

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**

**Autarquia Associada à Universidade de São Paulo**

**DESENVOLVIMENTO DE RADIOFARMACO PARA RADIOSINOVECTOMIA**

**RENATA MARTINUSSI COUTO**

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

Orientadora:  
Dra. Elaine Bortoleti de Araújo

**SÃO PAULO**

**2009**

*Aos meus pais Gilberto e Neusa  
e minha irmã Karina pelo amor,  
incentivo e confiança em todas  
as etapas de minha vida*

## **AGRADECIMENTOS**

À DEUS, fonte inesgotável de força e sabedoria.

À Dra. Elaine Bortoleti de Araújo primeiramente pela oportunidade cedida, mas principalmente pela orientação, pelos ensinamentos, pela paciência, por todo apoio e confiança, e pela amizade construída.

À Msc. Marycel Figolz de Barboza pela amizade, pelos conhecimentos compartilhados e por toda ajuda diretamente neste trabalho.

À Dra. Emiko Muramoto pelo apoio e colaboração fornecidos na realização deste trabalho.

À Dra. Maria Tereza Colturato pelo apoio e amizade.

Aos meus grandes amigos Cláudia Regina Cecchi, Flávia Valgôde, Gianluca Nicastro, Juliana Machado, Natália Malavasi Valejo, Rafael Sanfurgo e Taís Lima pela amizade verdadeira, pelos momentos de descontração e alegria, e por estarem presentes constantemente em todos os momentos da minha vida.

Aos amigos do laboratório, Guilherme, Josefina, Laura, Priscila, José Caldeira, Adriana, Tatiana, Kátia, Ivani e Akim, por toda a ajuda e companheirismo em todos estes anos.

À Rosana Herrerias, Adriano Aparecido, Natanael Gomes e aos demais funcionários da Diretoria de Radiofarmácia pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

À toda minha família pelo amor e carinho dedicado.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares e a todos da comissão de pós-graduação.

À Comissão Nacional de Energia Nuclear pelo sustento financeiro necessário à realização desta dissertação.

À todos que contribuíram direta e indiretamente neste trabalho

# DESENVOLVIMENTO DE RADIOFÁRMACO PARA RADIOSINOVECTOMIA

RENATA MARTINUSSI COUTO

## RESUMO

Radiofármacos marcados com diferentes radionuclídeos são utilizados em aplicações diagnósticas e terapêuticas em Medicina Nuclear. Nos últimos anos houve um aumento no interesse pela terapia radionuclídica, com a introdução de novos radiofármacos aplicados para destruir especificamente determinada célula ou impedir sua proliferação indesejável. Uma modalidade terapêutica que emprega radiofármacos é a radiosinovectomia (RSV), na qual o radiofármaco é administrado na cavidade articular, sendo uma alternativa de tratamento existente para artropatia de várias etiologias e, em particular, àquelas associadas à artrite reumatóide e à hemofilia. O presente trabalho objetivou estudar a marcação de compostos com  $^{90}\text{Y}$  e  $^{177}\text{Lu}$  visando otimizar as condições de produção e controle de qualidade de pureza radioquímica, avaliar a estabilidade dos produtos gerados e realizar estudos preliminares de biodistribuição animal de radiofármacos com potencial para aplicação em radiosinovectomia. O estudo da produção do citrato coloidal de  $^{90}\text{Y}$  (Cit- $^{90}\text{Y}$ ) foi baseado em procedimento de marcação utilizando solução de  $^{90}\text{YCl}_3$  (37 - 54 MBq) levada previamente à secura, seguida da adição de solução de nitrato de ítrio, e citrato de sódio em pH 7,0 com aquecimento à 37° C por 30 minutos. A produção de hidroxiapatita (HA) marcada com  $^{90}\text{Y}$  foi estudada tendo como base procedimento de marcação utilizando ácido cítrico monohidratado, nitrato de ítrio e a solução de  $^{90}\text{YCl}_3$  (37 - 370MBq). Incubou-se a

mistura durante 30 minutos à temperatura ambiente e adicionou-se a hidroxiapatita em meio aquoso e incubou-se à temperatura ambiente durante 30 minutos sob forte agitação. Na produção de HA-<sup>177</sup>Lu, utilizou-se solução de <sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub> (296 MBq), em presença de óxido de lutécio em meio de NaCl 0,9% pH 7, sob agitação contínua à temperatura ambiente durante 30 minutos. Diversos parâmetros de reação foram estudados para os três radiofármacos. O rendimento das marcações foi determinado por meio de centrifugação após lavagem das partículas com NaCl 0,9%. A análise de pureza radioquímica das marcações foi realizada por meio de cromatografia líquida ascendente utilizando diferentes sistemas cromatográficos. A análise do tamanho das partículas radiomarcadas foi realizada utilizando-se membranas filtrantes de poros de diferentes tamanhos. O comportamento biológico da HA-<sup>90</sup>Y e HA-<sup>177</sup>Lu foi estudado a partir da administração intra-articular (joelho) de 18,5 – 22,2 MBq /0,1 mL do respectivo radiofármaco. Foram adquiridas imagens cintilográficas em gama-câmara em diferentes tempos para determinar a retenção e o extravasamento da atividade da articulação. O método utilizado para produção do Cit-<sup>90</sup>Y resultou em baixo rendimento de marcação (cerca de 20%), com baixa porcentagem de atividade ligada às partículas com tamanho apropriado para aplicação em RSV. Apesar do baixo rendimento de marcação, as partículas radiomarcadas separadas por centrifugação apresentaram estabilidade relativa de cerca de 70% após 5 dias. A marcação da HA-<sup>90</sup>Y resultou em excelentes rendimentos de marcação (> 95%). A reação foi otimizada para aplicação rotineira com a redução do tempo de reação para 15 minutos e utilização de apenas um procedimento de centrifugação e lavagem. A marcação da HA com <sup>177</sup>Lu resultou em excelente rendimento (> 95%), com otimização da % de ligação às partículas >12µm, sendo que os melhores resultados foram obtidos nas marcações realizadas na ausência de óxido de lutécio. A HA marcada com <sup>90</sup>Y e <sup>177</sup>Lu apresentaram estabilidade *in vitro*, armazenado à temperatura ambiente dentro do período avaliado de 5 e 7 dias, respectivamente. Foram definidos sistemas cromatográficos em papel e em camada delgada para determinação da pureza radioquímica das preparações. Os

estudos de biodistribuição realizados com a hidroxiapatita marcada com  $^{90}\text{Y}$  e  $^{177}\text{Lu}$  mostraram a estabilidade *in vivo* dos compostos, não tendo ocorrido extravasamento articular nem liberação do radionuclídeo livre para a circulação, confirmando o potencial de ambos para aplicação em radiosinovectomia.

## **DEVELOPMENT OF RADIOPHARMACEUTICAL FOR RADIOSINOVECTOMY**

**RENATA MARTINUSSI COUTO**

### **ABSTRACT**

Radiopharmaceuticals prepared with different radionuclides have been used in diagnostic and therapeutic procedures in Nuclear Medicine. The interest in radionuclidic therapy has been increased in last years, with the introduction of new radiopharmaceuticals applied in the destruction of specific cells or to prevent its undesired proliferation. Radiosinovectomy (RSV) is a therapeutic modality that uses radiopharmaceuticals administered in the intra-articular cavity and represents an alternative to the treatment of different arthropaties and, in particular, the arthropaties derived from reumathoid arthritis and haemophilic. The objective of the present work was to study the labeling of compounds with  $^{90}\text{Y}$  and  $^{177}\text{Lu}$  in order to improve the production conditions and quality control procedures, study the stability of the labeled compounds and preliminary biodistribution studies of the radiopharmaceuticals with potential for RSV applications. The study of the production of  $^{90}\text{Y}$  citrate colloid ( $^{90}\text{Y}$ -Cit) was based in a labeling procedure using  $^{90}\text{YCl}_3$  solution (37 - 54 MBq) that was previously dried, followed by the addition of yttrium nitrate and sodium citrate in pH 7 at  $37^\circ\text{C}$  for 30 minutes. The production of hydroxyapatite (HA) labeled with  $^{90}\text{Y}$  was based in a labeling procedure using monohydrated citric acid, yttrium nitrate and  $^{90}\text{YCl}_3$  solution (37 - 370MBq). The reaction mixture was incubated for 30 minutes at room temperature and the HA was introduced in aqueous medium and the reaction proceed for 30 minutes under

