra vantagem da bleomicina é o fato dela raramente se concentrar em processos inflamatórios, ao contrário do que ocorre com outros produtos complexados com radioisótopos, ou com estes últimos sob forma elementar, a saber: <sup>67</sup>Ga, <sup>111</sup>In, <sup>169</sup>Yb e outros<sup>(12)</sup>.

### 1.3 – Objetivos

Há vários anos vem sendo experimentada a quelação da bleomicina com alguns cátions bi e trivalentes<sup>(18)</sup>: <sup>111</sup>In, <sup>67</sup>Ga, <sup>67</sup>Cu, <sup>169</sup>Yb, <sup>203</sup>Pb e o <sup>57</sup>Co<sup>(15)</sup>. Dentre todos, o que mostrou ser mais estável foi o quelato formado com o <sup>57</sup>Co, mas que para uso em rotina mostrou-se impróprio, por causa de sua meia-vida longa (269 d).

Surgiu em seguida a necessidade de preparar a bleomicina marcada com <sup>99m</sup>Tc<sup>(15,12,18)</sup>, por causa das características nucleares favoráveis deste radioisótopo.

A bleomicina ligada ao Tc é capaz de detectar tumores em tecidos de origem não epitelial, enquanto que a bleomicina não marcada tem seu uso terapêutico restrito aos processos neoplásicos em tecidos de origem ectodérmica, fazendo crer que a complexação com o <sup>99m</sup>Tc, modifica suas características biodinâmicas<sup>(4)</sup>.

Neste trabalho procura-se padronizar um método simples e rápido para marcação de um composto anticancerígeno, com um radioisótopo de meia-vida curta, com o objetivo de obter um meio eficaz e seguro para uso em diagnóstico tumoral. Estudam-se diversas variáveis, a saber: pH para complexação, relação das massas do redutor Sn(II) e da bleomicina, e tempo de reação.

Analisa-se a estabilidade do composto marcado e a distribuição biológica em animais. Faz-se uso de uma técnica simples e rápida para detectar impurezas radioquímicas, e finalmente prepara-se um "kit" de Sn/bleomicina sob forma liofilizada para emprego em ensaios radioquímicos e "in vivo".

## CAPÍTULO II

### MATERIAL E MÉTODOS

#### II.1 – Material

##### II.1.1 – Bleomicina

Utilizou-se a bleomicina liofilizada, na forma de sulfato. Essa bleomicina produzida pela Laboratório Bristol S/A Indústria Química e Farmacêutica é fornecida em ampolas.

Quimicamente, trata-se de uma mistura que contém aproximadamente 55% de bleomicina  $A_2$ , 27% de  $B_2$ , 9% de  $A_1$  e 3% de  $DMA_2$ , livre de cobre<sup>(5)</sup>. Apresenta-se como um pó branco, cristalino, de baixa densidade, solúvel em água e metanol, pouco solúvel em etanol, acetona e éter.

### II.1.2 – Tecnécio-99m

O  $^{99m}\text{Tc}$  usado neste trabalho proveio de um gerador tipo Ultra-Technekow-FM (Mallinckrodt Nuclear) contendo  $^{99}\text{Mo}$  obtido por fissão do  $^{235}\text{U}$ . O gerador é constituído por uma coluna de alumina na qual é fixado o  $^{99}\text{Mo}$ , sendo o tecnécio eluído com solução salina isotônica ( $\text{NaCl}$  0,9%), estéril, apirogênica, na forma de pertecnetato de sódio.

### II.1.3 – Cloreto Estanoso Bihidratado

O  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  usado é de origem americana (J. T. Baker), com grau de pureza 98,0 – 102%.

### II.1.4 – Animais

Usaram-se ratos (*Rattus norvegicus*, variedade Albinus), provenientes de colônias mantidas no biotério do Centro de Aplicações Médicas de Radioisótopos e Radiações – Área de Radiobiologia do Instituto de Energia Atômica, alimentados com ração comercial padrão.

### II.1.5 – Equipamentos

Câmara estanque, tipo "Glove box", conectada a um torpedo de nitrogênio gasoso, e dotada de filtros de ar na entrada e saída, e de luz ultravioleta.

Liofilizador marca Virtis, modelo 10-146 MR-BA, com cabeça dotada de dispositivo para fechamento de frascos em que se fez vácuo, previamente.

- Gama câmara (Fogama), tipo HP da Nuclear Chicago.
- Mapeador de corpo inteiro Scintimatic tipo 2F da Siemens.
- Contador de esteira, modelo Ultrascaler II da Nuclear Chicago (cristal de NaI ativado com Tl).
- Mediac modelo 6362 da Nuclear Chicago.

## II.2 – Métodos

### II.2.1 – Preparação da Solução de Cloreto Estanoso

Dissolveram-se 5 mg de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  em 50 mililitros de  $\text{HCl}$  1N, obtendo-se uma solução com uma concentração de  $50 \mu\text{g}$  de  $\text{Sn(II)}$  por mililitro. A operação foi realizada em ambiente saturado de nitrogênio gasoso. A dissolução do cloreto estanoso em  $\text{HCl}$  1N se fez com borbulhamento ininterrupto de  $\text{N}_2$ , durando esta operação 15 minutos.

### II.2.2 – Preparação da Solução de Bleomicina

Dissolveram-se 10 mg da bleomicina (conteúdo de uma ampola comercial), em um mililitro de água destilada em temperatura ambiente. A unidade usada na terapêutica para a bleomicina, denomina-se mg/potência, cuja equivalência com o mg/peso é: 1,5 mg/potência = 1,0 mg/peso.

### 11.2.3 – Preparação dos “Kits” Bleomicina/Estanho

Dois mililitros da solução de cloreto estano (item 11.2.1) contendo 100 µg de Sn(II), foram adicionados à solução aquosa de bleomicina (10 mg/ml). Percolou-se esta solução por filtro esterilizante Millipore 0,22 µ e dividiu-se a solução (3 ml) em três porções iguais de um mililitro, resultando 3,3 mg de bleomicina para 33 µg de Sn(II) em cada frasco.

Os frascos usados são do tipo penicilina de 10 ml de capacidade, sendo fechados manualmente com tampas especiais de borracha, para posterior vedação e produção de vácuo no liofilizador.

### 11.2.4 – Liofilização

Colocaram-se os frascos tipo penicilina imediatamente no banho do liofilizador a -20°C, af permanecendo por dez minutos, tempo necessário para o congelamento da solução. Retirados do banho, os frascos foram introduzidos no interior da cabeça do liofilizador, onde sob vácuo de 50 µl de ar no mínimo, obteve-se um produto liofilizado após cinco horas de operação. Os frascos são fechados ainda dentro do aparelho, usando-se para isso um dispositivo a ar comprimido. Após esta operação colocaram-se os “kits” sob refrigeração normal (+ 4°C).

### 11.2.5 – Marcação dos “Kits” com <sup>99m</sup>Tc

#### 11.2.5.1 – Reação <sup>99m</sup>Tc/Sn(II)/Bleomicina

Usou-se <sup>99m</sup>Tc de concentração radioativa em torno de 10 mCi/ml e contido num volume nunca superior a quatro mililitros. Se o volume eluído do gerador de <sup>99m</sup>Tc, fosse muito reduzido ou maior que 4 ml, fazia-se necessário um acerto do pH, usando solução de HCl 0,1 N ou de NaOH 0,1 N, ou adicionando-se NaCl 0,9% até o pH chegar ao desejado (2,0/2,5). Após agitação moderada por cerca de 15 minutos passou-se a solução por filtro esterilizante Millipore 0,22 µ.

#### 11.2.5.2 – Controle da Pureza Radioquímica

Inicialmente, fizeram-se os controles de pureza radioquímica do produto marcado por cromatografia ascendente em papel Whatman n.1, utilizando-se diversos solventes, a saber: solução de cloreto de amônia a 10%, metanol em solução aquosa a 85%, solução de cloreto de sódio a 0,9% e por último a metil etil cetona.

Infelizmente, estes métodos revelaram-se falhos e imprecisos, além do que o tempo relativamente longo (1 a 2 h) para a corrida do cromatograma, provocava reoxidação do <sup>99m</sup>Tc(IV) a <sup>99m</sup>Tc(VII), adulterando os resultados.

Adotou-se posteriormente a técnica cromatográfica “Michrom”<sup>(3)</sup>, que consiste na justaposição de dois processos cromatográficos, usando como solvente acetona e solução salina (NaCl 0,9%). Como fase estacionária (suporte), usaram-se tiras de celulose embebidas em sílica gel, medindo cada uma delas 57 mm de comprimento por 7 mm de largura.

Numa das tiras (A), usou-se por solvente a solução salina, na outra tira (B), a acetona. Na tira (A), fez-se um traço demarcatório a 20 mm da base, tendo-se pois uma secção A<sub>1</sub> até este traço e

secção  $A_2$  do traço até o topo da fita. Na tira (B) (acetona), fez-se um traço demarcatório a 17 mm do topo, e chamou-se a esta secção de  $B_2$ , e a que vai do traço até a base, de  $B_1$ .

As tiras foram posteriormente embebidas em uma suspensão de sílica gel a 6% (60-200 "mesh" – grau 62) e secas ao ar. Para melhor visualização da corrida, pode-se colocar uma gota de um corante solúvel; na tira (A), o metil orange e na tira (B) a violeta de genciana, ambas a 10 mm da base.

Após a secagem, as tiras foram guardadas em dessecadores, para posterior uso. Colocaram-se de cinco a dez microlitros da amostra a analisar nos pontos corados (tanto em A como em B), deixou-se secar. Em seguida, puseram-se as tiras em pequenos tubos de ensaio, com solvente até altura de 2 mm, mantendo-se os tubos na posição vertical.

Não houve necessidade de se fechar os tubos, pois a saturação é rápida. A corrida levou em média 60 segundos, finda a qual retiraram-se as tiras, secaram-se e seccionaram-se nos traços divisórios, obtendo portanto duas secções. Registraram-se as atividades das secções, e fez-se o cálculo da porcentagem de  $^{99m}\text{Tc}$  em suas diferentes formas químicas de acordo com as expressões:

$$^{99m}\text{Tc} \text{ reduzido, mas não complexado} = \frac{A_1}{(A_1 + A_2)} \times 100\%$$

$$^{99m}\text{TcO}_4^- \text{ livre} = \frac{B_2}{(B_1 + B_2)} \times 100\%$$

$$^{99m}\text{Tc} \text{ complexado} = 100\% - (^{99m}\text{Tc} \text{ reduzido} + ^{99m}\text{Tc} \text{ Livre}) \text{ ou}$$

$$(^{99m}\text{Tc(IV)} + ^{99m}\text{TcO}_4^-)$$

### II.2.5.3 – Distribuição Biológica

Fizeram-se estudos de distribuição biológica em ratos (pesando 200 g aproximadamente) saudáveis e com tumores espontâneos, sendo o produto marcado introduzido no organismo do animal por meio de injeção intravenosa em veias do péris ou da cauda.

