INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Estudo da produção do radiofármaco FLT-¹⁸F em sistema automatizado: contribuição para validação do processo

Camila Zanette

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Bortoleti de Araújo

Durante o desenvolvimento deste trabalho o autor recebeu auxílio financeiro do CNPq

São Paulo
2013

AGRADECIMENTOS

Agradecer a todos que ajudaram a construir esta dissertação não é fácil. O maior perigo do agradecimento seletivo não é decidir quem incluir, mas decidir quem não mencionar. Então, a meus amigos e todos os envolvidos neste trabalho que, de uma forma ou de outra, contribuíram com sua amizade e com sugestões efetivas para a realização deste trabalho, sintam-se agradecidos pela minha pessoa.

Sendo seletiva, gostaria de deixar registrado o meu enorme agradecimento à minha família, pois o apoio que sempre tive ao longo do mestrado foi de fundamental importância na construção deste trabalho final. Um super agradecimento ao Guilherme, meu namorado e amigo, que sempre me incentivou nas minhas decisões e esteve do meu lado durante a realização desta etapa da minha vida.

No âmbito acadêmico, a minha seleção começa com a minha orientadora Dra. Elaine Bortoleti de Araújo, agradeço-lhe por todos os ensinamentos proporcionados, principalmente pela sua disposição em me aceitar para o seu grupo de pesquisa, além da confiança depositada em mim. Agregados à ela estão os integrantes de seu grupo de pesquisa, os alunos, colegas e amigos, Adriana, Akin, Daniele, Guilherme, Laís, Luis Alberto, Renata e Ricardo, que ajudaram de uma forma ou de outra na construção deste trabalho. E aproveitando o gancho, um super agradecimento à Adriana e Priscilla pelo acolhimento quando ainda era estagiária, pelos ensinamentos prestados e toda a ajuda proporcionada por esses quase três anos de amizade, devo muito do meu trabalho a vocês duas.

Gostaria de agradecer a todos os colaboradores do IPEN envolvidos, entre eles, MSc. Jair Mengatti, funcionários da instalação de Aceleradores Cíclotrons, principalmente Dr. Valdir Sciani, equipe de produção da radiofarmácia, especialmente Nestor, Luis Alberto, Bruzinga e Rosana, ao pessoal da garantia da qualidade e do controle de qualidade da radiofarmácia, Dra. Margareth, Msc. Neusa, pesquisadores do Centro de Biotecnologia do IPEN, Dra. Kayo, Dr. Daniel Perez, Dr. Carlos Soares e Dra. Miriam Suzuki e equipe do biotério. Agradeço-lhes pelos auxílios prestados, as parcerias e realizações de ensaios e tarefas que seriam impossíveis de serem feitas sozinha.

Também gostaria de agradecer ao Ricardo e à equipe do Centro de Medicina Nuclear

do InRad (HC-FMUSP), Dr. Carlos Buchipiguel, Dra. Camila M. L. Machado e Miriam R. Okamoto pela parceria com as imagens PET/CT do radiofármaco estudado.

Agradeço aos integrantes da banca de defesa por aceitarem o convite.

Agradeço também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela bolsa de estudo concedida.

RESUMO

ESTUDO DA PRODUÇÃO DO RADIOFÁRMACO FLT-¹⁸F EM SISTEMA AUTOMATIZADO: CONTRIBUIÇÃO PARA VALIDAÇÃO DO PROCESSO

Camila Zanette

O radiofármaco FLT-¹⁸F é um análogo do nucleosídeo timidina e um promissor marcador da proliferação tumoral para imagens em PET. A síntese deste radiofármaco não é simples e, muitas vezes, apresenta baixos rendimentos. Este radiofármaco já vem sendo estudado há alguns anos, porém, não há produção, nem estudos clínicos, no Brasil. O estudo do processo produtivo e a sua adequação às diretrizes de Boas Práticas de Fabricação (ANVISA) são de extrema importância.

Este trabalho teve como objetivo estudar a síntese deste radiofármaco, avaliar os métodos de controle de qualidade que serão utilizados na rotina de produção futura, realizar estudos de citotoxicidade, estudos de biodistribuição e imagens PET em animais, contribuindo para o desenvolvimento e elaboração do protocolo de validação de processo e estabelecimento das metodologias analíticas a serem utilizadas durante a rotina de produção.

Inicialmente, foi estudada a síntese e produção do produto FLT-¹⁸F, com a avaliação de três temperaturas diferentes de marcação, a fim de verificar o comportamento do rendimento radioquímico e a estabilidade do produto final. Os estudos de metodologia analítica compreenderam as análises de identificação radionuclídica, determinação dos perfis cromatográficos, pureza radioquímica, solventes residuais e pH. Estudos *in vitro* do FLT-¹⁸F de internalização e citotoxicidade também foram feitos. Nos estudos *in vivo*, avaliou-se a farmacocinética, biodistribuição em animais saudáveis e em animais com modelos tumorais, além de imagens PET/CT de animais com melanoma.

O produto final apresentou alta pureza radioquímica e mostrou-se estável por até 10 horas após a síntese, porém obteve-se um rendimento radioquímico relativamente baixo, conforme descrito na literatura. As metodologias analíticas testadas mostraram-se adequadas para o uso no controle de qualidade do FLT-¹⁸F. Nos estudos *in vitro* o FLT-¹⁸F apresentou uma significativa porcentagem de ligação às células tumorais e a molécula não radiomarcada

não foi considerada tóxica para estas células estudadas. A biodistribuição e as imagens apresentaram resultados compatíveis com o esperado. As contribuições para a validação de processo foram satisfatórias e auxiliarão na validação futura do processo produtivo do radiofármaco em estudo.

ABSTRACT

STUDY OF THE PRODUCTION OF THE RADIOPHARMACEUTICAL ^{18}F -FLT IN AUTOMATED SYSTEM: CONTRIBUTION FOR PROCESS VALIDATION

Camila Zanette

Radiopharmaceutical ^{18}F -FLT is a thymidine nucleoside analogue and a promising tumor proliferation marker for PET images. The synthesis of this radiopharmaceutical is not simple, and often has low yields. This radiopharmaceutical has already been studied for some years; however, there is no production, nor are there clinical studies in Brazil. The study of the production process and its compliance with the guidelines of Good Manufacturing Practices (ANVISA) are of extreme importance.

This study aimed to investigate the synthesis of this radiopharmaceutical, evaluate methods of quality control that will be used in future production routines, perform cytotoxicity studies, biodistribution studies and PET imaging in animals, thereby contributing to the development and elaboration of the process validation protocol and to the establishment of analytical methods to be used during production routines.

Initially, we studied the synthesis and production of ^{18}F -FLT, with the evaluation of three different temperatures of radiolabeling to check the behavior of the radiochemical yield and stability of the final product. Studies of analytical methodology comprised the analysis of radionuclide identification, determination of chromatographic profiles, radiochemical purity, residual solvents, and pH. *In vitro* studies of internalization and cytotoxicity were also carried out. In *in vivo* studies, we evaluated the pharmacokinetics, biodistribution in healthy animals and in animals with tumor models, in addition to PET/CT images in animals with melanomas.

The final product had high radiochemical purity and was stable for up to 10 hours after the synthesis, but got a relatively low radiochemical yield, as described in the literature. The tested analytical methods proved suitable for use in the quality control of ^{18}F -FLT. In *in vitro* studies, ^{18}F -FLT showed a significant percentage of binding to tumor cells, and the non-radiolabeled molecule was not considered toxic for these studied cells. The biodistribution

and images showed results that were consistent with expectations. Contributions to the validation process were satisfactory, and will assist in the future validation of the production process of the radiotracer under study.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	xv
Lista de Figuras	xix
Lista de Tabelas	xxiii
1 Introdução	1
2 Objetivos	5
2.1 Objetivos específicos	5
3 Revisão Bibliográfica	7
3.1 O câncer	7
3.2 Radiofármacos	8
3.3 Tomografia por emissão	9
3.4 FLT marcado com radioisótopo flúor-18 para uso em PET	11
3.4.1 Nucleotídeos	11
3.4.2 Síntese e degradação de nucleotídeos de pirimidina	12
3.4.3 Fluortimidina- ^{18}F	13
3.4.4 Métodos de marcação com ^{18}F	15
3.4.5 Aplicações clínica do FLT- ^{18}F	16
3.4.6 FLT- ^{18}F <i>versus</i> FDG- ^{18}F	17

4	Delineamento Experimental	19
4.1	Resumo do Delineamento Experimental	19
5	Produção do FLT-¹⁸F	23
5.1	Objetivos Específicos	23
5.2	Revisão Bibliográfica Específica	23
5.2.1	Produção de Flúor-18 no Cíclotron e Envio para o Módulo de Síntese	25
5.2.2	Radiação Síntese do FLT- ¹⁸ F	27
5.2.3	Purificação do FLT- ¹⁸ F	29
5.2.4	Diferentes rotas de sínteses do FLT- ¹⁸ F	30
5.2.5	Estudo de estabilidade	32
5.3	Materiais e Métodos	33
5.3.1	Infraestrutura	33
5.3.2	Materiais	33
5.3.3	Métodos	35
5.3.4	Análise Estatística	38
5.4	Resultados e Discussões	38
5.4.1	Estudo de Estabilidade	41
5.5	Conclusões	42
6	Metodologias Analíticas	45
6.1	Objetivos específicos	45
6.2	Revisão Bibliográfica Específica	45
6.2.1	Identidade Radionuclídica	46
6.2.2	Pureza Radioquímica	46
6.2.3	Determinação de solventes residuais	48
6.3	Materiais e Métodos	49
6.3.1	Infraestrutura	49

6.3.2	Materiais	49
6.3.3	Métodos	50
6.4	Resultados e Discussões	53
6.4.1	Identidade Radionuclídica	53
6.4.2	Determinação dos Perfis Cromatográficos	54
6.4.3	Análise da Pureza Radioquímica	59
6.4.4	Análise de solventes residuais por cromatografia gasosa	62
6.4.5	Determinação de pH	65
6.5	Conclusões	66
7	Estudos <i>in vitro</i>	69
7.1	Objetivos Específicos	69
7.2	Revisão Bibliográfica Específica	69
7.2.1	Internalização celular do FLT- ¹⁸ F	70
7.3	Materiais e Métodos	72
7.3.1	Infraestrutura	72
7.3.2	Materiais	72
7.3.3	Células	73
7.3.4	Métodos	73
7.3.5	Análise Estatística	74
7.4	Resultados e Discussões	75
7.4.1	Estudo de Internalização	75
7.4.2	Estudo de Citotoxicidade	76
7.5	Conclusões	80
8	Estudos <i>in vivo</i>	81
8.1	Objetivos Específicos	81
8.2	Revisão Bibliográfica Específica	82

8.2.1	Farmacocinética	82
8.2.2	Biodistribuição	83
8.2.3	Imagens do radiofármaco FLT- ¹⁸ F em animais	83
8.3	Materiais e Métodos	84
8.3.1	Infraestrutura	84
8.3.2	Materiais	84
8.3.3	Animais	85
8.3.4	Células	86
8.3.5	Métodos	86
8.4	Resultados e Discussões	89
8.4.1	Estudo farmacocinético em camundongos	89
8.4.2	Estudo de Biodistribuição	90
8.4.3	Estudos de imagem	97
8.5	Conclusões	99
9	Contribuições para a Validação do Processo Produtivo do FLT-¹⁸F	101
9.1	Objetivos Específicos	101
9.2	Revisão Bibliográfica Específica	102
9.2.1	As Boas Práticas de Fabricação (BPF)	102
9.2.2	Validação de Processo	103
9.3	Materiais, Métodos e Resultados	107
9.3.1	Infraestrutura	107
9.3.2	Materiais	107
9.3.3	Métodos e Resultados	107
9.4	Conclusões	115
10	Conclusões	117

10.1 Considerações Finais	117
10.2 Sugestões para Pesquisas Futuras	118
A Anexo A - Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa	119
Referências Bibliográficas	121

LISTA DE ABREVIATURAS

% AI	Porcentagem de atividade injetada
% AI/g	Porcentagem de atividade injetada por grama de tecido
μCi	Microcurie
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μmol	Micromol
^{11}C	Radioisótopo de carbono com número de massa 11
^{111}In	Radioisótopo de índio com número de massa 111
^{13}N	Radioisótopo de nitrogênio com número de massa 13
^{131}I	Radioisótopo de iodo com número de massa 131
^{15}O	Radioisótopo de oxigênio com número de massa 15
^{18}F	Radioisótopo de flúor com número de massa 18
^{201}Tl	Radioisótopo de tálio com número de massa 201
3D	Três dimensões
^{67}Ga	Radioisótopo de gálio com número de massa 67
^{68}Ga	Radioisótopo de gálio com número de massa 68
^{82}Rb	Radioisótopo de rubídio com número de massa 82
^{99m}Tc	Radioisótopo de tecnécio metaestável com número de massa 99
Abs	Absorção
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR42J	Linhagem celular de tumor pancreático de rato
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
AUC	Área sob a curva
AZT	Azotimidina
Bq	Bequerel
BPF	Boas práticas de fabricação
CB	Centro de Biotecnologia
CCD	Cromatografia de camada delgada
CL	Depuração
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência

CMN	Centro de Medicina Nuclear
cpm	Contagens por minuto
CT	Tomografia computadorizada
CTP	Citidina trifosfato
DMEM	Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido Desoxirribonucléico ou <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EMEM	Eagle suplementado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EQ	Equação
ET	Tomografia por emissão
F	Fluor
FDA	Food and Drug Administration
FDG- ¹⁸ F	Fludesoxiglicose (18 F)
FET- ¹⁸ F	Fluoretil tirosina radiomarcada com flúor-18
FIG	Figura
FLT	Fludesoxitimidina
g	Grama
GE	General Electric
GBq	Gigabecquerel
h	Horas
H ₂ O	Água
HCl	Ácido clorídrico
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
IT	Instrução de Trabalho
K ₂₂₂	Kryptofix
K _{el}	Constante de eliminação do organismo
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minutos
MTT	Brometo de 3 - [4,5- dimetiltiazol-2-il]- 2,5-difeniltetrazólio
MTS	3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)- 5-(3-carboximetoxifenil)- 2-(4-sulfofenil)- 2H-tetrazólio
n	Números
N-BOC	N-butoxicarbonil
PBS	Tampão fosfato-salina ou <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
PG	Procedimento Gerencial
pH	Potencial hidrogeniônico
PMS	fenazina metassulfato
PNM	Palpável não mensurável

PO	Procedimento operacional
POP	Procedimento operacional padrão
PV	Protocolo de Validação
R	Resolução
RCY	Rendimento radioquímico
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
R_f	Fator de retenção
RNA	Ácido ribonucleico
RSD	Desvio Padrão Relativo
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SFB	Soro Fetal Bovino
SPECT	Tomografia por emissão de fóton único
$t_{1/2}$	Tempo de meia-vida
TAB	Tabela
TBA	Tetrabutylamônio
TK	Timidina cinase ou quinase
TLC-SG	Suporte cromatográfico para cromatografia em camada delgada
t_R	Tempo de retenção
U-87 MG	Linhagem celular de glioblastoma humano
UMP	Uridina monofosfato
USA	United States of America
USP	Universidade de São Paulo
USP-35	United States Pharmacopeia - 35
UTP	Uridina trifosfato
UV	Ultra violeta
Vd	Volume de distribuição
v/v	Volume por volume
WST	Sais de Tetrazólio solúveis em água
XTT	2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida

LISTA DE FIGURAS

1.1	Estrutura química do radiofármaco fludesoxitimidina (^{18}F) (FLT- ^{18}F).	2
3.1	Esquema da estrutura de um nucleotídeo [1].	11
3.2	Bases nitrogenadas purinas e pirimidinas, respectivamente.	12
3.3	Nucleosídeo timidina e seu análogo FLT.	14
3.4	Esquema que ilustra a substituição eletrofílica em compostos alifáticos e aromático.	15
3.5	Esquema de uma substituição eletrofílica através da reação de desmetalização.	15
4.1	Esquema do delineamento experimental do trabalho.	21
5.1	Módulos de síntese automatizada para produção do FLT- ^{18}F . Em (A) módulo TRACERlab FX _{F-N} da GE [2], (B) Módulo GRP da Scintomics [3], (C) módulo Synthera da IBA [4], (D) módulo ELIXYS da Sofie Biosciences [5].	25
5.2	Módulo de síntese TRACERlab MX (GE) com o cassete e conjunto de reagentes do FLT- ^{18}F	26
5.3	Estrutura química do recursor do FLT.	28
5.4	Esquema do estado de transição que ocorre durante a síntese do FLT- ^{18}F por meio da reação de substituição nucleofílica S _N 2	28
5.5	Esquema do TBA HCO ₃ funcionando como um catalisador na síntese do FLT- ^{18}F	29
5.6	O radiofármaco FLT- ^{18}F após a saída através da hidrólise ácida dos grupos de proteção. Os círculos pontilhados em vermelho estão indicando os locais em que os grupos de proteção foram retirados.	30

5.7	Esquema do módulo de síntese TRACERlab MX (GE) com o cassete e conjunto de reagentes do FLT- ¹⁸ F fornecido pela ABX.	36
5.8	Estabilidade do radiofármaco FLT- ¹⁸ F em temperatura ambiente por diferentes tempos (n = 3).	41
5.9	Cromatogramas do produto FLT- ¹⁸ F obtidos 10 horas após a síntese, utilizando como fase móvel acetonitrila e água em gradiente [6]. Em (A) está representado o último controle radioquímico em CLAE feito na primeira produção e em (B) refere-se a segunda produção.	42
6.1	Gráfico linear das medidas de atividade do radiofármaco FLT- ¹⁸ F ao longo do tempo, referente a três diferentes produções em condição padrão de síntese.	54
6.2	Perfil cromatográfico do (A) FLT- ¹⁸ F e (B) fluoreto- ¹⁸ F utilizando-se diferentes fases móveis em suporte de TLC-SG.	55
6.3	Perfil cromatográfico do (A) FLT- ¹⁸ F e (B) fluoreto- ¹⁸ F utilizando-se diferentes fases móveis em suporte de tipo ITLC-SG.	56
6.4	Cromatograma (CLAE) UV do FLT a 267 nm (t _R = 7,5), com fase móvel contendo água:etanol (90:10 v/v).	57
6.5	Radiocromatograma do (A) ¹⁸ F ⁻ e (B) FLT- ¹⁸ F contaminado com ¹⁸ F ⁻ , utilizando-se coluna de fase reversa C ₁₈ e fase móvel água:etanol (90:10 v/v) a um fluxo de 1 mL/min por 20 minutos; (C) ¹⁸ F ⁻ e (D) FLT- ¹⁸ F contaminado com ¹⁸ F ⁻ , utilizando coluna de fase reversa C ₁₈ e fase móvel água:etanol (90:10 v/v) a um fluxo de 0,8 mL/min por 20 minutos [7, 8, 9].	57
6.6	Cromatograma de CLAE (A) fluoreto-18 e (B) FLT- ¹⁸ F utilizando-se coluna de fase reversa C ₁₈ e fase móvel gradiente de acetonitrila em água e fluxo de 1 mL/min por 20 minutos.	58
6.7	Radiocromatograma de CLAE de fase reversa do FLT- ¹⁸ F utilizando (A) 100 °C, (B)120 °C e (C) 140 °C, fase móvel água:etanol (90:10 v/v) com fluxo de 1 mL/min, isocrático por 20 minutos.	61
6.8	Cromatograma gasoso do FLT- ¹⁸ F marcado à 100 °C.	62
6.9	Cromatograma gasoso do FLT- ¹⁸ F marcado à 120 °C.	63
6.10	Cromatograma gasoso do FLT- ¹⁸ F marcado à 140 °C.	64
7.1	Mecanismo de absorção do FLT- ¹⁸ F na célula. Esquema adaptado de Been e colaboradores [10].	71

7.2	Porcentagem do radiofármaco FLT- ¹⁸ F que foi internalizado e ligado à membrana celular em função do tempo de incubação (n = 4).	75
7.3	Porcentagem do radiofármaco FLT- ¹⁸ F que foi internalizado em relação à quantidade total colocada em cada poço (n = 4).	76
7.4	Ajuste linear das densidades ópticas (Abs) obtidas com diferentes quantidades de células U-87 MG, em diferentes tempos de incubação com o agente cromogênio MTS (1, 2 e 3 horas) (n = 7). * Absorbância.	77
7.5	Resíduos obtidos através da função linear das densidades ópticas obtidas das diferentes quantidades de células em três tempos distintos.	77
7.6	Viabilidade das células U-87 MG utilizando-se diferentes concentrações de FLT não radiomarcado em relação ao controle (n = 8).	78
7.7	Viabilidade das células U-87 MG do grupo controle e com diferentes atividades de FLT radiomarcado com ¹⁸ F (n = 8). A barra em verde representa o grupo controle com concentração de FLT- ¹⁸ F igual a zero.	78
8.1	Curva de clareamento sanguíneo do FLT- ¹⁸ F em camundongos <i>BALB/c</i> sadios (n = 5).	89
8.2	Biodistribuição do FLT- ¹⁸ F em animais <i>BALB/c</i> sadios. Os dados são expressos em porcentagem da atividade injetada por grama de tecido (n = 4).	90
8.3	Biodistribuição do FLT- ¹⁸ F nos órgãos e tecidos em camundongos <i>BALB/c</i> . Os dados são expressos em porcentagem da atividade injetada (n = 4).	92
8.4	Biodistribuição do FLT- ¹⁸ F nos órgãos e tumor de glioblastoma humano (U-87 MG) em camundongos <i>Nude</i> . Os dados são expressos em porcentagem da atividade injetada por grama de tumor (n=3).	95
8.5	Biodistribuição do FLT- ¹⁸ F nos órgãos e tumor de adenocarcinoma pancreático de rato (AR42J) em camundongos <i>Nude</i> . Os dados são expressos em porcentagem da atividade injetada por grama de tumor (n=3).	96
8.6	Imagens PET/CT de camundongos <i>Nude</i> fêmeas com tumor de células SK-Mel-145 (indicados pelas setas brancas) utilizando o FLT- ¹⁸ F. A primeira linha representa imagens CT, a segunda a fusão das duas técnicas e a última apenas PET. As imagens são representativas de dois animais.	98
9.1	Hierarquia da garantia da qualidade e a relação entre adequação do sistema, qualificação, validação e desenvolvimento (Adaptado de [11]).	106

9.2	Escopo das etapas críticas do processo da produção de FLT- ¹⁸ F para a validação de processo.	109
9.3	Fluxograma do plano de amostragem relacionado aos pontos críticos do processo de produção do radiofármaco FLT- ¹⁸ F.	110
9.4	Cromatograma de CLAE (UV) do precursor utilizado para a síntese do FLT- ¹⁸ F utilizando-se coluna C ₁₈ e como fase móvel um gradiente de acetonitrila e água, com um fluxo de 1 mL/min. Em (A) o precursor apresentava-se dentro do prazo da validade, já em (B) o precursor com prazo de validade vencido [6].	113
9.5	Radiocromatograma de CLAE do produto FLT- ¹⁸ F utilizando coluna C ₁₈ de fase reversa, fase móvel em gradiente de acetonitrila e água, com fluxo de 1 mL/min [6].	114

LISTA DE TABELAS

3.1	Energia e alcance nos tecidos de diferentes radiofármacos emissores de pósitron [12]	10
5.1	Conjuntos de reagentes atualmente disponíveis comercialmente para produção do radiofármaco FLT- ¹⁸ F.	24
5.2	Diferentes definições para o rendimento radioquímico de uma marcação com radioisótopos.	31
5.3	Soluções e reagentes que compõe o conjunto de reagentes para a síntese do radiofármaco FLT- ¹⁸ F (ABX, Alemanha).	34
5.4	Materiais utilizados para realizar a síntese do radiofármaco FLT- ¹⁸ F em sistema automatizado.	35
5.5	Dados das irradiações que foram realizadas durante o estudo de variação da temperatura de radiomarkação do FLT- ¹⁸ F, produção feita nos aceleradores cíclotron de 18 e 30 MeV.	38
5.6	Variação da temperatura de radiomarkação. Foi utilizado 25 mg do precursor, atividade inicial variando de 17,76 a 116,18 GBq (0,48 a 3,14 Ci) de ¹⁸ F ⁻ e um tempo de 5 minutos.	39
6.1	Medidas de atividade do FLT- ¹⁸ F, obtidas através da condição padrão de síntese, em calibrador de doses em três diferentes tempos.	53
6.2	Dados encontrados através da equação da reta e meias-vidas calculadas para cada síntese na identificação radionuclídica do FLT- ¹⁸ F.	54
6.3	Pureza radioquímica do FLT- ¹⁸ F, utilizando-se 25 mg do precursor e três temperaturas de radiomarkação na síntese diferentes. A pureza radioquímica foi realizada por CCD (n = 3)	59

6.4	Concentração de etanol encontrada no produto final derivado de três temperaturas de marcação diferentes (100 °C, 120 °C e 130 °C) através da cromatografia gasosa (n = 3).	65
6.5	Valores de pH do produto final encontrados em diferentes sínteses produzida neste trabalho (n = 9).	66
8.1	Parâmetros farmacocinéticos para FLT- ¹⁸ F em camundongos <i>BALB/c</i> machos sadios (n = 5). Os parâmetros foram calculados utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.0 [®] , após o ajuste para decaimento exponencial e cálculo da área sob a curva.	89
8.2	Biodistribuição do FLT- ¹⁸ F nos órgãos e tecidos em camundongos <i>BALB/c</i> . Os dados são expressos em porcentagem da atividade injetada por grama de órgão ou tecido (n = 4).	91
8.3	Biodistribuição do FLT- ¹⁸ F nos órgãos e tumor de glioblastoma humano (U-87 MG) em camundongos <i>Nude</i> . Os dados são expressos em porcentagem da atividade injetada por grama de tumor (n = 3).	93
8.4	Biodistribuição do FLT- ¹⁸ F nos órgãos e tumor de adenocarcinoma pancreático de rato (AR42J) em camundongos <i>Nude</i> . Os dados são expressos em porcentagem da atividade injetada por grama de tumor (n = 3).	94
8.5	Razões tumor:tecidos calculadas para os dois tumores estudados. Os valores utilizados para os cálculos foram os %AI/g obtidos a partir da biodistribuição dos derivados em camundongos <i>Nude</i>	97
9.1	Apêndices do protocolo de validação de processo da produção de FLT- ¹⁸ F. .	111
9.2	Especificações dos ensaios do controle de qualidade do FLT- ¹⁸ F para a realização da validação de processo.	112
9.3	Resultado dos ensaios do controle de qualidade para os três lotes da validação de processo.	115

1

INTRODUÇÃO

A tomografia por emissão de pósitron (PET) é uma técnica bem estabelecida utilizada na oncologia para o diagnóstico, estadiamento e monitoração tumoral em resposta à terapia [13]. Atualmente, a fludesoxiglicose (^{18}F) (FDG- ^{18}F) é o radiofármaco mais amplamente utilizado para imagens PET. A emissão de pósitrons (β^+) é a característica essencial de radioisótopos para aplicação em PET. O flúor-18 é um radioisótopo emissor de pósitrons, amplamente utilizado nesta técnica da medicina nuclear [14]. O flúor-18, na forma de íon ($^{18}\text{F}^-$), é obtido como resultado do bombardeamento do ^{18}O (na forma de água enriquecida) por prótons acelerados e com uma corrente de feixe em aceleradores de partículas (Cíclotron) [15]. O $^{18}\text{F}^-$ tem um tempo de meia-vida de apenas 109,77 minutos [16] e 1,85 – 3,7 GBq (50 – 100 mCi) de flúor anidro radioativo é necessário para iniciar o processo de marcação e manter a radioatividade suficiente até o processo final, quando o paciente faz uso do produto [7].

Apesar do FDG- ^{18}F ser muito utilizado na medicina nuclear, este possui afinidade por tecidos inflamados, possibilitando o aparecimento de resultados falso-positivos no diagnóstico de tumores [17]. O FDG- ^{18}F possui captação alta e seletiva em uma série de tumores, para os quais vem sendo empregado como importante ferramenta no diagnóstico. Entretanto, a captação do FDG- ^{18}F é de moderada a baixa em tumores neuroendócrinos, câncer de próstata e hepatomas. O diagnóstico de tumores cerebrais com FDG- ^{18}F fica prejudicado pela captação fisiológica do radiofármaco e a eliminação renal do composto dificulta o diagnóstico de câncer de bexiga. Em virtude de tais limitações, novos radiofármacos mais seletivos

para diagnóstico de câncer têm sido desenvolvidos para o uso em imagens PET, utilizando mecanismos de captação nas células tumorais diferentes da fludesoxiglicose (^{18}F) [18]. Neste sentido, radiofármacos que monitoram a proliferação celular que podem apresentar uma especificidade maior em relação à captação tumoral têm sido estudados [19].

Um destes fármacos radioativos que monitoram a proliferação celular é a 3'-desoxi-3'-[^{18}F]-fluortimidina ou fludesoxitimidina (^{18}F) (FLT- ^{18}F) (desoxitimidina marcada com o isótopo radioativo flúor-18), um análogo da timidina (FIG. 1.1). A etapa inicial do seu metabolismo é a fosforilação da desoxitimidina, que é catalisada pela enzima timidina quinase 1 (TK1) [10].

FIGURA 1.1 Estrutura química do radiofármaco fludesoxitimidina (^{18}F) (FLT- ^{18}F).

Em células que não estão no estado de divisão celular, a enzima TK1 tem sua atividade praticamente nula, mas em células em divisão atinge a sua atividade máxima no final da fase G1 e durante a fase S do ciclo celular. Em alguns estudos, foi possível verificar que a atividade da enzima TK1 é de três a quatro vezes maior em células malignas que em células benignas [20]. Este fator se mostra atrativo não só para a imagem de tumores, mas também para a avaliação precoce da resposta tumoral frente à quimio e radioterapia [10].

Há alguns anos vem se desenvolvendo métodos diferentes para síntese do radiofármaco FLT- ^{18}F , muitos deles sendo bastante complicados e com rendimentos baixos. Estudos revelam que o precursor utilizado e a sua concentração, o tempo e a temperatura de reação e até mesmo o grau da evaporação do solvente utilizado (acetonitrila) [8] são fundamentais no rendimento radioquímico da síntese do FLT- ^{18}F . A síntese automatizada da fluortimidina radioativa é composta por três etapas principais, sendo elas a fluoração ($^{18}\text{F}^-$) do precursor, seguido pela hidrólise dos grupos de proteção e por fim a purificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou em alguns casos por cartuchos de purificação, como, por exemplo, os Sep-Pak[®] [8].

Mesmo sendo um processo de síntese automatizado, para a adequação de uma rotina de produção, se faz necessário estudar os parâmetros do processo, de modo a avaliar a influência da variação das condições de marcação no rendimento radioquímico da síntese.