strong stirring.  $^{177}\text{Lu}$ -HA was produced using  $^{177}\text{LuCl}_3$  solution (296MBq), in presence of lutetium oxide in NaCl medium, pH 7, under continuous stirring for 30 minutes at room temperature. Several reaction parameters were studied for the three radiopharmaceuticals. Labeling yield was determined after particles were centrifuged and washed with NaCl 0,9%. Radiochemical purity was determined by ascending chromatography using different chromatographic systems. Particles size was determined by membrane with using filters of different porous sizes. The biological behavior of  $^{90}\text{Y}$ -HA and  $^{177}\text{Lu}$ -HA was studied by intra-articular administration of 18,5 – 22,2 MBq /0,1 mL of the labeled particles (knee). Scintigraphic images were obtained in gamma-camera at different times after the administration, to determine the intra-articular retention and leakage of the activity from the joint. The methodology applied in the production of  $^{90}\text{Y}$ -Cit resulted in low radiochemical yield (about 20%), with low percentage of the activity related to the particles with appropriated size to RSV application. Despite low radiochemical yield, labeled particles, when purified by centrifugation, presented relative stability of about 70% after 5 days. The labeling of  $^{90}\text{Y}$ -HA resulted in excellent radiochemical yield (> 95%). The reaction was optimized to routine production with the reduction of the reaction time to 15 minutes and using only one step of centrifugation and washing. The labeling of HA with  $^{177}\text{Lu}$  also resulted in excellent radiochemical yield (> 95%) and the percent of the activity incorporated to the particles >12 $\mu\text{m}$  was optimized, with best results obtained when lutetium oxide was not used. The HA labeled with  $^{90}\text{Y}$  and  $^{177}\text{Lu}$  showed high *in vitro* stability when stored at room temperature for 5 and 7 days, respectively. Paper chromatography and thin layer chromatography were defined as chromatographic systems applied in the radiochemical purity determination of the preparations. Biodistribution studies using HA labeled with  $^{90}\text{Y}$  and  $^{177}\text{Lu}$  showed great *in vivo* stability of the labeled compounds, with no joint leakage of the radiopharmaceutical or free radionuclide in the blood system, confirming the potential of both radiopharmaceuticals for RSV application.



## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1 Aspectos gerais da terapia radionuclídica em Medicina Nuclear .....	17
1.2 Articulação Sinovial .....	19
1.3 Doenças que acometem as articulações.....	21
1.3.1 Hemofilia .....	21
1.3.2 Artrite reumatóide .....	22
1.4 Tratamento das doenças articulares .....	24
1.4.1 Sinovectomia química e cirúrgica .....	24
1.4.2 Radiosinovectomia.....	27
Média .....	28
1.5 Obtenção de partículas radiomarcadas.....	38
1.5.1 Tamanho das partículas .....	39
<b>2 OBJETIVO .....</b>	<b>41</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
3.1 Materiais .....	42
3.1.1 Equipamentos e sistemas.....	42
3.1.2 Reagentes e solventes .....	43
3.1.3 Soluções .....	44
3.1.4 Outros .....	44
3.1.5 Animais .....	45
3.2 Métodos.....	45

3.2.1	Produção de citrato coloidal de $^{90}\text{Y}$ .....	45
3.2.2	Produção de hidroxapatita (HA) marcada com $^{90}\text{Y}$ .....	46
3.2.3	Produção de HA marcada com $^{177}\text{Lu}$ .....	47
3.2.4	Controle de qualidade das marcações .....	48
3.2.4.1	Análise do rendimento de marcação da HA- $^{90}\text{Y}$ , HA- $^{177}\text{Lu}$ e Citrato coloidal de $^{90}\text{Y}$ .....	48
3.2.4.2	Análise da pureza radioquímica .....	48
3.2.4.3	Análise do tamanho das partículas .....	50
3.2.4.4	Controle microbiológico.....	51
3.2.5	Estudo de estabilidade em plasma humano da HA- $^{177}\text{Lu}$ .....	52
3.2.6	Estudo de distribuição biológica da HA- $^{90}\text{Y}$ e HA- $^{177}\text{Lu}$ .....	52
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
4.1	Produção do citrato coloidal de $^{90}\text{Y}$ .....	54
4.2	Produção de HA marcada com $^{90}\text{Y}$ .....	66
4.3	Produção da HA marcada com Lu-177 .....	74
4.4	Estudo de esterilidade e apirogenicidade.....	85
4.5	Estudos de biodistribuição.....	86
4.5.1	Estudos de biodistribuição do HA- $^{90}\text{Y}$ .....	86
4.5.2	Estudos de biodistribuição do HA- $^{177}\text{Lu}$ .....	88
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>92</b>
5.1	Com relação aos procedimentos de marcação .....	92
5.1.1	Citrato coloidal de $^{90}\text{Y}$ .....	92
5.1.2	HA- $^{90}\text{Y}$ .....	92
5.1.3	HA- $^{177}\text{Lu}$ .....	93
5.2	Com relação ao método cromatográfico utilizado na determinação da pureza radioquímica das marcações.....	93

5.2.1 Citrato coloidal de $^{90}\text{Y}$ .....	93
5.2.2 HA- $^{90}\text{Y}$ .....	93
5.2.3 HA- $^{177}\text{Lu}$ .....	94
5.3 Com relação à estabilidade das preparações <i>in vitro</i> .....	94
5.3.1 Citrato coloidal de $^{90}\text{Y}$ .....	94
5.3.2 HA- $^{90}\text{Y}$ .....	94
5.3.3 HA- $^{177}\text{Lu}$ .....	94
5.4 Com relação à biodistribuição .....	95
5.5 Considerações finais .....	95
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>96</b>

## Lista de Figuras

FIGURA 1- Componentes das articulações sinoviais .....	20
FIGURA 2 - Fisiologia normal e alterações patológicas em articulação promovidas pela artrite reumatóide .....	23
FIGURA 3 - Sinovectomia química com cloridrato de oxitetraciclina .....	25
FIGURA 4 - Sinovectomia artroscópica .....	26
FIGURA 5 - Foto ilustrativa dos filtros utilizados para a determinação do tamanho de partículas presentes nas amostras .....	51
FIGURA 6 - Perfil cromatográfico do $^{90}\text{YCl}_3$ em solução NaCl 0,9% e papel Whatman 3MM – sistema descrito na literatura (duplicata) .....	55
FIGURA 7 - Perfil cromatográfico do Citrato de $^{90}\text{Y}$ em solução NaCl 0,9% e papel Whatman 3MM – sistema descrito na literatura (triplicata) .....	56
FIGURA 8 - Perfil cromatográfico em solução NaCl 8,4% e papel Whatman 3MM da amostra de $^{90}\text{YCl}_3$ (duplicata) .....	58
FIGURA 9 - Perfil cromatográfico em solução NaCl 8,4% e papel Whatman 3MM da amostra de Cit- $^{90}\text{Y}$ antes da purificação por centrifugação (duplicata) .....	58
FIGURA 10 - Perfil cromatográfico em solução NaCl 8,4% e papel Whatman 3MM da amostra de sobrenadante após centrifugação da preparação de Cit- $^{90}\text{Y}$ (duplicata) .....	61
FIGURA 11 - Perfil cromatográfico em solução NaCl 8,4% e papel Whatman 3MM das amostras de precipitado após centrifugação da preparação de Cit- $^{90}\text{Y}$ (duplicata) .....	62
FIGURA 12 - Perfil cromatográfico do produto Cit- $^{90}\text{Y}$ (CIS Bio) em papel Whatman 3MM e solução NaCl 0,9% .....	65
FIGURA 13 - Filtração da amostra de Cit- $^{90}\text{Y}$ (CIS Bio) em filtro Millipore com membrana de 5 $\mu\text{m}$ .....	65
FIGURA 14 - Influência do volume de nitrato de ítrio-90 no rendimento da marcação .....	67

