INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**COMPARAÇÃO DA MARCAÇÃO DE DIVERSOS FOSFONATOS:
MDP, EDTMP E CLODRONATO COM ^{188}Re**

ANGÉLICA BUENO BARBEZAN

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

Orientador:

Dr. João Alberto Osso Júnior

SÃO PAULO

2012

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

COMPARAÇÃO DA MARCAÇÃO DE DIVERSOS FOSFONATOS:
MDP, EDTMP E CLODRONATO COM ^{188}Re

ANGÉLICA BUENO BARBEZAN

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

Orientador:

Dr. João Alberto Osso Júnior

SÃO PAULO

2012

Eu dedico este trabalho a todos profissionais da medicina nuclear e afins, aos meus filhos, ao meu marido e amigos que sempre ao meu lado que deram todo suporte e credibilidade.

AGRADECIMENTOS

O meu mais sincero agradecimento não poderia deixar de ser primeiramente a Deus principalmente pela força espiritual e porque se não fosse da vontade dele com toda certeza nada disso teria sido possível.

Agradecimento ao meu orientador Dr. João Alberto Osso Junior por me aceitar como aluna, por toda paciência, apoio e por acreditar que daria tudo certo.

Agradecimento fundamental também aos meus amados pais Sérgio Pompilio e Cleusa Bueno pela minha educação e pela vida.

Ao meu querido marido Rogério Barbezan por todo carinho, dedicação, auxílio e total apoio em todos os sentidos.

Aos meus amados filhos Wesley, Erik e Theo.

Aos meus sempre presentes e outros nem tão presentes, mas que são muito queridos amigos Radu Shirokov, Cleu Silva, Tati Leandro, e Dr. Gentil Jorge A. Junior por me fazerem sorrir quando na verdade minha vontade era exatamente o contrário.

Aos meus amigos que surgiram no IPEN e que me ajudaram muito principalmente no ambiente laboratorial e nas difíceis disciplinas são eles: Angélica Tamião, Danielle Dantas, M.Sc Jânio da Silva Mororó, Natanael Gomes, Fabíola Ribeiro, Aline Bignardi, Larissa Carvalho, Dra. Patricia de Andrade Martins e principalmente a Dra. Renata Ferreira Costa pelo gigante apoio, compreensão, companhia nas viagens de congressos etc... etc...

Aos funcionários do IPEN em especial ao Costa e Josevaldo (pelo “tão complicado” nitrogênio utilizado nos experimentos).

A toda galera da sala dos bolsistas que sempre me auxiliou nas dúvidas quando necessitei.

A instituição IPEN/CNEN, a USP e a agência Capes que financiou todo o projeto.

Tenha coragem, vá em frente!
Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importam quais sejam os obstáculos e as dificuldades, se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.

Dalai Lama

COMPARAÇÃO DA MARCAÇÃO DE DIVERSOS FOSFONATOS: MDP, EDTMP e CLODRONATO COM ^{188}Re

Angélica Bueno Barbezan

RESUMO

A grande aplicação dos radiofármacos está em medicina nuclear diagnóstica representando 95% dos procedimentos realizados, porém, nos últimos anos, tem crescido consideravelmente a sua aplicação em procedimentos terapêuticos. Os radionuclídeos que emitem partículas ionizantes (α , β e *elétrons Auger*) são indicados para tratamento de tumores. Tumores malignos são responsáveis por aproximadamente 12% dos óbitos e representam a terceira causa de mortalidade no Brasil. O ^{188}Re é um dos mais atrativos radioisótopos para uma variedade de aplicações terapêuticas em medicina nuclear, oncologia e intervenções cardiológicas, é totalmente favorável e conveniente pelo fato de que ele é livre de carregador e pode ser obtido de forma econômica na forma de um gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$, além de possuir uma meia-vida física de 16,9 horas e 100% de emissão de radiação β^- . A partir da década de 2000 vêm sendo realizadas diversas investigações envolvendo marcações de moléculas com ^{188}Re . Os tumores metastáticos são a forma mais comum de malignidade esquelética. Em casos metastáticos os principais objetivos do tratamento são a prevenção de fraturas patológicas e promover a sobrevida com o máximo de preservação de função permitindo que o paciente mantenha o máximo possível de mobilidade e controle da dor. O objetivo deste trabalho foi realizar a comparação das marcações de

diversos fosfonatos (Metileno disfosfonato de Sódio – MDP, Ácido Etilenodiaminotetrametilenofosfônico – EDTMP, e do diclorometilenobifosfonato de sódio - Clodronato) com ^{188}Re para terapia de metastases ósseas. Fosfonatos são inibidores da reabsorção óssea osteoclástica e são efetivos neste tratamento. As marcações do MDP, EDTMP e Clodronato com ^{188}Re foram otimizadas utilizando como agente redutor o cloreto estânico ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e como agente estabilizante o ácido ascórbico. As variáveis estudadas foram massa do ligante, massa do $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, massa do ácido ascórbico, tempo, pH e temperatura da reação. Os resultados mostraram que se obteve um excelente rendimento de marcação de 98% para o ^{188}Re -MDP, de 83% para o ^{188}Re -EDTMP e 85% para o ^{188}Re -Clodronato.

COMPARISON OF LABELING VARIOUS PHOSPHONATES: MDP, EDTMP AND CLODRONATE WITH ^{188}Re

Angelica Bueno Barbezan

ABSTRACT

The wide application of radiopharmaceuticals in nuclear medicine, representing 95% of procedures performed is in diagnosis, but in recent years, its application in therapeutic procedures has grown considerably. The radionuclides that emit ionizing particles (α , β , and Auger electrons) are indicated for the treatment of tumors. Malignant tumors account for approximately 12% of deaths and represent the third cause of mortality in Brazil. ^{188}Re is one of the most attractive radioisotopes for a variety of therapeutic applications in nuclear medicine, oncology and cardiology interventions, is fully favorable and convenient because it is carrier free and can be obtained inexpensively in the form of a generator of $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$, and has a physical half-life of 16.9 hours and 100% of β -radiation emission. From the 2000s several investigations have been conducted involving molecules labeled with ^{188}Re . Metastatic tumors are the most common form of malignancy in the skeleton. In metastatic cases the main goals of treatment are the prevention of pathological fractures and the promotion of survival with maximum preservation of function allowing the patient to maintain the greatest possible mobility and pain control. The objective of this study was to compare the labeling of various phosphonates (Sodium methylene diphosphonate - MDP, Ethylenediaminetetramethylene phosphonic acid - EDTMP, and sodium dichloromethylenediphosphonate - clodronate) with ^{188}Re for bone metastases therapy. Phosphonates are inhibitors of osteoclastic bone

resorption and are effective in treatment. The labeling of MDP, EDTMP and Clodronate with ^{188}Re was optimized using stannous chloride ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) as reducing agent, and ascorbic acid as stabilizing agent. The variables studied were the ligand mass, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ mass, mass of ascorbic acid, time, pH and temperature of the reaction. The results showed an excellent labeling yield of 98% for ^{188}Re -MDP, 83% for ^{188}Re -EDTMP and 85% for ^{188}Re -Clodronate.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	
1.1. Medicina Nuclear	17
1.2. Terapia	18
1.2.1. Teleterapia	18
1.2.2. Braquiterapia	20
1.2.3. Endoterapia (Radiofármacos Injetáveis)	21
1.3. ^{188}Re	24
1.3.1. Geradores de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$	26
1.3.2. Aplicações do ^{188}Re em Medicina Nuclear	28
1.4. Marcação de moléculas com ^{188}Re	29
1.4.1. Variáveis de Marcação	30
1.4.1.1. pH e Força iônica	30
1.4.1.2. Tempo	31
1.4.1.3. Temperatura	31
1.4.1.4. Massas.....	31
1.4.3.5. Atividade do Radionuclídeo	32
1.4.2. Controle de Qualidade	32
1.4.2.1. Pureza Radionuclídica	32
1.4.2.2. Pureza Química	32
1.4.2.3. Pureza Radioquímica	33
1.5. Radiofármacos marcados com ^{188}Re	33

1.6	Fosfonatos na Medicina Nuclear	40
1.6.1	Marcações dos bifosfonatos com ^{188}Re	42
1.7	Ossos – Função e Arquitetura	46
1.7.1	Tumores Metástáticos no Esqueleto	47
1.7.2	Sintomas do Câncer Ósseo	49
1.8	Dor – Conceitos Básicos	51
1.8.1	Dor Oncológica	52
1.8.2	Dor na Metástases Ósseas	52
2	JUSTIFICATIVA / OBJETIVOS	53
3	MATERIAIS E MÉTODOS	54
3.1	Infraestrutura	54
3.2	Materiais, Reagentes e Equipamentos	54
3.3	Metodologia de Marcação	55
3.3.1	MDP	55
3.3.2	EDTMP	56
3.3.3	Clodronato	57
3.4	Controle de Qualidade	58
3.4.1	Pureza Radioquímica	58
3.5	Concentração do ^{188}Re utilizando sistemas de cartuchos	60
4	RESULTADO E DISCUSSÃO	61
4.1	Pureza Radioquímica	61
4.2	Marcação dos Fosfonatos	64
4.2.1	MDP	64

4.2.2	EDTMP	69
4.2.3	Clodronato	74
4.3	Concentração	80
5	CONCLUSÃO	81
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Exemplos de geradores que produzem radioisótopos emissores-beta para utilização em terapia	27
TABELA 2. Valores do Fator de Retenção (R_f) das diferentes espécies do ^{188}Re	59
TABELA 3. Resultados das melhores formulações encontradas das marcações realizadas do MDP / EDTMP e Clodronato com ^{188}Re	79

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1- Imagem de um acelerador linear Modelo L60 <i>Varian</i>	19
FIGURA 2- Imagem A – Braquiterapia de mama / Imagem B – Braquiterapia de próstata	21
FIGURA 3 – Imagem do Rênio em seu estado natural	25
FIGURA 4- Imagem do Gerador de ^{188}Re – <i>Polatom</i>	28
FIGURA 5 – Estrutura química do MDP, EDTMP e Clodronato	41
FIGURA 6 – Imagem de alguns ossos que compõe o sistema esquelético	46
FIGURA 7 – Imagem dos principais ossos que apresentam maior incidência na manifestação dos ostessarcomas	47
FIGURA 8 – Imagem do espalhamento do câncer através da corrente sanguínea	48
FIGURA 9 – Imagem da infiltração e dano ósseo causado por metástases	50
FIGURA 10 – Separação das espécies utilizando processo Cromatográfico	59
FIGURA 11 – Cromatograma do $^{188}\text{ReO}_4^-$ em solvente acetona	61
FIGURA 12 – Cromatograma do $^{188}\text{ReO}_4^-$ em solvente salina	61
FIGURA 13 – Cromatograma do $^{188}\text{ReO}_2$ em solvente acetona	62
FIGURA 14 – Cromatograma do $^{188}\text{ReO}_2$ em solvente salina	62
FIGURA 15 – Cromatograma do MDP marcado com ^{188}Re em solvente acetona	63
FIGURA 16 – Cromatograma do MDP marcado com ^{188}Re em solvente salina	63
FIGURA 17 – Variação da massa do MDP na marcação com ^{188}Re	64
FIGURA 18 – Variação da massa do $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ na marcação do MDP com ^{188}Re	65

FIGURA 19 – Variação da massa do ácido ascórbico na marcação do MDP com ^{188}Re	66
FIGURA 20 – Variação do tempo de reação na marcação do MDP com ^{188}Re	66
FIGURA 21 – Variação do pH na marcação do MDP com ^{188}Re	67
FIGURA 22 – Variação de temperatura na marcação do MDP com ^{188}Re	68
FIGURA 23 – Estudo de estabilidade do ^{188}Re -MDP	69
FIGURA 24 - Variação da massa do EDTMP na marcação com ^{188}Re	70
FIGURA 25 - Variação da massa do $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ na marcação do EDTMP com ^{188}Re	70
FIGURA 26 - Variação da massa do ácido ascórbico na marcação do EDTMP com ^{188}Re	71
FIGURA 27 - Variação do tempo de reação na marcação do EDTMP com ^{188}Re	72
FIGURA 28 - Variação do pH na marcação do EDTMP com ^{188}Re	73
FIGURA 29 - Variação de temperatura na marcação do EDTMP com ^{188}Re	73
FIGURA 30 - Variação da massa do Clodronato na marcação com ^{188}Re	74
FIGURA 31 - Variação da massa do $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ na marcação do Clodronato com ^{188}Re	75
FIGURA 32 - Variação da massa do ácido ascórbico na marcação do Clodronato com ^{188}Re	76
FIGURA 33 - Variação do tempo de reação na marcação do Clodronato com ^{188}Re	76
FIGURA 34 - Variação do pH na marcação do Clodronato com ^{188}Re	77
FIGURA 35 - Variação de temperatura na marcação do Clodronato com ^{188}Re	78

1 Introdução

1.1 Medicina Nuclear

A Medicina Nuclear é o ramo da medicina especializada no uso de radionuclídeos para diagnóstico e terapia. Esta modalidade, baseada em radioisótopos e em princípios físicos, foi desenvolvida na década de 50. Um dos primeiros radioisótopos usado em Medicina Nuclear foi o Iodo-131 (^{131}I ; $E_{\beta\text{max}} = 606 \text{ keV}$, $I_{\beta} = 89,9\%$; $E_{\gamma} = 364 \text{ keV}$, $I_{\gamma} = 81,7\%$) utilizado para tratamento de doenças da tireóide, câncer da tireóide e hipertireoidismo. O desenvolvimento da Medicina Nuclear tem uma importante contribuição de cientistas de diversas áreas como química, física, medicina, farmacologia, engenharia e tecnologia [1].

Os tumores malignos são responsáveis por aproximadamente 12% dos óbitos e representam a terceira causa de mortalidade no Brasil [2]. Não há como negar um impacto direto de sua adequada investigação diagnóstica e estadiamento na conduta terapêutica e prognóstico dos pacientes. O fornecimento de informações funcionais e metabólicas *in vivo* pela medicina nuclear pode contribuir no raciocínio e planejamento clínico em diferentes situações, particularmente quando os métodos de imagem estrutural não detectam alterações ou mostram achados poucos específicos.

