



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

**SÍNTESE, ANÁLISE, PURIFICAÇÃO E BIODISTRIBUIÇÃO EM MODELO ANIMAL
DO RADIOFÁRMACO $^{177}\text{Lu}^{3+}$ - DOTATATO PARA USO DIAGNÓSTICO E
TERAPÊUTICO EM TUMORES NEUROENDÓCRINOS**

José de Souza Caldeira Filho

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau
de Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Aplicações**

Orientadora:
Dra.: Elaine Bortoleti de Araújo

**São Paulo
2009**



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

SÍNTESE, ANÁLISE, PURIFICAÇÃO E BIODISTRIBUIÇÃO EM MODELO ANIMAL
DO RADIOFÁRMACO $^{177}\text{Lu}^{3+}$ - DOTATATO PARA USO DIAGNÓSTICO E
TERAPÊUTICO EM TUMORES NEUROENDÓCRINOS

José de Souza Caldeira Filho

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

Orientadora:

Dra.: Elaine Bortoleti de Araújo

São Paulo
2009

*À Maria dos Prazeres Villar Caldeira
(28 de abril de 1935 – 28 de abril de 2008).*

AGRADECIMENTOS

À Dra. Elaine Bortoleti de Araújo pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao singular mestre Alexander de Freitas por todas as sugestões e críticas e sua incansável busca pela clareza de conhecimentos.

À Dra. Emiko Muramoto por seu auxílio fundamental nos experimentos com animais.

À MSc. Miriam Fussae Suzuki pela colaboração com o cultivo de células e pela revisão do texto.

À MSc. Miriam Rosely Yoshie pelo auxílio no estudo cintilográfico.

À Dra. Silvia Regina Cavani Jorge Santos pela atenção, pelos conhecimentos transmitidos como mestra e pela abertura a novos saberes.

À doutoranda Karin Jannet Vera López, por sua pronta disponibilidade, disposição e pelo auxílio na modelagem farmacocinética.

À Dra. Áurea Beatriz Cerqueira Geraldo pela leitura crítica e pelas sugestões dispensadas a este trabalho.

Ao Dr. José Eduardo Manzoli por sua disposição em discutir os dados deste trabalho e pelas sugestões para sanar alguns entraves.

À Dra. Sibila Marques pelas sugestões.

À doutoranda Josefina Santos e à mestranda Renata Couto pelo auxílio prestado aos experimentos de biodistribuição.

À D. Maria Imaculada pelo apoio e incentivo.

À bibliotecária Edna Alves pelo auxílio nas referências bibliográficas.

Ao pessoal de apoio do IPEN.

O ato de conhecer dá-se contra um conhecimento anterior, superando o que, no próprio espírito, é obstáculo à espiritualização. (Gaston Bachelard. A formação do espírito científico, 1999, p.17)

**SÍNTESE, ANÁLISE, PURIFICAÇÃO E BIODISTRIBUIÇÃO EM MODELO ANIMAL DO
RADIOFÁRMACO $^{177}\text{Lu}^{3+}$ - DOTATATO PARA USO DIAGNÓSTICO E TERAPÊUTICO EM
TUMORES NEUROENDÓCRINOS**

José de Souza Caldeira Filho

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo propor uma racionalização da síntese, da análise e da purificação do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO para uso diagnóstico e terapêutico em tumores neuroendócrinos, bem como avaliar a biodistribuição deste radiofármaco em modelo animal. A reação de complexação para a síntese do radiofármaco foi realizada em tampão acetato de amônio 0,5 M, pH 7,0, à 95 °C, com tempo de reação de 30 minutos. Obteve-se pureza radioquímica > 95%, de acordo com a análise por cromatografia em ITLC-SG, utilizando-se como fase móvel, tampão citrato de sódio 0,1 M, pH 5,0. A razão molar-limite $^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO utilizada na síntese do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO foi dependente da atividade específica e da procedência do radioisótopo, sendo de 1:3,5 (370 MBq : 2,6 µg) para radioisótopo oriundo do Oak Ridge National Laboratory/EUA e de 1:16 (370 MBq : 11,8 µg) para o radioisótopo oriundo do Nuclear Analytical and Medical Services/Holanda, considerando para ambos, um decaimento de cinco dias a partir da data de produção do radioisótopo. Esta racionalização da síntese do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO permite uma grande economia nos custos de produção. O estudo químico da síntese do radiofármaco também evidenciou a interferência do $^{177}\text{Hf}^{4+}$, produto de decaimento do $^{177}\text{Lu}^{3+}$, como competidor do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ pelo DOTATATO. A preparação radiofarmacêutica mostrou-se estável durante 24 horas, a uma atividade de 2775 MBq, com adição de 0,6 mg/mL de ácido genticóico, mantida em gelo seco. Nos estudos de biodistribuição em camundongos *Swiss* e *Nude* demonstrou-se a especificidade do radiofármaco pelos tecidos receptor-específicos para somatostatina como pâncreas, estômago, pulmão, adrenais, rins e de células tumorais AR42J.

Palavras chave: síntese, complexação, radiofármaco, ^{177}Lu -DOTATATO, tumor neuroendócrino.

SYNTHESIS, ANALYSIS, PURIFICATION AND BIODISTRIBUTION IN AN ANIMAL MODEL OF RADIOPHARMACEUTICAL $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO FOR DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC USE IN NEUROENDOCRINE TUMORS

José de Souza Caldeira Filho

ABSTRACT

The aim of this work was to propose rationalization in the synthesis, analysis and purification of radiopharmaceutical $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO for diagnostic and therapeutic use in neuroendocrine tumors, as well as for evaluating biodistribution of this radiopharmaceutical in an animal-model. The complexation reaction for the synthesis of radiopharmaceutical was carried out in ammonium acetate buffer 0.5 M, pH 7.0, for 30 minutes at 95 °C. The radiochemical purity was > 95%, according to analysis by chromatography in ITLC-SG, when using the sodium citrate buffer 0,1 M, pH 5.0, as the mobile phase. The molar-limit ratio $^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO, used in the synthesis of radiopharmaceutical $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO, in ammonium acetate buffer 0.5 M, pH 7.0, for 30 minutes at 95 °C, was dependent on the specific activity and origin of the radioisotope, this being 1:3.5 (370 MBq : 2.6 µg) for that from the Oak Ridge National Laboratory/U.S.A., and 1:16 (370 MBq : 11.8 µg) for that from Nuclear Analytical and Medical Services/Holland, when considering a decay of five days from the production date of the radioisotopes. This rationalization in the synthesis of radiopharmaceutical $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO permits high economy in production costs. Chemical studies on the synthesis of radiopharmaceuticals also placed in evidence the interference of $^{177}\text{Hf}^{4+}$, the decay product of $^{177}\text{Lu}^{3+}$, as the $^{177}\text{Lu}^{3+}$ competitor for DOTATATO. Radiopharmaceutical preparation proved to be stable during 24 hours, at an activity rate of 2775 MBq, with the addition of 0.6 mg/mL of gentisic acid and when kept in dry ice. In biodistribution studies on *Swiss* and *Nude* mice, the specificity of radiopharmaceutical for somatostatin positive-receptor tissues, such as the pancreas, stomach, lungs, adrenal glands, kidneys and the cell tumor AR42J was demonstrated.

Key words: synthesis, complexation, radiopharmaceutical, $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO, neuroendocrine tumors

SUMÁRIO

| | Página |
|---|-----------|
| LISTA DE TABELAS..... | xi |
| LISTA DE FIGURAS..... | xiii |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | xv |
| REVISÃO DA LITERATURA..... | 1 |
| Nomenclatura e classificação dos tumores neuroendócrinos..... | 2 |
| Possibilidades diagnósticas de tumores neuroendócrinos..... | 6 |
| Somatostatina e análogos sintéticos da somatostatina..... | 7 |
| Receptores de somatostatina..... | 9 |
| Radiofármacos no diagnóstico de tumores neuroendócrinos..... | 11 |
| Radioisótopos na terapia de tumores neuroendócrinos..... | 13 |
| Radiofármacos com $^{177}\text{Lu}^{3+}$ para o diagnóstico e para a terapia de tumores neuroendócrinos..... | 16 |
| Protocolos de síntese do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO da Agência Internacional de Energia Atômica..... | 17 |
| Referências Bibliográficas..... | 20 |
| OBJETIVOS..... | 27 |
| MATERIAIS..... | 28 |
| CAPÍTULO I – SÍNTESE DO COMPLEXO $^{177}\text{Lu}^{3+}$-DOTATATO..... | 30 |
| 1.0 Introdução..... | 31 |
| 1.1 Influência dos parâmetros cinéticos (tempo e temperatura) na síntese do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO..... | 36 |
| 1.1.1 Métodos..... | 36 |
| 1.1.2 Resultados & Discussão..... | 37 |
| 1.2 Influência do pH do meio de reação na síntese do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO..... | 38 |
| 1.2.1 Fundamentação teórica..... | 38 |
| 1.2.2 Métodos..... | 47 |
| 1.2.3 Resultados & Discussão..... | 48 |
| 1.3 Influência da razão molar $^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO na síntese do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO em pH 7,0..... | 53 |

| | |
|---|-----------|
| 1.3.1 Fundamentação teórica: Equacionamento das variáveis que influenciam a Razão Molar ($^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO)..... | 53 |
| 1.3.2 Métodos..... | 56 |
| 1.3.3 Resultados & Discussão | 57 |
| 1.4 Conclusões..... | 69 |
| 1.5 Referências Bibliográficas..... | 71 |
| CAPÍTULO II – DETERMINAÇÃO DA PUREZA RADIOQUÍMICA, PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO RADIOFÁRMACO $^{177}\text{Lu}^{3+}$-DOTATATO POR CROMATOGRAFIA..... | 72 |
| 2.0 Introdução..... | 73 |
| 2.1 Determinação da pureza radioquímica do radiofármaco por cromatografia em camada delgada | 75 |
| 2.1.1 Fundamentação teórica..... | 75 |
| 2.1.2 Métodos..... | 77 |
| 2.1.3 Resultados & Discussão..... | 78 |
| 2.2 Purificação do radiofármaco por cromatografia em coluna Sep-Pak C ₁₈ | 82 |
| 2.2.1 Métodos..... | 83 |
| 2.2.2 Resultados & Discussão..... | 84 |
| 2.3 Avaliação da estabilidade do radiofármaco na preparação radiofarmacêutica por cromatografia em camada delgada..... | 89 |
| 2.3.1 Métodos..... | 89 |
| 2.3.2 Resultados & Discussão..... | 90 |
| 2.4 Conclusões..... | 91 |
| 2.5 Referências Bibliográficas..... | 92 |
| CAPÍTULO III – BIODISTRIBUIÇÃO DO RADIOFÁRMACO $^{177}\text{Lu}^{3+}$-DOTATATO EM MODELO ANIMAL..... | 93 |
| 3.0 Introdução..... | 94 |
| 3.1 Métodos..... | 95 |
| 3.1.1 Desenvolvimento do modelo tumoral em camundongos <i>Nude</i> | 95 |
| 3.1.2 Estudos de biodistribuição..... | 95 |
| 3.1.3 Cálculos do percentual de atividade biodistribuída..... | 96 |
| 3.1.3.1 Determinação da porcentagem de atividade no órgão..... | 96 |

| | |
|--|-----|
| 3.1.3.2 Determinação da porcentagem de atividade no sangue, músculo e osso.... | 97 |
| 3.1.3.3 Determinação da porcentagem de atividade por grama de tecido..... | 97 |
| 3.2 Resultados & Discussão..... | 99 |
| 3.2.1 Modelo tumoral em camundongos <i>Nude</i> | 99 |
| 3.2.2 Estudos de biodistribuição..... | 99 |
| 3.3 Conclusões..... | 116 |
| 3.4 Referências Bibliográficas..... | 117 |

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|---|--------|
| Tabela A – Octapeptídeos análogos da somatostatina, sua sequência de aminoácidos, o nome dado à sequência e o análogo ligado ao agente quelante..... | 12 |
| Tabela B – Características físicas de radioisótopos emissores β^- utilizados na terapia de tumores..... | 14 |
| Tabela C – Protocolos de síntese do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO..... | 18 |
| Tabela 1 – Efeito do tempo de incubação à 80 °C na formação do complexo $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO sintetizado à razão molar de 1 : 70 ($^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO).... | 37 |
| Tabela 2 – Efeito do tempo de incubação à 95 °C na formação do complexo $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO sintetizado à razão molar de 1 : 70 ($^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO).... | 37 |
| Tabela 3 – Valores de α_4 para o EDTA em função do pH | 42 |
| Tabela 4 – Constante de formação corrigida (K_f^H) em função do pH..... | 43 |
| Tabela 5 – Valores de pureza radioquímica (%) do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO em função do pH, utilizando $^{177}\text{Lu}^{3+}$ de duas procedências distintas: ORNL/EUA e NRG/Holanda, em diferentes razões molares ($^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO)..... | 48 |
| Tabela 6 – Valores de pureza radioquímica (%) do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO em função de diferentes razões molares, utilizando $^{177}\text{Lu}^{3+}$ de procedências distintas: NRG/Holanda e ORNL/EUA. Reações de complexação realizadas em pH 7,0..... | 57 |
| Tabela 7 – Resultados comparativos dos passos em relação ao $^{177}\text{Lu}^{3+}$ ORNL/EUA e o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ NRG/Holanda..... | 64 |
| Tabela 8 – Valores calculados de razão molar $^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO após 11, 18 e 27 dias da produção do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ (ORNL/EUA), considerando e não considerando a influência do $^{177}\text{Hf}^{4+}$ | 65 |
| Tabela 9 – Valores experimentais de pureza radioquímica (%) em função da razão molar $^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO após 11, 18 e 27 dias da produção do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ (ORNL/EUA). Reações de complexação realizadas em pH 7,0..... | 66 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 10 – Purificação do radiofármaco em coluna Sep-Pak C ₁₈ . Distribuição das atividades expressas como percentual da atividade de cada fração em relação ao total da atividade..... | 86 |
| Tabela 11 – Comparação das purezas radioquímicas antes e após (fração “etanol – 1”) a realização do procedimento de purificação em colunas Sep-Pak C ₁₈ | 87 |
| Tabela 12 – Dados de pureza radioquímica do radiofármaco na preparação radiofarmacêutica durante 48 horas, considerando as atividades de 2775 e 5180 MBq (75 e 140 mCi)..... | 90 |
| Tabela 13 – Dados de biodistribuição do radiofármaco ¹⁷⁷ Lu ³⁺ -DOTATATO apresentados como a média da porcentagem de atividade por órgão ou tecido ± desvio padrão. Camundongos <i>Swiss</i> | 100 |
| Tabela 14 – Dados de biodistribuição do radiofármaco ¹⁷⁷ Lu ³⁺ -DOTATATO apresentados como a média da porcentagem de atividade por grama de tecido ± desvio padrão. Camundongos <i>Swiss</i> | 104 |
| Tabela 15 – Dados de biodistribuição do radiofármaco ¹⁷⁷ Lu ³⁺ -DOTATATO apresentados como a média da porcentagem de atividade por órgão ou tecido ± desvio padrão. Camundongos <i>Nude</i> | 107 |
| Tabela 16 – Dados de biodistribuição do radiofármaco ¹⁷⁷ Lu ³⁺ -DOTATATO apresentados como a média da porcentagem de atividade por grama de tecido ± desvio padrão. Camundongos <i>Nude</i> | 109 |
| Tabela 17 – Dados de biodistribuição do radioisótopo ¹⁷⁷ Lu ³⁺ apresentados como média da porcentagem de atividade por órgão ou tecido ± desvio padrão. Camundongos <i>Swiss</i> | 111 |
| Tabela 18 – Dados de biodistribuição do radioisótopo ¹⁷⁷ Lu ³⁺ apresentados como média da porcentagem de atividade por grama de tecido ± desvio padrão. Camundongos <i>Swiss</i> | 113 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|--|---------------|
| Figura 1 – Fórmula estrutural do DOTA..... | 32 |
| Figura 2 – Estrutura octacoordenada do complexo DOTA-metal..... | 33 |
| Figura 3 – Fórmula estrutural do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO..... | 34 |
| Figura 4 – Fórmula estrutural do EDTA..... | 41 |
| Figura 5 – Estrutura hexacoordenada do complexo metal-EDTA..... | 41 |
| Figura 6 – Relação entre várias concentrações molares de Lu^{3+} em solução, expressa como pLu, em função do pH corrigido, expresso como pCH..... | 45 |
| Figura 7 – Relação entre concentrações de Lu^{3+} em solução, considerando-se uma concentração inicial de 2×10^{-3} mol/L, em função do pH (pCH) do meio..... | 46 |
| Figura 8 – Valores de pureza radioquímica (%) do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO em $4,5 < \text{pH} < 7,5$, utilizando $^{177}\text{Lu}^{3+}$ da ONRL/EUA, à razão molar de 1 : 7 ($^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO)..... | 49 |
| Figura 9 – Valores de pureza radioquímica (%) do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO em $4,5 < \text{pH} < 8,0$, utilizando $^{177}\text{Lu}^{3+}$ da ONRL/EUA, à razão molar de 1 : 10 ($^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO)..... | 49 |
| Figura 10 – Valores de pureza radioquímica (%) do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO em $4,5 < \text{pH} < 8,0$, utilizando $^{177}\text{Lu}^{3+}$ da NRG/Holanda, à razão molar de 1 : 16 ($^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO)..... | 50 |
| Figura 11 – Comparação dos valores de pureza radioquímica (%) do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO em função do pH e das razões molares 1:7, 1:10 ($^{177}\text{Lu}^{3+}$ ORNL/EUA) e 1:16 ($^{177}\text{Lu}^{3+}$ NRG/Holanda)..... | 50 |
| Figura 12 – Pureza radioquímica (%) do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO versus razão molar, utilizando $^{177}\text{Lu}^{3+}$ de duas procedências distintas: NRG/Holanda e ORNL/EUA. Reações de complexação realizadas em pH 7,0..... | 58 |
| Figura 13 – Pureza radioquímica (%) do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO versus razão molar, utilizando $^{177}\text{Lu}^{3+}$ de duas procedências distintas: NRG/Holanda e ORNL/EUA. Reações de complexação realizadas em pH 7,0..... | 59 |
| Figura 14 – Valores experimentais de pureza radioquímica (%) em função da razão molar $^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO após 11, 18 e 27 dias da produção do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ (ORNL/EUA)..... | 67 |

| | |
|--|-----|
| Figura 15 – Representação esquemática da sílica gel com os grupos silanol (Si-OH) e siloxano (Si-O-Si)..... | 74 |
| Figura 16 – Representação esquemática das cadeias orgânicas hidrofóbicas do tipo C ₁₈ , immobilizadas na superfície da sílica..... | 74 |
| Figura 17 – Perfil de CCD em ITLC-SG, do ¹⁷⁷ Lu ³⁺ e do ¹⁷⁷ Lu ³⁺ - DOTATATO..... | 78 |
| Figura 18 – Representação esquemática da sílica gel antes da ativação ou na presença de fase móvel aquosa..... | 79 |
| Figura 19 – Fórmula estrutural do citrato de sódio..... | 80 |
| Figura 20 – Perfil de CCD em ITLC-SG, do ¹⁷⁷ Lu ³⁺ em pH 4,5, 7,0 e 8,5..... | 81 |
| Figura 21 – Perfil em CLAE do ¹⁷⁷ Lu ³⁺ em coluna de fase reversa C ₁₈ | 84 |
| Figura 22 – Perfil em CLAE do ¹⁷⁷ Lu ³⁺ -DOTATATO em coluna de fase reversa C ₁₈ | 84 |
| Figura 23 – Perfis de biodistribuição do radiofármaco ¹⁷⁷ Lu ³⁺ -DOTATATO medida em porcentagem de atividade por órgão ou tecido. Camundongos <i>Swiss</i> | 101 |
| Figura 24 – Perfis de biodistribuição do radiofármaco ¹⁷⁷ Lu ³⁺ -DOTATATO medida em porcentagem de atividade por grama de tecido. Camundongos <i>Swiss</i> | 105 |
| Figura 25 – Perfis de biodistribuição do radiofármaco ¹⁷⁷ Lu ³⁺ -DOTATATO em porcentagem de atividade por órgão ou tecido. Camundongos <i>Nude</i> | 108 |
| Figura 26 - Perfis de biodistribuição do radiofármaco ¹⁷⁷ Lu ³⁺ -DOTATATO medida em porcentagem de atividade por grama de tecido. Camundongos <i>Nude</i> | 110 |
| Figura 27 – Perfis de biodistribuição do radioisótopo ¹⁷⁷ Lu ³⁺ medida em porcentagem de atividade por órgão ou tecido. Camundongos <i>Swiss</i> | 112 |
| Figura 28 – Perfis de biodistribuição do radioisótopo ¹⁷⁷ Lu ³⁺ medida em porcentagem de atividade por grama de tecido. Camundongos <i>Swiss</i> | 114 |
| Figura 29 – Imagens cintilográficas de camundongo <i>Nude</i> após a administração do ¹⁷⁷ Lu ³⁺ -DOTATATO..... | 115 |

LISTA DE ABREVIATURAS

α - alfa

β - beta

γ - gama

μCi – microcurie

DMSO – dimetilsulfóxido

μg – micrograma

μL – microlitros

^{111}In –índio-111

^{123}I – iodo-123

^{12}C – carbono-12

^{131}I – iodo-131

^{14}C – carbono-14

^{153}Sm – samário-153

^{16}O – oxigênio-16

^{177}Lu – lutécio – 177

$^{177}\text{Lu}(\text{OH})_3$ – hidróxido de lutécio-177

$^{177}\text{LuCl}_3$ – cloreto de lutécio-177

^{188}Re – rênio-188

^{18}O – oxigênio-18

5-HIAA – ácido 5-hidroxiindolacético

^{90}Y – ítrio -90

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ – tecnécio – 99 meta-estável

ACTH – hormônio adenocorticotrópico

AR42J – células de câncer pancreático de rato

ATCC – american type culture collection

AUC – área sob a curva

Bq – bequerel

$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ – glicose

CCD –cromatografia em camada delgada

Ci – Curie

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência
cm – centímetro
CNEN – Comissão Nacional de Energia Nuclear
CO₂ – dióxido de carbono
cpm – contagens por minuto
C-terminal – carbono-terminal
DNA – ácido desoxirribonucléico
DOTA – ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10 tetra-acético
D-Phe – D-fenilalanina
dps – desintegrações por segundo
DTPA – ácido dietileno triamino penta-acético
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-ácético
eq. – equivalente
Fig. – figura
g – grama
GBq – gigabequerel
H₂O – água
HCl – ácido clorídrico
Hf – háfnio
IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
ITLC – instant thin layer chromatography
Ka – constante de acidez
keV – kilo elétron volt
Kf – constante de formação do complexo
Kf^H - constante aparente de formação do complexo
Kps – constante de solubilidade ou produto de solubilidade
L – litro
LET – transferência linear de energia
Lu₂O₃ – óxido de lutécio
M – molar
MAP quinase – proteína quinase ativada por mitógenos
MBq – megabequerel

mCi – milicurie
MeV – mega elétron volt
mg – miligrama
mL – mililitro
mm – milímetro
mM – milimolar
mol – unidade do SI de quantidade de matéria
N – normal
NaI – iodeto de sódio
NaOAc – acetato de sódio
NH₂ – grupamento amina
NRG – Nuclear Analytical and Medical Services
N-terminal – nitrogênio-terminal
°C – grau Celsius
OMS – Organização Mundial da Saúde
ORNL – Oak Ridge National Laboratory
pC_H - pH corrigido
pH – potencial hidrogeniônico
pKa – logaritmo negativo de Ka
pLu – logaritmo negativo da [Lu³⁺]
pmol – pico mol
rpm – rotações por minuto
rsst – receptor de somatostatina
sst – somatostatina
t_(1/2)α - meia-vida de distribuição
t_(1/2)β - meia-vida de eliminação
T_(1/2)γ - meia-vida de eliminação lenta
t_{1/2} – meia-vida
Thr-ol – treoninol
Tyr – tirosina
UV – ultra-violeta

REVISÃO DA LITERATURA

Nomenclatura e classificação dos tumores neuroendócrinos

Carcinóide, tumor endócrino, carcinoma endócrino, carcinoma neuroendócrino, APUDoma, tumor gastroenteropancreático são alguns dos sinônimos encontrados na literatura e na prática clínica, para designar os tumores neuroendócrinos (Arnold, 2005).

A nomenclatura e a classificação destes tumores são controversas entre patologistas, cirurgiões e oncologistas. Historicamente, essa multiplicidade de denominações dadas aos tumores neuroendócrinos foi gerada em virtude de vários critérios que apresentaremos a seguir.

Um tipo de critério que foi utilizado para classificar os tumores neuroendócrinos consistia em partir do conhecimento do conteúdo hormonal do tumor, ou, ainda, da associação com síndromes clínicas. Este último modo de classificação acabava por omitir informações essenciais sobre as características do tumor. Por exemplo, o termo corticotropinoma podia ser usado para descrever um tumor benigno de pituitária, carcinoma de pulmão, ou, carcinoma de pequenas células de pâncreas, porque todos estes são capazes de produzir e secretar corticotropina (Ronald & DeLellis, 2001).

Williams e Sandler (1963) propuseram uma classificação de acordo com a embriogênese do tecido de origem do tumor. Baseados neste critério dividiram o tubo digestivo embrionário em três partes, chamando-as de: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior, sendo cada uma delas o provável local de origem de determinado tipo de tumor.

De acordo com esta classificação, os tumores neuroendócrinos do sistema respiratório, do estômago, do duodeno, do jejuno proximal e do pâncreas pertencem ao intestino anterior. Os tumores neuroendócrinos de jejuno distal, íleo, apêndice e cólon direito pertencem ao intestino médio. Os tumores neuroendócrinos de cólon transversal, cólon esquerdo e reto pertencem ao intestino posterior. A caracterização dos tumores neuroendócrinos nestes três grupos foi realizada com base em análises das características morfológicas, histoquímicas e imunohistoquímicas, que foram diferentes para cada um dos grupos (Williams & Sandler, 1963).

No entanto, estudos histopatológicos associados aos estudos sobre o desenvolvimento e comportamento destes tumores, evidenciaram que os tumores neuroendócrinos do intestino anterior não poderiam ser agrupados em uma mesma categoria e que, portanto, o uso desta classificação na triagem dos pacientes poderia gerar problemas (Arnold, 2005). Apesar da classificação de Williams e Sandler ter o seu valor histórico e poder ser usada para apontar o local do tumor primário, é notório a falta de uma solução definitiva para a classificação dos tumores neuroendócrinos.

Um complicador importante para a nomenclatura e classificação dos tumores neuroendócrinos foi a introdução do termo “carcinóide” (Karzinoid), em 1907 por Oberndorfer, para descrever uma classe de tumor intestinal distinta morfológicamente, apresentando um comportamento, quanto ao crescimento, menos agressivo do que os adenocarcinomas intestinais mais comuns. Oberndorfer não reconheceu a natureza endócrina destes tumores, embora esta caracterização já houvesse sido sugerida (Ciacco, 1906). Aqui é importante frisar que a generalização do uso do termo “carcinóide” introduzida por Oberndorfer produz uma complicação na classificação dos tumores neuroendócrinos porque sugere que estes tumores sempre são pouco agressivos.

A amplificação do uso do termo carcinóide para denominação dos tumores neuroendócrinos foi realizada por Gosset e Masson (1914) que, assim como Ciacco (1906), também chamaram atenção para a natureza endócrina dos carcinóides. Gosset e Masson observaram que os carcinóides cresciam a partir das células enterocromafins (células Kulchitzky) situadas nas glândulas de Lieberkuhn, localizadas principalmente no intestino. Isto explica porque os tumores endócrinos do sistema gastroenteropancreático foram chamados de carcinóides. Essa classificação não se aplica se eles crescem no pâncreas, embora as características histológicas sejam muito semelhantes.

Com o avanço de novas tecnologias de análises de materiais biológicos foi possível a inclusão de mais uma categoria aos tumores neuroendócrinos. Realizando estudos ultra-estruturais de tumores, Bensch *et al.*, (1968) estabeleceram relações entre o carcinoma de pequenas células de pulmão e o carcinóide bronquial porque

foi possível observar, por exemplo, que ambos tinham origem do mesmo tipo celular (células de Kulchitsky), encontradas no epitélio bronquial.

A partir das inter-relações entre estes dois tipos de tumores, estabelecidas por Bensch *et al*, (1968), foi possível a caracterização de um terceiro tipo de tumor denominado de carcinóide atípico. Esta caracterização foi baseada em estudos do tamanho e formato irregular das células, hipercromasia, atividade mitótica e necrose (Arrigoni, Woolner & Bernatz, 1972).

Uma nova classificação foi então proposta dividindo os tumores neuroendócrinos em relação ao potencial de malignidade do seguinte modo: 1) potencial de malignidade baixo, que seriam os tumores denominados carcinóides; 2) potencial de malignidade intermediário seriam os carcinóides atípicos; 3) potencial de malignidade alta seriam os carcinomas de pequenas células. Observou-se ainda que, embora fosse um fenômeno raro, o tumor neuroendócrino poderia transitar entre estes três tipos dependendo da sua localização, como observado no carcinóide de timo (Wick & Ritter, 1999).

Em 1980, a Organização Mundial da Saúde (OMS), insistindo no uso inapropriado do termo carcinóide e tentando conter a generalização implicada no termo, sugere, paradoxalmente, o uso de “carcinóide” para todos os tumores do sistema endócrino, classificando-os como: 1) carcinóides de células enterocromafins (ou carcinóides clássicos ou argentafinomas); 2) carcinóides gastrina (células G); 3) carcinóides de outros tipos. Como exceções a essa classificação, há os tumores do pâncreas endócrino; os carcinomas de medula da tireóide; os paragangliomas; os carcinomas de pequenas células de pulmão; os carcinomas das células de Merckel (Williams, 1980).

No entanto, a partir da utilização das técnicas de microscopia eletrônica e imunohistoquímica nos estudos de caracterização de tumores, observa-se que o termo carcinóide sugerido pela OMS em 1980 não é o mais apropriado para definir o amplo espectro de tumores, com características neuroendócrinas, porque impõe falsamente a idéia de graus de malignidade baixo ou intermediário. Esta observação revela que o termo carcinóide passa a ser usado em um sentido muito amplo, incluindo neoplasias que podem ser benignas, mediantemente malignas ou malignas, de

acordo com suas características morfológicas e evolução clínica (Gould *et al.*, 1983; DeLellis & Tischler 1998; Wick & Rosai, 1988; Capella *et al.*, 1995; Kloppel *et al.*, 1996).

Paralelo aos estudos de caracterização dos tumores neuroendócrinos, novas chaves de classificação iam surgindo, entretanto, sem delimitar a generalização do uso do termo carcinóide, que ainda persiste.

Gould *et al.*, (1983), propuseram uma classificação que incluísse os seguintes termos: carcinóide típico, carcinoma neuroendócrino bem diferenciado e carcinoma neuroendócrino de células pequenas ou intermediárias. Travis *et al.*, (1991), propuseram a inserção dos termos: carcinoma neuroendócrino de células grandes (ou volumosas) para os tumores neuroendócrinos de pulmão. Capella *et al.*, (1995) sugeriram a inclusão dos termos: tumor neuroendócrino de grau baixo/benigno, carcinoma neuroendócrino de grau baixo de malignidade e carcinoma neuroendócrino de grau alto de malignidade. Estudos moleculares no final do século XX e início do atual apontam para a necessidade de propor uma chave mais precisa para a classificação dos tumores neuroendócrinos (Komminoth, Heitz & Kloppel, 1998; Onuki, 1999; Hoff, Conte & Gagel, 2000 e Petzmann, 2001).

Em 2000 a Organização Mundial da Saúde sugeriu a substituição do termo neuroendócrino por endócrino e uma nova proposição de classificação que considera o comportamento específico do tumor, de acordo com a sua localização e diferenciação (Solcia, Kloppel & Sobin, 2000). Frente a esta perspectiva, os tumores endócrinos de pâncreas e gastrointestinais são classificados em 3 categorias, a saber: 1) tumores endócrinos bem diferenciados (tumores endócrinos benignos); 2) carcinomas endócrinos bem diferenciados (carcinoma neuroendócrino com baixo potencial maligno); 3) carcinomas endócrinos pouco diferenciados (carcinomas neuroendócrinos altamente malignos). Sugere ainda que o termo “carcinóide” deva ser usado somente para a caracterização de tumores neuroendócrinos bem diferenciados (ou altamente diferenciados) do trato gastrointestinal, mas não do pâncreas.

A OMS sugere ainda que os tumores endócrinos bem diferenciados (categoria 1) sejam segregados dos carcinomas endócrinos bem diferenciados (categoria 2),

por intermédio da condução de estudos a cerca do tamanho do tumor, da sua localização, da capacidade de invasão localizada, da angiogênese e metástase. Outros parâmetros que considera importantes nesta segregação são: a citologia irregular (atípica), índice mitótico, a taxa de proliferação e o padrão de produção hormonal.

Apesar de todos os estudos coligidos acima, a classificação e a nomenclatura dos tumores neuroendócrinos não estão ainda estabelecidas definitivamente. Muitos esforços ainda serão necessários para que se possa estabelecer uma sistemática de classificação que seja plausível e coerente com a diversidade destes tumores. Para Ronald e deLellis (2001), estudos da expressão gênica dos tumores neuroendócrinos poderão promover um melhor entendimento na sua caracterização individual, facilitando sua classificação e estabelecendo melhor suas inter-relações.

Possibilidades diagnósticas de tumores neuroendócrinos

O refinamento das ferramentas de caracterização tanto dos tumores propriamente ditos, quanto do seu comportamento e desenvolvimento ampliou a possibilidade diagnóstica dos tumores neuroendócrinos. Além disso, novas perspectivas diagnósticas se justificam pelo aumento da incidência populacional dos tumores carcinóides do trato gastrointestinal como importante problema de saúde pública (Modlin & Sandor, 1997; Modlin, Lye & Didd, 2003).

Uma abordagem diagnóstica para os tumores neuroendócrinos é o perfil de produção hormonal. De acordo com o seu tecido de origem, os tumores neuroendócrinos podem produzir, por exemplo, ACTH (hormônio adenocorticotrópico), serotonina, calcitreína, histamina, prostaglandina, gastrina e insulina, sendo cada um destes hormônios responsável por diferentes reações orgânicas que resultam, por sua vez, em diferentes quadros clínicos (Creutzfeldt, 1996). Portanto fica evidente a dificuldade de se efetuar um diagnóstico que irá indicar a ocorrência de tumor neuroendócrino baseado no quadro clínico do paciente.