FIGURA 15 - Variação do volume de nitrato de ítrio e sua influência na % de atividade incorporada às partículas maiores de 8 µm.....	68
FIGURA 16 - Perfil cromatográfico do <sup>90</sup> YCl <sub>3</sub> em sistema de cromatografia em camada delgada (TLC-SG) e solução DTPA 2,5 mM .....	72
FIGURA 17 - Perfil cromatográfico da HA- <sup>90</sup> Y em sistema de cromatografia em camada delgada (TLC-SG) e solução DTPA 2,5 mM .....	72
FIGURA 18 - Estabilidade das partículas de tamanho superior a 12µm .....	74
FIGURA 19 - Perfil cromatográfico do <sup>177</sup> LuCl <sub>3</sub> e da HA- <sup>177</sup> Lu em papel Whatman 3MM e solução DTPA 5 mM .....	81
FIGURA 20 - Perfil cromatográfico do <sup>177</sup> LuCl <sub>3</sub> e da HA- <sup>177</sup> Lu no sistema cromatográfico utilizando fita de TLC-SG e solução DTPA 2,5 mM .....	82
FIGURA 21 - Estudo da estabilidade da pureza radioquímica da HA marcada com <sup>177</sup> Lu seguindo o procedimento de marcação da HA- <sup>90</sup> Y.....	84
FIGURA 22 - Imagem cintilográfica adquirida em gamma-câmara 24 hs após administração de 37 MBq de HA- <sup>90</sup> Y na articulação esquerda do joelho de um rato <i>Wistar</i> .....	87
FIGURA 23 - Imagem cintilográfica adquirida em gamma-câmara de 7 dias após administração de 37 MBq de HA- <sup>90</sup> Y na articulação direita do joelho de um rato <i>Wistar</i> .....	87
FIGURA 24 - Ampliação da Imagem cintilográfica em gamma-câmara da região do joelho do rato .....	88
FIGURA 25 Estudo cintilográfico realizado em rato <i>Wistar</i> , 24 h após administração de 37 MBq de <sup>177</sup> LuCl <sub>3</sub> na veia caudal do animal .....	89
FIGURA 26 - Estudo cintilográfico realizado em rato <i>Wistar</i> , 24 h após administração de 37 MBq de HA- <sup>177</sup> Lu diretamente na articulação do joelho do animal. ....	90
FIGURA 27 - Estudo cintilográfico realizado em rato <i>Wistar</i> , 7 dias após administração de 37 MBq de HA- <sup>177</sup> Lu diretamente na articulação do joelho do animal. ....	91

## Lista de Tabelas

TABELA 1 - Radioisótopos sugeridos para aplicações em radiosinovectomia.....	28
TABELA 2 - Características dos radiofármacos utilizados em RSV .....	30
TABELA 3 - Volume e atividade de sulfito de $^{186}\text{Re}$ para cada articulação de acordo com a EANM .....	35
TABELA 4 - Volume e atividade de citrato coloidal de $^{169}\text{Er}$ para cada articulação de acordo com a EANM .....	36
TABELA 5 - Sistemas cromatográficos empregados na determinação da pureza radioquímica das marcações .....	49
TABELA 6 - Resultados de pureza radioquímica da produção de $\text{Cit-}^{90}\text{Y}$ em quatro preparações distintas .....	54
TABELA 7 – Resultados de pureza radioquímica utilizando-se o método cromatográfico com papel Whatman 3MM e solução NaCl 8,4%.....	59
TABELA 8 - Análise do tamanho de partículas na marcação do $\text{Cit-}^{90}\text{Y}$ na condição padrão.....	59
TABELA 9 - Análise do tamanho de partículas na marcação do $\text{Cit-}^{90}\text{Y}$ na condição de concentrações dobradas.....	60
TABELA 10 - Rendimento de marcação do $\text{Cit-}^{90}\text{Y}$ em função da variação da atividade de marcação.....	62
TABELA 11 - Resultados de pureza radioquímica e rendimento de marcação (obtidos por contagem da atividade da amostra após centrifugação separando-se sobrenadante e precipitado). .....	63
TABELA 12 - Estudo da estabilidade do $\text{Cit-}^{90}\text{Y}$ (mistura de marcação) e do precipitado (após centrifugação) em sistema de cromatografia líquida ascendente em papel Whatman 3MM e solução NaCl 8,4%. .....	64
TABELA 13 - Estudo da variação da quantidade de solução de nitrato de ítrio 2mM no procedimento de marcação da $\text{HA-}^{90}\text{Y}$ .....	67

TABELA 14 - Estudo da influência do tempo de reação no rendimento da marcação de HA com $^{90}\text{Y}$ .....	69
TABELA 15 - Estudo de lavagem da amostra de HA- $^{90}\text{Y}$ por centrifugação para remoção de $^{90}\text{YCl}_3$ . .....	70
TABELA 16 - Sistemas cromatográficos utilizados na avaliação da pureza radioquímica da HA- $^{90}\text{Y}$ .....	71
TABELA 17 - Estudo da estabilidade da HA- $^{90}\text{Y}$ incubada em solução salina à temperatura ambiente utilizando sistema de cromatografia em camada delgada (TLC-SG) e solução DTPA 2,5 mM.....	73
TABELA 18 - Estudo do tamanho das partículas formadas de HA- $^{90}\text{Y}$ (ensaio de membranas filtrantes) e estabilidade das partículas.....	73
TABELA 19 - Resultados obtidos na marcação de HA com $^{177}\text{Lu}$ utilizando-se a condição padrão de marcação.....	75
TABELA 20 - Análise da variável massa de hidroxiapatita no rendimento de marcação da HA com $^{177}\text{Lu}$ , utilizando-se 200 $\mu\text{g}$ de óxido de lutécio .....	75
TABELA 21 - Análise da variável massa de hidroxiapatita no rendimento de marcação da HA com $^{177}\text{Lu}$ utilizando-se 400 $\mu\text{g}$ de óxido de lutécio. ....	76
TABELA 22 - Análise da variável atividade de $^{177}\text{LuCl}_3$ utilizada na marcação da hidroxiapatita utilizando 200 $\mu\text{g}$ de óxido de lutécio e 5 mg de hidroxiapatita .....	77
TABELA 23 - Influência da variação da massa de óxido de lutécio na marcação do HA- $^{177}\text{Lu}$ utilizando-se 5 mg de HA e atividade de 296 MBq (8 mCi) .....	78
TABELA 24 - Estudo da variação da atividade de $^{177}\text{LuCl}_3$ na marcação de 20 mg de hidroxiapatita sem adição de óxido de lutécio .....	79
TABELA 25 - Estudo da variação da atividade de $^{177}\text{LuCl}_3$ na marcação de 5 mg de hidroxiapatita sem adição de óxido de lutécio .....	79
TABELA 26 - Estudo de marcação da HA- $^{177}\text{Lu}$ , sem óxido de lutécio, variando a massa de HA .....	80
TABELA 27 - Estudo de estabilidade da HA- $^{177}\text{Lu}$ obtido após marcação de 20 mg de HA, com 148 MBq de $^{177}\text{LuCl}_3$ , sem óxido de lutécio, mantida à temperatura ambiente (triplicata).....	82

TABELA 28 - Estudo de estabilidade da HA- <sup>177</sup> Lu obtida após marcação de 20 mg de HA, com 370 MBq de <sup>177</sup> LuCl <sub>3</sub> , sem óxido de lutécio, em plasma humano a 37° C e em solução de NaCl 0,9% à temperatura ambiente (fitas em triplicata) .....	83
TABELA 29 - Estudo de marcação da HA- <sup>177</sup> Lu seguindo o procedimento de marcação da HA- <sup>90</sup> Y (15 mg de ácido cítrico, 40 mg de hidroxiapatita, sem adição de óxido de lutécio e atividade de 296 MBq de <sup>177</sup> LuCl <sub>3</sub> ) .....	83
TABELA 30 - Resultados obtidos na marcação da HA com <sup>177</sup> LuCl <sub>3</sub> sem alteração de pH no momento da marcação utilizando-se a condição padrão de marcação .	85
TABELA 31 - Estudo invasivo de administração intra-articular de 18,5 MBq de HA- <sup>90</sup> Y: porcentagem da atividade administrada retida na articulação após 7 dias ....	86



## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 Aspectos gerais da terapia radionuclídica em Medicina Nuclear**

A medicina nuclear pode ser definida como uma especialidade médica que utiliza as propriedades nucleares de compostos radioativos para realizar avaliações diagnósticas das condições anatômicas e/ou fisiológicas, tratamentos terapêuticos e pesquisas médicas. Um aspecto único na medicina nuclear é a sensibilidade elevada dos radiofármacos para detectar alterações na função e/ou morfologia de um determinado órgão (Granier, 1990; Kowalsky, 1987).