As doses injetadas foram de  $100 \mu\text{Ci}$  a  $1 \text{ mCi}$ , com a massa de bleomicina variando de  $0,5 \text{ mg}$  a  $2,0 \text{ mg}$ . Os animais quando da execução dos cintilogramas, achavam-se sob sono barbitúrico e deitados de dorso em placa fixadora especial.

Fizeram-se cintilogramas logo após injeção, e em intervalos de tempo variáveis (15', 30', 60', 120' e 180'). Utilizou-se produto marcado com ou sem passagem prévia por Millipore  $0,22 \mu$ . Fez-se um ensaio de concentração do  $^{99m}\text{Tc}$ -BLM em intervalos de tempo convenientes (até o máximo de 6 h), usando o Fogema acoplado a uma Polaroid, para obtenção de imagens fotográficas.

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS E CONCLUSÕES

#### III.1 – Ensaios Preliminares

##### III.1.1 – Marcação da Bleomicina

Fez-se inicialmente a marcação de 5 mg de bleomicina, usando 100 µg de cloreto estanozo ( $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) e 14 mCi de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  contido em 2 ml de solução de NaCl 0,9%.

Para o controle de pureza radioquímica, usou-se cromatografia ascendente em papel Whatman n.1, utilizando como solvente o metanol 75%. Segundo LIN e GOODWIN<sup>(9)</sup>, a bleomicina marcada se espalha do Rf 0,0 a 0,6, enquanto o pertecnato não reduzido ( $\text{TcO}_4^-$ ) se situa entre 0,6 e 0,78. A Figura 3.3 mostra os resultados obtidos.

##### III.1.2 – Estabilidade da BLM- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ em Função do Tempo

Fez-se o ensaio de estabilidade do composto em relação ao tempo de marcação, sendo o controle realizado por cromatografia em papel conforme III.1.1, após 24 horas e 48 horas. A Figura 3.4, mostra que o composto é estável nesse período de tempo.

##### III.1.3 – Estabilidade da BLM- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ em Função do pH

Analisou-se a estabilidade do produto a posteriores alterações do pH, usando-se hidróxido de sódio 0,1 N. Os resultados indicaram uma gradual decomposição do composto com o aumento do pH, fato este evidenciado pela elevação na porcentagem de tecnécio livre ( $\text{TcO}_4^-$ ) conforme mostra a Figura 3.5.

#### III.2 – Marcação dos “Kits”

##### III.2.1 – Influência da Relação em Massa entre Estanho e a Bleomicina no Rendimento de Marcação

Para esse estudo utilizou-se a técnica especificada em II.2.5.1 e a cromatografia “Michrom” para determinação das porcentagens de bleomicina- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , de tecnécio na forma de pertecnato e de tecnécio reduzido, conforme apresentado no item II.2.5.2.

Nesse ensaio a massa de bleomicina foi mantida inalterada (3,3 mg), o tempo de reação foi de 15 minutos e variou-se a massa de estanho em cada “kit”. Usando sempre pertecnato de sódio com concentração radioativa de aproximadamente 10 mCi/ml, obteve-se resultado que indica ser a relação 1:132(Sn/BLM) a mais adequada, conforme pode-se observar pela Figura 3.6.

##### III.2.2 – Influência do pH no Rendimento de Marcação

Para esse estudo utilizou-se a técnica especificada em II.2.5.1, com 3,3 mg de bleomicina, tempo de reação 15 minutos e pH variando de 2 a 8. Usou-se a cromatografia “Michrom” para determinação do  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -bleomicina, do íon pertecnato e das formas reduzidas.