A medicina nuclear baseia-se na concentração (mecanismo passivo) ou captação (mecanismo ativo) tecidual de elementos radioativos puros ou acoplados a outras moléculas (radiofármacos). Estes radiofármacos são usualmente administrados por via oral, intravenosa, cavitária ou por inalação, aguardando-se a concentração tecidual antes de se obter as imagens com o auxílio de equipamentos específicos. As imagens refletem a

distribuição do radiofármaco no corpo do paciente e podem ser planas (bidimensionais) ou tomográficas (SPECT = *single photon emission computed tomography* / *Tomografia computadorizada com emissão de fóton único*) técnica que utiliza radionuclídeos emissores γ como, por exemplo, ^{99m}Tc , ^{123}I , ^{67}Ga , ^{201}Tl . As imagens tomográficas obtidas após a administração de radiofármaco emissores de pósitrons (PET = *positron emission tomography* / *Tomografia com emissão de pósitron*) que, por exemplo, utilizam os radionuclídeos: ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , seguem o mesmo princípio básico de determinação da biodistribuição de radioisótopos *in vivo*, com diferenças no sistema de detecção da radiação [2].

1.2 Terapia

A terapia utilizando radiação pode ser dividida em técnicas que utilizam fontes seladas (teleterapia e braquiterapia) e fontes abertas (endoterapia ou injetáveis).

1.2.1 Teleterapia

A radioterapia, uma forma de tratamento usando radiações, é feita na maioria das vezes com feixes de radiação de uma fonte em uma máquina afastada do paciente. Esta forma de tratamento é conhecida como teleterapia. A FIG. 1 mostra um exemplo de equipamento de teleterapia.

FIGURA 1 – Imagem de um acelerador linear Modelo L 60 Varian
[3]

Aparelhos de teleterapia usam um dos seguintes tipos de fontes de radiação:

❖ Cobalto-60

Fontes de ^{60}Co liberam fótons sob forma de raios γ com energias de 1,17 MeV e 1,33 MeV. Como a fonte é radioativa, a emissão de fótons é contínua ou seja a fonte não para de emitir fótons. Quando a máquina está desligada, a fonte permanece guardada numa blindagem adequada que bloqueia a saída de raios γ .

Alguns serviços mais antigos ainda usam fontes de ^{137}Cs o que não é mais recomendado devido a baixa penetração de seu feixe [4].

❖ Aceleradores Lineares

Estes aparelhos utilizam ondas eletromagnéticas de elevada frequência para acelerar elétrons a energias da ordem de dezenas de MeV, através de uma estrutura linear de aceleração. Este feixe de elétrons de alta energia pode ser usado no tratamento de lesões superficiais ou atingir um alvo e originar, através de interação com os núcleos, raios X de alta energia para atingir tumores mais profundos [5].

1.2.2 Braquiterapia

A braquiterapia é uma modalidade de tratamento que utiliza a radiação ionizante nos tumores malignos, e, para isso, faz o uso de pequenas fontes radioativas seladas posicionadas a uma distância curta em relação ao volume alvo. Estas fontes são os radioisótopos cujas radiações, ao penetrarem o tecido de interesse, liberam toda ou parte de sua energia, levando à morte as células neoplásicas.

Em meados de 1980, a braquiterapia por alta taxa de dose ("high dose rate" - HDR) foi desenvolvida como uma alternativa à braquiterapia por baixa taxa de dose ("low dose rate" - LDR). A braquiterapia com HDR, está recebendo atenção considerável na maioria dos países, em virtude de ser uma opção segura e eficiente na administração da dose de radiação no tratamento de tumor maligno em diferentes regiões do corpo. A braquiterapia pode ser utilizada para o tratamento de tumores do cérebro, pulmão, esôfago, próstata, além daqueles que podem se desenvolver no aparelho reprodutor feminino. Por esse motivo, e por causa da complexidade da técnica de HDR, exige-se que os controles de segurança sejam cada vez mais rigorosos, com a finalidade de garantir a segurança, não somente aos pacientes, mas também aos operadores e demais envolvidos. Na FIG. 2 apresentam-se os processos de braquiterapia em A: patologia mamária e B: patologia prostática.

FIGURA 2 – Imagem (A) Braquiterapia de mama / Imagem (B) Braquiterapia de próstata [6]

As formas destas fontes podem ser: Sementes de ^{125}I , tubos de ^{137}Cs e fios de ^{192}Ir [7].

1.2.3 Endoterapia (Radiofármacos Injetáveis)

A grande aplicação dos radiofármacos está em Medicina Nuclear diagnóstica, representando cerca de 95% dos procedimentos em Medicina Nuclear. A partir da década de 2000, entretanto, tem crescido consideravelmente a aplicação dos radiofármacos em procedimentos terapêuticos, envolvendo desde a simples administração de solução de iodeto de sódio (^{131}I) para terapia de câncer de tireóide e hipertireoidismo, até o uso de peptídeos e anticorpos monoclonais específicos, como o anticorpo anti-CD-20 marcado com elementos radioativos emissores β^- (^{90}Y , ^{177}Lu e ^{131}I), empregado na terapia de linfoma do tipo não - Hodgkin, numa modalidade terapêutica denominada Radioimunoterapia [8].

Os radionuclídeos que emitem partículas ionizantes (partículas α , β^- e *elétrons Auger*) são indicados para tratamentos de tumores. O tipo de partícula a utilizar depende do tamanho do tumor, da distribuição intratumoral e farmacocinética do radiofármaco.

Sempre que a energia de raios γ é adequada para a aquisição de imagens, pode-se constituir em vantagem, pois permite visualizar a distribuição *in vivo* do radiofármaco que está sendo utilizado na terapia.

❖ Radionuclídeos emissores de partículas β^-

São os radionuclídeos mais utilizados em terapia. As partículas β^- permitem uma dose de radiação uniforme apesar de sua deposição nos tecidos alvo (tumores) ser heterogênea. Exemplos de emissores β^- são: ^{131}I , ^{32}P , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re e ^{153}Sm .

❖ Radionuclídeos emissores de partículas α

Estes radionuclídeos são os escolhidos quando se pretende que a radiação tenha um pequeno alcance. Apesar de existirem mais de 100 radionuclídeos emissores α , a maioria apresenta tempos de meia-vida demasiados longos, incompatíveis com as aplicações *in vivo* sendo também de difícil produção. Exemplos de emissores alfa são: ^{213}Bi , ^{212}Bi , e ^{211}At .

❖ Radionuclídeos emissores de *elétrons Auger*

Os *elétrons Auger* apresentam capacidade ionizante baixa, quando situados no citoplasma das células, mas elevada, quando incorporados em compostos que interagem diretamente com o DNA.

Ainda não existem radiofármacos comercializados contendo emissores de *elétrons Auger*, mas a concepção desses radiofármacos constitui-se em área ativa de investigação. Será necessário conceber um radiofármaco específico internalizado pelas células e que atinja o núcleo das mesmas. Um exemplo de emissor de *elétrons Auger* é o ^{125}I [09].

❖ **Meia vida física**

O decaimento de um radionuclídeo é caracterizado pela sua meia-vida física T_p ou $t_{1/2}$. É o tempo para que a radioatividade de um radionuclídeo seja reduzida à metade. Ex.:

- ^{188}Re : 16,9 horas
- ^{99m}Tc : 6 horas
- ^{131}I : 8,04 dias

A meia vida física é independente de qualquer condição e característica de um radionuclídeo.

❖ **Meia vida biológica**

A eliminação de um radioisótopo de um sistema biológico é caracterizada pela sua meia vida biológica T_b .

❖ **Meia vida efetiva**

Depende tanto da meia vida física quanto da biológica. Os decaimentos físico e biológico ocorrem ao mesmo tempo.

O tempo de meia-vida é um parâmetro essencial na escolha de radionuclídeos para terapia, devendo se adequar à farmacocinética do radiofármaco e ao tipo de tumor.

Os radiofármacos administrados em seres humanos são eliminados pelo sistema biológico através principalmente pelas vias urinária, fecal, e transpiração. Este desaparecimento biológico de um radiofármaco segue uma lei exponencial semelhante ao decaimento de um radionuclídeo, ou seja cada radiofármaco possui uma meia-vida biológica (T_b). É o tempo necessário suficiente para que um radiofármaco desapareça pela metade do sistema biológico, este fato está relacionado com uma constante de decaimento $\lambda_b = 0.693/T_b$.

É claro que em qualquer sistema biológico a perda de um radiofármaco se deve tanto à desintegração física do radionuclídeo quanto à eliminação biológica do radiofármaco. A taxa líquida efetiva (λ_e) da perda de radioatividade está relacionada com as constantes de decaimento físico λ_p e biológico λ_b . Matematicamente isso é expresso da seguinte forma:

$$\lambda_e = \lambda_p + \lambda_b \quad (1)$$

Uma vez que $\lambda = 0.693/t_{1/2}$

Os radiofármacos utilizados para diagnósticos devem ter uma relativa meia-vida efetiva curta, que não deve ser mais longa do que o tempo necessário para completar o estudo em questão. O tempo para iniciar a formação de imagens varia de acordo com os diferentes estudos, dependendo da farmacocinética *in vivo*. Quanto mais rápido o acúmulo do marcador, a imagem deve iniciar mais cedo. No entanto a duração da imagem depende principalmente da quantidade de atividade administrada, da fração acumulada no órgão alvo e da janela de energia definida no equipamento de imagem [22].

Em casos de radiofármacos utilizados para terapia, a meia-vida também é muito importante, pois se determina o tempo que o radiofármaco permanecerá no organismo, só lembrando que quanto maior a meia-vida em casos terapêuticos melhor, pois mais tempo o radiofármaco permanecerá no tumor desempenhando sua função.

1.3 ¹⁸⁸Re

Rênio é um elemento químico, símbolo Re, número atômico 75 (75 prótons e 75 elétrons), massa atômica 186,2u, situado no grupo 7 da classificação periódica dos elementos localizado exatamente abaixo do Tecnécio, pertencendo ao mesmo grupo possuindo em sua química similaridade em muitos aspectos, e a diferença mais significativa

estruturalmente nos complexos análogos de tecnécio e rênio pode ser encontrada no seu potencial de redução.

É um metal de transição branco prateado, pesado, sólido a temperatura ambiente, raramente encontrado na natureza. É obtido como subproduto do processamento de minerais de Molibdênio, e a sua descoberta foi relatada por Valter Noddack, Ida Tacke e Otto Berg em 1925 na Alemanha. A FIG. 3 mostra o rênio em seu estado bruto.

FIGURA 3 – Imagem do Rênio em seu estado natural [10]

^{188}Re é um dos mais atrativos radioisótopos para uma variedade de aplicações terapêuticas em medicina nuclear, oncologia e intervenções cardiológicas.

O ^{188}Re decai para o estado fundamental do ^{188}Os , que é estável, 79% das vezes ($E_{\beta 1\text{máx}} = 2,11 \text{ MeV}$) e para o primeiro estado excitado 20% das vezes ($E_{\beta 2\text{máx}} = 1,97 \text{ MeV}$). A desexcitação deste estado excitado fornece um raio γ de 155 keV com uma intensidade de 15% que pode ser detectado por imagem, conveniente para propósitos dosimétricos e de imagem.

Por possuir uma meia-vida física de 16,9 horas e 100% de emissão de radiação β^- com alta energia final (E_{β} média= 764 keV), é considerado um candidato atrativo para ser usado em aplicações terapêuticas e em comparação ao uso do ^{131}I poucas preocupações com radioproteção são envolvidos com ^{188}Re [11].

As propriedades físicas do ^{188}Re são favoráveis e convenientes, incluindo o fato de que ele é livre de carregador e pode ser obtido de maneira econômica na forma de um gerador de tungstênio-188/rênio-188 ($^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$), a base de alumina, onde o pai ^{188}W tem uma meia-vida longa de 69 dias, assegurando uma disponibilidade clínica diária. Dessa maneira, o ^{188}Re é obtido como perrenato de sódio ($\text{Na}[^{188}\text{ReO}_4]$) pela eluição do gerador com solução salina 0,9% [11].

1.3.1 Geradores de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$

O desenvolvimento de geradores foi primeiramente motivado pelo crescimento das aplicações de radioisótopos e compostos marcados, especialmente para aplicações no diagnóstico em medicina nuclear.

É extremamente importante que haja disponibilidade confiável para atender a grande demanda de radioisótopos na medicina nuclear e os geradores de radionuclídeos são opções econômicas para radiofarmácias centralizadas e hospitalares para o fornecimento de radionuclídeo tanto para o diagnóstico quanto para terapia em diversas aplicações em Medicina nuclear e oncologia.

Várias pesquisas dos geradores tem sido realizadas, e além dos geradores que já são utilizados na rotina clínica, outros se encontram em fase de ensaios clínicos ou aguardando apenas aprovação para serem utilizados em rotina.

O gerador mais utilizado para aplicações clínicas é o $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$, estima-se que só nos EUA, mais de 13 milhões de aplicações anuais são utilizadas no diagnóstico usando moléculas marcadas com $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Na

década de 2000 houve um grande aumento no desenvolvimento e aperfeiçoamento do uso dos radioisótopos terapêuticos na medicina nuclear e oncologia utilizando o sistema de gerador, e suas principais vantagens são o custo razoável e a conveniência em se obter o radionuclídeo em alta atividade específica [12]. Na TAB. 1 estão listados alguns exemplos de geradores que produzem radioisótopos emissores-beta para terapia.

TABELA 1 – Exemplos de geradores que produzem radioisótopos emissores-beta para utilização em terapia

Radionuclídeo Pai	$t_{1/2}$	Radionuclídeo Filho	$t_{1/2}$	$E_{\max}$ (MeV)
Estrôncio-90	28,6 a	Ítrio-90	64,1 h	3,32
Tungstênio-188	69 d	Rênio-188	16,9 h	2,12
Disprósio-166	3,4 d	Hólmio-166	1,117 h	1,90

Os principais estudos do gerador $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ estão focalizados no sistema cromatográfico com base de alumina. Assim, o tungstênio na forma química de $\text{WO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ou WO_4^{2-} , é adsorvido na alumina por ser o material com melhores características de adsorção e estabilidade numa faixa de pH de 1 a 4. O ^{188}Re é eluído com solução de NaCl 0,9% por apresentar rendimentos de eluições superiores a outros sistemas de solventes. Os íons de tungstato permanecem adsorvidos após a eluição, retirando o radioisótopo ^{188}Re na forma de perrenato de sódio ($\text{Na}^{188}\text{ReO}_4$) [13]. A FIG. 4 demonstra um gerador de ^{188}Re .

FIGURA 4 – Imagem do Gerador de ^{188}Re da Polatom [14]

O ^{188}W é produzido em reator nuclear por uma reação de dupla captura de nêutrons no ^{186}W . Para se obter alta atividade específica do ^{188}W são necessários alto fluxo de nêutrons e longos tempos de irradiação. Se a atividade específica do ^{188}W for baixa, o volume de eluição do ^{188}Re será alto levando a uma baixa concentração radioativa, levando a necessidade do uso de um sistema de concentração após eluição do ^{188}Re é necessário. Após a eluição do gerador base-alumina $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$, todo o conteúdo de eluição é passado no sistema de concentração fornecendo assim solução de ^{188}Re perrenato com concentração radioativa elevada [12].