Uma abordagem diagnóstica para avaliar tumor neuroendócrino de intestino médio é a avaliação do ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), um dos produtos

metabólicos da serotonina, na urina do paciente. Sua avaliação na urina de 24 horas é indicativa dos tumores originários do intestino médio, uma vez que os tumores originados do intestino anterior e posterior não secretam serotonina (Kotze, 1998; Roggo, Wood & Ottinger, 1993).

Outras abordagens utilizadas para o diagnóstico e para a localização dos tumores neuroendócrinos são: radiografia de abdômen, ultra-sonografia, tomografia computadorizada (Chayvialle, 1996), ultra-sonografia endoscópica e endorectal e ressonância magnética nuclear (Hokama *et al.*, 1996). Embora existam todas essas ferramentas disponíveis, a precisão do diagnóstico ainda não atinge um nível satisfatório e conclusivo.

A precisão diagnóstica dos tumores neuroendócrinos ganhou maior especificidade com o uso de isótopos radioativos ligados aos análogos da somatostatina. Esta abordagem constitui, na atualidade, a grande ferramenta para a avaliação diagnóstica – e, também terapêutica, como veremos adiante – dos tumores neuroendócrinos.

Somatostatina e análogos sintéticos da somatostatina

A somatostatina (sst) é um peptídeo cíclico encontrado sob duas formas: somatostatina-14 formada por 14 aminoácidos e somatostatina-28, formada por 28 aminoácidos. Ambas as formas agem a partir de sua ligação a receptores específicos situados na membrana plasmática das células alvo, sendo os resíduos de 7 a 11, além da sua estrutura cíclica, essenciais para o reconhecimento do sítio de ligação com o receptor (Blok *et al.*, 1999).

A somatostatina atua em muitos sistemas orgânicos, como o sistema nervoso central, o sistema pituitária-hipotálamo, o trato gastrointestinal, o pâncreas endócrino e exócrino e o sistema imune. Devido a sua versatilidade, por atuar em diferentes sistemas, a sst pode ser considerada, por vezes, um neurotransmissor, um neurohormônio, ou um hormônio que atua por mecanismos autócrino e parácrino (Patel, 1999).

A somatostatina possui uma ação regulatória ou inibitória em um amplo espectro de funções fisiológicas. No trato gastrointestinal ela inibe sua motilidade, a produção de ácido gástrico, a secreção de enzimas pancreáticas e a secreção da bile. No pâncreas e intestinos ela também atua na inibição dos hormônios insulina, glucagon, secretina e polipeptídeo intestinal vasoativo (de Herder *et al.*, 2003). Além dessas funções, cabe ressaltar aqui o controle regulatório que a somatostatina exerce sobre a proliferação celular, tanto em tecidos normais, como em tecidos tumorais (Reichlin, 1983, a, b; Schally, 1988; Lamberts *et al.*, 1991).

A partir da observação desta atividade inibitória/regulatória da sst sobre essa gama de processos fisiológicos, vislumbrou-se, inicialmente, o seu valor terapêutico em casos clínicos que envolvessem hipersecreção ou hiperfunção dos órgãos supracitados. Porém essa euforia inicial da aplicação clínica da sst é refreada por Lamberts *et al.*, (1996), que apontam alguns entraves para este uso.

De acordo com Lambert, a concentração necessária para que houvesse ação farmacológica geraria múltiplos efeitos colaterais em diferentes órgãos. Outro fator impeditivo do uso da sst para estes casos clínicos foi a pequena duração de sua ação, em consequência de sua meia vida ($t_{1/2}$) plasmática que, devido a proteólise, é de aproximadamente 2 minutos. No entanto, todas essas descobertas foram geradoras de informações, e, a partir delas, novas possibilidades do uso da sst foram surgindo.

Em função dos fatores apontados como impeditivos para o uso clínico da sst, a primeira necessidade foi lançar mão de análogos da sst, isto é, peptídeos sintéticos que pudessem exercer a maioria das ações da própria sst, mas que superassem os problemas encontrados como, por exemplo, sua tão baixa meia vida plasmática, do que decorre sua ação de curta duração.

Assim os análogos da somatostatina ganham maior importância no cenário científico. O octapeptídeo análogo da somatostatina que foi denominado octreotideo, já sintetizado na década de 80 (Bauer *et al.*, 1982), foi retomado devido às novas perspectivas para seu uso.

Neste análogo, formado por 8 aminoácidos, foi mantida a mesma afinidade da sst pelo seu receptor, que é devido aos resíduos 7-11, bem como a conformação

cíclica da molécula. Para proteger este octapeptídeo contra a degradação enzimática, foram realizadas modificações nas porções N-terminal da molécula, na qual foi inserido um D-aminoácido, a D-Phe (D-fenilalanina) e outra modificação na porção C-terminal, na qual foi inserido um amino-álcool, Thr-ol (treoninol). Estas modificações conduziram ao aumento da meia vida plasmática do análogo sintético, que passa a ser estimada em torno de 2 horas (Pless *et al.*, 1986).

Com este poder de ação potencializado em função do aumento da meia-vida plasmática, este análogo da somatostatina passa a ser indicado para o tratamento sintomático de tumores neuroendócrinos. Com base no efeito inibitório da somatostatina, o uso do análogo, que por sua vez carrega as mesmas características farmacodinâmicas da sst, atua na regulação da hipersecreção das células tumorais resultando em melhora na qualidade de vida do paciente (Reubi, 2003).

Outros análogos da somatostatina foram desenvolvidos com o mesmo intuito para uso clínico. Os que se mostraram mais adequados a esta função foram os octapeptídeos cíclicos, sendo os mais citados na literatura atual, além do octreotídeo, o [Tyr³]-octreotídeo, o vapreotídeo, o lanreotídeo e o [Tyr³]-octreotato. Neste trabalho nos deteremos no uso do [Tyr³]-octreotato, cuja importância clínica em tumores neuroendócrinos, será abordada no decorrer deste trabalho.

A razão desta aplicação clínica dos análogos da sst é a presença, nos tumores neuroendócrinos, de receptores para somatostatina (rsst) em alta densidade. Embora não se tenha uma hipótese que explique, de fato, esse aumento da expressão dos receptores para somatostatina nas células dos tumores neuroendócrinos, é fato que estes tumores “super-expressam” os rsst.

Receptores de somatostatina

Os receptores de somatostatina foram detectados *in vitro* em amostras de tumores humanos, via método de autoradiografia, e, atualmente, 5 subtipos de rsst já foram caracterizados: rsst 1, rsst 2 (rsst 2a e rsst 2b), rsst 3, rsst 4 e rsst 5 (Hoyer, Lubbert & Bruns, 1994). Todos os 5 subtipos de rsst são acoplados aos receptores

de proteína G, que media os sistemas efetores intracelulares, por intermédio de um sistema de segundo mensageiro.

Este sistema inclui: 1) a inibição da adenilato ciclase; 2) a inibição da abertura dos canais de cálcio nas células; 3) a estimulação da fosfotirosina fosfatase; 4) a estimulação da MAP quinase (mitogen-activated protein) (Reisine & Bell, 1995; Patel, 1997, 1999). Os efeitos inibitórios da sst sobre a atividade da adenilato ciclase e sobre os canais de cálcio estão ligados à inibição do processo secretório da célula. Já a ativação da fosfotirosina fosfatase ou da MAP quinase estão, provavelmente, envolvidas na regulação da proliferação celular (Schally, 1988; Lamberts, Krening & Reubi, 1991; Hofland, Visser-Wisselaar & Lamberts, 1995).

O processo da interação do peptídeo com o receptor na membrana da célula possui um interessante mecanismo de inativação. Após a interação, o complexo peptídeo-receptor sofre um processo de internalização pela célula, que irá resultar em degradação deste complexo e/ou reciclagem do receptor internalizado que retorna à superfície da membrana da célula, livre para novas interações (Behr *et al.*, 2001). Este processo de internalização é fundamental para formação de imagem diagnóstica dos tumores neuroendócrinos, que será abordado no decorrer deste capítulo.

Além da caracterização dos 5 subtipos de rsst, observou-se que estes receptores são expressos de maneira heterogênea, sendo essa variação tumor-dependente, embora haja variação na expressão de receptores em um mesmo tipo de tumor (Reubi *et al.*, 1998 a; Schulz *et al.*, 1998; Kimura *et al.*, 1999; Hofland *et al.*, 1996 b). Outra distinção importante foi a observação de padrões de expressão dos rsst que foram divididos em duas classes: uma classe que expressa os receptores rsst 1 e rsst 4 e outra classe que expressa os rsst 2, rsst 3 e rsst 5.

Ainda dentro desse conjunto de variações tão complexas, há que se levar em conta a afinidade de cada um destes receptores pelo análogo da sst com o qual vai interagir. Por exemplo, o octreotídeo se liga com alta afinidade aos rsst 2, com uma afinidade considerada moderada aos rsst 5 e com afinidade menor aos rsst 3 (Reubi *et al.*, 2000).

Radiofármacos no diagnóstico de tumores neuroendócrinos

A utilização de análogos da somatostatina como ferramenta para o diagnóstico de tumores que super-expressam rsst foi proposta por Krenning *et al.*, (1989) que utilizaram um isótopo radioativo do iodo acoplado a um análogo da sst, sintetizando o radiofármaco [^{123}I -Tyr 3] octreotideo, para a localização de tumores neuroendócrinos.

Segundo Reubi (2003), o princípio para esta utilização é simples: o peptídeo ligado a um isótopo radioativo, que deve ser obrigatoriamente um emissor de radiação γ (gama) como ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{177}Lu , é injetado no paciente por via intravenosa. O paciente é então colocado sob uma câmara de cintilografia γ , que captura as emissões desta radiação, integrando-as e transduzindo-as, por meio de um sistema computadorizado adequado, em uma imagem que permite, já em primeira instância, localizar o tumor e suas possíveis metástases, com precisão.

O radioiodo foi o primeiro isótopo radioativo acoplado a um análogo da sst, formando um radiofármaco útil na detecção de tumores neuroendócrinos, devido à facilidade de sua incorporação no peptídeo, a partir de um resíduo de Tyr da molécula, caracterizando o que se chama de método direto de incorporação do radioisótopo.

No entanto este radiofármaco não se mostrou estável, uma vez que a digestão proteolítica intralisossomal que ocorre durante o processo de internalização do complexo radiofármaco-receptor, gerava mono ou di-iodotirosina que eram rapidamente excretadas da célula, não permitindo assim um acúmulo suficiente do radiofármaco por tempo adequado para aquisição de uma boa imagem. (Behr *et al.*, 2001)

Uma saída encontrada para este problema foi o uso de agentes quelantes como o ácido dietileno triamino penta-acético (DTPA) ou o ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10 tetra-acético (DOTA) acoplados aos análogos da somatostatina. Neste caso, o radioisótopo não se liga diretamente ao análogo, mas complexa com o agente quelante (como, por exemplo: o ^{111}In -DTPA-octreotideo, Octreoscan[®]) (Krenning *et al.*, 1995).

O uso do agente quelante (DOTA ou DTPA), tanto aumenta a estabilidade do radiofármaco, quanto impede a rápida degradação proteolítica que ocorre no lisossoma após o processo de internalização, resultando em acúmulo do radiofármaco no meio intracelular, o que concorre com melhora na aquisição da imagem cintilográfica (Behr *et al.*, 2001).

A tabela A ilustra as sequências de aminoácidos que formam os análogos sintéticos da sst, os agentes quelantes disponíveis e os respectivos análogos sintéticos da sst quimicamente ligados aos agentes quelantes.

Tabela A – Octapeptídeos análogos da somatostatina, sua sequência de aminoácidos, o nome dado à sequência e o análogo ligado ao agente quelante.

| Sequência de aminoácidos dos peptídeos | Nome | Abreviações |
|---|---------------------------------|-----------------------|
| -D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr(ol) | Octreotideo | OC |
| -D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr(ol) | [Tyr ³]-octreotideo | [Tyr ³]OC |
| -D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Trp | Vapreotideo | VAP |
| -β-D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr | Lanreotideo | LAN |
| -D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr | [Tyr ³]-octreotato | TATO |
| Agente Quelante | | Abreviações |
| Ácido dietileno triamino penta-ácético | | DTPA |
| Ácido 1,4,7,10 – tetraazaciclododecano - 1,4,7,10 tetra-acético | | DOTA |
| Agente quelante-peptídeo conjugado | | Abreviações |
| DTPA-octreotideo | | DTPAOC |
| DTPA-[Tyr ³]-octreotato | | DTPATATE |
| DOTA-octreotideo | | DOTAOC |
| DOTA-[Tyr ³]-octreotideo | | DOTATOC |
| DOTA-vapreotideo | | DOTAVAP |
| DOTA-lanreotideo | | DOTALAN |
| DOTA-[Tyr ³]-octreotato | | DOTATATO |

Fonte: Adaptado de European Journal of Nuclear Medicine. Vol. 27, No. 3, March 2000.

Por fim, o radiofármaco formado pelos análogos sintéticos da sst quimicamente ligados ao agente quelante (que possibilita a inserção de um radioisótopo metálico) tornou-se um importante recurso diagnóstico porque permite a obtenção de boas imagens cintilográficas de tumores que expressam receptores para somatostatina.

A literatura considera que os resultados mais promissores foram encontrados em relação aos tumores que expressam rsst com alta densidade, como os tumores neuroendócrinos, mas também foram encontrados resultados satisfatórios no uso diagnóstico de meningiomas e meduloblastomas (Schmidt *et al.*, 1998; Muller *et al.*, 1998).

Radioisótopos na terapia de tumores neuroendócrinos

A utilização de um radiofármaco receptor-específico para o diagnóstico de tumores neuroendócrinos abriu possibilidades para que se pensasse em vias terapêuticas utilizando como alvo os receptores de somatostatina. Assim, os radiofármacos usados para fins de diagnóstico foram modificados para uso terapêutico por meio da substituição do radioisótopo.

Segundo Srivastava & Dadachova (2001), a escolha do radioisótopo para fins terapêuticos deve ser avaliada com base nos seguintes fatores: 1) meia-vida física, considerada ótima entre 1 e 14 dias; 2) tipo de emissão (α , β , γ , elétron Auger), que engloba o modo de desintegração do radioisótopo, bem como a energia e a intensidade da radiação; 3) atividade específica; 4) química favorável à síntese do radiofármaco, como por exemplo o radioiodo que sofre substituição eletrofílica num resíduo de tirosina (Tyr) ou radiometais que são facilmente complexados por agentes quelantes que são encontrados comercialmente acoplados à biomoléculas; 5) via de administração; 6) dosimetria interna; 7) cuidados com a segurança radiológica e ambiental; 8) veículo usado como carreador; 9) farmacocinética *in vivo* do radiofármaco e do radioisótopo livre; 10) custo de produção.

Apesar de todos estes fatores influenciarem, de um modo ou de outro, na escolha do radioisótopo adequado para a terapia, para proposições práticas a escolha atual é limitada à emissão de partícula β^- pelo radioisótopo eleito (Lewington, 2003). As

partículas β^- são elétrons carregados negativamente que são emitidos do núcleo de um átomo instável, sendo sua energia e seu alcance, variáveis (Zweit, 1996).

Os elementos radioativos conhecidos por serem emissores de partículas β^- possuem muitos representantes, os quais são classificados em 3 grupos de acordo com a energia de emissão da partícula e conseqüente alcance: 1) radionuclídeos emissores β^- de baixa energia; 2) radionuclídeos emissores β^- de média energia e 3) radionuclídeos emissores β^- de alta energia (Zweit, 1996).

Os elementos com emissões β^- que são classificados como “de baixa energia”, possuem emissões com energias que variam de 0,08 a 0,18 MeV, apresentando alcance, na água, entre 0,4 e 0,9 mm, sendo seus representantes o iodo – 131 (^{131}I) e o lutécio – 177 (^{177}Lu). Os de média energia são classificados entre 0,23 a 0,36 MeV, com alcance entre 1,2 e 1,8 mm, como por exemplo o samário – 153 (^{153}Sm). Os de alta energia variam entre 0,5 a 1,0 MeV, com alcance entre 2,2 e 5,0 mm, sendo seus representantes o rênio – 188 (^{188}Re) e o ítrio – 90 (^{90}Y) (Zweit, 1996). A tabela B mostra alguns radioisótopos que são frequentemente utilizados na produção de radiofármacos com fins terapêuticos.

Tabela B – Características físicas de radioisótopos emissores β^- , utilizados na terapia de tumores

| Radioisótopo | $t_{1/2}$ (dias) | Emissão | $E\beta$ (MeV) | d (mm) * | $E\gamma$ (keV) / A (%) |
|-----------------|---------------------|-----------|----------------|----------|----------------------------|
| I – 131 | 8,0 | β^- | 0,181 | 0,39 | 364 / 81 |
| Lu- 177 | 6,7 | β^- | 0,140 | 0,23 | 208 / 11 |
| Sm - 153 | 1,9 | β^- | 0,225 | 0,54 | 103 / 28 |
| Re - 188 | 0,7 | β^- | 0,795 | 3,1 | 155 / 15 |
| Y – 90 | 2,7 | β^- | 0,935 | 4,0 | - |

$t_{1/2}$ - meia vida física; $E\beta$ - energia média de emissão; **d** - alcance na água; $E\gamma$ / **A** - energia gama principal / abundância.

Fonte: Adaptado de “Seminars in Nuclear Medicine”, vol. XXXI, nº 4 (october), pp. 331, 2001.

* Welch, 2003.

O objetivo da terapia utilizando-se radioisótopos associados a biomoléculas receptor-específicas é levar diretamente ao tumor doses de radiação tidas como terapêuticas, sem que os tecidos adjacentes e órgãos saudáveis sejam afetados excessivamente.

A dose terapêutica será eficiente quando produzir um efeito radiocitotóxico sobre as células-alvo. No efeito radiocitotóxico, a partícula β^- emitida pelo radioisótopo promove ionizações durante sua trajetória, sendo parte de sua energia transferida e depositada no material biológico. Tal energia absorvida pela célula tumoral induz quebras de ligações químicas na molécula de DNA, o que pode levar à morte celular (Kassis & Adelstein, 2003).

A razão entre a energia transferida pela partícula β^- emitida pelo radioisótopo (dada em keV) e o seu alcance (em unidade de comprimento) é denominada transferência linear de energia (LET). Essa taxa de transferência linear de energia é um importante parâmetro na escolha do radioisótopo a ser utilizado na produção de radiofármacos com fins terapêuticos. Isto porque emissões que possuem um alto LET irão produzir mais ionizações em menor espaço e, conseqüentemente, terão maior probabilidade de produzir um dano biológico irreversível (Kassis & Adelstein, 2003).

Embora existam todos estes parâmetros para o uso de radioisótopos na terapia de tumores neuroendócrinos, não existe, de fato, um consenso de como estes parâmetros podem racionalizar a escolha de um radioisótopo para compor um radiofármaco que venha a ser utilizado na terapêutica.

Nos últimos anos o radioisótopo $^{177}\text{Lu}^{3+}$ surgiu como um promissor emissor β^- de curto alcance para uso na terapia de tumores neuroendócrinos. Sua baixa energia de emissão β^- , associada ao seu curto alcance, tornam este radioisótopo ideal para tratamento de metástases pequenas dos tumores neuroendócrinos, sem o risco de exposição desnecessária dos tecidos adjacentes aos tumores, como ocorre com o uso do ^{90}Y .

Outra vantagem em relação ao ^{90}Y , que é rotineiramente utilizado na produção de radiofármacos para terapia de tumores neuroendócrinos, é que o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ possui emissão de energia γ adequada à realização de diagnóstico por imagem, bem como

aos estudos dosimétricos. Quando se utiliza para fins terapêuticos um radiofármaco com ^{90}Y , que não emite radiação γ com energia suficiente para detecção e formação de imagem diagnóstica, faz-se uso de um radiofármaco com ^{111}In para a avaliação diagnóstica e dosimétrica. No entanto não há dados suficientes que evidenciem a equivalência da biodistribuição destes radioisótopos (^{90}Y e ^{111}In) no paciente (Vallabhajosula *et al.*, 2005).

O ^{131}I , que também é um radioisótopo utilizado rotineiramente na clínica, não é o mais adequado para obtenção de diagnóstico por imagem em função de sua emissão γ ser de alta energia. Sua utilização leva a necessidade de cuidados especiais como o isolamento do paciente. O uso do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ não tem este inconveniente (Dvoráková, 2007).

Radiofármacos com $^{177}\text{Lu}^{3+}$ para o diagnóstico e para a terapia de tumores neuroendócrinos

As possibilidades do uso diagnóstico e terapêutico do radioisótopo $^{177}\text{Lu}^{3+}$ em tumores neuroendócrinos vêm sendo muito exploradas recentemente. A maior parte do uso do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ está concentrada no desenvolvimento de radiofármacos com peptídeos análogos da somatostatina, sendo mais utilizados na clínica o DTPAOC, o DOTATOC, DOTATATO e o DOTALAN (Tab. A) (Krenning *et al.*, 2005; Reubi Macke & krenning, 2005), com finalidade de diagnóstico, mas, principalmente, com grande ênfase no tratamento de tumores neuroendócrinos (Schimitt *et al.*, 2004; Teunissen, Kwekkeboom & Krenning, 2004; Forrer *et al.*, 2005).

Os octapeptídeos análogos da somatostatina apresentam estruturas semelhantes, sendo que as pequenas modificações que os diferem acabam por interferir na afinidade pelo receptor de somatostatina. A literatura ressalta que a afinidade do DOTATATO pelos rsst 2 é nove vezes maior do que a afinidade do DOTATOC pelo mesmo receptor (Reubi, Macke & krenning, 2005). Já o DOTALAN apresenta afinidade diminuída pelos rsst 2, porém tem alta afinidade pelos rsst 5 (Krenning *et al.*, 2005).

Estudo em modelo animal mostrou que quando associados ao radioisótopo ^{90}Y , formando os radiofármacos ^{90}Y -DOTATOC e ^{90}Y -DOTATATO, este último apresentou maior afinidade pelos tecidos que expressam rsst (de Jong *et al.*, 1998).

Dados da literatura sugerem que o agente quelante DTPA acoplado ao octreotideo (DTPAOC) apresenta baixa estabilidade quando ligado a radiometais (Kaltsas *et al.*, 2005). Assim, para fins terapêuticos, o agente quelante DTPA foi substituído pelo DOTA, do que resulta maior estabilidade aos complexos formados com radiometais ^{90}Y e $^{177}\text{Lu}^{3+}$ (Reubi, Macke & Krenning, 2005). Esta estratégia evita uma rápida dissociação do complexo ligante-radiometal no plasma, com conseqüente aumento de irradiação no tumor (Kaltsas *et al.*, 2005).

A literatura vem dando grande ênfase ao uso do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO no tratamento de tumores neuroendócrinos (Kwekkeboom *et al.*, 2001; Kwekkeboom *et al.*, 2003; Teunissen, Kwekkboom & Krenning, 2004; de Jong *et al.*, 2005; Kwekkeboom *et al.*, 2005; Esser *et al.*, 2006).

Por tudo o que foi descrito, fica notória a importância do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO no tratamento e no diagnóstico de tumores neuroendócrinos, razão pela qual justificam-se pesquisas brasileiras para sua produção.

Protocolos de síntese do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO da Agência Internacional de Energia Atômica.

Pelo Programa de Cooperação Técnica coordenado pela Agência Internacional de Energia Atômica, denominado “Comparative Evaluations of Therapeutic Radiopharmaceuticals”, grupos de pesquisadores trabalharam em prol do desenvolvimento de radiofármacos com análogos da somatostatina utilizando diferentes radionuclídeos (IAEA, 2007). Descreveremos aqui os protocolos de obtenção do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO resultantes deste programa (Tab. C).

TABELA C – Protocolos de síntese do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO

| <i>País</i> | <i>Origem do $^{177}\text{Lu}^{3+}$</i> | <i>Meio de reação</i> | <i>pH</i> | <i>T (°C)</i> | <i>t (min)</i> | <i>$^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO</i> |
|------------------|--|---|-----------|---------------|----------------|---|
| Brasil | Nordion, Canadá (>50Ci/mg) e IDB, Holanda (>20Ci/mg) | HCl 0,05 N, com ascorbato de sódio e ácido gentísico; ou tampão acetato 0,4 M | 4,5 | 80 – 100 | 30 | ? : 10 µg |
| Índia | Produzido no próprio país | Tampão acetato de amônio 0,1 M | 5,0 | 80 | 60 | 600 µCi : 25 µg 1,13 nmol : 17,41 nmol |
| Itália | Sigma-Aldrich | Ácido gentísico em tampão acetato | ~4,5 | 90 | 30 | 3 eq. : 1 eq |
| Coréia | Perkin-Elmer Life Sci., Belgica | Tampão acetato com ácido gentísico | 4,5 | 90 | 30 | 1 mCi : 1 µg |
| México | Nordion, Canadá (>32GBq/mL) | Tampão acetato 1 M. | 5,0 | 90 | 30 | 185 MBq : 5 µg |
| Paquistão | Produzido no próprio país | Tampão 30 mM acetato de sódio / 25 mM ascorbato de sódio. | 2,0 a 7,0 | 20 – 90 | 5 a 60 | 10 mCi : 25 µg |
| Polônia | ? | Acetato de sódio com 40 mg/mL de ácido dihidroxibenzóico | 4,5 | 95 | 25 | 1 mol : 5 mol |
| Romênia | Nordion, Canadá (45Ci/mg). | Tampão acetato, 0,4 M, ácido 3-hidroxi 4 aminobenzóico (5mg) | 4,5 | 80 | 30 | 10 mCi : 10 µg 1 mol : 3,7 mol |
| Uruguai | Adaho, USA e University of Missouri, Columbia, USA | Acetato de sódio 0,4 M e ácido gentísico | ? | 100 | 30 | 7,2 mCi : 7,2 µg |

T (°C) – temperatura; t (min) – tempo (minutos); ? – dado desconhecido. IAEA (2007).

A partir dos resumos dos protocolos de obtenção do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO descritos na tabela C, podemos perceber que há diferenças marcantes entre os parâmetros de síntese utilizados por cada país. A carência de uniformidade destes protocolos torna evidente a necessidade de avaliar criticamente e de racionalizar a síntese deste radiofármaco.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNOLD, R. Introduction: definition, historical aspects, classification, staging, prognosis and therapeutic options. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 19, n. 4, p. 491 – 505, 2005.
- ARRIGONI, M.G.; WOOLNER, L.B.; BERNATZ, P.E. Atypical carcinoid tumor of the lung. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 64, p. 413 – 421, 1972.
- BAUER, W.; BRINER, U.; DOEPFNER, W.; HALLER, R.; HUGUENIN, R.; MARBACH, P.; PETCHER, T.J.; PLESS, J. SMS 201-995: a very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action. **Life Sciences**, v. 31, p. 1133 – 1140, 1982.
- BEHR, T.M.; GOTTHARDT, M.; BARTH, A.; BÉHÉ, M. Imaging tumors with peptide-based radioligands. **The Quarterly Journal of Nuclear Medicine**, v. 45, p. 189 – 200, 2001.
- BENSH, K.G.; CORRIN, B.; PARIETE, R.; SPENCER, H. Oat cell carcinoma of the lung: its origin and relationship to bronchial carcinoid. **Cancer**, v. 22, p. 1163 – 1172, 1968.
- BLOK, D.; FEITSMA, R.I.J.; VERMEIJ, P.; PAWELS, E.J.K. Peptide radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine. **European Journal of Nuclear Medicine**, v. 26, n. 11, p. 1511 – 1519, nov. 1999.
- CAPELLA, C.; HEITZ, P.U.; HOFER, H., SOLCIA, E. & KLOPPEL, G. Revised classification of neuroendocrine tumors of the lung, pancreas and gut. **Virchows Archives**, v. 425, p. 547 – 560, 1995.
- CHAYVIALLE, J.A. A comparison of imaging techniques for localization of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. **Digestion**, v. 57 (suppl. I), p. 54 – 56, 1996.
- CIACCO, C. Sur une nouvelle espèce cellulaire dans les glandes de Lieberkuhn. **Comptes Rendus des Seances de la Société de Biologie et ses Filiales**, v. 1, p. 76 – 78, 1906.
- CREUTZFELDT, W. Carcinoid Tumors: development of our knowledge. **World Journal of Surgery**, v. 20, p. 126 – 131, 1996.
- DE HERDER, W.W.; HOFER, L.J.; IVAN DER LELY, A.; LAMBERTS, S.W.J. Somatostatin receptor in gastroentero-pancreatic neuroendocrine tumors. **Endocrine-Related Cancer**, v. 10, p. 451 – 458, 2003.

DE JONG, M.; BREEMAN, W.A.; BAKKER, W.H.; KOOIJ, P.P.; BERNARD, B.F.; HOFLAND, L.J.; VISSER, T.J.; SRINIVASAN, E.P.; SCHMIDT M.A.; ERION, J.L.; BUGAJ, J.E.; MACKE, H.R.; KREENING, E.P. Comparison of ^{111}In -labeled somatostatin analogues for tumor scintigraphy and radionuclide therapy. **Cancer Research**, v. 58, p. 437 – 441, 1998.

DE JONG, M.; BREEMAN, W.A.; VALKEMA, R.; BERNARD, B.F.; KREENING, E.P. Combination radionuclide therapy using ^{177}Lu and ^{90}Y labeled somatostatin analogs. **The Journal of Nuclear Medicine**, v. 46, p. 13S – 17S, 2005.

DELELLIS, R.A.; TISCHER, A.S. The dispersed neuroendocrine cell system. In: Kovacs K, Asa SL, eds. **Functional endocrine pathology**. 2. Ed. Malden, MA: Blackwell Scientific, 1998.p. 529 – 549

DVORÁKOVÁ, Z. **Production and chemical processing of ^{177}Lu for nuclear medicine at the Munich research reactor FRM-II**. Institut für Radiochemie der Technischen Universität München, 2007.

ESSER, J.P.; KRENNING, E.P.; TEUNISSEN, J.J.M.; KOOIJ, P.P.M.; VAN GAMEREN, A.L.H.; BAKKER, W.H.; KWEKKEBOOM, D.J. Comparison of [^{177}Lu -DOTA,Tyr³]octreotate and [^{177}Lu -DOTA,Tyr³]octreotide: wich peptide is preferable for PRRT? **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v.33, n.11, p. 1346 – 1351, 2006.

FORRER, F.; USIJARVI, H.; STORCH, D.; MAECKE, H.R.; MUELLER-BRAND. Treatment wit ^{177}Lu -DOTATOC of patients with relapse of neuroendocrine tumors after treatment with ^{90}Y -DOTATOC. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 46,n. 8, p. 1310 – 1316, 2005.

GOSSET, A.; MASSON, P. Tumeurs endocrines de l'appendice. **Presse Médicin**, v. 22, p. 237 – 240, 1914.

GOULD, V.E.; LINNOILA, I.; MEMOLI, V. A.; WARREN, W.H. Neuroendocrine componentes of the bronchopulmonary tract: hyperplasias and neoplasms. **Laboratory Investigation**, v. 49, p. 519 – 537, 1983.

HOFF, A.O.; COTE, G.J.; GAGEL, R.F. Multiple endocrine neoplasias. **Annual Review of Physiology**, v. 62, p. 377 – 411, 2000.

HOFLAND, L.J.; LIU, Q.; VAN KOETSVELD, P.M.; ZUIJDERWIJK, J.; VAN DER HAM, F. DE KRIJGER, R.R.; SCHONBRUNN, A.; LAMBERTS, S.W. Immunohistochemical detection of somatostatin receptor subtypes sst1 and sst2a in human somatostatin receptor positive tumors. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 84, p. 775 – 780, 1996.

HOFLAND, L.J.; VISSER-WISSELAAR, H.A.; LAMBERTS, S.W. Somatostatin analogs: clinical application in relation to human somatostatin receptors subtypes. ***Biochemical Pharmacology***, v. 50, p. 287 – 297, 1995.

HOKAMA, A.; OSHIRO, J.; KINJO, F.; SAITO, A. Utility of endoscopic ultrasonography in rectal carcinoid tumors. ***American Journal of Gastroenterology***, v. 91, p. 1289 – 1290, 1996.

HOYER, D.; LUBBERT, H.; BRUNS, C. Molecular pharmacology of somatostatin receptors. ***Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology***, v. 350, p. 441 – 453, 1994.

IAEA - International Atomic Energy Agency. ***Comparative evaluation of therapeutic radiopharmaceuticals***. Viena: IAEA, 2007. (Technical Reports Series, 459).

KALTSAS, G.A.; PAPADOGIAS, D.; MAKRAS, P.; GROSSMAN, A.B. Treatment of advanced neuroendocrine tumours with radiolabelled somatostatin analogues. ***Endocrine-Related Cancer***, v. 12, p. 683 – 699, 2005.

KASSIS, A.I.; ADELSTEIN, S.J. Considerations in the selection of radionuclides for cancer therapy. In: WELCH, Michael J. ; REDVANLY, Carol S. . ***Handbook of Radiopharmaceuticals: radiochemistry and applications***. [s.n.]: John Wiley & Sons, 2003

KIMURA, N.; PILICHOWSKA, M.; DATE, F.; KIMURA, I.; SCHINDLER, M. Immunohistochemical expression of somatostatin type 2a receptor in neuroendocrine tumors. ***Clinical Cancer Research***, v. 5, p. 3483 – 3478, 1999.

KLOPPEL, G.; HEITZ, P.U.; CAPELLA, C.; SOLCIA, E. Pathology and nomenclature of human gastrointestinal neuroendocrine (carcinoid) tumors and related lesion. ***World Journal of Surgery***, v. 20, p. 132 – 141, 1996.

KOMMINOTH, P.; HEITZ, P.U.; KLOPPEL, G. Pathology of MEN1: morphology, clinicopathologic correlations and tumors development. ***Journal of Internal Medicine***, v. 243, p. 455 – 464, 1998.

KOTZE, L.M.S. ***Tumores do intestino delgado***: gastroenterologia essencial. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

KRENNING, E.P.; KWEKKEBOOM, D.J.; PAUWELS, S.; KVOLS, L.K.; REUBI, J.C. Somatostatin receptor scintigraphy. New York: Raven Press, 1995.

KRENNING, E.P.; VALKEMA, R.; KWEKKEBOOM, D.J.; DE HERDER, W.W.; VAN EIJCK, C.H.; DE JONG, M.; PAUWELS, S.; REUBI, J.C. Molecular imaging as in vivo molecular pathology for gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: implications for follow-up after therapy. ***Journal of Nuclear Medicine***, v. 46 (suppl. 1), p. 76S – 82S, 2005.

KWEKKEBOOM, D.J.; BAKKER, W.H.; KOOIJ, P.P.M.; KOINJNENBERG, M.W.; SRINIVASAN, A.; ERION, J.L.; SCHIMIDT, M.A.; BUGAJ, J.L.; DE JONG, M.; KRENNING, E.P. [¹⁷⁷Lu-DOTA,Tyr³]octreotate: comparison with [¹¹¹In-DTPA⁰]octreotide in patients. *European Journal of Nuclear Medicine*, v. 28, n.9, p. 1319 – 1325, 2001.