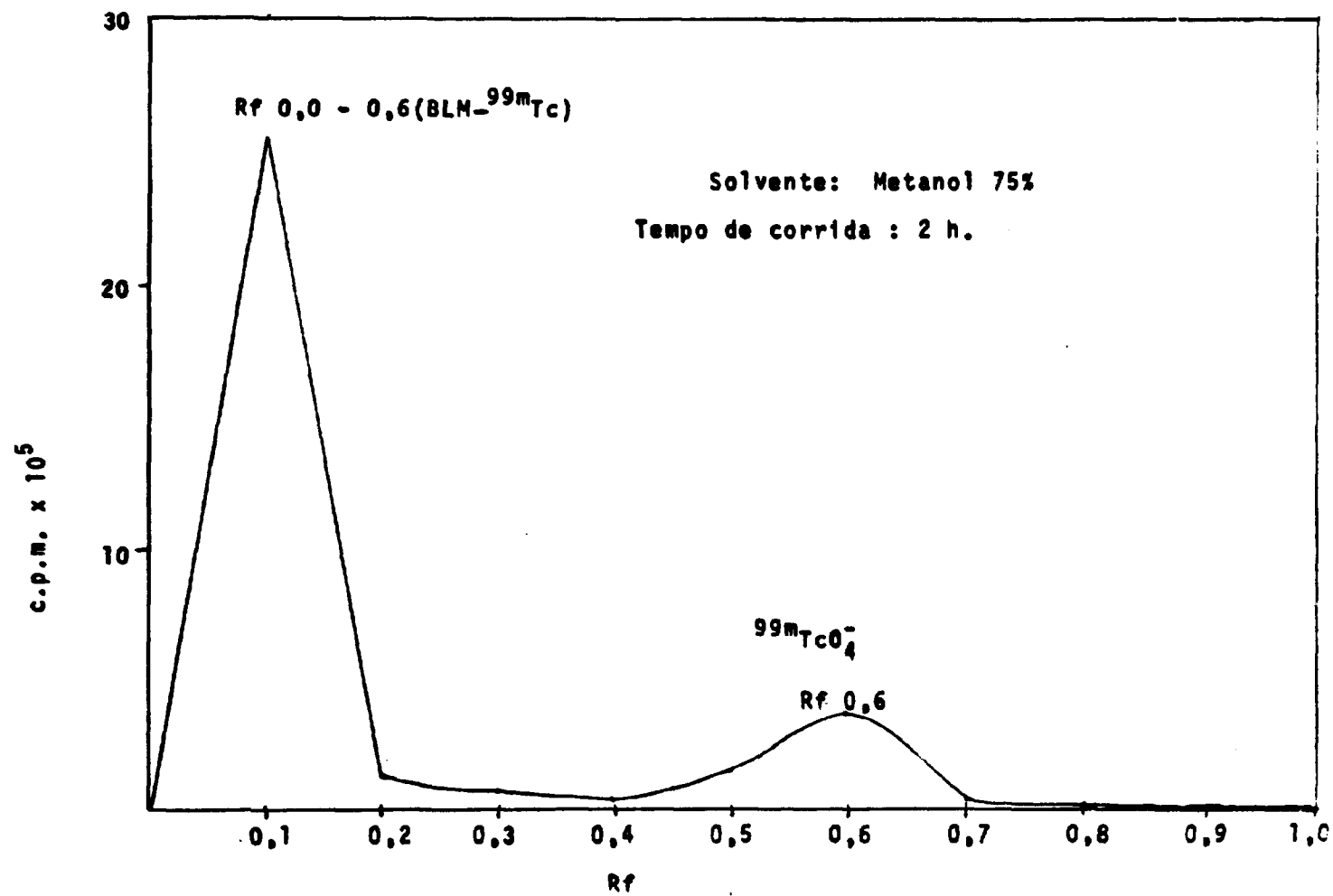


Figura 3.3 - Cromatografia ascendente da Bleomicina-<sup>99m</sup>Tc

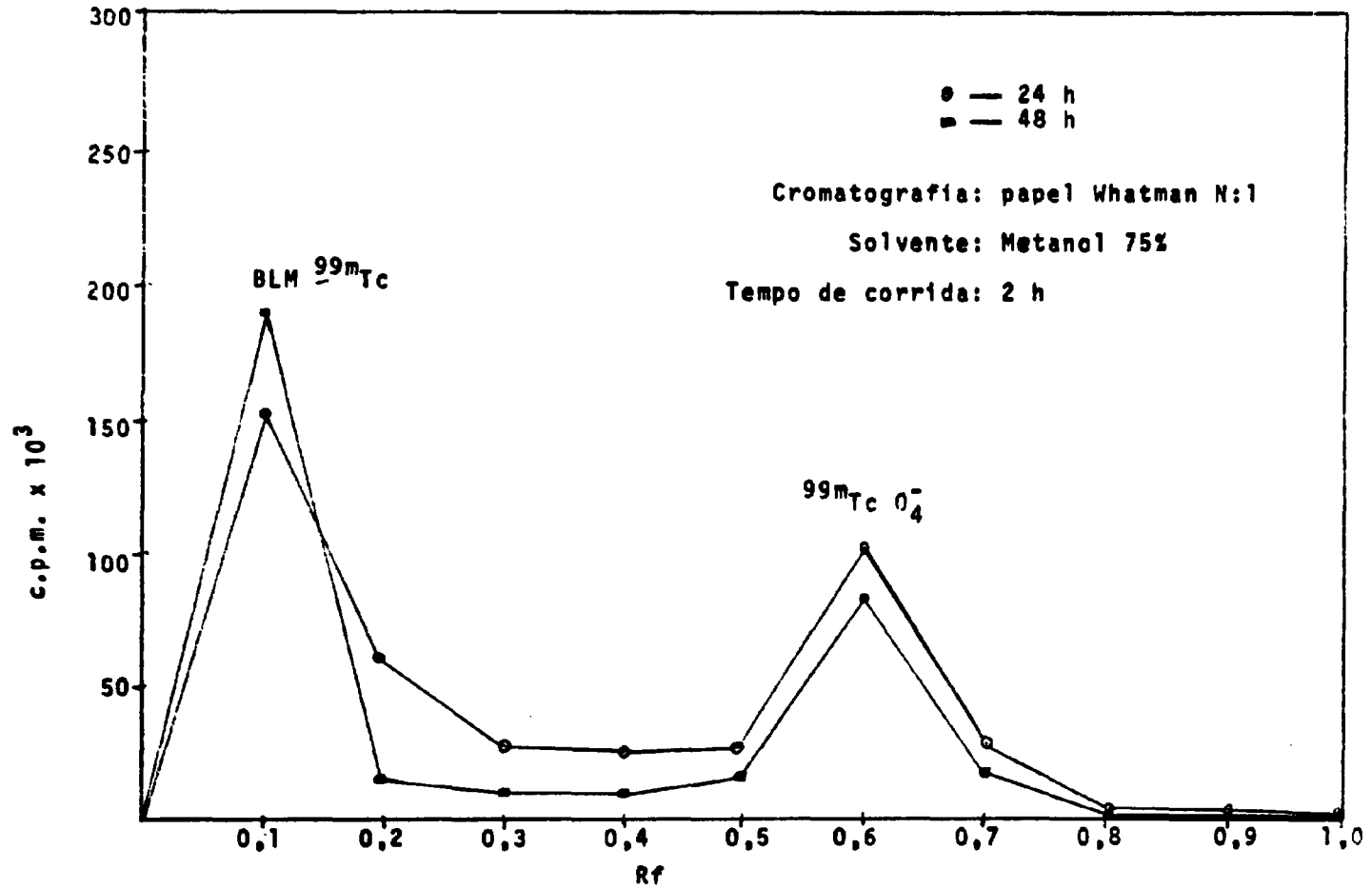


Figura 3.4 - Estabilidade de ligação: BLM-<sup>99m</sup>Tc

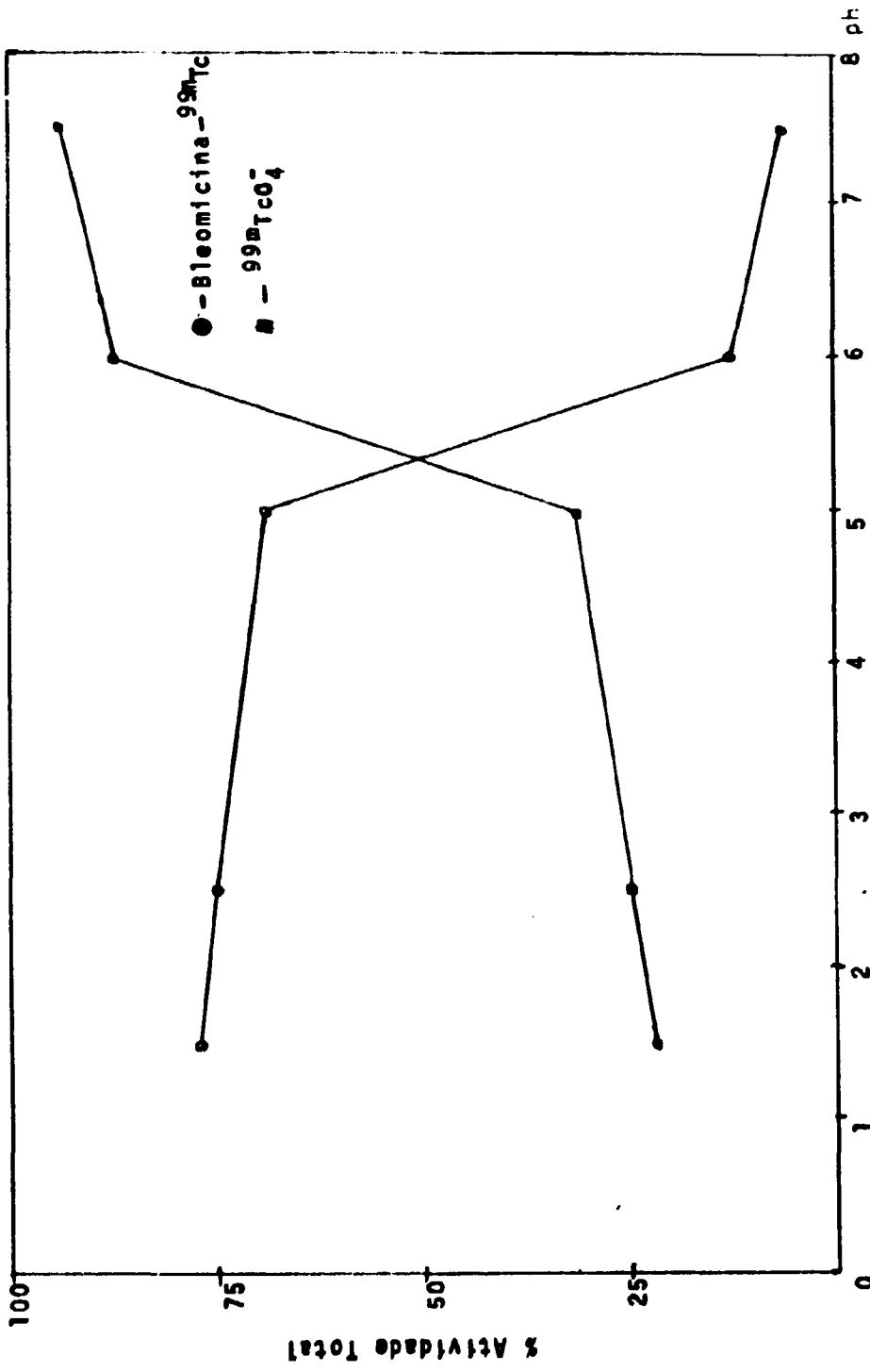


Figura 3.6 - Variação de BLM.<sup>99m</sup>Tc e <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> em função do pH

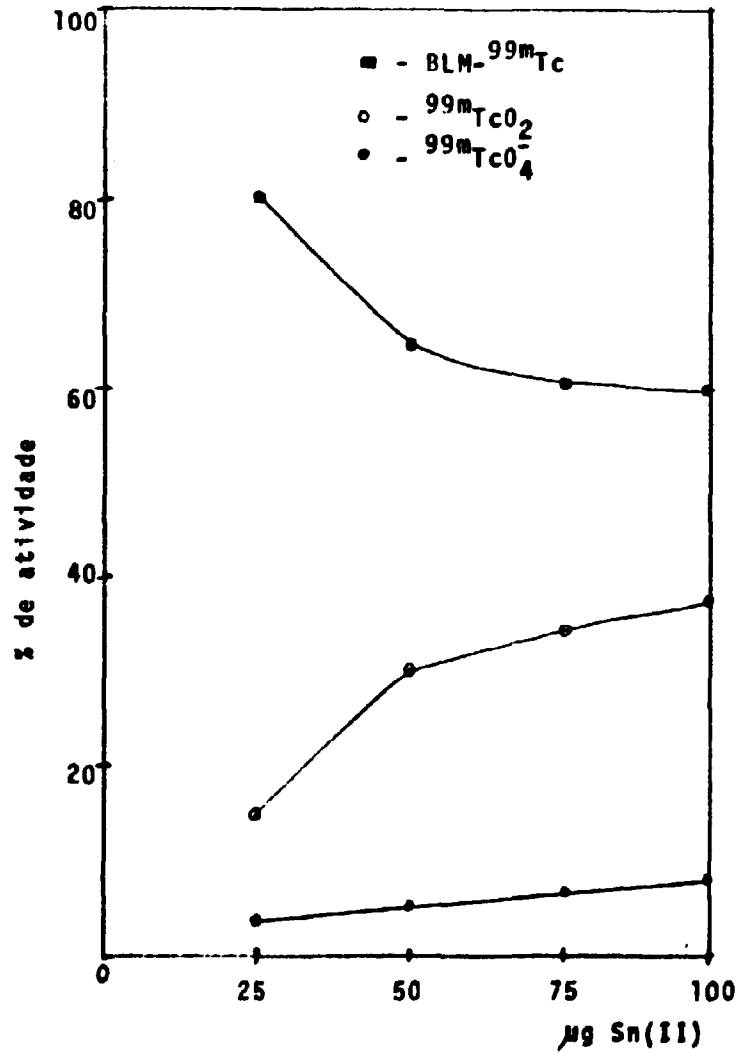


Figura 3.6 - Porcentagem de atividade de BLM-<sup>99m</sup>Tc, de <sup>99m</sup>TcO<sub>2</sub> e <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub> em função de massa de Sn(II).

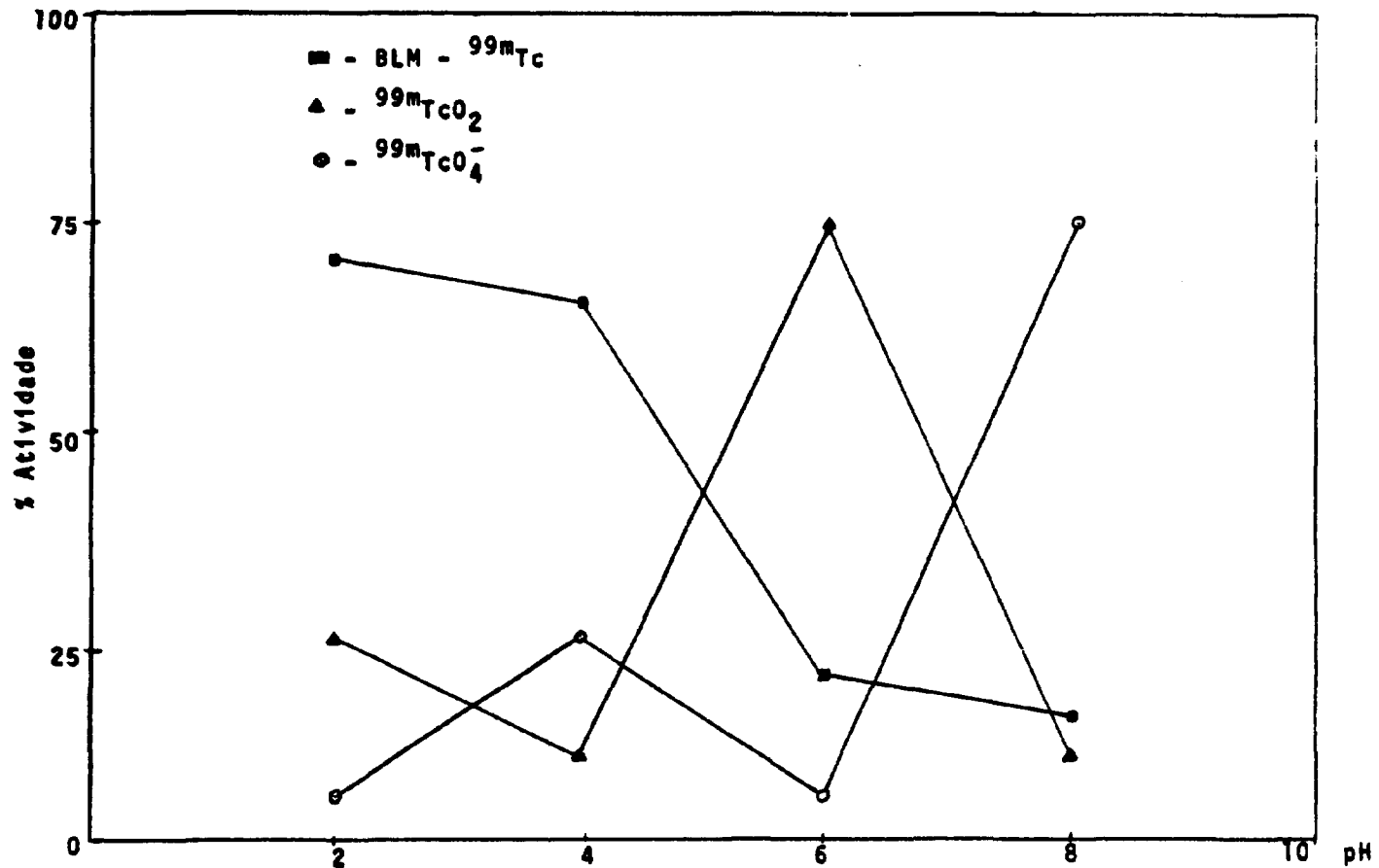


Figura 3.7 - Rendimento de marcação de bleomicina- $^{99m}\text{Tc}$  em função do pH

Segundo OWUNWANNE<sup>(13)</sup>, as formas quelantes de tecnécio são o  $^{99m}\text{TcO}^{2-}_2$  ou  $^{99m}\text{Tc}(\text{OH})_2^{+2}$ , isto é, tecnécio apresentando-se no estado de oxidação +4. Estas formas aparecem quando o pH for igual ou menor que dois, ocorrendo hidrólise quando o meio se torna menos ácido. A principal forma hidrolisada é o  $\text{TcO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , que como óxido insolúvel vai provocar uma queda brusca no rendimento de marcação, por ser uma forma não quelante. A Tabela III.1 e a Figura 3.7 mostram que o melhor pH de marcação é 2.