Além disso, é necessário elaborar e executar um protocolo de validação do processo

produtivo, documentando a capacidade de reproduzir o procedimento produtivo com a finalidade e segurança requeridos para o registro do produto na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Os estudos de validação de processos constituem parte essencial das Boas Práticas de Fabricação (BPF) de medicamentos da ANVISA e devem ser conduzidos de acordo com protocolos predefinidos. Atualmente, as boas práticas de fabricação de medicamentos estão contidas na Resolução da Diretoria Colegiada nº 17, de 16 de abril de 2010 [21] e especificamente para modelos de radiofármacos, na RDC nº 63 de 18 de dezembro de 2009.

Juntamente ao desenvolvimento de métodos para validação dos processos produtivos deve ser desenvolvida a capacitação necessária para a elaboração dos relatórios técnicos para registro de novo radiofármaco na ANVISA conforme presente na RDC nº 64, de 18 de dezembro de 2009, que trata dos registros dos radiofármacos. A elaboração de um dossiê para registro de um radiofármaco envolve a descrição dos procedimentos de produção e controle de qualidade, especificações do produto acabado, apresentação de resultados de estudos clínicos já realizados (que envolve intensa busca bibliográfica), de estudos pré-clínicos, incluindo ensaios toxicológicos em animais, bem como documentação completa do produto relacionada à embalagem para transporte e a bula que acompanha o produto. Desta forma, torna-se de extrema importância incluir no planejamento de desenvolvimento de um novo radiofármaco a inclusão dos estudos pré-clínicos [22].

2

OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo estudar os parâmetros da síntese automatizada do radiofármaco FLT- ^{18}F , avaliar os métodos de controle de qualidade que serão utilizados na rotina de produção futura, assim como realizar estudos de biodistribuição em animais, imagens em PET de animais e estabilidade radioquímica. O trabalho pretende ainda contribuir para o desenvolvimento e elaboração dos protocolos de validação do processo de produção e estabelecer as metodologias analíticas a serem utilizadas durante a rotina de produção, de modo a adequar o processo de produção do novo radiofármaco às exigências de Boas Práticas de Fabricação da ANVISA.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- realizar a síntese automatizada do FLT- ^{18}F e estudar certos parâmetros a ela relacionados a fim de otimizar as condições de produção;
- analisar e estabelecer as metodologias analíticas do radiofármaco FLT- ^{18}F ;
- estudar a estabilidade do FLT- ^{18}F ;
- avaliar a citotoxicidade do radiofármaco estudado;

-
- estudar a farmacocinética do FLT- ^{18}F ;
 - realizar estudo de biodistribuição do radiofármaco em animais sadios e com modelo tumoral;
 - realizar imagem em PET de animais com tumor;
 - desenvolver o protocolo e documentos relacionados à validação de processo produtivo.

3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será abordada a revisão bibliográfica geral referente ao trabalho realizado. As revisões bibliográficas específicas serão encontradas, subsequentemente, nos capítulos correspondentes.

3.1 O CÂNCER

O câncer é uma das maiores causas de morte no mundo, causando 7,6 milhões de mortes em 2008 (correspondendo a 13% do total das mortes) [23]. O problema do câncer no Brasil ganha relevância pelo perfil epidemiológico que essa doença vem apresentando. A estimativa de 2012 para novos casos de neoplasias no Brasil foi de 257.870 em homens e de 260.640 em mulheres [24].

Neoplasia significa literalmente o processo de um “novo crescimento”, também denominado de *neoplasma*. As neoplasias, também chamadas de tumores, resultam de alterações genéticas que são passadas hereditariamente desde a progênie das células. Estas alterações permitem que as células tenham uma proliferação excessiva e não regulada que se torna autônoma (independente de estímulos fisiológicos do crescimento). Os tumores podem, no entanto, serem classificados como tumores malignos ou benignos.

As neoplasias malignas são denominadas cânceres, as quais são lesões capazes de

invadirem tecidos adjacentes e se espalharem para locais distantes no corpo, levando à morte. Felizmente, muitos cânceres diagnosticados precocemente são tratados com sucesso.

Durante muitos anos, teorias foram propostas com a finalidade de explicar o câncer, mas, hoje, a maioria dos cânceres, senão todos, surge por defeitos do DNA. Primeiramente, foi reconhecido que muitos agentes eram classificados como carcinogênicos, por exemplo, a radiação ionizante e substâncias químicas. Estes agentes são capazes de causar danos no DNA e, assim, desencadear um câncer. Em segundo, alguns cânceres estão associados a determinadas anomalias cromossômicas. E em terceiro, alguns tipos específicos de cânceres tem tendência a ocorrer em famílias [1].

3.2 RADIOFÁRMACOS

Radiofármacos são fármacos que possuem radionuclídeos na sua estrutura e são utilizados para tratamento ou diagnósticos de doenças [25, 12].

Normalmente, os radiofármacos não possuem atividade farmacológica no organismo, isto porque a quantidade de traçador utilizada é muito pequena. Assim, não há uma relação de dose-resposta como em fármacos convencionais. E nos casos dos radiofármacos utilizados na terapia, o efeito gerado é através da radiação e não da molécula carreadora [26, 25].

Os radiofármacos são compostos basicamente por um radionuclídeo, responsável pela radiação, e um subtrato ou ligante, que irá determinar a distribuição e o comportamento fisiológico do radiofármaco [25, 12].

Os radionuclídeos ou radioisótopos possuem um núcleo instável, que se estabilizam por meio da emissão de radiação ionizante. Os radioisótopos podem decair emitindo diferentes tipos de radiações ionizantes, como alfa (α), beta (β^-), pósitron (β^+) e gama (γ). Desta maneira, dependendo do tipo de radiação emitida pelo radionuclídeo, o mesmo é utilizado para uma finalidade. Emissores pósitron e gama são usados para fins diagnósticos, já emissores alfa e beta são para fins terapêuticos, pois possuem uma maior capacidade de causar lesão nas células [26].

Os radiofármacos devem possuir afinidade por determinados órgãos ou pelos tumores em questão. A busca por radiofármacos com baixa captação em órgãos não alvo é contante. Isto porque captações não específicas podem atrapalhar o diagnóstico por imagem, obscurecendo possíveis detalhes, além de causar exposição de radiação em partes desnecessárias do corpo [26].

Os radiofármacos precisam passar pelo processo de radiomarcagem para que o radioisótopo seja adicionado à sua estrutura e, assim, tenha o efeito esperado. A radiomarcagem do produto depende, basicamente, de qual radioisótopo está sendo trabalhado

e a propriedade química da molécula a ser marcada. E, assim como em fármacos tradicionais, cuidados na produção e manipulação dos radiofármacos são importantes [25, 12].

Se faz necessário que o produto seja livre de contaminação e que o operador não contamine-o, assim como em fármacos tradicionais. Entretanto, o operador e o ambiente devem ser protegidos da contaminação radioativa do produto. Estes dois itens são os princípios básicos das boas práticas de produção dos radiofármacos [26]. Desta maneira, os radiofármacos, assim como os fármacos tradicionais, devem ser produzidos de acordo com as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e, além disso, sob as normas de radioproteção [25].

3.3 TOMOGRAFIA POR EMISSÃO

Tomografia por emissão (ET, *Emission Tomography*) é um ramo da imagem medicinal que engloba duas técnicas, a tomografia por emissão de pósitrons, mais conhecida como PET (*Positron Emission Tomography*), e a tomografia computadorizada por emissão de fóton único, mais conhecida pelo acrônimo SPECT (*Single Photon Emission Computed Tomography*). Estas técnicas fazem uso de materiais radioativos para realizarem as imagens fisiológicas do corpo. Portanto, imagens feitas pela tomografia por emissão são capazes de detectar tumores, áreas do coração afetadas por doenças coronarianas e identificar regiões do cérebro influenciadas por drogas, por exemplo [27].

As etapas no estudo da tomografia por emissão começam com a produção do radiofármaco específico para determinada imagem de uma doença em questão. O próximo passo é a administração deste radiofármaco, o qual é introduzido no corpo do paciente, normalmente por injeção. Após a administração (o tempo é dependente do radiofármaco utilizado) é feito, então, a aquisição dos dados para imagem, os raios gama originados do decaimento radioativo do produto são emitidos pelo corpo do paciente, detectados e os dados são salvos pelo equipamento. Em seguida, a imagem deve ser reconstruída, ou seja, os dados recolhidos na etapa anterior são processadas matematicamente a fim de gerar uma imagem final. E para finalizar, a imagem gerada é analisada por médicos, podendo também ser computacionalmente analisada [27].

As imagens SPECT se distinguem das PET pelo tipo de radioisótopo utilizado, o qual emite unicamente um fóton de raio γ em cada evento do decaimento, originando o nome da técnica como de fóton único. Além disto, os detectores empregados na instrumentação SPECT requerem emissão gama abundante e de energia entre 100 e 300 keV [27].

A técnica SPECT é realizada em uma gama câmara de 360° capaz de fazer imagens em 3D, normalmente apresentadas na forma de cortes transversais do paciente. As câmaras utilizam detectores de cristais de NaI e podem ser configuradas com uma, duas ou três cabeças de detecção. A sensibilidade aumenta com o número de cabeças de detecção, pois a

área que captará a radiação simultaneamente será maior [12].

O ^{99m}Tc é o radioisótopo mais utilizado para a realização de imagens por SPECT, outros radioisótopos como o ^{131}I , ^{67}Ga , ^{201}Tl , ^{111}In e ^{123}I também são utilizados para a mesma finalidade [12, 27].

A tomografia por emissão de pósitrons é uma técnica de imagem molecular que apresenta grandes vantagens frente às outras modalidades de imagem [27]. As bases físicas do mecanismo da imagem PET derivam da medida de dois fótons resultantes de uma aniquilação produzida por radionuclídeos emissores de pósitrons [28].

A resolução espacial da PET depende do tipo de detector e do radioisótopo utilizado. A energia da partícula β^+ emitida pelo radioisótopo determina a distância que o pósitron percorre no tecido até a aniquilação. Emissores de pósitron de menor energia conferem melhor resolução às imagens [12]. Na TAB. 3.1 apresentam-se os emissores de pósitrons mais comumente utilizados, suas energias e seus alcances.

TABELA 3.1 Energia e alcance nos tecidos de diferentes radiofármacos emissores de pósitron [12]

Radioisótopo	Energia máxima do pósitron (MeV)	Alcance máximo linear (mm)	Alcance médio linear (mm)
^{11}C	0,96	5,0	0,3
^{13}N	1,19	5,4	1,4
^{15}O	1,72	8,2	1,5
^{18}F	0,64	2,4	0,2
^{68}Ga	1,89	9,1	1,9
^{82}Rb	3,35	15,6	2,6

A PET é extremamente sensível, necessitando que apenas pequenas quantidades do traçador sejam suficientes para realizar o exame. Além disso, os radioisótopos emissores de pósitrons apresentam meia-vida curta, a qual possibilita uma ótima imagem dos fótons (alta energia) mantendo doses baixas nos pacientes [12].

Geralmente, na clínica oncológica, as imagens em PET são feitas empregando a fludesoxiglicose (^{18}F) (FDG- ^{18}F) a fim de detectar tumores e avaliar a sua atividade metabólica. O FDG- ^{18}F atua através do mecanismo metabólico das células cancerígenas, e diferentes traçadores têm sido estudados a fim de explorar diferentes aspectos do metabolismo das células tumorais e normais [29].

3.4 FLT MARCADO COM RADIOISÓTOPO FLÚOR-18 PARA USO EM PET

O FDG- ^{18}F é o radiofármaco mais utilizado para PET, entretanto, existem outros que estão sendo estudados e validados para o uso no diagnóstico clínico. Alguns aminoácidos marcados como a metionina- ^{11}C e a fluoretiltirosina- ^{18}F (FET- ^{18}F) têm mostrado grande potencial em imagens de tumores cerebrais e, em particular, no planejamento preciso da radioterapia [30, 31, 32].

Análogos da colina também têm sido utilizados em oncologia na obtenção de imagens PET. A colina entra na célula e é utilizada na biossíntese de fosfatidilcolina, componente essencial da membrana celular. Dois dos mais utilizados radiofármacos análogos da colina são a colina- ^{11}C e a fluormetilcolina- ^{18}F , e são utilizados particularmente nas imagens de câncer de próstata [30].

Um radiofármaco para fins diagnóstico em PET que vem sendo bastante explorado aos longo dos anos é a fluortimidina ou flutimidina marcada também com flúor-18. A seguir, serão abordadas as principais características deste radiofármaco.

3.4.1 NUCLEOTÍDEOS

O DNA (ácido desoxirribonucleico) é formado por estruturas repetitivas ligadas entre si em grandes quantidades. Estas estruturas são compostas por um açúcar, um fosfato e uma base, que juntos formam um nucleotídeo FIG.3.1 [1].

FIGURA 3.1 Esquema da estrutura de um nucleotídeo [1].

Assim como o DNA, o RNA (ácido ribonucleico) também possui esta estrutura. Entretanto, o açúcar pertencente ao RNA possui uma estrutura diferente do açúcar do DNA. Os açúcares dos nucleotídeos são chamados de pentose, e possuem cinco átomos de carbono em sua estrutura numerados como 1', 2', 3', 4' e 5'. A ribose do RNA tem um grupamento hidroxila ligado ao carbono 2', enquanto a desoxirribose do DNA possui um

átomo de hidrogênio nesta posição [1].

A base nitrogenada que faz parte da estrutura do nucleotídeo pode ser de dois tipos - uma purina ou uma pirimidina. As purinas são quimicamente formadas por um anel de seis lados ligado a um outro anel de cinco lados, enquanto as pirimidinas consistem apenas em um anel de seis lados [1]. O DNA e o RNA possuem ambos duas purinas, adenina e guanina (FIG. 3.2). Já as pirimidinas existem três, citosina, timina e uracil (FIG. 3.2), sendo a uracil encontrada apenas no RNA e a timina apenas no DNA. Quando uma base nitrogenada está ligada a um açúcar, sem o grupamento fosfato, são chamados de **nucleosídeo**.

FIGURA 3.2 Bases nitrogenadas purinas e pirimidinas, respectivamente.

O terceiro componente de um nucleotídeo é o grupamento fosfato, composto por um átomo de fósforo ligado a quatro átomos de oxigênio. O fosfato possui carga negativa, conferindo acidez ao DNA e RNA, e está ligado ao carbono 5' do açúcar [1].

Os nucleotídeos se ligam entre si através das ligações fosfodiéster, a fim de formar filamentos de polinucleotídeos dando origem ao DNA ou RNA. Estas ligações são do tipo covalente relativamente fortes e ligam o átomo do carbono 3' de um nucleotídeo ao grupamento fosfato 5' do seguinte [33, 1].

3.4.2 SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS DE PIRIMIDINA

A biossíntese das pirimidinas é mais simples que a biossíntese das purinas. Os anéis pirimidínicos são todos derivados do ácido aspártico. Basicamente, a biossíntese *de novo* dos nucleotídeos pirimidínicos consiste em seis reações da formação de uridina monofosfato (UMP), o qual dará origem as subsequentes uridina trifosfato (UTP), citidina trifosfato (CTP) e timidina monofosfato (dTMP) [33].

O objetivo inicial da síntese dos nucleotídeos pirimidínicos é a formação do anel pirimidínico, para, depois, o mesmo ser acoplado à porção ribose-5-fosfato. Com o UMP sintetizada, ocorre a formação de UTP através da ação de duas enzimas subsequentes, uma nucleosídeo monofosfatocinase e uma nucleosídeo difosfatocinase. Esta etapa deve ser realizada para que o então formado nucleosídeo trifosfato participe da síntese dos ácidos nucleicos. Já o CTP é formado a partir da aminação do UTP pela CTP-sintetase [33].

Os desoxiribonucleotídeos são formados a partir de seus ribonucleotídeos correspondentes através da redução do carbono 2'. Como a DNA-polimerase não é capaz de distinguir uridina trifosfato (dUTP) e timidina trifosfato (dTTP), o dTTP é biossintetizado através da metilação do dUMP pela enzima timidilato-sintase (TS). O dUMP é formado pela hidrólise do dUTP pela dUTP-difosfodrolase. Com este processo, a concentração de dUTP nas células é reduzida de forma a prevenir a incorporação de uracila no DNA [33].

Os ácidos nucleicos estão contidos na maioria dos alimentos, sendo de origem celular. Eles sobrevivem a ação do ácido estomacal e são degradados em nucleotídeos principalmente no duodeno por nucleases pancreáticas e fosfodiesterases intestinais. Os nucleotídeos formados não conseguem passar através das membranas celulares, por isso, ocorre a ação de várias nucleotidasases grupo-específicas e fosfatases não-específicas para degradá-los em nucleosídeos. Estes compostos podem, então, ser facilmente absorvidos pela membrana intestinal. Porém, uma fração muito pequena dos nucleosídeos absorvidos são utilizados na síntese dos ácidos nucléicos. Isto ocorre porque as rotas de biossíntese *de novo* são bastante satisfatórias para suprir as necessidades do organismo. Além disso, ácidos nucleicos celulares do próprio organismo são constantemente degradados, sendo parte da rotatividade dos compostos celulares [33].

Os desoxinucleosídeos provenientes da alimentação e de células mortas são solicitados pelas células que estão no processo de divisão celular. Durante a intérfase, a célula superexpressa determinadas enzimas a fim de garantir substratos para a duplicação do DNA. Uma destas enzimas é a timidina quinase (TK), presente em duas formas nos mamíferos, TK1 e TK2.

A TK1 é considerada uma enzima da proliferação celular, sua atividade é praticamente ausente em células quiescentes, mas, em células em divisão, atinge a sua atividade máxima no final da fase G1 e durante a fase S do ciclo celular [34]. Estas duas fases pertencem à etapa da vida celular chamada intérfase. Durante a fase G1 ocorrem uma série de atividades dentro da célula como biossíntese e crescimento celular, e é na fase S que ocorre a replicação do DNA [35]. A TK1 é responsável em transformar a timidina em timidina monofosfato utilizando ATP e, subsequentemente, em timidina trifosfato.

3.4.3 FLUORTIMIDINA-¹⁸F

A fluortimidina radiomarcada com ¹⁸F (FLT-¹⁸F) é um análogo nucleosídico da timidina FIG. 3.3 e, por não possuir um nome DCB (Denominação Comum Brasileira) até o momento, também pode ser chamada de fludesoxitimidina (18 F). A diferença entre as duas estruturas está na presença do átomo de flúor que, para justificar o seu uso em imagens PET, trata-se de um radioisótopo emissor de pósitron.

FIGURA 3.3 Nucleosídeo timidina e seu análogo FLT.

O FLT não radiomarcado foi originalmente produzido após a descoberta das propriedades anti-HIV do azidotimidina (AZT) ou zidovudina, também análogo do nucleosídeo timidina [36]. Atualmente, existe um grande grupo composto por análogos de nucleosídeos que são capazes de inibir a transcriptase reversa dos vírus. Estes compostos, após sofrerem a fosforilação, incorporam na cadeia do DNA viral e levam ao término da cadeia. A α -DNA-polimerase dos mamíferos é resistente a estes efeitos, entretanto, a γ -DNA-polimerase das mitocôndrias das células hospedeiras do vírus é bastante sensível [37].

Inicialmente, a fluortimidina não marcada foi estudada com o intuito de buscar o mesmo mecanismo de ação e finalidade da zidovudina. Durante o início da fase I dos testes clínicos em pacientes com AIDS, foi detectada uma alta toxicidade do FLT nas doses clinicamente utilizáveis (100 mg por dia, administrados por semanas) [38]. No entanto, estudos farmacológicos notaram que a quantidade utilizada de FLT marcado com flúor-18 como traçador era segura e poderia ser utilizada para PET [36].

Em 1998, Shields e colaboradores [39] introduziram o FLT- ^{18}F como um radiofármaco utilizado para imagens PET na visualização da proliferação celular de tumores. E a partir disto, o FLT vem ganhando uma grande atenção em oncologia.

O FLT é apenas fracamente incorporado ao DNA e a timidina quinase 1 pode ser super-regulada mesmo durante uma inibição da síntese do DNA. Além disso, o aumento da captação de FLT- ^{18}F pode ser estimulado pelo mecanismo de reparação celular ou pela via de recuperação (salvamento) do metabolismo pirimidínico [36].

O FLT- ^{18}F resiste à degradação metabólica em determinadas espécies de mamíferos, em ratos e cachorros ele é excretado sem alteração na urina. Já em humanos, duas horas após a administração de FLT, 50 % do mesmo encontra-se como glicuronídeo no sangue [40]. Por sofrer essa metabolização no fígado, as imagens em humanos para tumores hepáticos ficam comprometidas, havendo captação no órgão devido a esse processo. Outra característica é a quantidade de timidina endógena existente, como organismo é capaz de sintetizar e reaproveitar a timidina, a absorção de timidina proveniente da alimentação e através de outros meios (injetável) fica comprometida. Esta particularidade afeta diretamente a

absorção celular do análogo de timidina FLT- ^{18}F [40].

3.4.4 MÉTODOS DE MARCAÇÃO COM ^{18}F

O átomo de flúor pode ser inserido em uma molécula através de dois mecanismos químicos. O primeiro é através da substituição eletrofílica e o segundo é a substituição nucleofílica.

A substituição eletrofílica pode ser também chamada de halogenação eletrofílica ou, ainda, dependendo do átomo que é incorporado, pode se chamar fluoração eletrofílica, para o átomo flúor. Este tipo de reação utiliza a molécula $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ que é um agente eletrofílico altamente reativo, porém de baixa seletividade. A reação pode ocorrer tanto em moléculas alifáticas como em aromáticas e possui dois tipos, a fluoração direta (FIG. 3.4) e utilizando um catalisador de ácido de *Lewis*, também chamado de reação de desmetalização vista na FIG. 3.5, esta reação utilizando um catalisador possibilita um aumento da seletividade da fluoração eletrofílica, formando um complexo altamente eletrofílico [41, 42].

FIGURA 3.4 Esquema que ilustra a substituição eletrofílica em compostos alifáticos e aromático.

FIGURA 3.5 Esquema de uma substituição eletrofílica através da reação de desmetalização.

Já a substituição nucleofílica, faz uso do fluoreto como um agente nucleofílico. Esta reação é o método preferencial para a radiofluoração de compostos orgânicos. É muito mais fácil produzir $^{18}\text{F}^-$ do que $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$ e o rendimento é maior. Além disso, o fluoreto-18 é produzido com uma alta atividade específica, diferente da produção do $[^{18}\text{F}]\text{F}_2$. Nesta reação, a molécula que sofrerá o processo de fluoração precisa ter um grupo abandonador que dará

lugar ao átomo de flúor [41, 42]. A reação de substituição nucleofílica será abordada mais detalhadamente no capítulo 5.

3.4.5 APLICAÇÕES CLÍNICA DO FLT-¹⁸F

Existem vários trabalhos na literatura que mostram o uso do radiofármaco FLT-¹⁸F em humanos na realização de estudos clínicos.

Em um trabalho foi observado uma alta sensibilidade do radiofármaco FLT-¹⁸F na detecção de células B de linfoma não-Hodgkin em oito pacientes que não apresentaram tratamento anterior [43]. FLT-¹⁸F também apresentou uma boa captação em gliomas, resultando em uma boa performance nestas imagens em PET [44].

Muitos estudos com o radiofármaco FLT-¹⁸F têm sido feitos a fim de detectar a resposta tumoral frente à quimioterapia e/ou radioterapia, isto porque este radiofármaco é um marcador da proliferação celular tumoral. Em um estudo com 20 pacientes, Contractor e colaboradores [45] observaram mudanças na proliferação de tumor de mama utilizando FLT-¹⁸F após o início da quimioterapia com docetaxel, apresentando uma alta sensibilidade e com fortes indícios de continuar utilizando FLT-¹⁸F para detectar o final da quimioterapia.

No acompanhamento radioquimioterápico de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, as imagens PET de FLT-¹⁸F também apresentaram um grande potencial para prever as respostas terapêuticas e identificar pacientes que precisavam de um rigoroso acompanhamento a fim de detectar doença persistente ou recorrente [46]. Este resultado já havia sido notado por Troost e colaboradores em 2010 [47], mostrando o radiofármaco FLT-¹⁸F como um traçador PET promissor para imagem da proliferação celular de tumores de cabeça e pescoço, estudo este realizado em dez pacientes com tumores da orofaringe.

Estudos realizados sugerem que o uso de FLT-¹⁸F na monitoração de tumores em tratamento seja mais bem sucedido em pacientes sob terapia citostática [48]. As imagens de proliferação celular do FLT-¹⁸F podem mostrar diretamente o efeito de tratamentos utilizando inibidores mTOR (reguladores da proliferação celular), desta maneira, distinguindo os pacientes que apresentam ou não alguma resposta inibidora a essas drogas.

O radiofármaco FLT-¹⁸F mostrou captação em lesões de inflamação granulomatosa e linfonodos reativos. A explicação para tal fato decorre do aumento da taxa de proliferação de macrófagos em inflamações crônicas com formação de granulomas, como no caso da tuberculose, e de linfócitos B nos linfonodos [49, 50].

Em um estudo piloto, realizado em dez pacientes com leucemia mieloide aguda, as imagens PET com FLT-¹⁸F mostraram ser capazes de visualizar os locais com manifestação

da doença, refletindo, assim, a atividade da doença. Desta forma, mesmo o radiofármaco FLT- ^{18}F apresentando captação na medula óssea e baço (órgãos normalmente com grande proliferação celular), a captação em pacientes com a leucemia mielóide aguda foi significativamente maior do que no grupo controle [51].

3.4.6 FLT- ^{18}F *versus* FDG- ^{18}F

O FLT- ^{18}F possui algumas vantagens como um marcador de imagem tumoral, entre elas estão o mecanismo de captação por proliferação celular, a estabilidade frente ao catabolismo *in vivo* e sua radiosíntese em módulo automatizado. Estudos revelam que o FLT- ^{18}F tem se mostrado um marcador mais câncer-específico que o FDG- ^{18}F . Em células de câncer pancreático (SW-979 e BxPc-3), foi encontrado que a absorção do FLT- ^{18}F foi de 18,4% para as células SW-979 e 5,2% para as BxPc-3 da radioatividade administrada *in vitro*, sendo que o FDG- ^{18}F apresentou apenas 0,6% e 0,3%, respectivamente [52].

Outro caso peculiar é a afinidade do FDG- ^{18}F por tecidos de inflamação. Dentro do tumor pode ocorrer um processo inflamatório decorrente da terapia utilizada. Com isto, há uma maior captação de FDG- ^{18}F no tumor, podendo, assim, subestimar o procedimento terapêutico utilizado. Como células inflamatórias possuem uma baixa taxa de proliferação, o FLT- ^{18}F pode precisamente refletir a resposta tumoral frente à terapia [48]. Devido a este fato, o FLT- ^{18}F gera um menor número de falso-positivo que o FDG- ^{18}F .

Entretanto, a taxa de absorção do FDG- ^{18}F pelo tumor em ratos é maior que a do FLT- ^{18}F , mas a seletividade por neoplasmas é maior para o FLT- ^{18}F [53]. Um estudo comparativo da biodistribuição do FLT- ^{18}F e do FDG- ^{18}F mostrou que há uma maior captação do FLT- ^{18}F quando comparado com o FDG- ^{18}F no sangue, plasma, fígado, rins e intestino delgado e uma menor acumulação no cérebro, medula espinal, coração e músculo [54].

Quando se compara o FDG- ^{18}F com o FLT- ^{18}F em imagens de proliferação celular em tumores no pulmão, novamente o FLT- ^{18}F se mostra superior, mostrando uma maior absorção no tumor e podendo ser um biomarcador mais seletivo para proliferação tumoral [55].

Liu e colaboradores [56] reportaram um caso de uma paciente que apresentava lesões na mama, a qual passou por um exame clínico com FLT- ^{18}F a fim de detectar se as lesões eram benignas ou malignas. Entretanto, nenhuma captação foi observada na mama e sim uma alta captação foi notada no mediastino anterior direito. Já as imagens PET do FDG- ^{18}F mostraram uma leve captação apenas nas lesões mamárias. Posteriormente, uma análise patológica da timectomia foi realizada comprovando a presença de timoma.

Um fato interessante foi o diagnóstico combinado utilizando FDG- ^{18}F e FLT- ^{18}F , o qual demonstrou grande sucesso no diagnóstico de lesões pulmonares. O estudo de Xu

e colaboradores [57], mostrou que a multimodalidade FDG- ^{18}F /FLT- ^{18}F PET/CT foi a que mostrou a melhor eficácia diagnóstica de um grupo de setenta e três pessoas que apresentavam dificuldade no diagnóstico de suas lesões pulmonares. Com esta técnica foi possível constatar que 28 pacientes apresentavam tumores de pulmão, 18 pacientes com tuberculose e 27 com outras lesões benignas.

4

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Será apresentado neste capítulo o delineamento experimental adotado neste trabalho.

4.1 RESUMO DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Neste trabalho, primeiramente, foi estudado o processo da síntese do radiofármaco FLT- ^{18}F . Testes foram feitos a fim de determinar o rendimento prévio da síntese do FLT- ^{18}F e conseqüentemente a sua pureza radioquímica. O procedimento de síntese seguiu as descrições fornecidas pelos fabricantes do módulo de síntese e do conjunto de reagentes químicos e cassete utilizados na síntese e para a análise da pureza, seguiu-se a literatura consultada.

Após observar, como já previsto, um baixo rendimento radioquímico da síntese do produto, porém com boa pureza química, decidiu-se testar um dos parâmetros da síntese. Na literatura foi possível verificar melhores rendimentos com temperaturas superiores à preconizada e, desta maneira, outras temperaturas foram avaliadas.

Já com relação às metodologias analíticas para determinação da pureza radioquímica do produto sintetizado, diferentes fases móveis foram testadas, tanto na cromatografia em camada delgada (CCD) como na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a fim de adaptar o melhor método para a rotina no IPEN. Além disso, outras metodologias de análise

do produto foram avaliadas, como análise de solventes residuais e identificação radionuclídica, além do estudo de estabilidade.

Uma vez obtidos resultados dentro do esperado para as análises de controle de qualidade, seguiu-se para os estudos *in vitro*. Foram feitos estudos de internalização em células tumorais e de citotoxicidade.

Além disso, foram realizados estudos de biodistribuição em camundongos saudáveis e farmacocinética para elucidar quais são os órgãos-alvo, via de excreção, cinética sanguínea e eliminação do radiofármaco no organismo animal. Para avaliar o potencial diagnóstico do produto, foi feito um estudo de biodistribuição com modelos tumorais utilizando-se camundongos *Nude*. E para complementar, também foram realizadas imagens em PET/CT de camundongos *Nude* com melanoma.

Para finalizar, uma etapa importante para implantação da rotina de produção do radiofármaco FLT- ^{18}F na Radiofarmácia do IPEN foi realizada, com a elaboração de instruções de trabalho da produção do radiofármaco, complementação das instruções do controle de qualidade, preenchimento do formulário referente ao relatório de desenvolvimento de novo radiofármaco e elaboração do protocolo de validação do processo produtivo.

Na FIG. 4.1 apresenta-se um esquema do planejamento experimental deste trabalho.

FIGURA 4.1 Esquema do delineamento experimental do trabalho.