Radiofármacos (RF) podem ser definidos simplesmente como substratos que contêm átomo radioativo na sua estrutura, podendo ser considerados como vetores que apresentam certa especificidade por algum órgão ou uma função fisiológica e/ou fisiopatológica. Por sua forma farmacêutica, quantidade e qualidade de radiação emitida, podem ser utilizados com finalidade diagnóstica ou terapêutica (Granier, 1990).

No desenvolvimento de radiofármacos, vários fatores devem ser levados em consideração, tais como, a escolha e produção do elemento radioativo, a escolha e obtenção do substrato de marcação e o método a ser aplicado na marcação. Além disso, devem ser considerados os aspectos de pureza de natureza química, física e biológica relativos ao controle de qualidade deste radiofármaco (Chandra, 1992).

Atualmente, radiofármacos marcados com diferentes radionuclídeos vêm sendo utilizados em aplicações diagnósticas e terapêuticas, sendo que cerca de 95% dos radiofármacos são utilizados com propósito de diagnóstico (Unak, 2000).

Nos últimos anos houve um aumento no interesse pela terapia radionuclídica, com a introdução de novos radiofármacos aplicados para destruir especificamente determinada célula ou impedir sua proliferação indesejável.

A terapia radionuclídica interna utiliza-se do princípio da entrega de grandes doses de radiação aos tecidos alvos doentes, por meio de radiofármacos, poupando os tecidos normais.

Para a localização seletiva tanto de íons ou moléculas que são específicas ao tecido doente, são usados carregadores para terapia radionuclídica ou radiofármacos solúveis e microparticulados, que são introduzidos na região para aumentar a absorção ou confinar o radiofármaco em uma determinada cavidade corporal (Santos, 2001).

Além da localização seletiva da radiação, a terapia radionuclídica interna tem a vantagem de poder determinar a dose de radiação no tecido alvo. Outra vantagem é a de que um grande número de radionuclídeos, com uma ampla variedade de tipos de emissão e energias está disponível, proporcionando aplicações específicas e diversificando as possibilidades para produção (Ercan, 1999).

A efetividade da terapia pode ser aumentada pelo local de introdução do radiofármaco. Radiofármacos constituídos por elementos alfa ( $\alpha$ ) ou beta emissores (partículas  $\beta^-$ ) são administrados diretamente dentro da cavidade tumoral, como na terapia de tumores sólidos, ou introduzidos por meio de uma via arterial preferencial, como no caso da radioembolização utilizada na terapia de tumores hepáticos. Ainda como exemplo de administração localizada de radiofármacos para terapia é importante citar a aplicação em radiosinovectomia, na qual o radiofármaco é administrado na cavidade articular para efeito de tratamento de patologias tais como a artrite reumatóide. A administração local do radiofármaco pretende confinar o efeito da radiação no local da aplicação, para poupar os tecidos normais da exposição desnecessária à radiação (Ercan, 1999).

Os radioisótopos empregados no desenvolvimento de radiofármacos terapêuticos devem apresentar decaimento por emissão particulada (partículas  $\beta^-$ ,

$\alpha$  ou elétrons Auger). A partícula pode apresentar alcance médio (partículas  $\beta^-$ ) ou curto (partículas  $\alpha$  ou elétrons Auger), diminuindo assim os danos aos tecidos normais circunvizinhos ao tecido alvo. O tipo específico de decaimento vai depender da natureza e do estágio da doença. Desta forma, a toxicidade da terapia radionuclídica interna é muito menor do que a radioterapia externa. A emissão de raios gama ( $\gamma$ ), que pode ou não acompanhar o processo de emissão de partículas carregadas, apresenta uma pequena contribuição efetiva no tratamento terapêutico, porém, também contribui para um aumento na irradiação dos tecidos adjacentes. A emissão  $\gamma$ , entretanto, facilita a localização e acompanhamento da radiação no local de interesse, por meio de aquisição de imagens cintilográficas em Medicina Nuclear (Saha e cols, 2003).

## 1.2 Articulação Sinovial

As articulações sinoviais são aquelas nas quais os ossos são articulados em uma cavidade preenchida por líquido sinovial. As diartroses são articulações dotadas de grande mobilidade, geralmente unindo ossos longos. Nas diartroses existe uma cápsula que liga as extremidades ósseas, delimitando uma cavidade fechada, a cavidade articular. Esta cavidade contém um líquido incolor, transparente e viscoso – o líquido sinovial. O líquido sinovial é um dialisado do plasma sanguíneo contendo elevado teor de ácido hialurônico, sintetizado pelas células da camada sinovial. O deslizamento das superfícies articulares que são revestidas por cartilagem hialina é facilitado pelo efeito lubrificante do ácido hialurônico (Junqueira e Carneiro, 2004).

Os principais componentes da articulação sinovial (FIG. 1) são: a cápsula articular, a cartilagem articular hialina (que reveste os ossos), a cavidade articular (preenchida pelo líquido sinovial) e os ligamentos (reforçam e sustentam a articulação durante os movimentos).

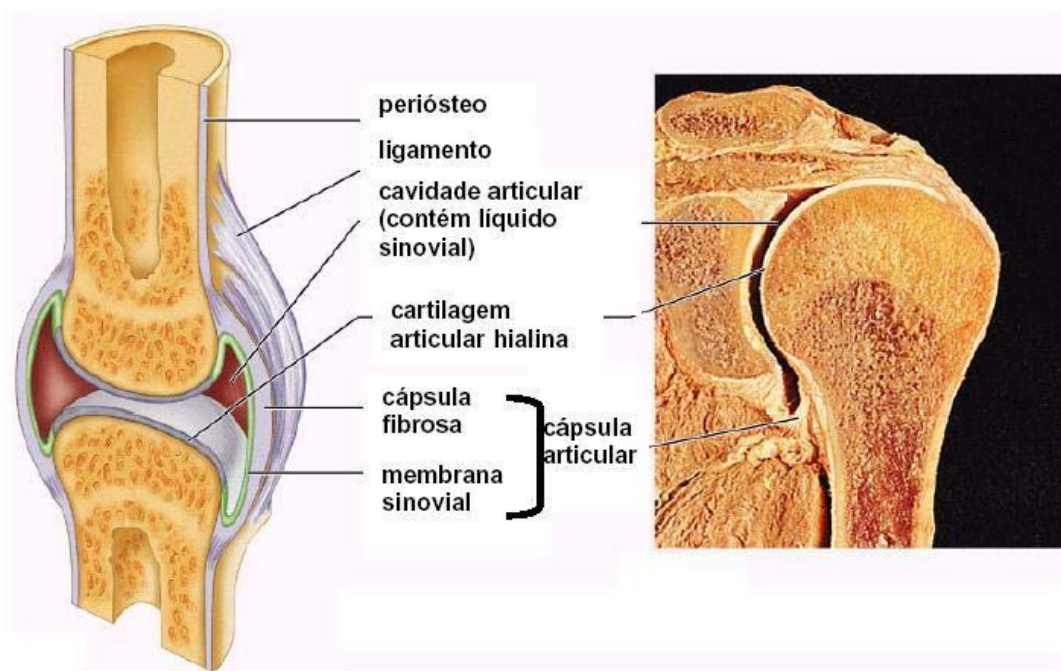


FIGURA 1- Componentes das articulações sinoviais

(Fonte: Silva, 2006)

A membrana sinovial é um componente essencial das articulações sinoviais e reveste a superfície interna da cápsula articular, recobrendo todas as estruturas intra-articulares, exceto a cartilagem articular. Esta membrana é dividida em duas partes: uma camada de revestimento adjacente ao espaço articular, chamada de revestimento ou camada íntima e a camada de suporte ou tecido subsinovial. (Roosendal e cols, 1998).

A membrana sinovial desempenha importante função na manutenção do balanço entre o processo fisiológico e as mudanças patológicas que ocorrem na articulação durante sangramentos recorrentes. É responsável pela lubrificação e nutrição dos tecidos articulares, além de regular o volume do fluido sinovial e a composição de suas macromoléculas (Roosendal e cols, 1998).