1.3.2 Aplicações do ^{188}Re em Medicina Nuclear

As aplicações do ^{188}Re em medicina nuclear estão em terapia, tais como:

- Terapia endovascular para prevenção de restenose coronária após angioplastia ou implante de Stent utilizando um cateter de balão contendo o radioisótopo [15].
- Terapias de metástases ósseas utilizando fosfonatos marcados como por exemplo o estudo realizado por HSIEH et al [16].

- Peptídeos também são marcados com ^{188}Re como por exemplo análogos da somatostatina utilizados para restringir o crescimento de tumores gástricos, mamário, prostáticos e pulmão [17]
- Microesferas como a albumina de soro humano (HSA) marcadas com ^{188}Re utilizadas para endoterapia de tumores seletivos após cateterismo [18].
- Lipiodol marcado com ^{188}Re para terapia de carcinoma hepatocelular [19]
- Anticorpos monoclonais como por exemplo o anti-CD52 para radioimunoterapia de células β com leucemia linfocitária [20]

1.4 Marcação de moléculas com o ^{188}Re

As marcações utilizando o ^{188}Re são muito semelhantes as marcações realizadas com o $^{99\text{m}}\text{Tc}$, que podem ser realizadas por método direto onde, no procedimento de marcação, a molécula, o radionuclídeo e o agente redutor se misturam e no indireto a marcação é coordenada por meio de um agente quelante sintético que pode ser conjugado antes ou depois da radiomarkação.

São utilizados também no processo o $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ como agente redutor e o ácido ascórbico como agente antioxidante.

❖ Cloreto de Estanho – Agente Redutor

Um agente redutor é uma substância que através da doação de elétrons reduz outra substância. O redutor sofre uma reação de oxidação e seu número de oxidação aumenta devido à perda de elétrons.

Cloreto de estanho ou cloreto estanoso é sólido, branco cristalino, de fórmula $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, forma um di-hidrato estável mas em solução aquosa tende a sofrer hidrólise principalmente se aquecido. $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ é utilizado como agente redutor em soluções ácidas.

Em marcações realizadas com moléculas de radioisótopos os agentes redutores mais utilizados são o tetrahidratoborato de sódio

(NaBH_4) e o cloreto de estanho ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) que foi o escolhido para ser utilizado nos estudos realizados neste trabalho.

O ^{188}Re apresenta estado de oxidação +7, mas para que haja uma boa radiomarcagem é necessário uma redução para o estado +4, estado de oxidação mais reativo e conseqüentemente criando condições ideais para as marcações dos fosfonatos [21].

❖ **Ácido Ascórbico - Agente Estabilizante**

Oxirredução é uma reação caracterizada pela ocorrência de processos de oxidação e redução simultâneos. A substância que sofre oxidação, perdendo elétrons e aumentando o seu número de oxidação (NOX) é denominada agente redutor. Já a espécie química que se reduz ganhando elétrons e diminuindo seu NOX é o agente oxidante.

Existem muitos agentes redutores e oxidantes comuns no dia a dia. Na medicina e na indústria, um dos agentes redutores mais conhecidos é o ácido L-ascórbico.

O ácido ascórbico em solução aquosa possui uma facilidade excepcional para ser oxidado, portanto essa característica faz com que ele seja um ótimo antioxidante. Isso significa que ele protege outras espécies químicas de se oxidarem, em razão da sua própria oxidação.

A utilização do ácido ascórbico em trabalhos realizados com ^{188}Re é essencial pois ele atua evitando a reoxidação do ^{188}Re , proporcionando um bom rendimento de marcação e boa estabilidade da molécula marcada.

1.4.1 Variáveis de Marcação

No processo de marcação de moléculas com radioisótopos as principais variáveis para otimização do processo são: pH e força iônica, tempo, temperatura, massas e atividades dos radionuclídeos.

1.4.1.1 pH e Força Iônica

Para a integridade e estabilidade dos radiofármacos, todos devem conter uma concentração de íons de hidrogênio e pH adequados. O pH ideal de um radiofármaco é de 7,4 (pH do sangue) mas que pode apresentar uma variação entre 2 e 9 e isso se deve ao fato da elevada capacidade tampão do sangue.

A fim de serem administrados em seres humanos os radiofármacos também devem possuir força iônica adequada, isotonicidade e osmolaridade. A força iônica adequada pode ser alcançada a partir da adição de um ácido adequado, alcalino ou de eletrólito, e esta forma pode ser calculada a partir das concentrações de eletrólitos adicionados.

1.4.1.2 Tempo

A variável estudada referente ao tempo de marcação é muito importante de ser avaliada, pois é interessante encontrar um tempo mínimo de reação e que produza neste período um bom rendimento de marcação para diminuir a perda de atividade do radionuclídeo devido ao seu decaimento físico.

1.4.1.3 Temperatura

Alguns radiofármacos reagem melhor à temperatura ambiente, outros a temperaturas elevadas, depende muito de qual molécula está sendo avaliada. A temperatura elevada pode favorecer algumas reações de marcação, contanto que não afete a estabilidade da molécula. Um exemplo é a marcação de anticorpos monoclonais, onde a alta temperatura deve ser evitada porque pode desnaturar o anticorpo.

1.4.1.4 Massas

O estudo das variações das massas das moléculas, do agente redutor e do oxidante é muito importante, tanto no ponto de vista econômico quanto no rendimento final do produto marcado.

1.4.1.5 Atividade do radionuclídeo

A marcação de uma molécula é dependente da atividade do radionuclídeo. O excesso da atividade do radioisótopo pode favorecer a radiólise do processo, afetando negativamente o rendimento e estabilidade do produto final [12].

1.4.2 Controle de Qualidade

O controle de qualidade é um dos pontos essenciais nas normas de Boas Práticas Radiofarmacêuticas (BPR). Engloba uma série de medidas e processos para assegurar a qualidade do produto final antes da sua administração.

1.4.2.1 Pureza Radionuclídica

Refere-se à porcentagem de atividade do radionuclídeo considerado relativamente à atividade total, que pode ser devido à contaminação por outros radionuclídeos. No caso do ^{188}Re o contaminante radionuclídico é o seu pai radioativo, o ^{188}W .

1.4.2.2 Pureza Química

Pureza química é ausência de qualquer impureza química não radioativa presente no radiofármaco. Pode ter origem na degradação da matéria prima ou na passagem ou presença por substâncias desde a eluição do gerador, a produção de radioisótopo ou no processo de marcação. Um exemplo é a presença de alumínio (Al) no eluído do gerador de ^{188}Re , devido ao fato do gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ ser composto de uma coluna de alumina (Al_2O_3).

1.4.2.3 Pureza Radioquímica

Pureza radioquímica é demonstrada através da percentagem da atividade de um dado radionuclídeo na forma química desejada.

Impurezas radioquímicas surgem a partir da decomposição do radiofármaco devido à ação dos solventes utilizados, temperatura, pH, agente redutor ou radiólise. Quanto maior o tempo que os compostos são expostos a estas condições mais tenderão à quebra, por esta razão a maioria dos radiofármacos são atribuídos a uma data específica de validade, após esta data eles não possuem garantias de eficácia para o uso pretendido. No caso dos radiofármacos marcados com ^{188}Re as impurezas encontradas são o $^{188}\text{ReO}_4^-$ (livre) e o $^{188}\text{ReO}_2$ (coloide). A presença de impurezas radioquímicas em alguns radiofármacos pode resultar em má qualidade de imagem em casos de radiofármacos utilizados para os diagnósticos e nos radiofármacos utilizados em terapia pode não exercer o efeito desejado. A impureza pode fornecer também dose de radiação desnecessária para o paciente [12].

1.5 Radiofármacos marcados com ^{188}Re

Desde o fim da década de 1990 vem sendo realizado um grande número de investigações nas marcações de compostos com ^{188}Re , onde o objetivo principal é a identificação de características farmacocinéticas que melhor se enquadre ao uso terapêutico.

Seguem alguns exemplos da radiomarcagem com ^{188}Re segundo a literatura:

ZAMORA et al. (1997) estudaram as condições para a radiomarcagem do peptídeo sintético análogo da somatostatina (^{188}Re -RC-160) em kits liofilizados [23].

GUHLKE et al. (1998) utilizaram a radiomarcagem do ^{188}Re -MAG₃ (mercapto-acetiltriglicina – estudos renais em medicina nuclear) como grupo prostético demonstrando a viabilidade do método para a marcação

de peptídeos com diferentes rotas de conjugação química tendo como modelo o RC-160 [24].

SEITZ et al. (1999) examinaram o potencial do antígeno - anticorpo Anti-NCA BW 250/183 (anticorpo monoclonal murínico - IgG1) na radioimunoterapia (RAIT) adjuvante no condicionamento da medula óssea antes do transplante de medula óssea em tratamentos de leucemia [25].

CHEN et al. (1999) avaliaram a captação *in vivo* dos análogos sintéticos do hormônio de estimulação de melanócitos (α -MSH), um hormônio primariamente responsável pela pigmentação da pele. Os análogos do α -MSH: [Nle4, D-Phe7] α -MSH (NDPMSH) e [D-Phe7] α -MSH (DPMSH), foram marcados com ^{99m}Tc e ^{188}Re via um agente quelante MAG_2 (tetrafluorofenil-mercapto-acetildiglicil-gama-aminobutirato) ou tetrapeptídeo Ac-Cys-Gly-Cys-Gly (CGCG) [26].

DU et al. (2000) descreveram um método para a radiomarcagem do dextran com o ^{188}Re semelhante ao método de marcação de anticorpos pela redução de pontes S-S, por meio de resíduos de cisteína formando um conjugado modificado de policisteína-dextran para a transquelação do ^{188}Re -gluconato. O método de conjugação do dextran pode ser útil para a radiomarcagem de outras moléculas de interesse terapêutico [27].

WUNDERLICH et al. (2000) estudaram a biocompatibilidade, biocinética e estabilidade *in vivo* das microesferas de albumina humana sérica (HSA) B20 marcadas com ^{188}Re e observaram a excelente estabilidade dos produtos *in vivo* após a endoradioterapia tumoral ou sinovectomia [28].

MURPHY et al. (2001) marcaram com ^{188}Re com boa eficiência o peptídeo Lanreotídeo (β -naphthyl-peptídeo) que possui ação antiproliferativa em células humanas de carcinoma pulmonar com potencial terapêutico [29].

HÄFELI et al. (2001) estudaram a possibilidade do uso das microesferas produzidas com polímeros biodegradáveis em tratamentos de braquiterapia e terapias de radioembolização, além da radiomarcagem de

partículas magnéticas com ^{188}Re para a terapia de tumores sólidos capazes de minimizar a radiação em tecidos adjacentes [30].

WANG et al. (2001) verificaram os efeitos histológicos do procedimento de sinovectomia com microesferas marcadas com ^{188}Re sugerindo que a dose de tratamento para a artrite reumatóide é segura e não danifica a cartilagem articular do joelho, sendo um agente terapêutico potencial de baixo custo [31].

LIU et al. (2003) investigaram a estabilidade *in vivo* dos análogos de DNA (morfolinos –MORF). Os MORFs são oligonucleotídeos sintetizados para complementar uma sequência alvo de tumores malignos. As marcações utilizaram o DOTA e o MAG_3 como agentes quelantes na radiomarcagem com ^{111}In , ^{90}Y e ^{188}Re , para a terapia de radionuclídeos com potencial clínico [32].

KOTHARI et al. (2003) estudaram outro agente em potencial para a radiosinovectomia, diferente dos colóides e microesferas. A preparação do ^{188}Re -HA (Hidroxiapatita) com marcação direta atingiu alto rendimento e boa estabilidade *in vitro* e *in vivo* [33].

JEONG et al. (2003) desenvolveram um método simples de radiomarcagem do ^{188}Re -nitrocelulose (papel) para a distribuição homogênea da dose nos tumores de pele. Os estudos em animais mostraram efeitos terapêuticos relevantes [34].

LIN et al. (2004) compararam os cálculos dosimétricos teóricos calculados (Monte Carlo) com as medidas obtidas com *phantoms*, utilizando o balão de braquiterapia com ^{188}Re para angioplastia coronária e assim, prover dados sobre o tempo de irradiação e a quantificação das doses para o uso de fontes líquidas [35].

GARIN et al. (2004) descreveram o desenvolvimento do ^{188}Re -SSS-Lipiodol: $^{188}\text{Re}-(\text{S}_2\text{CPh})(\text{S}_3\text{CPh})_2$, como alternativa ao agente terapêutico ^{131}I -Lipiodol mais usado no tratamento intra-arterial de carcinoma hepato celular (HCC). A administração do lipiodol radiomarcado com ^{131}I apresenta problemas relacionados com a proteção radiológica, devido à

sua longa meia-vida e os raios- γ de alta energia, que tornam necessária a hospitalização mínima (8 dias) dos pacientes [36].

BOSCHI et al. (2004) obtiveram melhores resultados para a preparação do ^{188}Re -Lipiodol. Foram formulados kits liofilizados do complexo lipofílico (bis-dietilditiocarbamato-nitrito): $^{188}\text{ReN-DEDC}$. O produto marcado apresenta boa estabilidade *in vivo* e nenhum efeito adverso foi verificado nos pacientes submetidos ao tratamento seqüencial com doses de 2,5 a 5 GBq [37].

LI et al. (2005) estudaram a marcação do anticorpo monoclonal humanizado ^{188}Re -Herceptin: (anti-p 185-HER2/neu). Muitos tumores expressam o proto-oncogene HER2/neu, o que se correlaciona a um prognóstico ruim. Os resultados demonstraram uma inibição ou redução no crescimento do tumor ao bloquear a atividade do HER2/neu [38].

HÄFELI et al. (2006) testaram o sistema de cola de fibrina para braquiterapia adjuvante de tumores cerebrais com microesferas marcadas com ^{188}Re e ^{186}Re . Pode-se constatar que a cola de fibrina contendo ^{188}Re e ^{186}Re representou um efetivo método de ligação com alta dose focal de radiação [39].

LIU et al. (2006) investigaram uma nova abordagem para a marcação de oligômeros morfolino com ^{188}Re com alta eficiência de marcação para aplicações terapêuticas. Na conclusão demonstraram que o uso do quelante MAG_3 evita a necessidade de purificação após a marcação [40].