5

PRODUÇÃO DO FLT- ^{18}F

Neste capítulo será apresentada a síntese do radiofármaco FLT- ^{18}F , e demais etapas do processo produtivo nas instalações de radiofármacos do IPEN.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos desta etapa do trabalho foram:

- realizar a síntese do radiofármaco FLT- ^{18}F ;
- determinar e analisar o rendimento radioquímico da síntese;
- estudar a variação da temperatura de marcação e sua influência no rendimento radioquímico final do produto;
- estudar a estabilidade do radiofármaco por até 10 horas após a síntese.

5.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ESPECÍFICA

Há alguns anos vem se desenvolvendo métodos diferentes para síntese do radiofármaco FLT- ^{18}F , muitos deles sendo bastante complexos e com rendimentos baixos [58, 59].

A síntese automatizada do FLT-¹⁸F é composta por 3 etapas principais, sendo elas a fluoração-¹⁸F do precursor, seguida pela hidrólise dos grupos de proteção e por fim a purificação por CLAE e/ou por cartuchos compactados de purificação do tipo Sep-Pak® [8].

Estudos revelam que o precursor utilizado e a sua concentração, o tempo e a temperatura de reação, até mesmo o grau da evaporação da acetonitrila [8] e a possível adição de um solvente alcoólico (prótico) ao precursor são fundamentais no rendimento radioquímico da síntese do FLT-¹⁸F.

Atualmente, não existem muitos conjuntos de reagentes disponíveis no mercado para produção do radiofármaco FLT-¹⁸F. Na TAB. 5.1 são apresentados três conjuntos de reagentes comercialmente disponíveis. Cada conjunto de reagentes pertence a um módulo diferente. Todos utilizam o mesmo tipo de precursor, mas possuem eluentes e sistema de purificação distintos. Consequentemente, seus rendimentos também são diferentes. Neste trabalho, o conjunto de reagentes utilizado foi o da ABX (Alemanha) para o módulo automatizado TRACERlab MX (GE).

TABELA 5.1 Conjuntos de reagentes atualmente disponíveis comercialmente para produção do radiofármaco FLT-¹⁸F.

Fornecedor	Módulo	Precursor	Eluente	Rendimento*	Purificação
ABX (Alemanha)	TRACERlab (GE)	N-BOC 25mg	TBAHCO ₃	16 % [60]	Cartuchos compactos
Huayi-isotopes (China)	Synthera (IBA)	N-BOC 30mg	Kryptofix	25 % [4]	CLAE
Huayi-isotopes (China)	TRACERlab FX _{F-N} (GE)	N-BOC 30mg	Kryptofix	> 40 % ¹ [14]	CLAE

* Rendimento aproximado encontrado na literatura; ¹ rendimento corrigido

A produção deste radiofármaco ainda está em desenvolvimento para o módulo de síntese automatizado All in One (Trasis, Bélgica) com sistema de purificação por CLAE, este módulo é considerado a primeira unidade GMP (*Good Manufacture Practices*) de radiosíntese universal, sintetiza moléculas radiomarcadas com ⁶⁸Ga, ¹⁸F e ¹¹C [61]. No módulo da Scintomics, os conjuntos de reagentes para a produção FLT-¹⁸F também estão em desenvolvimento [62]. Um novo módulo chamado ELIXYS da Sofie Biosciences atingiu bons resultados na produção do FLT-¹⁸F e outros radifármacos com ¹⁸F, porém, ainda não há um conjunto de reagentes em específico do radiofármaco em estudo para este módulo [63, 5]. Os módulos citados são apresentados na FIG. 5.1.

FIGURA 5.1 Módulos de síntese automatizada para produção do FLT-¹⁸F. Em (A) módulo TRACERlab FX_{F-N} da GE [2], (B) Módulo GRP da Scintomics [3], (C) módulo Synthera da IBA [4], (D) módulo ELIXYS da Sofie Biosciences [5].

5.2.1 PRODUÇÃO DE FLÚOR-18 NO CÍCLOTRON E ENVIO PARA O MÓDULO DE SÍNTESE

O ciclotron é um acelerador de partículas nucleares subatômicas. No ciclotron há uma fonte de íons que aceleram íons negativos (H^-). A partir desta fonte, é necessário que um feixe destes íons seja extraídos e direcionados para o centro do ciclotron. Ao sair da fonte de íons, os primeiros dispositivos que o feixe acelerado de H^- encontra são dois dipolos magnéticos, responsáveis por direcionar esse feixe. A aceleração dos íons H^- no interior do acelerador é obtido pela condição de ressonância. Depois de produzidos e acelerados, o feixe de íon deve ser extraído através do mecanismo Stripper. O Stripper é composto de uma folha de carbono e, quando os íons H^- atravessam-o, perdem os dois elétrons, transformando-se em íons H^+ (prótons). Com a mudança de polaridade da carga dos íons sua trajetória é alterada devido a interação com o campo magnético e os prótons são direcionados para uma das portas de saída do ciclotron [64].

Ao ser extraído do acelerador, o feixe de íons H⁺ passa por vários dispositivos, cuja principal função é transportar o feixe até o alvo. Os sistemas de irradiação para a produção de ¹⁸F⁻ também possui um porta-alvo onde é colocado o material que sofrerá o bombardeamento dos prótons. Desta maneira, os prótons colidem nos átomos pertencentes ao material contido dentro do porta-alvo e estes átomos são, então, transformados em isótopos instáveis e radioativos por meio de uma reação nuclear [64].

Existem vários radioisótopos produzidos através do ciclotron e um deles é o flúor-18, produzido a partir do bombardeamento com pósitrons de água enriquecida em ¹⁸O. A reação nuclear pode ser vista a seguir [64]:

Depois que a água enriquecida passou pelo processo de reação nuclear, o flúor-18 obtido na forma de fluoreto-18 em solução aquosa tem que ser enviado diretamente ao módulo automatizado para síntese do FLT-¹⁸F (FIG. 5.2). O processo é feito através de tubulações específicas, que são responsáveis por enviarem o material produzido no ciclotron para o módulo [64].

FIGURA 5.2 Módulo de síntese TRACERlab MX (GE) com o cassete e conjunto de reagentes do FLT-¹⁸F.

O flúor-18 é um radioisótopo emissor de pósitrons. Possui uma meia vida curta de aproximadamente 109,8 minutos. Desta maneira, todo o processo deve ser otimizado e automatizado ao máximo para minimizar a perda de atividade por decaimento radionuclídico [65, 64].

Assim que a solução aquosa de ¹⁸F⁻ chega ao módulo, ela deve passar por um processo de purificação antes de ser utilizada na reação de síntese do FLT-¹⁸F (marcação). O ânion ¹⁸F⁻ deve ser extraído da solução e possíveis impurezas catiônicas, orgânicas e insolúveis em

água devem ser removidas antes de se iniciar a marcação. Para tanto, o material vindo do ciclotron passa por uma resina aniônica *AccelPlusTM QMA Sep-Pak[®]*, a qual irá reter em sua coluna os íons fluoreto-18, enquanto todas as impurezas catiônicas solúveis, bem como as substâncias solúveis em água não carregadas (orgânicas), passam pela coluna junto com a água (H_2^{18}O) e são coletadas no frasco de rejeitos. Esta mistura aquosa passa pela coluna por meio de vácuo aplicado ao frasco de coleta de rejeitos. O íon fluoreto- ^{18}F retido na resina é, então, eluído com uma solução aquosa de bicarbonato de tetrabutilamônio (TBA HCO_3).

O fluoreto-18 é eluído para o frasco reator e passa por um processo de evaporação dos solventes, posteriormente, é então transferida acetonitrila ao frasco reator, a qual também passa pelo processo de evaporação sob um fluxo de nitrogênio (N_2), deixando o fluoreto-18 complexado ao TBA^+ . A temperatura no frasco reator é elevada da temperatura ambiente até 95°C para facilitar a evaporação. A duração total desta etapa, incluindo a secagem a vácuo do resíduo, é de aproximadamente 12 minutos.

5.2.2 RADIOSÍNTESE DO FLT- ^{18}F

A radiosíntese do FLT- ^{18}F se dá basicamente através da reação de substituição nucleofílica $\text{S}_\text{N}2$. A substituição nucleofílica nada mais é do que uma reação composta por um nucleófilo e um substrato contendo um grupo abandonador. Esta reação ocorre quando um par solitário de um nucleófilo ataca um centro eletrofílico deficiente em elétrons e suas ligações, expulsando o grupo abandonador [41].

Para atuar como o substrato em uma reação de substituição nucleofílica, uma molécula deve ter um bom grupo abandonador. Este grupo abandonador é um substituinte que tem a capacidade de deixar a molécula ou ânion fracamente básico e relativamente estável. No precursor do FLT- ^{18}F , o grupo abandonador é o O-Nosil (4-nitrobenzenosulfonil), localizado na posição 3' da molécula (FIG. 5.3) [41].

O mecanismo para a reação $\text{S}_\text{N}2$ se dá através da aproximação do nucleófilo por trás do carbono contendo o grupo abandonador. À medida que a reação progride, a ligação entre o nucleófilo e o átomo de carbono se fortalece e a do grupo abandonador e o átomo de carbono se enfraquece (estado de transição). Com isso, o átomo de carbono tem a sua configuração invertida e o grupo abandonador é puxado para fora da molécula (FIG. 5.4) [41].

Na radiosíntese do FLT- ^{18}F , o íon fluoreto negativo e radioativo é o nucleófilo da reação. Ele traz um par de elétrons para o carbono que se apresenta parcialmente positivo pelo lado de trás em relação ao grupo abandonador (O-Nosil). O grupo abandonador começa a sair com o par de elétrons que o liga ao carbono. No estado de transição, a ligação entre o íon fluoreto e o carbono é parcialmente formada e a ligação do carbono com o grupamento O-Nosil é parcialmente quebrada. Assim que o grupo O-Nosil abandona a molécula, a configuração do

FIGURA 5.3 Estrutura química do recursor do FLT.

FIGURA 5.4 Esquema do estado de transição que ocorre durante a síntese do FLT-¹⁸F por meio da reação de substituição nucleofílica S_N2

carbono se torna invertida [41].

No módulo automatizado, esta reação ocorre durante 5 minutos e com uma temperatura de 100°C (considerada a condição padrão), preconizados pelo fornecedor. O íon fluoreto não é um bom nucleófilo, já que possui uma cinética de reação lenta. Desta maneira, além do precursor e do íon fluoreto negativo, a reação também conta com um catalizador de transferência de fase, o TBA⁺ HCO₃⁻, e um solvente aprótico (acetonitrila) [41].

Além de ser o eluente do íon fluoreto-18, o TBA HCO₃ também funciona como um catalizador que transfere um ânion de uma fase para a outra durante uma reação. No caso da síntese do FLT-¹⁸F, o TBA HCO₃ é o responsável pela transferência do íon fluoreto que está presente na fase aquosa para a fase orgânica, onde ocorre a reação [41].

Depois que ocorre a fluoração do precursor, o TBA HCO₃ também faz a transferência do grupo abandonador, que está presente na fase em que ocorre a reação (fase orgânica), para a fase aquosa [41]. Na FIG. 5.5 é possível compreender o processo de migração do íon fluoreto-18 da fase aquosa para a fase orgânica pelo catalizador e, depois, este mesmo

catalisador, transfere o grupo abandonador para a fase aquosa.

FIGURA 5.5 Esquema do TBA HCO₃ funcionando como um catalisador na síntese do FLT-¹⁸F.

Solventes próticos, como a água, são capazes de solvatar o nucleófilo e impedir a reação de substituição. Além disso, o ânion fluoreto é mais fortemente solvatado quando comparado com outros haletos, isto acontece por ser um ânion menor e sua carga ser a mais concentrada. Desta maneira, a utilização de solventes apróticos polares são especialmente úteis nas reações S_N2 [41]. Solventes como acetonitrila, *N,N*-Dimetilformamida (DMF), Dimetil sulfóxido (DMSO) e Dimetilacetamida (DMA) dissolvem compostos iônicos e podem solvatar cátions, entretanto, não podem formar ligações de hidrogênio, não solvatando os ânions em qualquer extensão apreciável. Assim, os ânions não são obstruídos por uma camada de moléculas de solventes. Além disso, os solventes apróticos polares são capazes de estabilizarem o grupo de saída, deslocando o equilíbrio da reação para a direita, ou seja, influenciando o ataque do nucleófilo e a saída do grupo abandonador. Portanto, em um solvente aprótico polar, o fluoreto-18 se torna um nucleófilo mais eficaz, aumentando a cinética de reação [41].

Por conseguinte, após os 5 minutos da reação de marcação do precursor com o íon fluoreto radioativo, a temperatura começa a ser reduzida até 85°C para que ocorra a hidrólise ácida dos grupos de proteção da molécula (FIG. 5.6). Ocorrida a hidrólise por também 5 minutos, segue-se para a evaporação da acetonitrila do reator. Em seguida, ocorre a reação de neutralização da solução, adicionando-se solução de NaOH. E para finalizar, logo após a neutralização, segue-se para a etapa de purificação da solução [41].

5.2.3 PURIFICAÇÃO DO FLT-¹⁸F

A etapa de purificação do processo de produção do FLT-¹⁸F é comumente realizada utilizando-se cartuchos compactados de purificação e/ou através da cromatografia líquida de alta eficiência. O método de purificação escolhido neste estudo utilizou várias e sucessivas colunas de purificação (Sep-Pak®). Isto porque, o módulo automático utilizado foi o TRACERlab MX (GE), o mesmo utilizado na produção do FDG-¹⁸F, que não possui

FIGURA 5.6 O radiofármaco FLT-¹⁸F após a saída através da hidrólise ácida dos grupos de proteção. Os círculos pontilhados em vermelho estão indicando os locais em que os grupos de proteção foram retirados.

sistema de purificação por CLAE acoplado a ele. O sistema de purificação conta com quatro cartuchos, além das membranas esterilizantes com poros de 0,22 μm , que promove a esterilização do produto ao final do processo.

Três dos quatro cartuchos utilizados na purificação do FLT-¹⁸F são acoplados ao módulo de síntese de maneira que fiquem um sobre o outro. O primeiro cartucho é o *CHROMAFIX Clean-up PS-H⁺*, que é um cartucho de troca catiônica, ou seja, possui uma superfície negativa atrativa, retendo, assim, o analito positivamente carregado, como moléculas carregadas de TBA⁺, neutraliza o hidróxido de sódio, além de outras espécies iônicas remanescentes. Em seguida, o cartucho de extração utilizado é o *Oasis[®] WAX Plus*, que é um cartucho de fase reversa e de troca aniônica fraco. O último cartucho desta etapa é o cartucho de extração *Sep-Pak[®] HLB*. Ele é um cartucho de fase reversa, ou seja, sua fase estacionária é apolar, retendo por mais tempo moléculas de natureza apolar do soluto. Neste processo ocorre uma separação do que é descartável e do que é produto através de uma extração de fase sólida, parte da solução é enviada para o frasco de descarte e o produto é enviado para o frasco final.

É importante ressaltar que junto ao frasco final, que receberá a solução de FLT-¹⁸F pronta, está acoplado um cartucho pré-condicionado *Sep-Pak[®] Alumina-N light* (fase normal), que retém analitos polares, e um filtro para esterilização final. Estes dois sistemas também fazem parte da purificação da solução. Todo o processo de purificação, que inicia-se logo após a neutralização da solução, é responsável por 16 minutos do tempo total da síntese.

5.2.4 DIFERENTES ROTAS DE SÍNTESES DO FLT-¹⁸F

Antes de iniciar esta subseção, é importante ressaltar a definição de rendimento radioquímico (RCY). Em uma publicação, ela pode indicar o rendimento da incorporação

de $^{18}\text{F}^-$ na molécula (como determinado em CCD ou CLAE), assim como o rendimento radioquímico global da reação corrigido e não corrigido [66]. De acordo com a IUPAC, rendimento radioquímico trata-se do rendimento de uma separação radioquímica expressa como a porcentagem da atividade originalmente presente [67]. Portanto, não há um consenso tratando-se do rendimento radioquímico de uma síntese, cada autor pode apresentar seus resultados da maneira que achar mais conveniente. Muitas vezes, altos rendimentos em uma síntese não passam de uma análise da eficiência da fluoração, feita através de cromatografia em camada delgada ou cromatografia de alta eficiência. Os tipos de definições existentes para o rendimento radioquímico podem ser vistos na TAB. 5.2.

TABELA 5.2 Diferentes definições para o rendimento radioquímico de uma marcação com radioisótopos.

Tipos de definição para o RCY	Modo de cálculo
Eficiência da fluoração	CCD ou CLAE*
Rendimento radioquímico	Porcentagem de (produto purificado / radioatividade inicial) - corrigido ou não corrigido
Rendimento radioquímico bruto	(Radioatividade total coletada x conversão pela pureza radioquímica) / (total de radioatividade inicial)

* pureza radioquímica, muitas vezes não considerada como rendimento radioquímico.

Foi realizado um estudo [14] utilizando dois precursores diferentes para a síntese automatizada do FLT- ^{18}F através de dois métodos diferentes. Para um dos métodos (Método A), utilizou-se o módulo de síntese TRACERLab FX_{F-N} (GE) acoplado a um sistema purificador de CLAE contendo uma coluna semi-preparativa de fase reversa C₁₈ (10 x 250 mm²) e uma pré-coluna C₁₈, equipado com um detector de UV e de radioatividade. Já para o outro método (Método B), o módulo de síntese utilizado foi o PET-MF-2V-IT-I da Beijing PET Company (China) com purificação utilizando cartuchos compactos de purificação. Os precursores utilizados neste estudo foram, respectivamente, o 5'-benzoil-3',2'-anidro-timidina (Precursor 1) e o 3-N-t-butoxicarbonil- (5'-O-(4,4'-dimetoxitriifenilmetil)- 2'-desoxi-3'-O-(4-nitro benzenosulfonil)- β -D-pentofuranosil) timidina (precursor com N-BOC-protetido, Precursor 2). Os dois métodos utilizaram Kryptofix (K₂₂₂) como eluente. Os resultados mostraram que o Método A apresentou um rendimento global da síntese corrigido de $18,6 \pm 3,6$ % com um tempo de reação de 56 minutos para o precursor 1 e com o precursor 2, $25,2 \pm 5,3$ % de rendimento, gastando um tempo de 55 minutos. Já o Método B apresentou melhores resultados com relação ao tempo de síntese, apresentando um rendimento corrigido de $10,6 \pm 18,6$ % em 45 minutos para o precursor 1 e usando 15 mg do precursor 2, $23,2 \pm$

2,6 % em 35 minutos. Quando se utiliza 30 mg do precursor 2, o rendimento passa dos 40 % e apresenta o mesmo tempo de reação.

A temperatura também é um ponto chave no rendimento radioquímico da síntese do FLT-¹⁸F. Isto pode ser observado nos resultados encontrados por Lee e colaboradores [9]. Utilizando-se o módulo de síntese TRACERLab MX (GE) e o precursor N-BOC protegido em um sistema de substituição nucleofílica do flúor-18 utilizando solvente prótico (*t*-BuOH) juntamente com acetonitrila, TBA HCO₃ como eluente e purificação por CLAE. O estudo mostrou um rendimento radioquímico determinado por cromatografia em camada delgada de $60,2 \pm 5,2$ % à uma temperatura de 120°C. Quando baixou-se a temperatura de reação, consequentemente o rendimento também foi reduzido. Com a temperatura de 100°C e 110°C, o rendimento radioquímico por CCD foi de $40,8 \pm 7,2$ % e $55,4 \pm 7,9$ % após a purificação por HPLC, com uma fluoração de 30 minutos. Para este estudo, o tempo total da síntese, incluindo a purificação, foi de $70,5 \pm 10,5$ minutos.

O estudo de Oh e colaboradores [8] demonstrou uma relação entre a temperatura de reação (110, 130 e 150 °C) e a concentração do precursor em acetonitrila (20-40 mg/2 mL de acetonitrila) utilizada. O módulo de síntese de escolha foi o TRACERLab MX (GE), o precursor foi o N-BOC protegido e utilizou-se Kryptofix como eluente. Os piores resultados de rendimento foram obtidos utilizando-se 20 mg do precursor e temperatura de 110° ($15 \pm 5,4$ %), enquanto que os melhores resultados foram alcançados para 40 mg de precursor a 150° ($50 \pm 5,2$ %) Concluiu-se que quanto maior a concentração de precursor em acetonitrila e maior a temperatura utilizada, maior foi o rendimento da síntese.

5.2.5 ESTUDO DE ESTABILIDADE

O estudo de estabilidade é uma etapa muito importante no desenvolvimento de novos fármacos. Além dos fatores econômicos e de regulamentação envolvidos, a saúde do paciente está em primeiro lugar. Um medicamento seguro, livre de produtos de degradação tóxicos e decomposição do princípio ativo é um fator primordial para a sua devida distribuição no sistema de saúde.

Radiofármacos para PET necessitam, assim como outros medicamentos, que sua estabilidade seja garantida durante o seu armazenamento. Entretanto, estes radiofármacos possuem um tempo de vida muito curto quando comparados com outros tipos de medicamentos, tendo em vista a meia-vida física curta do elemento radioativo. Além disso, há o efeito da radiólise, relacionado à radioatividade, que influencia a estabilidade destes produtos [68].

Portanto, certos parâmetros devem ser analisados para estabelecer e documentar a estabilidade de radiofármacos para uso em PET sob condições de armazenamento

apropriadas. Em geral, avalia-se o produto utilizando-se os processos usuais empregados para o controle de qualidade para liberar o lote, em diferentes tempos após a produção. Pode ser realizada a identificação e pureza radioquímica, aparência, pH, efetividade de estabilizantes ou conservantes e pureza química. Além disso, testes de estabilidade destes radiofármacos devem ser realizados com a maior concentração radioativa e todo o volume do lote deve ser estocado. Para radiofármacos que empregam radionuclídeos com tempo de meia-vida curto, o estudo de estabilidade geralmente se estende por toda a vida útil do produto [68].

5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

5.3.1 INFRAESTRUTURA

Os ensaios englobados nesta etapa do trabalho foram realizados na Instalação de Aceleradores Cíclotron e laboratórios de Produção de Radiofármacos da Instalação de Radiofarmácia do IPEN. Estes laboratórios forneceram toda a infraestrutura necessária para a produção e manipulação de materiais radioativos.

5.3.2 MATERIAIS

As soluções utilizadas nesta etapa do trabalho foram água enriquecida, fluoreto-18, o conjunto de reagentes para síntese automatizada de FLT; solução eluente de TBA HCO₃ 0,075 M; e precursor do FLT-¹⁸F (3-N-Boc-5'-O-dimetoxitritil-3'-O-nosiltimidina) (TAB. 5.3).

Os principais equipamentos e materiais utilizados nestes experimentos foram: Módulo de síntese automatizado (TRACERlab MX - GE, EUA); calibrador de doses modelo CRMTM-35R (Capintec, Inc, EUA); conjunto de cassete para síntese automatizada do FLT (ABX, Alemanha) (TAB. 5.4); computador e *software* específico para realização da síntese; celas de processamento de material radioativo; frascos de penicilina estéreis; e blindagens de chumbo específicas.

TABELA 5.3 Soluções e reagentes que compõe o conjunto de reagentes para a síntese do radiofármaco FLT-¹⁸F (ABX, Alemanha).

Reagente	Função
Bicarbonato de Tetrabutilamônio, Água para injetáveis, Etanol, Solução 0,075M - 750 μ L	Solução eluente
Acetonitrila para o precursor, 2 mL	Diluyente do precursor
Acetonitrila, 7 mL	Solvente da reação
3-N-Boc-5'-O-dimetoxitritil-3'-O-nosil-timidina 25 mg	Precursor do FLT- ¹⁸ F
Ácido Clorídrico 2M, 3 mL	Desprotetor
Água para injetáveis, 100 mL	Auxiliar de purificação e lavagem da linha
Etanol, 3 mL	Auxiliar de purificação e lavagem da linha
Hidróxido de sódio 1M, 3 mL	Alcalinizante
Água e Etanol (10:1, v/v), 20 mL	Auxiliar na purificação
Tampão Citrato, 3 mL	Tampão do produto final

TABELA 5.4 Materiais utilizados para realizar a síntese do radiofármaco FLT- ^{18}F em sistema automatizado.

Material	Função
Cassete para síntese do FLT- ^{18}F , ABX	Suporte para síntese
Cartucho <i>AccelPlusTM QMA Sep-Pak[®]</i> , ABX	Extração do $^{18}\text{F}^-$
Cartucho de Extração <i>Oasis[®] WAX PLUS</i> , ABX	Purificação
Cartucho de Purificação <i>CHROMAFIX Clean-up PS-H⁺</i> , ABX	Purificação
Cartucho de Extração <i>Oasis[®]</i> , ABX	Purificação
Cartucho <i>Sep-Pak[®] Alumina-N light</i> , ABX	Purificação do produto final
Unidade de Filtro de Ventilar Hidrofóbico 0,2 μm (MILLEX [®] -25), Millipore	Recepção do produto final
Agulhas 0,90 x 50 mm, Bbraun	Respiro para frasco final e encaixe de seringas
Frasco final de 27 mL, 30 mm x 60 mm, ABX	Recepção do produto final
Filtro Cathivex-GS 0,2 μm , Millipore	Filtração final

5.3.3 MÉTODOS

5.3.3.1 PRODUÇÃO DE $^{18}\text{F}^-$ NO CÍCLOTRON

A produção do $^{18}\text{F}^-$ foi realizada nos ciclotrons de 18 e 30 MeV da Instalação de Aceleradores Ciclotrons do IPEN. O tempo de irradiação e, por consequência, a atividade produzida de fluoreto-18 variou nas diferentes datas de produção do FLT- ^{18}F .

O fluoreto-18 foi produzido pela reação nuclear $^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$ a partir de água enriquecida em ^{18}O ($\text{H}_2\text{O}-^{18}\text{O}$) em acelerador ciclotron localizado na Instalação de Aceleradores Ciclotron.

5.3.3.2 SÍNTESE DO RADIOFÁRMACO FLT- ^{18}F

A síntese do FLT- ^{18}F foi realizada utilizando-se o módulo automatizado modelo TRACERlab MX (GE), o qual foi instalado com um cassete contendo um sistema de

purificação por cartuchos compactados de resina. O módulo opera de forma automatizada através de um *software* específico. Este *software* é o mesmo utilizado para a produção do FDG-¹⁸F, porém um arquivo com os passos da síntese do FLT-¹⁸F foi instalado no programa. Durante o processo de síntese, é possível acompanhar pelo computador todos os passos que estão sendo realizados no momento.

Durante a produção do fluoreto-18, os reagentes contidos no conjunto de marcação, a solução eluente e o frasco do precursor foram encaixados nos locais indicados pelo protocolo do fornecedor (FIG. 5.7). E antes de iniciar a síntese, testes foram realizados a fim de verificar o aquecimento do reator de síntese, as seringas conectadas ao cassete, o ar comprimido e o nitrogênio.

FIGURA 5.7 Esquema do módulo de síntese TRACERlab MX (GE) com o cassete e conjunto de reagentes do FLT-¹⁸F fornecido pela ABX.

Depois de realizados os testes e verificação de conformidade, deu-se início à pré-síntese. Neste momento o fluoreto-18 produzido no ciclotron foi enviado através de sua tubulação específica até o módulo de síntese do FLT-¹⁸F. Antes de iniciar-se a síntese, a atividade do fluoreto-18 foi verificada utilizando-se um ativímetro.

Depois de verificar-se a atividade do radioisótopo, a síntese foi iniciada. O fluoreto-18 foi capturado no cartucho de troca iônica (QMA) e eluído com bicarbonato de tetrabutylamônio (TBA HCO₃) para o reator.

Foi realizada uma evaporação dos solventes contidos no frasco do reator, com a finalidade de manter o ¹⁸F⁻ concentrado. Em seguida, 25 mg do precursor N-BOC protegido em 2 mL de acetonitrila foram adicionados à mistura reacional utilizando-se temperatura de 100°C por 5 minutos para o processo de radiomarcção.

Após a marcação, foi feita uma hidrólise ácida com HCl 2 M dos grupos de proteção do precursor. Em seguida, foi realizado outra evaporação a fim de retirar a acetonitrila ainda

presente na mistura. Esta mistura reacional foi passada no cartucho de troca catiônica forte (*CHROMAFIX Clean-up PS-H⁺*) ligado a um cartucho de troca iônica fraca e de fase reversa (*Oasis[®] WAX Plus*) e um cartucho de fase reversa (*HLB*). Neste processo, as impurezas foram removidas e enviadas para o frasco de descarte. E, finalmente, o produto foi eluído com água para injetáveis (WFI) através do *Sep-Pak[®] Alunina-N Light* e filtro esterilizante de 0,2 μm para um frasco final estéril livre de pirogênio e contendo 3,0 mL de tampão citrato.

Ao final de cada síntese, o produto foi fracionado dentro de uma cela de processamento específica. Após o fracionamento, os frascos do tipo 1 contendo uma quantidade determinada de produto foram acondicionados em blindagens específicas e, então, encaminhados para análises de controle de qualidade e demais ensaios pertinentes.

5.3.3.3 VARIAÇÃO DA TEMPERATURA DE MARCAÇÃO

No intuito de estudar possíveis variações no rendimento final da síntese do FLT-¹⁸F, optou-se por realizar um estudo baseado na variação de três diferentes temperaturas durante a etapa de marcação da síntese. Esta variável foi preferencialmente escolhida com intuito de aumentar o rendimento de marcação.

Durante a etapa de síntese do FLT-¹⁸F, a temperatura padrão, de acordo com protocolo estipulado pelo fornecedor dos conjuntos de reagentes da síntese, foi de 100 °C. Desta maneira, a temperatura desta etapa foi alterada, o rendimento da síntese foi calculado ao final do processo e a análise do controle da qualidade do produto foi realizada. As novas temperaturas testadas foram de 120 °C e 140 °C. Esta alteração foi realizada mudando a temperatura estipulada pelo fornecedor no arquivo de dados das etapas do processo de síntese do radiofármaco FLT-¹⁸F.

5.3.3.4 ESTUDO DE ESTABILIDADE

Inicialmente, foi feito um estudo de estabilidade prévio na condição de armazenamento à temperatura ambiente e para o produto na sua forma não diluída. As amostras tinham atividade de 370 MBq (10 mCi) em um volume final de 1 mL. Utilizou-se a cromatografia em camada delgada para análise da pureza radioquímica e acetato de etila em metanol (85:15 v/v) como solvente [6]. A estabilidade do composto foi acompanhada por 5 horas (imediato, 1, 2, 3, 4 e 5 horas após a síntese) [14, 7, 8].

A fim de estabelecer o prazo de validade do composto que será rotulado na embalagem, foi realizado o estudo de estabilidade por 10 horas em temperatura ambiente de duas produções do FLT-¹⁸F. Foi utilizado o método CLAE com a fase móvel composta por acetonitrila e água de modo gradiente descrito no capítulo 6 [6]. A amostra foi mantida sem diluir e com a máxima atividade possível produzida, considerada como situação mais crítica, de 8,06 GBq

(218 mCi) na primeira produção e 8,33 GBq (225 mCi) na segunda produção [16].

5.3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Para a análise dos dados foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 5.0[®] (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Para dados paramétricos, foi utilizada a análise de variância ANOVA de um fator, teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Bonferroni ou Dunn para comparação múltipla dos grupos.