A cartilagem articular é um dos componentes da articulação que está diretamente envolvida aos efeitos deletérios do sangue dentro do processo de

dano articular. A cartilagem é formada principalmente por fibras de colágeno e moléculas grandes (agregantes proteoglicanos) além de um número relativamente pequeno de condrócitos. A cartilagem contribui com as extraordinárias propriedades da articulação, permitindo a distribuição de altas cargas compressivas e a estabilização do movimento da articulação com baixo nível de fricção. Não existem danos indicativos que a cartilagem de pacientes com hemofilia (prévio dano articular) seja diferente de pessoas saudáveis. (Roosendal e cols, 1998).

### **1.3 Doenças que acometem as articulações**

As principais doenças que acometem as articulações são: hemofilia, artrite reumatóide aguda, artrite psoriática, sinovite vilonodular pigmentada, poliartrite crônica e osteoartrite (Das e cols, 2004; Deutsch e cols, 1993; Shabat e cols, 2002).

#### **1.3.1 Hemofilia**

A hemofilia é um distúrbio hemorrágico hereditário, decorrente da deficiência ou anormalidade da atividade coagulante do fator VIII (hemofilia A) ou do fator IX (hemofilia B). Os genes que codificam a produção dos fatores VIII e IX estão localizados no cromossomo X. As alterações genéticas que determinam as hemofilias A e B são variáveis e podem estar associadas a deleções, inversões, mutações de ponte, entre outras (Lorenzi, 1999).

A hemofilia é transmitida quase exclusivamente a indivíduos do sexo masculino, por gene localizado na porção 2.8 do braço longo do cromossomo X da mãe portadora, aparentemente normal. Raramente a mulher apresenta a doença (Calegaro, 2007).

No Brasil, de acordo com o Registro de Coagulopatias Hereditárias do Ministério da Saúde (<http://portal.saude.gov.br/saude>) o número de hemofílicos atualmente registrados é de 6937 pacientes com hemofilia A e 1316 pacientes com hemofilia B.

A hemartrose (hemorragia intra-articular) é a manifestação mais comum e dolorosa com implicações econômicas, físicas e psicológicas que caracterizam o quadro debilitante da hemofilia. Sucessivas hemartroses resultam em uma patologia inflamatória e proliferativa denominada sinovite hemofílica. Com o tempo instala-se uma progressiva e incapacitante debilidade em função da progressão da destruição articular chamada de artropatia hemofílica crônica. Esta, por sua vez, é a causa mais importante de morbidade em pacientes hemofílicos adultos jovens (Bithell, 1998).

De acordo com a “Association of Hemophilia Clinic Director” do Canadá, a sinovite repetitiva resulta na destruição da cartilagem de revestimento, perda progressiva do movimento, deformidade articular, destruição óssea até a anquilose definitiva (Calegari, 2007).

As articulações mais acometidas pela sinovite hemofílica são os joelhos, cotovelos, tornozelos, quadris, ombros e punhos (Roberts e Hoffman, 1995).

No entanto, uma maneira de diminuir os episódios de hemartrose, seria a utilização de outros métodos de tratamento, como as sinovectomias. Elas podem ser químicas ou radioativas e são chamadas de sinoviortese, ou cirúrgicas como a sinovectomia aberta ou artroscópica (Silva, 2006).

### **1.3.2 Artrite reumatóide**

A artrite reumatóide (AR) é uma doença autoimune de etiologia desconhecida, caracterizada por poliartrite periférica, simétrica, que leva à deformidade e à destruição das articulações por erosão do osso e cartilagem. Afeta mulheres duas vezes mais do que os homens e a sua incidência aumenta com a idade. Em geral, acomete grandes e pequenas articulações em associação

com manifestações sistêmicas como rigidez matinal, fadiga e perda de peso (Laurindo e cols, 2002).

Os sintomas mais acentuados são: dores fortes nas articulações, mobilidade reduzida, inflamação do tecido sinovial com eventual destruição das estruturas da articulação, causando deformação e perda da função (Laurindo e cols, 2002).

Outros tipos de artrite, também relatados são: artrite psoriática, artrite reativa, osteoartrite; artrite hemofílica, espondilitis e sinovite vilonodular pigmentada entre outras (Ginelli e Boas, 2005; Laurindo, 2005).

A artrite reumatóide é a artrite mais severa na qual a maior parte do corpo sofre as conseqüências da doença, apresentando deformação das articulações e inflamação do tecido sinovial (FIG. 2) com eventual destruição das estruturas ósseas (Bois e cols, 1995).

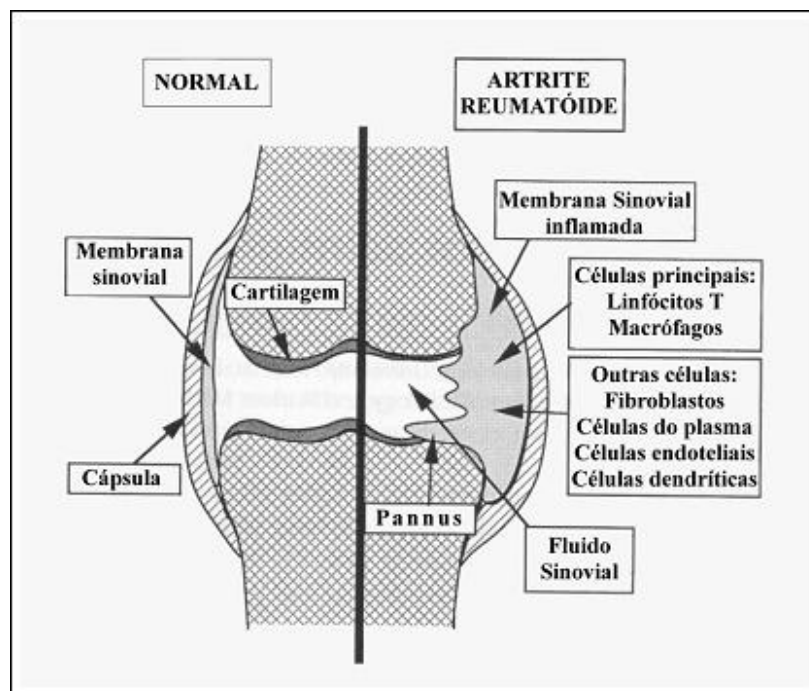


FIGURA 2 - Fisiologia normal e alterações patológicas em articulação promovidas pela artrite reumatóide

(FONTE: Barboza e cols, 2006)

Com a progressão da doença, os pacientes desenvolvem incapacidade para realização de suas atividades tanto de vida diária como profissional, com impacto econômico significativo para o paciente e para a sociedade (Laurindo, 2002).

Quando envolve outros órgãos, a morbidade e a gravidade da doença são maiores, podendo diminuir a expectativa de vida em cinco a dez anos.

Existem diversos fármacos no mercado, antiartríticos e analgésicos, que acabam sendo consumidos sem prescrição médica, com o objetivo de aliviar a dor, sem levar à cura. Estes produtos não oferecem alívio suficiente da dor, nem diminuem a inflamação nas articulações, além de ocasionar uma indisposição gástrica muito forte, que leva o paciente à desistência do uso do medicamento.

Outra modalidade terapêutica aplicada à artrite reumatóide é a radiosinovectomia que apresenta índice de sucesso de aproximadamente 80% dos casos de artrite reumatóide tratados (Kampen, 2005).

## **1.4 Tratamento das doenças articulares**

### **1.4.1 Sinovectomia química e cirúrgica**

As sinoviorteses químicas (FIG. 3) são feitas a partir de uma injeção intra-articular de um produto químico fibrosante da membrana sinovial, tal como o cloridrato de oxitetraciclina com resultados bons em curto prazo, porém têm as desvantagens de terem que ser repetidas várias vezes, além de ser um procedimento muito doloroso (Pacheco, 2006)





FIGURA 3 - Sinovectomia química com cloridrato de oxitetraciclina

(Fonte: Pacheco, 2006)

A sinovectomia artroscópica, artroscopia ou ainda sinovectomia fechada (FIG. 4), consiste em várias incisões de tamanho pequeno pelas quais são inseridos os instrumentos que possuem um sistema de lentes e iluminação, sistema este que possibilita uma melhor visualização das estruturas de dentro da articulação. Acoplado ao artroscópio, há uma câmera em miniatura, a qual irá transmitir as imagens para uma tela maior, permitindo assim a observação dos meniscos, cartilagens e ligamentos, podendo, em determinados casos, diagnosticar o tipo e o grau da lesão e, quando necessário, será feita a reparação ou correção da lesão. O tempo de duração e de recuperação depende da complexidade do problema. De forma que cada artroscopia é única para cada paciente e o tempo de recuperação dependerá do mesmo (Nabarrete, 2003).