KWEKKEBOOM, D.J.; BAKKER, W.H.; KAM, B.L.; TEUNISSEN, J.J.M.; KOOJI, P.P.M.; HERDER, W.W.; FEELDERS, R.A.; EIJCK C.H.J.; DE JONG, M.; SRINIVASAN, A.; ERION, J.L.; KRENNING, E.P. Treatment of patients with gastro-entero-pancreatic (GEP) tumours with the novel radiolabelled somatostatin analogue [¹⁷⁷Lu-DOTA,Tyr³]octreotate. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, v. 30, n.3, p. 417 – 422, 2003.

KWEKKEBOOM, D.J.; TEUNISSEN, J.J.M.; BAKKER, W.H.; KOOJI, P.P.; HERDER, W.W.; FEELDERS, R.A.; EIJCK C.H.J.; ESSER, J.P.; KAM, L.B.; KRENNING, E.P. Radiolabeled somatostatin analog [¹⁷⁷Lu-DOTA,Tyr³]octreotate in patients with endocrine gastroenteropancreatic tumors. *Journal of Clinical Oncology*, v. 23, p. 2754 – 2762, 2005.

LAMBERTS, S.W.; KRENNING, E.P.; REUBI, J.C. The role of somatostatin and its analogs in the diagnosis and treatment of tumors. *Endocrine Reviews*, v. 12, p. 450 – 482, 1991.

LAMBERTS, W.J.S.; VAN DER LELY, A.; DE HERDER, W.W.; HOFLAND, L.J. Octreotide. *The New England Journal of Medicine*, v. 334, p. 246 – 254, 1996.

LEWINGTON, V.J. Target radionuclide therapy for neuroendocrine tumours. *Endocrine-Related Cancer*, v. 10, p. 497 – 501, 2003.

MODLIN, I.M.; LYE, K.D.; DIDD, M. A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. *Cancer*, v. 97, p. 934 – 961, 2003.

MODLIN, I.M.; SANDOR, A. An analysis of 8305 cases of carcinoid tumors. *Cancer*, v. 78, p. 813 – 829, 1997.

MÜLLER, H.L.; FRÜHWALD, M.C.; SCHEUBECK, M.; RENDEL, J.; WARMUTH-METH, M.; SÖRENSEN, N.; KÜHL, J. REUBI, J.C. A possible role for somatostatin receptor scintigraphy in diagnosis and follow-up of children with medulloblastoma. *Journal of Neurooncology*, v. 38, p. 27 – 40, 1998.

OKARVI, S.M. Recent developments in ^{99m}Tc-labelled peptide-based radiopharmaceuticals: an overview. *Nuclear Medicine Communications*, v. 20 n.12, p. 1093-1112, 1999.

ONUKI, N.; WISTUBA, I.I.; TRAVIS, W.D.; VIRMANI, K.A.; YASHIMA, K.; BRAMBILLA, E.; HASLETON, P.; GAZDAR, A.F. Genetic changes in the spectrum of neuroendocrine lung tumors. *Cancer*, v. 85, p. 600 – 607, 1999.

OTTE, A.; MUELER-BRAND, J.; DELLAS, S.; NITZSCHE, E.U.; HERRMANN, R.; MAECKER, H.R. Yttrium-90-labelled somatostatin-analogue for cancer treatment. *Lancet*, v. 351, p. 417 – 418, 1998.

PATEL, Y.C. Molecular pharmacology of somatostatin receptor subtypes. *Journal of Endocrinological Investigation*, v. 20, p. 348 – 367, 1997.

PATEL, Y.C. Somatostatin and its receptor family. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 20 (3), p. 157 – 198, 1999.

PETZMANN, S.; ULLMAN, R.; KLEMEN, H.; RENNER, H.; POPPER, H.H. Loss of heterozygosity on chromosome arm 11q in lung carcinoids. *Human Pathology*, v. 32, p. 333 – 338, 2001.

PLESS, J.; BAUER, W.; BRINER, U.; DOEPFNER, W.; MARBACH, P.; MAURER, R.; PETCHER, T.J.; REUBI, J.C.; VONDERSCHER, J. Chemistry and pharmacology of SMS 201-995, a long-acting octapeptide analogue of somatostatin. *Scandinavian Journal of Gastroenterology. Supplement*, v. 119, p. 54 – 64, 1986.

REICHILIN, S. Somatostatin. *New England Journal of Medicine*, v. 309, p. 1495 – 1501, 1983 a.

REICHILIN, S. Somatostatin (second of two parts). *New England Journal of Medicine*, v. 309, p. 1556 – 1563, 1983 b.

REISINE, T.; BELL, G.I. Molecular biology of somatostatin receptors. *Endocrine Reviews*, v. 16, p. 427 – 442, 1995.

REUBI J.C.; KAPPELER, A.; WASER, B.; LAISSUE, J.; HIPKIN, R.W.; SCHONBRUNN, A. Immunohistochemical localization of somatostatin receptors sst2a in human tumors. *American Journal of Pathology*, v. 153, p. 233 – 245, 1998.

REUBI, J.C.; SCHAR, J.C.; WASER, B.; WENGER, S.; HEPPELER, A.; SCHIMITT, J.S.; MACKE, H.R. Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes SST1-SST5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use. *European Journal of Nuclear Medicine*, v. 27, n. 3, p. 273 – 282, 2000.

REUBI, J.C. Peptide receptors as molecular target for cancer diagnosis and therapy. *Endocrine Reviews*, v. 24 (4), p. 389 – 427, aug, 2003.

REUBI, J.C.; MACKE, H.R.; KRENNING, E.P. Candidates for peptide receptor radiotherapy today and in future. *The Journal of Nuclear Medicine*, v. 46, n. 1 (Suppl).p. 67S – 75S, January 2005.

ROGGO, A.; WOOD, W.C.; OTTINGER, L.W. Carcinoid tumor of the appendix. ***Annals of Surgery***, v .217, p. 385 – 390, 1993.

RONALD, A.; DELELLIS, M.D. The neuroendocrine System and its Tumors. ***American Journal of Clinical Pathology***, v. 115 (Suppl1), p. S5 – S16, 2001.

SCHALLY, A.V. Oncological applications of somatostatin analogues. ***Cancer Research***, v. 48, p. 6977 – 6985, 1988.

SCHIMIDT, M.; SCHEIDHAUER, K.; LUYKEN, C.; VOTH, E.; HILDEBRANDT, G. KLUG, N.; SCHICHA, H. Somatostatin receptor imaging in intracranial tumours. ***European Journal of Nuclear Medicine***, v. 25, p. 675 – 686, 1998.

SCHMITT, A.; BERNHARDT, P.; NILSSON, O.; AHLMAN, H.; KOLBY, H.R.; MAECKE, H.R.; FORSELL-ARONSSON. Radiation therapy of small cell lung cancer with ^{177}Lu -DOTA-Tyr³-octreotate in an animal model. ***Journal of Nuclear Medicine***, v. 45, n. 9, p. 1542 – 1548, 2004.

SCHULZ, S.; SCHMITT, J.; WIBORNY, D.; SCHMIDT, H.; OLBRICHT, S. WEISE, W.; ROESSNER, A.; GRAMSCH, C.; HOLLT, V. Immunocytochemical detection of somatostatin receptors sst1, sst2a, sst2b and sst3 in paraffin-embedded breast cancer tissue using subtype-specific antibodies. ***Clinical Cancer Research***, v. 4, p. 2047 – 2052, 1998.

SOLCIA, E.; KLOEPPEL, G; SOBIN, L.H. (ed) World Health Organization: International Histological Classification of Tumours: ***Histological typing of endocrine tumours***. Berlin: Springer, 2000.

SRIVASTAVA, S.; DADACHOVA, E. Recent advances in radionuclide therapy. ***Seminars in Nuclear Medicine***, vol XXXI, no 4,(October), 330 – 341, 2001.

TEUNISSEN, J.J.M.; KWEKKEBOOM, D.J.; KRENNING, E.P. Quality of life in patients with gastroenteropancreatic tumors treated with [^{177}Lu -DOTA⁰,Tyr³]octreotate. ***Journal of Clinical Oncology***, v. 13, p. 2724 – 2729, 2004.

VALLABHAJOSULA, S.; KUJI, I.I.; HAMACHER, K.A.; KONISHI, S.; KOSTAKOGLU, L.; KOTHARI, P.A.; MILOWISKI, M.I.; NANUS, D.M.; BANDER, N.H.; GOLDSMITH, S.J. Pharmacokinetics and biodistribution of ^{111}In and ^{177}Lu -labeled J591 anti-body specific for prostate-specific membrane antigen: prediction of 90Y-J591 radiation dosimetry based on ^{111}In or ^{177}Lu ? ***The Journal of Nuclear Medicine***, v. 46, p. 634 – 641, 2005.

WELCH, M. J. ; REDVANLY; C. S. . ***Handbook of Radiopharmaceuticals: radiochemistry and applications***. [S.n.]: John Wiley & Sons, 2003.

WICK, M.R.; ROSAI, J. Neuroendocrine neoplasms of the thymus. ***Pathology Research and Practice***, v. 183, p. 188 – 189, 1988.

WICK, M.R.; RITTER, J.H. Thymic neuroendocrine tumors: a commentary with current perspective on neuroendocrine neoplasia. ***Annals of Thoracic Surgery***, v. 67, p. 7 – 9, 1999.

WILLIAMS, E.D.; SANDLER, M. The classification of carcinoid tumours. ***Lancet***, v. 1, p. 238 – 239, 1963.

WILLIAMS, E. D. ***Histological typing of tumors of the endocrine system***. Berlin, Germany: Springer – Verlag, 1980.

ZWEIT, J. Radionuclides and carrier molecules for therapy. ***Physics in Medicine and Biology***, v. 41, p. 1905 – 1914, 1996.

OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo propor uma racionalização da síntese, da análise e da purificação do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO para uso diagnóstico e terapêutico em tumores neuroendócrinos, bem como avaliar a biodistribuição deste radiofármaco em modelo animal.

MATERIAIS

- ✓ Glove-box: destinada às reações de síntese com material radioativo, IPEN/CNEN, Brasil.
- ✓ Contador automático tipo poço com cristal de NaI(Tl), modelo D5002, cobra II, auto-gama, Packard, Camberra, EUA;
- ✓ Calibrador de doses, modelo CRMTM-35R com câmara de ionização CRC[®]-35R1, Capintec, EUA;
- ✓ Balança Analítica – Ohaus e Explorer, EUA;
- ✓ pHmetro digital Tecnopeon MPA 210P;
- ✓ Agitador / aquecedor de microtubos tipo eppendorf –Thermomixer comfort;
- ✓ Micropipetas de volumes: 0,5 – 10 µL, 10 – 100 µL e 100 – 1000 µL BRAND Transferpette
- ✓ Equipamento para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Waters, EUA.
Com os seguintes módulos:
 - Integrador, modelo 746;
 - Detector UV, modelo 486;
 - Detector de radiação beta (β) e gama (γ), modelo radiomatic, Packard, Camberra Company, EUA;
 - Injetor manual, modelo 600;
 - Bombas de solventes modelo 600;
 - Degaseificador;
- ✓ Colunas de separação de fase reversa para CLAE, Symetry[®]C₁₈ (RP-C₁₈), 4,6 x 250 mm, 5µm, Waters EUA;
- ✓ Tiras de fibra de vidro impregnadas com sílica gel (Instant thin layer chromatography - ITLC-SG), PALL – Life Sciences
- ✓ Mini colunas compactadas para purificação – Sep-Pak[®] – Waters, EUA;
- ✓ Solventes diversos – grau analítico e grau HPLC, Sigma Aldrich;
- ✓ Reagentes diversos – grau p.a. Sigma Aldrich ou similar;
- ✓ Vidrarias em geral;

- ✓ Amostras de $^{177}\text{LuCl}_3$ (cloreto de lutécio) do Nuclear Analytical and Medical Services – NRG/Holanda e do Oak Ridge National Laboratory – ORNL/EUA;
- ✓ Peptídeo análogo da somatostatina, octreotato, acoplado ao agente quelante DOTA, DOTA-octreotato (DOTATATO) – ANASPEC, EUA.

Animais utilizados:

- ✓ Camundongos *Swiss*, adultos e camundongos *Nude*, adultos – fornecidos pelo biotério do Instituto de Biotecnologia – IB - IPEN-CNEN/SP;

Células utilizadas:

- ✓ Linhagem de células – AR42J câncer pancreático de rato (American Type Culture Collection – ATCC, EUA);

Programa computacional:

- ✓ PK Solutions 2.0 Noncompartmental Pharmacokinetics Data Analysis, (Ashland, Ohio, EUA)

CAPÍTULO I

SÍNTESE DO COMPLEXO $^{177}\text{Lu}^{3+}$ – DOTATATO

1.0 Introdução

Habitualmente inserimos no dia a dia de trabalho palavras ou até mesmo expressões para dar significado a determinados contextos técnicos. Por exemplo, atribuímos adjetivos como “quente” ou “frio” para designar materiais ou ambientes radioativos ou não-radioativos, respectivamente. O uso daqueles termos, não específicos, termina por generalizar informações fundamentais, que são desconsideradas ou, muitas vezes, mal analisadas.

Quando inserimos um isótopo radioativo em determinada molécula, atribuímos a este procedimento a denominação de “marcação”. Porém esta denominação carrega uma aplicação específica, de modo que, nem todo procedimento de inserção de um isótopo em determinada molécula deva ou possa ser chamado de “marcação”.

O uso adequado do que se entende por “marcação” refere-se à substituição de um dos átomos de uma molécula pelo correspondente isótopo radioativo ou não-radioativo. Desta forma, para saber, por exemplo, quais alterações metabólicas ocorrem em moléculas de glicose, podemos inserir ^{14}C no lugar de ^{12}C “marcando” tais moléculas. Também, nos estudos da fotossíntese, podemos fornecer água “marcada” com ^{18}O (por substituição do ^{16}O) e avaliar a formação de glicose e oxigênio segundo a reação: $6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2^{18}\text{O} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6^{18}\text{O}_2$, observando que o oxigênio produzido é proveniente das moléculas de água e não das de dióxido de carbono (Atkins & Jones, 2006).

Neste trabalho, inserimos o radioisótopo $^{177}\text{Lu}^{3+}$ no quelante DOTA, acoplado ao octapeptídeo análogo da somatostatina, o octreotato. Dado que o isótopo (radioisótopo) lutécio não fazia parte da molécula em que foi inserido, não se trata de um procedimento de “marcação”. A este processo, em razão de determinadas características que discutiremos a seguir, denominaremos: síntese do complexo, reação de complexação ou complexação e ao produto desta síntese chamaremos – complexo. Com isso queremos mostrar ao longo deste item que a denominação de “marcação” aplicada ao contexto em que estamos trabalhando, acaba por ocultar determinadas características químicas que são relevantes para análise crítica da síntese que realizamos.

Por definição química entende-se “complexo” como uma espécie formada por vários ligantes (bases de Lewis) que têm existência independente, em interação com um único átomo ou íon metálico (ácido de Lewis) (Atkins. & Jones, 2006).

Antes de Lewis, Bronsted e Lowry classificavam um ácido como uma espécie que é capaz de doar prótons e uma base como uma espécie que aceita prótons, focalizando a transferência de um próton entre duas espécies. Segundo Lewis, um ácido é umceptor de um par de elétrons, enquanto, uma base, é doadora. Assim, quando uma base de Lewis partilha um par de elétrons com um ácido de Lewis, forma-se uma ligação covalente coordenada, isto é, uma ligação em que os elétrons provêm de um dos átomos, originalmente da base de Lewis. Neste sentido, “complexo” vem a ser a espécie formada a partir de ligações covalentes coordenadas.

A figura 1 representa a estrutura da molécula DOTA, que também pode ser chamada de ligante ou base de Lewis. O $^{177}\text{Lu}^{3+}$ que reage com esta molécula é o ácido de Lewis. A figura 2 ilustra a estrutura octacoordenada do complexo DOTA-metal.

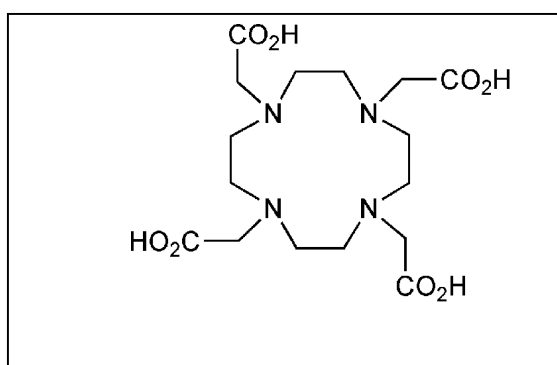
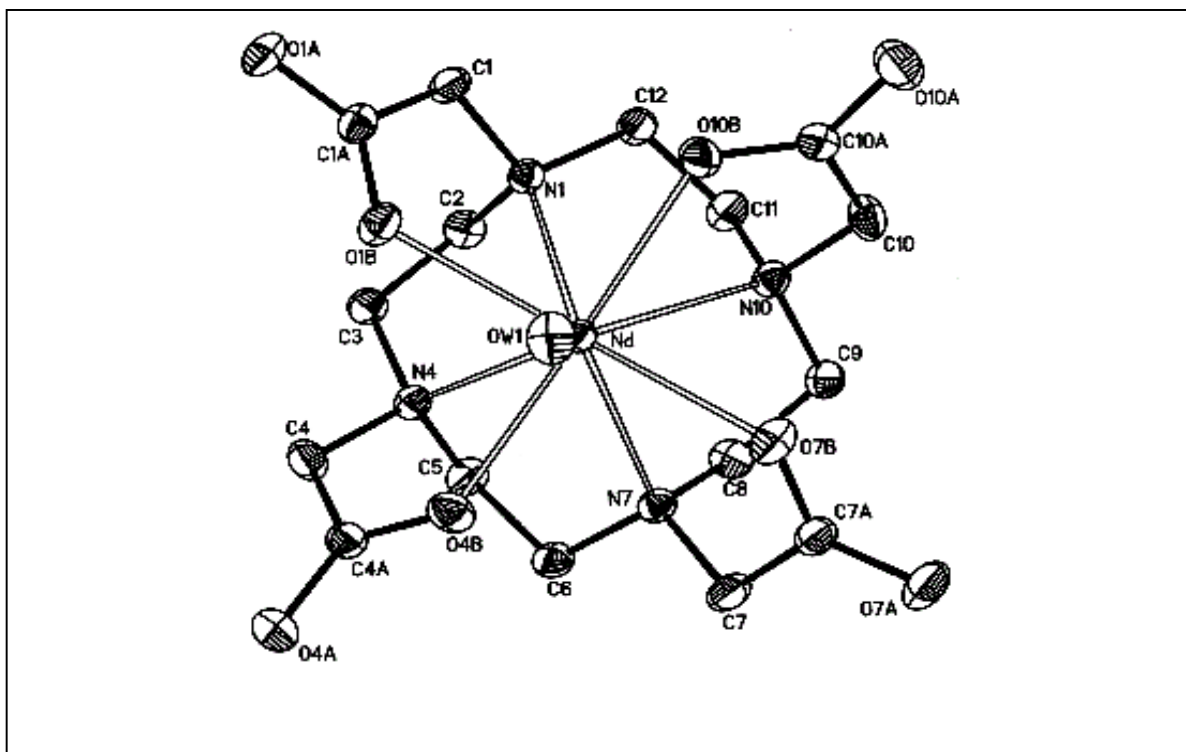


Figura 1 – Fórmula estrutural do DOTA.



Fonte: Inorganic Chemistry. 2003, 42, 150.

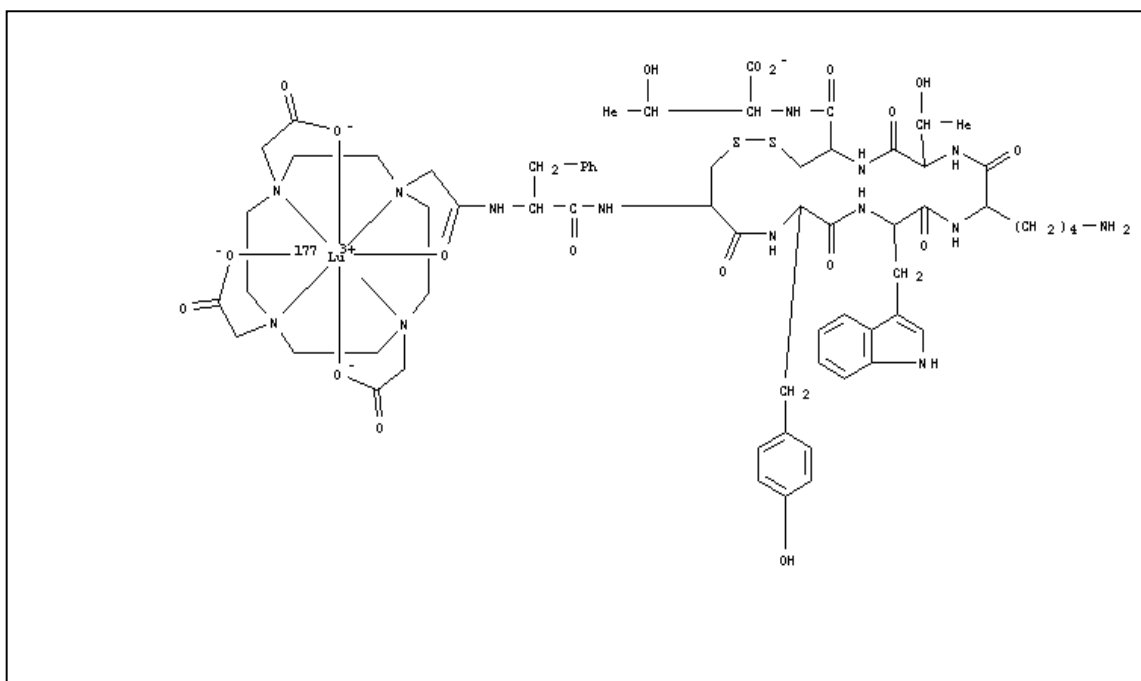
Figura 2 – Estrutura octacoordenada do complexo DOTA-metal.

O DOTA (Fig. 1), é um ligante octacoordenado (observar as 8 ligações covalentes coordenadas na Fig. 2), formado pelo anel 1,4,7,10 tetraazaciclododecano (Benetollo *et al.*, 2003), no qual cada átomo de nitrogênio tem ligado a ele um grupo carboxietil, daí seu nome químico: ácido 1,4,7,10 tetraazaciclododecano N, N', N'', N''' tetra-acético.

Na figura 2, temos a representação, obtida através da difração de raio-X, da estrutura octacoordenada de um complexo DOTA-metal. Podemos observar que no centro da molécula encontra-se o metal, em nosso caso o $^{177}\text{Lu}^{3+}$. As linhas negras indicam as ligações entre os átomos que formam o anel e as linhas brancas mostram as interações ácido-base de Lewis, com o metal ao centro do anel. Estas interações do ácido de Lewis com a base de Lewis, irão ocorrer em função da disponibilidade de elétrons das bases de Lewis, quais sejam: os quatro átomos de nitrogênio presentes no anel (representados na Fig. 2 por N1, N4, N7 e N10) e os quatro átomos de

oxigênio (representados na Fig. 2 por O1B, O4B, O7B e O10B). Os oxigênios desprotonados da carboxila são bases de Lewis duras, o que explica a formação da ligação coordenada com estes átomos.

Em nosso caso, o DOTA estará acoplado a um peptídeo (Fig. 3), de modo que a carbonila (C10 e O10A), estará realizando uma ligação amídica com o grupo amina ($-NH_2$) da fenil alanina terminal do peptídeo. Deste modo, como pode ser visualizado na figura 3, dado que o “O10B” é o grupo que atua na formação da ligação peptídica, se estabelecerá uma ligação coordenada com o “O10A”, mantendo assim o caráter octacoordenado do DOTA.



Fonte: Chemical Abstract.

Figura 3 – Fórmula estrutural do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO.

É importante salientar também que a disponibilidade eletrônica das bases de Lewis pode variar de acordo com o pH do meio de reação. Espera-se que, em pH baixo, a disponibilidade eletrônica seja menor devido à protonação dos átomos, tanto de nitrogênio como dos oxigênios das carboxilas (O1B, O4B, O7B e O10B). Em pH alto, portanto, há aumento da disponibilidade de elétrons.

No entanto, o aumento do pH favorece a reação de precipitação de hidróxido de lutécio, que compete com a reação de complexação. Portanto é preciso estudar os parâmetros que orientam estes dois processos, o que significa que será necessário comparar a constante de formação do complexo $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO com o produto de solubilidade do $^{177}\text{Lu}(\text{OH})_3$, verificando um pH ótimo para complexação sem risco de precipitação.

Devido às características específicas entre o ligante e o átomo central no complexo descrito, fica evidente a necessidade de estabelecer parâmetros para racionalizar a síntese do radiofármaco. Neste caso iremos estabelecer dois parâmetros: 1.1) parâmetros cinéticos relacionados ao tempo e à temperatura da reação; 1.2) parâmetros de pH.

Os estudos conduzidos para estabelecer os parâmetros de pH, necessitaram do desenvolvimento de mais um tópico para elucidar as condições de síntese do radiofármaco. Por isso teremos uma terceira seção que trata da influência da razão molar $^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO na compreensão da síntese do radiofármaco.

1.1 Influência dos parâmetros cinéticos (tempo e temperatura) na síntese do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO

1.1.1 Métodos

Para o procedimento de síntese do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO foi utilizado como meio de reação tampão acetato de sódio 0,4M pH 4,5, adaptado de Breeman, *et al.*, 2003.

O peptídeo DOTATATO (1mg) foi diluído em 1 mL deste mesmo tampão, fracionado em alíquotas de 10, 20 50 e 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, que foram armazenadas em tubos do tipo eppendorf e mantidas congeladas a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O radioisótopo utilizado era de procedência do NRG-Holanda, obtido na forma de $^{177}\text{LuCl}_3$ em solução de HCl 0,05 M.

A execução do procedimento de síntese do radiofármaco foi realizada em *glove box* apropriada à manipulação de elementos radioativos.

Em eppendorf com capacidade de 1,5 mL foi adicionado 200 μL de tampão, a massa de peptídeo e a atividade desejadas, por exemplo: 10 μg de DOTATATO e 74 MBq (2 mCi) de $^{177}\text{Lu}^{3+}$. Em seguida foram aquecidos à temperatura constante e mantidos sob agitação de 350 rpm.

Para a avaliação dos parâmetros cinéticos tempo e temperatura, os experimentos foram conduzidos variando o tempo de incubação da reação em: 10, 20 e 30 minutos à temperatura de $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 10, 15, 20, 30 e 40 minutos à temperatura de $95\text{ }^{\circ}\text{C}$.

1.1.2 Resultados & Discussão

Os resultados de Pureza Radioquímica (%) mostrados nas tabelas 1 e 2 indicam que o aumento da temperatura não mostrou alteração na extensão de formação do complexo.

A variação dos tempos de incubação, estudados nestas temperaturas, também não influenciou a pureza radioquímica. As tabelas (1 e 2) mostram que a extensão de formação do complexo $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO à razão molar de 1 : 70, avaliada como pureza radioquímica, não apresenta diferenças significativas.

Tabela 1 – Efeito do tempo de incubação à 80 °C na formação do complexo $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO sintetizado à razão molar de 1 : 70 ($^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO) (n=4).

| <i>Tempo (minutos)</i> | <i>Pureza Radioquímica (%)</i> |
|------------------------|--------------------------------|
| 10 | 96,6 ± 0,9 |
| 20 | 97,7 ± 0,9 |
| 30 | 98,3 ± 0,10 |

Tabela 2 – Efeito do tempo de incubação à 95 °C na formação do complexo $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO sintetizado à razão molar de 1 : 70 ($^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO) (n=4).

| <i>Tempo (minutos)</i> | <i>Pureza Radioquímica (%)</i> |
|------------------------|--------------------------------|
| 10 | 98,0 ± 0,2 |
| 15 | 97,6 ± 0,9 |
| 20 | 97,9 ± 0,2 |
| 30 | 98,1 ± 0,2 |
| 40 | 98,5 ± 0,8 |

De um modo geral, a temperatura aumenta a velocidade das partículas que formam a matéria. Dotadas de energia cinética, tais partículas movimentam-se continuamente e colidem mutuamente, reagindo ou não. A ocorrência de reação fica condicionada a um limiar energético definido pela energia de ativação, que pode ser entendida como a energia necessária para suplantar as energias de ligação nos reagentes, a ponto de causar seu rompimento e formar novas ligações nos produtos.

Isto significa que, quando as partículas reagentes colidem, a energia cinética que possuem no momento do choque pode ser convertida e armazenada na forma de energia potencial. A diferença entre a energia potencial acumulada na colisão e a energia que os reagentes possuíam antes da colisão representa a parcela mínima de energia necessária para a transformação ocorrer. Deste modo, um aumento da temperatura gera aumento de energia cinética, que caso exceda o limiar da energia de ativação, resulta em aumento de velocidade da reação química.

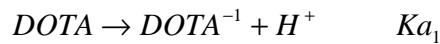
Dentro das condições deste experimento, ambas as temperaturas avaliadas, 80 e 95 °C, forneceram aos reagentes energia cinética suficiente para exceder o limiar energético responsável pela formação do estado de transição, com a consequente transformação dos reagentes em produto.

1.2 Influência do pH do meio de reação na síntese do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO

1.2.1 Fundamentação teórica

Assim como os parâmetros cinéticos tempo e temperatura, o pH tem grande importância na reação de complexação, visto que a ionização do DOTA é dependente do pH.

O DOTA forma um complexo estável com o $^{177}\text{Lu}^{3+}$. Entretanto, determinadas condições de pH se fazem necessárias para que o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ encontre o DOTA com máxima disponibilidade eletrônica (DOTA^{-4}) para que se dê a formação do complexo. O DOTA^{-4} é dado pelas reações de ionização do DOTA, como representado a seguir:



Equação geral de ionização $DOTA \rightarrow DOTA^{-4} + 4H^{+}$

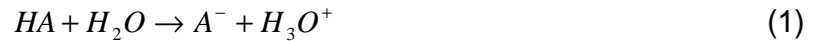
Onde a equação geral de complexação deve ser escrita, preferencialmente da seguinte forma: $^{177}Lu^{3+} + DOTA^{-4} \rightarrow [^{177}LuDOTA]^{-1}$

Para que o complexo seja formado, o DOTA requer a desprotonação de seus 4 hidrogênios ácidos (referentes a cada uma das carboxilas). Para tal, sofre sucessivos estágios de ionização (mostrados acima). Cada estágio vai representar a perda de um H^{+} para formação da base conjugada correspondente, chegando à espécie de interesse (que efetivamente serve à complexação), que vamos caracterizar aqui como $DOTA^{-4}$ sendo esta a espécie que apresenta máxima disponibilidade eletrônica para reação com $^{177}Lu^{3+}$.

O parâmetro que vai caracterizar cada um dos 4 estágios de ionização é denominado constante de acidez (Ka) e é representado, convencionalmente, pelo seu logaritmo negativo ($-\log Ka = pKa$). Portanto, cada estágio de ionização terá seu pKa correspondente que tende a ser maior (ionização menos favorável) com a perda progressiva de prótons ($pKa_1 < pKa_2 < pKa_3 < pKa_4$).

Para que a ionização do DOTA, que libera H^{+} , não diminua o pH do meio de reação, fica evidente a necessidade do uso de um tampão com pH conveniente para a reação de complexação.

A partir de valores de pKa tabelados para o DOTA, é possível relacionarmos pH e concentrações molares do ligante ($DOTA^{-4}$). Podemos então calcular o pH ideal do meio de reação, para que haja máxima concentração molar de $DOTA^{-4}$, a partir da equação genérica da ionização de um ácido, como mostraremos a seguir:



onde: HA é o ácido;

A^- é a base conjugada;

H_3O^+ íon hidrônio (a representação, em solução aquosa, do íon H^+).

Correlacionando o equilíbrio expresso pela ionização geral de um ácido, obteremos a equação que mostra a constante de equilíbrio (Ka) (constante de ionização do ácido) em função das concentrações molares das espécies envolvidas, exceptuando-se a água que se encontra em excesso no meio;

$$Ka = \frac{[A^-] \cdot [H^+]}{[HA]} \quad (2)$$

Aplicando o logaritmo negativo aos dois membros da equação e rearranjando os termos, chegaremos à:

$$-\log[H^+] = -\log[Ka] + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (3)$$

O logaritmo negativo da concentração de H^+ ($-\log[H^+]$) é definido como pH. Analogamente, $-\log[Ka]$ é definido como pKa . Esta conversão é feita para evitar escrever potências negativas de 10 (por exemplo, para o ácido acético em água a 24 °C, o Ka é igual a $1,79 \times 10^{-5}$; e seu pKa correspondente é 4,76).

Assim teremos:

$$pH = pKa + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (4)$$

Conhecida como equação de Henderson-Hasselbach, a equação 4 nos permite relacionar pH, constante de ionização do ácido e as concentrações molares de base conjugada e ácido.

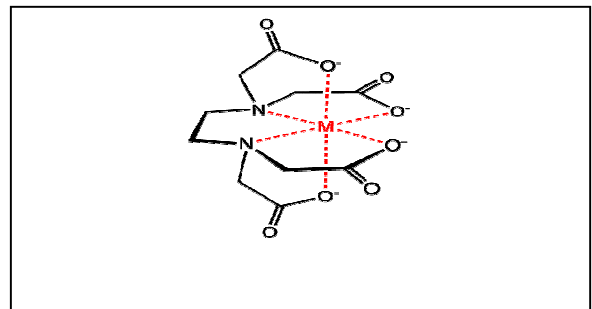
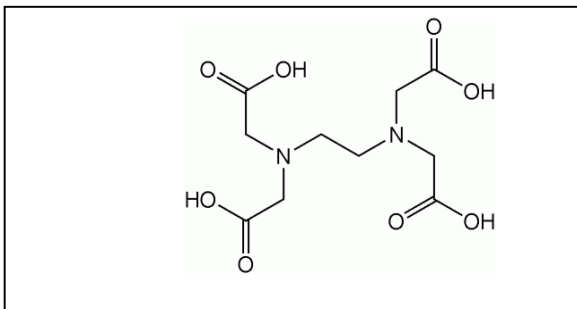
Sendo o DOTA um ácido que irá sofrer 4 ionizações sucessivas, formando 4 espécies diferentes, pela análise da equação 4, as quantidades de cada uma destas espécies poderá ser determinada para um dado pH.