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os dados das irradiações realizadas no estudo de variação da temperatura de radiomarcagem do produto final FLT-¹⁸F podem ser observados na tabela 5.5. Para cada uma das três temperaturas utilizadas e $n = 3$ a atividade de fluoreto-18 produzida foi variada. Isto deve-se a fatores externos, dependendo principalmente da produção rotineira na instalação dos ciclotrons.

TABELA 5.5 Dados das irradiações que foram realizadas durante o estudo de variação da temperatura de radiomarcagem do FLT-¹⁸F, produção feita nos aceleradores ciclotron de 18 e 30 MeV.

Grupos*	Tempo de irradiação (min)	Corrente média (μ A)	Dose (μ Ah)	Atividade de ¹⁸ F (Ci)
Grupo 1	19	37,9	12,0	1,19
	18	40,0	12,0	1,50
	15	40,0	10,0	1,34
Grupo 2	13	46,2	10,0	1,00
	39	46,2	30,0	1,98
	16	18,8	5,00	0,38
Grupo 3	23	39,1	15,0	1,57
	37	40,5	25,0	2,42
	52	40,4	35,0	3,14

*Grupo 1 representa as irradiações feitas para as sínteses com radiomarcagem à 100 °C, Grupo 2 para as de 120 °C e Grupo 3 para as de 140 °C.

Como apresentado previamente, a síntese se dá através da reação química de substituição nucleofílica S_N2, na qual o grupo substituinte do precursor, localizado na posição 3' da

pentose, é substituído pelo radioisótopo flúor-18 durante a etapa de radiomarcagem da molécula [9, 41].

Na TAB. 5.6 é possível verificar o rendimento radioquímico da síntese do FLT- ^{18}F com três diferentes temperaturas de fluoração ($^{18}\text{F}^-$). Utilizando 25 mg de precursor e 5 minutos de marcação não foi possível observar diferença significativa no rendimento da síntese com as três temperaturas utilizadas (TAB. 5.6).

TABELA 5.6 Variação da temperatura de radiomarcagem. Foi utilizado 25 mg do precursor, atividade inicial variando de 17,76 a 116,18 GBq (0,48 a 3,14 Ci) de $^{18}\text{F}^-$ e um tempo de 5 minutos.

T(°C)	Amostras (n=3)	Atividade Inicial de $^{18}\text{F}^-$ (GBq)	Atividade Final de FLT- ^{18}F (GBq)	Rendimento Radioquímico (%)	Rendimento Radioquímico Corrigido (%)*	Média do Rendimento Corrigido (%)*
100	1	44,40	4,90	11,15	16,12	19,13 ± 4,49
	2	55,50	6,42	11,57	16,99	
	3	49,58	8,28	16,71	24,29	
120	1	73,26	9,39	12,83	18,53	21,73 ± 4,96
	2	37,00	7,01	18,95	27,45	
	3	17,76	2,32	13,06	19,22	
140	1	58,09	3,94	6,78	9,96	12,62 ± 7,47
	2	89,54	12,98	14,50	21,06	
	3	116,18	5,49	4,73	6,85	

* Decaimento corrigido.

O rendimento da síntese se mostrou semelhante ao que foi demonstrado na literatura, para a temperatura de 100°C [69, 60]. De acordo com Li e col. [60], em uma síntese utilizando-se 20 mg de precursor N-BOC protegido e TBA HCO_3 , foi possível verificar um rendimento global de 16 ± 4 %. Entretanto, é difícil realizar uma comparação precisa com relação aos rendimentos encontrados na literatura, pois cada publicação calcula seus rendimentos radioquímicos de uma determinada maneira. Além disso, as condições da síntese nem sempre são fiéis às condições utilizadas neste estudo.

Neste trabalho, diferentemente do que foi visto em algumas literaturas, não foi possível notar o aumento do rendimento quando a temperatura de reação atingiu valores mais altos ($P > 0,05$). De acordo com alguns estudos, temperaturas elevadas e a massa do precursor entre 30 e 45 mg são necessários para garantir uma boa incorporação do fluoreto-18 na molécula [14, 7, 8, 70]. Neste estudo, a temperatura de 120 °C apresentou o melhor rendimento médio composto, apesar do resultado não ser significativamente maior que os observados para as demais temperaturas estudadas.

Atualmente, outros estudos vêm sendo realizados e a discussão gira em torno da reação de

eliminação competitiva que ocorre com a formação de estavudina (análogo da timidina sem grupamento químico na posição 3' da pentose) e a necessidade de suprimi-la drasticamente reduzindo a quantidade de base (K_{222}/K_2CO_3 ou $TBAHCO_3$) empregada, pois na presença de excesso de base, o precursor é rapidamente consumido pela reação de eliminação E2 antes que a reação S_N2 seja completada [71, 72]. Desta maneira, condições de reação que possam acelerar a reação E2 e contribuir para a decomposição do precursor, como o aquecimento excessivo, devem ser evitadas [71]. Uma possível explicação para a diminuição do rendimento radioquímico com temperatura de 140 °C pode estar relacionada ao aumento da reação E2 com relação a S_N2 . Desta forma, as temperaturas de 100 °C e 120 °C parecem favorecer a reação S_N2 e se mostraram-se mais apropriadas.

Uma das supostas explicações para o baixo rendimento encontrado neste trabalho pode ser devido à utilização do TBA como agente de transferência de fase durante a substituição nucleofílica com o fluoreto-18. Trabalhos demonstraram rendimentos radioquímico inferiores nas sínteses que utilizaram o TBA ao invés do outro agente como o Kryptofix (K_{222}). O K_{222} é utilizado na síntese do FDG-¹⁸F e é considerado um agente melhor para a transferência de íons e, desta forma, provê melhores resultados e rendimentos [13, 71]. Porém, o TBA é mais facilmente retido no cartucho de troca catiônica forte que o K_{222} durante a fase de purificação, sendo difícil a sua detecção tanto no produto quando na solução de descarte [13]. Apesar de alguns trabalhos mostrarem rendimentos superiores utilizando-se o Kryptofix, no estudo de Li e colaboradores [60] não foi possível notar uma diferença significativa ($P > 0,05$) entre a reação com Kryptofix e a reação com $TBA HCO_3$, onde os rendimentos globais das reações foram de $20 \pm 5 \%$ e $16 \pm 4 \%$, respectivamente.

Outros estudos anteriores demonstraram que o rendimento radioquímico é drasticamente reduzido quando o precursor com grupo protetor N-BOC é utilizado na síntese [7, 59]. Isto pode ser mais uma das hipóteses de baixo rendimento das sínteses realizadas com este precursor. Outras razões possíveis para explicar o baixo rendimento dessa síntese seriam:

- cartucho Alumina-N prende não somente o TBA e o fluoreto-18, mas também outro intermediário;
- uma pequena porção de FLT-¹⁸F pode ficar retida no *Sep-Pak[®] Plus C₁₈* e lavado com água para dentro do frasco de descarte [7];
- a concentração utilizada do precursor em acetonitrila neste trabalho (12,5 mg/mL) ser mais baixa que a utilizada nos demais trabalhos (superior a 17 mg/mL) [73].

O sistema automatizado utilizado neste trabalho apresenta diversas vantagens frente a outros sistemas automatizados existentes. Uma das vantagens seria o uso de cassetes que não são reaproveitados, pois a cada síntese um novo cassete é utilizado. Deste modo, o risco de contaminações, principalmente as contaminações cruzadas entre os diferentes radiofármacos

produzidos no mesmo módulo automatizado, é reduzido. Além disso, não é necessário que se faça uma limpeza entre cada síntese, já que os cassetes são sempre novos e estéreis. O que pode ser feito é, ao final de cada síntese, limpar o sistema com água para retirada de atividade residual no cassette e reduzir a radiação exposta, processo que normalmente é realizado e já vem inserido no protocolo do fornecedor. Outra vantagem é a semelhança da produção do FLT- ^{18}F comparado com a do radiofármaco FDG- ^{18}F , já realizada na Radiofarmácia do IPEN, além do módulo automatizado e o *software* serem os mesmos utilizados na produção do FDG- ^{18}F , o sistema de cassette e todo o processo relacionado a produção são muito semelhantes.

5.4.1 ESTUDO DE ESTABILIDADE

Através do estudo de estabilidade realizado previamente à temperatura ambiente foi possível notar que não houve diferença significativa da pureza radioquímica das amostras entre os tempos analisados de 1 a 5 horas ($P = 0,406$) (FIG. 5.8). Desta maneira, o produto estudado se mostrou estável ao longo de 5 horas após a sua síntese, como encontrado na literatura pesquisada [14, 7, 8].

FIGURA 5.8 Estabilidade do radiofármaco FLT- ^{18}F em temperatura ambiente por diferentes tempos ($n = 3$).

Conforme esperado, o produto se manteve estável também ao longo das 10 horas após a síntese. Na FIG. 5.9A e 5.9B é possível verificar os últimos cromatogramas de CLAE feitos após as 10 h para cada produção realizada, respectivamente. Ao longo das 10 horas, as purezas radioquímicas encontradas foram superiores a 98 % de produto em todos os tempos estudados.

FIGURA 5.9 Cromatogramas do produto FLT- ^{18}F obtidos 10 horas após a síntese, utilizando como fase móvel acetonitrila e água em gradiente [6]. Em (A) está representado o último controle radioquímico em CLAE feito na primeira produção e em (B) refere-se a segunda produção.

5.5 CONCLUSÕES

De acordo com o que foi apresentado nos resultados e discussões, nesta etapa do trabalho relacionada a produção do FLT- ^{18}F , foi possível concluir que:

- o radiofármaco FLT- ^{18}F apresentou rendimentos radioquímicos na marcação conforme literatura nas temperaturas estudadas de 100, 120 e 140 °C;

- mesmo os rendimentos radioquímicos serem considerados baixos, os valores são semelhantes aos encontrados na literatura pesquisada;
- a utilização de TBA pode estar diretamente relacionado aos baixos rendimentos encontrados nesta síntese do FLT- ^{18}F ;
- o sistema automatizado utilizado mostrou-se vantajoso para a prática rotineira, principalmente com relação a redução de riscos de contaminação devido ao não reaproveitamento do cassete;
- o produto FLT- ^{18}F mostrou-se estável por até 10 horas após a sua síntese, armazenado em temperatura ambiente.

6

METODOLOGIAS ANALÍTICAS

Neste capítulo, toda a metodologia analítica estudada será apresentada, bem como sua revisão bibliográfica específica, resultados, discussões e conclusões.

6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos desta etapa do trabalho foram as seguintes:

- avaliar as metodologias analíticas para o controle de qualidade do radiofármaco estudado;
- determinar os perfis cromatográficos do produto FLT- ^{18}F e impurezas e escolher as metodologias mais adequadas para o controle da pureza radioquímica;
- verificar se o radiofármaco FLT- ^{18}F produzido encontra-se dentro dos parâmetros estabelecidos em literatura.

6.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ESPECÍFICA

Os ensaios de controle de qualidade fazem parte de uma etapa de grande importância no processo produtivo de um medicamento, um atributo de caráter comercial, mas também

ético, legal e moral. Para a indústria, garantir a qualidade de seus medicamentos vai além da competitividade do mercado, é uma questão obrigatória [74].

Os radiofármacos não fogem desse parâmetro e também devem seguir legislações, guias e monografias referente às análises de qualidade a serem feitas e seus devidos critérios de aceitação. Em específico, os radiofármacos para PET possuem certas características que os tornam diferentes dos demais radiofármacos por apresentar um tempo de meia-vida curto e, com isso, possuir algumas restrições.

De acordo com a Farmacopéia Americana [16], radiofármacos para PET com tempo de meia-vida maior ou igual a 20 minutos, no geral, devem passar pelos seguintes ensaios: medida de pH, inspeção visual, determinação da identidade radionuclídica, pureza radioquímica, atividade específica, análise de solventes residuais ou outras substâncias tóxicas usadas durante a síntese, endotoxina bacteriana e teste de esterilidade.

Atualmente, não existe uma monografia específica para o radiofármaco FLT- ^{18}F em farmacopéia. Entretanto, as Farmacopéias Americana e Européia já estão desenvolvendo suas respectivas monografias para este radiofármaco [75].

6.2.1 IDENTIDADE RADIONUCLÍDICA

A identidade radionuclídica é realizada, como o próprio nome diz, para determinar o radionuclídeo que está presente em uma determinada amostra. Ela é realizada através de medidas da atividade de uma amostra no calibrador de doses em tempos diferentes, a fim de encontrar o tempo de meia-vida físico e determinar, através deste tempo, qual radioisótopo está presente na amostra [6, 16]. O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) é definido como o intervalo de tempo necessário para uma determinada atividade do radionuclídeo decair a metade do seu valor inicial [16]. O tempo de meia-vida do flúor-18 é de 109,77 minutos.

6.2.2 PUREZA RADIOQUÍMICA

O método analítico mais amplamente utilizado para a realização do controle da pureza radioquímica de radiofármacos é a cromatografia. A cromatografia é um método físico-químico que separa componentes de uma mistura através da distribuição dos mesmos em duas fases distintas, mas que estão em contato muito próximo [76, 77].

A utilização deste método de análise se dá pela facilidade com que a separação, a identificação e a quantificação das espécies químicas podem ser realizadas [77]. E quando se trata de radiofármacos, a necessidade de métodos analíticos que tenham eficiência e resolução é de grande importância.

Para o estudo do radiofármaco FLT- ^{18}F neste trabalho, utilizou-se três tipos de cromatografias: cromatografia em papel, cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência.

A cromatografia em papel é uma técnica bastante simples e com boa capacidade de resolução e normalmente é utilizada para a separação de compostos polares. A cromatografia em papel possui um mecanismo de separação líquido-líquido, isto porque, a celulose é constituída por inúmeras unidades de glicose anidra. Esta glicose anidra contém átomos de oxigênio que possuem afinidade por moléculas polares como a água, formando pontes de hidrogênio. Líquidos polares ficam então retidos na celulose, formando a fase estacionária, enquanto líquidos apolares são repelidos e funcionam como a fase móvel. Em alguns usos especiais, é necessário optar por papeis modificados, como o papel de fibra de vidro, que foi utilizado neste estudo. Neste papel, as fibras de celulose são substituídas por fibras de vidro e o papel deve estar impregnado com sílica gel [77].

A cromatografia em camada delgada (CCD) difere da cromatografia em papel pelo fundamento de separação, o qual se dá principalmente através da adsorção [76]. Este tipo de cromatografia é composto por uma camada de adsorvente sob uma superfície plana como a fase estacionária, juntamente com uma fase móvel adequada. Existem dois adsorventes que são os mais utilizados nesta técnica, são eles a sílica (SiO_2) e a alumina (Al_2O_3) [77].

A forma mais simples da cromatografia em papel e em camada delgada é a cromatografia ascendente, a qual estabelece um ponto de partida (local de aplicação da amostra) na parte inferior da fita que é inserida dentro de uma cuba vedada contendo a fase móvel. As tiras devem ficar suspensas no sentido vertical e o nível da fase móvel deve ficar abaixo do ponto de partida. Desta forma, o líquido da fase móvel deve percorrer toda a extensão do papel demarcada, do ponto inicial até o ponto final, distância que, geralmente, é de 10 cm [77].

A análise qualitativa de uma substância é feita através da sua posição na fita e de seu fator de retardamento (R_f), determinados pela equação 6.1.

$$R_f = \frac{d_r}{d_m} \quad (6.1)$$

Onde d_r é a distância percorrida pela substância; e d_m é a distância percorrida pela frente da fase móvel.

Existem vários métodos para detectar as substâncias separadas nas fitas. A detecção de compostos radioativos pode ser realizada utilizando a auto-radiografia dos cromatogramas ou, ainda, através de detectores de cintilação (contador de poço com cristal NaI). Tanto a cromatografia em papel quanto a em camada delgada podem ser utilizadas para realizar análises quantitativas de substâncias [77].

Já a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica de separação que faz uso de instrumentos que podem ser totalmente automatizados [76]. A CLAE emprega colunas recheadas com materiais especialmente preparados e uma fase móvel, eluída sob altas pressões. Como apresentado anteriormente, esta técnica também realiza separação de componentes em uma amostra, além de fazer análises quantitativas dos mesmos com alta resolução, eficiência e detectabilidade, tudo isto em um tempo reduzido de análise [77].

Para a análise da pureza radioquímica do radiofármaco FLT- ^{18}F , a CLAE mostra uma grande vantagem frente as outras técnicas cromatográficas com relação ao tempo. A duração de uma análise em CLAE para a fluortimidina radioativa é bem menor em relação às outras técnicas, além de ser mais prática. Muitos trabalhos na literatura abordam a análise radioquímica do FLT- ^{18}F apenas utilizando a CLAE. Entretanto, o alto custo do equipamento e a mão de obra especializada podem representar empecilhos para o utilização desta técnica [78, 76].

6.2.3 DETERMINAÇÃO DE SOLVENTES RESIDUAIS

É de extrema importância a análise da quantidade de solventes em um produto final. As Farmacopéias Americana e Européia preconizam limites para diferentes tipos de solventes em injetáveis [16]. Entretanto, alguns medicamentos possuem os seus próprios limites para solventes residuais, desde que seja comprovado toxicologicamente a segurança dos mesmos [77].

Durante a síntese do FLT- ^{18}F , há a utilização de acetonitrila e etanol. Estes dois solventes possuem limites diferentes na solução final. De acordo com a Farmacopéia Americana, o limite de etanol em soluções injetáveis no geral, sem especificidade para radiofármacos, é de 5000 ppm [16]. Já para acetonitrila, o limite é bem menor, podendo conter apenas 500 ppm em soluções injetáveis. Entretanto, particularmente para o FLT- ^{18}F , a proposta da monografia da Farmacopéia Européia estabelece até 10 % v/v de etanol na solução final [6].

A técnica mais utilizada para este tipo de análise de solventes é a cromatografia gasosa, capaz de separar gases ou substâncias voláteis. O fundamento da técnica é semelhante ao de outras cromatografias já citadas anteriormente, composta por uma fase estacionária (líquida ou sólida) e uma fase móvel (gasosa) [77].

A análise de uma amostra acontece por meio de um sistema de injeção, ou seja, a amostra é introduzida em uma coluna contendo a fase estacionária. Deve haver uma temperatura adequada no local de injeção e na coluna para que possa ocorrer a vaporização dessas substâncias que são retidas por tempos determinados de acordo com suas propriedades físico-químicas. No final da coluna há um detector que faz a leitura e a quantificação das substâncias que saem ao longo do tempo da corrida [77].

6.3 MATERIAIS E MÉTODOS

6.3.1 INFRAESTRUTURA

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de Controle de Qualidade e Pesquisa e Desenvolvimento das Instalações da Radiofarmácia do IPEN. Todos os laboratórios fornecem a infraestrutura necessária para a manipulação de materiais radioativos.

6.3.2 MATERIAIS

Os principais reagentes utilizados nesta etapa do trabalho foram:

- radiofármaco FLT- ^{18}F ;
- padrão primário de FLT (ABX, Alemanha);
- etanol grau CLAE (Merck, Alemanha);
- metanol grau analítico (Merck, Alemanha);
- hidróxido de amônia grau analítico (Merck, Alemanha);
- acetonitrila grau CLAE (Merck, Alemanha);
- acetato de etila grau analítico (Merck, Alemanha);
- diclorometano grau analítico (Merck, Alemanha);
- solução de cloreto de sódio 0,9 % (IPEN);
- padrão de acetonitrila e etanol para solventes residuais (Merck, Alemanha).

Os principais equipamentos e materiais utilizados nos experimentos foram:

- balança analítica (M220 – Denver Instrument, EUA);
- pipetas automáticas (Brand, Alemanha e Socorex, Suíça);
- cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu, Japão) com detector UV e detector de radiação (Packard, EUA);
- contador automático tipo poço com cristal NaI(Tl) (D5002 CobraII Packard - Canberra, EUA);
- calibrador de atividade (CRMTM-35R - Capintec[®], EUA);

- monitor portátil de radiação 7013 – IPEN;
- cromatógrafo a gás (GC-17A - Shimadzu, Japão);
- suporte cromatográfico de alumínio impregnado com sílica gel 60 – TLC-SG (Merck, Alemanha);
- suporte cromatográfico de fibra de vidro impregnada com sílica gel 60 – ITLC-SG (Varian, EUA);
- coluna de fase reversa C₁₈ para cromatografia líquida de alta eficiência, 250 mm x 4,6 mm, 5μm (Waters[®], EUA);
- tiras indicadoras de pH (Merck, Alemanha);
- vidraria e material plástico descartável em geral.

6.3.3 MÉTODOS

Nesta subseção serão apresentados os métodos relacionados ao controle de qualidade do radiofármaco FLT-¹⁸F realizados neste trabalho. As análises de solventes residuais por cromatografia gasosa foram realizadas pela equipe de Controle de Qualidade do IPEN.

6.3.3.1 IDENTIFICAÇÃO RADIONUCLÍDICA

A identificação radionuclídica foi realizada segundo a Farmacopéia Americana (USP-35) [16, 6]. Foram realizadas três medidas da atividade de uma amostra do produto (FLT-¹⁸F) com intervalos de 20 minutos cada, a fim de construir um gráfico linear, calcular o coeficiente de determinação (r^2) para análise estatística e achar a equação linear da reta (EQ. 6.2). O tempo de meia-vida foi calculado utilizando-se o valor de a (coeficiente angular) encontrado na equação anterior e inserido na EQ. 6.3.

Após isto, foi feita a comparação entre o tempo de meia-vida calculado e o conhecido do fluor-18 (109,77 minutos) [79]. O resultado do tempo de meia-vida calculado deve estar no intervalo de 105 a 115 minutos. Este procedimento foi realizado após três sínteses do radiofármaco executadas na temperatura de 100 °C (n=3).

$$\ln \textit{Atividade} = ax + b \quad (6.2)$$

$$T_{1/2} = -\frac{\ln 2}{a} \quad (6.3)$$

6.3.3.2 DETERMINAÇÃO DOS PERFIS CROMATOGRÁFICOS

Os perfis cromatográficos do produto FLT-¹⁸F e suas impurezas foram obtidos pelos seguintes métodos:

6.3.3.2.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

O produto foi aplicado em suportes cromatográficos de alumínio impregnados com sílica gel 60 (TLC-SG) (1,5 x 12,5 cm) e foram utilizadas diferentes fases móveis: acetato de etila:metanol (1:1 v/v) [8], acetato de etila:etanol (1:1 v/v) [9], etanol:metanol (1:1 v/v), acetato de etila:metanol (85:15 v/v) [6] e diclorometano:metanol (9:1 v/v) [80].

O suporte cromatográfico de fibra vidro com sílica gel 60 (ITLC-SG) também foi utilizado a fim de determinar o perfil cromatográfico, para as mesmas fases móveis citadas anteriormente, exceto a diclorometano:metanol (9:1 v/v).

6.3.3.2.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

As metodologias utilizadas em CLAE foram realizadas com base em trabalhos encontrados na literatura pesquisada [7, 80, 9, 6]. Procedeu-se à cromatografia em um sistema Shimadzu equipado com uma coluna de fase reversa C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 μm – Waters), detector de radiação gama (Shell Jr), detector UV 190 – 300 nm (Shimadzu) e comprimento de onda de 267 nm.

Utilizou-se duas metodologias distintas com diferentes fases móveis, uma delas foi água:etanol (90:10 v/v) de modo isocrático por 20 minutos e outra foi água:acetonitrila começando com 90% e 10% nos 10 primeiros minutos e chegando a 5% e 95% durante 10 minutos, totalizando o tempo de 20 minutos de corrida, com fluxo de 1 mL/min [7, 80, 9, 6].

Além disso, na metodologia com a fase móvel água:etanol (90:10 v/v) foram estudados dois fluxos, um de 0,8 mL/min e o outro de 1 mL/min. Desta maneira, os perfis cromatográficos do FLT radioativo e não radioativo e suas impurezas foram obtidos em dois diferentes métodos com fluxos variados.

6.3.3.3 ANÁLISE DA PUREZA RADIOQUÍMICA DO FLT-¹⁸F

O método de cromatografia por camada delgada foi utilizado para determinação da pureza radioquímica nas diversas sínteses realizadas. Utilizou-se como fase estacionária sílica gel em suporte de alumínio (TLC-SG) e acetato de etila:metanol (1:1 v/v) como fase móvel [7, 8], tendo como base os resultados obtidos nos estudos de perfil cromatográfico.

O método de cromatografia líquida de alta eficiência também foi utilizado para determinar a pureza radioquímica do FLT-¹⁸F. Utilizou-se uma fase móvel contendo água:etanol (90:10 v/v) a um fluxo de 1mL/min, em coluna de fase reversa C₁₈ (4,6 x 250 mm, 5 μm) e um detector UV no comprimento de onda de 267 nm [7, 8, 9].

6.3.3.4 ANÁLISE DE SOLVENTES RESIDUAIS POR CROMATOGRAFIA GASOSA

Foi utilizado o método empregado na análise por cromatografia gasosa da fludesoxiglicose marcada com flúor-18 descrito na Farmacopéia Americana (USP-35) [16]. O cromatógrafo gasoso utilizado era equipado com um detector por ionização de chama (FID-300°C), um sistema injetor, e uma coluna de sílica empacotada de 0,50 mm x 30 m, 0,25 μm, quimicamente ligada com a fase estacionária G16. O gás de arraste utilizado foi o Hélio (He), com um fluxo de 10 mL/min. Inicialmente a temperatura foi mantida a 40 °C por 2 minutos, então a temperatura foi aumentada seguindo uma taxa de 20 °C por minuto até atingir a temperatura de 130 °C, e mantendo-se a 130 °C por 5,5 minutos. As temperaturas da porta de injeção e do detector foram mantidas a 250 °C e 300 °C, respectivamente. As soluções padrão de etanol e acetonitrila foram preparadas com solventes ultrapuros diluídos em água com concentração de 2 a 250 μg/L e as amostras foram analisadas à temperatura ambiente. A resolução entre os picos deve ser $R \geq 1$ (Resolução) e $RSD < 5\%$ (Desvio Padrão Relativo) [16, 6].

6.3.3.5 DETERMINAÇÃO DE PH

O pH da solução foi determinado utilizando-se fitas de teste de pH. Foram utilizadas tiras que indicam o pH de 0 a 6 e também as de 0 a 14 para confirmação do resultado.

6.3.3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Para análise estatística dos dados foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 5.0[®] (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Para dados paramétricos, foi utilizada a análise de variância ANOVA de um fator, seguida do teste de Newman-Keuls ou Dunn para comparação de

múltiplos grupos. Para comparações de dois grupos utilizou-se o teste t não pareado. Para análise de variáveis dependentes e independentes, foi utilizado análise de regressão linear.

6.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.4.1 IDENTIDADE RADIONUCLÍDICA

Após realizar as três leituras de atividade no calibrador de doses (TAB. 6.1), para cada síntese, confeccionou-se o gráfico e o realizou-se cálculo de regressão linear para obter-se o coeficiente de determinação (r^2).

TABELA 6.1 Medidas de atividade do FLT- ^{18}F , obtidas através da condição padrão de síntese, em calibrador de doses em três diferentes tempos.

Tempo (min)	Atividade (MBq)		
	Síntese 1	Síntese 2	Síntese 3
0	2,51	5,28	39,37
20	2,20	4,68	34,93
40	1,94	4,13	30,34

Na FIG. 6.1 é possível visualizar os gráficos obtidos da identificação radionuclídica em três sínteses do FLT- ^{18}F , obtido através da condição padrão de síntese. Todas as retas apresentaram r^2 maior que 0,99 e as equações das retas calculadas mostraram o valor de a para cada produção (TAB. 6.2). Foram obtidas, nas três sínteses a 100 °C ($n = 3$), meias-vidas calculadas entre 105 e 115 minutos de acordo com o que foi estabelecido pela Farmacopéia Americana (TAB. 6.2).

FIGURA 6.1 Gráfico linear das medidas de atividade do radiofármaco FLT- ^{18}F ao longo do tempo, referente a três diferentes produções em condição padrão de síntese.

A TAB. 6.2 apresenta os resultados obtidos a partir das retas.

TABELA 6.2 Dados encontrados através da equação da reta e meias-vidas calculadas para cada síntese na identificação radionuclídica do FLT- ^{18}F .

Síntese (n)	r^2	a	Meia-vida ($T_{1/2}$)
1	1,00	-0,0065	106,6
2	1,00	-0,0061	113,5
3	0,99	-0,0065	106,6

6.4.2 DETERMINAÇÃO DOS PERFIS CROMATOGRÁFICOS

Os perfis cromatográficos do FLT- ^{18}F e do fluoreto- ^{18}F foram obtidos utilizando-se diferentes fases estacionárias e diferentes fases móveis (FIG. 6.2 e 6.3).

Utilizando-se TLC-SG como suporte cromatográfico (FIG. 6.2), todos os solventes apresentaram um comportamento semelhante. Comparando-se a FIG. 6.2A e a FIG. 6.2B é possível notar uma boa resolução entre o fluoreto- ^{18}F e o produto marcado. Em todos os sistemas estudados o fluoreto- ^{18}F permaneceu no início da fita, próximo ao ponto de aplicação, enquanto o FLT- ^{18}F migrou com o solvente. A fase móvel contendo diclorometano:metanol (9:1 v/v) apresenta um diferencial frente aos outros métodos

utilizados. De acordo com a literatura, é possível observar a presença da impureza DMTr-FLT- ^{18}F (FLT radioativo com o grupo protetor DMTr na posição 5' da pentose que não foi hidrolisado) no R_f 0,5 [80]. Porém, em nenhuma das sínteses realizadas esse contaminante foi observado.

(A)

(B)

FIGURA 6.2 Perfil cromatográfico do (A) FLT- ^{18}F e (B) fluoreto- ^{18}F utilizando-se diferentes fases móveis em suporte de TLC-SG.

A fase móvel composta por acetato de etila com metanol (85:15 v/v) proposta na monografia em desenvolvimento da Farmacopéia Européia mostrou-se ser um método com boa resolução [6]. Esta metodologia de pureza radioquímica foi, então, adotada para inserção nas Instruções de Trabalho (IT) do controle de qualidade para o radiofármaco FLT- ^{18}F , uma vez que, sendo uma metodologia farmacopeica, facilitará a elaboração e execução de um protocolo de validação de metodologias analíticas, havendo apenas a necessidade de se avaliar reprodutibilidade e repetibilidade.

Além da TLC-SG, foi testado a ITLC-SG com as fases móveis descritas anteriormente (FIG. 6.3). Todos os solventes utilizados apresentaram perfis semelhantes com R_f entre 0,9 a 1,0 para o FLT- ^{18}F (FIG. 6.3A). Também apresentaram perfis semelhantes quando se tratando de impureza que no caso é o $^{18}\text{F}^-$, com exceção da fase móvel contendo etanol:metanol (1:1 v/v) (FIG. 6.3B). Foi observado um arraste do fluoreto- ^{18}F , o qual implica na perda de resolução [77].

(A)

(B)

FIGURA 6.3 Perfil cromatográfico do (A) FLT- ^{18}F e (B) fluoreto- ^{18}F utilizando-se diferentes fases móveis em suporte de tipo ITLC-SG.