FIGURA 4 - Sinovectomia artroscópica

(Fonte: Pacheco, 2006)

A sinovectomia aberta consiste basicamente numa inspeção articular, feita por meio da introdução de uma câmera na articulação. Uma vez determinada a tática a ser utilizada, é introduzido por outro portal um equipamento motorizado usado para raspar e aspirar a membrana sinovial (Pacheco, 2006).

De acordo com o estudo realizado por Pacheco (2006) este procedimento mostrou-se seguro e eficaz, promovendo a diminuição do número de episódios de sangramento intra-articular, porém sem impedir a progressão da degeneração articular.

De acordo com Patti e Mayo (1996) ocorrem muitas dificuldades técnicas neste método, pois as aderências fibrosas prejudicam a distensão da cavidade articular e dificultam o início do procedimento.

#### 1.4.2 Radiosinovectomia

A sinovectomia com material radioativo ou radiosinovectomia (RSV) é uma alternativa de tratamento existente para artropatia de várias etiologias e, em particular, àquelas associadas à artrite reumatóide e à hemofilia (Calegaro, 2007).

A RSV é um procedimento invasivo que utiliza injeções intra-articulares de radiofármacos cujo objetivo é estabilizar a membrana sinovial, pela ação fibrótica dos fármacos empregados.

Tem como objetivo a redução da dor, do edema e também a restauração da mobilidade e das funções articulares. A escolha do radionuclídeo a ser utilizado depende da articulação a ser tratada (Teixeira e cols, 2008).

As características ideais dos radionuclídeos para uso em RSV são:

- Tempo de meia vida curto (2 a 30 horas);
- Radiação  $\beta^-$  com energia e tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) adequados;
- Formar partículas de integridade estável (preparações coloidais ou macroagregados), biodegradáveis e que destroem a membrana sinovial inflamada permanecendo somente no espaço intra-articular;
- Radiação  $\gamma$  de baixa energia, para a medição *in-vivo*.

Os radionuclídeos mais utilizados e também os de grande interesse na preparação de radiofármacos para RSV estão representados na TAB. 1. Muitos radioisótopos têm sido sugeridos para aplicações em RSV e alguns ainda estão sendo estudados. Os principais radioisótopos utilizados são beta emissores com energia média e poder médio de penetração variando, respectivamente, entre 0,34 MeV e 0,33 mm ( $^{169}\text{Er}$ ) a 2,28 MeV e 3,6 mm ( $^{90}\text{Y}$ ) (Deutsch e cols, 1993).

TABELA 1 - Radioisótopos sugeridos para aplicações em radiosinovectomia

Radioisótopo	$t_{1/2}$ (dias)	Energia $\beta^-$ (max) (MeV)	Penetração tecidual (mm)		Energia gama (keV)
			Máxima	Média	
$^{165}\text{Dy}$	0,1	1,29 (83%)	5,7	-	95 (4%)
		1,19 (15%)	-	-	-
$^{115\text{m}}\text{In}$	0,2	0,86 (4%)	-	-	336 (47%)
		1,3 (35%)	-	-	-
$^{176\text{m}}\text{Lu}$	0,2	1,2 (65%)	-	-	-
		0,7 (51%)	-	-	-
$^{156}\text{Sm}$	0,4	0,4 (44%)	-	-	-
		2,12 (72%)	11,0	-	155 (15%)
$^{188}\text{Re}$	0,7	1,96 (25%)	-	-	-
		1,85 (51%)	8,5	-	81 (6%)
$^{166}\text{Ho}$	1,2	1,77 (48%)	-	-	-
		0,57 (75%)	-	-	319 (19%)
$^{105}\text{Rh}$	1,5	0,25 (20%)	-	-	-
		0,67 (78%)	2,5	-	103 (28%)
$^{153}\text{Sm}$	1,9	0,81 (21%)	-	-	-
		0,96 (99%)	3,6	1,2	411 (96%)
$^{198}\text{Au}$	2,7	2,28 (100%)	11,0	3,6	-
$^{90}\text{Y}$	2,7	1,07 (74%)	3,6	1,2	137 (10%)
$^{186}\text{Re}$	3,7	0,93 (21%)	-	-	-
		0,47 (87%)	-	-	396 (7%)
$^{175}\text{Yb}$	4,2	0,48 (78%)	1,7	-	208 (11%)
		0,34 (45%)	1,0	0,3	-
$^{169}\text{Er}$	9,4	0,35 (55%)	-	-	-
		1,71 (100%)	7,9	2,6	-
$^{32}\text{P}$	14	0,47 (EC-45%)	-	-	320 (10%)
$^{51}\text{Cr}$	27,8				

Fonte: Deutsch e cols, 1993

Após a injeção intra-articular do radiofármaco, os colóides ou macroagregados radioativos são fagocitados pelas células superficiais da sinóvia. Devido à irradiação ocorre a necrose da camada superficial da sinóvia a partir do primeiro dia após administração. Após o período de alguns meses, observa-se a fibrose sinovial, com a diminuição de infiltrados inflamatórios, sendo esta diminuição em tamanho e número das dobras sinoviais e na espessura das camadas adjacentes (CIS BIO-International).

O tamanho da partícula é um fator importante por garantir a permanência da mesma no espaço sinovial, sendo considerado o tamanho ideal de 5 – 20  $\mu\text{m}$ . As partículas de 1 a 10  $\mu\text{m}$  podem ser liberadas do local de aplicação, extravasando da cavidade articular e difundindo-se no organismo, causando severas lesões em outras regiões do corpo, devido à captação nos tecidos moles, em especial o fígado e a medula óssea (Pandey e cols, 2001; Deutsch e cols, 1993).

Na elaboração de radiofármacos para radiosinovectomia, o itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ) tem sido usado durante anos na forma de silicato, citrato, hidróxido férrico e em formas de resina. Com o silicato de Y-90, com tamanho de 10 a 100 nm, foi reportado um extravasamento de 5 – 10% nas primeiras 24 horas, e até 25% de extravasamento em 5 dias após administração (Gedik e cols, 2006).

De acordo com Chakraborty e cols em seus estudos utilizando itérbio-175 ( $^{175}\text{Yb}$ ) para aplicação em pequenas articulações, o tamanho ideal das partículas a serem administradas seria de 2 – 10  $\mu\text{m}$ . (Chakraborty, 2006-B).

Schneider e cols (2005) também relatam partículas de 2 – 10  $\mu\text{m}$  como sendo o tamanho ideal (Schneider, 2005).

A Tabela a seguir (TAB. 2) resume os principais radiofármacos já utilizados em radiosinovectomia, relacionando o tamanho das partículas e porcentagem de extravasamento articular observada.

TABELA 2 - Características dos radiofármacos utilizados em RSV

Radioisótopos	Aplicação	Tamanho de partículas ( $\mu\text{m}$ )	Extravasamento articular (%)
$^{198}\text{Au}$ (colóide)	Doenças articulares degenerativas	0,02-0,04	20-35
$^{32}\text{P}$ (fosfato crômico)	AR	0,05-0,1	2-4
$^{186}\text{Re}$ (sulfito)	AR, hemofilia	0,05-0,1	2
$^{90}\text{Y}$ (colóide)	AR, hemofilia	1,5-3,5	3
$^{166}\text{Ho}$ (FHMA)	AR	1,2-12	1
$^{165}\text{Dy}$ (FHMA)	AR	0,8-12	1
$^{169}\text{Er}$ (citrato)	AR, hemofilia	0,1-10	1
$^{153}\text{Sm}$ (HA)	AR	1-10	0,1

FHMA = Macroagregados de hidróxido férrico

HA = hidroxiapatita

O tratamento de articulações com material radioativo começou na década de 1950, mais especificamente em 1952, com  $^{32}\text{P}$  na forma de fosfato crômico, por Fellingner e Schmid. Visando a princípio tratar articulações de pacientes com artrite reumatóide, em menor escala, a sinovite nodular pigmentada, espondilite anquilosante, colagenoses e artrite psoriática nos anos que se seguiram (Albherg, 1971 e Siegel, 1997; Ugur e cols, 2008).