DE DECKER et al. (2008) avaliaram a aplicação do ^{188}Re na marcação do anti-CD 52, anticorpo monoclonal alemtuzumabe para radioimunoterapia de leucemia linfocitária crônica de células β . O objetivo do estudo foi desenvolver uma preparação instantânea do ^{188}Re – alemtuzumabe. Concluíram que o procedimento foi eficiente para radiomarkação do anti-CD52 humanizado Moab alemtuzumab com ^{188}Re com alta pureza radioquímica com a purificação após marcação, favorável biodistribuição e baixa dose de radiação [20].

CHEN et al. [2009] desenvolveram uma técnica onde o trastuzumabe intacto pode ser diretamente e eficientemente marcado com o $^{188}\text{Re}(\text{I})$ tricarbonila como um precursor para atingir as células de câncer de pulmão HER2. Concluíram que o $^{188}\text{Re}(\text{I})$ – trastuzumabe exibiu especificamente uma alta concentração nas células cancerígenas de pulmão humano. Com base em seus estudos esperam que o $^{188}\text{Re}(\text{I})$ trastuzumabe possa ser desenvolvido como um agente imunoterápico para o tratamento de HER-2-positivo em pacientes com câncer [41].

FUKS et al. [2010] estudaram os complexos $2+1$ tricardonil $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e ^{188}Re com N-metilpiridina-2-carboxiamida como ligante neutro bidentado e o ligante butil – 3-isocianopropionato ou amidazole como ligante monodentado. Constaram que os complexos formados com o ^{188}Re são muito mais estáveis do que os análogos do $^{99\text{m}}\text{Tc}$. O complexo isocianopropionato pode ser considerado um modelo promissor para os precursores radiofarmacêuticos [42].

CHAN et al. (2010) investigaram a eficácia terapêutica de um novo nanocarregador ^{188}Re -N,N-bis(2-mercaptoetil)-N',N'-dietiletilenodiamina (BMEDA) utilizado para localizar seletivamente locais com células cancerígenas e transportar moléculas tanto no diagnóstico quanto na terapia. O efeito terapêutico em ratos portadores de tumores tratados com o nanocarregador ^{188}Re -DXR-lipossoma mostrou sobrevida maior (74 dias) do que aqueles tratados apenas com o radiofármaco ^{188}Re -lipossoma (60 dias) [43].

FRENCH et al. (2010) analisaram a utilização de nanopartículas/nanocarregadores para facilitar a distribuição do radiofármaco através de uma bomba de infusão para terapia em ratos portadores de câncer de língua. Compararam este método de terapia (utilizando nanocarregador) com os que utilizaram apenas ^{186}Re -perrenato e ^{186}Re (^{186}Re -N,N-bis[2-mercaptoetil]-N',N'-dietil-etilenodiamino BMEDA). Concluíram que os ratos tratados com as nanopartículas lipossomais apresentaram efeitos colaterais mínimos e que o volume tumoral reduziu consideravelmente comparando com os outros métodos utilizados [44].

BOX et al. (2011) demonstraram através de um estudo realizado em ratos portando um modelo de glioma que a radiação fracionada interna utilizando LNC¹⁸⁸Re-SSS desencadeia respostas notáveis de sobrevivência. Realçaram também a importância do gradiente de atividade em estimular respostas imunes, sistema este que desempenha um papel na eficácia do tratamento, podendo assim apresentar uma nova alternativa interessante para o tratamento de tumores sólidos, tal como o glioblastomas [45].

LIEPE et al. (2011) caracterizaram a resposta do pulmão (pneumopatia) após administração intravenosa de microesferas marcadas com ¹⁸⁸Re em ratos portadores de tumor hepático. A taxa de respiração é um parâmetro sensível para quantitativamente avaliar a incidência de pneumonite bem como pneumopatia fibrótica (devido à radiação tardia). O estudo demonstrou que a toxicidade pulmonar de terapias com radionuclídeos podem ser medidas através da taxa de respiração como resposta funcional clinicamente relevante. A incidência da resposta é diretamente dependente da dose que o pulmão recebe, esta definirá o comprometimento da função pulmonar, porém, conclusões sobre tolerâncias devem ser validadas com estudos clínicos adicionais [46].

TANG et al. (2011) estudaram um novo complexo tetradentado N-[2-(trifenilmetil)tiotilo]-3-AZA-19-etiloxicarbonilo-3-[2-(trifenilmetil)tioetilo] octadecanoato (H3MN-16ET) marcado com ¹⁸⁸Re utilizando lipiodol (¹⁸⁸Re-MN-16ET lipiodol) em ratos portadores de carcinoma hepatocelular. Através do SPECT/CT avaliaram a distribuição do radiofármaco e constataram que o ¹⁸⁸Re-MN-16ET lipiodol teve uma elevada acumulação no tumor e mostrou ser um potente radiofármaco terapêutico para o hepatoma [19].

LI et al (2011) sintetizaram uma nova marcação do peptídeo RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) com ¹⁸⁸Re utilizando uma sonda dupla (QDS) para radioterapia de câncer. Concluíram que esta sonda de modalidade dupla pode visualizar de forma não invasiva o tumor, verificando sua biodistribuição e efeito terapêutico. [47].

LEPAREUR et al. (2011) descreveram a otimização da formulação de um Kit para a marcação do ^{188}Re -SSS/Lipiodol com alta atividade. Para a produção de rotina do ^{188}Re -SSS/Lipiodol, um procedimento automatizado também foi desenvolvido para se obter atividade elevada não fornecendo altas doses radioativas para o operador [48].

DIAS et al. (2011) estudaram a radiomarcção direta do anticorpo CD20 (rituximab) utilizado em terapia de linfoma não-Hodgkin utilizando $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - e ^{188}Re - tricarbonila potencializando a eficácia terapêutica do anticorpo. Concluíram que o rituximab poderia ser marcado diretamente e de forma estável com $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$ com a técnica da carbonila com retenção da atividade biológica [49].

ANDREANA et al. (2012) descreveram as vantagens e limitações em terapias utilizando ^{131}I , ^{90}Y e ^{188}Re no tratamento do carcinoma hepatocelular (HCC), onde também realizaram comparações da técnica que utiliza a radio-embolização trans-arterial (TARE) com outras técnicas intra arterial [50].

TAVARÉ et al. (2012) descreveram diversas informações sobre a concepção e modo de ligação do ^{188}Re tricarbonila. Neste estudo verificaram a inclusão da Cisteína (cys) que melhora a marcação, pois está diretamente envolvida na coordenação e reduz o número de isômeros formados. O intuito desta inclusão é proporcionar sequencias otimizadas de marcação direta de proteínas com $[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ e $[^{186/188}\text{Re}(\text{CO})_3]^+$ [51].

CHEN et al. (2012) relataram a comparação da radiomarcção da nanopartícula ^{188}Re -lipossoma e o 5-fluorouracilo (5-FU) para tratamento de metástases malignas de pulmão e câncer de cólon através de administração intravenosa, investigando a dosimetria, biodistribuição, farmacocinética, e eficácia terapêutica de ambos radiofármacos [52].

1.6 Fosfonatos na Medicina Nuclear

As primeiras publicações sobre os efeitos dos Difosfonatos mais tarde denominados Bifosfonatos (*BFs*) apareceram em 1969, desde então diversos *BFs* tem sido estudados no homem, vários obtiveram o status “blockbuster” com vendas superiores a 1 bilhão de dólares. Cada BF tem um único perfil em termos de efeitos minerais, efeitos vinculativos e celulares o que explica possíveis diferenças clínicas entre eles.

O etidronato foi o primeiro BF utilizado, originalmente sintetizado há mais de 100 anos atrás. O uso inicial dos *BFs* foi principalmente como inibidores de corrosão, agentes complexantes em indústrias de fertilizantes, têxtil, óleo e outros processos industriais. A descoberta dos efeitos biológicos tem sua origem em estudos de mecanismos de calcificação e do papel do pirofosfato que, quando ocorrem determinados distúrbios no metabolismo, tem papel importante em várias doenças [53].

Os bifosfonatos são análogos sintéticos do Pirofosfato endógeno, nos quais um átomo de carbono toma lugar do átomo central de oxigênio. Esta substituição confere uma maior estabilidade, sendo resistente a hidrólise enzimática pelos osteoclastos. Ao lado do átomo de carbono, foram adicionadas duas cadeias laterais de estrutura variável. Uma destas cadeias contém hidroxila, a qual tem uma alta afinidade por cristais de cálcio e mineral ósseo. A outra cadeia produz marcadas diferenças no potencial de reabsorção de diferentes bifosfonatos.

O Clodronato é um bifosfonato de 1ª geração já utilizado em composições de fármacos comercializados e utilizados como um dos principais agentes no tratamento de diversas patologias ósseas e/ou como potente paliativo de dor óssea, se mostrando ser bastante eficaz e resultando em mudanças significativas em pacientes tratados com este bifosfonato.

Estudos realizados mostraram que o Clodronato parecer ser capaz de imitar de forma mais precisa e semelhante o pirofosfato endógeno. Foi

1.6.1 Marcação dos bifosfonatos com ^{188}Re

MATHIEU et al (1979) indicaram pela primeira vez o HEDP (ácido-1-hidroxietilideno-1,1-difosfônico) como possível agente terapêutico no tratamento de neoplasmas ósseos marcado com o radioisótopo ^{186}Re . A radiomarcagem do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HEDP para exames de cintilografia óssea serviu de base para o ^{186}Re -HEDP [57].

Durante a década de 80, estudos sobre a radiomarcagem de fosfonatos com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ foram conduzidos para a aquisição de imagens ósseas. Na formação dos complexos, a influência das condições experimentais foi verificada, como o tipo de agente redutor (NaBH_4 : borohidreto de sódio e SnCl_2 : cloreto estânico), a adição de carregador, além da biodistribuição *in vivo* em ratos [13].

EINSENHUT (1982) após preparação do ^{186}Re -MDP formado pela redução com SnCl_2 , testou sua afinidade óssea em coelho. A marcação mostrou-se dependente do pH, o complexo ^{186}Re -MDP quase não se formou em pH neutro enquanto em pH 1,4 92,6% do radionuclídeo foi complexado com o MDP [58].

LIN et al. (1997) apresentaram resultados de biodistribuição do ^{188}Re -HEDP: alta captação seletiva no esqueleto e nas lesões ósseas, baixa captação para o tecido não-alvo e rápida depuração. A razão osso/músculo inicialmente foi 18,96 e após 24 horas de 79,28. Já a concentração no tecido ósseo da espinha torácica após 4 horas da injeção expressa em %DI (Dose injetada) /g foi de $2,02 \pm 0,25\%$ e com 24 horas $1,43 \pm 0,31\%$ [59].

HISIEH et al. (1999) mostraram comparações realizadas entre os fosfonatos MDP, HEDP e HDP marcados com ^{188}Re , através de estudos *in vivo*, para que fosse escolhido a melhor forma de tratamento para metástase óssea. Concluíram que o HEDP é a melhor escolha pois pode se acumular no tecido ósseo, já com MDP e HDP não houve nenhuma captação óssea significativa com ou sem o uso de carregador [16].

HASHIMOTO (1999) investigaram a marcação de derivados do EDTMP marcados com ^{188}Re como o EDBMP (ácido-etileno-diamino-N,N-bis-metileno-fosfônico) e o NTMP (ácido-nitrilo-tris-metileno-fosfônico). Verificou-se que a estabilidade foi influenciada pelas condições de sua formação, tais como a temperatura, pH e adição de um carregador [60].

QINGNUAN et al. (2000) estudaram a síntese do ^{188}Re -AEDP (ácido-1-amino-etileno-difosfônico) onde a concentração do AEDP, pH e carregador foram examinados. Em condições ideais os rendimentos de marcação de ^{188}Re -AEDP livre de carregador foi de 92-93%, e com o carregador foi de 95-98%. Pode-se verificar que o carregador tem um efeito significativo sobre a estabilidade do ^{188}Re -AEDP e que o mesmo é um potencial radiofármaco paliativo para o osso uma vez que possui alta absorção do esqueleto e baixa absorção em tecidos moles [61].

BANERJEE et al (2001) relataram a síntese de derivados do ácido tetrafosfônico, como o EDTMP (etileno-diamino-tetrametileno-fosfonato), o DTPMP (dietileno-triamino-pentametileno-fosfonato) e o HMDTMP (hexametileno-diamino-tetrametileno-fosfonato), bem como a sua marcação com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e $^{186}\text{Re}/^{188}\text{Re}$ com a finalidade de avaliar a eficácia da preparação do radiofármaco. Após padronização para proporcionar rendimentos máximos e testes de biodistribuição *in vivo*, pode-se observar que a marcação dos complexos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ variaram dependendo dos ligantes e a captação em tecidos moles foi mínima [62].

MURPHY et al. (2001) estudaram um novo bifosfonato (ABP alendronato) marcado com ^{188}Re reduzido com SnF_2 para terapia de metástase óssea. Após todos os testes realizados concluíram que este é um potente e promissor radiofármaco paliativo para dor de metástases óssea [17].

LISIC et al. (2001) estudaram a síntese de um novo bifosfonato SEDP (2-sulfonato-1-ácido bifosfônico etilideno) que foi marcado de forma idêntica ao ^{188}Re -HEDP. Após biodistribuição *in vivo* observaram que o composto ^{188}Re -SEDP mostrou uma maior captação óssea [63].

PERVEZ et al. (2003) estudaram a preparação do ^{188}Re -EDTMP tendo como base os radiofármacos marcados com ^{153}Sm e o ^{166}Ho que vem recebendo considerável atenção para o tratamento terapêutico de metástases óssea. O rendimento de marcação do ^{188}Re -EDTMP em condições ideais foi de 98%, foram observados o tempo de incubação, pH e a adição ou não de carregador. A biodistribuição foi realizada *in vivo* e os resultados mostraram que o ^{188}Re -EDTMP é um potente paliativo na dor óssea, pois apresentou alta absorção no tecido alvo, depuração rápida do sangue e relativamente baixa absorção em tecidos moles [64].

BANERJEE et al. (2004) investigaram radiofármacos projetados para uso como paliativo na dor óssea marcados com ^{177}Lu , ^{153}Sm , ^{175}Yb e ^{186}Re : $^{186/188}\text{Re}$ -CTMP, ^{177}Lu -DOTMP, ^{175}Yb -EDTMP, ^{153}Sm -DOTMP, e ^{153}Sm -EDTMP. Eles foram preparados com alta pureza radioquímica (>98%) e condições ideais e todos os complexos radiomarcados apresentaram excelente estabilidade. Concluíram após o estudo de biodistribuição *in vivo* que tinham alto potencial para o tratamento paliativo da dor óssea com absorção mínima em outros órgãos, apresentando maior captação óssea para o ^{177}Lu -DOTMP e menor para ^{186}Re -CTMP [65].