Os cromatogramas em CLAE do FLT (UV 267 nm), $^{18}\text{F}^-$ e FLT- ^{18}F foram obtidos de acordo com as metodologias citadas anteriormente. Em todas as metodologias utilizadas, os cromatogramas mostraram uma boa resolução entre o radionuclídeo livre e o produto radiomarcado. O tempo de retenção (t_R) do FLT padrão através do UV no sistema isocrático água:etanol (90:10 v/v) utilizando um fluxo de 1 mL/min foi de $7,62 \pm 0,56$ min (FIG. 6.4), do $^{18}\text{F}^-$ de $2,79 \pm 0,27$ min e do FLT- ^{18}F foi de $7,82 \pm 0,08$ min (FIG. 6.5A e 6.5B). Já o

t_R do fluoreto- ^{18}F num fluxo de 0,8 mL/min foi de $3,55 \pm 0,28$ min e do FLT- ^{18}F foi de $9,98 \pm 0,12$ min (FIG. 6.5C e 6.5D).

FIGURA 6.4 Cromatograma (CLAE) UV do FLT a 267 nm ($t_R = 7,5$), com fase móvel contendo água:etanol (90:10 v/v).

FIGURA 6.5 Radiocromatograma do (A) $^{18}\text{F}^-$ e (B) FLT- ^{18}F contaminado com $^{18}\text{F}^-$, utilizando-se coluna de fase reversa C_{18} e fase móvel água:etanol (90:10 v/v) a um fluxo de 1 mL/min por 20 minutos; (C) $^{18}\text{F}^-$ e (D) FLT- ^{18}F contaminado com $^{18}\text{F}^-$, utilizando coluna de fase reversa C_{18} e fase móvel água:etanol (90:10 v/v) a um fluxo de 0,8 mL/min por 20 minutos [7, 8, 9].

A CLAE utilizando-se acetonitrila e água em gradiente apresentou um t_R de $2,67 \pm 0,19$ min para o fluoreto-18 (FIG. 6.6A) e $8,63 \pm 0,35$ min para o produto (FIG. 6.6B). Este sistema utilizado pertence à monografia em desenvolvimento do FLT- ^{18}F na Farmacopéia

Européia [6]. Os dois sistemas de CLAE estudados neste trabalho demonstraram boa resolução, seletividade e eficiência, sendo, portanto, bons métodos para a análise da pureza radioquímica do FLT- ^{18}F .

(A)

(B)

FIGURA 6.6 Cromatograma de CLAE (A) fluoreto-18 e (B) FLT- ^{18}F utilizando-se coluna de fase reversa C_{18} e fase móvel gradiente de acetonitrila em água e fluxo de 1 mL/min por 20 minutos.

Uma grande vantagem na utilização da cromatografia líquida de alta eficiência comparando-a com a cromatografia em camada delgada foi a sua rapidez em liberar o resultado final da pureza radioquímica do produto. As corridas em CCD, realizadas com os solventes deste estudo, demoraram aproximadamente 30 minutos para o solvente percorrer

tudo o suporte cromatográfico. Já toda a análise CLAE foi de 20 minutos, sendo que, como observado, em todos os sistemas realizados, o produto e as possíveis impurezas saíram antes dos 10 minutos. Desta maneira, pode-se concluir que a análise da pureza radioquímica utilizando CLAE é mais rápido que a CCD. Isto é um fator importante no controle de qualidade do FLT-¹⁸F, por se tratar de um radiofármaco com tempo de meia-vida curto.

6.4.3 ANÁLISE DA PUREZA RADIOQUÍMICA

Por ser um radiofármaco produzido em um módulo automatizado com sistema de purificação constituído de cartuchos compactados acoplados, o FLT-¹⁸F apresentou em todas as sínteses alta pureza radioquímica (TAB. 6.3) determinada por cromatografia em camada delgada (CCD). Utilizou-se como fase móvel acetato de etila em metanol (1:1 v/v) [7, 8].

TABELA 6.3 Pureza radioquímica do FLT-¹⁸F, utilizando-se 25 mg do precursor e três temperaturas de radiomarcção na síntese diferentes. A pureza radioquímica foi realizada por CCD (n = 3)

Temperatura (°C)	Pureza Radioquímica (%)
100	99,37 ± 0,17
120	99,32 ± 0,28
140	99,16 ± 0,18

Como estabelecido na literatura, os produtos sintetizados apresentaram uma pureza radioquímica acima de 95 % em qualquer uma das temperaturas de radiomarcção estudadas. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre a pureza radioquímica do produto nas diferentes temperaturas testadas.

Foi realizada também a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos produtos a fim de constatar a presença de outras espécies devido à mudança de temperatura (FIG. 6.7). Os resultados da análise da radiomarcção por cromatografia em camada delgada foram confirmados pela CLAE. Utilizou-se como fase móvel água:etanol (90:10 v/v) a um fluxo de 1,0 mL/min por 20 minutos [7, 8, 9].

Notou-se a presença de um pico no tempo de retenção de $8,862 \pm 0,53$ minutos do FLT-¹⁸F radiomarcado a uma temperatura de 120 °C (FIG. 6.7B). Porém, este pico não se mostrou significativo, correspondendo a menos de 2% do produto final.

Na radiomarcção realizada a 140 °C foi observado um pico no tempo de retenção igual a $5,51 \pm 0,23$ minutos. Novamente, este pico representou menos de 1%, mantendo a pureza do produto acima das especificações (FIG. 6.7C). Este pico, provavelmente, se refere a um

composto resultante da oxidação do grupo metila da posição C-5 do FLT-¹⁸F [59].

FIGURA 6.7 Radiocromatograma de CLAE de fase reversa do FLT- ^{18}F utilizando (A) 100 °C, (B) 120 °C e (C) 140 °C, fase móvel água:etanol (90:10 v/v) com fluxo de 1 mL/min, isocrático por 20 minutos.

6.4.4 ANÁLISE DE SOLVENTES RESIDUAIS POR CROMATOGRAFIA GASOSA

Foi realizada a cromatografia gasosa (CG) com o intuito de verificar a presença dos solventes etanol e acetonitrila, os quais fazem parte do processo de síntese do FLT-¹⁸F. O produto radiomarcado à 100 °C apresentou apenas um pico no tempo de retenção de $3,923 \pm 0,002$ minutos ($n = 3$) (FIG. 6.8), pico este correspondente ao solvente etanol. O pico correspondente à acetonitrila não foi detectado. A quantidade de etanol presente nas amostras a essa temperatura foi de $33206,3 \pm 2883,5$ ppm ($n = 3$) que equivale a 3,32 % v/v de etanol, como visto na TAB. 6.4.

FIGURA 6.8 Cromatograma gasoso do FLT-¹⁸F marcado à 100 °C.

Como dito anteriormente, ainda não existe uma monografia específica para o radiofármaco FLT-¹⁸F em farmacopeias oficiais, consequentemente, seus limites são estabelecidos através da literatura [75]. De acordo com a Farmacopéia Americana (USP-35) este limite está acima do permitido para fármacos injetáveis que é de 5000 ppm ou

0,5 % (V/V) [16]. Porém, de acordo com o esboço da monografia em desenvolvimento do FLT- ^{18}F na Farmacopéia Européia, é permitido para o FLT- ^{18}F até 10 % em volume de etanol [6]. Desta maneira, o radiofármaco produzido no módulo automatizado, radiomarcado nas temperaturas de 120 °C e 140 °C (FIG. 6.9 e FIG. 6.10), não estaria acima do limite estabelecido na literatura [6] (TAB. 6.4).

FIGURA 6.9 Cromatograma gasoso do FLT- ^{18}F marcado à 120 °C.

FIGURA 6.10 Cromatograma gasoso do FLT- ^{18}F marcado à 140 °C.

Os resultados da cromatografia gasosa para as demais sínteses de FLT- ^{18}F realizadas estão na TAB. 6.4. Não foi possível detectar acetonitrila em nenhuma amostra dos produtos finais estudados. A acetonitrila é um contaminante do produto final, o seu limite em fármacos injetáveis, de acordo com a Farmacopéia Americana (USP-35), é de no máximo 410 ppm [16]. Portanto, a não detecção deste solvente é muito importante na produção e qualidade do radiofármaco em estudo.

TABELA 6.4 Concentração de etanol encontrada no produto final derivado de três temperaturas de marcação diferentes (100 °C, 120 °C e 130 °C) através da cromatografia gasosa (n = 3).

Temperatura (°C)	Concentração de Etanol (ppm)	Média ± desvio padrão (%)
100	36500,0	33206,3 ± 2883,4
	31137,5	
	31981,5	
120	49856,6	56600,5 ± 6033,6
	61487,5	
	58457,2	
140	39571,1	51040,7 ± 10228,8
	54333,3	
	59217,6	
Critério de aceitação*		100000,0 ppm ou 10 % v/v

* monografia em desenvolvimento para Farmacopéia Européia [6]

6.4.5 DETERMINAÇÃO DE PH

O pH do produto final analisado variou de 5,5 a 6,0 (n = 9) (TAB. 6.5). O tampão citrato, o qual é acrescentado ao frasco final do produto, possui uma faixa de pH de 3,0–6,2 e um PKA igual a 6,40, auxiliando a manutenção do pH do FLT-¹⁸F. Este valor está dentro da faixa estabelecida na literatura que é de 4,5 a 8,5 [6]. Desta maneira, o produto final mostrou-se adequado.

TABELA 6.5 Valores de pH do produto final encontrados em diferentes sínteses produzida neste trabalho (n = 9).

Síntese	pH
1	5,5
2	5,5
3	6,0
4	6,0
5	5,5
6	6,0
7	6,0
8	6,0
9	6,0
Limite estabelecido	4,5 a 8,5 *

* monografia em desenvolvimento pela Farmacopéia Européia [6].

6.5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados discutidos neste capítulo, é possível concluir que:

- o método de identidade radionuclídea, assim como utilizado para o FDG- ^{18}F , se mostrou apropriado para o radiofármaco estudado, tendo em vista tratar-se do mesmo elemento radioativo;
- no estudo dos perfis cromatográficos em CCD, todos os sistemas estudados apresentaram boa resolução do produto e o fluoreto- ^{18}F ;
- as metodologias da CLAE testadas obtiveram boas resoluções entre a impureza (fluoreto- ^{18}F) e o produto (FLT- ^{18}F);
- todas as temperaturas de marcação estudadas resultaram um produto com pureza radioquímica superior a 98 %, mostrando que o produto obtido através do módulo automatizado, com sistema de purificação específico, possui um alto grau de pureza;
- com relação a análise de solventes residuais, não foi encontrada acetonitrila em nenhuma das amostras estudadas, e a quantidade de etanol contida nas amostras está

abaixo do limite permitido de acordo com a proposta de monografia de FLT- ^{18}F da Farmacopéia Européia;

- o pH do produto apresentou-se dentro da faixa especificada;
- desta forma, o radiofármaco FLT- ^{18}F produzido atendeu todos os critérios de aceitação dos ensaios de qualidade avaliados;
- este trabalho contribuiu para a avaliação das metodologias analíticas propostas pela Farmacopéia Européia, concluindo pela sua viabilidade de aplicação na rotina de produção do radiofármaco FLT- ^{18}F .

7

ESTUDOS *in vitro*

Neste capítulo apresentam-se os estudos *in vitro* realizados primeiramente em células e posteriormente em animais.

7.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a internalização do FLT-¹⁸F em células de glioblastoma humano;
- analisar a citotoxicidade da fluortimidina não radiomarcada (FLT) e radiomarcada (FLT-¹⁸F) em células de glioblastoma humano.

7.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ESPECÍFICA

Estudos *in vitro* são de fundamental importância no desenvolvimento de novas drogas. De acordo com o guia da OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), o teste de citotoxicidade faz parte dos testes preliminares a serem feitos antes de determinados estudos *in vitro*, como o teste do cometa, teste do micronúcleo, dentre outros.

Os testes de citotoxicidade *in vitro* são importantes para se verificar a toxicidade de novos compostos, principalmente quando se está estudando a aplicabilidade como

agente terapêutico [81]. Os radiofármacos, mesmo sendo de uso diagnóstico, também são considerados medicamentos e necessitam ser avaliados em estudos pré-clínicos antes de serem utilizados em seres humanos.

Dentre os diferentes testes que podem ser utilizados na avaliação da citotoxicidade de um fármaco, destaca-se o ensaio MTT proposto por Mosmann em 1983 [82]. O ensaio MTT tem sido amplamente utilizado para determinar a viabilidade celular, citotoxicidade e proliferação de células vivas, após a exposição a determinadas substâncias. Esta técnica pode também ser utilizada para caracterização da toxicidade celular de novos fármacos [82, 83, 84, 85].

No ensaio do MTT, o sal de tetrazolio (Brometo de 3- [4,5- dimetiltiazol-2-il]- 2,5-difeniltetrazólio) é incorporado facilmente por células viáveis. Posteriormente, este composto sofre uma reação de redução nas mitocôndrias celulares através da ação da enzima succinato desidrogenase, uma enzima do ciclo de Krebs. O método envolve a conversão, pelas mitocôndrias celulares, do MTT de coloração amarela em cristais de formazan de coloração roxa. Após a adição de dimetilsulfóxido (DMSO), os cristais são solubilizados, liberados e quantificados colorimetricamente, através de espectrofotometria [85, 83]. Desta maneira, a capacidade das células em reduzirem o MTT, uma indicação da atividade e da integridade mitocondrial, é interpretada como medida da viabilidade celular. Ao contrário de outros ensaios de citotoxicidade, o ensaio do MTT apresenta algumas vantagens, como rapidez e precisão [82].

Existem outros corantes tetrazólicos intimamente relacionados ao MTT, como o MTS, XTT e WST os quais são utilizados em conjunto com um agente acoplador de elétrons. O MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazólio) na presença de fenazina metassulfato (PMS), que foi utilizado neste trabalho, produz um produto de formazan que tem uma faixa de absorvância de 490-500 nm, em PBS, e sofre o mesmo mecanismo de reação do MTT dentro da célula. O método utilizando MTS tem como vantagem a redução de passos quando comparado com o MTT, onde há a necessidade de adicionar um solubilizante, além de outras etapas. Entretanto, essa conveniência tem sua desvantagem, uma vez que o método com MTS é passível de interferências colorimétricas, pois estes passos intermediários no método com MTT auxiliam na retirada de qualquer corante que possa ficar preso na parede dos poços [86, 87]. Portanto, é preciso ter bastante cautela na hora de realizar o estudo de citotoxicidade utilizando o corante MTS.

7.2.1 INTERNALIZAÇÃO CELULAR DO FLT-¹⁸F

O FLT-¹⁸F entra na célula através de dois mecanismos, por difusão passiva ou transporte facilitado por carreadores Na⁺-dependentes. Após isso, o FLT-¹⁸F é fosforilado pela timidina quinase 1 em FLT-¹⁸F-monofosfato, ficando preso dentro da célula (FIG. 7.1) [20].

A timidina quinase 1 (TK1) é uma enzima da proliferação celular. É a principal enzima na via de recuperação da síntese do DNA [34]. A atividade da TK1 é praticamente ausente em células quiescentes, mas em células em divisão atinge a sua atividade máxima no final da fase G1 e durante a fase S do ciclo celular. Em alguns estudos, foi possível verificar que a atividade da enzima timidina quinase 1 é de três a quatro vezes maior em células malignas (U1-Mel, HTB-152 e Hep-2) que em células benignas (GM 2906A, GM 2936B e GM 2305) [20].

FIGURA 7.1 Mecanismo de absorção do FLT-¹⁸F na célula. Esquema adaptado de Been e colaboradores [10].

Uma característica importante a ser tratada é o fato de que a molécula do FLT-¹⁸F não se incorpora ao DNA. Isto acontece porque o FLT-¹⁸F age como um finalizador de cadeia devido à ausência do grupamento hidroxila localizado na posição 3' da molécula de timidina original [88].

A capacidade de internalização do FLT-18F em modelos de células animais é uma forma de verificar, em um ensaio *in vitro*, o potencial do radiofármaco no meio biológico. Protocolos de estudos de internalização de radiofármacos em células específicas foram discutidos por diversos autores e amplamente disponíveis [89, 90].

7.3 MATERIAIS E MÉTODOS

7.3.1 INFRAESTRUTURA

Os ensaios correspondentes a esta etapa do trabalho foram realizados nos laboratórios do Centro de Biotecnologia (CB) do IPEN e nos laboratórios de pesquisa e desenvolvimento nas Instalações de Radiofarmácia no IPEN, ambos locais adequados para o cultivo de células tumorais e a realização dos estudos de citotoxicidade e internalização, respectivamente.

7.3.2 MATERIAIS

Os principais materiais utilizados nesta etapa do trabalho foram:

- padrão de FLT (ABX);
- FLT-¹⁸F;
- tampão de lise celular (20 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl e 1 mM EDTA, pH 7,5);
- tampão fosfato de sódio/ salina (PBS);
- soro albumina bovino (BSA) (Sigma-Aldrich Co, EUA);
- tampão glicina/cloreto de sódio pH 5;
- meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Cultilab);
- meio de cultura Eagle suplementado (EMEM) (Cultilab).

Os equipamentos e materiais utilizados nesta etapa do trabalho foram:

- contador automático tipo poço com cristais NaI(Tl) (D5002 CobraII Packard - Canberra);
- calibrador de atividade (CRMTM-35R - Capintec®);
- leitor de microplaca (Thermo Multiskan);
- micropipetas automáticas;
- microplacas de cultura celular com 96 poços;
- placas de cultura celular de 6 poços;
- vidraria e material plástico descartável em geral.

7.3.3 CÉLULAS

As células de glioblastoma humano (U-87 MG) foram cultivadas no Centro de Biotecnologia do IPEN a 37 °C e 5 % de CO₂ em meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) enriquecido com 10 % de soro fetal bovino (SFB) e 1 % de antibiótico para o estudo de internalização e para o estudo de citotoxicidade estas células foram cultivadas no meio Eagle suplementado (EMEM) com 10 % de SFB e 1 % de antibiótico. As células foram tripsinizadas e depois ressuspensas em solução com meio de cultura e concentrações diferentes conforme os ensaios realizados.

7.3.4 MÉTODOS

7.3.4.1 ESTUDO DE INTERNALIZAÇÃO

Neste ensaio, as células U-87 MG foram semeadas em placas de seis poços ($2,5 \times 10^5$ /poço) e mantidas a 37 °C e 5 % CO₂ por 48 horas, até atingirem 80 % ou mais de confluência. O meio de cultura foi removido e as células foram lavadas duas vezes com o meio de internalização (DMEM 1 % v/v SFB). Adicionou-se 1,2 mL de meio de internalização a cada poço e as placas foram incubadas a 37 °C por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado em cada poço, em quintuplicata, 300 µL de PBS com 1 % BSA e 150 µL de FLT-¹⁸F (20000000 cpm). As células foram incubadas a 37 °C por 10, 30, 60 e 120 minutos. Ao final de cada tempo, as células foram lavadas duas vezes com meio de internalização, tratadas com 1 mL de solução tampão glicina/cloreto de sódio pH 5 por 5 minutos, seguido de uma lavagem rápida com a mesma solução. As lavagens ácidas foram coletadas para tubos de contagem para avaliação do total ligado à membrana celular. Para análise da internalização, as células foram lisadas com 1 mL tampão de lise celular (20 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl e 1 mM EDTA, pH 7,5) e o conteúdo foi removido para tubos de contagem após 10 minutos, juntamente com duas lavagens com 1 mL de PBS. Após a contagem dos tubos em contador gama, a porcentagem de internalização foi calculada em função do total de radioatividade na célula (ligada + internalizada) e do total de radioatividade adicionado [90].

7.3.4.2 ESTUDO DE CITOTOXICIDADE

Para o ensaio de citotoxicidade do FLT não radiomarcado, foi utilizada a concentração máxima de 7,9 nM, a qual corresponde à injeção de 10 µg num paciente de 70 Kg e 5,2 L de sangue, esta massa equivale a aproximadamente 185 MBq (5 mCi) de FLT-¹⁸F [10]. Foi realizada a variação desta concentração até chegar ao limite mínimo de 10 % do valor estabelecido.

Já para o ensaio com o FLT-¹⁸F radioativo, utilizou-se uma concentração de 34,78 kBq/mL do radiofármaco no ensaio. Esta concentração foi baseada na dose injetada de FLT-¹⁸F em estudos clínicos já realizados até o presente momento, que é de 2,59 MBq/Kg [10, 45, 46, 47, 51]. Desta maneira, esta atividade foi calculada para um homem de 70 Kg e, considerando que este possui aproximadamente 5,2 L de sangue, achou-se a atividade por mL de sangue que foi de 34,78 kBq/mL (sendo 185 MBq ou 5 mCi, considerada uma dose segura em humanos) [91]. Desta maneira, as concentrações estudadas foram 1,739 kBq/poço, 3,378 kBq/poço, 6,956 kBq/poço e 13,912 kBq/poço.

Foi preparada uma suspensão de células U-87 MG em meio de cultura Eagle suplementado (EMEM) com 10 % de soro fetal bovino (SFB) e 1 % de antibiótico. Em seguida, realizou-se a contagem das células viáveis em azul de tripano para o ajuste da concentração em 4×10^4 células/mL para a posterior realização dos ensaios de citotoxicidade. Esta concentração celular foi adotada após estudo prévio utilizando-se diferentes concentrações de células em diferentes tempos de incubação com o MTS. Os resultados foram ajustados em uma função linear utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.0[®] (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

A suspensão celular escolhida foi, então, distribuída em uma placa de 96 poços, 100 μ L por poço, e incubadas a 37 °C e a 5 % de CO₂. Após $24 \pm 0,5$ h em cultura, cada coluna (8 poços) das placas recebeu 100 μ L das soluções com diferentes concentrações de FLT não radiomarcado (0,79 a 7,9 nM) e, no ensaio com o FLT-¹⁸F, cada coluna recebeu também diferentes concentrações radioativas do radiofármaco em 100 μ L. Nos dois ensaios, as células contidas nos poços da primeira coluna das placas receberam apenas meio de cultura, sendo consideradas o grupo controle. De acordo com referências pesquisadas, a meia-vida efetiva do FLT é de $78 \pm 2,5$ min [38, 92]. Este parâmetro forneceu base para determinar o tempo de exposição das células ao FLT não radiomarcado, correspondendo, portanto, a 120 minutos.

Após o término deste período, o meio de cultura com as concentrações do FLT ou FLT-¹⁸F foi removido e substituído por meio de cultura EMEM fresco, sendo então, as placas incubadas por mais 24 h. Ao final deste período, o meio de cultura dos poços foi removido novamente e adicionado 100 μ L do meio EMEM com 20 μ L de MTS e 1 μ L de PMS, solução cromogênica que permite a verificação da viabilidade celular. Após 1 hora de incubação a absorbância em cada poço foi determinada a 490 nm utilizando-se um leitor de microplaca (Thermo Multiskan). A absorbância obtida das células controle, não tratadas, foi considerada como 100 % de viabilidade celular [82].

7.3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Para análise estatística dos dados foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 5.0[®] (GraphPad Software, Inc.,

San Diego, CA, EUA). Utilizou-se a análise de variância ANOVA de um fator, seguida do teste de Bartlett à homogeneidade de variâncias, e do teste de comparação de Bonferroni para múltipla comparação ou teste de Dunnet para comparações de grupos com o grupo controle.

7.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

7.4.1 ESTUDO DE INTERNALIZAÇÃO

Como apresentado anteriormente, o FLT é transportado para dentro das células por difusão passiva ou transporte facilitado por carreadores Na^+ -dependentes. O FLT- ^{18}F entra na célula quando a mesma encontra-se no processo de divisão celular, mais especificamente no final da fase G1 e durante toda a fase S do ciclo celular.

Na FIG. 7.2 é possível observar uma diferença significativa no tempo de incubação de 120 min ($P < 0,05$) quando comparado com os demais tempos. Pode-se afirmar que neste tempo de 120 min houve uma maior internalização do produto e conseqüentemente, menos produto ficou ligado à membrana. Entretanto, o FLT- ^{18}F é incorporado à célula na fase de divisão do ciclo celular, pois é nesta fase que a célula faz uso da timidina na replicação do DNA. Este fator interfere na internalização do FLT, a qual é significativamente maior no momento em que mais células estão na fase mitótica ideal.

FIGURA 7.2 Porcentagem do radiofármaco FLT- ^{18}F que foi internalizado e ligado à membrana celular em função do tempo de incubação ($n = 4$).

O FLT radiomarcado com radioisótopo ^{18}F não se liga a um receptor específico na membrana celular. Porém, o tamanho pequeno da molécula e as porções da estrutura molecular contendo hidroxilas podem ter colaborado com a interação radiofármaco-receptor

inespecífico. Isto refletiu na fração de FLT-¹⁸F que ficou ligado à superfície da membrana celular.

Já na FIG. 7.3 é possível observar a porcentagem de FLT-¹⁸F que foi internalizado em relação à quantidade total que foi colocada no poço.

FIGURA 7.3 Porcentagem do radiofármaco FLT-¹⁸F que foi internalizado em relação à quantidade total colocada em cada poço (n = 4).

7.4.2 ESTUDO DE CITOTOXICIDADE

Antes de iniciar o estudo de citotoxicidade propriamente dito, determinou-se a melhor quantidade de células U-87 MG a ser adicionada em cada poço. Várias quantidades de células e três tempos de incubação com MTS foram estudados. Através das análises estatísticas, os tempos de 1 ou 2 horas de incubação com MTS foram os que apresentaram o melhor resultado, já que foram obtidos os melhores ajustes à função linear (r^2 : 0,9797 e 0,9792 para o tempo de 1 hora e 2 horas, respectivamente) observados na FIG. 7.4. A quantidade de 4000 células foi determinada como melhor resultado analisando-se o gráfico dos resíduos que, em média, foram mais próximos de zero (FIG. 7.5) e seu valor de densidade óptica (Abs) que não ultrapassou 1.0 nos dois tempos determinados (FIG. 7.4).

FIGURA 7.4 Ajuste linear das densidades ópticas (Abs) obtidas com diferentes quantidades de células U-87 MG, em diferentes tempos de incubação com o agente cromogênio MTS (1, 2 e 3 horas) ($n = 7$). * Absorvância.

FIGURA 7.5 Resíduos obtidos através da função linear das densidades ópticas obtidas das diferentes quantidades de células em três tempos distintos.

A viabilidade celular do FLT e não radiomarcado como o radiomarcado foi analisada pela técnica de redução de um derivado do sal de tetrazólio pelo complexo enzimático piruvato desidrogenase presente na matriz de mitocôndrias, também chamado de teste MTS.

A FIG. 7.6 apresenta a viabilidade celular média expressa em porcentagem para fluortimidina não radioativa em relação ao grupo controle das diferentes concentrações estudadas. Nenhuma concentração mostrou diferença significativa quando comparada com o grupo controle, ou seja, todas as concentrações de FLT não radiomarcado avaliadas não apresentaram alterações na viabilidade celular quando comparadas com as células que não receberam o composto.

FIGURA 7.6 Viabilidade das células U-87 MG utilizando-se diferentes concentrações de FLT não radiomarcado em relação ao controle (n = 8).

Já no estudo feito com as células de glioma humano utilizando-se FLT radiomarcado com flúor-18, foi possível notar uma diferença significativa ($P < 0,005$) entre o grupo controle e a concentração radioativa de 1,74 kBq/poço (0,047 μ Ci/poço) (FIG. 7.7).

FIGURA 7.7 Viabilidade das células U-87 MG do grupo controle e com diferentes atividades de FLT radiomarcado com ¹⁸F (n = 8). A barra em verde representa o grupo controle com concentração de FLT-¹⁸F igual a zero.

Alguns fatores podem ter causado esta diferença na menor atividade de FLT utilizada. Um fato importante a ser considerado é o número variável de mitocôndrias que cada célula possui, mesmo sendo células da mesma linhagem celular. O número de mitocôndrias é proporcional à atividade metabólica de cada célula, podendo variar de quinhentas até dez mil por célula. Portanto, uma das possibilidades da redução da viabilidade celular causada na menor concentração radioativa poderia ser decorrente à números variados de mitocôndrias

celulares, já que é nas mitocôndrias que ocorre a redução do MTS [93].

No estudo de internalização, foi possível verificar que ocorre uma maior internalização do radiofármaco estudado num tempo de 120 minutos de incubação das células com o radiofármaco. Esta característica pode ser apenas proporcional ao tempo em que as células ficaram expostas ao FLT radioativo no estudo de citotoxicidade. Além disso, o FLT é mais internalizado quando as células estão no período de divisão celular, tendo, assim, uma internalização variável e não depende de apenas um fator. Isto implica diretamente no possível efeito toxicológico celular que possa ocorrer. O grupo de células submetido a uma menor concentração de FLT, pode ter internalizado com mais eficiência o FLT-¹⁸F do que outros grupos que receberam uma maior concentração do radiofármaco, gerando, assim, um efeito mais citotóxico nas células. Além disso, foi possível verificar neste estudo a ligação do radiofármaco na membrana celular, mesmo não havendo receptores específicos na membrana das células para o FLT-¹⁸F. Este fator pode alterar consideravelmente o efeito citotóxico do radiofármaco em estudo, já que parte do FLT-¹⁸F não é internalizado e, conseqüentemente, não causa o efeito citotóxico.

Outra hipótese também levando em consideração a internalização do radiofármaco nas células é que quanto mais atividade inserida por poço, maior é a concentração de FLT-¹⁸F em solução. Desta maneira, é possível que estas concentrações mais altas tenham desequilibrado o transporte do fármaco para o meio intracelular. Uma vez que, teoricamente, o FLT-¹⁸F em excesso poderia deixar de ser transportado em quantidades suficientes para induzir redução de viabilidade estatisticamente significante em relação ao controle.

Outro problema é o poder de reparação celular. O FLT não é incorporado ao DNA celular de mamíferos por possuírem a α -DNA-polimerase, que protege o DNA da adição de nucleotídeos errados [38]. Entretanto, o estudo foi realizado em células cancerígenas de glioblastoma, que possuem uma desregulação do crescimento e divisão celular, esta desregulação acontece porque a célula deixa de conferir os erros e falhas que provocariam o bloqueio no ciclo celular, reparo do DNA e indução da morte por apoptose [94]. Isto mostra a complexidade do estudo e dos resultados que podem ser encontrados.

A redução da viabilidade foi reduzida quando comparada ao grupo controle, porém, a redução foi muito pequena e não atingiu 50 %. Portanto, outros ensaios podem ser feitos para investigar este efeito encontrado, como estudos de dano ao DNA, além de testar, inclusive, outras concentrações radioativas menores, a fim de confirmar algum possível efeito toxicológico na célula.

7.5 CONCLUSÕES

Foi possível concluir, de acordo com o que foi apresentado nos resultados e discussões, que:

- através do estudo de internalização, foi possível verificar que há uma maior internalização do FLT- ^{18}F após 120 minutos de incubação;
- o FLT não radiomarcado não apresentou citotoxicidade em células de glioma humano nas concentrações estudadas;
- já para o FLT- ^{18}F , houve uma diferença significativa na menor concentração radioativa quando comparada ao grupo controle, entretanto, este resultado deve ser analisado com cautela tendo em vista as diversas variáveis presentes no estudo.