Entretanto, na prática, não nos interessa conhecer a proporção de cada uma das 4 espécies ionizadas que estarão presentes em solução num dado pH, mas, diretamente a proporção da espécie de interesse ($DOTA^{-4}$), em relação às demais

espécies presentes ($DOTA$, $DOTA^{-1}$, $DOTA^{-2}$, $DOTA^{-3}$, $DOTA^{-4}$). O parâmetro que expressa esta relação é denominado α_4 . Trata-se de um número adimensional que correlaciona diretamente a proporção da espécie de interesse (α_4 se relaciona com a proporção de $DOTA^{-4}$ presente na solução, podendo variar de 0 a 1, ou seja, de 0% a 100%). Por exemplo só em pH 12 é que teremos 98% de $DOTA^{-4}$ (Tab. 3), em relação ao total de espécies presentes. Em pH 4,0, este valor cai drasticamente para 0,00000036%.

Em busca dos valores dos 4 pK_a do DOTA, só encontramos referência no “Chemical Abstracts” dos valores de pK_{a1} (2,16) e pK_{a4} (10,32). Entretanto, um agente quelante de amplo uso, o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), apresenta valores de pK_a bem conhecidos. Tal como o DOTA, o EDTA apresenta 4 estágios de ionizações sucessivas, sendo respectivamente: $pK_{a1} = 2$; $pK_{a2} = 2,67$; $pK_{a3} = 6,16$ e $pK_{a4} = 10,26$.

A figura 4 mostra a estrutura do EDTA e a figura 5, de um complexo metal-EDTA. A comparação destas, com as respectivas estruturas do DOTA (Fig. 1) e DOTA-metal (Fig. 2) auxiliará a compreensão das extrapolações que evidenciaremos a seguir.



Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/EDTA>

Figura 4 – Fórmula estrutural do EDTA.

Figura 5 – Estrutura hexacoordenada do complexo metal-EDTA.

Dado que o parâmetro que permite racionalizar a proporção da espécie de interesse ($DOTA^{-4}$), num dado pH, segundo a equação 4, depende exclusivamente dos valores de pK_a e, sobretudo, dado a proximidade dos valores de pK_a entre o

DOTA e o EDTA, respectivamente, $pK_{a1} = 2,16$ versus $pK_{a1} = 2$ e $pK_{a4} = 10,32$ versus $pK_{a4} = 10,26$, utilizaremos o cálculo do α_4 do EDTA, em função do pH como valores válidos também para o DOTA.

A tabela 3 mostra a proporção da espécie de interesse para complexação ($EDTA^{-4}/EDTA_{total}$) em função do pH da solução. Como dissemos acima, vamos utilizar estes valores para caracterizar também a proporção da espécie de interesse $DOTA^{-4}/DOTA_{total}$, em função do pH do meio.

Tabela 3 – Valores de α_4 para o EDTA em função do pH (que serão também considerados para o DOTA).

| pH | α_4 |
|------|-----------------------|
| 2 | $3,7 \times 10^{-14}$ |
| 3 | $2,5 \times 10^{-11}$ |
| 4 | $3,6 \times 10^{-9}$ |
| 5 | $3,5 \times 10^{-7}$ |
| 6 | $2,2 \times 10^{-5}$ |
| 7 | $4,8 \times 10^{-4}$ |
| 8 | $5,4 \times 10^{-3}$ |
| 9 | $5,2 \times 10^{-2}$ |
| 10 | $3,5 \times 10^{-1}$ |
| 11 | $8,5 \times 10^{-1}$ |
| 12 | $9,8 \times 10^{-1}$ |

Fonte: Principles and practice of Analytical Chemistry (p.200) F.W. Fifield and D. Kealey. Fourth edition 1995.

Pela análise da tabela 3 podemos verificar que a proporção da espécie de interesse ($EDTA^{-4}$, que extrapolaremos para $DOTA^{-4}$) aumenta logaritmicamente com elevação do pH. Dado que se trata de uma função logarítmica, podemos verificar que um pequeno incremento do pH, quando o $pH < 7$, causa um grande aumento na proporção da espécie de interesse para a complexação. Analogamente

podemos inferir que quanto mais alto o pH, maior a disponibilidade de $DOTA^{-4}$ para complexação.

Dado que a proporção da espécie de interesse aumenta logaritmicamente com o pH, podemos relacionar a constante de formação do complexo (K_f) com o pH, obtendo-se sua constante corrigida (K_f^H), que equaciona, de modo preciso, a extensão da formação do complexo num dado pH. Por definição: $K_f^H = K_f \cdot \alpha_4$, (Ohlweiler, 1974).

Da literatura, sabemos que o logaritmo negativo da constante de formação do complexo $[^{177}LuDOTA]^{-1}$, dado pela equação química abaixo, é de $pK_f = -\log K_f = 25,4$ (Pawlak *et al*, 2005) $^{177}Lu^{3+} + DOTA^{-4} \rightarrow [^{177}LuDOTA]^{-1}$
 $pK_f = 25,4$.

Apresentaremos na tabela 4, os valores da constante de formação corrigida do $[^{177}LuDOTA]^{-1}$, resultante do produto entre K_f e α_4 .

Tabela 4 – Constante de formação corrigida (K_f^H) em função do pH.

| pH | Constante de formação | | Constante de formação do $[^{177}LuDOTA]^{-1}$ corrigida (K_f^H) |
|----|------------------------------------|-----------------------|--|
| | do $[^{177}LuDOTA]^{-1}$ (K_f) | α_4 | |
| 2 | 1×10^{25} | $3,7 \times 10^{-14}$ | $3,7 \times 10^{+11}$ |
| 3 | 1×10^{25} | $2,5 \times 10^{-11}$ | $2,5 \times 10^{+14}$ |
| 4 | 1×10^{25} | $3,6 \times 10^{-9}$ | $3,6 \times 10^{+16}$ |
| 5 | 1×10^{25} | $3,5 \times 10^{-7}$ | $3,5 \times 10^{+18}$ |
| 6 | 1×10^{25} | $2,2 \times 10^{-5}$ | $2,2 \times 10^{+20}$ |
| 7 | 1×10^{25} | $4,8 \times 10^{-4}$ | $4,8 \times 10^{+21}$ |
| 8 | 1×10^{25} | $5,4 \times 10^{-3}$ | $5,4 \times 10^{+22}$ |
| 9 | 1×10^{25} | $5,2 \times 10^{-2}$ | $5,2 \times 10^{+23}$ |
| 10 | 1×10^{25} | $3,5 \times 10^{-1}$ | $3,5 \times 10^{+24}$ |
| 11 | 1×10^{25} | $8,5 \times 10^{-1}$ | $8,5 \times 10^{+24}$ |
| 12 | 1×10^{25} | $9,8 \times 10^{-1}$ | $9,8 \times 10^{+24}$ |

Observamos pelos valores da tabela anterior que a tendência à formação do complexo aumenta com o incremento do pH. Por exemplo de pH 4 para pH 7, a extensão com que se dá a formação do complexo aumenta de 10^{+16} para 10^{+21} , isto é, um aumento na ordem de 10^{+5} , o que significa que é 100.000 vezes mais favorável a formação do complexo em pH 7, do que em pH 4.

Se de um lado o ligante DOTA, requer a máxima extensão de ionização para se apresentar com disponibilidade eletrônica ($DOTA^{-4}$) para complexação com o metal, sugerindo o uso de um pH alto para uma ação complexante máxima; de outro, o aumento de pH da solução vai acentuar a tendência à formação de hidróxido metálico pouco solúvel, precipitando o $^{177}Lu^{3+}$ na forma de $^{177}Lu(OH)_3$, de acordo com a equação $^{177}Lu^{3+}_{(aq)} + 3OH^{-}_{(aq)} \rightarrow ^{177}Lu(OH)_{3(s)}$

A precipitação do $^{177}Lu^{3+}$ na forma de $^{177}Lu(OH)_3$ ocorre em determinadas condições de pH, desta forma é mister saber qual o pH em que se dá a precipitação quantitativa de $^{177}Lu(OH)_3$. Uma maneira de estimar o pH em que ocorre precipitação do $^{177}Lu(OH)_3$ pode ser equacionada pelo valor do produto de solubilidade (K_{ps}) do hidróxido de lutécio.

O K_{ps} é a constante de equilíbrio da dissolução do hidróxido de lutécio. Assim, representando a solubilização do hidróxido de lutécio como: $Lu(OH)_{3(s)} \rightarrow Lu^{3+}_{(aq)} + 3OH^{-}_{(aq)}$ a expressão do K_{ps} será dada por: $K_{ps} = [Lu^{3+}] \cdot [OH^{-}]^3$, em que os dados entre colchetes representam concentrações molares.

Sendo o $K_{ps_{Lu(OH)_3}} = 10^{-23 \pm 0,14}$ (Lopez-Gonzalez *et al.*, 2007) e tendo valores de $[^{177}Lu^{3+}]$ que utilizamos na prática, podemos chegar a um valor de pH crítico em que há formação de $^{177}Lu(OH)_3$.

A fim de determinarmos este pH crítico, vamos utilizar as condições usuais de síntese do complexo $^{177}Lu^{3+}$ -DOTATATO, em que partimos de uma atividade de 370 MBq (10 mCi), o que corresponde a $516,6 \times 10^{-12}$ mols de $^{177}Lu^{3+}$. Considerando que o volume final que utilizamos como meio de reação é de 200×10^{-6} L, chegaremos a $[^{177}Lu^{3+}] = 2,583 \times 10^{-6}$ mol/L. Substituindo estes valores na equação do K_{ps} , para obtermos o valor do pH crítico, teremos:

$$10^{-23} = 2,583 \times 10^{-6} \times [\text{OH}^-]^3$$

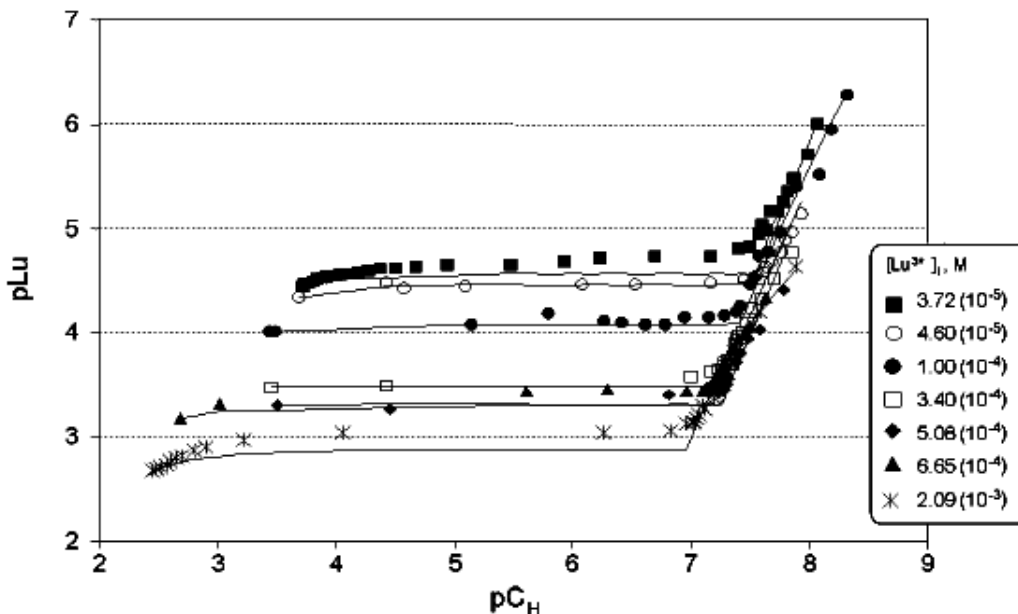
$$[\text{OH}^-] = 3,38 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$$

Se, analogamente ao pH, $p\text{OH} = -\log[\text{OH}^-]$, então, o pOH referente à $[\text{OH}^-]$ calculada acima será igual a 5,47. Pelo equilíbrio de autoionização da água, sabemos que $p\text{H} + p\text{OH} = 14$, então, neste caso, o pH crítico para precipitação de $^{177}\text{Lu}(\text{OH})_3$, neste caso, será 8,5.

Lembrando que na prática o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ está em mistura com o $^{17\text{X}}\text{Lu}^{3+}$ ($^{17\text{X}}\text{Lu}^{3+}$ refere-se a quaisquer outros isótopos de Lu^{3+} presentes em mistura com o $^{177}\text{Lu}^{3+}$), e, considerando que a proporção de $^{17\text{X}}\text{Lu}^{3+}/^{177}\text{Lu}^{3+}$ é de aproximadamente 4 (vide Tab.7), o valor recalculado do pH crítico será de 8,0.

Este pH crítico que encontramos, é coerente com dois dados da literatura que evidenciaremos a seguir.

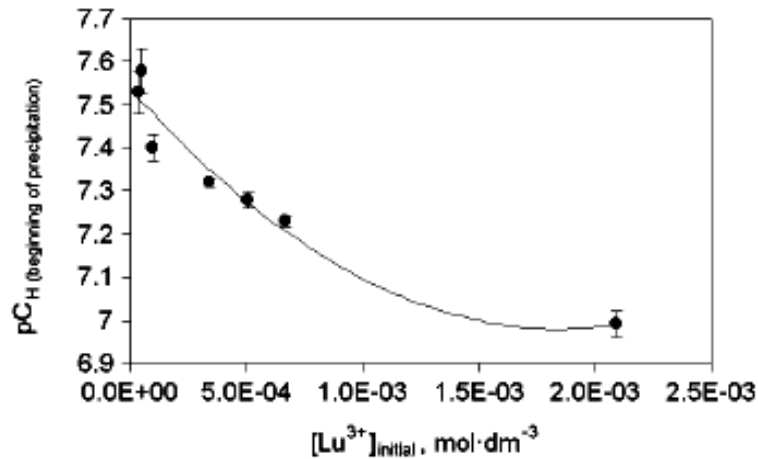
No primeiro caso, o gráfico da figura 6 ilustra como a concentração molar de Lu^{3+} ($[\text{Lu}^{3+}]$) em solução, diminui com o incremento de pH do meio. O gráfico apresenta como parâmetros pLu que corresponde a $-\log[\text{Lu}^{3+}]$ em solução, em função do pH corrigido ($p\text{C}_\text{H}$).



Fonte: J. Radioanal. Nucl. Chem. 274, p.105, 2007.

Figura 6 – Relação entre várias concentrações molares de Lu^{3+} em solução, expressa como pLu, em função do pH corrigido, expresso como $p\text{C}_\text{H}$.

No segundo caso, o gráfico da figura 7 ilustra como há decréscimo de $[\text{Lu}^{3+}]$ inicial de 2×10^{-3} mol/L, com o incremento de pH (pC_H) do meio.



Fonte: J. Radioanal. Nucl. Chem. 274, p.107, 2007.

Figura 7 – Relação entre concentrações de Lu^{3+} em solução, considerando-se uma concentração inicial de 2×10^{-3} mol/L, em função do pH (pC_H) do meio.

A análise do primeiro gráfico evidencia que há uma inflexão, mostrando a precipitação de $^{177}\text{Lu}(\text{OH})_3$, que varia com as $[\text{Lu}^{3+}]$, mas, que em todos os casos, está ao redor de $7 < \text{pH} < 8$. Entretanto, este gráfico não evidencia precisamente em que pH crítico ocorre a precipitação de $^{177}\text{Lu}(\text{OH})_3$, dada $[\text{Lu}^{3+}] = 3,72 \times 10^{-5}$, o valor mais próximo à $[\text{Lu}^{3+}]$ que utilizamos usualmente para a síntese do complexo.

Já no segundo gráfico, o autor mostra em que pH ocorre precipitação de $^{177}\text{Lu}(\text{OH})_3$. Pela análise deste gráfico podemos verificar que a precipitação ocorre próxima a pH 7. Entretanto, a concentração experimentada pelo autor, de 2×10^{-3} mol/L, é, pelo menos, 100 vezes maior em relação à $[\text{Lu}^{3+}]$ total que utilizamos em nosso experimento.

A partir desta fundamentação teórica, torna-se evidente a importância do estudo de relações de pH adequado para a realização da síntese. Dessa forma, podemos admitir, teoricamente, que a reação de complexação poderia ser realizada em $\text{pH} > 4,5$, otimizando a pureza radioquímica e sem risco de precipitação.

1.2.2 Métodos

Para a avaliação do parâmetro pH, foram utilizadas soluções tampão com índices entre de $4,5 \leq \text{pH} \leq 8,0$.

As soluções tampão utilizadas como meio de reação foram as seguintes:

- Para pH 4,5 e 5,5, tampão ácido acético / acetato de sódio 0,4M;
- Para pH 6,5; 7,0; 7,5 e 8, soluções tampão de ácido acético / acetato de amônio 0,5M.

Na síntese do radiofármaco, foram utilizados $^{177}\text{Lu}^{3+}$ de duas procedências distintas: ORNL/EUA na forma de $^{177}\text{LuCl}_3$ em solução de HCl 0,1M e NRG/Holanda na forma de $^{177}\text{LuCl}_3$ em solução de HCl 0,05M. Os experimentos de síntese foram realizados em diferentes razões molares ($^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO).

A execução do procedimento de síntese do radiofármaco foi realizada em *glove box* apropriada à manipulação de elementos radioativos.

Em eppendorf com capacidade de 1,5 mL foi adicionado 200 μL de tampão, a massa de peptídeo e a atividade desejadas, de acordo com a razão molar estabelecida.

Em seguida foram aquecidos à temperatura constante de 95 °C e mantidos sob agitação de 350 rpm por 30 minutos.

Ao final da síntese, o pH do meio de reação foi avaliado através de papel indicador universal, confirmando que não houve alteração de pH durante a reação de complexação em nenhum dos casos.

1.2.3 Resultados & Discussão

Tabela 5 – Valores de pureza radioquímica (%) do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO em função do pH, utilizando $^{177}\text{Lu}^{3+}$ de duas procedências distintas: ORNL/EUA e NRG/Holanda, em diferentes razões molares ($^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO).

| pH | Pureza Radioquímica (%) (*) | | |
|-----|-------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| | Razão Molar 1:7 (ORNL/EUA) | Razão Molar 1:10 (ORNL/EUA) | Razão Molar 1:16 (NRG/Holanda) |
| 4,5 | 1,8 ± 0,5 | 2 ± 1 | 39 ± 6 |
| 5,5 | 57 ± 5 | 97 ± 2 | 66 ± 9 |
| 6,5 | 91,1 ± 0,1 | 97,6 ± 0,5 | 75 ± 2 |
| 7,0 | 88 ± 9 | 95,4 ± 0,5 | 76 ± 3 |
| 7,5 | 93 ± 4 | 96 ± 3 | 74 ± 6 |
| 8,0 | - | 91 ± 3 | 76 ± 6 |

(*) Resultados provenientes de dois procedimentos de síntese distintos. A determinação da pureza radioquímica por cromatografia em camada delgada foi realizada em duplicata em cada procedimento. Sendo assim o espaço amostral para o cálculo da média e do desvio padrão foi n=4.

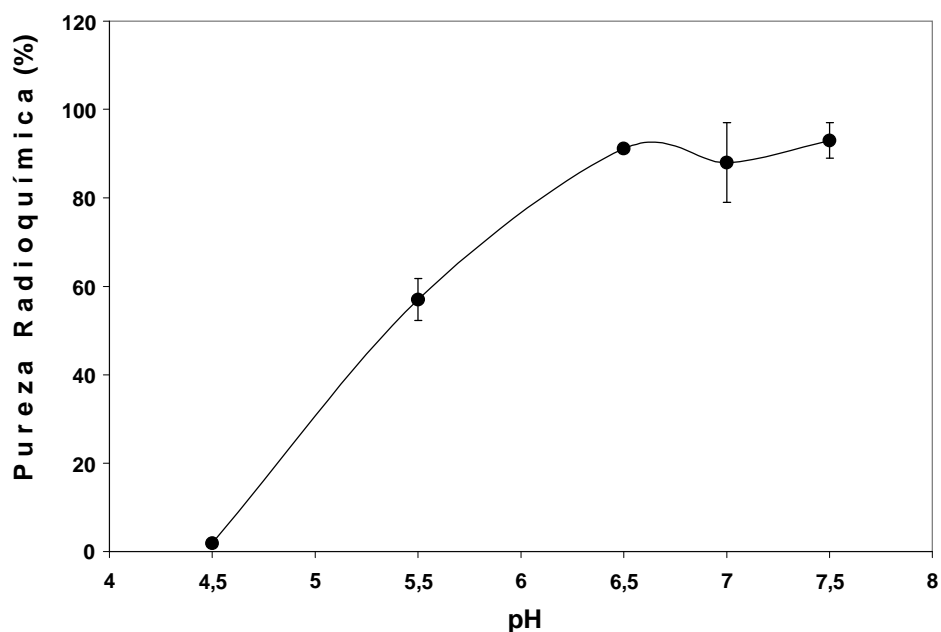


Figura 8 – Valores de pureza radioquímica (%) do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO em $4,5 \leq \text{pH} \leq 7,5$, utilizando $^{177}\text{Lu}^{3+}$ da ONRL/EUA, à razão molar de 1 : 7 ($^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO).

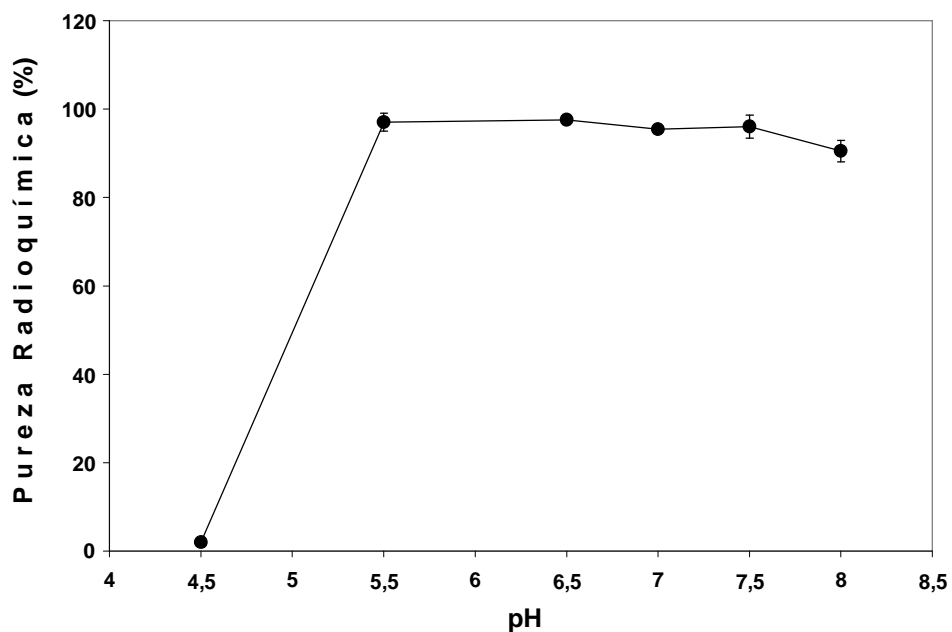


Figura 9 – Valores de pureza radioquímica (%) do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO em $4,5 \leq \text{pH} \leq 8,0$, utilizando $^{177}\text{Lu}^{3+}$ da ONRL/EUA, à razão molar de 1 : 10 ($^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO).

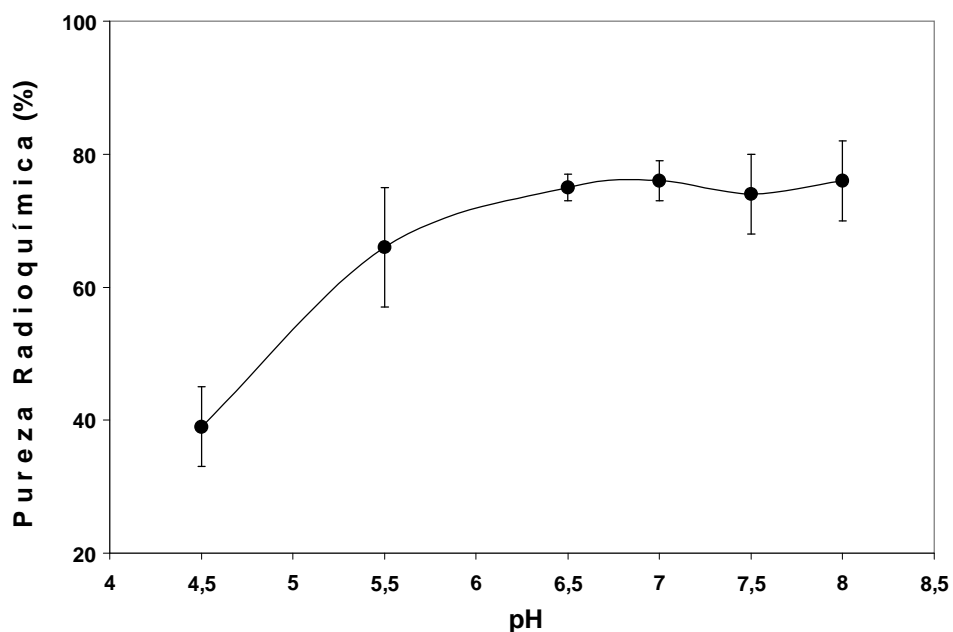


Figura 10 – Valores de pureza radioquímica (%) do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO em $4,5 < \text{pH} < 8,0$, utilizando $^{177}\text{Lu}^{3+}$ da NRG/Holanda, à razão molar de 1 : 16 ($^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO).

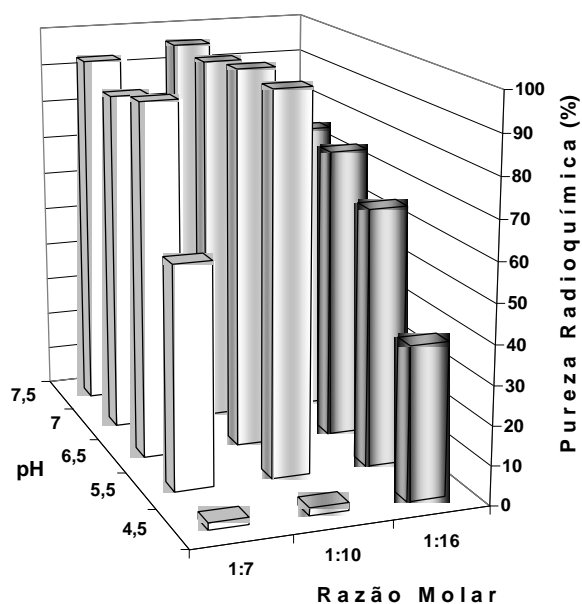


Figura 11 – Comparação dos valores de pureza radioquímica (%) do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO em função do pH e das razões molares 1:7, 1:10 ($^{177}\text{Lu}^{3+}$ ORNL/EUA) e 1:16 ($^{177}\text{Lu}^{3+}$ NRG/Holanda).

Como pode ser observado nos experimentos representados nas figuras 9 e 10 houve um incremento muito significativo dos valores de pureza radioquímica, quando passamos de pH 4,5 para pH 5,5. No experimento representado na figura 8, realizado à razão molar de 1:7, observamos um incremento tanto na passagem do pH 4,5 para 5,5, quanto de 5,5 para 6,5.

Este incremento na pureza radioquímica com um pequeno aumento de pH (4,5 para 5,5) concorda com os valores teóricos da constante de formação corrigida (K_f^H) do complexo $[^{177}\text{LuDOTA}]^{-1}$. Como podemos verificar pela tabela 4, há dois saltos significativos da K_f^H , de pH 4 para pH 5 de 97 vezes e de pH 5 para pH 6 de 63 vezes. Este incremento diminui de pH 6 para pH 7, sendo de apenas 22 vezes. Assim, é coerente que, experimentalmente, observemos incrementos significativos na pureza radioquímica com variações de pH entre 4,5 e 5,5.

No caso da figura 8, cujo experimento foi realizado à razão molar de 1:7, o incremento de pureza radioquímica na passagem do pH 4,5 para 5,5, e de 5,5 para 6,5, é possivelmente consequência da razão molar limite utilizada. Como veremos adiante, a razão molar de 1:7 ($^{177}\text{Lu}^{3+} : \text{DOTATATO}$), corresponde, na realidade a uma proporção de 1:1.

Conseqüentemente, no caso da figura 9, cujo experimento foi realizado à razão molar de 1:10, há um excesso de DOTATATO não-reagente, que acaba por deslocar o equilíbrio no sentido da formação do complexo. Neste caso, dado o deslocamento do equilíbrio por excesso de DOTATATO, o salto da pureza radioquímica fica condicionado a alteração de pH de 4,5 para 5,5. Isso faz com que seja importante fixar determinados valores de razão molar para evidenciar o efeito do pH no incremento da pureza radioquímica. É possível que, trabalhando com altas razões molares (que não se justificam pela questão do custo das matérias-primas), graças ao efeito de deslocamento do equilíbrio, não se observem os efeitos produzidos pela elevação do pH.

Como pode ser verificado pelas figuras 8, 9, 10 e 11, tanto há incremento significativo da pureza radioquímica em pH 5,5 e 6,5, quanto, dentro das incertezas experimentais, não se pode verificar decréscimo de pureza radioquímica em pH 7,0, 7,5 e 8,0. Este importante resultado contradiz a literatura. Breeman *et al.*,(2003),

propõe que o pH ótimo de reação seja entre 4 e 4,5, ou ainda entre 4 e 6 (Sosabowski & Mather, 2006).

As figuras 8, 9, 10 e 11 sugerem também que provavelmente não há precipitação de $\text{Lu}(\text{OH})_3$, mesmo em pH 8, dentro das condições utilizadas.

Pelo valor do K_{ps} do $\text{Lu}(\text{OH})_3$, como já havíamos previsto teoricamente, haveria precipitação do $\text{Lu}(\text{OH})_3$ apenas em pH acima de 8,0. Os dados experimentais ratificam essa premissa teórica.

A descoberta da possibilidade de síntese do complexo $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO com alta pureza radioquímica em $\text{pH} > 4,5$ é importante por três razões diferentes. Em primeiro lugar, pela possibilidade de realizar a reação em pH próximo ao fisiológico (pH 7,0). Em segundo, porque a condução da reação em pH 7 reduz a razão molar ($^{177}\text{Lu}^{3+} : \text{DOTATATO}$), o que implicaria em redução do custo pela otimização da produção. Cabe ressaltar que os experimentos iniciais eram realizados na razão molar de 1:70! Em terceiro lugar, caso haja desconfiança de impedimento estérico da reação de complexação, em virtude da conformação do peptídeo acoplado ao DOTA, há possibilidade de se fazer estudos prévios para se verificar qual o pH ótimo para a complexação. Sabe-se que a variação de pH pode modificar profundamente a conformação de um peptídeo. Portanto, para a realização da reação de complexação com outros peptídeos acoplados ao DOTA, com o $^{177}\text{Lu}^{3+}$, deve-se estudar preliminarmente, dentro da faixa de pH entre 4,5 e 8,0, qual é o pH que corresponde às melhores purezas radioquímicas.

No caso em questão, é possível dizer que não se observa impedimento estérico com o peptídeo octreotato. Caso houvesse efeito de impedimento estérico, a pureza radioquímica só se elevaria no valor de pH que, alterando a conformação do peptídeo, desimpediria a ligação do DOTA ao radioisótopo. Como neste caso, a elevação da pureza radioquímica acompanha o aumento da disponibilidade eletrônica do DOTA que decorre do aumento de pH, fica descartada a possibilidade de impedimento estérico do sítio de complexação. Entretanto, este efeito deve ser considerado com outros peptídeos acoplados ao DOTA.

1.3 Influência da razão molar $^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO na síntese do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO em pH 7,0

1.3.1 Fundamentação teórica: Equacionamento das variáveis que influenciam a Razão Molar ($^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO)

Observando a relação das ligações covalentes coordenadas entre o agente quelante DOTA e o $^{177}\text{Lu}^{3+}$, pode-se supor que a estequiometria da reação de complexação obedece a razão molar de 1:1. Esta suposição é válida para agentes complexantes como o EDTA, que, em condições adequadas de pH, obedece a uma estequiometria de 1:1.

No caso em questão, a estequiometria da reação de complexação entre o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ e o DOTATATO, em condições ótimas de pH, é de no mínimo, 1:7 (considerando o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ de procedência da ORNL/EUA). Se não conseguimos atingir, a partir de uma adequação dos valores de pH, uma estequiometria de 1:1, temos agora que tentar explicar porque experimentalmente a razão molar entre $^{177}\text{Lu}^{3+}$ e o DOTATATO é de 1:7 .

Isso faz com que seja necessário pesquisar possíveis interferentes que expliquem a necessidade de um excesso de DOTATATO, para que se dê a síntese do radiofármaco com alta pureza radioquímica, considerando condições ótimas de pH (pH 7,0). O equacionamento dessa interferência na síntese do radiofármaco, será mostrado a seguir.

Os cálculos dos dados que evidenciam a razão molar dos reagentes na obtenção do radiofármaco serão mostrados passo a passo.

Passo 1 – Cálculo do número de mols de $^{177}\text{Lu}^{3+}$ presentes na atividade de 370 MBq (10 mCi) ($3,7 \times 10^8$ dps).

Sabendo-se que $1 \text{ Ci} = 3,7 \times 10^{10}$ desintegrações por segundo (dps) e que $1 \text{ Bq} = 1 \text{ dps}$, então: $10 \text{ mCi} = 3,7 \times 10^8 \text{ dps} = 3,7 \times 10^8 \text{ Bq}$.

Dada a equação da desintegração radioativa:

$$A = \lambda N \quad (5)$$

Onde: A – atividade em desintegrações por segundo (dps)

λ – constante de desintegração ($0,693/t_{1/2}$)

N – número de átomos

$t_{1/2}$ – meia vida física em segundos (s)

Assim, para sabermos quantos átomos de $^{177}\text{Lu}^{3+}$ existem nessa dada atividade:

$$N = \frac{A}{\lambda} \Rightarrow N = \frac{3,7 \times 10^8}{1,19 \times 10^{-6}} \Rightarrow N = 3,11 \times 10^{14} \text{ átomos de } ^{177}\text{Lu}^{3+}$$

Sabendo-se que $6,02 \times 10^{23}$ átomos correspondem a 1 mol, por meio de uma regra de três simples podemos calcular quantos mols estão presentes nessa atividade:

$$\begin{array}{l} 6,02 \times 10^{23} \leftrightarrow 1 \text{ mol} \\ 3,11 \times 10^{14} \leftrightarrow x \text{ mol} \end{array} \quad x = \frac{3,11 \times 10^{14} \times 1}{6,02 \times 10^{23}} \Rightarrow x = 5,166 \times 10^{-10} \text{ mol de } ^{177}\text{Lu}^{3+}$$

Portanto, há 516,6 pmol de $^{177}\text{Lu}^{3+}$ em uma amostra com atividade de 370 MBq (10 mCi).

Passo 2 – Cálculo da massa do DOTATATO à razão molar de 1:1, considerando atividade de 370 MBq (10 mCi) de $^{177}\text{Lu}^{3+}$.