Tabela III.1

Rendimento de Marcação da BLM- $^{99m}\text{Tc}$  em Função do pH

pH	$^{99m}\text{TcO}_2$ %	$^{99m}\text{TcO}_4^-$ %	BLM- $^{99m}\text{Tc}$ %
2	25	5	70
4	10	25	65
6	75	5	20
8	10	75	15

Em nosso trabalho o único fator que poderia alterar o pH, no momento da reação, seria o volume de eluído (pertechnetato de sódio em NaCl 0,9%) do gerador, cujo pH varia de 5,0 a 5,5. Para tanto fez-se um ensaio com adições progressivas de volumes do eluído, verificando-se que até 4 ml não houve alteração significativa do pH. O resultado do experimento mostra-se na Tabela III.2.

Tabela III.2

Modificação do pH com a Adição de Volumes Diferentes do Eluído

Experiência nº	Volume $^{99m}\text{NaTcO}_4$ (ml)	pH (final)
1	1	3,0
2	2	3,0
3	3	3,0
4	4	3,5
5	5	4,0
6	6	4,5
7	7	4,5
8	8	5,0
9	9	5,0
10	10	5,0

### III.2.3 – Influência do Tempo de Reação entre o Íon Pertecnetato e o “Kit” (Sn(II)/BLM), no Rendimento de Marcação

Para os experimentos utilizou-se a técnica descrita em II.2.5.1, com 3,3 mg de bleomicina, 50 µg de estanho e pH = 2,0 tempo de reação variou de 15 a 105 minutos. Para controle das porcentagens de atividade da bleomicina-<sup>99m</sup>Tc, do íon pertecnetato e do tecnécio reduzido, usando-se a técnica cromatográfica “Michrom” descrita em II.2.5.2.

Verificou-se que a partir de 15 minutos alcança-se um rendimento de marcação em torno de 75%, após o que o rendimento tende a aumentar lentamente. Todavia um tempo de reação muito prolongado prejudica a medida de atividade, por causa de meia-vida do <sup>99m</sup>Tc ser de apenas 6 horas, tornando-se o processo inaplicável na rotina. O resultado do ensaio é mostrado na Figura 3.8.

### III.3 – Controle de Qualidade do Produto Marcado

#### III.3.1 – Controle de Pureza Radioquímica

Conforme descrito em II.2.5.2, usou-se inicialmente método cromatográfico ascendente em papel Whatman n.1, ensaiando-se o comportamento de vários solventes, a saber:

- a) Cloreto de amônia a 10% – verificou-se que havia sobreposição de atividade da bleomicina (Rf = 0,6 – 0,75) com o pico de atividade correspondente ao íon pertecnetato (Rf = 0,7 – 0,8), prejudicando o resultado, como pode-se ver pela Figura 3.9.
- b) Metanol 85% – a bleomicina marcada se espalha do Rf = 0,0 a 0,6<sup>(11)</sup>, havendo uma separação razoável do íon pertecnetato (<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>), o qual tanto pode ser resultado da redução incompleta ou de uma reoxidação, pois o processo leva cerca de duas horas. O resultado do ensaio está exposto na Figura 3.10.
- c) Solução salina (NaCl 0,9%) – com este solvente obteve-se uma separação satisfatória do <sup>99m</sup>Tc reduzido, do não reduzido (<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>) este último sobrepondo-se parcialmente ao <sup>99m</sup>Tc-bleomicina, como se observa na Figura 3.11.
- d) Metil etil cetona – Com este solvente conseguiu-se separar o <sup>99m</sup>Tc reduzido e o <sup>99m</sup>Tc complexado, que permaneciam próximos da origem, do pertecnetato (<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>) que atinge o Rf = 0,9 a 1,0 conforme mostra a Figura 3.12.

Nenhum desses processos cromatográficos forneceu dados que permitissem discriminar os três principais produtos radioativos presentes após a complexação, o BLM-<sup>99m</sup>Tc, o <sup>99m</sup>TcO<sub>2</sub> e o <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>, impossibilitando o cálculo de rendimento da reação.

Por esse motivo, abandonou-se esse método cromatográfico, passando a utilizar-se em todos os experimentos de marcação, a técnica “Michrom” descrita em II.2.5.2.

#### III.3.2 – Estabilidade Físico-Química dos “Kits”

Os “kits” com 60 e 90 dias após a preparação, mostraram-se estáveis pelo fato de terem sido liofilizados e estocados em frascos com vácuo sob refrigeração (+ 4°C). A ausência de oxigênio evita a oxidação do Sn(II), e a liofilização protege o “kit” dos efeitos das reações de hidrólise. A estabilidade dos “kits” durante o período citado foi comprovada pela marcação com <sup>99m</sup>Tc.