8

ESTUDOS *in vivo*

Neste capítulo serão abordados os estudos realizados em animais (farmacocinética e biodistribuição) importantes para a avaliação do comportamento *in vivo* do radiofármaco FLT-¹⁸F e sua captação tumoral.

8.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos desta etapa do trabalho foram:

- caracterizar e avaliar o perfil farmacocinético e de biodistribuição do radiofármaco estudado;
- realizar imagens PET/CT em animais com tumor utilizando-se o radiofármaco em estudo.

8.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ESPECÍFICA

8.2.1 FARMACOCINÉTICA

A farmacocinética significa “o que o organismo faz com o fármaco”, e trata-se da relação temporal das concentrações de um fármaco obtidas em diferentes partes do organismo durante e após a administração [37].

A farmacocinética é essencial para o desenvolvimento de novos fármacos e também radiofármacos. Ela serve para entender os ensaios pré-clínicos e toda a farmacologia em modelo animal. Existem dois modelos diferentes para simular o organismo, um simples com um compartimento único e outro mais complexo com dois compartimentos ou com uma depuração dependente da concentração do fármaco (cinética não-linear) [37].

O modelo monocompartimental descreve, muitas vezes, adequadamente as alterações sofridas pelos fármacos ao longo do tempo, como a concentração plasmática ou a excreção urinária que, após a administração, se distribuem rapidamente entre o plasma e os tecidos [37]. O modelo de um compartimento concebe o organismo como um compartimento único, sendo um dos mais utilizados na clínica, dada a sua simplicidade matemática aliada a uma boa capacidade preditiva. Esta aproximação torna-se vantajosa na medida em que modelos mais complexos são de difícil aplicação devido à escassez de informação existente quando comparada com o número de parâmetros a determinar para a sua resolução [95, 37].

Utilizando o modelo compartimental, o processo de distribuição de um fármaco pode ser quantificado através do volume de distribuição (Vd). Este parâmetro farmacocinético avalia a extensão da distribuição da substância ativa além do plasma. Entretanto, o Vd é considerado apenas como uma constante de proporcionalidade fictícia, sendo, assim, apenas um conceito matemático que é utilizado para explicar as concentrações observadas dos medicamentos com base na quantidade de fármaco conhecida presente no organismo. O Vd é capaz de fornecer uma estimativa da extensão do tecido extravascular que captou o fármaco, e ainda descreve a relação entre a quantidade de fármaco em todo o organismo e a quantidade existente no plasma. E pode-se concluir que quando o valor atribuído à Vd é pequeno, isto significa que a captação pelos tecidos é limitada, consequentemente, valores grandes de Vd, indicam uma ampla distribuição do fármaco para os tecidos [37, 95].

Outro conceito importante no estudo da farmacocinética de um fármaco é o tempo de meia-vida plasmático ($t_{1/2}$). A meia-vida indica o tempo em que uma determinada grandeza reduz o seu valor pela metade. Em farmacocinética o tempo de meia-vida de um fármaco representa o tempo gasto para que a sua concentração plasmática ou a sua quantidade original no organismo se reduza à metade. A cada meia-vida, a concentração do fármaco decresce em 50 % do valor que tinha no início do período, e esse conceito é observado

através da concentração plasmática. A caracterização de um evento farmacocinético através da meia-vida possibilita uma estimativa da velocidade com que o processo ocorre e, assim, originando dados importantes para a interpretação dos efeitos [37, 95].

Em se tratando da depuração de um fármaco do organismo, a mesma pode ser compreendida como a taxa de eliminação por todas as vias, normalizada para a concentração do fármaco em um líquido biológico [37, 95].

O FLT não radioativo foi pesquisado durante anos como um fármaco no tratamento de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus* - HIV). Vários estudos foram realizados a fim de constatar sua atividade antiretroviral e suas propriedades farmacocinéticas, dinâmicas e toxicológicas como um fármaco não radioativo. O tempo de meia-vida de eliminação para o FLT foi de 4,35 horas para administração via oral de 12 em 12 horas [38].

Atualmente, alguns estudos foram feitos a fim de constatar os aspectos farmacocinéticos do radiofármaco FLT- ^{18}F em modelos tumorais ou ainda em pacientes com tumores malignos [75].

8.2.2 BIODISTRIBUIÇÃO

A biodistribuição de um fármaco está intimamente ligado a sua farmacocinética, já que a farmacocinética corresponde ao estudo da evolução temporal do movimento do fármaco *in vivo* [37].

O termo distribuição ou biodistribuição trata-se da transferência reversível do fármaco de um local a outro dentro do organismo. O doseamento de um fármaco nos diferentes tecidos disponibiliza informações precisas da sua distribuição [37].

Assim que absorvido ou injetado na corrente sanguínea o fármaco em questão pode distribuir-se para os líquidos intersticiais e celulares. E seus padrões de distribuição refletem alguns fatores fisiológicos, como fluxo sanguíneo tecidual e características da membrana de transporte, bem como de suas propriedades físico-químicas [37].

8.2.3 IMAGENS DO RADIOFÁRMACO FLT- ^{18}F EM ANIMAIS

Há vários trabalhos na literatura sobre imagens em PET do radiofármaco FLT- ^{18}F realizadas em animais. Normalmente as imagens em animais são feitas aproximadamente após 60 minutos da injeção intravenosa do traçador e uma atividade de 37 MBq [17, 96, 97].

Lee e colaboradores [17] fizeram um trabalho bastante interessante comparando os radiofármacos fludesoxiglicose- ^{18}F (FDG- ^{18}F), fluoretiltirosina- ^{18}F (FET- ^{18}F) e FLT- ^{18}F

em ratos, a fim de observar a diferenciação entre tumor e inflamação. As taxas das relações tumor:sangue e tumor:músculo foram maiores para o FDG- ^{18}F que para os demais radiofármacos estudados. Entretanto, a sua captação no foco inflamatório também foi elevada. E pode-se concluir que o FET- ^{18}F e o FLT- ^{18}F são superiores ao FDG- ^{18}F na diferenciação entre tumor e inflamação.

Em um outro trabalho foi estudada a interferência do uso de 5-fluorouracil (5-FU) em imagens PET, sendo este administrado 24 horas antes da administração de FLT- ^{18}F em animais. O 5-FU é um inibidor da timidilato-sintase, uma enzima responsável pela síntese *de novo* da timidina, e é usado como um auxiliar na quimioterapia metástica em vários tumores sólidos. Observou-se, neste trabalho, que 5-FU foi capaz de aumentar o fluxo de FLT- ^{18}F e a atividade da enzima TK1 no tecido tumoral [96].

Assim como em estudos clínicos com o FLT- ^{18}F citados no capítulo 3, muitos estudos em animais vêm sendo feitos para analisar a utilização do radiofármaco no acompanhamento de tratamentos tumorais. Em um estudo, o FLT- ^{18}F mostrou-se um radiofármaco de diagnóstico eficiente para analisar o tratamento de glioma (U-87) e tumor coloretal (HCT116) em camundongos, utilizando-se o inibidor da enzima fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) chamado GDC-0941 (novo agente ainda na fase II dos estudos clínicos) [98]. Resultados positivos no acompanhamento de tratamentos com cetuximab em camundongos com câncer de pulmão também foram encontrados para imagens PET/CT com o radiofármaco FLT- ^{18}F [99]. Um estudo também mostrou a eficácia do FLT- ^{18}F no acompanhamento de tratamento antiproliferativo de glioma em camundongos [100].

8.3 MATERIAIS E MÉTODOS

8.3.1 INFRAESTRUTURA

Os experimentos desta etapa do trabalho foram realizados nos laboratórios de pesquisa e desenvolvimento das Instalações de Radiofarmácia, no biotério e Centro de Biotecnologia (CB) localizados no IPEN. E os estudos de imagem foram realizados no Centro de Medicina Nuclear (CMN) do Instituto de Radiologia (InRad) no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

8.3.2 MATERIAIS

Os principais reagentes utilizados nesta etapa do trabalho foram:

- radiofármaco FLT- ^{18}F ;

- soro fetal bovino (Cultilab);
- antibiótico (Cultilab);
- meio de cultura DMEM e RPMI (Cultilab);
- água purificada por equipamento de osmose reversa (Purificador Milli-RX 45 Millipore, EUA);
- solução salina NaCl 0,9 % (IPEN);
- PBS;
- isofluroano em oxigênio;

Os equipamentos utilizados nos experimentos desta etapa do trabalho foram:

- calibrador de atividade (CRMTM-35R – Capintec, EUA);
- contador automático tipo poço com cristal NaI(Tl) D5002 cobra II (Packard-Canberra, EUA);
- micro-SPECT/PET/CT (LabPET4, Gamma Medica-Ideas, EUA);
- material plástico descartável em geral, tais como ponteiras, seringas, tubos tipo eppendorf, tubos cônicos tipo Falcon e criotubos;
- pipetas automáticas (Brand e Socorex);
- vidraria em geral, tais como béqueres, erlenmeyers, balões volumétricos e pipetas;
- tubos capilares heparinizados.

8.3.3 ANIMAIS

Os estudos desta etapa do trabalho foram realizados em camundongos *BALB/c* e *Nude* machos, de quatro a oito semanas de idade e 20 a 25 gramas de peso (Biotério - IPEN). Os camundongos *Nude* fêmeas utilizados nos estudos de imagem foram provenientes do próprio Centro de Medicina Nuclear, local onde as imagens foram realizadas.

Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisas do IPEN (Projeto nº 86/11) [A](#) e realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira em Animais de Laboratório (SBCAL).

8.3.4 CÉLULAS

As células de glioblastoma humano (U-87 MG) foram cultivadas no CB do IPEN a 37 °C e 5 % de CO₂ em meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) enriquecido com 10 % de soro fetal bovino (SFB) e 1 % de antibiótico. Já as células AR42J de adenocarcinoma de pâncreas de rato foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 enriquecido com 20 % de soro fetal bovino e 1 % de antibiótico a 37 °C e 5 % de CO₂. As células foram tripsinizadas e depois ressuspensas em solução e concentrações conforme os ensaios realizados.

As células utilizadas na implantação dos tumores de melanoma (linhagem SK-MEL-145) seguiram protocolos específicos de cultivo do CMN-InRad e foram cultivadas neste local.

8.3.5 MÉTODOS

8.3.5.1 ESTUDO FARMACOCINÉTICO EM CAMUNDONGOS

A análise farmacocinética foi realizada em camundongos *BALB/c* sadios por método não invasivo. Injetou-se, por via endovenosa caudal, uma dose única de 18,5 MBq do radiofármaco estudado (500 μ Ci), diluídos em 100 μ L de solução de NaCl 0,9 %. Após diferentes tempos (5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60 e 120 minutos), coletou-se amostra de sangue (60 μ L) pelo plexo orbital dos camundongos, utilizando um tubo capilar heparinizado. A radioatividade do sangue foi analisada em um contador gama tipo poço e os dados foram ajustados no programa GraphPad Prism 5.0[®] (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA) para um modelo de distribuição em um compartimento extravascular.

Os parâmetros farmacocinéticos de tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), constante de eliminação (K_{el}), bem como a área sob a curva de concentração plasmática versus tempo (AUC), foram calculados utilizando o mesmo programa. A depuração (CL) foi calculada pela equação 8.1.

$$CL = \frac{\text{Atividade total administrada}}{AUC} \quad (8.1)$$

O volume de distribuição (Vd) foi calculado pela equação 8.2.

$$Vd = \frac{CL}{K_{el}} \quad (8.2)$$

8.3.5.2 ESTUDO DE BIODISTRIBUIÇÃO

8.3.5.2.1 ESTUDO DE BIODISTRIBUIÇÃO EM ANIMAIS SADIOS

Utilizou-se camundongos da espécie *BALB/c*. O composto marcado foi dividido em alíquotas contendo uma atividade de 7,4 MBq/100 μ L (200 μ Ci/100 μ L) e injetado via endovenosa pela veia caudal; os animais foram separados em grupos contendo quatro animais que posteriormente foram sacrificados e dessecados em tempos pré-definidos (30 minutos, 1 hora e 2 horas). Durante a dessecação, foram retirados o sangue, coração, fígado, baço, pulmões, músculo da pata, osso da pata, intestino delgado e grosso, rins, estômago, cérebro e coluna vertebral, que posteriormente foram lavados, pesados e levados ao contador Gama Cobra (Packard Instrument) para determinar a radioatividade em cada órgão ou tecido [54].

A captação nos tecidos ou órgãos foi calculada como a porcentagem da atividade injetada (% AI) (equação 8.3) e atividade injetada por grama do tecido (% AI/g) (equação 8.4). A atividade da cauda foi contada, para corrigir possíveis depósitos de FLT-¹⁸F. Para corrigir o decaimento radioativo do radionuclídeo, foi analisado simultaneamente aos órgãos ou tecidos uma solução padrão da atividade administrada, em triplicata, para o conjunto de órgãos de cada animal.

$$\%AI = \frac{cpm \text{ órgão}}{cpm \text{ padrão}} \times 100 \quad (8.3)$$

$$\%AI/g = \frac{cpm \text{ órgão}}{\text{peso órgão (g)} \times cpm \text{ padrão}} \times 100 \quad (8.4)$$

8.3.5.2.2 DESENVOLVIMENTO DE MODELO TUMORAL EM CAMUNDONGOS *Nude*

Os modelos tumorais desenvolvidos foram encontrados na literatura [101]. Nove camundongos *Nude* foram obtidos do Biotério do IPEN com idade de 4 a 10 semanas para cada linhagem de células tumorais estudadas. Foi injetado, via subcutânea no dorso do animal, 100 μ L de uma solução contendo 2×10^6 células de glioblastoma (U-87 MG) diluídas em PBS [101]. Já para as células de tumor pancreático de ratos (AR42J), foi injetado por via subcutânea no dorso do animal 100 μ L de solução contendo 1×10^6 células também em PBS. Os animais foram observados semanalmente a fim de constatar o crescimento tumoral.

8.3.5.2.3 ESTUDO DE BIODISTRIBUIÇÃO EM ANIMAIS COM TUMOR

A partir do modelo tumoral proposto em camundongos imunodeficientes (*Nude*) foi realizado o estudo de biodistribuição seguindo as mesmas variáveis propostas para o estudo de biodistribuição em animais saudáveis. Utilizou-se três animais por tempo definido (30, 60 e 120 minutos). Após 17 dias da inoculação das células de glioblastoma, os animais

apresentaram um tumor com diâmetro médio de 0,5 cm e receberam 100 μL do radiofármaco FLT- ^{18}F contendo uma atividade de 7,4 MBq (200 μCi). Já os animais que foram inoculados com as células de tumor pancreático receberam o radiofármaco nas mesmas condições após 30 dias de inoculação, quando os seus tumores atingiram um diâmetro médio de 0,5 cm. Os camundongos foram sacrificados nos tempos determinados e a contagem radioativa seguiu-se como nos animais sadios incluindo o tumor. Os cálculos foram realizados da mesma forma que a biodistribuição em animais sadios. A atividade da cauda também foi contada, para corrigir possíveis depósitos de FLT- ^{18}F [102].

8.3.5.3 ESTUDOS DE IMAGEM

Em parceria com o Centro de Medicina Nuclear do InRad, foi possível o desenvolvimento de um pequeno estudo de imagens PET/CT com o radiofármaco FLT- ^{18}F . O estudo foi realizado em camundongos *Nude* fêmeas, nas quais foram implantado subcutaneamente 1×10^7 células de melanoma da linhagem SK-Mel-145. Após 4 semanas foi possível obter tumores PNM (palpável não mensurável), sendo os animais submetidos a imagens quando os tumores estavam com volume próximo a $0,8 \text{ cm}^3$, medida esta obtida através do cálculo do volume aproximado a de um elipsóide.

Os animais receberam 37 MBq (1 mCi) de FLT- ^{18}F em aproximadamente 200 μL e, após 1 hora, os animais foram anestesiados com 2 % de isoflurano em oxigênio e as imagens foram adquiridas no aparelho micro-SPECT/PET/CT - modelo LabPET4 (Gamma Medica-Ideas, Northridge, CA, EUA), por 30 min (10 min/bed). E as imagens de CT foram adquiridas com 80 kVp e 100 μA em 512 projeções e magnificação de 1.3.

As imagens de PET foram reconstruídas pelo método MLEM-2D com campo de visão transversal de 60 mm, matriz de 80 x 80 e pixel de 0,75 x 0,75 mm. O estudo de CT foi reconstruído com o método de Retroprojeção Filtrada (FBP), matriz de 512 x 512 e pixel de 0.17 x 0.17 mm. Ambas as imagens foram exportadas no padrão DICOM e observadas no *software* AMIDE.

8.3.5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Para análise estatística dos dados foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 5.0[®] (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Foi realizada análise de variância ANOVA de um e dois fatores, seguida de teste de múltipla comparação Bonferroni. No estudo de farmacocinética realizou-se um gráfico com decaimento de um compartimento e ajuste não linear.

8.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

8.4.1 ESTUDO FARMACOCINÉTICO EM CAMUNDONGOS

Para construir a curva da FIG. 8.1, os dados encontrados no experimento de farmacocinética foram ajustados para um modelo de decaimento exponencial utilizando o programa GraphPad Prism 5.0[®] para cálculo da meia-vida biológica ($t_{1/2}$) e da constante de eliminação do organismo (K_{el}). Estes dados são apresentados na TAB. 8.1.

FIGURA 8.1 Curva de clareamento sanguíneo do FLT-¹⁸F em camundongos *BALB/c* sadios (n = 5).

TABELA 8.1 Parâmetros farmacocinéticos para FLT-¹⁸F em camundongos *BALB/c* machos sadios (n = 5). Os parâmetros foram calculados utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.0[®], após o ajuste para decaimento exponencial e cálculo da área sob a curva.

Parâmetro farmacocinético	Valor encontrado
$t_{1/2}^1$ (min)	18,38
K_{el}^2 (min ⁻¹)	0,04
CL ³ (mL.min ⁻¹)	1,75
Vd ⁴ (mL)	43,84
Vd ⁴ corrigido pelo peso (L.kg ⁻¹)	1,75

¹ Tempo de meia-vida; ² constante de eliminação; ³ depuração; ⁴ volume de distribuição.

O modelo de um compartimento, que foi utilizado neste trabalho, tem como característica fármacos de absorção instantânea (intravenosa) e eliminação de primeira ordem, com uma distribuição instantânea [95]. Pelo fato do FLT- ^{18}F não sofrer metabolização no fígado em camundongos, ele é eliminado de forma íntegra através dos rins. Foi possível observar um tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) relativamente curto do radiofármaco FLT- ^{18}F (18,38 min), com uma constante de eliminação de $0,04 \text{ min}^{-1}$.

Como dito anteriormente, o volume de distribuição (Vd) é um valor fictício que fornece uma estimativa da extensão do tecido extravascular que captou o fármaco em questão [37, 95]. O grande volume de distribuição mostra que o radiofármaco em estudo se liga rapidamente aos tecidos e se distribui rapidamente.

8.4.2 ESTUDO DE BIODISTRIBUIÇÃO

8.4.2.1 ESTUDO DE BIODISTRIBUIÇÃO EM ANIMAIS SADIOS

O resultado do estudo de biodistribuição pode ser visto na FIG 8.2. Os dados são expressos em porcentagem de atividade administrada em relação à atividade captada por grama de tecido (%AI/g).

FIGURA 8.2 Biodistribuição do FLT- ^{18}F em animais *BALB/c* sadios. Os dados são expressos em porcentagem da atividade injetada por grama de tecido ($n = 4$).

A captação pelo baço manteve-se sem diferença significativa ao longo do tempo, assim

como observado em outros trabalhos [54, 103, 104] (TAB. 8.2). Isto porque, estes órgãos apresentam um grande número de células em proliferação, ocorrendo uma alta taxa de internalização do FLT-¹⁸F. Foi possível observar uma redução na captação na coluna vertebral apenas 2 horas após a injeção do radiofármaco comparando com o tempo de 30 minutos ($P < 0,05$). Não houve diferença significativa da captação na coluna vertebral entre os tempos de 30 e 60 minutos ($P > 0,05$). Já o baço, em nenhum momento obteve uma alteração na captação significativa ($P > 0,05$) entre os três tempos estudados.

TABELA 8.2 Biodistribuição do FLT-¹⁸F nos órgãos e tecidos em camundongos *BALB/c*. Os dados são expressos em porcentagem da atividade injetada por grama de órgão ou tecido ($n = 4$).

	%AI/g de órgão ou tecido ou mL de sangue		
Tempo após injeção (min)	30	60	120
Sangue	1,32 ± 0,41	0,54 ± 0,15	0,30 ± 0,06
Coração	1,60 ± 0,51	0,57 ± 0,05	0,18 ± 0,04
Pulmões	1,20 ± 0,47	0,32 ± 0,08	0,15 ± 0,06
Pâncreas	1,24 ± 0,44	0,42 ± 0,20	0,16 ± 0,01
Baço	1,04 ± 0,50	0,99 ± 0,35	0,65 ± 0,18
Estômago	0,98 ± 0,37	0,42 ± 0,15	0,17 ± 0,06
Fígado	1,52 ± 0,53	0,57 ± 0,23	0,20 ± 0,01
Rins	4,09 ± 1,50	1,23 ± 0,45	0,38 ± 0,13
Intestinos	1,77 ± 0,70	1,44 ± 0,16	0,92 ± 0,23
Músculo	1,38 ± 0,67	0,73 ± 0,11	0,22 ± 0,10
Osso	1,69 ± 0,50	0,96 ± 0,65	0,70 ± 0,41
Coluna	1,10 ± 0,27	0,70 ± 0,25	0,26 ± 0,05
Cérebro	0,21 ± 0,07	0,14 ± 0,05	0,05 ± 0,01

Como previsto, o FLT-¹⁸F não é bem captado no cérebro, pois este órgão não possui células que estão em divisão (baixa atividade da enzima TK1) [104]. Isto mostra uma das vantagens frente ao consagrado FDG-¹⁸F [17, 104]. A baixa captação cerebral do FLT-¹⁸F auxilia na melhor visualização de tumores cerebrais em imagens PET, já que não há interferência da captação pelas células sadias cerebrais como ocorre no FDG-¹⁸F.

A grande captação do produto nos rins demonstra que o mecanismo de excreção se dá

através deste órgão. A captação renal sofreu uma grande diferença ($P < 0,01$) entre o tempo de 30 minutos e o de 2 horas, sinalizando o rápido clareamento sanguíneo. A captação no coração e nos pulmões ocorre provavelmente devido ao aporte sanguíneo nestes órgãos, sendo possível verificar uma grande queda da radioatividade presente nos órgãos uma hora após a administração do radiofármaco ($P < 0,01$ e $P < 0,05$ respectivamente).

Na FIG. 8.3 está representada a biodistribuição em porcentagem de atividade injetada.

FIGURA 8.3 Biodistribuição do FLT-¹⁸F nos órgãos e tecidos em camundongos *BALB/c*. Os dados são expressos em porcentagem da atividade injetada ($n = 4$).

8.4.2.2 ESTUDO DE BIODISTRIBUIÇÃO EM ANIMAIS COM TUMOR

Os animais com glioblastoma humano receberam a injeção do produto 17 dias após a implantação das células. Já os camundongos com adenocarcinoma pancreático só receberam o radiofármaco após 30 dias da implantação.

Os resultados de captação do FLT-¹⁸F nos órgãos e nos tumores em camundongos *Nude* implantados com células de glioblastoma humano (U-87 MG) são mostrados na TAB. 8.3 e adenocarcinoma pancreático de rato (AR42J) na TAB. 8.4.

TABELA 8.3 Biodistribuição do FLT-¹⁸F nos órgãos e tumor de glioblastoma humano (U-87 MG) em camundongos *Nude*. Os dados são expressos em porcentagem da atividade injetada por grama de tumor (n = 3).

	%AI/g de tecido ou tumor ou mL de sangue		
Tempo após injeção (min)	30	60	120
Sangue	2,78 ± 0,41	0,56 ± 0,17	0,15 ± 0,06
Coração	2,69 ± 0,18	0,78 ± 0,27	0,31 ± 0,06
Pulmões	1,99 ± 0,33	0,47 ± 0,11	0,17 ± 0,08
Pâncreas	2,62 ± 0,52	0,89 ± 0,39	0,14 ± 0,10
Baço	6,07 ± 0,96	7,74 ± 1,55	6,28 ± 1,18
Estômago	2,20 ± 0,32	0,47 ± 0,22	0,15 ± 0,08
Fígado	2,52 ± 0,93	0,75 ± 0,25	0,22 ± 0,11
Rins	5,94 ± 1,60	1,47 ± 0,40	0,42 ± 0,25
Intestinos	2,71 ± 0,94	1,22 ± 0,59	1,22 ± 0,41
Músculo	2,81 ± 0,29	0,62 ± 0,22	0,25 ± 0,07
Osso	1,43 ± 0,43	0,86 ± 0,45	0,68 ± 0,21
Coluna	2,06 ± 0,12	0,82 ± 0,18	0,53 ± 0,17
Cérebro	0,36 ± 0,12	0,14 ± 0,05	0,05 ± 0,01
Tumor	4,10 ± 0,72	1,56 ± 0,38	1,23 ± 0,12

TABELA 8.4 Biodistribuição do FLT-¹⁸F nos órgãos e tumor de adenocarcinoma pancreático de rato (AR42J) em camundongos *Nude*. Os dados são expressos em porcentagem da atividade injetada por grama de tumor (n = 3).

	%AI/g de tecido ou tumor ou mL de sangue		
Tempo após injeção (min)	30	60	120
Sangue	2,26 ± 0,55	2,56 ± 0,95	0,95 ± 0,22
Coração	1,91 ± 0,45	1,78 ± 1,06	0,76 ± 0,44
Pulmões	2,44 ± 0,38	1,86 ± 1,12	0,75 ± 0,42
Pâncreas	2,89 ± 0,72	1,54 ± 1,12	0,72 ± 0,47
Baço	3,08 ± 0,20	2,62 ± 1,53	1,03 ± 0,30
Estômago	1,59 ± 0,06	0,58 ± 0,40	0,77 ± 0,39
Fígado	2,17 ± 0,35	1,32 ± 0,66	0,70 ± 0,49
Rins	4,47 ± 0,67	2,65 ± 0,96	1,08 ± 0,50
Intestinos	2,21 ± 0,14	2,04 ± 0,79	1,41 ± 0,37
Músculo	2,51 ± 0,39	1,66 ± 0,82	0,67 ± 0,34
Osso	2,16 ± 0,46	1,78 ± 1,09	1,25 ± 0,41
Coluna	1,91 ± 0,41	1,56 ± 0,90	0,86 ± 0,44
Cérebro	0,45 ± 0,06	0,29 ± 0,19	0,16 ± 0,07
Tumor	2,23 ± 0,37	4,00 ± 1,06	1,29 ± 0,59

Os estudos de biodistribuição em camundongos *Nude* com tumor U-87 MG confirmam o rápido clareamento sanguíneo ($P < 0,001$) e a excreção renal ($P < 0,001$) na primeira hora após a injeção endovenosa, previamente constatado nos estudos feitos em camundongos *BALB/c* (FIG. 8.4). Já na biodistribuição dos animais com tumor pancreático o clareamento sanguíneo foi mais lento, sendo que não houve diferença significativa entre os tempos de 30 e 60 minutos ($P > 0,05$), mas o clareamento renal foi semelhante ao encontrado nas outras duas biodistribuições ($P < 0,001$) (FIG. 8.5).

FIGURA 8.4 Biodistribuição do FLT-¹⁸F nos órgãos e tumor de glioblastoma humano (U-87 MG) em camundongos *Nude*. Os dados são expressos em porcentagem da atividade injetada por grama de tumor (n=3).

A captação tumoral nos 30 primeiros minutos teve diferença significativa comparando-a com o tempo de 60 minutos tanto para o glioblastoma quanto para o tumor pancreático ($P < 0,001$). Porém, foi possível observar a captação tumoral aumentando entre estes dois tempos para o adenocarcinoma de pâncreas, já para o glioblastoma a captação diminuiu no tempo de 60 minutos após a injeção do radiofármaco.

FIGURA 8.5 Biodistribuição do FLT- ^{18}F nos órgãos e tumor de adenocarcinoma pancreático de rato (AR42J) em camundongos *Nude*. Os dados são expressos em porcentagem da atividade injetada por grama de tumor ($n=3$).

Os resultados de porcentagem de atividade injetada por grama de tecido dos estudos de biodistribuição foram utilizados para calcular as razões entre a captação tumoral e os órgãos excretores (rins e intestinos), o baço, órgão este que apresenta uma grande quantidade de células em divisão que internalizam o FLT- ^{18}F , e o músculo (TAB. 8.5).

O aumento do valor da razão tumor:sangue no decorrer do tempo em ambos tumores (principalmente no glioblastoma) sugere que a captação tumoral não se deve ao aporte sanguíneo do tumor, mas sim à sua internalização nas células tumorais em processo de divisão. Os valores encontrados em ambos os tumores para o tempo de 60 minutos foram semelhantes aos encontrados na literatura em tumores distintos [17].

A razão tumor:rins sofreu um aumento ao longo do tempo para o camundongo com tumor de cérebro. Isto mostra a rápida excreção renal sofrida pelo radiofármaco nos primeiros minutos após a injeção. Já para o tumor pancreático, inicialmente, observou-se um aumento da razão tumor:rins, porém, dos 60 minutos para 120 minutos foi possível observar uma discreta redução desta razão.

A razão tumor:músculo nos animais com glioblastoma teve um aumento ao longo do tempo, sugerindo que é possível obter uma melhor imagem do tumor sem interferência de radiação de fundo com tempos maiores. Entretanto, esta característica foi um pouco distinta para o adenocarcinoma pancreático, já que a maior razão tumor:músculo foi encontrada no tempo de 60 minutos após a injeção. [104]

A razão tumor:baço mostrada na TAB. 8.5 indica a captação do radiofármaco em órgão

TABELA 8.5 Razões tumor:tecidos calculadas para os dois tumores estudados. Os valores utilizados para os cálculos foram os %AI/g obtidos a partir da biodistribuição dos derivados em camundongos *Nude*.

Razão		Tumor:sangue			Tumor:rins			Tumor:músculo			Tumor:baço		
Tempo após injeção (min)	30	60	120	30	60	120	30	60	120	30	60	120	
U-87 MG	1,47	2,79	8,20	0,69	1,06	2,93	1,46	2,52	4,92	0,68	0,20	0,20	
AR42J	0,99	1,56	1,36	0,50	1,51	1,19	0,89	2,41	1,93	0,72	1,53	1,25	

não alvo. Isto porque o baço é um dos órgãos responsáveis pela hematopoiese. Para os animais implantados com as células U-87 MG, a captação do baço foi maior, comparada com a captação tumoral, já que a razão foi reduzindo ao longo do tempo. No entanto, para as células AR42J, a razão tumor:baço foi maior que para as células U-87 MG nos tempos de 60 e 120 minutos. A diferença encontrada entre os dois tumores pode ser justificada pela idade diferente dos camundongos trabalhados. Os camundongos *Nude* implantados com as células AR42J receberam o radiofármaco com algumas semanas de vida a mais que os demais animais. A redução da hematopoiese ocorre ao longo da idade, sendo maior a produção de células sanguíneas neste órgão em animais mais jovens [105]. Portanto, quanto menor a captação no baço, maior será a razão tumor:baço, pois são valores inversamente proporcionais.