Como em 370 MBq (10 mCi) temos 516,6 pmol e, sendo a razão molar aqui desejada de 1:1, obrigatoriamente teremos que partir de 516,6 pmol de peptídeo. Assim 516,6 pmol de $^{177}\text{Lu}^{3+}$ reagem com 516,6 pmol de DOTATATO.

Sabendo-se que em 1 mol há a massa molar do peptídeo, então:

$$\begin{array}{l} 1 \text{ mol} \leftrightarrow 1435,6 \text{ g} \\ 516,6 \times 10^{-12} \text{ mols} \leftrightarrow X \end{array} \quad X = 516,6 \times 10^{-12} \times 1435,6 \Rightarrow X = 7,416 \times 10^{-7} \text{ g}$$

Convertendo grama (g) em micrograma (μg), chegaremos a:

$$\begin{array}{l} 1 \text{ g} \leftrightarrow 1 \times 10^6 \mu\text{g} \\ 7,416 \times 10^{-7} \text{ g} \leftrightarrow X \end{array} \quad X = 7,416 \times 10^{-7} \times 1 \times 10^6 \Rightarrow X = 0,74 \mu\text{g}$$

Portanto, para obtenção do radiofármaco com razão molar de 1:1, considerando que a atividade utilizada será de 370 MBq (10 mCi), a massa de DOTATATO a ser utilizada será de 0,74 μg . Entretanto, como veremos na tabela 6, a razão molar deve

ser bem maior do que 1:1 para que ocorra obtenção do radiofármaco com alta pureza radioquímica.

Passo 3 – Formulação de uma equação para obtenção da massa de peptídeo considerando a atividade do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ e a razão molar de interesse pelo pesquisador. A realização dos cálculos acima descritos permite racionalizar uma equação para o cálculo direto da massa de peptídeo em microgramas, considerando como variáveis, a atividade de $^{177}\text{Lu}^{3+}$ utilizada e a razão molar escolhida pelo pesquisador.

$$m = 0,074 \times RM \times A \quad (6)$$

Onde: m – massa do DOTATATO em μg .

RM – razão molar que se deseja utilizar no experimento, expressa por quantas vezes o número de mols do DOTATATO é maior que o número de mols do $^{177}\text{Lu}^{3+}$. Por exemplo, caso se deseje uma razão molar de 1:5, RM=5.

A – atividade do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ expressa em mCi.

Uma equação geral que permite calcular diretamente a massa de peptídeo em microgramas, caso se utilize outros peptídeos acoplados ao DOTA, diferentes do octreotato, pode ser dada por:

$$m = 5,165 \times 10^{-5} \times MM \times RM \times A \quad (7)$$

Onde: m – massa do peptídeo em μg .

MM – massa molar do DOTA-peptídeo em gramas.

RM – razão molar que se deseja utilizar no experimento, expressa por quantas vezes o número de mols do DOTATATO é maior que o número de mols do $^{177}\text{Lu}^{3+}$. Por exemplo, caso se deseje uma razão molar de 1:5, RM=5.

A – atividade do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ expressa em mCi.

Equacionada a problemática da determinação dos números de mols entre o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ e o DOTATATO, apresentaremos abaixo como conduzimos os experimentos em situação-limite de razão molar com o objetivo de evidenciar valores adequados à obtenção do radiofármaco com alta pureza radioquímica.

1.3.2 Métodos

Para a avaliação do parâmetro razão molar $^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO, os experimentos foram conduzidos variando-se a razão molar e mantendo o pH fixo em 7,0.

Na síntese do radiofármaco, utilizou-se $^{177}\text{Lu}^{3+}$ de duas procedências distintas: ORNL/EUA na forma de $^{177}\text{LuCl}_3$ em solução de HCl 0,1M e NRG/Holanda na forma de $^{177}\text{LuCl}_3$ em solução de HCl 0,05M.

A execução do procedimento de síntese do radiofármaco foi realizada em *glove box* apropriada à manipulação de elementos radioativos.

Em eppendorf com capacidade de 1,5 mL foi adicionado 200 μL de tampão, a massa de peptídeo e a atividade desejadas, de acordo com a razão molar estabelecida.

Em seguida foram aquecidos à temperatura constante de 95 °C e mantidos sob agitação de 350 rpm por 30 minutos.

Os experimentos foram conduzidos de modo a se obter uma razão molar-limite, definida como a mínima razão experimentada (mol $^{177}\text{Lu}^{3+}$:mol de DOTATATO) que concorre com pureza radioquímica elevada >95%.

Foram realizados também, experimentos de síntese do radiofármaco decorridas 1,64 $T_{1/2}$, 2,68 $T_{1/2}$ e 4,03 $T_{1/2}$ do $^{177}\text{Lu}^{+3}$ ORNL/EUA .

1.3.3 Resultados & Discussão

Tabela 6 – Valores de pureza radioquímica (%) do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO em função de diferentes razões molares, utilizando $^{177}\text{Lu}^{3+}$ de procedências distintas: NRG/Holanda e ORNL/EUA. Reações de complexação realizadas em pH 7,0.

| <i>Razão Molar Lu:DOTATATO</i> | <i>Pureza Radioquímica (%) (*)</i> | |
|------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| | $^{177}\text{Lu}^{3+}$ ONRL/EUA | $^{177}\text{Lu}^{3+}$ NRG/Holanda |
| 1 : 4 | 5,2 ± 1,5 | - |
| 1 : 7 | 88,0 ± 9,0 | - |
| 1 : 8 | - | 18,0 ± 6,0 |
| 1 : 10 | 99,4 ± 0,1 | 25,3 ± 0,5 |
| 1 : 14 | - | 59,7 ± 0,2 |
| 1 : 15 | - | 88,5 ± 2,0 |
| 1 : 16 | 99,5 ± 0,2 | 96,0 ± 3,0 |
| 1 : 17 | - | 95,6 ± 1,0 |
| 1 : 18 | - | 98,2 ± 0,2 |
| 1 : 20 | 99,6 ± 0,1 | - |

(*) Resultados provenientes de dois procedimentos de síntese distintos. A determinação da pureza radioquímica por cromatografia em camada delgada foi realizada em duplicata em cada procedimento. Sendo assim o espaço amostral para o cálculo da média e do desvio padrão foi n=4.

Com base nos dados da tabela 6 é preciso salientar que só razões molares de 1:7 no caso do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ da ORNL/EUA e de 1:16 para o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ da NRG/Holanda, concorrem com alta pureza radioquímica, considerando os respectivos desvios padrões . Mesmo tendo em conta à razão molar de 1:7 uma pureza radioquímica de 88%, abaixo do limite aceitável para uso do radiofármaco, (>95%), na razão molar 1:10 já se obtém elevada pureza radioquímica com o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ da ORNL/EUA. Comparado com o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ da NRG/Holanda esta mesma razão molar de 1:10 alcança pureza radioquímica de apenas 25,3 ± 0,5.

Analisando os dados da tabela 6, observamos que a reação de complexação com o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ da ORNL/EUA ocorre à uma razão molar significativamente menor do que com o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ da NRG/Holanda. As figuras 12 e 13 ilustram essa disparidade.

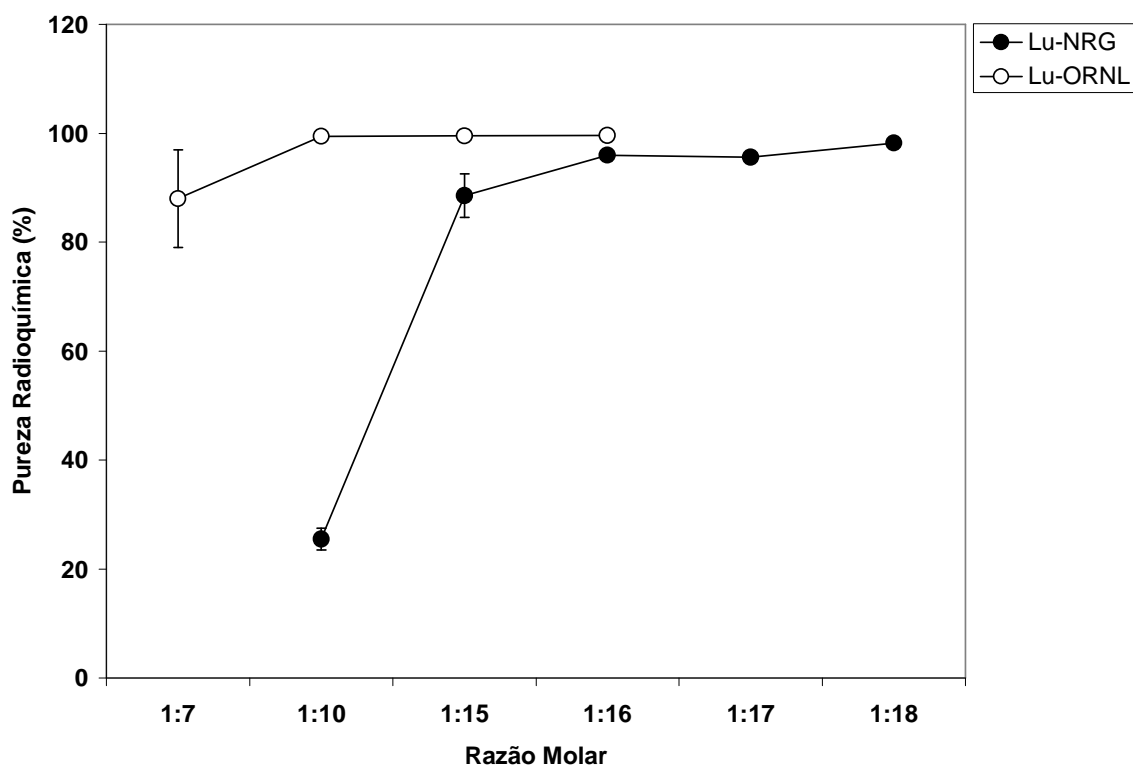


Figura 12 – Pureza radioquímica (%) do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO versus razão molar, utilizando $^{177}\text{Lu}^{3+}$ de duas procedências distintas: NRG/Holanda e ORNL/EUA. Reações de complexação realizadas em pH 7,0.

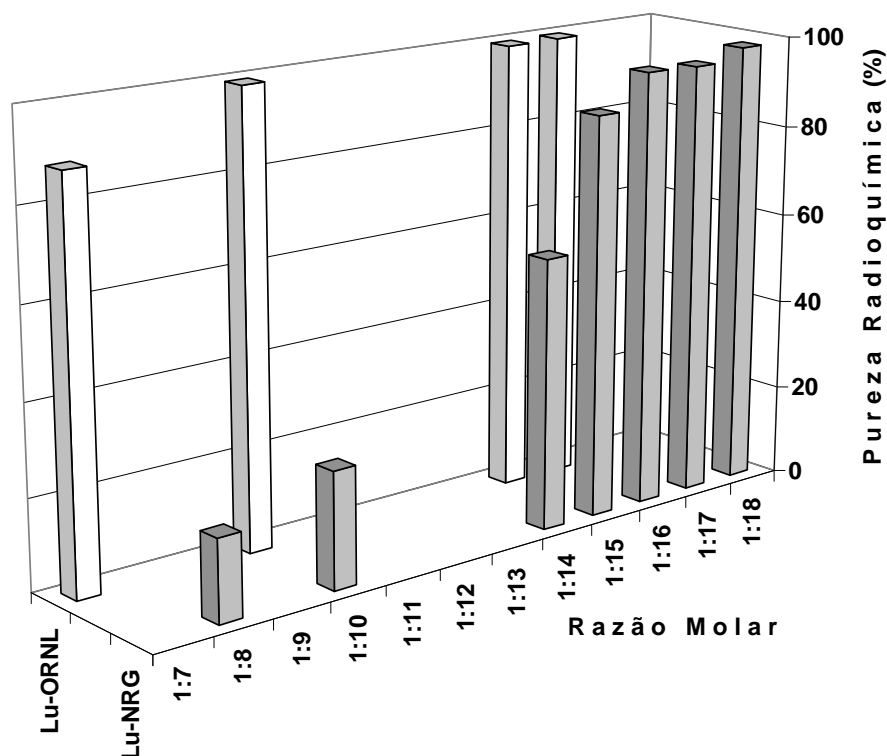


Figura 13 – Pureza radioquímica (%) do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO versus razão molar, utilizando $^{177}\text{Lu}^{3+}$ de duas procedências distintas: NRG/Holanda e ORNL/EUA. Reações de complexação realizadas em pH 7,0.

De acordo com estes resultados, podemos dizer que o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ de procedência da ORNL/EUA pode ser usado em menor proporção para a obtenção do radiofármaco. Esta conclusão está embasada no fato de que há purezas radioquímicas equivalentes, considerando os desvios experimentais, à razão molar de 1:7 (ORNL/EUA) versus 1:15 (NRG/Holanda), e, também, de 1:10 (ORNL/EUA) versus 1:16 (NRG/Holanda).

A diferença entre os isótopos radioativos provenientes desses dois fabricantes fica mais acentuada se considerarmos que a reação de complexação foi realizada 11 dias após a produção do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ de procedência da ORNL/EUA, e após 5 dias para o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ de procedência da NRG/Holanda. Se a obtenção do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO tivesse sido conduzida, decorrido o mesmo intervalo de tempo, se observariam altas

purezas radioquímicas em razão molar abaixo de 1:10 em relação ao $^{177}\text{Lu}^{3+}$ de procedência da ORNL/EUA.

Apesar de termos obtido resultados de pureza radioquímica mais elevada, com menor razão molar com o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ de procedência da ORNL/EUA, a razão molar-limite encontrada foi, como visto acima, de 1:7. Como a previsão estequiométrica para esta reação é de 1:1, resta ainda explicar (descobrir) porque a razão molar limite obtida experimentalmente é 7 vezes maior.

A primeira hipótese a ser levada em consideração é a da existência de outros isótopos de Lu^{3+} que se encontram no meio de reação e que competem pelo mesmo sítio de ligação do agente quelante. Por ser produzido a partir de óxido de lutécio (Lu_2O_3) enriquecido com $^{176}\text{Lu}^{3+}$, o produto da irradiação contém, além de $^{177}\text{Lu}^{3+}$ e $^{177\text{m}}\text{Lu}^{3+}$, $^{176}\text{Lu}^{3+}$ não convertido em $^{177}\text{Lu}^{3+}$ durante o processo de produção. O decaimento por emissão de partícula β^- e radiação γ , resulta como produto estável o elemento $^{177}\text{Hf}^{4+}$ (háfnio).

A partir do certificado de Análise emitido pelo fabricante, obtivemos uma relação entre o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ e os demais isótopos, que caracterizamos como $^{17\text{X}}\text{Lu}^{3+}$.

O raciocínio para a obtenção da relação entre o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ e os demais isótopos serão mostrados, a seguir, passo a passo:

Passo 1 – Cálculo da relação entre $^{177}\text{Lu}^{3+}$: $^{17\text{X}}\text{Lu}^{3+}$ – ORNL/EUA, na data de produção ($^{17\text{X}}\text{Lu}^{3+}$ refere-se a quaisquer outros isótopos de Lu^{3+} presentes em mistura com o $^{177}\text{Lu}^{3+}$).

A partir dos dados do certificado de análise do fabricante: Atividade específica = 53 Ci/mg (na data de produção)

Sabendo-se que $1 \text{ Ci} = 37 \text{ GBq}$:

$$1 \text{ Ci} \leftrightarrow 37 \text{ GBq}$$

$$53 \text{ Ci} \leftrightarrow X$$

$$X = 53 \times 37 \Rightarrow X = 1961 \text{ GBq}$$

o que equivale a $1961 \times 10^9 \text{ dps}$

Assim, para sabermos quantos átomos de $^{177}\text{Lu}^{3+}$ existem nessa dada atividade:

$$N = \frac{A}{\lambda} \Rightarrow N = \frac{1961 \times 10^9}{1,19 \times 10^{-6}} \Rightarrow N = 1,65 \times 10^{18} \text{ átomos de } ^{177}\text{Lu}^{3+} \text{ no dia da produção}$$

Sabendo-se que $6,02 \times 10^{23}$ átomos $^{177}\text{Lu}^{3+}$ contém a massa de 177 g, por meio de uma regra de três simples podemos calcular qual é a massa de $^{177}\text{Lu}^{3+}$ que corresponde a este número de átomos:

$$\begin{array}{l} 6,02 \times 10^{23} \leftrightarrow 177 \text{ g} \\ 1,65 \times 10^{18} \leftrightarrow X \text{ g} \end{array} \quad X = \frac{1,65 \times 10^{18} \times 177}{6,02 \times 10^{23}} \Rightarrow x = 4,85 \times 10^{-4} \text{ g de } ^{177}\text{Lu}^{3+}$$

Convertendo grama (g) em micrograma (μg), chegaremos a:

$$\begin{array}{l} 1 \text{ g} \leftrightarrow 1 \times 10^6 \mu\text{g} \\ 4,85 \times 10^{-4} \text{ g} \leftrightarrow X \end{array} \quad X = 4,85 \times 10^{-4} \times 1 \times 10^6 \Rightarrow X = 485 \mu\text{g de } ^{177}\text{Lu}^{3+}$$

Dado que temos uma atividade específica de 1961 GBq/mg (53 Ci/mg) e, que desta massa, 485 μg correspondem ao $^{177}\text{Lu}^{3+}$, logo 515 μg são de $^{177}\text{Lu}^{3+}$. De acordo com estes dados, portanto, encontramos aqui uma relação de $^{177}\text{Lu}^{3+} : ^{177}\text{Lu}^{3+}$ de 1:1,06, ou aproximadamente 1:1,1.

Passo 2 – Cálculo da relação molar entre $^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO para obtenção do radiofármaco na data de produção do $^{177}\text{Lu}^{3+}$.

Supondo que fôssemos realizar a síntese do radiofármaco com este radioisótopo no dia de sua produção, quando temos uma relação de 1 $^{177}\text{Lu}^{3+}$: 1,1 $^{177}\text{Lu}^{3+}$, a razão molar de $^{177}\text{Lu}^{3+}$ em relação a de DOTATATO a ser usada nesta síntese, seria de 1 ($^{177}\text{Lu}^{3+}$) : 2,1 (DOTATATO).

Passo 3 – Cálculo da relação entre $^{177}\text{Lu}^{3+} : ^{177}\text{Lu}^{3+}$ na data de utilização do radioisótopo (11 dias após sua produção).

Como recebemos o radioisótopo somente 11 dias após a data de sua produção, teremos que recalcular a relação entre $^{177}\text{Lu}^{3+} : ^{177}\text{Lu}^{3+}$ mostrada no Passo 1.

Dada a equação do decaimento:

$$N = N_0 x e^{-\lambda t} \quad (8)$$

Onde:

N – número de átomos

N_0 – número de átomos inicial

λ – constante de desintegração ($0,693/t_{1/2}$)

t – tempo.

Para sabermos qual a proporção de $^{177}\text{Lu}^{3+}$ teremos após 11 dias:

$$N = 1 x e^{-\frac{0,693}{6,7} \times 11} \Rightarrow N = 0,32$$

Assim, passados 11 dias podemos formular uma nova proporção de 0,32 $^{177}\text{Lu}^{3+}$: 1,1 $^{177}\text{Lu}^{3+}$ ou 1 $^{177}\text{Lu}^{3+}$: 3,44 $^{177}\text{Lu}^{3+}$.

Passo 4 – Cálculo da relação molar entre $^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO para obtenção do radiofármaco na data de utilização do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ (11 dias após sua produção).

Se fôssemos realizar a síntese do radiofármaco com este radioisótopo 11 dias após sua produção, quando temos uma relação de 1 $^{177}\text{Lu}^{3+}$: 3,44 $^{177}\text{Lu}^{3+}$, a razão molar de $^{177}\text{Lu}^{3+}$ em relação a de DOTATATO a ser usada nesta síntese, seria de 1 ($^{177}\text{Lu}^{3+}$) : 4,44 (DOTATATO).

Mesmo considerando o decaimento do $^{177}\text{Lu}^{3+}$, quando a razão molar para a síntese do radiofármaco é de 1 : 4,44, a razão molar-limite encontrada experimentalmente é de 1 : 7. A razão molar obtida teoricamente é menor que a razão molar obtida experimentalmente. Aqui ainda persiste uma diferença de 1,6 vezes entre a razão molar teórica e a experimental.

Diante destes dados, a segunda hipótese a ser levada em consideração é que existem outros interferentes no processo de síntese do radiofármaco. Resta então considerar o produto de decaimento do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ como possível competidor na reação de complexação.

Sabendo-se que o produto estável do decaimento do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ é o $^{177}\text{Hf}^{4+}$ (háfnio), vamos calcular quanto forma deste elemento.

Passo 5 – Cálculo do número de átomos de $^{177}\text{Hf}^{4+}$ formados 11 dias após a produção do $^{177}\text{Lu}^{3+}$.

Como já calculado no **Passo 1**, temos o número de átomos de $^{177}\text{Lu}^{3+}$, no dia da produção, igual a $1,65 \times 10^{18}$, substituindo esse valor na equação do decaimento:

$$N = 1,65 \times 10^{18} \times e^{-\frac{0,693}{6,7} \times 11} \Rightarrow N = 5,29 \times 10^{17} \text{ átomos de } ^{177}\text{Lu}^{3+} \text{ (11 dias após)}$$

Para sabermos quanto de $^{177}\text{Hf}^{4+}$ formou nesse período, admitindo que os átomos de $^{177}\text{Lu}^{3+}$ decaem a $^{177}\text{Hf}^{4+}$:

$$1,65 \times 10^{18} - 5,29 \times 10^{17} = 1,12 \times 10^{18} \text{ átomos de } ^{177}\text{Hf}^{4+} \text{ formados.}$$

Passo 6 – Cálculo da relação entre $^{177}\text{Lu}^{3+}$: $^{177}\text{Hf}^{4+}$ na data de utilização do radioisótopo (11 dias após sua produção).

Aqui a proporção entre átomos de $^{177}\text{Lu}^{3+}$: $^{177}\text{Hf}^{4+}$ será de:

$$5,29 \times 10^{17} : 1,12 \times 10^{18}, \text{ portanto de } 1 : 2,12.$$

Passo 7 – Cálculo da relação molar entre $^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO para obtenção do radiofármaco, 11 dias após a produção de $^{177}\text{Lu}^{3+}$, considerando a complexação com $^{177}\text{Hf}^{4+}$.

Se considerarmos que o $^{177}\text{Hf}^{4+}$ compete pelo sítio de ligação no DOTATATO com a mesma afinidade que os isótopos do $^{177}\text{Lu}^{3+}$, teremos que admitir uma nova razão molar para a síntese do radiofármaco. Esta nova razão molar $^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO será dada por: 4,44 (encontrada no **Passo 4**) + 2,12 (encontrada no **Passo 6**) = 6,56. Isso significa que na síntese do radiofármaco, para cada mol de $^{177}\text{Lu}^{3+}$ serão necessários 6,56 mols de DOTATATO (4,44 mols para reagir com $^{177}\text{Lu}^{3+}$ + $^{177}\text{Lu}^{3+}$ e 2,12 mols para reagir com o $^{177}\text{Hf}^{4+}$ presente). Portanto a razão molar final, considerando complexação com o $^{177}\text{Hf}^{4+}$ é de 1 $^{177}\text{Lu}^{3+}$: 6,56 de DOTATATO.

Aqui, a razão molar obtida teoricamente (1: 6,56) é coincidente com a razão molar-limite obtida experimentalmente (1: 7).

Como utilizamos $^{177}\text{Lu}^{3+}$ de procedências distintas, $^{177}\text{Lu}^{3+}$ ORNL/EUA e $^{177}\text{Lu}^{3+}$ NRG/Holanda, realizamos os cálculos mostrados acima também para o $^{177}\text{Lu}^{3+}$

NRG/Holanda, que tinha atividade específica de 852,4 GBq/mg na data de produção. Por se tratar de cálculos semelhantes, não mostraremos novamente o passo a passo dos cálculos. Os resultados são mostrados na tabela 7.

Tabela 7 – Resultados comparativos dos passos acima descritos em relação ao $^{177}\text{Lu}^{3+}$ ORNL/EUA e o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ NRG/Holanda.

| | Passos | $^{177}\text{Lu}^{3+}$ ORNL/EUA | $^{177}\text{Lu}^{3+}$ NRG/Holanda |
|-------------------------|--|---------------------------------|------------------------------------|
| Data da produção | (1) $^{177}\text{Lu}^{3+} : ^{17\text{X}}\text{Lu}^{3+}$ | 1 : 1,1 | 1 : 3,77 |
| | (2) $^{177}\text{Lu}^{3+} : \text{DOTATATO}$ | 1 : 2,1 | 1 : 4,77 |
| Data do uso | (3) $^{177}\text{Lu}^{3+} : ^{17\text{X}}\text{Lu}^{3+}$ | 1 : 3,44 (*) | 1 : 6,33 (**) |
| | (4) $^{177}\text{Lu}^{3+} : \text{DOTATATO}$ | 1 : 4,44 (*) | 1 : 7,33 (**) |
| | (6) $^{177}\text{Lu}^{3+} : ^{177}\text{Hf}^{4+}$ | 1 : 2,12 (*) | 1 : 0,67 (**) |
| | (7) $^{177}\text{Lu}^{3+} : \text{DOTATATO final}$ | 1 : 6,56 (*) | 1 : 8 (**) |

(*) – 11 dias após a produção do $^{177}\text{Lu}^{3+}$

(**) – 05 dias após a produção do $^{177}\text{Lu}^{3+}$

O primeiro resultado da tabela 7 referente ao **Passo 1** chama a atenção que a proporção $^{177}\text{Lu}^{3+} : ^{17\text{X}}\text{Lu}^{3+}$ do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ ORNL/EUA é 3,4 vezes menor que a do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ NRG/Holanda. Esta diferença é refletida na razão molar final $^{177}\text{Lu}^{3+} : \text{DOTATATO}$ (**Passo 7**) no momento da síntese do radiofármaco.

No entanto, se considerarmos o mesmo tempo decorrido (5 dias após a data de produção), podemos calcular uma razão molar final $^{177}\text{Lu}^{3+} : \text{DOTATATO}$ de 1:3,5 para o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ de procedência do ORNL/EUA.

Pela razão molar calculada, pode-se notar a real diferença entre as proporções molares $^{177}\text{Lu}^{3+} : \text{DOTATATO}$ de 1:3,5 (ORNL/EUA) e de 1:8 (NRG/Holanda), que na tabela acima fica enviesada pela diferença de dias.

Revedo os resultados da tabela 6, devemos agora comparar a razão molar calculada *versus* a razão molar-limite encontrada experimentalmente (Tab. 6), considerando-se como parâmetro, valores de pureza radioquímica acima de 95%. Observamos que os dados são coincidentes para o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ ORNL/EUA (1:6,7 calculado; 1:7 experimental), mas não para o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ NRG/Holanda (1:8 calculado; 1:16 experimental). Para este, uma razão molar de 1:8 (já considerando a influência

do $^{177}\text{Hf}^{4+}$) deveria resultar em obtenção do radiofármaco com alta pureza radioquímica, porém isso só é observado quando a razão molar é de 1:16, o dobro da razão molar calculada.

Baseado nestes resultados podemos supor que o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ NRG/Holanda pode apresentar outros interferentes.

Para validar a coincidência da razão molar calculada *versus* a razão molar-limite encontrada experimentalmente e, ao mesmo tempo, ratificar a hipótese de que o produto de decaimento do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ interfere na reação de complexação, conduzimos outros experimentos com o mesmo $^{177}\text{Lu}^{3+}$ da ORNL/EUA, seguindo os passos descritos acima e usando as mesmas condições para a realização da síntese do radiofármaco.

Assim, realizamos experimentos de síntese do radiofármaco 11, 18 e 27 dias após a produção do $^{177}\text{Lu}^{3+}$, o que equivale dizer que se passaram, respectivamente 1,64 $t_{1/2}$, 2,68 $t_{1/2}$ e 4,03 $t_{1/2}$.

Antes de mostrar os dados experimentais, mostraremos na tabela 8, abaixo, os resultados calculados da razão molar $^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO, considerando ou não a interferência do $^{177}\text{Hf}^{4+}$.

Tabela 8 – Valores calculados de razão molar $^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO após 11, 18 e 27 dias da produção do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ (ORNL/EUA), considerando e não considerando a influência do $^{177}\text{Hf}^{4+}$.

| <i>Dias após a produção do</i> $^{177}\text{Lu}^{3+}$ | <i>Razão molar calculada</i> | |
|--|--|--|
| | Sem considerar o $^{177}\text{Hf}^{4+}$ | Considerando o $^{177}\text{Hf}^{4+}$ |
| 11 | 1: 4,4 | 1: 6,7 |
| 18 | 1: 8,1 | 1: 13,5 |
| 27 | 1: 19 | 1: 34,3 |

Pela análise da tabela 8 fica evidente que, quando consideramos $^{177}\text{Hf}^{4+}$ como potencial competidor com o $^{177}\text{Lu}^{3+}$, a razão molar para a síntese do radiofármaco com alta pureza radioquímica terá que ser maior.

Podemos relacionar a proporção molar teórica $^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO da tabela 8, com os resultados experimentais apresentados na tabela 9 e ilustrados na figura 14 a seguir.

Tabela 9 – Valores experimentais de pureza radioquímica (%) em função da razão molar $^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO após 11, 18 e 27 dias da produção do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ (ORNL/EUA). Reações de complexação realizadas em pH 7,0.

| <i>Razão Molar</i> | <i>Pureza Radioquímica (%) (*)</i> | | |
|--------------------|------------------------------------|------------|------------|
| | 11 dias | 18 dias | 27 dias |
| 1 : 4 | 5,2 ± 1,5 | | |
| 1 : 7 | 88,0 ± 9,0 | | |
| 1 : 8 | | 38,1 ± 0,9 | |
| 1 : 10 | 99,4 ± 0,1 | | |
| 1 : 11 | | 59,3 ± 0,1 | |
| 1 : 14 | | 98,2 ± 0,7 | |
| 1 : 16 | 99,5 ± 0,2 | | |
| 1 : 19 | | | 14,4 ± 2,2 |
| 1 : 20 | 99,6 ± 0,1 | | |
| 1 : 34 | | | 69,0 ± 2,1 |

(*) Resultados provenientes de dois procedimentos de síntese distintos. A determinação da pureza radioquímica por cromatografia em camada delgada foi realizada em duplicata em cada procedimento. Sendo assim o espaço amostral para o cálculo da média e do desvio padrão foi n=4.

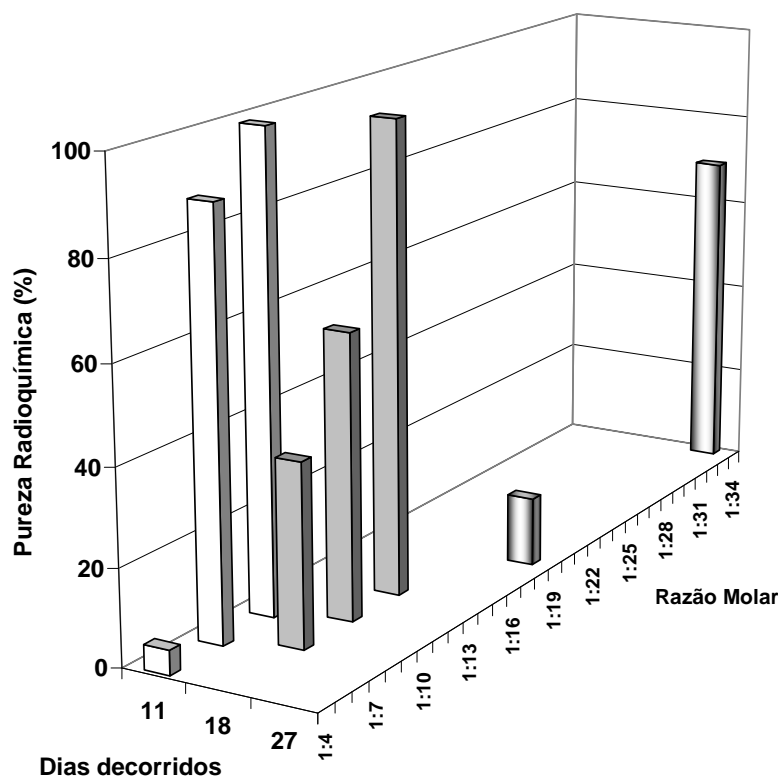


Figura 14 – Valores experimentais de pureza radioquímica (%) em função da razão molar $^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO após 11, 18 e 27 dias da produção do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ (ORNL/EUA).

Da observação das tabelas 8 e 9 vemos claramente como são coincidentes o valor da razão molar $^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO calculado considerando a interferência do $^{177}\text{Hf}^{4+}$ em relação ao da razão molar experimental que produz alta pureza radioquímica do radiofármaco. Esta coincidência entre o calculado e o experimental ratifica a coerência do raciocínio utilizado para equacionar os cálculos apresentados acima.

No experimento realizado após 11 dias da produção do $^{177}\text{Lu}^{3+}$, a razão molar calculada, 1:6,7, coincide com a razão molar experimental de 1:7. Esta evidência se repete para os resultados do experimento realizado após 18 dias, e, 1:13,5 (valor da razão molar teórica) também coincide com 1:14 (valor experimental). Ambos os resultados, tendo por parâmetro experimental a pureza radioquímica do radiofármaco >95%, ratificam a hipótese da interferência do $^{177}\text{Hf}^{4+}$.

No experimento conduzido após 27 dias da produção do $^{177}\text{Lu}^{3+}$, a razão molar experimental de 1:34 apresentou pureza radioquímica de aproximadamente 70%. Sendo a razão molar calculada igual a 1:34,3, podemos perceber que utilizamos, no experimento, uma razão molar-limite. Apesar de obtermos uma pureza radioquímica menor que a esperada (>95%), este resultado ratifica a mesma hipótese: o $^{177}\text{Hf}^{4+}$ interfere na complexação do $^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO.

A figura 14 ilustra a conclusão a que chegamos: é preciso aumentar a proporção de DOTATATO utilizado em relação ao $^{177}\text{Lu}^{3+}$ para obtenção de pureza radioquímica > 95%, devido ao decaimento do $^{177}\text{Lu}^{3+}$. Mas este incremento na proporção de DOTATATO utilizado, não é apenas em função do aumento relativo da quantidade de $^{177}\text{Lu}^{3+}$, mas também, da formação de $^{177}\text{Hf}^{4+}$ que compete com o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ pelo DOTATATO. Neste sentido, os resultados apresentados na figura 14 comparados com os resultados calculados de razão molar, evidencia o acerto do equacionamento destes cálculos e da hipótese da interferência do $^{177}\text{Hf}^{4+}$.