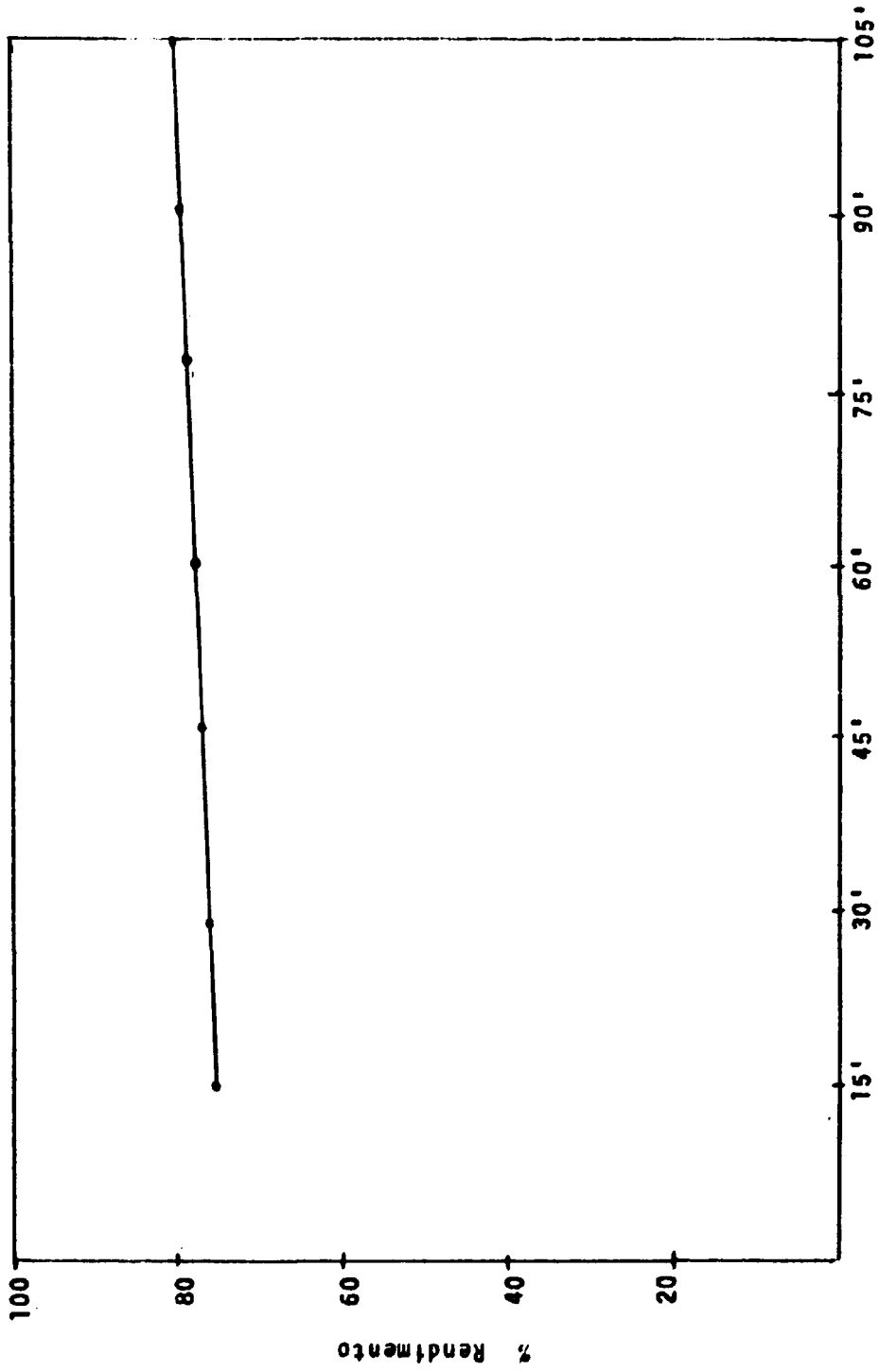


Figure 3.8 - Rendimento de marcação do BLM.<sup>99m</sup>Tc em função do tempo



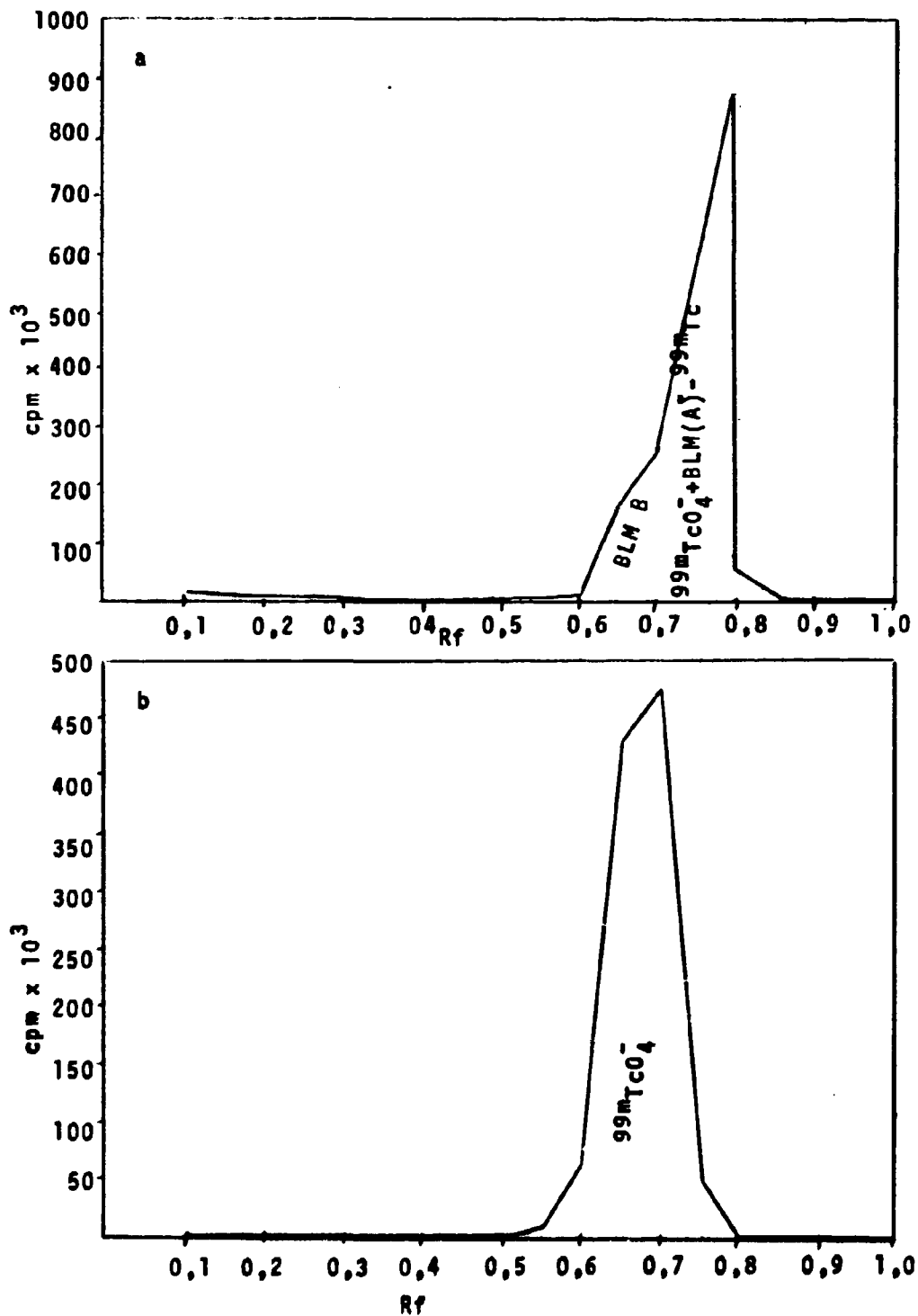


Figura 3.9 - Perfis cromatográficos do BLM- $^{99m}\text{Tc}$ (a) e  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (b) em cloreto de amônio 10%

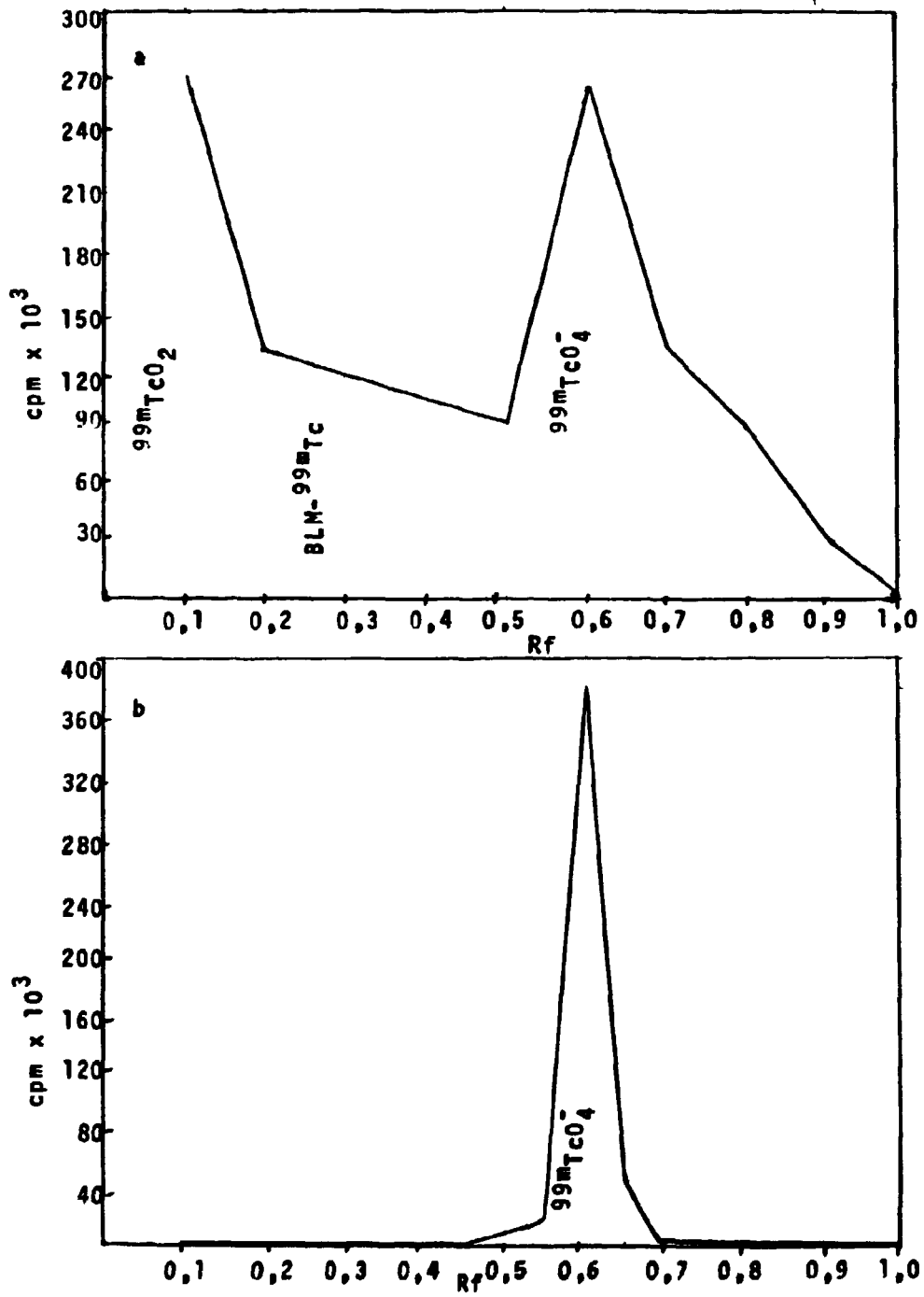


Figura 2.10 - Perfis cromatográficos do BLM- $^{99m}\text{Tc}$ (a) e  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (b) em metanol 85%

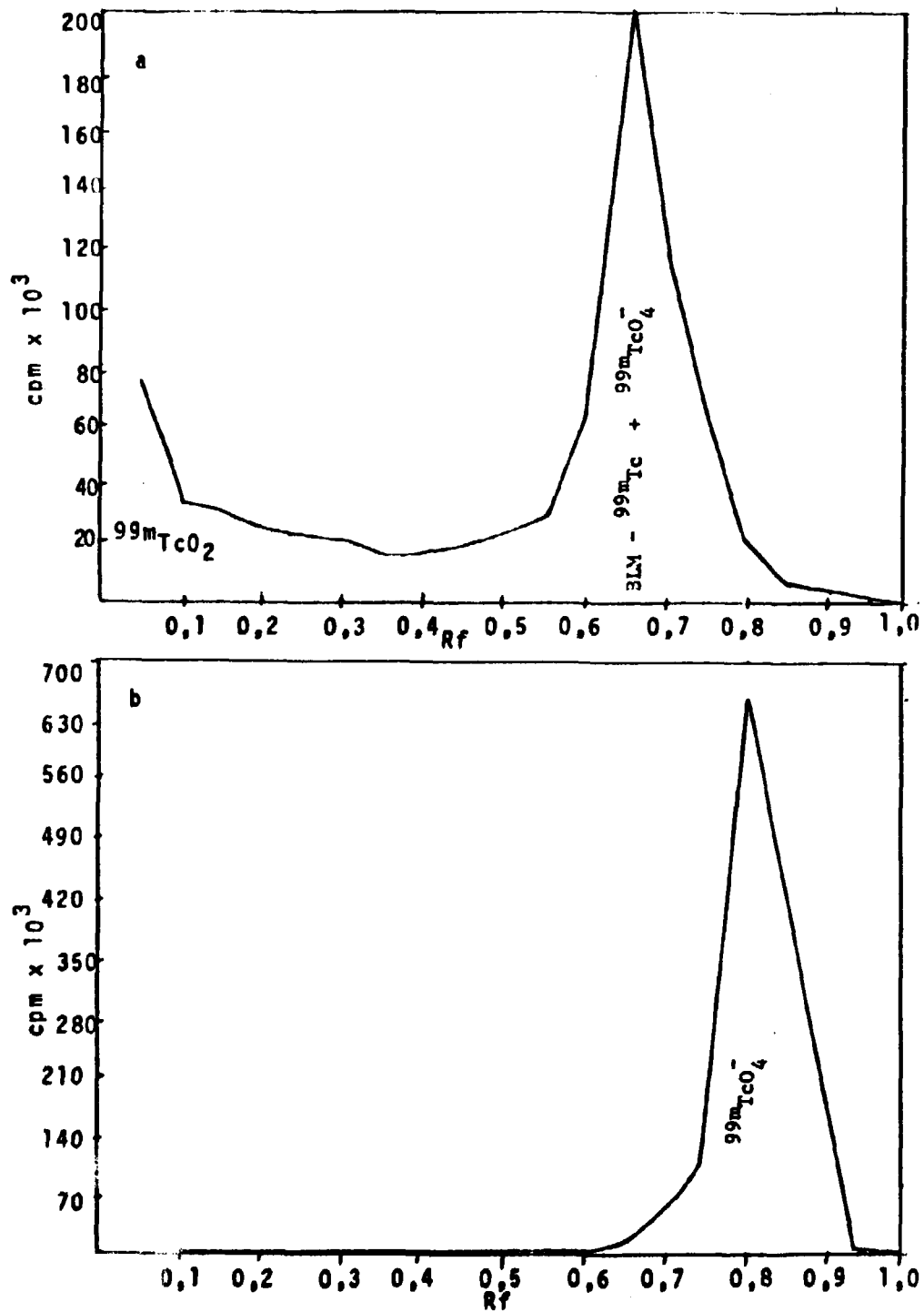


Figura 31 - Perfis cromatográficos do  $\text{BLM} - ^{99m}\text{Tc}$  (a) e  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  (b) em solução salina (NaCl 0,9%)

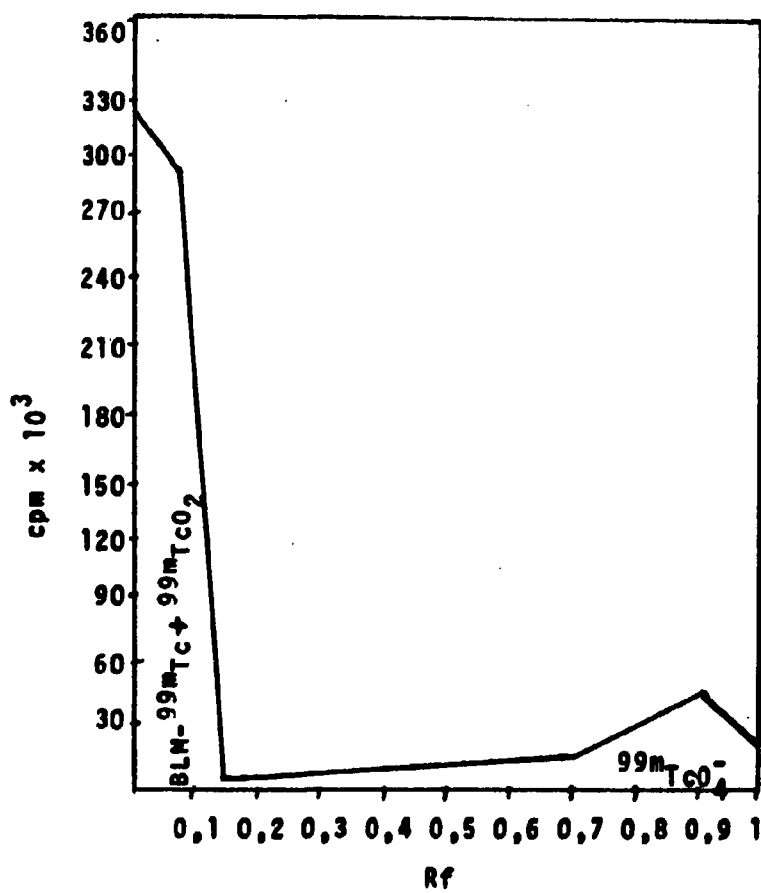


Figura 3.12 - Perfil cromatográfico do BLM.<sup>99m</sup>Tc em metil etil cetona

### III.3.3 – Estabilidade de BLM-<sup>99m</sup>Tc em Função do Tempo

Fizeram-se ensaios de estabilidade, submetendo-se o produto marcado à cromatografia "Michrom", logo após a marcação e durante períodos subsequentes até 8 horas. O produto marcado mostrou-se estável durante o intervalo de tempo ensaiado, como mostra a Figura 3.13 e Tabela III.3.