MITTERHAUSER et al. (2004) compararam a marcação de um kit de EDTMP Multibone com radionuclídeos diferentes ^{188}Re , ^{111}In e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ para avaliar as condições da absorção óssea [66].

EL-MABHOUH (2004) avaliaram a capacidade dos bifosfonatos DTPA/BF (ácido-dietileno-triamino-penta-acético) e o 5-FU/BF (5-fluor-uracil) de se ligar ao ^{188}Re , seletivamente e atingirem o alvo (osso). Utilizaram como padrão o ^{188}Re -HEDP para avaliarem os resultados que se apresentaram satisfatórios e potenciais para a terapia de metástases ósseas [18].

OGAWA et al. (2006) desenvolveram um radiofármaco para o tratamento paliativo de metástases ósseas dolorosas com base no conceito de radiofármaco bifuncional e sintetizaram um derivado bifosfonato marcado com ^{186}Re que contém um grupo hidroxila no carbono central da

sua estrutura com bisfofonato, ^{186}Re -MAMA-HBP. Observaram que quando administrado em ratos, ^{186}Re -MAMA-HBP mostrou alta afinidade por ossos, sendo que a maior radioatividade se concentrou no fêmur se comparado com ^{186}Re -HEDP ou ^{186}Re -MAMA-BP [67].

MABHOUH et al. (2008) investigaram a afinidade de ligação e biodistribuição do gemcitabina/bifosfonatos (Gem/BP conjugado) marcados com ^{188}Re uma droga multifuncional designada para atingir um tumor específico combinando radioterapia e quimioterapia no osso, utilizando a alta afinidade de ligação óssea ao grupo de biofosfonatos. Concluíram que o ^{188}Re -Gem/BP mostrou elevada, seletiva e persistente ligação óssea e pode ser considerado como um modelo composto para terapia multifuncional específica para metástase óssea [68].

LAM et al (2009) estudaram a combinação do ^{188}Re -HEDP à capecitabina em pacientes com câncer de próstata refratário. Concluíram que a capecitabina pode ser utilizada com segurança em combinação com o ^{188}Re -HEDP, porém a eficácia será aprofundada em outra fase dos estudos [69].

LIEPE et al (2009) estudaram a autoradiografia de ^{188}Re -HEDP em esqueleto normal e com metástase óssea osteoblástica em um modelo de rato com câncer de próstata metastático, com o intuito de quantificar a dose de radiação absorvida em terapia de radionuclídeos [70].

ROSALES et al (2010) descreveram a síntese do $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$ -dipicolylamine (DPA) e alendronato bifosfonato bifuncional para paliativo e tratamento de metástases ósseas. $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$ -DPA-alendronato é facilmente sintetizado com alta atividade específica apresentando um rendimento de marcação de 96%. Comprovaram através de imagem *in vivo* que a biodistribuição do $^{188}\text{Re}(\text{CO})_3$ -DPA-alendronato é superior a do ^{188}Re -HEDP [71].

1.7 Ossos – Função e Arquitetura

O sistema esquelético é tão importante para a vida quanto qualquer outro sistema orgânico devido a seu papel essencial no suporte mecânico e hematopoéticos, protege as vísceras e determina o tamanho e o formato corporal. O sistema esquelético é composto de 206 ossos de tamanho e formato variados (tubular, plano, cuboidal). Os ossos são interconectados por uma variedade de articulações que permitem uma ampla variedade de movimentos mantendo a estabilidade estrutural [72]. A FIG. 6 demonstra alguns ossos que compõe todo o sistema esquelético.

FIGURA 6 – Imagem de alguns exemplos de ossos que compõe o esqueleto [73]

1.7.1 Tumores Metastáticos no Esqueleto

Os tumores metastáticos são a forma mais comum de malignidade esquelética. As vias de propagação incluem (1) extensão direta, (2) disseminação linfática ou vascular (plexo venoso de Batson), e (3) semeadura dentro do canal vertebral. Carcinomas de mama, próstata, rim, pulmão e tireóide são as fontes mais comuns que, em geral, alcançam o esqueleto através do sistema vascular. Em adultos, mais de 75% das metástases esqueléticas originam-se de cânceres de próstata, mama, rim e pulmão. Os tumores que se propagam para o osso em crianças incluem neuroblastoma, tumor de Wilms, osteossarcoma, sarcoma de Ewing e rabdomiossarcoma. Na FIG. 7 pode-se observar os principais locais de origem dos osteossarcomas.

FIGURA 7 – Imagem dos principais ossos que apresentam maior incidência na manifestação dos osteossarcomas. Os números entre parênteses representam percentuais aproximados [74].

As metástases esqueléticas são tipicamente multifocais. Entretanto, os carcinomas do rim e da tireóide são conhecidos por produzirem lesões solitárias. As metástases podem ocorrer em qualquer osso, mas a maioria acomete o esqueleto axial (coluna vertebral, pelve, costelas, crânio, esterno), o fêmur proximal e o úmero, em ordem decrescente de frequência. A medula vermelha nessas áreas, com sua rica rede capilar, seu fluxo sanguíneo lento e o meio ambiente nutricional, facilita a implantação e o crescimento das células tumorais. A FIG. 8 ilustra o processo de metástase através da corrente circulatória.

FIGURA 8 – Imagem do espalhamento do câncer através da corrente sanguínea [75]

As metástases para os pequenos ossos das mãos e dos pés são muito raras e originam-se habitualmente em cânceres do pulmão, rim ou de cólon [76].

1.7.2 Sintomas do Câncer Ósseo

Existem três sintomas principais exibidos pelos tumores ósseos: dor, presença de massa e comprometimento da função. A dor é uma característica comum a quase todos os tumores malignos, mas pode ocorrer ou não com os tumores benignos. Por exemplo, um cisto ósseo benigno geralmente é assintomático, até que ocorra fratura. A dor que persiste à noite e não é aliviada pelo repouso sugere malignidade. Massa ou caroço duro podem ser o primeiro sinal de tumor ósseo. Deve-se suspeitar de tumor maligno, quando existir uma massa dolorosa que se encontra aumentando ou provocando a erosão do córtex do osso. A facilidade de descobrir massa depende da localização do tumor. Um caroço pequeno que surge na superfície da tíbia é fácil de ser detectado, mas um tumor profundo na porção medial da coxa pode crescer até um tamanho considerável, antes de ser observado. Os tumores benignos e malignos podem corroer o osso até o ponto em que este não mais suporta o esforço do uso comum. Em tais casos, mesmo pequena quantidade de esforço no osso ou traumatismo precipita fratura patológica. Um tumor pode produzir pressão sobre o nervo periférico, causando a diminuição da sensação, dormência, claudicação ou limitação de movimento [77]. A FIG. 9 mostra metástases de tumores secundários que ao se infiltrar nos ossos aos poucos os danifica.

FIGURA 9 – Imagem da infiltração e dano ósseo causado por metástases [78]

Os principais objetivos do tratamento da doença óssea metastática são prevenir fraturas patológicas e promover a sobrevida com o máximo de preservação de função, permitindo que o paciente mantenha o máximo possível de mobilidade e controle da dor. Os métodos de tratamento consistem em quimioterapia, irradiação e estabilização cirúrgica. A irradiação local permite que haja o rápido alívio da dor, e quando agindo em conjunto com os bifosfonatos aliviam de forma muito significativa os sintomas, permitindo também que ocorra a cicatrização do osso e retarda complicações.

1.8 Dor – Conceitos básicos

Segundo o comitê de taxonomia da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) a dor é conceituada como “ experiência sensitiva e emocional desagradável decorrente ou descrita em termos de lesões reais e potenciais”, e pode ser classificada de acordo com as características da lesão:

- ❖ Dor nociceptiva – Causada por estímulos dos nociceptores que pode ser somática ou visceral dependendo da região;
- ❖ Dor neuropática – Causada por injúria neural geralmente referida pelo paciente como sensação de queimação, choque ou formigamentos;
- ❖ Dor psicogênica – Quando há predomínio de fatores psicológicos;
- ❖ Dor mista – Envolve os 3 tipos anteriores, tendo como exemplo a dor oncológica

Há um aumento significativo no mundo médico científico nos estudos relacionados a dor, e a importância no controle e tratamento da dor ocorre por diversos fatores. Primeiro, a alta incidência como que a dor atinge a população aliada ao sofrimento que provoca aos indivíduos. Cerca de aproximadamente 1/3 da população mundial um dia sofrerá algum tipo de dor. No Brasil, os indivíduos que procuram o serviço de saúde tendo como dor o sintoma principal chega a 70%, e ocorrem em torno de 300 mil novos casos de câncer por ano, e destes 70% sentiram dores em algum estágio da doença.

A dor altera os neurotransmissores tendo relação direta com a depressão e sofrimento. O estímulo doloroso deprime o sistema imunológico, predispondo outras enfermidades.

Ao ser responsável por gerar o afastamento do trabalho de muitos pacientes, as síndromes dolorosas interferem diretamente no setor econômico, pois quem sente dor não produz, pelo contrário, gasta mais recursos financeiros [79].

1.8.1 Dor Oncológica

A maior parte dos pacientes portadores de câncer apresentam dores em determinada fase da doença, e quando esta se encontra em estado avançado o principal objetivo da equipe de saúde é aliviar a dor e outros sofrimentos decorrentes da doença, proporcionando uma melhora na qualidade de vida destes pacientes.

A dor oncológica exige um controle e tratamento adequados. As principais causas da dor oncológica são:

- 78% dos casos – Invasão tumoral dos tecidos (principalmente metástases ósseas)
- 19% dos casos – Cirurgia, quimioterapia e radioterapia
- 3% dos casos – Outras causas não relacionadas com a doença base [79]

1.8.2 Dor na Metástases Ósseas

A dor aguda ou crônica é um problema de difícil manejo na prática clínica em Oncologia. Como já informado 78% dos pacientes a dor está relacionada à infiltração tumoral de estruturas sensíveis, como músculos, vísceras, nervos periféricos e ossos.

A dor óssea relacionada ao crescimento metastático tumoral é considerada como a mais freqüente síndrome intratável do câncer e, entre outros fatores, associa-se à compressão e invasão do periósteo, que é rico em inervação nociceptoras, à instabilidade óssea secundária a fraturas e ao desencadeamento de fenômenos inflamatórios em estruturas adjacentes. Toda vez que o tumor aparece nos ossos, o crescimento celular desregulado gera uma pressão interna e estimula a liberação de substâncias que provocam dor [79].

2 Justificativa/Objetivos

A Diretoria de Radiofarmácia do IPEN-CNEN/SP (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Comissão Nacional de Energia Nuclear / São Paulo) tem um programa de desenvolvimento de novos radiofármacos destinados à classe médica brasileira. Dentro deste programa estão as moléculas marcadas com ^{188}Re , que tem interesse também da IAEA (International Atomic Energy Agency / Agência Internacional de Energia Atômica) através de um CRP (Coordinated Research Program / Programa de Pesquisa Coordenada) denominado “Development of Therapeutic Radiopharmaceuticals based on ^{188}Re and ^{90}Y for Radionuclide Therapy”. Além disso, uma das moléculas a ser estudada, o clodronato tem um interesse em particular do Prof. Dr. Reto Schwendener da Universidade de Zurich, na Suíça, que hoje desenvolve esta molécula como um quimioterápico no tratamento de metástases ósseas. O trabalho será desenvolvido como sugestão desse grupo.

O objetivo deste trabalho é comparar a radiomarcagem dos bifosfonatos MDP, EDTMP e Clodronato com ^{188}Re utilizados para terapia de tumores ósseos e como paliativo de dores ósseas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Infraestrutura

Para a realização deste trabalho foram utilizadas as instalações da Diretoria de Radiofarmácia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares / Comissão Nacional de Energia Nuclear de São Paulo (DIRF - IPEN – CNEN/SP).

3.2 Materiais, Reagentes e Equipamentos

As principais matérias primas utilizadas foram:

- MDP – MP Biomedicals LLC E.U.A
- EDTMP – ABX Germany
- Clodronato – Gentilmente fornecido pelo Prof. Dr. Reto Schwendener da Universidade de Zurich, na Suíça
- ^{188}Re – Obtido através do Gerador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ – POLATON

Os materiais utilizados foram:

- Suporte universal e vidrarias;
- Agulhas e Seringas
- Papel indicador de pH;
- Frascos para eluição com solução NaCl 0,9%
- Frascos em vácuo para eluição
- Cromatografia em camada delgada
- Tubo Capilar para determinação de micro-hematócrito
- Cartuchos comerciais catiônicos (Maxi-Clean IC-Ag da Alltech)

- Cartuchos aniônicos (Acell™ Plus QMA Light da Waters)

Os reagentes utilizados nos experimentos foram:

- Acetona PA (Merck)
- Solução Salina 0,9% (Soreq Radiopharmaceuticals)
- Cloreto Estanoso >95% (Quimex)
- Ácido Clorídrico 37% (Merck)
- Hidróxido de Sódio (Merck)
- Nitrogênio Gasoso (White Martins)

Os principais equipamentos utilizados foram:

- Estufa com microprocessador de controle da temperatura – Orion 515 Fanem;
- Vortex;
- Espectroscopia gama com detector de Ge hiperpuro – GX 1518 Canberra, acoplado ao programa Geniepc para tratamento de dados;
- Calibrador de doses – CRM 35R – Capintec
- Balança analítica – M-220 Denver Instrument Company
- Chapa de aquecimento com agitador

3.3 Metodologia de Marcação

3.3.1 MDP

Para iniciar o processo da otimização das marcações dos fosfonatos foram utilizadas como valores padrão iniciais quantidades de massas e condições de marcação já estabelecidas e determinadas a partir de algum trabalho já realizado.

No preparo do ^{188}Re -MDP foi estabelecido inicialmente através da bula do Kit MDP produzido no IPEN para a marcação com $^{99\text{m}}\text{Tc}$, onde as massas utilizadas foram: 10 mg MDP, 1,2 mg de cloreto estanoso (utilizado como agente redutor) e 2 mg de ácido ascórbico [80].

Após pesagens das massas, o MDP e o ácido ascórbico foram dissolvidos em 5 mL de NaOH 2 mol.L⁻¹, e esta solução então foi transferida para o frasco contendo o cloreto estanoso, e após a dissolução total a amostra sofreu nitrogenação por 15 minutos. Após este procedimento, o eluido (1mL) do gerador ¹⁸⁸W/¹⁸⁸Re foi adicionado ao frasco contendo os reagentes citados e a marcação ocorreu por 15 minutos em temperatura ambiente e pH 1. As variáveis estudadas foram:

- Massa do MDP: 3, 6 e 10 mg;
- Massa do SnCl₂.2H₂O: 5, 7, 10 e 11 mg;
- Massa do ácido ascórbico: 1, 3, 5 e 6 mg;
- Tempo de reação: 15, 30, 60, 120 e 360 minutos;
- pH: 1 e 1,5;
- Temperatura: ambiente e gelo seco.