Um fator importante no estudo de biodistribuição do radiofármaco FLT-¹⁸F é a sua competição com a timidina endógena, isto pode afetar diretamente na sua captação no organismo, principalmente nos órgãos-alvo. Um estudo de van Waarde e col [104] mostrou essa competição usando um grupo de animais tratados com a enzima timidina fosforilase e outro grupo não tratado. Com isso, foi possível verificar uma captação tumoral maior nos animais que receberam o tratamento com a enzima.

8.4.3 ESTUDOS DE IMAGEM

Na FIG. 8.6 é possível observar as imagens PET/CT adquiradas através da administração de FLT-¹⁸F nos camundongos *Nude* fêmeas com tumores de melanoma. As setas brancas indicam o tumor e, as setas vermelhas, a bexiga.

Foi possível observar uma intensa captação de FLT-¹⁸F na porção terminal do intestino (indicada pelo asterisco), podendo estar associado à proliferação celular localizada neste órgão. Outro órgão que também apresentou intensa captação foi a bexiga, fato que novamente confirma excreção renal do radiofármaco estudado, assim como visto nos estudos de biodistribuição [104].

FIGURA 8.6 Imagens PET/CT de camundongos *Nude* fêmeas com tumor de células SK-Mel-145 (indicados pelas setas brancas) utilizando o FLT- ^{18}F . A primeira linha representa imagens CT, a segunda a fusão das duas técnicas e a última apenas PET. As imagens são representativas de dois animais.

A captação do radiofármaco FLT- ^{18}F no tumor não foi muito intensa, isso pode estar diretamente relacionado à competição do radiofármaco com a timidina endógena [104].

8.5 CONCLUSÕES

Nesta etapa do trabalho foi possível concluir que:

- os estudos de biodistribuição do FLT- ^{18}F em camundongos sadios evidenciam o rápido clareamento sanguíneo e excreção renal do composto, com maior captação em órgãos que apresentam maior atividade celular (órgãos não alvos);
- os estudos realizados em camundongos *Nudes* com modelo tumoral mostraram a captação do radiofármaco aos tumores com expressiva razão tumor:sangue, confirmando a especificidade do radiofármaco pelas células tumorais em virtude do processo de divisão celular acentuado;
- os resultados encontrados no estudo de biodistribuição em animais com modelo tumoral para o FLT- ^{18}F corroboram para o seu potencial como radiofármaco para diagnósticos de tumores.
- as imagens PET/CT do FLT- ^{18}F realizada nos animais apresentaram-se estar de acordo com o esperado em literatura. Houve uma intensa captação na bexiga e na porção terminal do intestino, devido à excreção renal e alta divisão celular, respectivamente.

9

CONTRIBUIÇÕES PARA A VALIDAÇÃO DO PROCESSO PRODUTIVO DO FLT- ^{18}F

Neste capítulo serão apresentadas as etapas relacionadas à garantia da qualidade do radiofármaco FLT- ^{18}F . Etapas estas importantes para introduzir futuramente o FLT- ^{18}F na rotina de produção na Radiofarmácia do IPEN.

9.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos desta etapa do trabalho foram:

- elaborar o relatório de desenvolvimento do novo radiofármaco FLT- ^{18}F ;
- elaborar o protocolo de validação de processo do FLT- ^{18}F ;
- realizar testes para verificar a robustez do protocolo de validação de processo do FLT- ^{18}F .

9.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ESPECÍFICA

9.2.1 AS BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO (BPF)

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, BPF é a parte da garantia da qualidade responsável por garantir que os produtos são consistentemente produzidos e controlados sob os padrões de qualidade apropriados de acordo com o uso pretendido e como requerido para que possa ser comercializado [106].

As boas práticas de fabricação são os mínimos padrões recomendados para uma boa qualidade do produto final. Atualmente, a certificação em BPF das linhas de produção é pré-requisito para o registro e comercialização do produto [106].

Cada país segue uma diretriz pertinente, e depois das primeiras normas de boas práticas de fabricação elaboradas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), várias outras foram baseadas nela. No Brasil, a RDC n° 17, de 16 de abril de 2010, é a diretriz responsável por tratar das boas práticas de fabricação de medicamentos [107].

É a garantia da qualidade que incorpora as boas práticas de fabricação e outros fatores, como o projeto e o desenvolvimento de um novo produto. Mas os conceitos de boas práticas, garantia da qualidade e também controle de qualidade são inter-relacionados.

Com relação às boas práticas de fabricação para radiofármacos, a ANVISA publicou em 2009 uma resolução tratando deste assunto. A RDC n° 63 dispõe sobre as boas práticas de fabricação para radiofármacos e oficializou a importância em tratar o radiofármaco como um medicamento com suas devidas particularidades [108]. Esta RDC veio para complementar a RDC n° 17 e as duas, em conjunto, definem as boas práticas de fabricação dos radiofármacos.

Também em 2009, o FDA (Food and Drugs Administration) foi mais além e elaborou um guia de BPF específico para radiofármacos de uso em PET [68]. O grande crescimento da produção de radiofármacos PET despertou a preocupação na qualidade do produto independente do local de sua fabricação. E foi essa a grande motivação do FDA para elaborar um guia específico, onde foi inserido os mínimos padrões para a qualidade de radiofármacos PET produzidos em todos os tipos de instalações (hospitais, universidades e outras instituições) [68].

Este guia do FDA também incorporou os princípios contidos da Farmacopéia Americana (USP) no capítulo sobre os radiofármacos PET [16]. O capítulo <823> da Farmacopéia Americana trata sobre a produção de radiofármacos PET, controle dos componentes, materiais e abastecimento, verificação de procedimentos, teste de estabilidade e data de validade, controle de qualidade e esterilização.

9.2.2 VALIDAÇÃO DE PROCESSO

Nos anos 70, a validação de processo e sua função começaram a ser disseminadas nas indústrias farmacêuticas. Até então, a atenção era dada somente aos métodos de esterilização de medicamentos injetáveis e, conseqüentemente, sua validação e o seu cumprimento efetivo. Em meados dos anos 70, o FDA começou a exigir que a validação fosse feita não somente em produtos estéreis e, ao longo dos anos, a validação expandiu-se para a produção de sólidos, cremes e outros produtos de uso tópico, validação de limpeza e validação de sistemas computadorizados [109].

Por muito tempo pensou-se que estas exigências adotadas pelo FDA apenas agregavam custos na produção da indústria. Entretanto, uma validação de processo bem sucedida agrega qualidade ao processo e, ainda, testes do produto final podem ser minimizados. Além disso, a validação pode se tornar uma grande ferramenta na gestão bem sucedida da cadeia de produção de um medicamento [109].

Durante a implantação de um programa de validação em uma empresa, é necessário que haja interação entre os departamentos desta empresa [109]. Os departamentos incluídos na validação de processo de produção de um medicamento são:

1. Pesquisa e Desenvolvimento: envolvida com o desenvolvimento de novos produtos e novos processos.
2. Engenharia: envolvida com toda a parte relacionada com equipamentos, utilidades e instalações.
3. Produção: responsável pelo processo que necessita ser validado.
4. Controle de Qualidade: responsável pelos testes laboratoriais feitos durante ou ao final do processo.
5. Garantia da Qualidade: responsável pelo cumprimento das Boas Práticas de Fabricação.

De acordo com a RDC nº 17, de 16 de Abril de 2010, validação é uma evidência documentada que atesta com um alto grau de segurança que um processo específico produzirá um produto de forma consistente, que cumpra com as especificações pré-definidas e características de qualidade [107].

Existem quatro tipos de validação: prospectiva, retrospectiva, concorrente e a revalidação [74, 107]. Porém, de acordo com a RDC nº 17, a validação retrospectiva não é mais encorajada e não é aplicável à fabricação de produtos estéreis. [107]. Neste trabalho, foi realizada a validação prospectiva que trata-se de uma validação que demonstra que um processo, ainda

não operante, satisfaz as especificações funcionais e expectativas de desempenho. Este tipo de validação ainda é realizado no estágio de desenvolvimento do produto e possibilita a identificação de pontos críticos antes do processo ser efetivado [74].

O processo de validação é um componente chave das Boas Práticas de Fabricação e da garantia da qualidade. Mas é de fundamental importância que todo o processo de validação seja devidamente documentado. A elaboração de um protocolo de validação (PV) completo e coerente, juntamente com as instruções de trabalho (ITs) ou procedimentos operacionais padrão (POPs) relacionados são fundamentais para a validação de um processo produtivo. Ademais, no protocolo deve ser incluído o descritivo de todo o sistema produtivo e os limites e variações esperados no processo produtivo [109].

De acordo com a RDC nº 17, de 16 de Abril de 2010, o protocolo de validação é um documento que deve descrever as atividades a serem realizadas na validação de um projeto em específico, contendo um cronograma, responsabilidades e os critérios de aceitação [107].

Já os POPs ou ITs são documentos de uso interno necessários à validação de todos os processos, consequentemente, são necessários para o cumprimento das BPF. Estes manuais descrevem com detalhes como executar corretamente um processo na indústria. Os POPs ou ITs devem garantir que o processo seja feito com segurança e qualidade [74].

Os POPs ou ITs de uma indústria devem ser padronizados e conter alguns itens importantes, como o objetivo, responsabilidades, alcance, documentos de referência, distribuição de cópias e o procedimento em si. Além disso, deve estar bem evidenciado a qual departamento ele pertence ou o nome da empresa, o título e código do documento, a data de emissão e histórico de atualizações [74].

A documentação faz parte das BPF, e, portanto, deve fazer parte da validação também. Mas a documentação (protocolos e instruções de trabalho) não é o único requisito importante na validação. A validação é o caminho pelo qual a indústria demonstra e documenta o controle de operação que possui de um determinado processo [109].

Discussões recentes vêm tratando da validação no âmbito radiofarmacêutico. Até pouco tempo atrás, estes fármacos radioativos não eram vistos como medicamentos e pouco era exigido com relação às práticas de produção e regulamentação de radiofármacos [11].

Antes de tratar da validação de radiofármacos PET, é necessário que seja esclarecido o impacto do tempo de meia-vida curto destes radiofármacos no esquema de produção e testes. Por conseguinte, o tempo de meia-vida curto cria um problema crítico de tempo, fazendo com que o processo de produção seja rápido, assim como os testes do controle de qualidade. De acordo com Zigler [11], os impactos secundários derivados do tempo de meia-vida curto são:

1. Não é possível obter uma produção de larga escala a fim de suprir as necessidades do

país em radiofármacos PET, por isso, a produção destes é feita em pequena escala para servir a demanda local.

2. Cada lote do produto rende um número limitado de doses, assim, são requeridos várias produções diárias a fim de suprir a demanda.
3. Cada lote do radiofármaco PET consiste em um único frasco contendo um pequeno volume do produto (geralmente de 5 a 50 mL), muito diferente do que ocorre nas indústrias farmacêuticas tradicionais, onde um grande volume de produto é produzido.
4. Os lotes de radiofármacos PET devem passar por um intenso controle de qualidade. Os testes realizados demandam uma quantidade razoável de produto, reduzindo, assim, a atividade que será comercializada.
5. Não há estoque do produto, todo dia deve haver uma produção completa para cada PET de acordo com a demanda.
6. Instalar e manter uma indústria de radiofármacos PET necessita de um alto investimento, pois equipamentos de produção e de controle de qualidade são fundamentais.

O ambiente de produção de radiofármacos para PET é drasticamente diferente das grandes indústrias farmacêuticas existentes. O desenvolvimento, a produção e a distribuição de radiofármacos PET faz parte de uma pequena indústria, a qual ainda encontra-se relativamente imatura em se tratando da maioria dos padrões normativos [11].

Atualmente, muito se fala na validação de processos, de metodologias analíticas, de sistemas computadorizados, entre outras, de fármacos tradicionais. Não obstante, ainda há uma certa confusão em se tratando de radiofármacos PET. Guias e regulamentações são, normalmente, vagos ou até mesmo não contém recomendações específicas relacionadas aos radiofármacos para uso em PET.

O desenvolvimento, a validação, a qualificação e a adequação de um sistema fazem parte da hierarquia da garantia da qualidade. O desenvolvimento e a validação são realizados apenas uma única vez, dando procedência e definindo a qualificação (tanto de equipamentos quanto de operadores) e, por último, a adequação do sistema, a qual é feita rotineiramente (FIG. 9.1) [11].

É importante ressaltar que a validação só é feita uma única vez, caso não haja alteração no processo ou na metodologia. Ou seja, se o processo ou a metodologia sofrer alguma alteração que possa comprometer o produto final, é necessário que o processo todo seja revalidado [11].

A fim de realizar a validação de um processo, algumas etapas devem ser estabelecidas. A primeira coisa que deve ser feita é determinar o objetivo do processo. Isto definido, segue os seguintes passos para iniciar o processo de validação [110, 109]:

FIGURA 9.1 Hierarquia da garantia da qualidade e a relação entre adequação do sistema, qualificação, validação e desenvolvimento (Adaptado de [11]).

1. Formar uma equipe multiprofissional com suas devidas responsabilidades durante a validação de um dado processo.
2. Definir o escopo do processo.
3. Elaborar o protocolo de validação.
4. Definir os critérios de aceitação, determinar os pontos críticos do processo e definir as metodologias que serão utilizadas no controle de qualidade do produto.
5. Realizar experimentos pré-validação.
6. Se preciso, ajustar parâmetros ou critérios de aceitação.
7. Aprovação do protocolo de validação.
8. Executar o protocolo de validação e avaliar os resultados obtidos.
9. Elaborar o relatório de validação, que deve ser revisado e aprovado.
10. Arquivar o protocolo de validação aprovado e o relatório.

A execução do protocolo deve seguir os procedimentos operacionais padrão, ou as instruções de trabalho (ITs), que descreveu passo a passo as etapas do trabalho. Por isso, antes de realizar a validação do processo de produção do FLT-¹⁸F, todas as instruções de trabalho pertinentes à produção do radiofármaco e seu controle de qualidade devem ser elaboradas e inseridas no sistema de documentação da empresa. Além disso, toda a equipe envolvida na produção e controle de qualidade do radiofármaco deve ser treinada. Todos esses procedimentos que contribuirão para a validação de processo do radiofármaco FLT-¹⁸F serão relatados a seguir.

9.3 MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS

9.3.1 INFRAESTRUTURA

Esta etapa do trabalho, referente ao desenvolvimento dos estudos prévios relacionados à validação de processo produtivo do radiofármaco estudado, foi realizada nos laboratórios de produção de radiofármacos, controle de qualidade e pesquisa e desenvolvimento nas Instalações dos Aceleradores Cíclotrons e da Radiofarmácia do IPEN.

9.3.2 MATERIAIS

Para elaboração de procedimentos operacionais, instruções de trabalho, protocolo de validação do processo produtivo e relatório de desenvolvimento do novo produto, utilizou-se a formatação e normas para elaboração de documentos do Sistema de Qualidade da Radiofarmácia do IPEN.

9.3.3 MÉTODOS E RESULTADOS

9.3.3.1 RELATÓRIO DE DESENVOLVIMENTO DE NOVO RADIOFÁRMACO

Foi elaborado o “Relatório de Desenvolvimento de Novo Radiofármaco” para o FLT- ^{18}F de acordo com o procedimento operacional do Sistema de Qualidade da Radiofarmácia do IPEN intitulado de “Desenvolvimento de Novos Radiofármacos: Transferência de Tecnologia da Função Pesquisa e Desenvolvimento para a Função Produtos na DIRF”. Este procedimento de operação foi implantado recentemente no Instituto. O objetivo do mesmo é estabelecer as diretrizes da transferência de tecnologia da função Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação para a função Produtos e/ou outras partes interessadas na comercialização do radiofármaco em questão.

O radiofármaco FLT- ^{18}F é um produto novo na Radiofarmácia do IPEN, por isso, fez-se necessário a elaboração deste relatório. Neste relatório estão descritas todas as etapas da produção do FLT- ^{18}F no módulo automatizado, devidamente detalhadas, o sistema de fracionamento e todas as metodologias analíticas aplicadas, juntamente com resultados esperados e critérios de aceitação. Além destas informações, é importante a elaboração dos procedimentos operacionais e instruções de trabalho relacionados à produção e controle de qualidade do FLT- ^{18}F , também foram discriminados as matérias-primas e respectivas especificações de qualidade, material de envase e acondicionamento, resultados de estudos de estabilidade, dos estudos de citotoxicidade e biodistribuição entre outros.

9.3.3.2 PROCEDIMENTO OPERACIONAL E INSTRUÇÕES DE TRABALHO

Elaborou-se o procedimento de operação da produção de FLT-¹⁸F que descreveu na forma de fluxograma todas as etapas envolvidas na produção de FLT-¹⁸F. Além do procedimento, as instruções de trabalho (ITs) referentes à produção e fracionamento do FLT-¹⁸F também foram elaboradas (denominadas de “FLT-FLÚOR-18: preparação do módulo de marcação” e “FLT-Flúor-18: síntese e fracionamento”), detalhando cada etapa do processo produtivo. O formulário referente à produção deste radiofármaco também foi elaborado, por enquanto, levando em conta apenas a sua produção no módulo de marcação da GE (TRACERlab). Neste formulário, todas as etapas de produção e controles de processo serão registrados para cada lote produzido.

Quanto ao controle de qualidade do radiofármaco, seus detalhes foram inseridos nas ITs referentes às metodologias do Controle de Qualidade. As ITs do controle de qualidade que receberam a inclusão de dados referentes ao FLT-¹⁸F foram as ITs de Controle físico-químico: determinação das características organolépticas, de determinação de pH e de Controle radioquímico de radioisótopos primários e moléculas marcadas.

9.3.3.3 PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO DE PROCESSO DO FLT-¹⁸F

Uma validação de processo efetiva contribui significativamente para a garantia da qualidade de um fármaco e, para que seja realizadas, é preciso que o protocolo de validação seja elaborado. A elaboração do protocolo de validação para o radiofármaco FLT-¹⁸F seguiu normas internas da Radiofarmácia do IPEN como o Procedimento Gerencial (PG), intitulado “Plano Mestre de Validação da DIRF - PMV: Política e Diretrizes de Validação”, e o procedimento operacional (PO), “Procedimento de Validação de Processo”, além de referências externas como as resoluções da ANVISA competentes, guias nacionais e internacionais e demais literatura consultada [109, 107, 108, 68, 16].

O primeiro passo no desenvolvimento do protocolo de validação de processo é estabelecer o objetivo do protocolo de validação. No protocolo de validação do processo de FLT-¹⁸F, o objetivo foi demonstrar, através de testes e evidências documentadas, que o processo utilizado na produção do produto FLT-¹⁸F é considerado reprodutível, consistente e está de acordo com as especificações e com todos os atributos de qualidade pré-determinados pela Radiofarmácia do IPEN.

No protocolo elaborado para a fluortimidina radiomarcada com flúor-18 foram incluídos dados de toda a produção de FLT-¹⁸F, incluindo um fluxograma do processo. O protocolo limitou-se a validação de processo abrangendo 8 etapas críticas da produção de FLT-¹⁸F, apresentadas na FIG. 9.2, tomando-se como base o resultado de uma análise de risco.

No protocolo de validação também foram inseridos os pontos críticos do processo, plano

FIGURA 9.2 Escopo das etapas críticas do processo da produção de FLT-¹⁸F para a validação de processo.

de amostragem (FIG. 9.3), monitoramento ambiental, ITs e POs relacionadas, ensaios do controle de qualidade e seus limites, equipamentos utilizados, matérias-primas, além de sete apêndices apresentados na TAB. 9.1:

FIGURA 9.3 Fluxograma do plano de amostragem relacionado aos pontos críticos do processo de produção do radiofármaco FLT-¹⁸F.

TABELA 9.1 Apêndices do protocolo de validação de processo da produção de FLT- ^{18}F .

Apêndice	Título	Especificação
1	Verificação dos equipamentos e utilidades relacionadas	Abrange os equipamentos e sistemas utilizados no processo, incluindo manutenções preventivas dos mesmos, documento de qualificação e calibração.
2	Verificação dos procedimentos/ Instruções de trabalho	Os procedimentos operacionais e as instruções de trabalho do processo de produção devem estar em conformidade e são checados neste apêndice.
3	Cronologia da produção	Datas de início e término de cada lote de validação e os colaboradores envolvidos.
4	Obtenção do Flúor ($^{18}\text{F}^-$)	Refere-se a todos os parâmetros envolvidos na obtenção do Flúor (^{18}F) nos cíclotrons.
5	Síntese do FLT- ^{18}F	Relaciona todos os parâmetros envolvidos na síntese do FLT- ^{18}F no módulo automatizado, incluindo os materiais e reagentes utilizados.
6	Fracionamento do FLT- ^{18}F	Agrega os parâmetros relacionados ao fracionamento do produto, juntamente com o monitoramento ambiental e a embalagem primária utilizada.
7	Liberação do controle de qualidade	Inclui os resultados dos testes do controle de qualidade e suas devidas especificações, mostrando conformidade ou não.

Os limites definidos para os ensaios do controle de qualidade foram baseados na literatura pesquisada [16, 6], assim como os resultados obtidos no capítulo 6 deste trabalho. As especificações inseridas no PV são apresentadas na TAB. 9.2.

TABELA 9.2 Especificações dos ensaios do controle de qualidade do FLT-¹⁸F para a realização da validação de processo.

Ensaio	Especificação
Características organolépticas	Líquido límpido e incolor
pH	4,5 - 8,5
Solventes residuais	Acetonitrila $\leq$ 410 ppm
	Etanol $\leq$ 100000 ppm
Identidade radionuclídica	$T_{1/2} = 105 - 115$ minutos
Pureza Radioquímica	≥ 95 %
Teste de esterilidade	Conforme
Endotoxina bacteriana (Pirôgeno)	< 175 EU/10 mL

9.3.3.4 TESTE DO PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO DE PROCESSO DO FLT-¹⁸F

Após o protocolo devidamente elaborado, foram realizados testes para verificar a robustez do protocolo de validação de processo do FLT-¹⁸F. Foram feitos três lotes de produção, o qual passaram por todas as análises contidas no PV. Os apêndices contidos no protocolo de validação foram preenchidos para cada produção com todos os dados necessários.

Todos os documentos referentes aos equipamentos utilizados durante a produção do FLT-¹⁸F estavam em conformidade. As ITs e PO referentes à síntese do radiofármaco foram elaboradas. O sistema do ciclotron, sistemas de ar comprimido, sistema de geração de vácuo, a pureza do hidrogênio, sistema de distribuição do hélio, a água enriquecida e o equipamento ciclotron apresentaram resultados dentro da conformidade em todas as três produções realizadas.

Com relação aos materiais e reagentes utilizados nas três sínteses do FLT-¹⁸F o lote e a validade foram anotadas no seu devido apêndice. O precursor utilizado nas sínteses dos três lotes estudados estava com a validade vencida. Entretanto, foi feita análise do mesmo por cromatografia líquida de alta eficiência para avaliar sua finalidade e estender o prazo de validade. A metodologia utilizada foi a mesma descrita no capítulo 6, porém foi apenas estendido o tempo de corrida para 30 minutos, com uma concentração de água e acetonitrila de 5:95 (v/v) durante os 10 últimos minutos [6]. O resultado apresentou um precursor íntegro e sem alterações quando comparado ao precursor dentro do prazo de validade (FIG. 9.4).

FIGURA 9.4 Cromatograma de CLAE (UV) do precursor utilizado para a síntese do FLT- ^{18}F utilizando-se coluna C_{18} e como fase móvel um gradiente de acetonitrila e água, com um fluxo de 1 mL/min. Em (A) o precursor apresentava-se dentro do prazo da validade, já em (B) o precursor com prazo de validade vencido [6].

Isto mostra que, mesmo o precursor não estando dentro do prazo de validade estipulado pelo fabricante, o mesmo permaneceu estável e produziu bons resultados, sem alteração também no cromatograma do produto final. Este resultado pode ser visto no radiocromatograma da FIG. 9.5. Também não houve alteração no rendimento da síntese quando se utilizou o precursor vencido.

FIGURA 9.5 Radiocromatograma de CLAE do produto FLT-¹⁸F utilizando coluna C₁₈ de fase reversa, fase móvel em gradiente de acetonitrila e água, com fluxo de 1 mL/min [6].

Quanto ao controle de qualidade do radiofármaco produzido, as análises foram feitas nos laboratórios de Controle de Qualidade pela sua própria equipe e também nos laboratórios de pesquisa e desenvolvimento da Radiofarmácia do IPEN. Todas as análises apresentaram resultados de acordo com as especificações. Os resultados encontrados para os três lotes do teste podem ser vistos na TAB. 9.3. O produto atingiu a qualidade esperada dentro das normas a serem seguidas [16, 6], assim como encontrado no capítulo 6.

Desta maneira, o protocolo de validação de processo produtivo do FLT-¹⁸F mostrou-se robusto e adequado para validar o processo produtivo. Com isso, é possível que o mesmo seja utilizado adequadamente em uma futura validação.

TABELA 9.3 Resultado dos ensaios do controle de qualidade para os três lotes da validação de processo.

Ensaio	Especificação	Resultados*		
		Lote 1	Lote 2	Lote 3
Características organolépticas	Líquido límpido e incolor	C	C	C
pH	4,5 - 8,5	6,0	6,0	6,0
Solventes residuais	Acetonitrila $\leq$ 410 ppm	0	0	0
	Etanol $\leq$ 100000 ppm	55574,7	54011,4	21861,2
Identidade radionuclídica	$T_{1/2} = 105 - 115$ minutos	106,6	113,5	106,6
Pureza Radioquímica	≥ 95 %	> 98 %	> 98 %	> 98 %
Teste de esterilidade	Conforme	C	C	C
Endotoxina (Pirogênio)	bacteriana < 175 EU/10 mL	C	C	C

* C = Conforme / NC = Não Conforme

9.4 CONCLUSÕES

As conclusões relacionadas à esta etapa do trabalho foram:

- a elaboração do relatório de desenvolvimento de novo radiofármaco possibilitou fornecer informações importantes para elaboração de procedimentos operacionais e instruções de trabalho da produção e controle de qualidade do FLT- ^{18}F ;
- o protocolo de validação do FLT- ^{18}F foi elaborado e testado, tendo se mostrado robusto para avaliação dos pontos críticos do processo de produção do FLT- ^{18}F e análise do produto acabado.

10

CONCLUSÕES

10.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O radiofármaco FLT- ^{18}F foi sintetizado através da reação de substituição nucleofílica $\text{S}_{\text{N}}2$ no módulo automatizado. Os rendimentos obtidos nas sínteses mostraram-se de acordo com a literatura. O produto final teve uma alta pureza radioquímica, não foram encontrados resíduos de acetonitrila, e a quantidade de etanol presente estava de acordo com os limites estipulados em literatura, assim como o pH. As metodologias analíticas utilizadas para as análises do produto final foram consistentes e puderam satisfazer as necessidades para o controle de qualidade do radiofármaco FLT- ^{18}F .

Com relação aos estudos *in vitro*, o FLT- ^{18}F apresentou maior internalização nas células U-87 MG após 120 minutos de incubação e mesmo não havendo receptor específico na membrana celular, foi possível verificar essa ligação do radiofármaco à membrana da célula. O FLT não radiomarcado não foi considerado citotóxico em nenhuma das concentrações estudadas, entretanto, o FLT- ^{18}F em sua menor atividade estudada mostrou-se redutor da viabilidade celular, resultado este que deve ser analisado com cautela, já que há vários fatores envolvidos.

Já nos estudos *in vivo*, a biodistribuição em animais sadios evidenciou a excreção renal do radiofármaco estudado, bem como o rápido clareamento sanguíneo e a captação em órgãos com alta taxa de divisão celular. No estudo de biodistribuição em animais com modelos

tumorais observou-se uma expressiva razão tumor:sangue, confirmando a especificidade do radiofármaco pelas células tumorais. Nas imagens PET/CT os resultados encontraram-se dentro do esperado, foi possível observar o tumor e uma intensa captação na bexiga e na porção terminal do intestino, devido à excreção renal e alta divisão celular, respectivamente.

No estudo relacionado à garantia da qualidade, foram elaborados o relatório de desenvolvimento de novo radiofármaco e o protocolo de validação de processo que mostrou-se adequado para a produção do radiofármaco FLT- ^{18}F .

10.2 SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS

As sugestões para pesquisas futuras envolvendo o radiofármaco FLT- ^{18}F são:

- estudar o efeito da variação da concentração do precursor no rendimento radioquímico da síntese;
- estudar o comportamento da produção do radiofármaco com altas atividades de fluoreto- ^{18}F e encontrar o limite de atividade para a sua produção;
- realizar estudos toxicológicos em animais;
- realizar estudos clínicos.

ANEXO A - AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Parecer - Projeto Nº 86/11 - CEUA-IPEN/SP

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa **"ESTUDO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DO RADIOFÁRMACO FLT-18F EM SISTEMA AUTOMATIZADO: VALIDAÇÃO DE PROCESSO E METODOLOGIA ANALÍTICA"** de responsabilidade da pesquisadora **DR^a ELAINE BORTOLETI DE ARAUJO** foi considerado **APROVADO**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados, a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou finais, dependendo da duração do projeto) referentes ao andamento da pesquisa. Após o término da pesquisa, uma cópia do trabalho deve ser encaminhada a este CEUA .