Tabela III.3

Porcentual Relativo em Atividade do Produto Marcado e Impurezas Radioquímicas com o Tempo

Tempo (h)	<sup>99m</sup> TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup> %	<sup>99m</sup> TcO <sub>2</sub> %	BLM- <sup>99m</sup> Tc %
2	3	27	70
4	4	31	65
6	3	27	70
8	2	30	68

### III.3.4 – Esterilidade do Produto Marcado

A esterilidade do produto marcado foi garantida pela passagem por filtro Millipore 0,22 μ, e confirmada por ensaios microbiológicos em caldo simples, tioglicolato e sabouraud com resultados negativos quanto ao crescimento bacteriano.

### III.3.5 – Toxicidade da Bleomicina para Animais

Segundo o "Committee of Clinical Research of Bleomycin"<sup>(12)</sup>, a dose letal média (LD<sub>50</sub>) para ratos machos é de cerca de 250 mg potência, portanto mais alta do que a massa usada em nossos experimentos, que foi de 4,95 mg/potência (ou 3,3 mg/massa). Não houve nenhum caso de choque ou morte de animais, o que comprova que a massa usada nos experimentos está realmente situada numa faixa sub-tóxica.

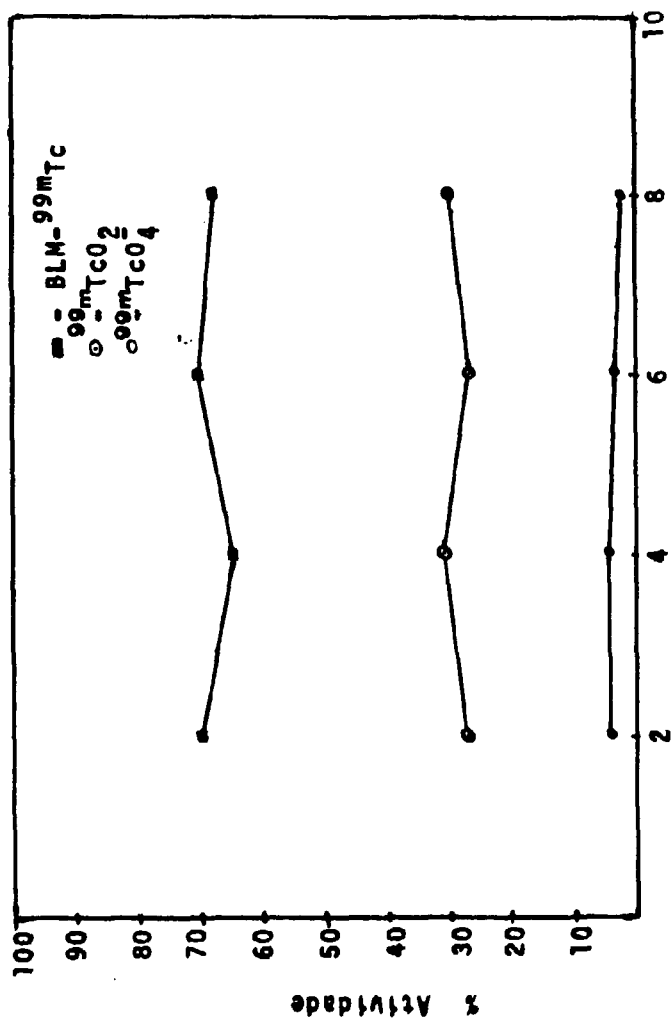
### III.3.6 – Distribuição Biológica

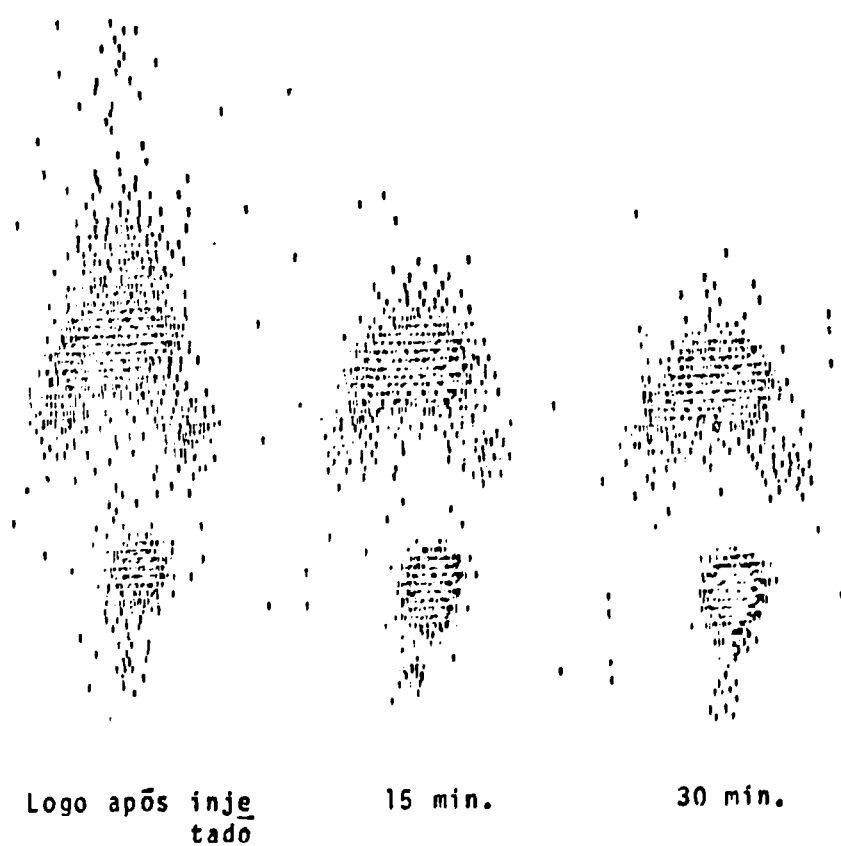
Segundo ECKELMAN<sup>(4)</sup>, SRIVASTAVA<sup>(13)</sup> e RHODES<sup>(16)</sup>, há grande possibilidade de formação de complexos coloidais do tipo Tc/Sn e óxidos insolúveis como TcO<sub>2</sub>, quando da reação do íon pertectato com o Sn(II).

Fizeram-se inicialmente cintilografias de ratos saudáveis, injetados com <sup>99m</sup>Tc-bleomicina, verificando-se que realmente as formas coloidais se formam e são retidas pelo sistema retículo endotelial (SRE) do fígado. A Figura 3.14 apresenta o cintilograma com a imagem hepática.

Pode-se notar que o produto não se concentra na tireóide, glândulas salivares e cérebro, o que elimina a possibilidade de existência de <sup>99m</sup>Tc livre (<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>), havendo eliminação<sup>(15)</sup> do complexo radioativo pelas vias urinárias.

Segundo os autores RYO<sup>(10)</sup>, VAN DE POLL<sup>(11)</sup>, GOODWIN<sup>(8)</sup> e MORI<sup>(12)</sup> estes quelatos

Figura 3.13 - Estabilidade do complexo BLM-<sup>99m</sup>Tc



**Figura 3.14** -- Cintilografias seqüenciais de rato injetado com BLM-<sup>99m</sup>Tc, sem passagem prévia por Millipore 0,22 $\mu$ . Nota-se a nítida imagem hepática resultado da retenção das formas coloidais pelo SRE.

insolúveis podem ser em grande parte eliminados por uma simples passagem do produto marcado por filtro Millipore 0,22  $\mu$ .

Fez-se este experimento e obteve-se o produto livre de formas coloidais, o que pode ser verificado pela Figura 3.15, onde não se nota a retenção no fígado. Observou-se que a eliminação do produto do organismo sadio, se dá entre três e quatro horas após injeção intravenosa.

### III.3.6.1 – Concentração do Produto Marcado em Tecidos Tumoriais

Utilizando-se o aparelho Foçama fizeram-se cintilogramas de ratos com tumores de desenvolvimento espontâneo, apresentando metástases, verificando-se a concentração do produto no tecido tumoral. A série de cintifotos da Figura 3.16, mostra o resultado, pelo qual se infere que o tempo necessário para otimizar a imagem é de 4 horas. Nota-se a presença do tumor original na região pélvica, pouco abaixo da bexiga.

Outros dois ratos, um com tumor testicular (Figura 3.17) e outro com tumor torácico (Figura 3.18), foram injetados 1,0 mCi de BLM- $^{99m}\text{Tc}$ . Fizeram-se cintilogramas 15, 60, 120 e 180 minutos após injeção intravenosa caudal.

Os resultados mostraram a localização do produto marcado nos tumores, concluindo-se que o tempo ideal para visualização nítida da região tumoral vai de duas a três horas após injeção. Utilizou-se nesses experimentos o Cintilógrafo tipo Scintimatic 2F.

### III.3.6.2 – Especificidade do Produto Marcado

Pelos cintilogramas obtidos notou-se nítida concentração do produto nos tecidos doentes e rápida eliminação da corrente circulatória. Não se notou concentrações do complexo em órgãos ou sistemas saudáveis, verificando-se após duas horas de introdução no organismo apenas as imagens do sistema excretor urinário (rins e bexiga).

## III.4 – Conclusões

### III.4.1 – Características dos "Kits"

Os "kits" mostraram-se adequados para marcação com  $^{99m}\text{Tc}$ , pelos fatores seguintes:

- a) Simplicidade e rapidez na preparação.
- b) Estabilidade físico-química.
- c) Facilidade para uso em marcações rotineiras, bastando adicionar o radioisótopo para obtenção do complexo utilizável em Medicina Nuclear.
- d) Baixo teor de Sn (máximo 60  $\mu\text{g}$ ), tornando mínima a possibilidade de toxicidade pelo metal.