Após se obter as melhores condições de marcação do ¹⁸⁸Re-MDP foi realizado um estudo de estabilidade onde pode ser observado o quanto este marcado se manteve estável entre o tempo de 0,25 minutos até 72 horas após a marcação.

3.3.2 EDTMP

O preparo do ¹⁸⁸Re-EDTMP foi estabelecido inicialmente de acordo com o procedimento de Pervez et al (2003) [64] entretanto a quantidade de massas foram aumentadas em 5 vezes mais, ou seja: 150 mg EDTMP, 10 mg de cloreto estanoso e 50 mg de ácido ascórbico.

Após pesagens das massas, o ácido ascórbico foi dissolvido em 5 mL de HCl 0,1 mol.L⁻¹, em seguida esta solução foi transferida para o frasco contendo a massa do SnCl₂. O EDTMP foi dissolvido em 2 mL de NaOH 2 mol.L⁻¹ e 1 mL desta solução foi misturada com 1 mL da solução anterior sendo posteriormente nitrogenada por 10 minutos. Após este procedimento, o eluido (1mL) do gerador ¹⁸⁸W/¹⁸⁸Re foi adicionado ao

frasco contendo os reagentes citados e a marcação ocorreu por 15 minutos em temperatura ambiente e pH foi ajustado para 2 com 150 μL de HCl 37% antes da marcação. As variáveis estudadas foram:

- Massa do EDTMP: 30, 50 e 60 mg;
- Massa do $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 4, 8 e 12 mg;
- Massa do ácido ascórbico: 10, 20 e 30 mg;
- Tempo de reação: 15, 30, 60 e 90 minutos;
- pH: 1, 2 e 3,5;
- Temperatura: ambiente, 50 e 100°C.

3.3.3 CLODRONATO

Por ainda não haver trabalhos realizados de marcação do Clodronato com o ^{188}Re o experimento inicial foi baseado em trabalhos realizados com o MDP. As massas utilizadas foram: 15 mg de Clodronato, 6 mg de ácido ascórbico e 9 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. O procedimento de marcação foi o mesmo utilizado para o MDP. As variáveis estudadas foram:

- Massa do Clodronato: 5, 10, 15, 20 e 25 mg;
- Massa do $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 1, 2, 3 e 5 mg;
- Massa do ácido ascórbico: 1 e 2, mg;
- Tempo de reação: 30, 60 e 90 minutos;
- pH: 1 e 3;
- Temperatura: ambiente, 50 e 100°C.

3.4 Controle de Qualidade

3.4.1 Pureza Radioquímica

As impurezas radioquímicas são determinadas por métodos analíticos, tais como cromatografia em papel (CP), em camada delgada (CCD), em gel, troca iônica, eletroforese ou extração com solventes e CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).

A Farmacopéia Européia estipula que mais de 95% da atividade de um radionuclídeo deverá corresponder à forma química desejada.

A CP ou CCD pode tanto ser do tipo ascendente ou descendente. Nestes modelos cromatográficos cada componente numa dada amostra é caracterizado por um valor de R_f (Fator de Retenção), que é definido como a razão entre distância percorrida pelo componente para a distância que a frente do solvente avançou a partir do ponto inicial da aplicação do material teste. Estes valores de R_f s são usados principalmente para a identificação dos diferentes componentes de uma determinada amostra. Quando a frente do solvente se move até o ponto desejável as fitas são retiradas das cubas/câmaras e após secarem são divididas em vários segmentos dependendo do radiofármaco e do estudo em questão podendo chegar a 10 partes. No caso do $^{188}\text{Re-BF}$ a fita foi cortada em 2 partes e a radioatividade de cada segmento foi medida através de um contador apropriado, neste trabalho o detector de Ge HP.

Neste trabalho a pureza radioquímica dos 3 fosfonatos (MDP, EDTMP e Clodronato) marcados foi determinada através da CCD em cromatografia em camada fina – sílica gel (TLC – SG), onde a amostra do produto é aplicada sobre um campo determinado da fita cromatográfica (fase estacionária) e arrastada por um solvente (fase móvel). Neste estudo os solventes foram acetona e NaCl 0,9% como se pode observar na FIG. 10.

FIGURA 10 – Separação das espécies utilizando processo cromatográfico [81]

Foi escolhido este método de avaliação de pureza radiquímica para a realização deste trabalho pois este tipo de cromatografia é relativamente rápida levando apenas alguns minutos.

A TAB. 2 demonstra os valores do fator de retenção (R_f) de cada espécie:

TABELA 2 – Valores do Fator de Retenção (R_f) das diferentes espécies do ^{188}Re

Espécie	Acetona	NaCl 0,9%
	R_f	R_f
$^{188}\text{Re} - \text{MDP} / \text{EDTMP} / \text{Clodronato}$	0	1
$^{188}\text{ReO}_4^-$	1	1
$^{188}\text{ReO}_2$	0	0

Foram realizados experimentos para comprovar os valores dos R_f usando como amostras o $^{188}\text{ReO}_4^-$ eluído do gerador, $^{188}\text{ReO}_2$ proveniente da adição de grandes massas de agente redutor ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ao ReO_4^- e o

bifosfonato marcado. O valor da pureza radioquímica reflete também o rendimento de marcação.

Após a corrida, as fitas foram cortadas de 1 em 1 cm e a atividade do ^{188}Re foi medida em um detector de Ge Hiperpuro.

3.5 Concentração do ^{188}Re utilizando sistemas de cartuchos [82]

O sistema de concentração é essencial para aumentar consideravelmente a vida útil do gerador, a partir do momento que as eluições apresentarem atividades em grandes volumes, impossibilitando as marcações dos agentes terapêuticos [11]. O gerador disponível para utilização no presente projeto a partir de um momento apresentou atividade muito baixa, sendo necessário então o uso do sistema de concentração em série onde cartuchos comerciais catiônicos (Maxi-Clean IC-Ag da Alltech) seguidos de cartuchos aniônicos (Acell™ Plus QMA Light da Waters) foram conectados e seguiram dois estágios: um de retenção e outro de liberação de ^{188}Re .

Os dois cartuchos foram condicionados com 20 mL de água cada um separadamente, em seguida foi realizada passagem de vácuo para secar. O gerador de ^{188}Re é normalmente eluído com solução de NaCl 0,9% e esta solução então foi passado pelo cartuchos conectados. No cartucho catiônico é retido o cloreto na forma insolúvel do cloreto de prata. O ânion perrenato então é retido na coluna aniônica e o efluente do eluído é descartado. Um volume de solução de NaCl 0,9% é usado para eluir o ^{188}Re , a atividade deste concentrado foi medida no calibrador de doses Capintec para avaliar o efeito de concentração [82].

Este procedimento foi utilizado para a realização de parte dos experimentos de marcação do ^{188}Re – EDTMP e do ^{188}Re – Clodronato.

4 Resultados e Discussão

4.1 Pureza Radioquímica

As FIG. 11, 12, 13, 14, 15 e 16 mostram os cromatogramas das diferentes espécies do ^{188}Re nos 2 sistemas cromatográficos empregados.

FIGURA 11 – Cromatograma do $^{188}\text{ReO}_4^-$ em Solvente Acetona

FIGURA 12 – Cromatograma do $^{188}\text{ReO}_4^-$ em Solvente NaCl 0,9%

FIGURA 13 – Cromatograma do $^{188}\text{ReO}_2$ em Solvente Acetona

FIGURA 14 – Cromatograma do $^{188}\text{ReO}_2$ em Solvente NaCl 0,9%

FIGURA 15 – Cromatograma do MDP marcado com ^{188}Re em Solvente Acetona

FIGURA 16 – Cromatograma do MDP marcado com ^{188}Re em solvente NaCl 0,9%

Através dos cromatogramas se comprova o R_f das espécies conforme mostrado na TAB. 2, mostrando que é possível cortar a fita pela metade para avaliar o rendimento de marcação dos fosfonatos e as impurezas.

4.2 Marcação dos Fosfonatos

4.2.1 MDP

As FIG. 17, 18, 19, 20, 21 e 22 mostram as variações da massa do MDP, massa do $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, tempo de reação, pH e temperatura no rendimento de marcação do ^{188}Re -MDP, respectivamente.

FIGURA 17 – Variação da massa do MDP na marcação com ^{188}Re nas condições: SnCl_2 5 mg, ácido ascórbico 3 mg, tempo de reação de 30 min e pH 1

FIGURA 18 – Variação da massa do SnCl_2 na marcação do MDP com ^{188}Re nas condições: Massa do MDP 10 mg, ácido ascórbico 3 mg, tempo de reação de 30 minutos e pH 1

Na FIG. 17 pode-se observar que a melhor massa encontrada foi de 10 mg (igualmente ao informado na bula do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP produzido no IPEN [80]), e na FIG. 18 a melhor massa de $\text{SnCl}_{2.2}\text{H}_2\text{O}$ foi de 5 mg para um bom rendimento de marcação. É sempre preferível reduzir as massas, em particular do agente redutor.

FIGURA 19 – Variação da massa do Ácido Ascórbico na marcação do MDP com ^{188}Re nas condições: Massa do MDP 10 mg, SnCl_2 5 mg, tempo de reação de 30 min e pH 1

FIGURA 20 – Variação do tempo de reação na marcação do MDP com ^{188}Re nas condições: Massa do MDP 10 mg, SnCl_2 5 mg, ácido ascórbico 3 mg, e pH 1

A FIG. 19 mostra que a melhor massa do ácido ascórbico encontrada foi de 3 mg (a formulação do kit do ^{99m}Tc – MDP [80] usa ácido paraminobenzóico, e neste trabalho o ácido ascórbico foi usado e apresentou bom comportamento na marcação). Na FIG. 20 pode-se observar que o melhor tempo de reação encontrado foi de 30 minutos, além de mostrar a estabilidade do produto.

FIGURA 21 – Variação do pH na marcação do MDP com ^{188}Re nas condições: Massa do MDP 10 mg, SnCl_2 5 mg, ácido ascórbico 3 mg e tempo de reação: 30 min

FIGURA 22 – Variação de temperatura na marcação do MDP com ^{188}Re nas condições: Massa do MDP 10 mg, SnCl_2 5 mg, ácido ascórbico 3 mg, tempo de reação 30 min e pH 1

O melhor pH encontrado foi 1 conforme a FIG. 21 mostra. A marcação feita à temperatura ambiente teve ótimo rendimento, que se manteve em gelo seco. A bula da marcação do kit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ – MDP sugere a temperatura ambiente para a marcação [80]. Sempre se procura a marcação em condições mais amenas, como uso da temperatura ambiente.

Após se obter as melhores condições de marcação do ^{188}Re -MDP um estudo de estabilidade também foi realizado como se observa na FIG. 23.

FIGURA 23 – Estabilidade do ^{188}Re -MDP

A FIG. 23 demonstra que mesmo 72 horas após a marcação o produto permaneceu sem grandes alterações, indicando que o ^{188}Re -MDP é bastante estável.

4.2.2 EDTMP

As FIG. 24, 25, 26, 27, 28 e 29 mostram as variações da massa do EDTMP, massa do $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, tempo de reação, pH, temperatura no rendimento marcação do ^{188}Re -EDTMP respectivamente

FIGURA 24 – Variação da massa do EDTMP na marcação com ^{188}Re nas condições: Massa do SnCl_2 8 mg, ácido ascórbico: 30 mg, tempo de reação 60 min, pH 2 em temperatura ambiente

FIGURA 25 – Variação da massa do SnCl_2 na marcação do EDTMP com ^{188}Re nas condições: Massa do EDTMP 50 mg, ácido ascórbico 30 mg, tempo de reação 60 min, pH 2 em temperatura ambiente

Na FIG. 24 pode-se observar que a melhor massa encontrada do EDTMP foi a de 50 mg, enquanto que Pervez et al [64] usaram 30 mg. A melhor massa do $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ encontrada foi de 8 mg como mostra a FIG. 25.

FIGURA 26 – Variação da massa do Ácido Ascórbico na marcação do EDTMP com ^{188}Re nas condições: Massa do EDTMP 50 mg, SnCl_2 8 mg, tempo de reação 60 min, pH 2 em temperatura ambiente

FIGURA 27 – Variação do tempo de reação da marcação do EDTMP com ^{188}Re nas condições: Massa do EDTMP 50 mg, SnCl_2 8 mg, ácido ascórbico 30 mg, pH 2 em temperatura ambiente

A melhor massa do ácido ascórbico foi de 30 mg conforme a FIG. 27 demonstra diferente de Pervez et al [64] que utilizaram 10 mg. O melhor tempo de reação foi de 60 minutos, discordante do encontrado pelo mesmo grupo, 15 minutos.

FIGURA 28 – Variação do pH na marcação do EDTMP com ^{188}Re nas condições: Massa do EDTMP 50 mg, SnCl_2 8 mg, ácido ascórbico 30 mg, tempo de reação 60 min em temperatura ambiente

FIGURA 29 – Variação da temperatura na marcação do EDTMP com ^{188}Re nas condições: Massa do EDTMP: 50 mg, SnCl_2 : 8 mg, ácido ascórbico: 30 mg, tempo de reação 60 min, pH 2 em temperatura ambiente

O melhor pH encontrado foi 2, e a melhor temperatura foi a ambiente. Tanto o pH como a temperatura são iguais às informadas no estudo realizado por Pervez et al [64].

4.3.3 Clodronato

As FIG. 30, 31, 32, 33, 34 e 35 mostram as variações da massa do Clodronato, massa do $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, tempo de reação, pH, e temperatura no rendimento marcação do ^{188}Re -Clodronato, respectivamente:

FIGURA 30 – Variação da massa do Clodronato na marcação com ^{188}Re nas condições: Massa do SnCl_2 3 mg, ácido ascórbico 2 mg, tempo de reação 60 min, pH 1 e temperatura: 100°C

FIGURA 31 – Variação da Massa do SnCl_2 na marcação do Clodronato com ^{188}Re nas condições: Massa do Clodronato 20 mg, ácido ascórbico 2 mg, tempo de reação 60 min, pH 1 e temperatura 100°C

A melhor massa do clodronato encontrado foi de 20 mg como mostra a FIG. 30, e a do cloreto estanoso foi de 3 mg como a FIG. 31 ilustra.