O  $^{198}\text{Au}$  coloidal foi utilizado em 1963, por Ansell e cols, sendo relatada a desvantagem relacionada ao extravasamento da amostra da articulação para os linfonodos regionais, corrente sanguínea e sistema reticulo endotelial. No mesmo ano, 1963, Ansell e cols recomendaram o tratamento com  $^{90}\text{Y}$  para radiosinovectomia (Pavelka e cols, 1975). Porém, este radioisótopo só foi aplicado com esta finalidade em 1968, por Delbarre e cols (Das e cols, 2004; Dorenbosch e cols, 2000; Chrapko, 2007). No mesmo ano, em 1968, Delbarre introduziu o termo

“sinoviortese”, que deriva do grego *orthesis* e significa “restauração da sinóvia” (Chrapko, 2007).

Em 1973 Gumpel publicou seu trabalho sobre o uso de resina colóide- $^{90}\text{Y}$  onde concluiu que a dose do radiofármaco administrado na articulação do joelho dos pacientes permanecia retida em aproximadamente 77 – 82% dos pacientes por até 5 dias (Gumpel e cols, 1973 e 1974).

Menkes, em 1972, tratou 460 pacientes com artrite reumatóide ou artropatia psoriática usando radiosinovectomia (1240 radiosinovectomias) e acompanhou os mesmos durante 1 a 2 anos após a injeção. Em seu trabalho pode concluir que houve uma significativa diminuição da inflamação articular na maioria dos pacientes tratados (Gumpel, 1973).

Em 1975, Bowen e cols desenvolveram o citrato coloidal de  $^{90}\text{Y}$ . Nos experimentos realizados em 28 pacientes foi observado que não houve extravasamento articular do radiofármaco administrado no joelho, não foi observado nenhum efeito colateral e ocorreu a diminuição da dor e inflamação e aumento da mobilidade articular (Bowen, 1975).

Spooren e cols, em 1985, trataram 33 pacientes com artrite reumatóide utilizando citrato coloidal de  $^{90}\text{Y}$ , onde a maioria dos pacientes relatou uma significativa redução da dor e melhora na mobilidade articular (Spooren e cols, 1975).

Nos anos de 1990, houve o renascimento da radiosinovectomia e o número de pacientes tratados tem crescido desde então. As indicações mais comuns para RSV são para artrite reumatóide correspondendo a 71% das aplicações, sendo que a articulação do joelho é a mais tratada, cerca de 46% dos casos (Chrapko e cols, 2007).

A partir de então, muitos estudos foram realizados utilizando diferentes radionuclídeos para o tratamento de patologias relacionadas às articulações. (Flores e cols, 2004).

Deutsch, em 1993, relatou o avanço da RSV a partir dos estudos de marcação de macroagregados de partículas insolúveis, com grande atenção no

tamanho das partículas formadas, evitando assim o extravasamento das mesmas da articulação. (Deutsch e cols, 1993).

De 1980 a 1990 foi realizada radiosinovectomia em 21 articulações (19 pacientes) com silicato de  $^{90}\text{Y}$  em 19 pacientes hemofílicos, tendo sido observada uma redução de 94% nos episódios de hemartroses (Van Kasteren e cols, 1993).

Em um levantamento bibliográfico realizado por Clunie e Ell, em 1995, foram identificadas até então 13450 articulações tratadas com radiosinovectomia na Europa, sendo utilizados 8 diferentes radiofármacos, entretanto o mais utilizado foi o citrato coloidal de  $^{90}\text{Y}$  para articulação do joelho, e o  $^{169}\text{Er}$  coloidal em articulações dos dedos (Clunie e Ell, 1995).

Macroagregados de hidróxido férrico (FHMA) marcados com disprósio-165 ( $^{165}\text{Dy}$ ) foram os primeiros macroagregados avaliados e, de fato, não reduziram muito o extravasamento da dose de radiação nos tecidos não alvo (Deutsch e cols, 1993).

No caso do ouro radiocoloidal ( $^{186}\text{Au}$ ), valores acima de 48% foram relatados como extravasamento da cavidade através da drenagem de linfonodos. Além disto, o radionuclídeo emite uma energia gama (411 keV) desnecessária ao paciente (Gedik, 2006).

O  $^{90}\text{Y}$  tem sido o isótopo de preferência para radiosinovectomia das articulações do joelho desde os anos de 1970 (Taylor e cols, 1997).

O  $^{90}\text{Y}$  apresenta características físicas adequadas (TAB. 1) decaindo para  $^{90}\text{Zr}$  estável, com emissão  $\beta^-$  de alta energia de radiação (2,28 keV), com alcance máximo no tecido de 11 mm, apropriada para tratamento de artrite reumatóide e hemartroses em grandes articulações como o joelho. Outra vantagem é a disponibilidade de obtenção do radioisótopo a partir de um gerador de  $^{90}\text{Sr} / ^{90}\text{Y}$ , com um  $t_{1/2}$  de 28,8 anos do  $^{90}\text{Sr}$ , possibilitando seu uso por um longo período de tempo, sendo o  $^{90}\text{Y}$  obtido em forma estável, livre de carregador e com alta atividade específica (Pandey e cols, 2001).

O uso do citrato coloidal de  $^{90}\text{Y}$  foi descrito primeiramente por Bowen e cols em 1975. Segundo o autor, o Citrato de  $^{90}\text{Y}$ , dentre os radiofármacos disponíveis



para RSV, contém os três principais critérios de um radiofármaco para sinovectomia: preparação estável, destrói somente a membrana sinovial e não escapa do espaço intra-articular.

Um estudo comparativo entre a radiosinovectomia e a mesma associada ao uso de glicocorticóides realizado por Jahangier e cols (2005) mostrou que a RSV com  $^{90}\text{Y}$  deve ser considerada o tratamento de escolha para pacientes com artrite persistente no joelho (Jahangier e cols, 2005).

Por sua vez, o  $^{177}\text{Lu}$  é considerado um radionuclídeo muito promissor para uso em radiosinovectomia de pequenas e médias articulações, como a do cotovelo, devido às suas propriedades físicas favoráveis (tabela 1). Além disto, apresenta poder de penetração tecidual de 1,7 mm e facilidade de produção em reator nuclear por meio de reação ( $n,\gamma$ ) a partir da irradiação de alvos de  $^{176}\text{Lu}$ . O  $^{177}\text{Lu}$  pode ser produzido por dois métodos diferentes, diretamente, irradiando-se alvos naturais de óxido de lutécio ( $\text{Lu}_2\text{O}_3$ ) ( $^{176}\text{Lu}$ , 2,6%) ou em alvos de  $\text{Lu}_2\text{O}_3$  enriquecidos em  $^{176}\text{Lu}$ , e também indiretamente, irradiando-se os alvos de óxido de itérbio ( $\text{Yb}_2\text{O}_3$ ), acompanhado pela separação radioquímica dos isótopos de lutécio e itérbio (Rosch, 2007, Chakraborty e col, 2008; Pillai e cols, 2003).

A hidroxiapatita [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ] (HA) é o maior componente do esqueleto (matriz óssea). Este material inorgânico comprovou ser biodegradável em estudos em modelos animais. O desaparecimento do material nos tecidos se dá num período de dias a semanas, sendo totalmente eliminado do corpo de um a dois meses. Partículas de tamanho ideal têm sido preparadas, e a natureza química deste substrato faz com que ele seja facilmente marcado por uma variedade de metais lantanídeos (Deutsch e cols, 1993).

A HA marcada com  $^{90}\text{Y}$  apresenta propriedades ótimas para uso em sinovectomia (Ramsey, 1973). Entretanto, alguns autores discutem sobre o dano das células na sinóvia e a dispersão das partículas no joelho. Hiltunen (2000) aponta o efeito da HA como o mais agressivo e de maior dano celular (Hiltunen, 2000).

Kampen e cols (2006) concluíram em seus estudos que as complicações locais após radiosinovectomia são muito raras. (Kampen e cols, 2006).

De acordo com Das (2007), a radiosinovectomia não causa praticamente nenhum efeito colateral, sendo reportado 1 caso em 35.000 pacientes de infecção articular causada após administração do radiofármaco. A baixa incidência de infecção é devida, em parte, à alta concentração de radiação beta emitida pelo material radioativo na articulação, causar a inviabilização de todas as bactérias presentes (Das e cols, 2007).