### III.4.2 – Marcação dos "Kits"

No que se refere à marcação dos "kits", conclui-se que:



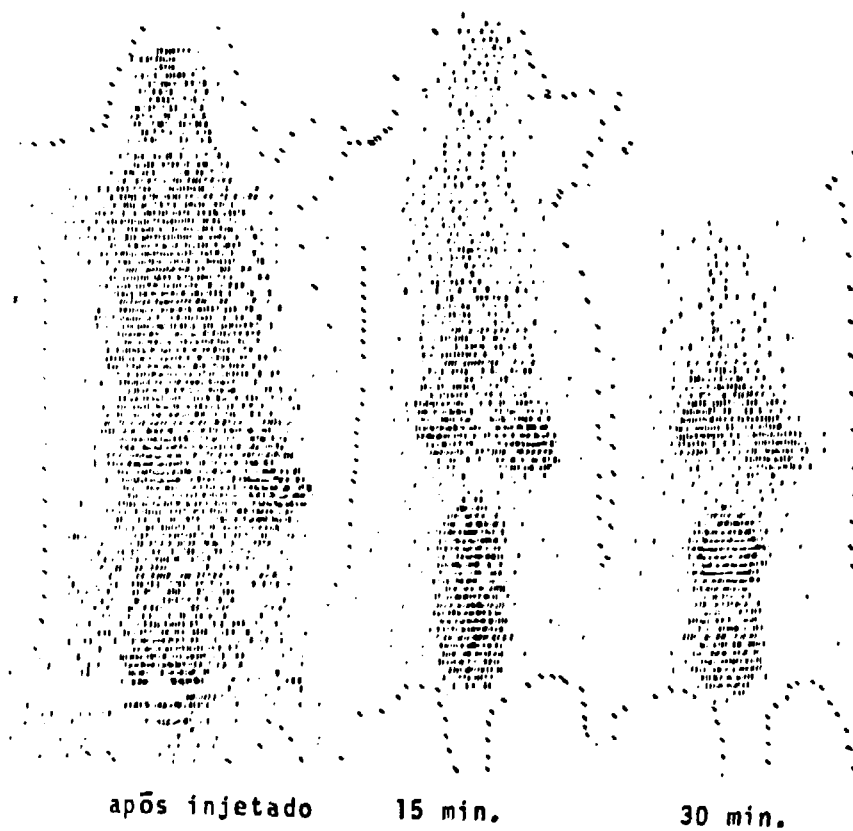


Figura 3.15 - Cintilografias seqüenciais de rato injetado com BLM-<sup>99m</sup>Tc, com passagem prévia por Millipore 0,22  $\mu$ . Nota-se ausência de imagem hepática.

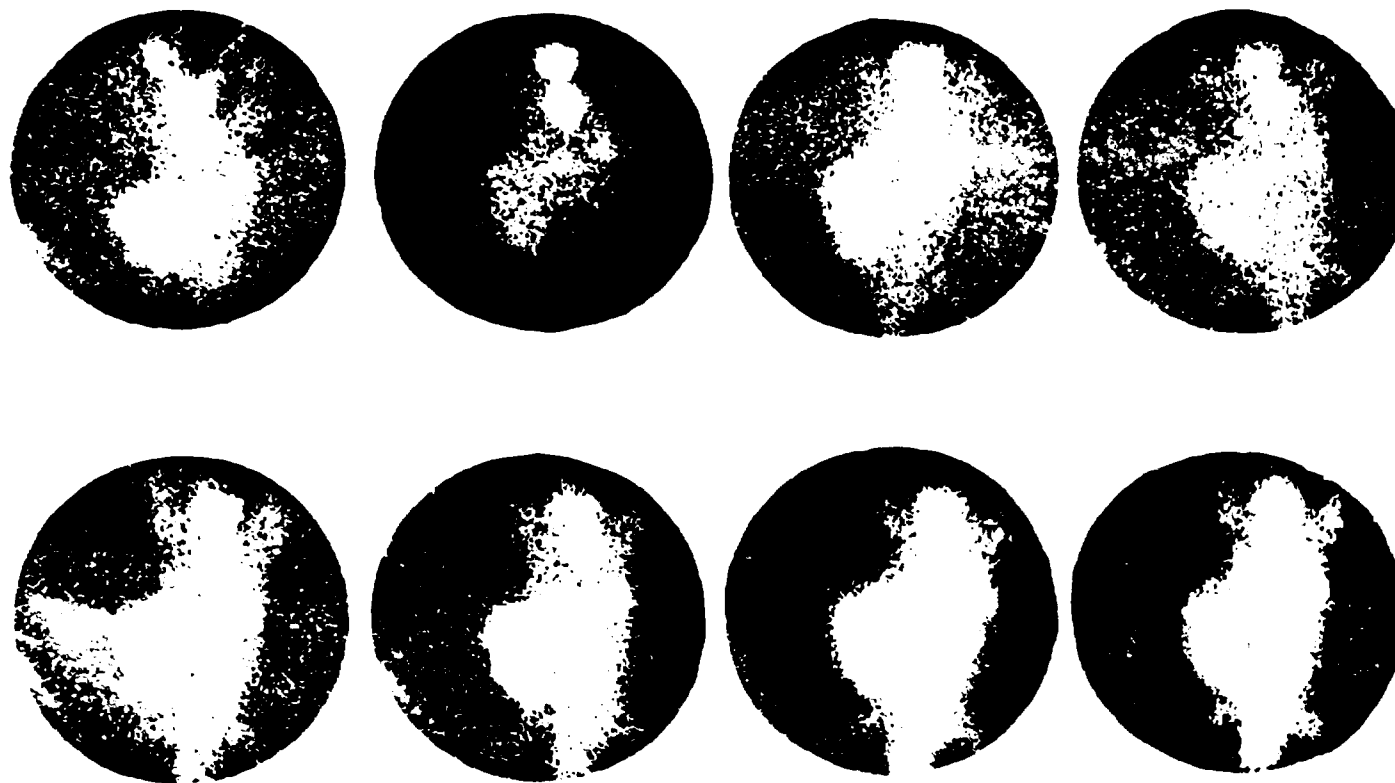


Figura 3.16 – Cintifotos em seqüência cronológica de um rato, com processo tumoral pélvico injetado com BLM-<sup>99m</sup>Tc

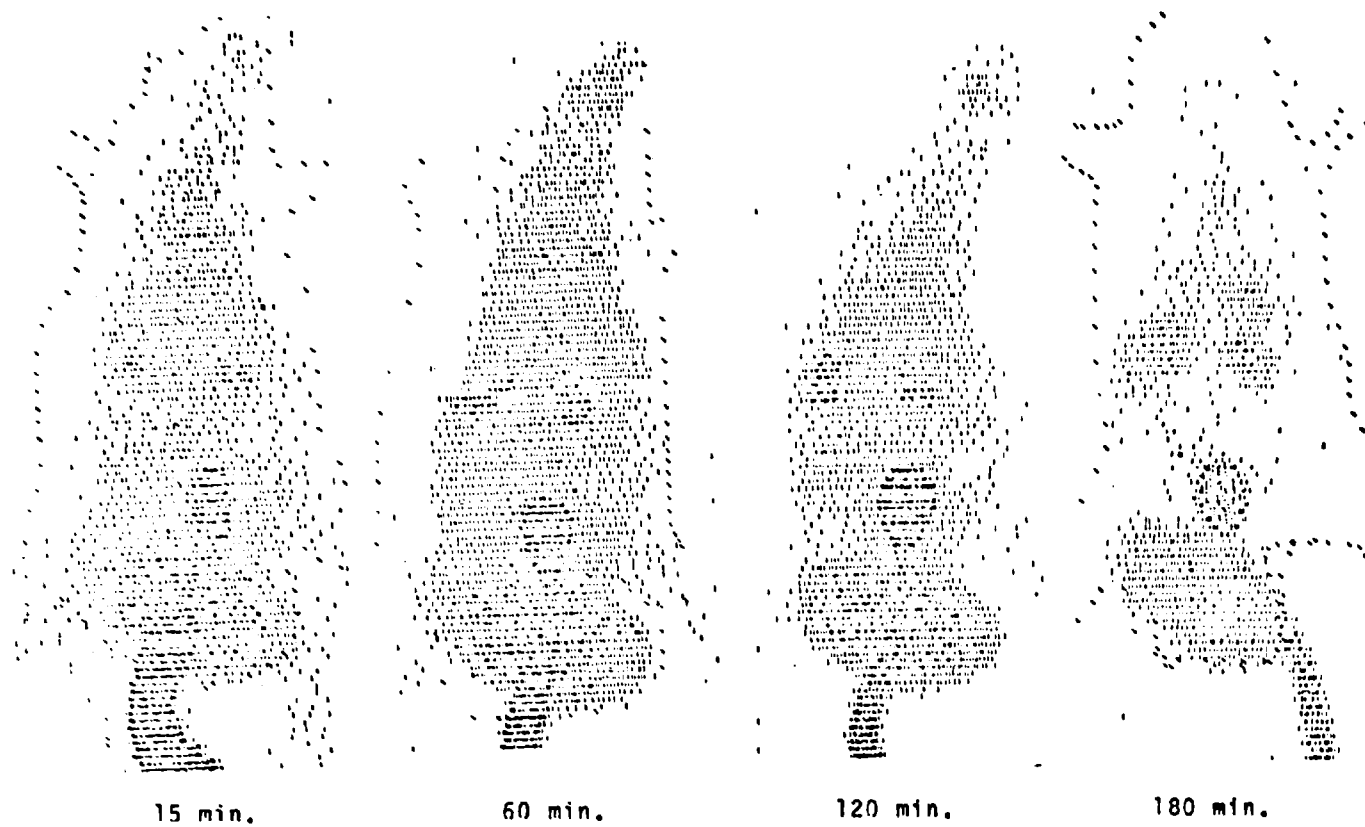
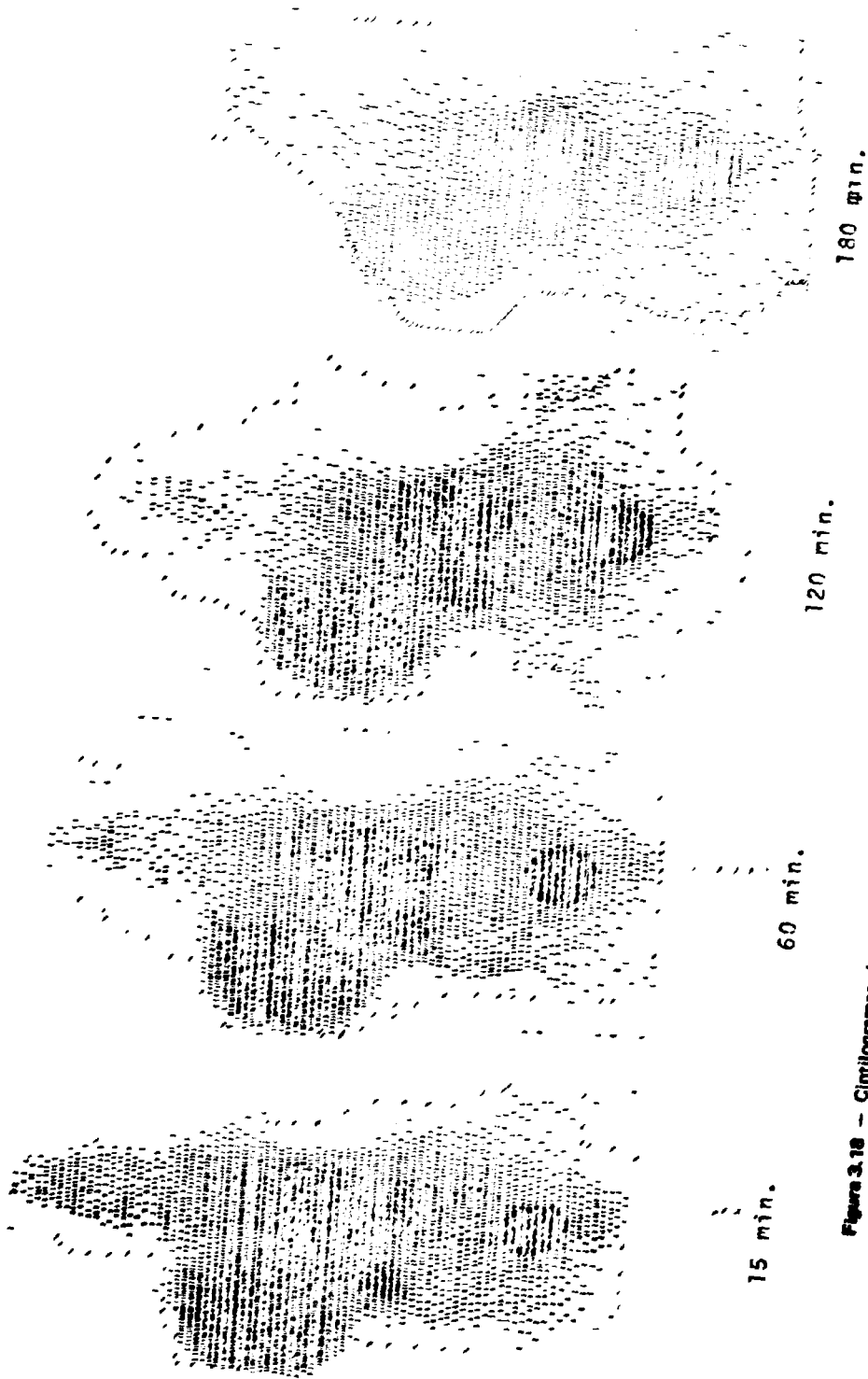