Os resultados encontrados com a realização de experimentos conduzidos em dias decorridos após a produção do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ mostram que a pureza radioquímica do radiofármaco é função de dois efeitos simultâneos e sinérgicos: com o decaimento do $^{177}\text{Lu}^{3+}$, aumenta-se relativamente a proporção de $^{177}\text{Lu}^{3+}$ e gera-se $^{177}\text{Hf}^{4+}$ que competem pelo mesmo sítio de ligação no DOTATATO.

Pelos dados aqui obtidos que evidenciam a competição do $^{177}\text{Hf}^{4+}$ como o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ vamos de encontro aos estudos de Breeman *et al.*, (2003) que afirmam que o $^{177}\text{Hf}^{4+}$ não compete com o $^{177}\text{Lu}^{3+}$, na síntese do radiofármaco.

Esta hipótese de que o $^{177}\text{Hf}^{4+}$ compete com o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ e o ganho de pureza radioquímica conseqüente à condução das reações de complexação do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO em pH > 4,5 são dados inéditos na literatura. Além disso, os cálculos desenvolvidos nesta seção inauguram uma sistemática para condução e avaliação de pesquisas em síntese de radiofármacos que tem o DOTA como agente de complexação.

1.4 Conclusões

De acordo com os dados apresentados e discutidos neste capítulo podemos concluir que:

Em relação aos parâmetros cinéticos:

1. As temperaturas de 80 e de 95 °C, produzem, indistintamente, o radiofármaco com alta pureza radioquímica. Esta mesma observação vale em relação aos tempos de 10, 20 e 30 minutos.
2. Padronizou-se utilizar temperatura de 95 °C por 30 minutos.

Em relação ao pH:

1. É possível realizar a síntese do complexo $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO com alta pureza radioquímica em $\text{pH} > 4,5$, sendo o $\text{pH} 7,0$ o mais apropriado, tanto pela possibilidade de realizar a reação em pH próximo ao fisiológico ($\text{pH} 7,0$), quanto pela condução da reação em $\text{pH} 7$ reduzir a razão molar $^{177}\text{Lu}^{3+} : \text{DOTATATO}$. Esta redução da razão molar, implica em redução direta do custo de produção.
2. Na faixa $4,5 < \text{pH} < 8,0$ não há precipitação de $^{177}\text{Lu}(\text{OH})_3$.
3. Para a realização da reação de complexação do $^{177}\text{Lu}^{3+}$, com outros peptídeos acoplados ao DOTA, deve-se estudar preliminarmente, dentro da faixa de pH entre 4,5 e 8,0, qual é o pH que corresponde à pureza radioquímica $>95\%$. É possível que para alguns peptídeos ocorra impedimento estérico do sítio de complexação, o que pode ser contornado pela eleição prévia de um pH adequado.

Em relação à razão molar:

1. A razão molar-limite obtida para a síntese do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO, com pureza radioquímica $>95\%$, foi de 1:3,5 para o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ ORNL/EUA e de 1:16 para o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ NRG/Holanda, considerando que utilizamos o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ 5 dias após a data de sua produção.

2. Por motivo de segurança, é prudente que se trabalhe com uma razão molar duas vezes maior que a limite, isto é, 1:7 para o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ ORNL/EUA e 1:32 para o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ NRG/Holanda. Isto significa dizer que, na prática, se poderia trabalhar com 5,2 μg de DOTATATO para 370 MBq (10 mCi) de $^{177}\text{Lu}^{3+}$ no caso da utilização do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ ORNL/EUA e 23,7 μg de DOTATATO para 370 MBq (10 mCi) no caso da utilização do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ NRG/Holanda. Considerando-se 5 dias após a produção do radioisótopo.
3. É possível que o NRG/Holanda forneça o radioisótopo com interferentes que não estão declarados no “Certificado de Análise” do fabricante.
4. A otimização da proporção molar gera uma enorme economia de DOTATATO, uma vez que se tinha como prática a utilização de 370 MBq (10 mCi) de $^{177}\text{Lu}^{3+}$ para 50 μg de DOTATATO (1:70). Seria importante avaliar se o uso de proporções molares tão altas quanto 1:70 não concorre com uma diminuição da eficácia clínica do radiofármaco, uma vez que, neste caso, são geradas moléculas de DOTATATO sem radioisótopo.
5. Há interferência do $^{177}\text{Hf}^{4+}$ como importante competidor pelo DOTATATO. Isto abre perspectivas futuras de investigação da competição entre o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ e o $^{177}\text{Hf}^{4+}$ pelo DOTATATO.

1.5 Referências Bibliográficas

ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de bioquímica**. [S.l.]: Bookman, 2006. cap. 10, Ácidos e bases. p. 461 – 496.

BENETOLLO, F.; BOMBIERI, G.; CALABI, L.; AIME, S.; BOTTA, M. Structural variations across the lanthanide series of macrocyclic DOTA complexes: insights into the design of contrast agents for magnetic resonance imaging. **Inorganic Chemistry**, v. 42, p. 148 – 153, 2003.

BREEMAN, W.A.P.; DE JONG M.; VISSER T.J.; ERION, J. L.; KRENNING, E.P. Optimising conditions for radiolabelling of DOTA-peptides with ^{90}Y , ^{111}In and ^{177}Lu at high specific activities. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 30, p. 917 – 920, 2003.

FIFIELD, F.W.; KEALEY, D. **Principles and practice of analytical chemistry**, [S.l.]:Blackie Academic & Professional, 1995. p. 200.

LÓPEZ-GONZÁLEZ, H.; JIMÉNEZ-REYES, M.; SOLACHE-RÍOS, M.; ROJAAS-HERNÁNDEZ, A. Solubility and Hydrolysis of lutetium at different $[\text{Lu}^{3+}]_{\text{initial}}$. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 274, p. 103 – 108, 2007.

OHLWEILER, O.A. **Química analítica quantitativa**, [S.l.]: Livros Técnicos e Científicos , 1974. v.2, p. 492.

PAWLAK D.; KORSAK A.; MIKOLAJCZAK, R.; JONATA, B.; KARCZMARCZYK, U.; JAKUBOWSKA, E. **The preclinical evaluation of therapeutic radiopharmaceuticals based ^{90}Y and ^{177}Lu** . Viena: IAEA, 2005.(IAEA Reporter – Comparative Evaluation of Therapeutic Radiopharmaceutics: p. 153 – 166, 2005).

SOSABOWSKI, J.K.; MATHER, J.S. Conjugation of DOTA-like chelating agents to peptides and radiolabeling with trivalent metallic isotopes. **Nature Protocols**, v.1, p. 972 – 976, 2006.

CAPÍTULO II

DETERMINAÇÃO DA PUREZA RADIOQUÍMICA, PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO RADIOFÁRMACO $^{177}\text{Lu}^{3+}$ – DOTATATO POR CROMATOGRAFIA

2.0 Introdução

Para analisar a composição de uma mistura é preciso separar seus componentes e identificar as substâncias presentes. Dentre as técnicas de separação empregadas nos mais diversos processos, a cromatografia tem destaque por sua ampla utilização.

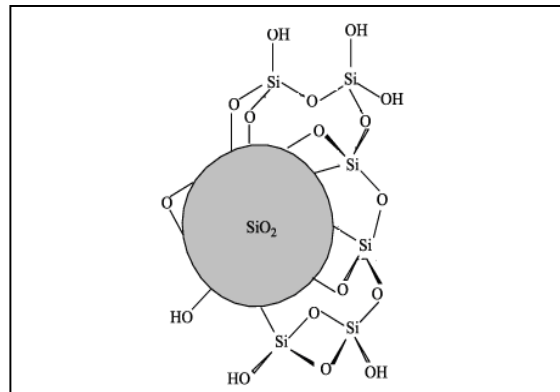
A cromatografia é um grupo de técnicas de separação físico-química baseada na distribuição diferencial dos componentes de uma mistura entre duas fases: uma fase fixa (estacionária) e uma fase móvel.

De um modo geral, o processo de separação cromatográfico é dado pela passagem da fase móvel sobre a fase estacionária. Nesta sucessão, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de modo que cada um dos componentes da mistura é seletivamente retido pela fase estacionária. A consequência disto é a migração diferencial destes componentes, resultando na separação dos componentes de uma mistura. (Collins, Branga & Bonato, 2006).

Para a separação e análise do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ - DOTATATO, utilizamos neste trabalho apenas dois tipos de técnicas cromatográficas. São elas: cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A CCD e a CLAE aqui utilizadas são tipos de cromatografias classificadas como líquido-líquido (fase móvel líquida e fase estacionária líquida), cujo mecanismo de separação é baseado na partição.

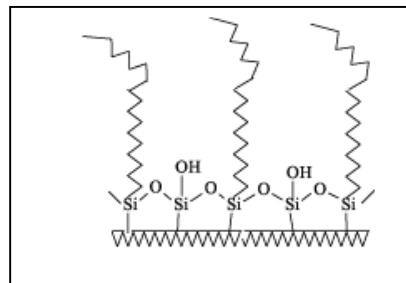
O processo de partição ou absorção é um processo físico, que separa os componentes da mistura pela solubilidade diferencial das substâncias da amostra entre a fase móvel e a fase estacionária. Trata-se de uma competição entre a natureza química (polaridade) das substâncias que constituem a amostra em relação a sua solubilidade diferencial nas fases estacionária/móvel (ambas líquidas).

Quanto à fase estacionária, a cromatografia pode ser chamada de dois tipos: de fase normal e de fase reversa. Na “fase normal” teremos uma fase estacionária mais polar do que a fase móvel. Quanto à “fase reversa”, teremos uma fase estacionária menos polar do que a fase móvel. As figuras 15 e 16 ilustram as estruturas da sílica nas fases normal e reversa.



Fonte: Quím. Nova, v.28, n.3, 2005.

Figura 15 – Representação esquemática da sílica gel com os grupos silanol (Si-OH) e siloxano (Si-O-Si).



Fonte: Quím. Nova, v.27, n.2, 2004.

Figura 16 – Representação esquemática das cadeias orgânicas hidrofóbicas do tipo C₁₈, immobilizadas na superfície da sílica.

Observando a figura 15, podemos notar que a sílica possui inúmeras pontes de hidrogênio, o que faz com que as substâncias que apresentem grupos polares (que fazem interação por ponte de hidrogênio ou dipolo-dipolo) interajam fortemente com a sílica. Na figura 16, temos um exemplo de fase reversa, onde um grupo octadecil (-C₁₈H₃₇) está quimicamente ligado à sílica, que funciona como suporte da fase estacionária. Neste caso temos uma fase estacionária apolar, que interage com

grupos apolares das substâncias. A fase reversa é utilizada para separação de substâncias polares que exigiriam uma alta polaridade da fase móvel, caso se utilizasse a fase normal.

2.1 Determinação da pureza radioquímica do radiofármaco por cromatografia em camada delgada

2.1.1 Fundamentação teórica

De acordo com a “The United States Pharmacopeia” (USP 30, 2007) a pureza radioquímica de uma preparação radiofarmacêutica se refere à fração do radionuclídeo incorporado à forma química de interesse. Mais detalhadamente, de acordo com a European Pharmacopoeia, (COE, 2005), a pureza radioquímica é definida como uma razão percentual da radioatividade do radionuclídeo que está presente na forma química de interesse, em relação ao total de radioatividade do radionuclídeo presente na preparação radiofarmacêutica.

Como no uso cotidiano de pesquisa em radiofarmácia interessa a avaliação da pureza radioquímica do radiofármaco (e não da preparação radiofarmacêutica), chamaremos de pureza radioquímica a razão, expressa em porcentagem, da radioatividade do radionuclídeo incorporado ao radiofármaco, em relação à radioatividade total do radionuclídeo (ligado e não-ligado ao radiofármaco). Isto significa dizer que, no nosso caso, a pureza radioquímica expressa quanto da radioatividade é devida à ligação do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ ao DOTATATO. Por exemplo, uma pureza radioquímica de 95% significa que 95% do $^{177}\text{Lu}^{3+}$, encontra-se ligado ao DOTATATO.

Neste sentido, pela adaptação do conceito apresentado na farmacopéia, podemos dizer que a avaliação da pureza radioquímica do radiofármaco é uma medida direta do rendimento da reação de complexação, entendendo-se rendimento como a quantidade máxima de produto que pode ser obtida, de acordo com a estequiometria da reação, a partir de uma determinada quantidade de reagente (no nosso caso, apesar da estequiometria de complexação ser de 1:1, utilizamos, no

mínimo, a proporção de 1 mol de $^{177}\text{Lu}^{3+}$: 7 mols de DOTATATO, de acordo com o item 1.3.3). Assim, dizer que a pureza radioquímica do radiofármaco é de 95%, é também dizer que, neste caso, o rendimento da reação de complexação é de 95%.

Para determinar a pureza radioquímica do radiofármaco, ou o rendimento da reação de complexação, é preciso proceder primeiramente à separação e posterior quantificação do radionuclídeo ligado ao radiofármaco, em relação ao radionuclídeo não-ligado ao radiofármaco. Nesse sentido é que a pureza radioquímica ou rendimento da reação de complexação pode ser determinado, no caso do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO, por cromatografia em camada delgada, utilizando-se condições que permitam a separação adequada entre o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO e o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ livre, isto é, não-ligado ao radiofármaco.

2.1.2 Métodos

Avaliamos a pureza radioquímica do radiofármaco por cromatografia em Camada Delgada (CCD) em modo ascendente. Como fase estacionária utilizamos sílica gel “*Instant thin layer chromatography*” – ITLC-SG, não ativada e como fase móvel tampão citrato de sódio, 0,1 M, pH 5,0.

Para realizarmos a CCD utilizamos tiras de ITLC-SG de 15 cm x 1,5 cm. A linha de aplicação da amostra foi 1,5 cm de distância a partir da base da tira e o ponto final da cromatografia (linha de chegada da fase móvel) consideramos 10 cm a partir da linha de aplicação da amostra. Com auxílio de micropipeta aplicamos entre 0,5 - 0,7 μL , da amostra, no centro da linha de aplicação. Em seguida, colocamos essa tira em uma cuba de vidro contendo a fase móvel em um volume abaixo da linha de aplicação da amostra, realizando uma cromatografia ascendente. Por capilaridade a fase móvel percorre a fase estacionária e ao atingir o ponto final da cromatografia (10 cm), retiramos imediatamente a tira da cuba de vidro, levando à estufa de secagem à 45 °C por 10 minutos.

Após a secagem, envolvemos a tira com fita crepe e dividimo-la em frações de 1 cm, considerando como primeira fração, 0,5 cm abaixo e 0,5 cm acima do ponto de aplicação. Assim, sucessivamente, dividimos a tira em 10 frações de 1 cm.

Colocamos estas frações de 1 cm em tubos de polietileno. Estas frações foram lidas em um detetor de radiação gama (NaI). A atividade contida em cada fração foi então registrada em contagem por minuto (cpm). Expressamos as contagens contidas em cada fração como percentual em relação ao total de contagens (n=4).

Para descartarmos a possível interferência do $^{177}\text{Lu}(\text{OH})_3$ na determinação da pureza radioquímica do radiofármaco por CCD, simulamos as condições experimentais de síntese do radiofármaco (item 1.2.2), sem adição de DOTATATO, em pH 4,5, 7,0 e 8,5. Em tubos do tipo eppendorfs de 1,5 mL adicionamos 200 μL de tampão pH 4,5, 7,0 ou 8,5, e, a seguir 18,5 MBq de $^{177}\text{Lu}^{3+}$ em solução de HCl 0,1 M (ORNL/EUA) e agitamos em vortex. Em seguida, avaliamos o pH do meio com papel indicador universal, confirmando que não houve alteração de pH da solução. Procedemos, então, à cromatografia em camada delgada conforme descrito acima.

2.1.3 Resultados & Discussão

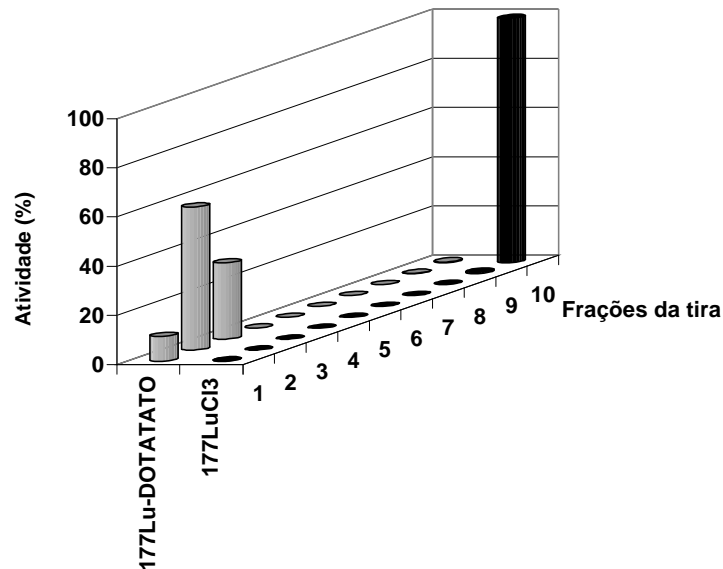


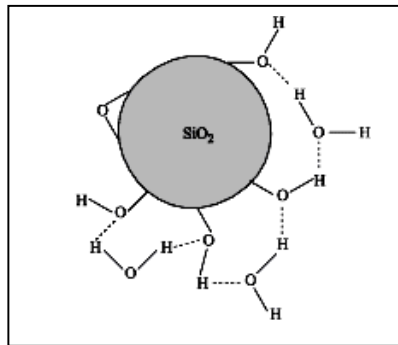
Figura 17 – Perfil de CCD em ITLC-SG, do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ e do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ - DOTATATO, utilizando-se como fase móvel tampão citrato de sódio 0,1 M pH 5,5. Cada fração expressa o percentual de contagens em relação ao total de contagens da tira.

Os perfis cromatográficos apresentados na figura 17, mostram que a CCD em ITLC-SG utilizando-se como fase móvel tampão citrato de sódio 0,1 M pH 5,0 é um método eficiente e seguro para a separação do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ livre. Deste modo a utilização deste sistema cromatográfico permite a determinação da pureza radioquímica do radiofármaco por meio da quantificação da radioatividade do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ ligado e não-ligado ao DOTATATO.

Como a determinação da pureza radioquímica está diretamente relacionada à separação do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ ligado e não-ligado ao DOTATATO, vale a pena discutir aqui o mecanismo de separação cromatográfica obtida por CCD.

Trata-se em primeiro lugar de reconhecer a CCD utilizada como um tipo de cromatografia líquido-líquido, uma vez que as tiras de ITLC-SG não foram ativadas e

que se utiliza um meio aquoso (saturado de vapor de água) como fase móvel. Portanto, não se deve considerar uma interação das substâncias a serem separadas com a sílica (adsorção), mas uma interação com a água adsorvida pela sílica (partição). A figura 18 ilustra a interação da sílica em presença de água. Notar as interações tipo ponte de hidrogênio entre os grupos silanóis e moléculas de água (representadas em pontilhado).

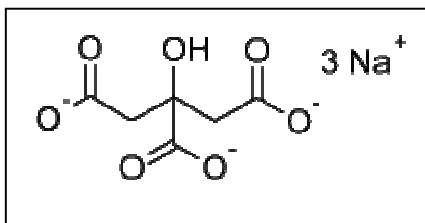


Fonte: Quím. Nova, v.28, n.3, 2005.

Figura 18 – Representação esquemática da sílica gel antes da ativação ou na presença de fase móvel aquosa.

A partir da CCD utilizada, vista como sistema líquido-líquido, podemos entender a separação entre o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO e o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ livre considerando-se a interação de pontes de hidrogênio presentes no DOTATATO, com a água adsorvida pela sílica. Lembramos que o octreotato apresenta pontes de hidrogênio nas ligações peptídicas, nos aminoácidos treonina e tirosina que possuem um grupo $-\text{OH}$ e no aminoácido lisina que apresenta um grupo $-\text{NH}_2$ terminal. São estas pontes de hidrogênio presentes no DOTATATO que explicam a interação do radiofármaco nas primeiras frações da tira de ITLC-SG, como mostra a figura 17.

Mais importante ainda, no mecanismo de separação da CCD utilizada é a presença do tampão citrato de sódio cuja utilização como fase móvel se explica por uma ação química de complexação do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ livre. É devido a esta capacidade do citrato em complexar o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ livre que esta fração é encontrada junto à linha de chegada da fase móvel. Este poder de complexação do citrato, semelhante ao DOTA, pode ser observado a partir da sua fórmula estrutural apresentada na figura 19.



Fonte: http://pt.wikipedia.org/wiki/Citrato_de_sodio

Figura 19 – Fórmula estrutural do citrato de sódio. Dado os valores de pKa do ácido cítrico $pK_{a1} = 3,13$, $pK_{a2} = 4,76$, $pK_{a3} = 6,40$.

Pelos valores de pKa do ácido cítrico podemos notar que duas das carboxilas do citrato estão totalmente desprotonadas em pH 5,0, o que garante disponibilidade eletrônica para a complexação com o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ não-ligado ao DOTATATO.

Portanto o mecanismo de separação da CCD utilizada é tanto um processo físico que retém o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO, por intermédio das interações tipo ponte de hidrogênio, nas frações iniciais, quanto um processo químico pela ação da fase móvel utilizada que age na complexação do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ livre, explicando sua localização na extremidade distal da tira. A metodologia aplicada é satisfatória na separação entre $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO e o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ livre, o que garante a determinação da pureza radioquímica do radiofármaco.

Para descartarmos a possível interferência do $^{177}\text{Lu}(\text{OH})_3$ na determinação da pureza radioquímica do radiofármaco por CCD, mostramos os perfis cromatográficos na figura 20, dos dados experimentais que simulam as condições de síntese do radiofármaco, sem adição de DOTATATO, em pH 4,5, 7,0 ou 8,5.

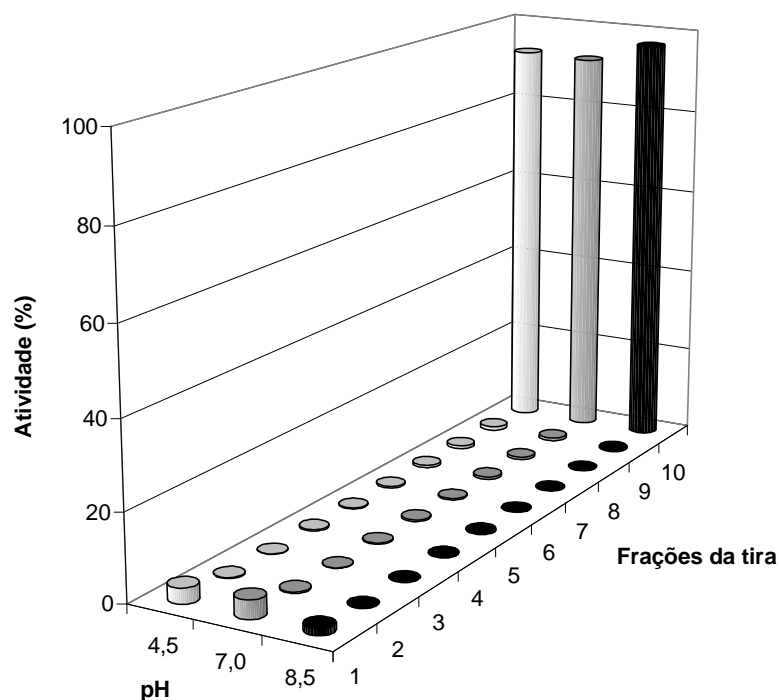


Figura 20 – Perfil de CCD em ITLC-SG, do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ em pH 4,5, 7,0 e 8,5, utilizando-se como fase móvel tampão citrato de sódio 0,1 M pH 5,5. Cada fração expressa o percentual de contagens em relação ao total de contagens da tira.

Os perfis cromatográficos apresentados na figura 20, mostram que em pH 4,5, 7,0 e 8,5, não há alteração do padrão de corrida do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ (Fig. 17). Pela observação destes perfis, podemos descartar a possibilidade de interferência do $^{177}\text{Lu}(\text{OH})_3$ na determinação na pureza radioquímica do radiofármaco.

2.2 Purificação do radiofármaco por cromatografia em coluna Sep-Pak C₁₈

De acordo com o perfil cromatográfico do radiofármaco em CCD (Fig. 17), o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO, interage fortemente com a sílica, o que torna sua eluição em uma coluna de sílica bastante difícil, mesmo com a utilização de solventes muito polares. Isso significa que não é possível o desenvolvimento de um sistema de purificação do radiofármaco utilizando-se a sílica como fase estacionária.

Portanto foi necessário, primeiramente conhecer o perfil cromatográfico do radiofármaco em fase reversa, para posteriormente aplicarmos um método adequado para sua purificação. Em geral a coluna utilizada para purificação de radiofármacos contendo peptídeos é a Sep-Pak em fase reversa tipo C₁₈. Sendo assim, realizamos preliminarmente um estudo do perfil de eluição do radiofármaco por CLAE em coluna C₁₈.

2.2.1 Métodos

Para a determinação do perfil cromatográfico do radiofármaco por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizamos uma coluna de fase reversa C₁₈, 4,6 x 250 mm, 5 µm de porosidade (Waters). Nesta coluna injetamos 20 µL do radiofármaco com atividade variando entre 0,37 e 0,74 MBq (10 e 20 µCi) .

Eluimos a coluna com gradiente de metanol : tampão acetato de sódio 0,06 M pH 5,5, com fluxo de 0,5 mL/min. (Kwekkboom *et al.*, 2001). Iniciamos a eluição com a mistura de solventes contendo 40% de metanol e 60% de tampão acetato de sódio. A cada 2 minutos o percentual de metanol era aumentado em 4%, chegando-se, aos 20 minutos de corrida, à proporção de 80% de metanol e 20% de tampão acetato de sódio, que foi mantida até o final da corrida.

Como sistema de detecção das substâncias radioativas presentes na amostra, utilizamos um contador “radiomatic beta flow”, acoplado ao integrador do cromatógrafo, com os seguintes parâmetros: tempo de corrida de 45 minutos; janela de detecção de 90 – 250 keV.

Para a purificação do radiofármaco utilizamos coluna Sep-Pak de fase reversa C₁₈ (Waters). O pré-tratamento para acondicionar a coluna foi: - lavagem com 5 mL de etanol 70%, lavagem com 5 mL de propanol e – lavagem com 5 mL de água Milli-Q. Em seguida aplicamos na coluna 100 µL da mistura do meio de reação contendo o radiofármaco. Para o procedimento de eluição utilizamos sucessivamente: 2,5 mL de água Milli-Q (chamado de fração água - 1), 2,5 mL de água Milli-Q (fração água - 2), 2,5 mL de etanol 98% (fração etanol - 1) e 2,5 mL de etanol 98% (fração etanol - 2). Determinamos a atividade da coluna Sep-Pak, bem como cada uma das frações em curiômetro. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao total de atividade, para cada fração.

Para avaliarmos a eficiência do método de purificação, cromatografamos a fração “água - 1” e a fração “etanol - 1” em CCD, de acordo com o método descrito no item 2.1.2.

2.2.2 Resultados & Discussão

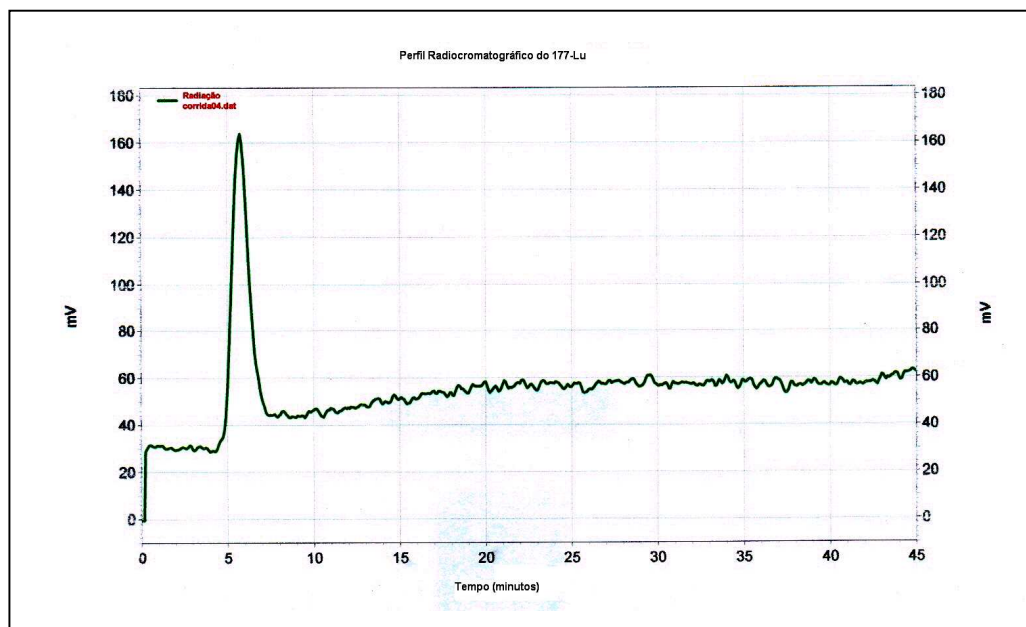


Figura 21 – Perfil em CLAE do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ em coluna de fase reversa C_{18} .

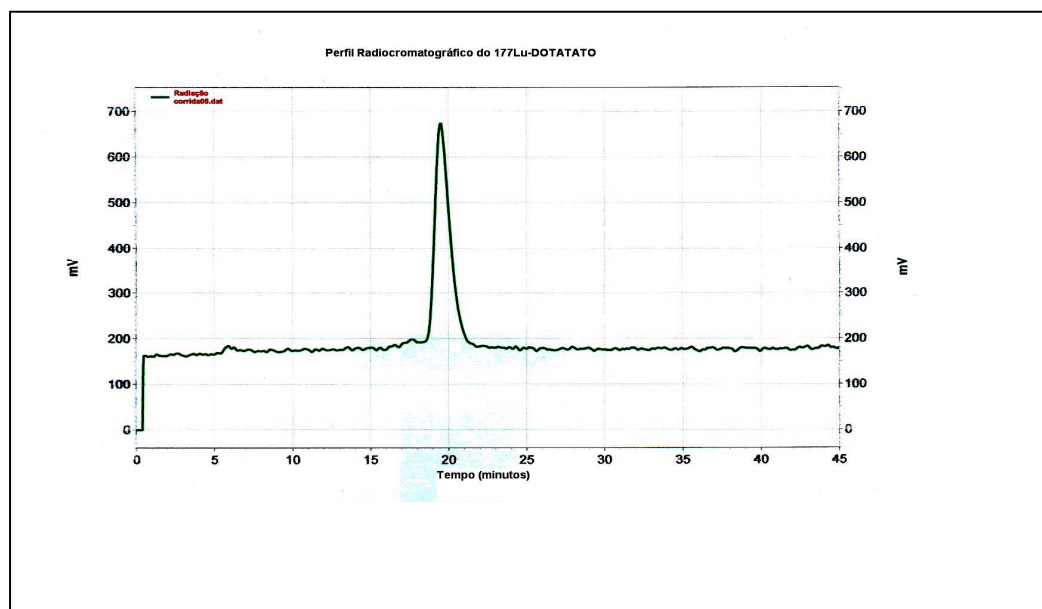


Figura 22 – Perfil em CLAE do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO em coluna de fase reversa C_{18} .

Pelos dois perfis cromatográficos apresentados nas figuras 21 e 22, podemos observar que o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ é caracterizado como um pico logo no início da cromatografia (Fig. 21) e o radiofármaco aparece somente após cerca de 20 minutos do início da cromatografia (Fig. 22). Observamos, portanto, que há uma inversão do perfil cromatográfico, em relação ao obtido por CCD em ITLC-SG (Fig. 17). Esta inversão do perfil pode ser explicada pela mudança da fase estacionária de sílica, para fase reversa. Neste caso, o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ livre elui primeiro sendo o tempo de retenção do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO mais de 3 vezes maior do que o tempo de retenção do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ livre.

Novamente aqui, a análise das interações do radiofármaco com a fase estacionária é o que explica o maior tempo de retenção do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO. O peptídeo octreotato apresenta, dentre seus aminoácidos, a fenilalanina e o triptofano, dois aminoácidos que possuem grupos apolares que realizam interações hidrofóbicas com o grupo octadecil que constitui a fase reversa C_{18} . É devido a estas interações hidrofóbicas, que não são possíveis entre a fase estacionária C_{18} e o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ livre, que se explica o maior tempo de retenção do radiofármaco.

Este fato é confirmado pela eluição do radiofármaco apenas com a diminuição da polaridade da fase móvel via aumento da proporção de metanol (no início de 40% *versus* 80% aos 20 minutos), o que “força” a eluição do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO.

Assim, os dois perfis cromatográficos apresentados nas figuras 21 e 22, são orientadores do tipo de fase móvel a ser utilizada em colunas Sep-Pak C_{18} para a purificação do radiofármaco. Isso quer dizer que devemos utilizar uma fase móvel tão polar quanto a água para eluir o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ livre, e diminuir a polaridade da fase móvel quando quisermos eluir o radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO.

Neste sentido, o sistema de fase móvel utilizado em coluna Sep-Pak C_{18} para a purificação do radiofármaco, foi: 1) duas vezes 2,5 mL de água, para eluir o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ livre; 2) duas vezes 2,5 mL de etanol 98% para eluir o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO. A avaliação da purificação pelo método acima está na tabela 10 que mostra a porcentagem da atividade, em cada fração eluída e também a atividade residual na coluna Sep-Pak, em relação ao total das atividades.

Tabela 10 – Purificação do radiofármaco em coluna Sep-Pak C₁₈. Distribuição das atividades expressas como percentual da atividade de cada fração em relação ao total da atividade.

| <i>Frações</i> | <i>% de atividade / Total (n=4)</i> |
|-------------------------|-------------------------------------|
| Água – 1 | 2,5 ± 1,3 |
| Água – 2 | 0,5 ± 0,10 |
| Etanol – 1 | 87,2 ± 10,8 |
| Etanol – 2 | 7,0 ± 6,0 |
| Sep-Pak C ₁₈ | 6,3 ± 5,1 |

Como previsto, o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ livre é eluído com a passagem de água pela coluna Sep-Pak C₁₈ concentrando-se na fração “água – 1”. Já o radiofármaco é eluído apenas com a passagem de um solvente menos polar, concentrando-se na fração “etanol – 1”. Pelos dados da tabela 10 podemos verificar que o volume de 5 mL é suficiente para eluir quantitativamente cada um dos componentes da mistura ($^{177}\text{Lu}^{3+}$ livre e $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO), restando uma pequena fração não eluída na coluna.

A distribuição dos componentes da mistura, $^{177}\text{Lu}^{3+}$ livre e $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO, entre as frações aquosa e alcoólica, respectivamente, foi confirmada pela realização de CCD das frações “água - 1” e “etanol - 1”. De fato, a CCD da fração “água – 1” revelou que sua composição é de 99% de $^{177}\text{Lu}^{3+}$ livre.