São Paulo, 15 de junho de 2011

Prof. Dra. Nanci do Nascimento
Coordenadora do CEUA-IPEN

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] PIERCE, B. **Genética: Um enfoque conceitual**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004. [xix](#), [8](#), [11](#), [12](#)
- [2] TRACERlab FX_{F-N}. GE. <http://www.gehealthcare.com>. acesso em Abril, 2013. [xix](#), [25](#)
- [3] GPD modules. SCINTOMICS. <http://www.scintomics.com/>. acesso em Abril, 2013. [xix](#), [25](#)
- [4] Synthera[®]: Small dimensions. Huge potential. IBA. <http://www.iba-radiopharmasolutions.com/products-cyclo/synthera>. acesso em Abril, 2013. [xix](#), [24](#), [25](#)
- [5] ELIXYS module. Sofie Biosciences. <http://www.itbriefing.net/index.php>. acesso em Abril, 2013. [xix](#), [24](#), [25](#)
- [6] European Pharmacopoeia Commission. *Draft monograph n° 2460: 3-Fluoro-3-deoxythymidine (18F)*. European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare, Strasbourg, 2011. [xx](#), [xxii](#), [37](#), [42](#), [46](#), [48](#), [50](#), [51](#), [52](#), [55](#), [58](#), [63](#), [65](#), [66](#), [111](#), [112](#), [113](#), [114](#)
- [7] TENG, B.; WANG, S.; FU, Z.; DANG, Y.; WU, Z.; LIU, L. Semiautomatic synthesis of 3'-deoxy-3'-[¹⁸F] fluorothymidine using three precursors. *Applied radiation and isotopes*, v. 64, n. 2, p. 187–193, 2006. [xx](#), [1](#), [37](#), [39](#), [40](#), [41](#), [51](#), [52](#), [57](#), [59](#)
- [8] OH, S.; MOSDZIANOWSKI, C.; CHI, D.; KIM, J.; KANG, S.; RYU, J.; YEO, J.; MOON, D. Fully automated synthesis system of 3'-deoxy-3'-[¹⁸F] fluorothymidine. *Nuclear medicine and biology*, v. 31, n. 6, p. 803–809, 2004. [xx](#), [2](#), [24](#), [32](#), [37](#), [39](#), [41](#), [51](#), [52](#), [57](#), [59](#)
- [9] LEE, S.; OH, S.; CHI, D.; KIL, H.; KIM, E.; RYU, J.; MOON, D. Simple and highly efficient synthesis of 3'-deoxy-3'-[¹⁸F] fluorothymidine using nucleophilic fluorination catalyzed by protic solvent. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, v. 34, n. 9, p. 1406–1409, 2007. [xx](#), [32](#), [39](#), [51](#), [52](#), [57](#), [59](#)

- [10] BEEN, L.; SUURMEIJER, A.; COBBEN, D.; JAGER, P.; HOEKSTRA, H.; ELSINGA, P. [^{18}F] FLT-PET in oncology: current status and opportunities. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, v. 31, n. 12, p. 1659–1672, 2004. [xx](#), [2](#), [71](#), [73](#), [74](#)
- [11] ZIGLER, S. Instrumentation and radiopharmaceutical validation. *The quarterly journal of nuclear medicine and molecular imaging*, v. 53, n. 4, p. 402–410, 2009. [xxi](#), [104](#), [105](#), [106](#)
- [12] KOWALSKY, R. J.; FALEN, S. W. **Radiation detection and measurement.** In: LANDIS, N. T. (Ed.) *Radiopharmaceuticals in nuclear pharmacy and nuclear medicine*. Universidade de Michigan: American Pharmacists Association, 2004. p. 39–70. [xxiii](#), [8](#), [9](#), [10](#)
- [13] PASCALI, C.; BOGNI, A.; FUGAZZA, L.; CUCCHI, C.; CRISPU, O.; LAERA, L.; IWATA, R.; MAIOCCHI, G.; CRIPPA, F.; BOMBARDIERI, E. Simple preparation and purification of ethanol-free solutions of 3'-deoxy-3'-[^{18}F] fluorothymidine by means of disposable solid-phase extraction cartridges. *Nuclear medicine and biology*, 2011. [1](#), [40](#)
- [14] TANG, G.; TANG, X.; WEN, F.; WANG, M.; LI, B. A facile and rapid automated synthesis of 3'-deoxy-3'-[^{18}F] fluorothymidine. *Applied Radiation and Isotopes*, v. 68, n. 9, p. 1734–1739, 2010. [1](#), [24](#), [31](#), [37](#), [39](#), [41](#)
- [15] DEJESUS, O.; MARTIN, J.; YASILLO, N.; GATLEY, S.; COOPER, M. [^{18}F] fluoride from a small cyclotron for the routine synthesis of [^{18}F] 2-fluoro-2-deoxy-d-glucose. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part A. Applied Radiation and Isotopes*, v. 37, n. 5, p. 397–401, 1986. [1](#)
- [16] OF REVISION, U. S. P. C. C. *United States Pharmacopeia, The National Formulary 2012: USP 35 NF 30*. United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, 2012. [1](#), [38](#), [46](#), [48](#), [50](#), [52](#), [63](#), [64](#), [102](#), [108](#), [111](#), [114](#)
- [17] LEE, T.; AHN, S.; MOON, B.; CHUN, K.; KANG, J.; CHEON, G.; CHOI, C.; LIM, S. Comparison of ^{18}F -FDG, ^{18}F -FET and ^{18}F -FLT for differentiation between tumor and inflammation in rats. *Nuclear medicine and biology*, v. 36, n. 6, p. 681–686, 2009. [1](#), [83](#), [91](#), [96](#)
- [18] RICE, S.; RONEY, C.; DAUMAR, P.; LEWIS, J. The next generation of positron emission tomography radiopharmaceuticals in oncology. In: *Seminars in Nuclear Medicine*. 2011. v. 41, p. 265–282. [2](#)
- [19] KUBOTA, K.; ISHIWATA, K.; KUBOTA, R.; YAMADA, S.; TADA, M.; SATO, T.; IDO, T. et al. Tracer feasibility for monitoring tumor radiotherapy: a quadruple

- tracer study with fluorine-18-fluorodeoxyglucose or fluorine-18-fluorodeoxyuridine, L-[methyl- ^{14}C] methionine, [6-3H] thymidine, and gallium-67. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*, v. 32, n. 11, p. 2118, 1991. 2
- [20] BOOTHMAN, D.; DAVIS, T.; SAHIJDAK, W. Enhanced expression of thymidine kinase in human cells following ionizing radiation. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, v. 30, n. 2, p. 391–398, 1994. 2, 70, 71
- [21] BRASIL. *Regulamento técnico das Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos*. Agência de Vigilância Sanitária, 2010. 3
- [22] ARAÚJO, E.; LAVINAS, T.; COLTURATO, M.; MENGATTI, J. Garantia da qualidade aplicada à produção de radiofármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 44, n. 1, p. 1–12, 2008. 3
- [23] WHO. Cancer. <http://www.who.int/topics/cancer/en/>. acesso em Fevereiro, 2013. 7
- [24] INCA. Incidência de câncer no Brasil. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/tabelaestados.asp?UF=BR>. acesso em Fevereiro, 2013. 7
- [25] THEOBALD, T. *Sampson's Textbook of Radiopharmacy*. 4. ed. London: PHARMACEUTICAL Press, 2011. 8, 9
- [26] DECRISTOFORO, C. The radiopharmacy. Viena: European Association of Nuclear Medicine. 2012. 8, 9
- [27] WERNICK, M. N.; AARSVOLD, J. N. *Emission tomography: the fundamentals of PET and SPECT*. Academic Press, 2004. 9, 10
- [28] LIN, E.; ALAVI, A. *PET And PET/CT: A Clinical Guide*. Thieme Medical Pub, 2005. 10
- [29] SHIELDS, A. F. PET imaging of tumor growth: Not as easy as it looks. *Clinical Cancer Research*, v. 18, n. 5, p. 1189–1191, 2012. 10
- [30] GROSU, A.-L.; WEBER, W. A. PET for radiation treatment planning of brain tumours. *Radiotherapy and Oncology*, v. 96, n. 3, p. 325, 2010. 11
- [31] SINGHAL, T.; NARAYANAN, T. K.; JAIN, V.; MUKHERJEE, J.; MANTIL, J. ^{11}C -l-methionine positron emission tomography in the clinical management of cerebral gliomas. *Molecular Imaging and Biology*, v. 10, n. 1, p. 1–18, 2008. 11

- [32] LANGEN, K.-J.; HAMACHER, K.; WECKESSER, M.; FLOETH, F.; STOFFELS, G.; BAUER, D.; COENEN, H. H.; PAULEIT, D. O-(2-[¹⁸F] fluoroethyl)-l-tyrosine: uptake mechanisms and clinical applications. *Nuclear medicine and biology*, v. 33, n. 3, p. 287–294, 2006. [11](#)
- [33] VOET, D.; VOET, J. G. *Bioquímica*. 3. ed. Porto Alegre: Media Panamericana, 2006. [12](#), [13](#)
- [34] MUNCH-PETERSEN, B.; CLOOS, L.; JENSEN, H.; TYRSTED, G. Human thymidine kinase 1. regulation in normal and malignant cells. *Advances in enzyme regulation*, v. 35, p. 69–89, 1995. [13](#), [71](#)
- [35] DE ROBERTIS, E.; HIB, J.; PONZIO, R. *De Robertis, biologia celular e molecular*. 14. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. [13](#)
- [36] SHIELDS, A. F. PET imaging with ¹⁸F-FLT and thymidine analogs: promise and pitfalls. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 44, n. 9, p. 1432–1434, 2003. [14](#)
- [37] RANG, H.; DALE, M.; RITTER, J.; MOORE, P. *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. v. 5. [14](#), [82](#), [83](#), [90](#)
- [38] FLEXNER, C.; VAN DER HORST, C.; JACOBSON, M.; POWDERLY, W.; DUNCANSON, F.; GANES, D.; BARDITCH-CROVO, P.; PETTY, B.; BARON, P.; ARMSTRONG, D. et al. Relationship between plasma concentrations of 3'-deoxy-3'-fluorothymidine (alovudine) and antiretroviral activity in two concentration-controlled trials. *Journal of Infectious Diseases*, v. 170, n. 6, p. 1394–1403, 1994. [14](#), [74](#), [79](#), [83](#)
- [39] SHIELDS, A. F.; GRIERSON, J. R.; DOHMEN, B. M.; MACHULLA, H.-J.; STAYANOFF, J. C.; LAWHORN-CREWS, J. M.; OBRADOVICH, J. E.; MUZIK, O.; MANGNER, T. J. Imaging proliferation in vivo with [¹⁸F]FLT and positron emission tomography. *Nature medicine*, v. 4, n. 11, p. 1334–1336, 1998. [14](#)
- [40] SHIELDS, A. F.; BRISTON, D. A.; CHANDUPATLA, S.; DOUGLAS, K. A.; LAWHORN-CREWS, J.; COLLINS, J. M.; MANGNER, T. J.; HEILBRUN, L. K.; MUZIK, O. A simplified analysis of [¹⁸F] 3'-deoxy-3'-fluorothymidine metabolism and retention. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, v. 32, n. 11, p. 1269–1275, 2005. [14](#), [15](#)
- [41] SOLOMONS, T.; FRYHLE, C. *Química orgânica 1*. Rio de Janeiro: LTC, 2006. [15](#), [16](#), [27](#), [28](#), [29](#), [39](#)
- [42] CAREY, F. *Química Orgânica - Vol. 1*. 7. ed. São Paulo: McGraw Hill Brasil, 2008. [15](#), [16](#)

- [43] HERRMANN, K.; BUCK, A. K.; SCHUSTER, T.; RUDELIUS, M.; WESTER, H.-J.; GRAF, N.; SCHEUERER, C.; PESCHEL, C.; SCHWAIGER, M.; DECHOW, T. et al. A pilot study to evaluate 3'-deoxy-3'-18F-fluorothymidine PET for initial and early response imaging in mantle cell lymphoma. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 52, n. 12, p. 1898–1902, 2011. [16](#)
- [44] ENSLOW, M. S.; ZOLLINGER, L. V.; MORTON, K. A.; KADRMAS, D. J.; BUTTERFIELD, R. I.; CHRISTIAN, P. E.; BOUCHER, K. M.; HEILBRUN, M. E.; JENSEN, R. L.; HOFFMAN, J. M. Comparison of F-18 fluorodeoxyglucose and F-18 fluorothymidine positron emission tomography in differentiating radiation necrosis from recurrent glioma. *Clinical nuclear medicine*, v. 37, n. 9, p. 854, 2012. [16](#)
- [45] CONTRACTOR, K. B.; KENNY, L. M.; STEBBING, J.; ROSSO, L.; AHMAD, R.; JACOB, J.; CHALLAPALLI, A.; TURKHEIMER, F.; AL-NAHHAS, A.; SHARMA, R. et al. [18F]-3' deoxy-3'-fluorothymidine positron emission tomography and breast cancer response to docetaxel. *Clinical Cancer Research*, v. 17, n. 24, p. 7664–7672, 2011. [16](#), [74](#)
- [46] KISHINO, T.; HOSHIKAWA, H.; NISHIYAMA, Y.; YAMAMOTO, Y.; MORI, N. Usefulness of 3'-deoxy-3'-18f-fluorothymidine pet for predicting early response to chemoradiotherapy in head and neck cancer. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 53, n. 10, 2012. [16](#), [74](#)
- [47] TROOST, E. G.; BUSSINK, J.; HOFFMANN, A. L.; BOERMAN, O. C.; OYEN, W. J.; KAANDERS, J. H. 18F-FLT PET/CT for early response monitoring and dose escalation in oropharyngeal tumors. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 51, n. 6, p. 866–874, 2010. [16](#), [74](#)
- [48] DE SAINT-HUBERT, M.; BREPOELS, L.; MOTTAGHY, F. M. Can evaluation of targeted therapy in oncology be improved by means of ¹⁸F-FLT? *Journal of Nuclear Medicine*, v. 51, n. 10, p. 1499–1500, 2010. [16](#), [17](#)
- [49] ZHAO, S.; KUGE, Y.; KOHANAWA, M.; TAKAHASHI, T.; ZHAO, Y.; YI, M.; KANEGAE, K.; SEKI, K.-I.; TAMAKI, N. Usefulness of ¹¹C-methionine for differentiating tumors from granulomas in experimental rat models: a comparison with ¹⁸F-FDG and ¹⁸F-FLT. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 49, n. 1, p. 135–141, 2008. [16](#)
- [50] TROOST, E. G.; VOGEL, W. V.; MERKX, M. A.; SLOOTWEG, P. J.; MARRES, H. A.; PEETERS, W. J.; BUSSINK, J.; VAN DER KOGEL, A. J.; OYEN, W. J.; KAANDERS, J. H. ¹⁸F-FLT PET does not discriminate between reactive and metastatic lymph nodes in primary head and neck cancer patients. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 48, n. 5, p. 726–735, 2007. [16](#)

- [51] BUCK, A. K.; BOMMER, M.; JUWEID, M. E.; GLATTING, G.; STILGENBAUER, S.; MOTTAGHY, F. M.; SCHULZ, M.; KULL, T.; BUNJES, D.; MÖLLER, P. et al. First demonstration of leukemia imaging with the proliferation marker ^{18}F -fluorodeoxythymidine. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 49, n. 11, p. 1756–1762, 2008. [17](#), [74](#)
- [52] SEITZ, U.; WAGNER, M.; NEUMAIER, B.; WAWRA, E.; GLATTING, G.; LEDER, G.; SCHMID, R. M.; RESKE, S. N. Evaluation of pyrimidine metabolising enzymes and in vitro uptake of $3'$ -[^{18}F] fluoro- $3'$ -deoxythymidine ([^{18}F] flt) in pancreatic cancer cell lines. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, v. 29, n. 9, p. 1174–1181, 2002. [17](#)
- [53] LEE, T.; SHIM, A.; HWANG, W.; AHN, S.; SUNG, H.; CHUNG, H. Comparison of FDG, FET and FLT for differentiation between tumor and abscess in rats. In: . New Orleans: **SNM 50th Annual Meeting**, c2003. [17](#)
- [54] BARTHEL, H.; CLEIJ, M.; COLLINGRIDGE, D.; HUTCHINSON, O.; OSMAN, S.; HE, Q.; LUTHRA, S.; BRADY, F.; PRICE, P.; ABOAGYE, E. $3'$ -deoxy- $3'$ -[^{18}F] fluorothymidine as a new marker for monitoring tumor response to antiproliferative therapy in vivo with positron emission tomography. *Cancer research*, v. 63, n. 13, p. 3791–3798, 2003. [17](#), [87](#), [91](#)
- [55] BUCK, A. K.; HALTER, G.; SCHIRRMESTER, H.; KOTZERKE, J.; WURZIGER, I.; GLATTING, G.; MATTFELDT, T.; NEUMAIER, B.; RESKE, S. N.; HETZEL, M. Imaging proliferation in lung tumors with PET: ^{18}F -FLT versus ^{18}F -FDG. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 44, n. 9, p. 1426–1431, 2003. [17](#)
- [56] LIU, C.-J.; WANG, J.; KUO, W.-H.; YEN, R.-F. High ^{18}F -fluorothymidine uptake for invasive thymoma. *Clinical Nuclear Medicine*, v. 37, n. 10, p. 991–992, 2012. [17](#)
- [57] XU, B.; GUAN, Z.; LIU, C.; WANG, R.; YIN, D.; ZHANG, J.; CHEN, Y.; YAO, S.; SHAO, M.; WANG, H. et al. Can multimodality imaging using ^{18}F -FDG/ ^{18}F -FLT PET/CT benefit the diagnosis and management of patients with pulmonary lesions? *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, v. 38, n. 2, p. 285–292, 2011. [18](#)
- [58] MACHULLA, H.; BLOCHER, A.; KUNTZSCH, M.; PIERT, M.; WEI, R.; GRIERSON, J. Simplified labeling approach for synthesizing $3'$ -deoxy- $3'$ -[^{18}F] fluorothymidine ([^{18}F]FLT). *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, volume=243, number=3, pages=843–846, year=2000, publisher=Springer. [23](#)

- [59] GRIERSON, J.; SHIELDS, A. Radiosynthesis of 3'-deoxy-3'-[^{18}F] fluorothymidine:[^{18}F] flt for imaging of cellular proliferation *in vivo*. ***Nuclear medicine and biology***, v. 27, n. 2, p. 143–156, 2000. 23, 40, 60
- [60] LI, J.; LI, X. F.; ZHENG, H.; HUANG, T.; NG, C. Synthesis of [18F]-fluoro-3'-deoxy-3'-L-fluorothymidine (FLT) in a fully automated modular system. ***Journal of Nuclear Medicine***, v. 52, n. 1, p. 1427, 2011. 24, 39, 40
- [61] All in One. Trasis. <http://www.trasis.com/>. acesso em Abril, 2013. 24
- [62] KENG, P. Y.; ESTERBY, M.; VAN DAM, R. M. Emerging technologies for decentralized production of PET tracers. ***Positron Emission Tomography—Current Clinical and Research Aspects***, p. 153–182, 2012. 24
- [63] LAZARI, M.; COLLINS, J.; CLAGGETT, S.; QUINN, K.; KENG, P. Y.; PHELPS, M.; SATYAMURTHY, N.; ESTERBY, M.; VAN DAM, R. M. Diverse nucleophilic syntheses on the ELIXYS multi-pot, cassette-based radiosynthesizer. ***Journal of Nuclear Medicine***, v. 53, p. 1484, 2012. 24
- [64] BIRSACK, H.; FREEMAN, L. **Radiochemistry and Radiopharmacy**. In: GUHLKE, S.; VERBRUGGEN, A. M.; S, V. (Eds.) *Clinical Nuclear Medicine*. London: Springer, 2007. p. 34–. 25, 26
- [65] GILLINGS, N. Radiotracers for positron emission tomography imaging. ***Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine***, v. 26, n. 1, p. 149–158, 2013. 26
- [66] SCHIRRMACHER, R.; WANGLER, C.; SCHIRRMACHER, E. Fluorine-18 radiochemistry: theory and practice. In: ***Pharmaceutical Radiochemistry***. Scintomics, 2011. v. 1 of *Munich molecular imaging handbook series*. 31
- [67] IUPAC. ***Compendium of Chemical Terminology***. 2. ed. 1997. v. 66. 31
- [68] FDA. *Guidance: PET Drugs — Current Good Manufacturing Practice (CGMP)*. U. S. Food and Drug Administration, Silver Spring, MD, 2009. 32, 33, 102, 108
- [69] MARTIN, S.; EISENBARTH, J.; WAGNER-UTERMANN, U.; MIER, W.; HENZE, M.; PRITZKOW, H.; HABERKORN, U.; EISENHUT, M. A new precursor for the radiosynthesis of [^{18}F]FLT. ***Nuclear medicine and biology***, v. 29, n. 2, p. 263–273, 2002. 39
- [70] PERUMAL, M.; PILLAI, R.; BARTHEL, H.; LEYTON, J.; LATIGO, J.; FORSTER, M.; MITCHELL, F.; JACKMAN, A.; ABOAGYE, E. Redistribution of nucleoside transporters to the cell membrane provides a novel approach for imaging thymidylate synthase inhibition by positron emission tomography. ***Cancer research***, v. 66, n. 17, p. 8558–8564, 2006. 39

- [71] SUEHIRO, M.; VALLABHAJOSULA, S.; GOLDSMITH, S.; BALLON, D. Investigation of the role of the base in the synthesis of [^{18}F]FLT. *Applied Radiation and Isotopes*, v. 65, n. 12, p. 1350–1358, 2007. 40
- [72] BOURGEOIS, M.; MOUGIN-DEGRAEF, M.; LEOST, F.; CHEREL, M.; GESTIN, J.; LE BARS, D.; BARBET, J.; FAIVRE-CHAUVET, A. Purification of [^{18}F]-fluoro-l-thymidine ([^{18}F]-FLT) for positron emission tomography imaging. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v. 45, n. 1, p. 154–157, 2007. 40
- [73] KIM, D.; AHN, D.; OH, Y.; LEE, S.; KIL, H.; OH, S.; LEE, S.; KIM, J.; RYU, J.; MOON, D. et al. A new class of $\text{S}_\text{N}2$ reactions catalyzed by protic solvents: facile fluorination for isotopic labeling of diagnostic molecules. *Journal of the American Chemical Society*, v. 128, n. 50, p. 16394–16397, 2006. 40
- [74] GIL, E. *Controle Físico-Químico de qualidade de medicamentos*. 3. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007. 46, 103, 104
- [75] SNMMI. [^{18}F]fluorothymidine. <http://www.snm.org/>. acesso em Abril, 2013. 46, 62, 83
- [76] DEGANI, A.; CASS, Q.; VIEIRA, P. Cromatografia um breve ensaio. *Química Nova na Escola*, 2011. 46, 47, 48
- [77] COLLINS, C.; BRAGA, G.; BONATO, P. *Fundamentos de Cromatografia*. Campinas, SP: Editora UNICAMP, 2006. 46, 47, 48, 56
- [78] LANÇAS, F. *Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE*. Campinas, SP: Editora Átomo, 2009. 48
- [79] SHAO, X.; HOAREAU, R.; HOCKLEY, B.; TLUCZEK, L.; HENDERSON, B.; PADGETT, H.; SCOTT, P. Highlighting the versatility of the tracerlab synthesis modules. part 1: fully automated production of [^{18}F] labelled radiopharmaceuticals using a Tracerlab FXFN. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, v. 54, n. 6, p. 292–307, 2011. 50
- [80] YUN, M.; SEUNG, J.; HA, H.; RYU, J.; MOON, D. High radiochemical yield synthesis of 3'-deoxy-3'-[^{18}F] fluorothymidine using (5'-O-dimethoxytrityl-2'-deoxy-3'-O-nosyl- β -D-threo pentofuranosyl) thymine and its 3-N-BOC-protected analogue as a labeling precursor. *Nuclear medicine and biology*, v. 30, n. 2, p. 151–157, 2003. 51, 55
- [81] DA SILVA MELO, P.; MARIA, S. S.; DE CAMPOS VIDAL, B.; HAUN, M.; DURÁN, N. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, v. 36, n. 8, p. 539–543, 2000. 70

- [82] MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, v. 65, n. 1, p. 55–63, 1983. [70](#), [74](#)
- [83] BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review*, v. 11, p. 127–152, 2005. [70](#)
- [84] BERRIDGE, M.; TAN, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (mtt): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in mtt reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 303, n. 2, p. 474–482, 1993. [70](#)
- [85] LIU, Y.; PETERSON, D. A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. Mechanism of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of neurochemistry*, v. 69, n. 2, p. 581–593, 1997. [70](#)
- [86] CORY, A.; OWEN, T.; BARLTROP, J.; CORY, J. et al. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer communications*, v. 3, n. 7, p. 207, 1991. [70](#)
- [87] BARLTROP, J. A.; OWEN, T. C.; CORY, A. H.; CORY, J. G. 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4, 5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4, 5-dimethylthiazolyl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 1, n. 11, p. 611–614, 1991. [70](#)
- [88] RASEY, J.; GRIERSON, J.; WIENS, L.; KOLB, P.; SCHWARTZ, J. Validation of FLT uptake as a measure of thymidine kinase-1 activity in A549 carcinoma cells. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 43, n. 9, p. 1210–1217, 2002. [71](#)
- [89] CHEN, X.; PARK, R.; HOU, Y.; TOHME, M.; SHAHINIAN, A. H.; BADING, J. R.; CONTI, P. S. micropet and autoradiographic imaging of grp receptor expression with ⁶⁴cu-dota-[lys3] bombesin in human prostate adenocarcinoma xenografts. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 45, n. 8, p. 1390–1397, 2004. [71](#)
- [90] PUJATTI, P. B. *Marcadores moleculares derivados da bombesina para diagnóstico de tumores por SPECT E PET*. 2012. Tese (Doutorado) - Doutorado em Ciências na área Tecnologia Nuclear, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. [71](#), [73](#)

- [91] TURCOTTE, E.; WIENS, L. W.; GRIERSON, J. R.; PETERSON, L. M.; WENER, M. H.; VESSELLE, H. Toxicology evaluation of radiotracer doses of 3'-deoxy-3'-[18F] fluorothymidine (¹⁸F-FLT) for human PET imaging: Laboratory analysis of serial blood samples and comparison to previously investigated therapeutic flt doses. *BMC Medical Physics*, v. 7, n. 1, p. 3, 2007. [74](#)
- [92] GRUDZINSKI, J.; FLOBERG, J.; MUDD, S.; JEFFERY, J.; PETERSON, E.; NOMURA, A.; BURNETTE, R.; TOMÉ, W.; WEICHERT, J.; JERAJ, R. Application of a whole-body pharmacokinetic model for targeted radionuclide therapy to NM404 and FLT. *Physics in Medicine and Biology*, v. 57, n. 6, p. 1641–1657, 2012. [74](#)
- [93] BURDON, R.; GILL, V.; RICE-EVANS, C. Reduction of a tetrazolium salt and superoxide generation in human tumor cells (HeLa). *Free Radical Research*, v. 18, n. 6, p. 369–380, 1993. [79](#)
- [94] GARAY, H. M.; ALVES, J.; OCHIUCCI, J. M.; BELIZÁRIO, J. E. Degradação seletiva de proteínas e suas implicações no câncer. *Novas Aplicações para a Engenharia Genética*, v. 30, p. 60, 2003. [79](#)
- [95] GODIN, D. Pharmacokinetics: disposition and metabolism of drugs. In: *Principles of pharmacology: Basic concepts and clinical applications*. New York: Chapman and Hall, 1. ed., 1995. p. 39–74. [82](#), [83](#), [90](#)
- [96] LEE, S. J.; KIM, S. Y.; CHUNG, J. H.; OH, S. J.; RYU, J. S.; HONG, Y. S.; KIM, T. W.; MOON, D. H. Induction of thymidine kinase 1 after 5-fluorouracil as a mechanism for 3'-deoxy-3'-[¹⁸f] fluorothymidine flare. *Biochemical pharmacology*, v. 80, n. 10, p. 1528–1536, 2010. [83](#), [84](#)
- [97] AIDE, N.; KINROSS, K.; BEAUREGARD, J.-M.; NEELS, O.; POTDEVIN, T.; ROSELT, P.; DOROW, D.; CULLINANE, C.; HICKS, R. J. A dual radiologic contrast agent protocol for 18F-FDG and 18F-FLT PET/CT imaging of mice bearing abdominal tumors. *Molecular Imaging and Biology*, v. 13, n. 3, p. 518–525, 2011. [83](#)
- [98] CAWTHORNE, C.; BURROWS, N.; GIELING, R. G.; MORROW, C. J.; FORSTER, D.; GREGORY, J.; RADIGOIS, M.; SMIGOVA, A.; BABUR, M.; SIMPSON, K. et al. [18F]-FLT positron emission tomography can be used to image the response of sensitive tumors to PI3-kinase inhibition with the novel agent GDC-0941. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2013. [84](#)
- [99] TAKEUCHI, S.; ZHAO, S.; KUGE, Y.; ZHAO, Y.; NISHIJIMA, K.-I.; HATANO, T.; SHIMIZU, Y.; KINOSHITA, I.; TAMAKI, N.; DOSAKA-AKITA, H. 18F-fluorothymidine PET/CT as an early predictor of tumor response to treatment with

- cetuximab in human lung cancer xenografts. *Oncology reports*, v. 26, n. 3, p. 725–730, 2011. 84
- [100] RUEGER, M. A.; AMELI, M.; LI, H.; WINKELER, A.; RUECKRIEM, B.; VOLLMAR, S.; GALLDIKS, N.; HESSELMANN, V.; FRAEFEL, C.; WIENHARD, K. et al. [18F] FLT PET for non-invasive monitoring of early response to gene therapy in experimental gliomas. *Molecular Imaging and Biology*, v. 13, n. 3, p. 547–557, 2011. 84
- [101] MIURA, F.; ALVES, M.; ROCHA, M.; SILVA, R.; OBA-SHINJO, S.; S.K.N., M. Xenograft transplantation of human malignant astrocytoma cells into immunodeficient rats: an experimental model of glioblastoma. *Clinics*, v. 65, n. 3, p. 305–9, 2010. 87
- [102] BUCK, A.; KRATOCHWIL, C.; GLATTING, G.; JUWEID, M.; BOMMER, M.; TEPSIC, D.; VOGG, A.; MATTFELDT, T.; NEUMAIER, B.; MÖLLER, P. et al. Early assessment of therapy response in malignant lymphoma with the thymidine analogue [18F] FLT. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, v. 34, n. 11, p. 1775–1782, 2007. 88
- [103] BARTHEL, H.; PERUMAL, M.; LATIGO, J.; HE, Q.; BRADY, F.; LUTHRA, S.; PRICE, P.; ABOAGYE, E. The uptake of 3'-deoxy-3'-[18F] fluorothymidine into L5178Y tumours in vivo is dependent on thymidine kinase 1 protein levels. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, v. 32, n. 3, p. 257–263, 2005. 91
- [104] VAN WAARDE, A.; COBBEN, D. C.; SUURMEIJER, A. J.; MAAS, B.; VAALBURG, W.; DE VRIES, E. F.; JAGER, P. L.; HOEKSTRA, H. J.; ELSINGA, P. H. Selectivity of 18f-flt and 18f-fdg for differentiating tumor from inflammation in a rodent model. *Journal of Nuclear Medicine*, v. 45, n. 4, p. 695–700, 2004. 91, 96, 97, 99
- [105] GUYTON, A.; HALL, J. *Tratado de fisiologia médica*. Rio de Janeiro: Elsevier Brazil, 2006. 97
- [106] WHO. WHO good manufacturing practices: main principles for pharmaceutical products. Geneva: . http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/_part1.pdf, 2004. acesso em Março, 2013. 102
- [107] BRASIL. *Resolução RDC nº17, de 16 de Abril de 2010*: dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2010. 102, 103, 104, 108
- [108] BRASIL. *Resolução RDC nº63, de 18 de Dezembro de 2009*: dispõe sobre os requisitos de boas práticas de fabricação de radiofármacos. Agência Nacional de Vigilância

- Sanitária (ANVISA), Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2009. [102](#), [108](#)
- [109] CARLETON, F.; AGALLOCO, J.; JAMES, P. *Validation of Pharmaceutical Processes*. 3. ed., Medical Psychiatry. Taylor & Francis, 2007. [103](#), [104](#), [105](#), [108](#)
- [110] SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, v. 987, n. 1, p. 57–66, 2003. [105](#)