Figura 3.17 - Cintilogramas de um rato com tumor na região pélvica, injetado por via caudal com  $\text{BLM-}^{99\text{m}}\text{Tc}$



180 min.

120 min.

60 min.

15 min.

Figura 3.18 - Cintilogramas de um reto com tumor na região torácica injetado por via caudal com  $^{99m}\text{Tc}$  BLM.

- a) O volume do eluído do gerador (pertechnetato) deve ser menor ou igual a 4 ml, e a concentração radioativa maior ou igual a 10 mCi/ml.
- b) O pH de marcação deve estar entre 2,0 e 2,5, para evitar a formação de óxido insolúvel e colóides.
- c) O tempo de reação deve ser de no mínimo 15 minutos, com constante agitação em atmosfera inerte.
- d) A relação em massa ( $\mu\text{g}$ ) entre o redutor Sn(II) e a bleomicina mostra que na faixa de 1:50 a 1:100 (Sn II/BLM) o rendimento é maximizado.

#### III.4.3 – Eliminação de Óxidos e Quelatos Insolúveis

Os ensaios realizados mostraram a necessidade imperiosa da passagem do produto marcado, por filtro Millipore  $0,22 \mu$  para eliminação dos óxidos insolúveis ( $\text{TcO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) e da forma coloidal Tc/Sn, que se não subtraídas do complexo, irão se localizar no fígado.

#### III.4.4 – Distribuição Biológica

A distribuição biológica mostrou que o produto BLM- $^{99\text{m}}\text{Tc}$  é apropriado para os fins a que se destina, ou seja, detectar tecidos tumorais, com rápida eliminação do organismo e conseqüente diminuição da dose absorvida. A concentração máxima do produto nos tecidos tumorais duas horas após injeção e sua eliminação total em menos de 24 horas, torna promissor o uso em diagnóstico tumoral para a Medicina Nuclear.

#### ABSTRACT

~~Super~~ <sup>A</sup> study about the behavior of the labelling yield of antineoplastic drug (bleomycin) with a short-lived radionuclide ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ), using Sn(II) as a reductor agent, *is presented.*

Parameters like the pH in the labelling, influence of the reaction time and mass of tin on the labelling yield were analysed.

To simplify the labelling, a lyophilized kit of Sn(II)/BLM in evacuated vials was prepared.

The quality control involving paper chromatography, sterility and "in vivo" test was made. The "in vivo" tests were made both in healthy rats and in those with tumorous tissues, under barbituric action.

The biological distribution, the concentration time of the products in tumors, the excretion time and excretion via were studied by means of scintigraphy and scintiphotos. *Autôr*

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS \*

1. APLICAÇÕES clínicas. In: ROCHA, A. F. G. *Medicina nuclear*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1976. p.253-438.
2. BLEOMYCIN: therapeutic effect of bleomycin. Japan, Committee of Clinical Research of Bleomycin, 1971. p.1-5

\* As referências bibliográficas relativas a documentos localizados pelo IEA foram revistas e enquadradas na NB-88 de ABTN.

3. COLOMBETTI, L. G.; MOERLIEN, S.; PATEL, G. C.; PINSKY, S. M. Rapid determination of oxidation state of unbound  $^{99m}\text{Tc}$  and labeling yield in  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled radiopharmaceuticals. *J. nucl. Med.*, 17(9):805-9, 1976.
4. ECKELMAN, W. C. & LEVENSON, M. S. Radiopharmaceuticals labelled with Technetium. *Int. J. appl. Radiat. Isotopes*, 28(1):67-82, 1977.
5. ECKELMAN, W. C.; RZESZOTARSKI, W. J.; SIEBEL, B. A.; KUBOTA, H.; CHELLIAH, M.; STEVENSON, J.; REBA, R. C. Chemical and biologic properties of isolated radiolabeled bleomycin preparations. *J. nucl. Med.*, 16(11):1033-7, 1975.
6. GALATEANU, I.; BRATU, C.; PETRIDE, A. The reduction of  $^{99m}\text{Tc}$ -pertechnetate by hydrazine. *Radiochem. Radioanal. Lett.*, 28(1):95-104, 1977.
7. HAYS, M. T. & GREEN, F. A. In vitro studies of the  $^{99}\text{Tc}$ -pertechnetate binding by human serum and tissues. *J. nucl. Med.*, 14(3):149-58, 1973.
8. HOFFER, P. B. & GOTTSCHALK, A. Tumor scanning agents. *Semin. nucl. Med.*, 4(3):305-18, 1974.
9. LIN, M. S. & GOODWIN, D. A. Method of preparation and pharmacodynamics of a  $^{99m}\text{Tc}$ -bleomycin. *J. nucl. Med.*, 14(6):422, 1973.
10. LIN, M. S. & WINCHELL, H. S. A kit method for the preparation of Technetium-Tin(II) colloid and study of its properties. *J. nucl. Med.*, 13(1):58-65, 1972.
11. LIN, M. S.; GOODWIN, D. A.; KRASH, S. L. Bleomycin as  $^{99m}\text{Tc}$  carrier in tumor visualization. *J. nucl. Med.*, 15(5):338-42, 1974.
12. MORI, T.; HAMAMOTO, K.; ONOYAMA, Y.; TORIZUKA, K. Tumor imaging after administration of  $^{99m}\text{Tc}$ -labelled bleomycin. *J. nucl. Med.*, 16(5):414-22, 1975.
13. OWUNWANNE, A.; MARINSKY, J.; BLAU, M. Charge and nature of Technetium species produced in the reduction of pertechnetate by stannous ion. *J. nucl. Med.*, 18(11):1099-105, 1977.
14. PERSSON, R. B. R. & STRAND, S. E. Labelling processes and short-term biodynamical behaviour of different types of Technetium ( $^{99m}\text{Tc}$ )-labelled complexes. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Radiopharmaceuticals and labelled compounds: proceedings of a symposium . . . held in Copenhagen, 26-30 March 1973. v.2. Vienna, 1973. p.1-36. (Proceedings series).*
15. POOL, M. A. P. C. van de; VERSLUIS, A.; RASKER, J. J.; JURJENS, H.; WOLDRINEM, G. Labelling of bleomycin with Cobalt-57, Indium-111, Technetium-99m, Mercury-197, Lead-203, and Copper-67. *Nucl. Med.*, 15(2):86-90, 1976.
16. RHODES, B. A. Considerations in the radiolabeling of albumin. *Semin. nucl. Med.*, 4(3):281-93, 1974.
17. RICHARDS, P. & STEIGMAN, J. *Chemistry of Technetium as it is applied to radiopharmaceuticals.* Upton, N. Y., Brookhaven National Laboratory, 1973. p.1-24. (Invited presentation at the international symposium on radiopharmaceuticals, Atlanta, Georgia, February 12-15, 1974). (BNL-18435; CONF 140203-5).
18. RONAULT, H.; HENRY, R.; RAPIN, J. Chelation de cations radioactifs par un polypeptide: la bleomycine. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Radiopharmaceuticals and*

*labelled compounds: proceedings of a symposium... held in Copenhagen, 26-30 March 1973, v.2. Vienna, 1973. p.195-204. (Proceedings series).*

19. RYO, U. Y.; ICE, R. D.; JONES, J. D.; BEIERWALTES, W. H. Relative tissue distribution of radioactivity in rats with endocrine autonomous breast carcinomas after  $^3\text{H}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , and  $^{64}\text{Cu}$ -bleomycin, *J. nucl. Med.*, 16(2):127-30; 1975.
20. SRIVASTAVA, S. C.; MEINKEN, G.; SMITH, T. D.; RICHARDS, P. Problems associated with stannous  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -radiopharmaceuticals. *Int. J. appl. Radiat. Isotopes*, 28(1):83-85, 1977.
21. STEIGMAN, J. & RICHARDS, P. Chemistry of Technetium-99m. *Semin. nucl. Med.*, 4(3):288-79, 1974.
22. TECHNETIUM-99m. St. Louis, Missouri, Mallinckrodt Chemical Works. Nuclear Consultants, 1965.
23. UMEZAWA, H. Bleomycin and other antitumor antibiotics of high molecular weight. *Antimicrob. Ag. Chemotherapy*, 5:1079-85, 1965.



**INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA**  
Caixa Postal, 11040 - Pinheiros  
CEP 06508  
01000 - São Paulo - SP

**Telefone: 211-6011**  
**Endereço Telegráfico - IEATOMICA**  
**Telex - 011-23502 IENA BR**