FIGURA 32 – Variação da massa do Ácido Ascórbico na marcação do Clodronato com ^{188}Re nas condições: Massa do Clodronato 20 mg, SnCl_2 3 mg, tempo de reação 60 min, pH 1 e temperatura 100°C

FIGURA 33 – Variação do Tempo de reação na marcação do Clodronato com ^{188}Re nas condições: Massa do Clodronato 20 mg, SnCl_2 3 mg, ácido ascórbico 2 mg, pH 1 e temperatura 100°C

A FIG. 32 mostra que a melhor massa do ácido ascórbico foi de 2 mg e o melhor tempo de reação encontrado foi o de 60 minutos conforme se observa na FIG. 33.

FIGURA 34 – Variação do pH na marcação do Clodronato com ^{188}Re nas condições: Massa do Clodronato 20 mg, SnCl_2 3 mg, ácido ascórbico 2 mg, tempo de reação 60 min e temperatura 100°C

FIGURA 35 – Variação da temperatura na marcação do Clodronato com ^{188}Re nas condições: Massa do Clodronato 20 mg, SnCl_2 3 mg, ácido ascórbico 2 mg, tempo de reação 60 min e pH 1

O melhor pH foi 1 e a temperatura mais adequada foi 100°C como mostram as FIG. 34 e 35.

De acordo com os resultados obtidos, a tabela 3 demonstra as melhores formulações encontradas para a marcação dos fosfonatos MDP, EDTMP E Clodronato com ^{188}Re .

TABELA 3 – Melhores formulações encontradas das marcações realizadas do MDP / EDTMP e Clodronato com ^{188}Re

Variáveis	MDP	EDTMP	Clodronato
Massa do ligante	10 mg	50 mg	20 mg
Massa do $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5 mg	8 mg	3 mg
Massa do Ácido Ascórbico	3 mg	30 mg	2 mg
T. de Reação	30 min	60 min	60 min
pH	1	2	1
Temperatura	Ambiente	Ambiente	100 °C
Rendimento de Marcação	98%	83%	85%

Os resultados para o MDP foram muito bons, porém estudos de biodistribuição *in vivo* para se confirmar este bom resultado seriam necessários e importantes para a visualização do produto atingindo seu objetivo específico que neste caso é o osso. Estudos adicionais seriam de fundamental importância para melhorar as condições de marcação do EDTMP, as condições encontradas que forneceram um rendimento de 83% de marcação precisam ser melhor exploradas a fim de aumentar este rendimento bem como também seu estudo *in vivo*.

O Clodronato dos 3 fosfonatos estudados é o que mais necessita de investigação detalhada de todo processo, pois exigiu aquecimento da solução marcada (em 100°C) para apresentar o melhor rendimento de marcação. Um processo menos trabalhoso e mais simples em menor tempo de marcação sempre será a melhor opção. O Clodronato segundo estudos realizados por Fulfaro et al (1998) mostrou ser um fosfonato bastante eficaz entre as classes dos fosfonatos estudados por ele, obtendo grande efeito analgésico em pacientes portadores de metástases ósseas [83].

Um sistema de purificação dos fosfonatos marcados começou a ser estudado utilizando uma coluna Sephadex PD 10 G-25M, porém as pesquisas não mostraram melhoras significativas nos resultados. Isso se deve provavelmente ao fato da baixíssima atividade que o gerador de ^{188}Re apresentava no fim dos trabalhos.

4.4 Concentração

Em algumas marcações realizadas do EDTMP e Clodronato foi utilizado o sistema de cartuchos para concentração do ^{188}Re pois o gerador apresentava atividade muito baixa e muito inferior às atividades apresentadas nos estudos realizados inicialmente. O sistema de concentração conseguiu elevar a concentração radioativa do ^{188}Re .

5 Conclusão

Foi realizada a otimização e comparação da marcação dos fosfonatos MDP, EDTMP e Clodronato com ^{188}Re .

Os melhores resultados foram com o MDP que apresentou um rendimento de marcação de 98%, mostrando ser bastante estável, indicando também ser bastante promissor e forte candidato para a utilização em terapia de metástase óssea, mas para que esta conclusão seja realmente comprovada é necessária a realização de experimentos/testes *in vivo*.

O melhor rendimento de marcação obtido com o EDTMP foi de 83%, menor que o encontrado na literatura que foi de 98% e novos estudos devem ser realizados.

O rendimento com o Clodronato foi de 85%, resultado razoável. Por não haver ainda estudos realizados com este fosfonato marcado com ^{188}Re o início do processo de otimização das massas fez com que fosse utilizado todo o material disponível, mas este fosfonato se mostrou bastante específico, possui sua estrutura química mais complexa que a molécula do MDP o que sugere que permaneça mais tempo dentro da célula, o que para a aplicação clínica seria o ideal.

Não foi possível a realização de mais experimentos devido à falta de gerador com maior atividade de ^{188}Re , sendo assim não houve a possibilidade de melhorar o resultado com o EDTMP e a falta da massa do Clodronato também nos impediu a continuação dos trabalhos tendo este que ser finalizado em fase intermediária.

Como sugestão de continuidade do trabalho são necessários a otimização da marcação do EDTMP e Clodronato com ^{188}Re e a realização dos estudos *in vivo* com animais.

Então pode-se concluir que até o presente momento o MDP mostrou-se a melhor escolha para ser utilizado como um agente terapêutico em metástases ósseas bem como paliativo na dor óssea.

6 Referências

- 1 - COSTA, R. F. **Desenvolvimento de métodos e preparação de microesferas de polímero e resinas marcadas com Hólmio-166**. 2008. Tese (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- 2 – SAPIENZA, M. T; BUCHPIGUEL, C. A; HIRONAKA, F. H, **Medicina Nuclear em Oncologia** – São Paulo: Atheneu, 2008. cap. 1. p. 1-2.
- 3 – Aparelho de Acelerador Linear - Disponível em: <http://www.oncoville.com.br/index.php/equipamentos/2-aceleradores-lineares-varian-ambos-com-multileaf-com-120-laminas-milemiun/> 11/05/2012
- 4 - COLÉGIO BRASILEIRO DE RADIOLOGIA SETOR DE RADIOTERAPIA. **Manual Prático de Segurança Radiológica – Teleterapia de Megavoltagem e Braquiterapia**. São Paulo, 1995, p. 5 -14.
- 5 - BENTEL, G.C. **Radiation Therapy Planning** – McGraw-Hill 2.ed, 1996. cap. 2. p. 17-18.
- 6 – Braquiterapia de Mama e Prostata - Disponível em: <http://www.hsm.min-saude.pt/CentroHospitalar/Organiza%C3%A7%C3%A3o/EstruturaOrganizacional/Ac%C3%A7%C3%A3oM%C3%A9dica/DepartamentodeOncologia/Servi%C3%A7odeRadioterapia/tabid/1959/Default.aspx> 11/05/2012
- 7 – CALCINA, C.; ALMEIDA, A.; ROCHA, J. R. O. **Análises de protocolos de braquiterapia, por alta taxa de dose, do controle de qualidade de alguns serviços locais, baseados no TG40, TG56 E ARCAL XXX**. Radiol Bras vol. 34, n. 4, jul./ago., 2001.

- 8 - ARAÚJO, E. B.; LAVINAS, T.; COLTURATO, M. T.; MENGATTI, JAIR. Garantia da qualidade aplicada à produção de radiofármacos.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas vol. 44, n. 1, jan./mar., 2008.
- 9 - OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; FERREIRA, D.; COELHO, P.; VEIGA, F. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas vol. 42, n. 2, abr./jun, 2006.
- 10 - Rênio em seu estado Natural - Disponível em: <http://material-stores.com/rhenium/> em 11/05/2012
- 11 - DIAS, C. R. B. R. Estudo comparativo de diversas rotas de marcação do anticorpo anti-cd20 com ^{188}Re .** 2008. Relatório – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- 12 - OSSO, J.; KNAPP, R. Principles and Operation of Radionuclide Generators.** Sampson's Textbook of Radiopharmacy, Fourth edition, Pharmaceutical Press, p. 339 – 355, 2011.
- 13 - MARCZEWSKI, B. S. Estudos de marcação do etidronato com ^{188}Re proveniente de diferentes geradores de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$.** 2006. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
- 14 - Gerador de ^{188}Re – Ipen – Foto fornecida pelo IPEN**
- 15 - OH, S. J.; MOON, D. H.; LEE, W. W.; PARK, S. W.; HONG, M. K.; PARK, S. J.; SHIN, DI.; LEE, H. K. Automated preparation of ^{188}Re -labeled radiopharmaceuticals for endovascular radioation therapy.** Applied Radiation and Isotopes, v. 59, n. 4, p. 225-230, 2003.

16 - HSIEH, B.-T.; HSIEH, J. F.; TSAI, S. C.; LIN, W. Y.; WANG, S. I.; TING, G. **Comparison of various rhenium-188-labeled diphosphonates for the treatment of bone metastases.** Nuclear Medicine and Biology, v. 26, p. 973-976, 1999.

17 - MURPHY, C. A.; FERRO, F. G.; PEDRAZA, L. M. **Labelling of Re-ABP with ^{188}Re for bone pain palliation.** Applied Radiation Isotopes, v. 54: p. 435-442, 2001.

18 - MABHOUH, A. E.; MERCER, JR. **^{188}Re -labeled bisphosphonates as potential bifunctional agents for therapy in patients with bone metastases.** Applied Radiation and Isotopes, v. 62. n. 4, p. 1-9, 2004.

19 – TANG, I-C.; LUO, T. Y.; LIU, S. W.; CHAN, S. H.; KUNG, H. C.; PENG, C. L.; LIN, W. Y.; CHANG, Y.; LIN, W. J. **Synthesis and application of ^{188}Re -MN-16ET/Lipiodol in a hepatocellular carcinoma animal model.** Nuclear Medicine and Biology 38 (2011) 1043–1052.

20 – DE DECKER, M.; BACHER, K.; THIERONS, H.; SLEGGERS, G., DIERCKY, R. A.; DE, V. F. **In vitro and in vivo evaluation of direct ^{188}Re labeled anti-CD52 monoclonal antibody alemtuzumab for radioimmunotherapy of β cell chronic lymphocytic leukemia.** Nuclear Medicine and Biology – 35 (2008) 599-604.

21 – Disponível: <http://wikiciencias.casadasciencias.org/index.php/Redutor> em 21/05/2012

22 – SAHA, G. B. **Fundamentals of Nuclear Pharmacy.** Fourth Edition. New York: Springer 1998, p. 81- 82 -149.

23 - ZAMORA, P. O.; MAREK, M. J.; KNAPP, F. F. J.; **Preparation of ^{188}Re -RC-160 somatostatin analog: a peptide for local/regional radiotherapy.** Applied Radiation and Isotopes, v. 48, n. 3, p. 305-309, 1997.

- 24** - GUHLKE, S.; SCHAFFLAND, A.; ZAMORA, P. O.; SARTOR, J.; DIEKMANN, D.; BENDER, H.; KNAPP, F. F.; BIRSACK, H. J. **^{188}Re and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG3 as prosthetic groups for labeling amines and peptides: approaches with pre- and postconjugate labeling.** Nuclear Medicine and Biology, v. 25, p. 621-631, 1998.
- 25** - SEITZ, U.; NEUMAIER, B.; GLATTING, G.; KOTZERKE, J.; BUNJES, D.; RESKE, S. N. **Preparation and evaluation of the rhenium-188-labelled anti-NCA antigen monoclonal antibody BW 250/183 for radioimmunotherapy of leukemia.** European Journal of Nuclear and Medicine and Molecular Imaging, v. 26, n. 10, p. 1265-1273, 1999.
- 26** - CHEN, J.; GIBLIN, M. F.; WANG, N.; JURISSON, S. S.; QUINN, T. P. **In vivo evaluation of $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$ -labeled linear alpha-melanocyte stimulating hormone analogs for specific melanoma targeting.** Nuclear Medicine and Biology, v. 26, p. 687-693, 1999.
- 27** - DU, J.; MARQUEZ, M.; HITTUNEM, J.; NILSSON, S.; HOLMBERG, A. R. **Radiolabeling of dextran with rhenium-188.** Applied Radiation and Isotopes, v. 53, p. 443-448, 2000.
- 28** - WUNDERLICH, G.; PINKERT, J.; ANDREEFF, M.; STINTZ, M.; KNAPP, F. F. J.; KROPP, J.; FRANKE, W. G. **Preparation and biodistribution of rhenium-188 labeled albumin microspheres B 20: a promising new agent for radiotherapy.** Applied Radiation and Isotopes, v. 52, p. 63-68, 2000.
- 29** - MURPHY, C. A.; PEDRAZA, L. M.; FERRO, F. G.; MURPHY, S. E.; CHÁVEZ, M. L.; ASCENCIO, J. A.; GARCIA, S. L.; HERNANDEZ, G. S. **Uptake of ^{188}Re - β -naphthyl-peptide in cervical carcinoma tumors in athymic mice.** Nuclear Medicine and Biology, v. 28, p. 319-326, 2001.
- 30** - HAFELI, U. O.; ROBERTS, W. K.; PAUER, G. J.; KRAEFT, S. K.; MACKLIS, R. M. **Stability of biodegradable radioactive rhenium (^{186}Re and ^{188}Re) microspheres after neutron-activation.** Applied Radiation and Isotopes, v. 54, p. 869-879, 2001.

- 31** - WANG, S-J.; CHEN, M. N.; CHEN, J. T.; HO, W. L.; HSIEH, B. T.; HUANG, H.; SHEN, L. H.; TING, G.; KNAPP, F. F. J. **Histologic study of effects of radiation synovectomy with rhenium-188 microsphere.** Nuclear Medicine and Biology, v. 28, p. 727-732, 2001.
- 32** - LIU, C. -B.; LIU, G. Z.; LIU, N.; ZHANG, Y. M.; HE, J.; RUSCKOWSKI, M.; HNATOWICH, D. J. **Radiolabeling morpholinos with ^{90}Y , ^{111}In , ^{188}Re , and $^{99\text{m}}\text{Tc}$.** Nuclear Medicine and Biology, v. 30, p. 207-214, 2003.
- 33** - KOTHARI, L.; SURESH, S.; SARMA, H. D.; MEERA, V.; PILLAI, M. R. **^{188}Re -labeled hydroxyapatite particles for radiation synovectomy.** Applied Radiation and Isotopes, v. 58, p. 463-468, 2003.
- 34** - JEONG, J. M.; LEE, Y. J.; KIM, E. H.; CHANG, Y. S.; SON, M.; LEE, D. S.; CHUNG, J. K.; LEE, M. C. **Preparation of ^{188}Re -labeled paper for treating skin cancer.** Applied Radiation and Isotopes, v. 58, p. 551-555, 2003.
- 35** - LIN, U.-T.; CHU, C. H.; HSIEH, B. T.; HWANG, W. S. **Dose evaluation and measurement of the ^{188}Re liquid-filled balloon in intravascular brachytherapy.** Applied Radiation and Isotopes, v. 61, p. 1323-1333, 2004.
- 36** - GARIN, E.; NOIRET, N.; MALBERT, C.; LEPAREUR, N.; ROUCOUX, A.; CAULET, M. S.; MOISAN, A.; LECLOIREC, J.; HERRY, J. Y.; BOURGUET, P. **Development and biodistribution of ^{188}Re -SSS lipiodol following injection into the hepatic artery of healthy pigs.** European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, v. 31, n. 4, p. 542-546, 2003.
- 37** - BOSCHI, A.; UCCELLI, L.; DUATTI, A.; COLAMUSSI, P.; CITTANTI, C.; FILICI, A.; ROSE, A. H.; MARTINDALE, A. A.; CLARINGBOLG, D. G.; KEANEY, D.; GALEOTTI, R.; TURNER, J. H.; GIGANTI, M. **A kit formulation for the preparation of ^{188}Re -lipiodol: preclinical studies and preliminary therapeutic evaluation in patients with unresectable hepatocellular carcinoma.** Nuclear Medicine Communications, v. 25, n. 7, p. 691-699, 2004.