Para avaliarmos a eficiência do método de purificação, cromatografamos em CCD a fração “etanol – 1” de 4 experimentos independentes. A tabela 11 compara a pureza radioquímica antes do processo de purificação, com a pureza radioquímica da fração purificada (etanol – 1).

Tabela 11 – Comparação das purezas radioquímicas antes e após (fração “etanol – 1”) a realização do procedimento de purificação em colunas Sep-Pak C₁₈.

| <i>Experimento</i> | <i>Pureza Radioquímica (%) antes da purificação</i> | <i>Pureza Radioquímica (%) após a purificação</i> |
|--------------------|---|---|
| 1 | 94,9 | 99,9 |
| 2 | 74,9 | 99,9 |
| 3 | 95,8 | 98,7 |
| 4 | 90,5 | 99,7 |

O procedimento de purificação garante, para todos os experimentos realizados, uma pureza radioquímica do radiofármaco de, pelo menos, 99%, independente do valor de pureza radioquímica antes do processo de purificação. Visto que tanto purezas radioquímicas iniciais de 74,9% quanto de 95,8%, após o procedimento de purificação, vão resultar em radiofármacos com 99% de pureza radioquímica. Com estes dados podemos verificar que o processo de purificação proposto é eficiente.

Apesar da demonstração da eficiência do processo de purificação desenvolvida neste item, pela discussão do capítulo anterior, podemos perceber que o processo de síntese já fornece o radiofármaco com alta pureza radioquímica, efetivamente quando se trabalha com altas razões molares $^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO. Por altas razões molares, estamos considerando uma proporção molar $^{177}\text{Lu}^{3+}$: DOTATATO de 1:7 para o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ ORNL/EUA e de 1:32 para o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ NRG/Holanda (vide item 1.4).

Se por medida de segurança adotamos, para o processo de síntese, uma razão molar de 1:7 para o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ ORNL/EUA e de 1:32 para o $^{177}\text{Lu}^{3+}$ NRG/Holanda, cabe agora assinalar que o radiofármaco daí obtido apresentará uma baixa atividade específica em função do excesso de DOTATATO utilizado (duas vezes a razão molar-limite). Isso significa dizer que, considerando a atividade específica do radiofármaco expressa em unidades de atividade/massa de DOTATATO, podemos obter um radiofármaco com a máxima atividade específica, trabalhando à razão molar-limite (o que resultaria na produção do radiofármaco sem excesso de

DOTATATO).

Do capítulo anterior verificamos que, trabalhando à razão molar-limite, não obtínhamos uma pureza radioquímica de 99%. Entretanto, com a discussão do procedimento de purificação, podemos evidenciar que é possível obter purezas radioquímicas de 99% partindo de purezas radioquímicas tão baixas quanto 75%.

Dado que a obtenção do radiofármaco com alta atividade específica minimiza a competição entre o radiofármaco e o DOTATATO sem o $^{177}\text{Lu}^{3+}$, pelo receptor, então, talvez fosse clinicamente importante o desenvolvimento do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO com alta atividade específica.

Neste caso, se fosse demonstrada a relevância clínica do radiofármaco com alta atividade específica, deveríamos utilizar a razão molar-limite para a síntese do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO, submetendo-o, a seguir, ao procedimento de purificação em coluna Sep-Pak. Teríamos assim, conjuntamente, garantidas tanto a máxima atividade específica, quanto alta pureza radioquímica (99%) do radiofármaco.

Estudos em animais, com ^{111}In acoplado a análogos da somatostatina como pentetrotideo e octreotideo sugerem que a sensibilidade de detecção de tumores que expressam receptores para somatostatina é dependente da massa de peptídeo injetada e independente da atividade específica do radiofármaco (Breeman *et al.*, 1995, de Jong *et al.*, 1999). Outro estudo, em humanos, com ^{111}In acoplado ao octreotideo sugere que atividade específica maior que 220 MBq por 5 μg , diminui a qualidade da imagem diagnóstica e reduz a captação do radiofármaco no tumor (Kooij *et al.*, 1994).

Embora estes estudos apontem para o uso de radiofármacos com baixa atividade específica, os experimentos realizados pelos autores acima carecem de precisão quanto à padronização do que se entende por baixa atividade específica. Estes artigos não equacionam as proporções molares utilizadas, dado este que permite estabelecer uma referência mais precisa do que se entende por atividade específica “alta” ou “baixa” do radiofármaco.

Por este motivo, sugerimos que a questão da relevância diagnóstica e terapêutica do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO com alta atividade específica deva ser melhor investigada, partindo do método de síntese do radiofármaco com alta atividade específica que desenvolvemos acima.

2.3 Avaliação da estabilidade do radiofármaco na preparação radiofarmacêutica por cromatografia em camada delgada

Chamaremos de avaliação da estabilidade do radiofármaco ao estudo da pureza radioquímica do radiofármaco na preparação radiofarmacêutica, em um período de 48 horas. Com isso queremos assinalar que, diferente dos demais itens, os estudos aqui conduzidos simulam as condições de envio da preparação radiofarmacêutica aos Centros de Medicina Nuclear: atividade entre 2775 e 5180 MBq (75 e 140 mCi) em 5 mL de solução fisiológica, acondicionados em frasco-ampola de vidro e mantido sob congelamento com gelo seco.

2.3.1 Métodos

A estabilidade do radiofármaco na preparação radiofarmacêutica, foi avaliada segundo o procedimento de cromatografia em camada delgada descrito no item 2.1.2. Para tanto, cromatografamos amostras retiradas imediatamente e nos tempos subseqüentes até 48 horas, sendo a preparação radiofarmacêutica conservada sob congelamento em gelo seco. Utilizamos o ácido gentísico (0,6 mg/mL) como estabilizante da preparação radiofarmacêutica.

2.3.2 Resultados & Discussão

Tabela 12 – Dados de pureza radioquímica do radiofármaco na preparação radiofarmacêutica durante 48 horas, considerando as atividades de 2775 e 5180 MBq (75 e 140 mCi) (n=4).

| Tempo | <i>Pureza Radioquímica (%)</i> | |
|--------------|--------------------------------|-----------------|
| | 2775 MBq | 5189 MBq |
| Imediato | 98,74 ± 0,01 | 98,3 ± 0,36 |
| 3 horas | - | 97,55 ± 0,31 |
| 6 horas | 98,05 ± 0,17 | 96,68 ± 0,34 |
| 9 horas | 98,23 ± 0,04 | 96,2 ± 0,18 |
| 24 horas | 97,86 ± 0,02 | 94,3 ± 1,0 |
| 48 horas | 94,7 ± 1,7 | 92,3 ± 0,4 |

Considerando-se como limite aceitável de pureza radioquímica 95%, para a atividade de 2775 MBq, há estabilidade do radiofármaco na preparação radiofarmacêutica até 24 horas. Para a atividade de 5180 MBq, já em 24 horas, a pureza radioquímica do radiofármaco na preparação radiofarmacêutica é < 95%, o que significa dizer que a preparação deve ser usada em menos de 24 horas.

Caso se pretenda estipular a data de validade da preparação radiofarmacêutica em 24 horas, deve-se levar em consideração uma atividade máxima em torno de 2775 MBq em cada preparação radiofarmacêutica. Assim, os dados sugerem que atividades tão altas quanto 5180 MBq sejam fracionadas pela metade para o envio aos centros de Medicina Nuclear.

2.4 Conclusões

De acordo com os dados apresentados e discutidos neste capítulo, podemos concluir que:

1. O procedimento de cromatografia em camada delgada em ITLC-SG, usando como fase móvel tampão citrato de sódio 0,1 M pH 5,0 é eficiente para a determinação da pureza radioquímica do radiofármaco.
2. O procedimento de cromatografia em coluna Sep-Pak C₁₈ eluída com 5 mL de água Milli-Q e 5 mL de etanol 98% é eficiente para a purificação do radiofármaco, permitindo atingir pureza radioquímica da ordem de 99%.
3. Para a obtenção do ¹⁷⁷Lu³⁺-DOTATATO com máxima atividade específica e alta pureza radioquímica (99%), a síntese do radiofármaco deve ser realizada à razão molar-limite com posterior purificação em coluna Sep-Pak C₁₈.
4. A estabilidade do radiofármaco ¹⁷⁷Lu³⁺-DOTATATO na preparação radiofarmacêutica é de 24 horas, sob as seguintes condições: 1) atividade de 2775 MBq; 2) adição de 0,6 mg/mL de ácido gentísico; 3) congelamento em gelo seco até sua utilização.
5. Atividades maiores que 2775 MBq devem ser fracionadas para que se garanta a estabilidade do radiofármaco na preparação radiofarmacêutica.

2.5 Referências Bibliográficas

BREEMAN, W. A. P.; KWEKKEBOOM, D. J.; KOOIJ, P. P. M.; BAKKER, W. H.; HOFLAND, L. J.; VISSER, T. J.; ENSING, G. J.; LAMBERTS, S. W. J.; KRENNING, E. P. Effect of Dose and Specific Activity on Tissue Distribution of Indium-111-Pentetreotide in Rats. *The Journal of Nuclear Medicine*, v. 36, n. 4, p. 623 – 627, 1995.

COE - Council of Europe – EDQM - European Directorate for the Quality of Medicines ***European Pharmacopoeia 5th Edition - Supplement 5.5.*** 2004. (European Treaty Series no. 50)

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Fundamentos de cromatografia. Campina, SP. Ed. Unicamp, 2006.

de JONG, M.; BREEMAN, W.A.P.; BERNARD, B.F.; VAN GAMEREN, A.; DE BRUIN, E.; BAKKER, W.H.; VAN DER PLUIJM, M.E.; VISSER, T.J.; MACKE, H.R.; KRENNING, E.P. Tumour uptake of the radiolabelled somatostatin analogue [DOTA⁰-TYR³] octreotide is dependent of the peptide amount. . *European Journal of Nuclear Medicine*, v. 26, p. 693 – 698, 1999.

KOOIJ, P.P.M.; KWEKKEBOOM, D.J.; BREEMAN, W.A.P.; REIJS, A.E.M.; BAKKER, W.H.; LAMBERTS, S.W.J.; VISSER, T.J.; KRENNING, E.P. The effects of specific activity on tissue distribution of [In-11-DTPA-D-Phe1] octreotide in humans. *Journal of Nuclear Medicine*, v.35, issue 5, p. P226-P226, suppl.S, 1994.

KWEKKEBOOM, D.J.; BAKKER, W.H.; KOOIJ, P.P.M.; KONIJNENBERGM.W.; SRINIVASAN, A.; ERION, J.K.; SCHIMIDT, M.A.; BUGAJ, J.L.; JONG, M.; KRENNING, E.P. ¹⁷⁷Lu[DOTA, Tyr³]octreotate: comparison with [¹¹¹In-DTPA⁰]octreotide in patients. *European Journal of Nuclear Medicine*, v. 28, n. 9, p. 1319 – 1325, 2001.

PRADO, A.G.S.; FARIA, E.A.; PADILHA, P.M. Aplicação e modificação química da sílica gel obtida de areia. *Química Nova*, v. 28, n. 3, p. 544 – 547, 2005.

SILVA, C.R.; JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, C.H.; AIROLDI, C. Novas fases estacionárias à base de sílica para cromatografia de alta eficiência. *Química Nova*, v. 27, n. 2, p. 270 – 276, 2004.

USP 30 – NF 25, The United States Pharmacopeia, 2007.

CAPÍTULO III

BIODISTRIBUIÇÃO DO RADIOFÁRMACO $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO EM MODELO ANIMAL

3.0 Introdução

Após discutirmos a racionalização do processo de síntese, bem como as técnicas de análise físico-química na determinação da pureza radioquímica e na avaliação da estabilidade do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO, iremos, neste capítulo, abordar alguns aspectos da sua biodistribuição em modelo animal.

Isso significa dizer que, enquanto os dois primeiros capítulos versaram sobre as técnicas de síntese e análise do radiofármaco (que podem ser agrupadas no âmbito do que se entende por farmacotécnica), este capítulo pretende, a partir dos dados de biodistribuição aqui encontrados, sugerir algumas diretrizes que possam orientar a utilização do radiofármaco, ou, pelo menos, sugerir que tipos de estudos e avaliações devam ser implementadas para sua correta utilização clínica.

Esta dimensão da correta utilização clínica do radiofármaco é importante ser considerada pela pesquisa em radiofarmácia uma vez que disso depende a racionalização da terapêutica, com gerenciamento de possível toxicidade dos radiofármacos produzidos.

Deste modo, a pesquisa em radiofarmácia poderia ampliar sua dimensão para além da pesquisa em farmacotécnica, dedicando-se também a fomentar pesquisas na pós-produção do radiofármaco que podem auxiliar seu uso racional. Dentre este domínio de saberes que podem ser úteis ao gerenciamento do bom uso clínico do radiofármaco, destacam-se os estudos de biodistribuição que podem orientar estudos mais aprofundados de farmacocinética e dosimetria, considerando não só o modelo animal, mas, também em humanos.

Este capítulo, partindo do estudo de biodistribuição em modelo animal, tem como principal objetivo fornecer subsídios para o planejamento de estudos futuros em farmacocinética e dosimetria que deverão ser conduzidos para racionalizar a correta utilização do radiofármaco.

3.1 Métodos

Para os estudos de biodistribuição do radioisótopo ^{177}Lu e do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO, foram utilizados camundongos *Swiss* adultos pesando 30 ± 5 gramas. Para os estudos de biodistribuição do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO, em modelo tumoral, foram utilizados camundongos *Nude* pesando 20 ± 5 gramas.

3.1.1 Desenvolvimento do modelo tumoral em camundongos *Nude*

Um modelo tumoral em camundongos imunodeprimidos *Nude*, foi desenvolvido, utilizando-se células de câncer pancreático de rato – AR42J, adquiridas do “American Type Culture Collection” (ATCC). Estas células foram cultivadas em frascos de 75 cm^2 contendo meio F12-K (Gibco®) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Cultilab®) à temperatura de $37\text{ }^\circ\text{C}$ e atmosfera controlada de 5% de CO_2 . Após três dias de cultivo, as células eram tripsinizadas, contadas e utilizadas ou congeladas em tubos criogênicos contendo meio F12-K (Gibco®) acrescido de 10% soro fetal bovino (Cultilab®) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO).

As células AR42J (1×10^6 células) foram implantadas no dorso ou na pata direita dos camundongos, por inoculação intradérmica. Após a inoculação das células tumorais, estes animais permaneceram no biotério com comida e água *ad libitum*. Os experimentos com estes animais foram realizados entre 2 e 4 semanas após a inoculação.

3.1.2 Estudos de biodistribuição

Nos estudos invasivos os camundongos foram separados em grupos de 4 (*Nude*) e 5 (*Swiss*) para cada tempo do experimento. Foram pesados e injetamos por via intravenosa (veia caudal) uma atividade de 1,11 MBq (30 μCi) em 50 μL , do radiofármaco ou do radioisótopo.

Após a administração, em tempos pré-determinados, foi retirado, com capilar de vidro pré-heparinizado, uma amostra de sangue de aproximadamente 100 μL pelo

plexo orbital e, imediatamente após, o animal foi sacrificado para a retirada dos seguintes órgãos: cérebro, pulmão, coração, baço, fígado, estômago, intestinos, músculo, pâncreas, adrenais, osso e tumor. A cauda do animal também foi retirada para desconto da radioatividade residual, resultante da administração pela veia caudal.

Após a dissecação, os órgãos/tecidos, foram lavados, o excesso de água foi retirado com papel absorvente e foram pesados separadamente cada um.

Os órgãos ou tecidos foram colocados em tubos de polietileno para a medida da atividade, em contagens por minuto (cpm), em contador de radiação gama (NaI).

A porcentagem da atividade contida em cada órgão/tecido foi determinada em relação às contagens de um padrão contendo 1,11 MBq (30 μ Ci), referente à atividade inicialmente administrada.

Foi realizado também, um estudo não-invasivo da biodistribuição do radiofármaco, por imagens cintilográficas, em camundongos *Nude* com tumor. Estas imagens foram obtidas em câmara-gama, do Centro de Medicina Nuclear do Hospital das Clínicas (FM-USP), da marca Siemens, analógica, com campo de visão circular pequeno, com analisador multicanal, de espectro entre 15 keV e 510 keV, com colimadores para baixa energia de até 200 keV para imagens em projeção planar.

Acoplada à câmara-gama utilizou-se um computador para aquisição de imagens da marca IBM/PC Intel Pentium 133, com sistema operacional Windows 98, software de aquisição de imagens PIP, placa de aquisição de dados IMAGAMMA e equipado com software IMAGE para processamento de imagens.

Para este estudo foi injetado, no animal anestesiado, uma atividade do radiofármaco de 37 MBq (1 mCi) em 0,1 mL de solução fisiológica. Realizou-se então um estudo dinâmico de obtenção de imagens durante 24 minutos, com formação de imagem a cada 3 minutos.

3.1.3 Cálculos do percentual de atividade biodistribuída

3.1.3.1 Determinação da porcentagem de atividade no órgão

Para o cálculo dos valores percentuais de atividade no órgão (% atividade no

órgão), usamos a seguinte equação:

$$\% \text{ de atividade no órgão} = \frac{\text{atividade no órgão (cpm)}}{PL(\text{cpm})} \times 100 \quad (9)$$

onde PL é o padrão líquido obtido pela contagem em cpm da atividade injetada de 1.11 MBq (30 μ Ci), subtraindo-se as contagens residuais em cpm da cauda do animal. $PL = cpm\bar{P} - cpm\text{cauda}$ (\bar{P} = média de três amostras).

3.1.3.2 Determinação da porcentagem de atividade no sangue, músculo e osso

No caso particular do sangue, músculo e osso, para os quais medimos a atividade em uma amostra, determinamos a atividade total no tecido aplicando as seguintes convenções: volemia = 7% do peso do animal; músculo total = 40% do peso do animal; osso total = 12% do peso do animal.

Assim,

$$\text{Atividade no Sangue Total (cpm)} = \text{cpm de sangue por mL} \times \text{volemia} \quad (10)$$

$$\text{Atividade no Músculo Total (cpm)} = \frac{\text{cpm da amostra de músculo} \times \text{Músculo Total (g)}}{\text{massa da amostra de músculo (g)}} \quad (11)$$

$$\text{Atividade no Osso Total (cpm)} = \frac{\text{cpm da amostra de osso} \times \text{Osso Total (g)}}{\text{massa da amostra de osso (g)}} \quad (12)$$

Então, os valores das atividades no sangue, no músculo e no osso foram utilizados para o cálculo das porcentagens de atividade nestes tecidos de acordo com a equação (9) do item 3.1.3.1.

3.1.3.3 Determinação da porcentagem de atividade por grama de tecido

Para o cálculo dos valores percentuais de atividade por grama de tecido (% atividade/g) foi utilizada a seguinte equação:

$$\% \text{ atividade} / g = \frac{\% \text{ atividade no \acute{o}rg\~{a}o (cpm)}}{\text{massa do \acute{o}rg\~{a}o (g)}} \quad (13)$$

No caso particular do sangue, a porcentagem de atividade deve ser expressa por mL de sangue, assim:

$$\% \text{ atividade} / \text{mL} = \frac{\% \text{ atividade no sangue (cpm)}}{\text{volume da amostra retirada (mL)}} \quad (14)$$

3.2 Resultados & Discussão

3.2.1 Modelo tumoral em camundongos *Nude*

Os animais inoculados com as células AR42J (1×10^6) ficaram sob observação durante o período de crescimento do tumor. Na primeira semana após a inoculação já foi possível observar uma pequena massa em formação. Entre o décimo e o décimo quinto dia após inoculação, a massa tumoral atingiu valores entre 1,0 e 1,5 cm^3 .

Embora o tumor tenha crescido em todos os animais, foram observadas grandes variações na massa dos tumores. Os tumores apresentaram uma massa média de 0,6 gramas, porém com um desvio de mais de 100%.

As variações encontradas em relação às massas tumorais foram provavelmente devidas, em primeiro lugar, à capacidade invasiva das células AR42J. Em alguns casos, o tumor alastrou-se para tecidos adjacentes como pele, músculo e osso, sendo a massa tumoral retirada junto com fragmentos destes tecidos, o que levou a uma dispersão nos dados de massa dos tumores.

Em segundo lugar, observou-se um estágio de necrose em alguns tumores no dia da dissecação, o que também levou a uma discrepância entre a massa tumoral e a massa tumoral fisiologicamente funcional.

3.2.2 Estudos de biodistribuição

Utilizando modelos animais, estudamos a biodistribuição do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO em camundongos *Swiss*, e em camundongos *Nude* usados como modelo tumoral. Também estudamos a biodistribuição do radioisótopo $^{177}\text{Lu}^{3+}$ em camundongos *Swiss*.

Nas tabelas a seguir apresentaremos os valores de atividade percentual média e os respectivos desvios-padrão, encontrados para cada órgão (ou tecido), em tempos específicos após a administração intravenosa do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO ou do

^{177}Lu . Os gráficos referentes a cada tabela ilustram alguns perfis de interesse, da biodistribuição no órgão(tecido)/tempo, que discutiremos a seguir.

Tabela 13 – Dados de biodistribuição do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO apresentados como a média da porcentagem de atividade por órgão ou tecido \pm desvio padrão. Tempos 0,25; 0,5; 1; 2 e 4 horas após a administração intravenosa. Camundongos *Swiss*, n=5.

| ÓRGÃOS | Tempo (horas) | | | | |
|---------------------|-----------------|-----------------|------------------|-------------------|------------------|
| | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4 |
| Cérebro | 0,06 \pm 0,01 | 0,03 \pm 0,01 | 0,02 \pm 0,001 | 0,01 \pm 0,0001 | 0,02 \pm 0,001 |
| Pulmão | 1,49 \pm 0,33 | 1,21 \pm 0,29 | 1,00 \pm 0,12 | 0,81 \pm 0,21 | 0,50 \pm 0,05 |
| Coração | 0,17 \pm 0,04 | 0,07 \pm 0,03 | 0,04 \pm 0,01 | 0,02 \pm 0,001 | 0,01 \pm 0,001 |
| Baço | 0,09 \pm 0,01 | 0,08 \pm 0,03 | 0,05 \pm 0,01 | 0,04 \pm 0,04 | 0,03 \pm 0,01 |
| Fígado | 1,20 \pm 0,23 | 0,78 \pm 0,15 | 0,48 \pm 0,07 | 0,36 \pm 0,08 | 0,37 \pm 0,05 |
| Estômago | 2,26 \pm 0,50 | 2,22 \pm 0,44 | 2,37 \pm 0,36 | 1,79 \pm 0,25 | 1,12 \pm 0,17 |
| Músculo | 6,66 \pm 0,54 | 3,01 \pm 1,50 | 1,43 \pm 0,29 | 0,77 \pm 0,38 | 0,56 \pm 0,39 |
| Rins | 4,09 \pm 1,40 | 3,11 \pm 0,85 | 2,48 \pm 0,14 | 2,17 \pm 0,39 | 1,87 \pm 0,41 |
| I. Delgado | 1,69 \pm 0,47 | 1,34 \pm 0,21 | 1,37 \pm 0,60 | 2,02 \pm 0,34 | 3,77 \pm 0,90 |
| I.Grosso | 1,40 \pm 0,20 | 1,13 \pm 0,11 | 1,00 \pm 0,11 | 1,01 \pm 0,14 | 1,90 \pm 0,44 |
| Adrenais | 0,03 \pm 0,02 | 0,03 \pm 0,01 | 0,04 \pm 0,01 | 0,03 \pm 0,01 | 0,04 \pm 0,01 |
| Pâncreas | 4,25 \pm 0,42 | 3,74 \pm 1,13 | 2,65 \pm 0,17 | 3,54 \pm 0,29 | 1,43 \pm 0,43 |
| Sangue Total | 5,99 \pm 1,37 | 2,62 \pm 1,07 | 0,93 \pm 0,34 | 0,28 \pm 0,07 | 0,12 \pm 0,05 |

Os dados que destacamos na tabela acima estão representados na figura 23 como perfis da biodistribuição do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO.

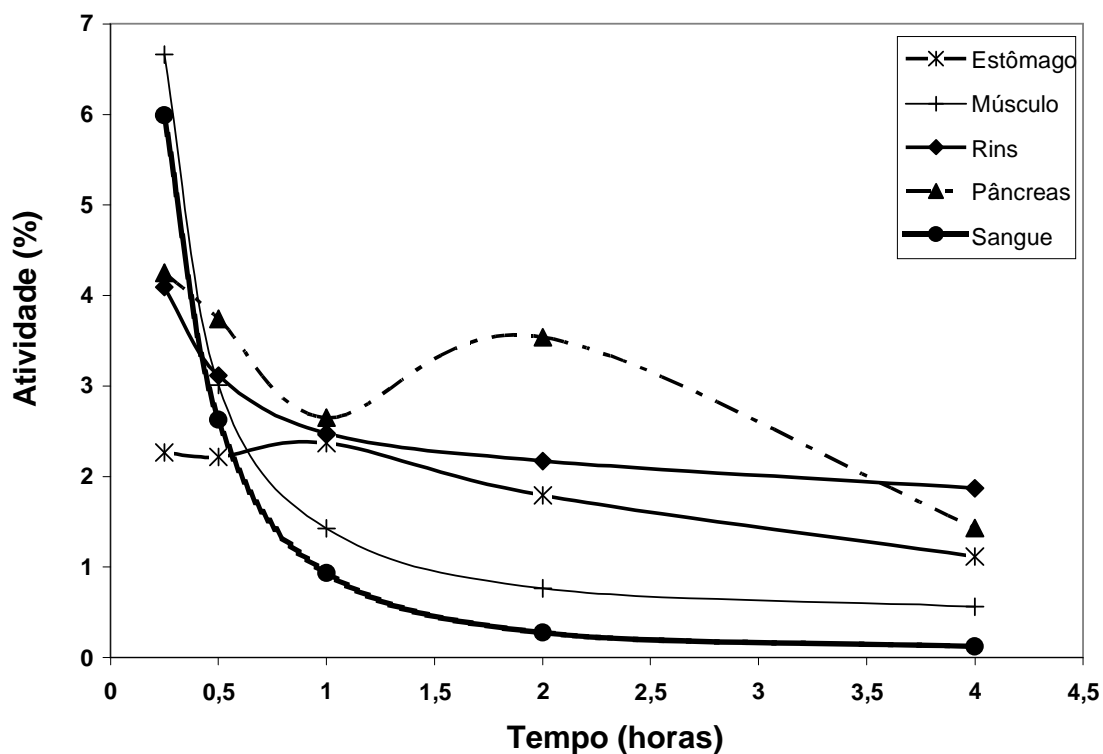


Figura 23 – Perfis de biodistribuição do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO medida em porcentagem de atividade por órgão ou tecido, nos tempos 0,25; 0,5; 1; 2 e 4 horas após administração intravenosa. Camundongos *Swiss*, n=5.

Como o sangue é o compartimento central, a partir do qual o radiofármaco se distribui para os tecidos e órgãos, consideramos a curva de clareamento sanguíneo como referência para avaliarmos a biodistribuição do radiofármaco nos demais tecidos e órgãos.

Em colaboração com o Laboratório de Farmacologia e Controle Terapêutico do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF-USP), realizamos uma modelagem farmacocinética preliminar para a curva de clareamento sanguíneo, utilizando-se como ferramenta o programa “PK Solutions 2.0”.

Por intermédio desta ferramenta, a análise da curva de clareamento sanguíneo evidenciou um modelo tricompartmental com os seguintes parâmetros

farmacocinéticos: meia vida de distribuição ($t_{(1/2)\alpha}$) de 4,9 minutos; meia vida de eliminação ($T_{(1/2)\beta}$) de 10,7 minutos e uma meia vida de eliminação lenta ($T_{(1/2)\gamma}$) de 58,9 minutos.

Apesar de serem dados que precisam ser confirmados pela realização de experimentos mais criteriosos, com um modelo animal adequado, os dados mostram um rápido clareamento sanguíneo do radiofármaco, o que evidencia a necessidade de se trabalhar com tempos curtos nos estudos de biodistribuição. No caso em questão, como a meia-vida de eliminação do radiofármaco é curta, fica claro que um estudo durante um período de 4 horas após a sua administração é mais do que suficiente para avaliar sua biodistribuição.

A hipótese, a ser melhor explorada, da modelagem tricompartmental do radiofármaco, é congruente com o que se espera de um radiofármaco receptor-específico. Neste caso, teríamos justificada uma eliminação mais rápida dos tecidos sem receptores para o radiofármaco e um compartimento profundo, de saída mais lenta, representado pelos órgãos com receptores específicos para somatostatina.

Da figura 23 podemos verificar que o músculo é um compartimento cuja curva de biodistribuição acompanha o perfil do clareamento sanguíneo, o que mostra ser o tecido muscular um compartimento de saída rápida do radiofármaco.

Padrões totalmente diferentes são observados nos perfis de biodistribuição do radiofármaco no pâncreas e no estômago, dois órgãos receptor-positivos para somatostatina. Estes dois órgãos podem ser considerados exemplos de compartimento profundo, onde o radiofármaco, dada a ligação com os receptores, fica impregnado ao tecido.

Em relação ao perfil do pâncreas é preciso comentar que os decréscimos da atividade por órgão visualizados nos tempos de trinta minutos e uma hora não são fidedignos. Estes dados encontram-se enviesados pela imprecisão na remoção cirúrgica deste órgão, o que concorre com grandes variações na massa de tecido a qual se determinou a atividade do radiofármaco. Esse efeito é, sobretudo, evidente para órgãos de difícil remoção como é o caso do pâncreas, para o qual se recomenda a normalização da atividade do radiofármaco no órgão por grama de tecido.

Da figura 23 podemos observar ainda que o perfil de biodistribuição do radiofármaco nos rins é semelhante ao perfil de biodistribuição nos órgãos com receptor para somatostatina, mostrando uma impregnação do radiofármaco no tecido renal que concorre com a do pâncreas e do estômago.

Este dado aparentemente anômalo de uma alta impregnação do radiofármaco nos rins não pode ser explicado apenas pela hidrossolubilidade do radiofármaco. É sabido que os rins expressam receptores para somatostatina (Bates, 2003; Bates, Kegg & Grady, 2004), o que seria motivo suficiente para que se esperasse um perfil semelhante em relação ao pâncreas e ao estômago.

Mas há outro motivo que pode explicar esta alta impregnação renal do radiofármaco. Embora ainda não bem esclarecido, alguns trabalhos em modelo animal apontam para uma possível reabsorção de análogos da somatostatina, associados a isótopos radioativos, no túbulo proximal dos rins (Rolleman, 2007), que pode ser inibida por aminoácidos polares com carga positiva (isto é, aminoácidos básicos) como a lisina (Rolleman, 2007).

Este trabalho de Rolleman (2007) revela que além da lisina, a amifostina que tem dois nitrogênios básicos que se encontram protonados em pH fisiológico (portanto apresentando-se com duas cargas positivas) também é um inibidor da reabsorção de análogos da somatostatina associados a radioisótopos. Este recurso é sugerido para diminuir a toxicidade renal destes radiofármacos em protocolos de tratamento em humanos (Rolleman, 2006).

De tudo o que foi discutido, é importante salientar que o radiofármaco é potencialmente nefrotóxico, o que deve estimular pesquisas no âmbito da farmacocinética-dosimetria de modo a se obter parâmetros que racionalizem a utilização do radiofármaco, com potencialização do efeito citotóxico no tumor e gerenciamento de possível efeito nefrotóxico.

Tabela 14 – Dados de biodistribuição do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO apresentados como a média da porcentagem de atividade por grama de tecido \pm desvio padrão. Tempos 0,25; 0,5; 1; 2 e 4 horas após a administração intravenosa. Camundongos *Swiss*, n=5.

| ÓRGÃOS | Tempo (horas) | | | | |
|-------------------|------------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4 |
| Cérebro | 0,14 \pm 0,02 | 0,06 \pm 0,01 | 0,03 \pm 0,01 | 0,02 \pm 0,001 | 0,03 \pm 0,01 |
| Pulmão | 6,05 \pm 1,43 | 4,95 \pm 0,75 | 4,28 \pm 0,38 | 2,86 \pm 0,27 | 2,09 \pm 0,16 |
| Coração | 1,16 \pm 0,30 | 0,57 \pm 0,15 | 0,26 \pm 0,05 | 0,15 \pm 0,02 | 0,08 \pm 0,02 |
| Baço | 0,82 \pm 0,10 | 0,73 \pm 0,20 | 0,38 \pm 0,06 | 0,26 \pm 0,07 | 0,25 \pm 0,06 |
| Fígado | 0,78 \pm 0,13 | 0,50 \pm 0,10 | 0,29 \pm 0,04 | 0,25 \pm 0,03 | 0,25 \pm 0,03 |
| Estômago | 7,68 \pm 1,56 | 9,02 \pm 0,41 | 8,96 \pm 0,97 | 6,95 \pm 0,95 | 5,05 \pm 0,73 |
| Músculo | 0,55 \pm 0,04 | 0,30 \pm 0,10 | 0,12 \pm 0,02 | 0,06 \pm 0,03 | 0,09 \pm 0,11 |
| Rins | 11,84 \pm 2,51 | 9,19 \pm 1,74 | 6,63 \pm 0,58 | 6,04 \pm 0,99 | 5,34 \pm 0,66 |
| I. Delgado | 1,24 \pm 0,21 | 1,03 \pm 0,16 | 1,21 \pm 0,30 | 1,32 \pm 0,21 | 2,37 \pm 0,43 |
| I.Grosso | 1,56 \pm 0,15 | 1,63 \pm 0,15 | 1,22 \pm 0,14 | 1,12 \pm 0,18 | 2,47 \pm 1,17 |
| Adrenais | 2,45 \pm 1,00 | 1,62 \pm 0,46 | 1,74 \pm 0,46 | 1,80 \pm 0,85 | 2,31 \pm 0,43 |
| Pâncreas | 4,55 \pm 2,99 | 6,79 \pm 2,65 | 10,95 \pm 1,5 | 5,68 \pm 1,95 | 2,63 \pm 0,27 |
| Sangue/mL | 2,56 \pm 0,5 | 1,29 \pm 0,40 | 0,44 \pm 0,13 | 0,13 \pm 0,02 | 0,05 \pm 0,01 |

Os dados que destacamos na tabela acima estão representados na figura 24 como perfis de biodistribuição do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO.