38 - LI, G.; WANG, Y.; HUANG, K.; ZHANG, H.; PENG, W.; ZHANG, C. The experimental study on the radioimmunotherapy of the nasopharyngeal carcinoma overexpressing HER2/neu in nude mice model with intratumoral injection of ^{188}Re -herceptin. Nuclear Medicine and Biology, v. 32, p. 59-65, 2005.

39 - HÄFELI, U. O.; PAUER, G. J.; UNNITHAN, J.; PRAYSON, R. A. Fibrin glue system for adjuvant brachytherapy of brain tumors with ^{188}Re and ^{186}Re – labeled microspheres. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics – 65 (2007) 282-288.

40 – LIU, G.; DOU, S.; HE, J.; YIN, D.; GUPTA, S.; ZHANG, S.; WANG, Y.; RUSCKOWSKI, M.; HNATOWICH, D. J. Radiolabeling of MAG_3 -morpholino oligomers with ^{188}Re at high labeling efficiency and specific radioactivity for tumor pretargeting. Applied Radiation and Isotopes – 64 (2006) 971-978.

41 – CHEN, K. T.; LEE, T. W.; LO, J. M. In vivo examination of $^{188}\text{Re}(\text{I})$ tricarbonyl labeled trastuzumab to target HER2 overexpressing breast cancer. Nuclear Medicine and Biology – 36 (2009) 355-361.

42 – FUKS, L.; GNIAZDOWSKA, E.; SOSNOWSKA, N. S. $2+1'$ Tricarbonyltechnetium(I) and-rhenium(I) mixed-ligand complexes with N-methylpyridine-2-carboxyamideandisocyanide or imidazole ligands—potential precursors of radiopharmaceuticals. Applied Radiation and Isotopes – 68 (2010) 90-95.

43 – CHANG, Y. J.; CHANG, C. H.; CY, Y.; CHANG, T. J.; CHEN, L. C.; CHEN, M. H.; LEE, T. W.; TING, G. Therapeutic efficacy and microSPECT/CT imaging of ^{188}Re -DXR-liposome in a C26 murine colon carcinoma solid tumor model. Nuclear Medicina and Biology (2010) 95-104.

- 44** – FRENCH, J.T.; GOINS, B.; SAENZ, M.; LI, S.; GARCIA, X. R.; OTTO, R. A.; BAO, A. **Interventional Therapy of Head and Neck Cancer with Lipid Nanoparticle-carried Rhenium 186 Radionuclide.** Journal of Vascular Interventional Radiology 21 (2010)1271–1279.
- 45** – BOX, C. V.; J.; LACOEUILLE, F.; BELLOCHE, C.; LEPAREUR, N.; LEMAIRE, L.; LE JEUNE, J. J.; BENOIT, J. P.; MENEI, P.; COUTURIER, D. E.; GARCION, E.; HINDRE, F. **Tumor eradication in rat glioma and bypass of immunosuppressive barriers using internal radiation with ^{188}Re -lipid nanocapsules.** Biomaterials 32 (2011) 6781-6790.
- 46** – LIEPE, K.; FAUHABER, D.; WRENDERLICH, G.; ANDREEFF, M.; HAASE, M.; JUNG, R.; OEHME, L.; DÓRR, W.; KOTZERKE.. **Radiation Pneumopathy in the rat after intravenous application of ^{188}Re -Labeled microspheres.** International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 81 (2011) No. 2, 529–536.
- 47** – LI, Z.; ZHANG, G.; SHEN, H.; ZHANG, L.; WANG, Y. **Synthesis and cell uptake of a novel dualmodality ^{188}Re -HGRGD (D) F-CdTe QDs probe.** Talanta 85 (2011) 936– 942.
- 48** – LEPAREUR, N.; ARDISSON, V.; NOIRET, N.; BOUCHER, E.; RAOUL, J. L.; CLÉMENT, B.; GARIN, E. **Automation of labeling of Lipiodol with high-activity generator-produced ^{188}Re .** Applied Radiation and Isotopes 69 (2011) 426–430.
- 49** – DIAS, C. R.; JEGER, S.; OSSO, J. A. JR.; MULLER, C.; DE PASQUALE, C.; HOHN, A.; WAIBEL, R.; SCHIBLI, R. **Radiolabeling of rituximab with ^{188}Re and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ using the tricarbonyl technology.** Nuclear Medicine and Biology 38 (2011) 19–28.
- 50** – ANDREANA, L.; ISGRÓ, G.; MARELLI, L.; DAVIES, N.; YU, D.; NAVALKISSOOR, S.; BURROUGHS, A. K. **Treatment of hepatocellular carcinoma (HCC) by intra-arterial infusion of radio-emitter**

compounds: Trans-arterial radio-embolisation of HCC. Cancer Treatment Reviews 38 (2012) 641–649.

51 – TAVARÉ, R.; WILLIAMS, J.; HOWLAND, K.; BLOWE, P. J.; MULLEN, G. E. [Re(CO)3]⁺ labelling of a novel cysteine/hexahistidine tag: Insights into binding mode by liquid chromatography-mass spectrometry. Journal of Inorganic Biochemistry 114 (2012) 24–27.

52 – CHEN, L-C.; LIU, J. H.; HO, C. L.; LEE, W. C.; CHANG, C. H.; LAN, K. L.; TING, G.; LEE, T. W.; SHIEN, J. H. Pharmacokinetics, dosimetry and comparative efficacy of ¹⁸⁸Re-liposome and 5-FU in a CT26-luc lung-metastatic mice model. Nuclear Medicine and Biology 39 (2012) 35– 43.

53 – GRAHAM, R.; RUSSELL, G. Biphosphonates: The first 40 years. Elsevier, v. 49, p 2-19, 2011.

54 – MDP - Disponível em: <http://www.chemicalbook.com/CAS/GIF/1984-15-2.gif> 21/08/12

55 – EDTMP - Disponível em <http://www.chemicalbook.com/CAS/GIF/1429-50-1.gif> 21/08/12

56 - Clodronato Disponível em http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB4404653.htm 21/08/2012

57- MATHIEU, L.; CHEVALIER, P.; GALY, G.; BERGER, M.; Preparation of rhenium-186 labelled EHDP and its possible use in the treatment of osseous neoplasms. Journal Applied Radiation and Isotope, v. 30, p. 725-727, 1979.

58 - EISENHUT, M. Preparation of ¹⁸⁶Re-perrhenate for nuclearmedical purposes. Applied Radiation and Isotopes, v. 33, p. 99-103, 1982.

59 - LIN, W.-Y.; LIN, C. P.; YEH, S. J.; HSIEH, B. T.; TSAI, B. T.; TSAI, Z. T.; TING, G.; YEN, T. C.; WANG, S. J.; KNAPP, F. F. JR.; STABIN, M. G. **Rhenium-188 hydroxyethylidene diphosphonate: a new generator-produced radiotherapeutic drug of potential value for the treatment of bone metastases.** European Journal of Nuclear Medicine, v. 24, n. 6, p. 590-595, 1997.

60 - HASHIMOTO, K. **Labelling of aminomethylenephosphonate derivatives with generator-produced ^{188}Re , and a study of their stability.** Applied Radiation and Isotope, v. 51: p. 307-313, 1999.

61 - QINGNUAN, L.; XIAODONG, Z.; RONG, S.; WENXIN, L. **Preparation of ^{188}Re -AEDP and its biodistribution studies.** Applied Radiation and Isotope., v. 53, p. 993-997, 2000.

62 - BANERJEE, S.; SAMUEL, G.; KOTHARI, K.; UNNI, P. R.; SARMA, H. D.; PILLAI, M. R. **$^{99\text{m}}\text{Tc}$ and ^{186}Re complexes of tetraphosphonate ligands and their biodistribution pattern in animal models.** Nuclear Medicine and Biology, v. 28: p. 205-213, 2001.

63 - LISIC, E.C.; PHILLIPS, M.; ENSOR, D.; NASH, K.; BEETS, A.; KNAPP, F. F. **Synthesis of a new bisphosphonic acid ligand (SEDP) and preparation of a ^{188}Re -(Sn)SEDP bone seeking.** Nuclear Medicine and Biology, v. 28, p. 419-424, 2001.

64 - PERVEZ, S.; MUSHTAQ, A.; ARIF, N.; CHOCHAN, Z. H. **$^{188}\text{Rhenium}$ -EDTMP: a potential therapeutic bone agent.** Journal Radioanalytical and Nuclear Chemistry., v. 257, n. 2, p. 417-420, 2003.

65 - BANERJEE, S.; CHAKRABORTY, S. D.; DAS, T.; KOTHARI, K.; SAMUEL, G.; VENKATESH, M.; PILLAI, M. R. A. **^{177}Lu -DOTMP, ^{153}Sm -DOTMP, ^{175}Yb -EDTMP and $^{186/188}\text{Re}$ -CTMP: Novel agents for bone pain palliation and their comparison with ^{153}Sm -EDTMP.** World Journal Nuclear Medicine, v. 3, n. 1, p. 22-37, 2004.

- 66** - MITTERHAUSER, M.; WADSAK, W.; EIDHERR, H.; KRCAL, A.; KLETTER, K.; DUDCZAK, R.; VIERNSTEIN, H.; PIRICH, C. **Labelling of EDTMP (multibone®) with [¹¹¹In], [^{99m}Tc] and [¹⁸⁸Re] using different carriers for “cross complexation”**. Applied Radiation and Isotope, v. 60, p. 653-658, 2004.
- 67** - OGAWA, K.; MUKAI, T.; ARANO, Y.; OTAKA, A.; UEDA, M.; UEHARA, T.; MAGATA, Y.; HASHIMOTO, K.; SAJI, H. **Rhenium-186-monoaminemonoamidedithiol-conjugated bisphosphonate derivatives for bone pain palliation**. Nuclear Medicine and Biology – 33 (2006) 513-20.
- 68** - MABHOUH, ELL-AA.; MERCER, JR. **¹⁸⁸Re-labelled gemcitabine/bisphosphonate (Gem/BP): a multi-functional, bone-specific agent as a potential treatment for bone metastases**. European Journal of Nuclear Molecular Imaging – 35 (2008) 1240-1248.
- 69** - LAM, M. E. H.; TJITSKE, B. B.; RJIK, P. P. V.; ZONNENBERG, B. A. **¹⁸⁸Re HEDP combined with capecitabine in hormone-refractory prostate cancer patients with bone metastases: a phase I safety and toxicity study**. European Journal of Nuclear Molecular Imaging – 36 (2009) 1425-1433.
- 70** - LIEPE, K.; GLIDEL, H. H.; BERGMANN, R.; HAASE, M.; RUNGE, R.; KOTZERKE, J. **Autoradiographic studies of rhenium-188-hydroxyethylidine diphosphonate in normal skeleton and osteoblastic bone metastases in a rat model metastatic prostate cancer**. Nuclear Medicine Communications – 30 (2009) 693-699.
- 71** - ROSALES, R. T. M.; FINUCANE, C.; FOSTER, J.; MATHER, S. J.; BLOWER, S. J.; **¹⁸⁸Re(CO)3-Dipicolylamine-Alendronate: A New Bisphosphonate Conjugate**. Bioconjugate Chemistry - 21 (2010) 811-815.

72 - COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Patologia – Bases Patológicas das Doenças** – KUMAR, Vinay – ABBAS, Abul K. – FAUSTO, Nelson – Elsevier – Sétima Edição, 2005, p. 1332.

73 - Ossos que compõe o esqueleto - Disponível em : <http://www.saudevidaonline.com.br/ossos.htm> em 29/05/2012

74 - COTRAN, R. S., KUMAR, V., ROBBINS, S. L. **Robbins - Patologia Estrutural e Funcional**. Philadelphia PA – Quinta Edição, 1996, p. 1116 - 1126.

75 - Como o câncer se espalha - <http://www.educadores.diaadia.pr.gov.br/arquivos/File/tvmultimedia/imagens/2011/biologia/5metastase.jpg> em 29/05/2012

76 - MACHADO, M.; CRUZ, L.S.; TANNUS, G.; FONSECA, M. **Efficacy of Clodronate, Pamidronate, and Zoledronate in Reducing Morbidity and Mortality in Cancer Patients With Bone Metastasis: A Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials**. Clinical Therapeutics, v. 31, n. 5, 2009.

77 - PORTH, C. M. Fisiopatologia. U.S.A. – Sexta Edição, 2004, p. 1322

78 - Infiltração e Dano Ósseo causado por metástases - Disponível em: <http://km-stressnet.blogspot.com.br/2008/08/o-cancro-dos-ossos.html> 29/05/2012

79 - JALES, Levi – **Radiofármacos no tratamento da dor oncológica**. 8º SIMBIDOR, Office Editora e Publicidade., arquivos 2007, p. 112-116.

80 - **METILENODIFOSFONATO DE SÓDIO - MDP**. Dra Elaine Bortoleti de Araújo – CRF/SP 12527. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares , 2010. Bula do conjunto de reagente liofilizado para preparar MDP-tecnécio-99m.

81 - Processo Radiocromatográfico - Disponível em: www.ufrgs.br/biofis/Pratica_4_Protocolo.doc 11/06/2012

82 - SUZUKI, K. N. **Estudos de técnicas de concentração da atividade de ^{99m}Tc eluido de geradores de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ tipo gel.** 2009. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

83 - FULFARO, F.; CASUCCIO, A.; TICOZZI, C.; RIPAMONTI, C. **The role of biphosphonates in the treatment of painful metastatic bone disease: A review of phase III trials.** International Association for the Study of Pain 78(1998) 157-169