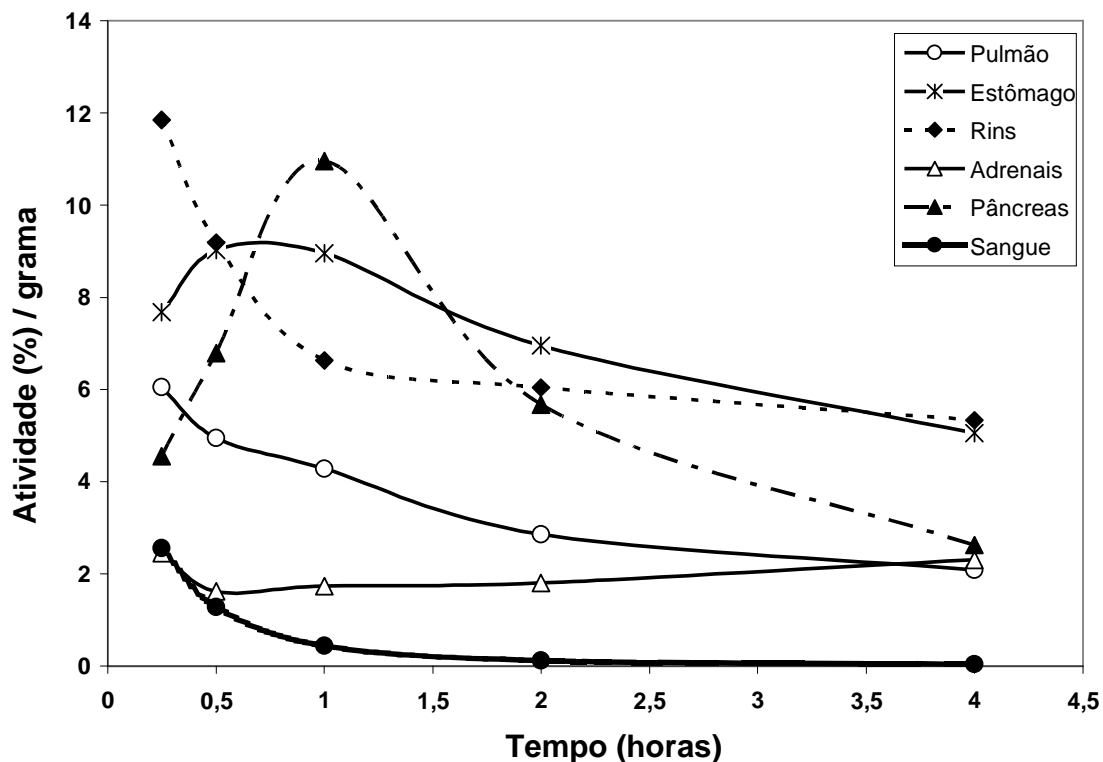


Figura 24 – Perfis de biodistribuição do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO medida em porcentagem de atividade por grama de tecido, nos tempos 0,25; 0,5; 1; 2 e 4 horas após administração intravenosa. Camundongos *Swiss*, $n=5$.

Na figura 24, a curva de clareamento sanguíneo (agora apresentada em porcentagem de atividade por mL de sangue) também é utilizada como referência para avaliarmos a biodistribuição do radiofármaco nos demais tecidos e órgãos. Os dados apresentados como porcentagem de atividade por grama de tecido tornam evidente a especificidade do radiofármaco para os tecidos que expressam receptores para somatostatina. No caso da figura 24, os tecidos apresentados com a mais alta impregnação do radiofármaco em relação aos dados da tabela 14 são receptor-positivos para somatostatina.

Ao normalizar os resultados por grama de tecido, órgãos como pulmão e adrenais mostram seu perfil de alta impregnação do radiofármaco. No caso das

adrenais, a sua pequena massa, de aproximadamente 0,01 g em média, justifica a sua expressividade, quando os resultados são expressos em porcentagem de atividade por grama de tecido.

No caso do pâncreas, fica evidente como a normalização por grama de tecido faz com que o perfil de biodistribuição deste órgão seja mais fidedigno do que o apresentado na figura 23, sobretudo em relação aos tempos de trinta minutos e uma hora que lá se apresentavam como decréscimo da atividade no órgão e, aqui, ao contrário, se mostram como incremento/acúmulo.

Portanto a normalização da atividade do radiofármaco no órgão por grama de tecido é uma ferramenta que possibilita a correção da atividade em órgãos de difícil remoção cirúrgica como o pâncreas, órgãos de tamanho pequeno como as adrenais, ou órgão de massa reduzida como é o caso do pulmão.

Feita esta normalização, a heterogeneidade observada nos perfis de biodistribuição do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO nos tecidos (Fig. 24) pode ser explicada em função principalmente, do tipo e densidade de receptores para somatostatina que estes tecidos expressam.

De posse destes dados normalizados por grama de tecido, seria interessante investigar se a comparação das áreas sob a curva (AUC), entre o músculo (tecido de eliminação rápida) e o estômago, o pulmão, as adrenais, ou o pâncreas (órgãos receptor-específicos), não se constituiria em um importante parâmetro farmacocinético para avaliar a especificidade deste radiofármaco.

Tabela 15 – Dados de biodistribuição do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO apresentados como a média da porcentagem de atividade por órgão ou tecido \pm desvio padrão. Tempos 1; 4 ; 24 e 48 horas após a administração intravenosa. Camundongos *Nude*, n=4

| ÓRGÃOS | Tempo (horas) | | | |
|---------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|
| | 1 | 4 | 24 | 48 |
| Cérebro | 0,04 \pm 0,02 | 0,02 \pm 0,01 | 0,02 \pm 0,02 | 0,01 \pm 0,001 |
| Pulmão | 0,45 \pm 0,05 | 0,21 \pm 0,11 | 0,10 \pm 0,04 | 0,08 \pm 0,002 |
| Coração | 0,08 \pm 0,03 | 0,02 \pm 0,01 | 0,01 \pm 0,001 | 0,01 \pm 0,001 |
| Baço | 0,08 \pm 0,02 | 0,04 \pm 0,02 | 0,02 \pm 0,001 | 0,02 \pm 0,01 |
| Fígado | 0,97 \pm 0,45 | 0,66 \pm 0,11 | 0,42 \pm 0,05 | 0,36 \pm 0,05 |
| Estômago | 0,81 \pm 0,05 | 0,49 \pm 0,08 | 0,25 \pm 0,03 | 0,20 \pm 0,03 |
| Músculo | 2,81 \pm 0,95 | 0,68 \pm 0,36 | 0,30 \pm 0,06 | 0,21 \pm 0,13 |
| Rins | 3,18 \pm 0,26 | 2,56 \pm 0,50 | 1,16 \pm 0,37 | 0,65 \pm 0,17 |
| I. Delgado | 2,01 \pm 0,77 | 1,22 \pm 0,09 | 0,40 \pm 0,02 | 0,29 \pm 0,01 |
| I.Grosso | 0,83 \pm 0,42 | 2,56 \pm 0,37 | 0,67 \pm 0,09 | 0,64 \pm 0,14 |
| Adrenais | 0,02 \pm 0,02 | 0,02 \pm 0,01 | 0,02 \pm 0,01 | 0,01 \pm 0,001 |
| Pâncreas | 2,56 \pm 0,76 | 1,05 \pm 0,29 | 0,43 \pm 0,07 | 0,20 \pm 0,09 |
| Ossos | 3,17 \pm 2,41 | 2,89 \pm 0,71 | 2,92 \pm 0,31 | 3,19 \pm 0,55 |
| Tumor | 1,62 \pm 2,17 | 0,96 \pm 1,06 | 0,52 \pm 0,84 | 0,30 \pm 0,28 |
| Sangue Total | 2,45 \pm 0,56 | 0,20 \pm 0,11 | 0,06 \pm 0,01 | 0,04 \pm 0,002 |

Os dados que destacamos na tabela acima estão representados na figura 25 como perfis de biodistribuição do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO.

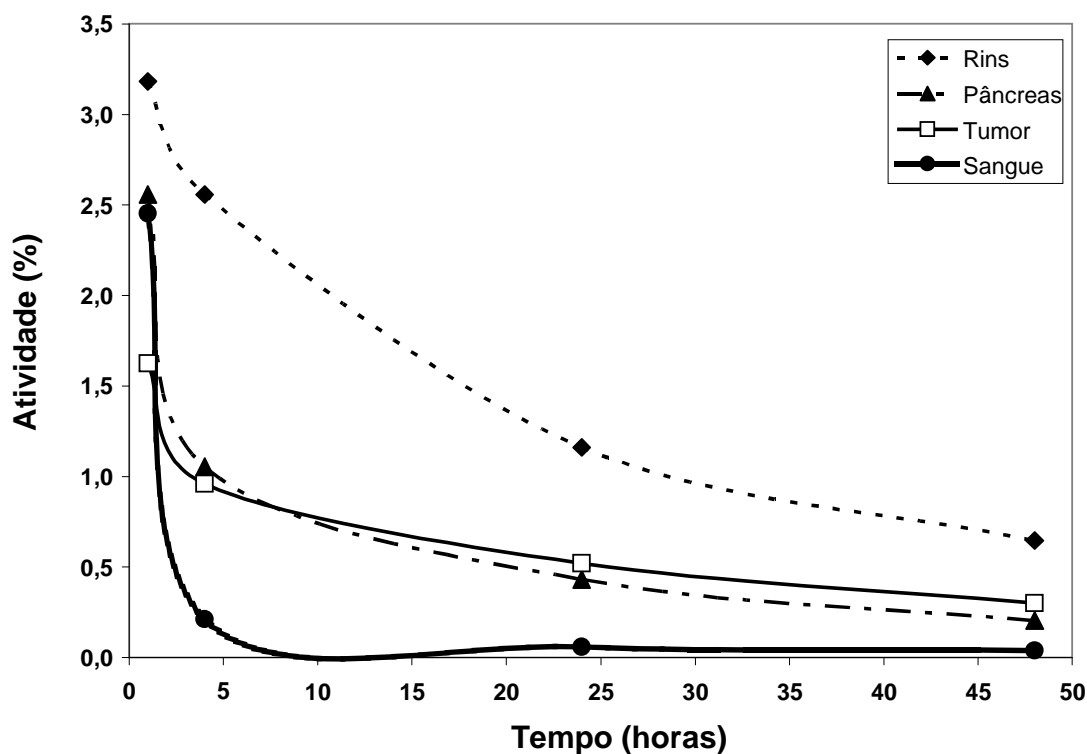


Figura 25 – Perfis de biodistribuição do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO em porcentagem de atividade por órgão ou tecido, nos tempo 1; 4; 24 e 48 horas após administração intravenosa. Camundongos *Nude*, n=4.

A figura 25 evidencia a especificidade do radiofármaco pelo tumor induzido pela linhagem de células de carcinoma pancreático de rato (células AR42J). Na figura 25, a curva de clareamento sanguíneo, avaliada entre 1 hora e 48 horas mostra claramente que além de 4 horas praticamente não há mais radiofármaco no sangue. Observamos ainda, que apesar disso, há permanência do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO nos tecidos receptor-positivos para somatostatina, o que inclui o tumor.

É interessante notar que os perfis do pâncreas e do tumor estão praticamente sobrepostos, o que implica supor que o radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO, apresenta especificidade para o tecido tumoral tanto quanto para o pâncreas, principal órgão de impregnação deste radiofármaco, como pode ser observado nas figuras anteriores.

Tabela 16 – Dados de biodistribuição do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO apresentados como a média da porcentagem de atividade por grama de tecido \pm desvio padrão. Tempos 1; 4 ; 24 e 48 horas após a administração intravenosa. Camundongos *Nude*, n=4.

| ÓRGÃOS | Tempo (horas) | | | |
|--------------------|------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| | 1 | 4 | 24 | 48 |
| Cérebro | 0,10 \pm 0,05 | 0,05 \pm 0,03 | 0,04 \pm 0,04 | 0,02 \pm 0,01 |
| Pulmão | 2,33 \pm 0,30 | 1,10 \pm 0,81 | 0,61 \pm 0,29 | 0,36 \pm 0,13 |
| Coração | 0,68 \pm 0,19 | 0,18 \pm 0,04 | 0,09 \pm 0,02 | 0,08 \pm 0,02 |
| Baço | 0,82 \pm 0,15 | 0,43 \pm 0,09 | 0,27 \pm 0,06 | 0,24 \pm 0,05 |
| Fígado | 0,92 \pm 0,26 | 0,69 \pm 0,05 | 0,40 \pm 0,05 | 0,36 \pm 0,05 |
| Estômago | 5,94 \pm 1,45 | 3,80 \pm 0,55 | 2,06 \pm 0,41 | 1,38 \pm 0,14 |
| Músculo | 0,32 \pm 0,11 | 0,09 \pm 0,04 | 0,03 \pm 0,01 | 0,03 \pm 0,02 |
| Rins | 10,84 \pm 0,82 | 9,99 \pm 1,96 | 4,35 \pm 1,79 | 2,54 \pm 0,65 |
| I. Delgado | 1,77 \pm 0,53 | 1,43 \pm 0,08 | 0,26 \pm 0,01 | 0,19 \pm 0,02 |
| I.Grosso | 1,02 \pm 0,43 | 5,16 \pm 0,44 | 0,62 \pm 0,09 | 0,50 \pm 0,11 |
| Adrenais | 1,14 \pm 1,18 | 1,65 \pm 1,51 | 2,07 \pm 0,44 | 1,06 \pm 0,23 |
| Pâncreas | 8,42 \pm 2,94 | 3,95 \pm 1,26 | 1,64 \pm 0,21 | 0,90 \pm 0,29 |
| Osso | 1,34 \pm 0,79 | 1,59 \pm 0,46 | 1,34 \pm 0,28 | 1,67 \pm 0,33 |
| Tumor | 2,46 \pm 0,77 | 1,18 \pm 0,32 | 0,83 \pm 0,26 | 0,57 \pm 0,10 |
| Sangue / mL | 1,57 \pm 0,10 | 0,16 \pm 0,07 | 0,04 \pm 0,01 | 0,03 \pm 0,001 |

Os dados que destacamos na tabela acima estão representados na figura 26 como perfis de biodistribuição do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO.

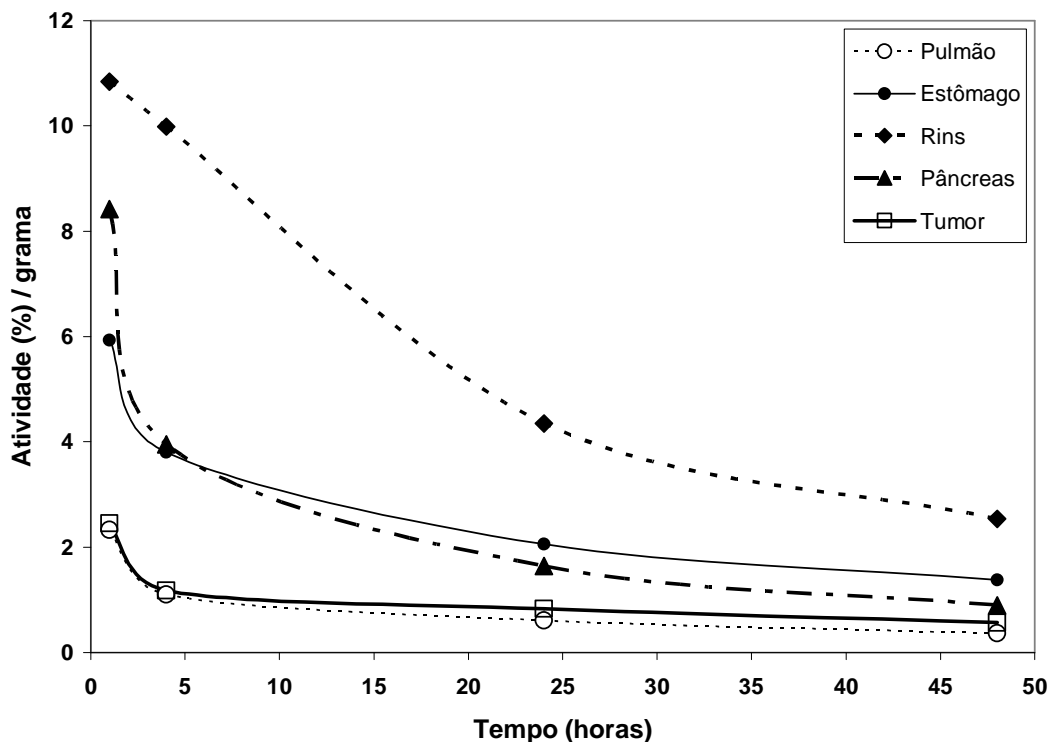


Figura 26 - Perfis de biodistribuição do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO medida em porcentagem de atividade por grama de tecido, nos tempo 1; 4; 24 e 48 horas após administração intravenosa. Camundongos *Nude*, n=4.

Nos dados normalizados por grama de tecido fica evidente o destaque dos órgãos receptor-positivos para somatostatina, como pâncreas, pulmão e estômago, os dois últimos não evidenciados no caso da expressão da biodistribuição do radiofármaco em porcentagem de atividade por órgão.

Na figura 26 observamos que as curvas do pâncreas e do tumor não mais se encontram sobrepostas, como observado na figura 25. O perfil de distribuição do tumor encontra-se abaixo do perfil de distribuição do pâncreas.

Para este caso específico, a normalização por grama não nos parece a maneira mais adequada para análise do perfil de biodistribuição do radiofármaco no tumor, uma vez que a massa do tumor está hiper-estimada porque há necrose e tecidos circunvizinhos invadidos pelo tumor, que não podem ser perfeitamente

dissecados. Este duplo efeito que contribui para um dado de massa do tumor hiperestimado faz com que, neste caso específico, o dado de porcentagem de atividade do radiofármaco biodistribuído no tecido tumoral (Fig. 25) seja mais fidedigno.

Tabela 17 – Dados de biodistribuição do radioisótopo $^{177}\text{Lu}^{3+}$ apresentados como média da porcentagem de atividade por órgão ou tecido \pm desvio padrão. Tempos 1, 4, 24 e 48 horas após a administração intravenosa. Camundongos *Swiss* n=5.

| ÓRGÃOS | Tempo (horas) | | | |
|---------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| | 1 | 4 | 24 | 48 |
| Cérebro | 0,07 \pm 0,02 | 0,05 \pm 0,02 | 0,02 \pm 0,01 | 0,02 \pm 0,01 |
| Pulmão | 1,36 \pm 0,49 | 0,77 \pm 0,13 | 0,23 \pm 0,04 | 0,16 \pm 0,05 |
| Coração | 0,29 \pm 0,06 | 0,22 \pm 0,04 | 0,08 \pm 0,02 | 0,06 \pm 0,02 |
| Baço | 0,17 \pm 0,06 | 0,21 \pm 0,01 | 0,12 \pm 0,03 | 0,10 \pm 0,01 |
| Fígado | 4,84 \pm 0,20 | 7,45 \pm 0,81 | 4,29 \pm 0,53 | 3,44 \pm 0,33 |
| Estômago | 0,79 \pm 0,04 | 0,48 \pm 0,08 | 0,34 \pm 0,05 | 0,28 \pm 0,08 |
| Músculo | 14,01 \pm 1,79 | 5,77 \pm 0,47 | 2,45 \pm 0,51 | 1,27 \pm 0,7 |
| Rins | 1,67 \pm 0,6 | 3,86 \pm 0,62 | 1,99 \pm 0,33 | 1,80 \pm 0,20 |
| I. Delgado | 6,89 \pm 0,53 | 6,01 \pm 0,58 | 2,17 \pm 0,46 | 1,77 \pm 0,21 |
| I.Grosso | 1,73 \pm 0,01 | 3,50 \pm 0,5 | 0,45 \pm 0,04 | 1,55 \pm 0,5 |
| Adrenais | 0,04 \pm 0,01 | 0,02 \pm 0,0001 | 0,01 \pm 0,001 | 0,01 \pm 0,001 |
| Pâncreas | 1,34 \pm 0,57 | 0,53 \pm 0,01 | 0,32 \pm 0,03 | 0,22 \pm 0,02 |
| Osso | 37,18 \pm 6,50 | 68,03 \pm 7,28 | 78,46 \pm 7,91 | 56,84 \pm 10,56 |
| Sangue Total | 12,18 \pm 2,91 | 6,31 \pm 1,41 | 0,34 \pm 0,07 | 0,12 \pm 0,02 |

Os dados que destacamos na tabela acima estão representados na figura 27 como perfis de biodistribuição do radioisótopo $^{177}\text{Lu}^{3+}$.

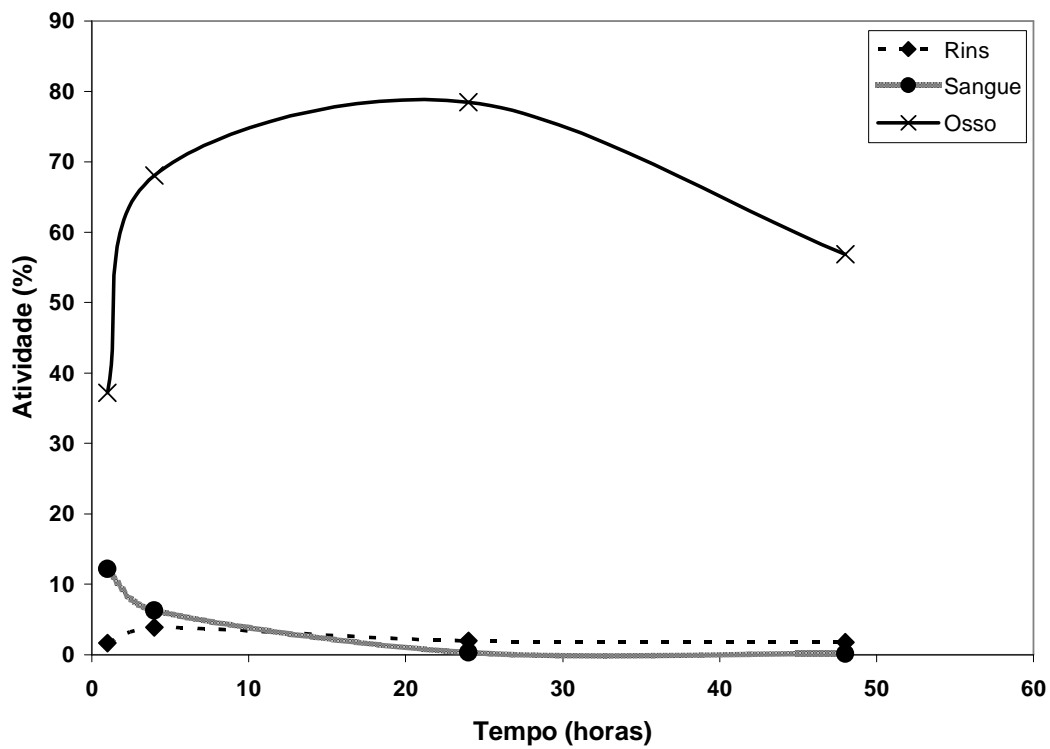


Figura 27 – Perfis de biodistribuição do radioisótopo $^{177}\text{Lu}^{3+}$ medida em porcentagem de atividade por órgão ou tecido, nos tempo 1, 4, 24 e 48 horas após a administração intravenosa. Camundongos *Swiss*, n=5.

Tabela 18 – Dados de biodistribuição do radioisótopo $^{177}\text{Lu}^{3+}$ apresentados como média da porcentagem de atividade por grama de tecido \pm desvio padrão. Tempos 1, 4, 24 e 48 horas após a administração intravenosa. Camundongos *Swiss* n=5.

| ÓRGÃOS | Tempo (horas) | | | |
|--------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 1 | 4 | 24 | 48 |
| Cérebro | 0,14 \pm 0,04 | 0,10 \pm 0,04 | 0,05 \pm 0,02 | 0,05 \pm 0,01 |
| Pulmão | 3,54 \pm 1,38 | 2,45 \pm 0,28 | 0,77 \pm 0,09 | 0,50 \pm 0,06 |
| Coração | 1,97 \pm 0,23 | 1,21 \pm 0,20 | 0,50 \pm 0,15 | 0,38 \pm 0,12 |
| Baço | 1,22 \pm 0,36 | 1,46 \pm 0,27 | 0,91 \pm 0,48 | 0,92 \pm 0,11 |
| Fígado | 2,72 \pm 0,44 | 4,05 \pm 0,59 | 1,86 \pm 0,16 | 2,30 \pm 0,12 |
| Estômago | 2,94 \pm 0,54 | 2,07 \pm 0,19 | 1,69 \pm 0,41 | 1,04 \pm 0,21 |
| Músculo | 1,01 \pm 0,12 | 0,38 \pm 0,03 | 0,18 \pm 0,03 | 0,12 \pm 0,04 |
| Rins | 3,85 \pm 0,42 | 6,43 \pm 1,22 | 3,35 \pm 0,72 | 4,10 \pm 0,21 |
| I. Delgado | 3,83 \pm 0,74 | 3,16 \pm 0,47 | 1,05 \pm 0,15 | 0,98 \pm 0,14 |
| I.Grosso | 1,48 \pm 0,20 | 4,58 \pm 0,57 | 0,46 \pm 0,06 | 2,12 \pm 0,33 |
| Adrenais | 2,29 \pm 0,50 | 1,94 \pm 0,28 | 0,60 \pm 0,04 | 0,81 \pm 0,11 |
| Pâncreas | 2,14 \pm 0,22 | 0,98 \pm 0,12 | 0,46 \pm 0,04 | 0,39 \pm 0,13 |
| Osso | 10,72 \pm 2,08 | 18,15 \pm 2,18 | 23,53 \pm 1,33 | 17,53 \pm 3,39 |
| Sangue / mL | 4,35 \pm 2,01 | 2,08 \pm 1,11 | 0,14 \pm 0,03 | 0,06 \pm 0,01 |

Os dados que destacamos na tabela acima estão representados na figura 28 como perfis de biodistribuição do radioisótopo $^{177}\text{Lu}^{3+}$.

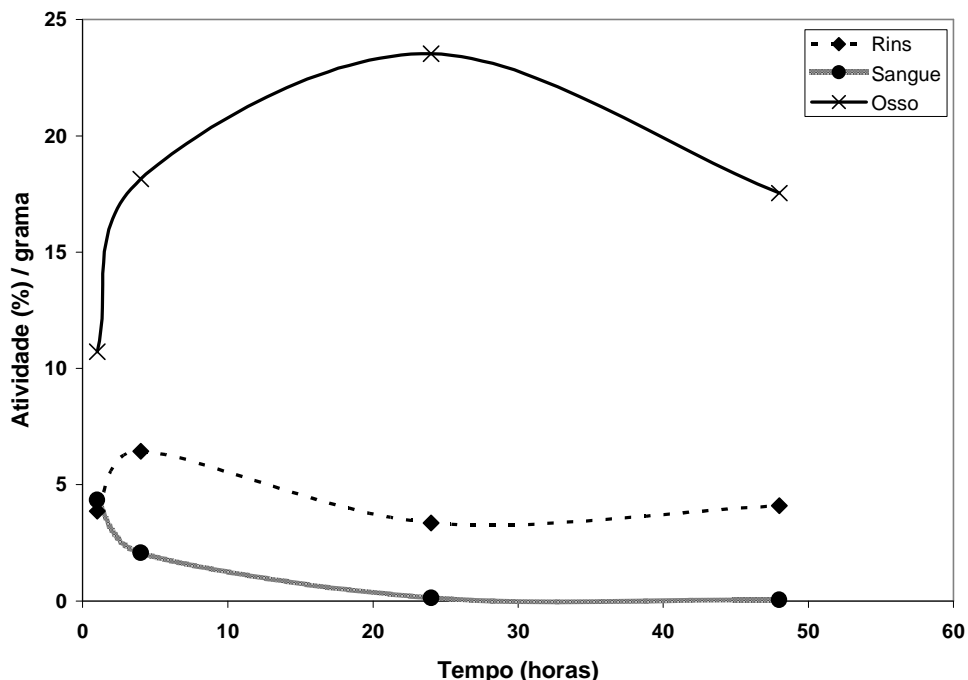


Figura 28 – Perfis de biodistribuição do radioisótopo $^{177}\text{Lu}^{3+}$ medida em porcentagem de atividade por grama de tecido, nos tempo 1, 4, 24 e 48 horas após a administração intravenosa. Camundongos *Swiss*, n=5.

As figuras 27 e 28, ilustrando os perfis de biodistribuição do radioisótopo $^{177}\text{Lu}^{3+}$ apresentam um padrão totalmente diverso em relação ao padrão de biodistribuição do radiofármaco, conforme evidenciado nas figuras 23, 24, 25 e 26.

Como pode ser evidenciado nas figuras 27 e 28, a altíssima impregnação do radioisótopo no tecido ósseo contrasta com a alta impregnação do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO nos tecidos com receptores para somatostatina e nos rins (que além de receptor positivo para somatostatina, tem alta impregnação devido ao mecanismo de reabsorção tubular).

O que vemos nas figuras 27 e 28, no perfil de biodistribuição do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ no osso, é uma impregnação lenta, mas progressiva, que se completa por volta da 24^a hora. É evidente também que este perfil, se considerarmos os desvios padrões dos

dados, praticamente não se modifica ao longo de 48 horas, o que indicaria um longo tempo de residência do radioisótopo $^{177}\text{Lu}^{3+}$ no osso.

No estudo não-invasivo, a seqüência de imagens cintilográficas (Fig. 29), mostra a rápida transferência e a alta impregnação do radiofármaco no tumor destacado no dorso, mas, sobretudo, nos rins e na bexiga.

A rápida transferência do radiofármaco para os rins é produto da sua alta hidrofiliabilidade. Mais importante, entretanto, devido a possíveis repercussões clínicas, é a alta impregnação do radiofármaco, observada na figura abaixo como alta densidade de cor nos rins.

Esta alta impregnação do radiofármaco nos rins, evidenciada durante toda a série de imagens, que pode ser compreendida tanto pela afinidade pelo receptor de somatostatina presente neste órgão, como pelo mecanismo de reabsorção tubular, é um indicativo da potencialidade nefrotóxica do radiofármaco.

Isso sugere que os estudos farmacocinéticos e dosimétricos do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO tenham os rins como foco de atenção, uma vez que este órgão está mais exposto aos efeitos radiocitotóxicos do que os demais tecidos.

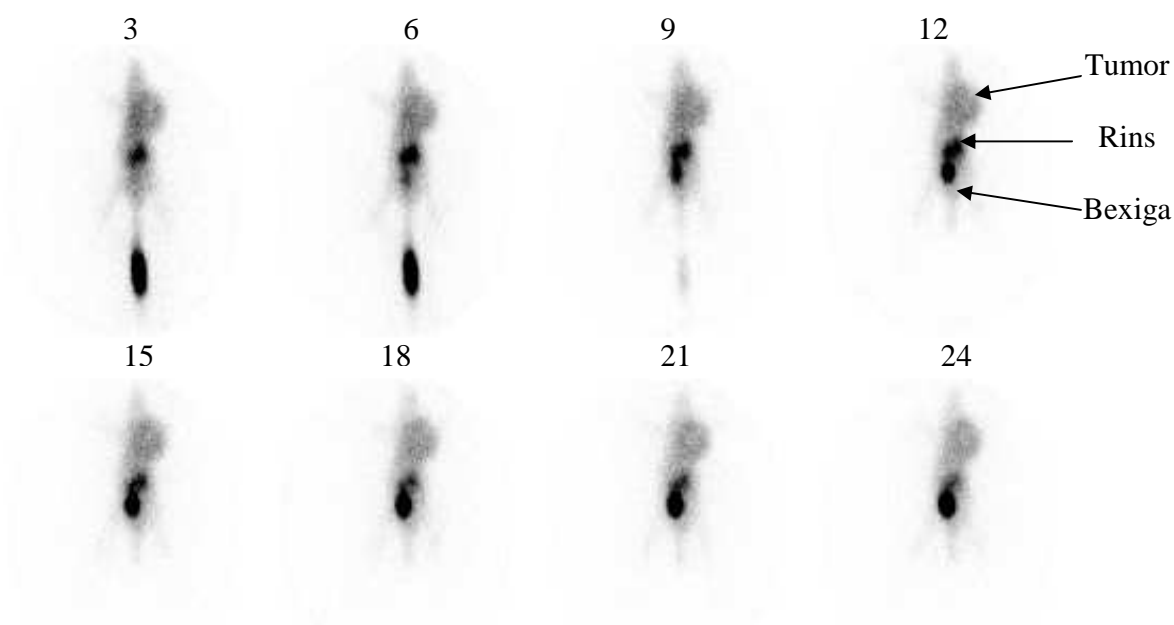


Figura 29 – Imagens cintilográficas de camundongo *Nude* após a administração do $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO.

3.3 Conclusões

De acordo com os dados apresentados e discutidos neste capítulo sobre a biodistribuição do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO, *in vivo* em modelo animal, podemos concluir que:

1. O modelo animal utilizado para o desenvolvimento tumoral necessita ser aprimorado para que haja maior controle na uniformidade em relação ao tamanho dos tumores.
2. A realização preliminar de uma análise farmacocinética da curva de clareamento sanguíneo do radiofármaco, em modelo animal adequado, é essencial para que se possa pré-determinar os tempos de amostragem para a realização de experimentos de biodistribuição.
3. Os dados de biodistribuição evidenciam a especificidade do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO pelos órgãos/tecidos que expressam receptores para somatostatina, dentre eles, destacou-se o pâncreas, o estômago, o pulmão, as adrenais, os rins e o tumor.
4. Os dados de biodistribuição do radioisótopo $^{177}\text{Lu}^{3+}$ mostram a alta afinidade deste radioisótopo pelo tecido ósseo.
5. A alta impregnação do radiofármaco $^{177}\text{Lu}^{3+}$ -DOTATATO nos rins faz com que este órgão deva ser considerado o alvo para estudos farmacocinéticos e dosimétricos que avaliem a potencialidade terapêutica do radiofármaco, com minimização dos possíveis efeitos radionefrocitotóxicos.

3.4 Referências Bibliográficas

BATES, C.M.; KEGG, H.; PETREVISK, C.; GRADY, S. Expression of somatostatin receptors 3, 4 and 5 in mouse kidney proximal tubules. *Kidney International*, p.53 – 63, 2003.

BATES, C.M.; KEGG, H.; GRADY, S. Expression of somatostatin receptors 1 and 2 in the adult mouse kidney. *Regulatory peptides*, v. 119. n.1/2, p. 11 – 20, 2004.

ROLLEMAN, E.J.; FORRER, F.; BERNARD, B.; BIJSTER, M.; VERMEIJ, M.; VALKEMA, R.; KRENNING, E.P.; DE JONG, M. Amifostine protects rat kidneys during peptide receptor radionuclide therapy with [¹⁷⁷Lu-DOTA⁰, Tyr³]octreotate. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, v. 34, p. 763 – 771, 2007.

ROLLEMAN, E.J.; KOOIJ, P.P.M.; DE HERDER, W.W.; VALKEMA, R.; KRENNING, E.P.; DE JONG, M. Somatostatin receptor subtype 2-mediated uptake of radiolabelled somatostatin analogues in the human kidney. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, v. 34, p. 1854 – 1860, 2007.