De acordo com o guia específico da Associação Européia de Medicina Nuclear (EANM) para uso de radiofármacos em radiosinovectomia, logo após a administração do radiofármaco pode ocorrer um aumento da inflamação sinovial e, tardiamente, a radionecrose, porém ambos os efeitos são raros (Guidelines EANM).

Atualmente, com estudos de acompanhamento mais prolongados, a RSV tem mostrado beneficiar artropatias reumáticas e hemofílicas que apresentam seqüência de eventos semelhante: hemorragia intra-articular repetitiva, causando reação inflamatória da sinóvia, com dor articular, limitação da mobilidade e posterior atrofia muscular (Calegari, 2007).

A radiosinovectomia (RSV) tem sido o procedimento de escolha em muitas instituições para o tratamento de hemartrose recorrente e sinovite crônica em pacientes nos quais a hemofilia não consegue ser controlada com medicamentos (Turkmen e cols, 2005).

De acordo com a EANM os radiofármacos aprovados e recomendados para uso em radiosinovectomia na Europa são: o citrato / silicato de  $^{90}\text{Y}$ , sulfato de  $^{186}\text{Re}$  e o Citrato de  $^{169}\text{Er}$ .

Em virtude das características do radionuclídeo, as partículas coloidais de Y-90 são indicadas apenas para articulação do joelho. A atividade recomendada para aplicação em cada articulação do joelho é de 185-222 MBq (5-6 mCi).

Em função das propriedades físicas do  $^{186}\text{Re}$  (TAB. 1) que determinam uma penetração tecidual inferior à do  $^{90}\text{Y}$  (1,1 mm), sua aplicação é recomendada em

articulações de quadril, ombro, cotovelo, pulso, tornozelo e em articulação subtalar. A atividade e o volume do radiofármaco a ser administrado variam de acordo com cada articulação (TAB. 3).

TABELA 3 - Volume e atividade de sulfito de  $^{186}\text{Re}$  para cada articulação de acordo com a EANM

Articulação	Atividade administrada	Volume recomendado
	MBq (mCi)	(mL)
Quadril	74-185 (2-5)	3
Ombro	74-185 (2-5)	3
Cotovelo	74-111 (2)	1-2
Pulso	37-74 (1-2)	1-1,5
Tornozelo	74 (2)	1-1,5
Articulação subtalar	37-74 (1-2)	1-1,5

Fonte: Guidelines EANM

No caso do  $^{169}\text{Er}$ , sua aplicação é recomendada em articulações metacarpofalangeal, metatarsofalangeal e interfalangeal. A atividade e o volume do radiofármaco a ser administrado variam de acordo com cada articulação (TAB. 4). A atividade de citrato de  $^{169}\text{Er}$  a ser administrada a cada sessão não deve ultrapassar 370 MBq (10 mCi).

TABELA 4 - Volume e atividade de citrato coloidal de  $^{169}\text{Er}$  para cada articulação de acordo com a EANM

<b>Articulação</b>	<b>Atividade administrada MBq (mCi)</b>	<b>Volume recomendado (mL)</b>
Metacarpofalangeal	20-40 (0,5-1)	1
Metatarsfalangeal	30-40 (0,8-1)	1
Interfalangeal proximal	10-20 (0,3-0,5)	0,5

Fonte: Guia de procedimentos da EANM

As contra indicações à radiosinovectomia, de acordo com o guia da EANM, são:

- Gravidez;
- Câncer de mama;
- Infecção de pele local;
- Ruptura do cisto popliteal (joelho);
- Em pacientes com menos de 20 anos de idade a radiosinovectomia só deve ser aplicada se os benefícios do tratamento forem mais importantes que os potenciais danos;
- Pacientes com instabilidade articular extensiva com destruição óssea;
- Evidência de perda significativa da cartilagem dentro da articulação.

No Brasil, desde 2003 é produzido quinzenalmente na Diretoria de Radiofarmácia do IPEN a Hidroxiapatita marcada com  $^{153}\text{Sm}$ , para aplicação em artrite reumatóide.

O IPEN tem importado o citrato coloidal de Y-90 da empresa CIS Bio (França) para distribuir a serviços de medicina nuclear que realizam procedimentos de radiosinovectomia, dado o interesse manifestado por alguns médicos nucleares pela utilização do isótopo ítrio-90, com maior poder de penetração tecidual, no tratamento de grandes articulações.

A partir de 2003, o IPEN em convênio com o Instituto de Medicina Nuclear (IMN / Cuiabá-MT) e o Hemocentro de Mato Grosso (MT Hemocentro), propiciou o início da radiosinovectomia de forma pioneira no país utilizando-se radiofármaco marcado com  $^{90}\text{Y}$ , em um protocolo clínico que envolveu pacientes hemofílicos originados de 20 centros de referência de tratamento desta doença no Brasil. O protocolo clínico coordenado pelo Dr Paulo Eduardo Assi utilizou, inicialmente, o Citrato de Ítrio-90 (Cit- $^{90}\text{Y}$  – CIS Bio) para a realização da radiosinovectomia em artropatia hemofílica crônica. Até julho de 2008 foram tratadas 293 articulações de pacientes com hemofilia ou Doença de Willebrand com sinovite crônica (comunicação pessoal).

Em 2006, o IPEN passou a produzir a hidroxiapatita marcada com  $^{90}\text{Y}$  (HA- $^{90}\text{Y}$ ) para uso intra-articular, a partir dos resultados preliminares deste trabalho. A partir de então, os pacientes começaram a ser tratados com HA- $^{90}\text{Y}$  (IPEN) ou Cit- $^{90}\text{Y}$  (CIS Bio), tendo sido realizadas 49 infiltrações com a HA- $^{90}\text{Y}$  até junho de 2008. Foram comparados o número de hemartroses 12 meses antes e em intervalos de 12 meses após o procedimento. Foi observada uma diminuição global dos sangramentos em todas as articulações com o uso do Cit- $^{90}\text{Y}$  bem como da HA- $^{90}\text{Y}$ , não tendo sido observado nenhum efeito colateral significativo (Assi, 2008).

Segundo informações fornecidas pela Dra. Silvia Thomas, presidente da Federação Brasileira de Hemofilia, o tratamento de um episódio de hemartrose custa cerca de U\$ 720. A interrupção do ciclo de hemartroses recorrentes (média de 12 episódios de hemartrose/ano) em apenas um único paciente que tenha apresentado resultado excelente à radiosinovectomia representa uma economia de U\$ 8.640 por ano.

Isso exemplifica o potencial que a radiosinovectomia tem em relação à economia no tratamento das hemartroses, abrindo oportunidades de maior disponibilidade de concentrados dos fatores de coagulação para as modalidades de tratamento que demonstram poupar as crianças das seqüelas da hemofilia.

Este tratamento, a profilaxia primária, exige, entretanto uma maior quantidade dessas medicações e o que ainda não está disponível no Brasil (Assi, 2008).

Os resultados preliminares do estudo clínico realizado em Cuiabá mostram uma redução do número de hemartroses superior a 80% em mais de 50% dos casos, para todas as articulações tratadas. No item dor, antes e um ano após a aplicação, evidenciou-se redução em 100% no escore inicial para 50% em todos os casos estudados. Houve, portanto, importante melhora na qualidade de vida dos pacientes (Assi, 2008).

### **1.5 Obtenção de partículas radiomarcadas**

Os procedimentos de preparações radiofarmacêuticas de colóides ou de macroagregados geralmente envolvem a coprecipitação do radionuclídeo e da partícula em uma única etapa. Duas principais metas devem ser alcançadas no processo de marcação: a geração de partículas de tamanho ideal, e as partículas devem ser quantitativa e irreversivelmente radiomarcadas, com estabilidade *in-vivo* e *in-vitro* adequadas (Deutsch e cols, 1993).

As técnicas de radiomarcagem da hidroxiapatita descritas na literatura são bem semelhantes, variando principalmente na velocidade e tempo de centrifugação e massa de hidroxiapatita.

Nos experimentos de Chakraborty e cols, na marcação de HA com  $^{175}\text{Yb}$ , foi realizado um estudo sobre a massa de hidroxiapatita utilizada na marcação. A massa estudada variou de 10 a 40 mg, sendo concluído neste trabalho que a massa de 10 mg de hidroxiapatita é suficiente para obtenção de ótimos resultados de rendimento de marcação (Chakraborty, 2006-B).

Num estudo de marcação da hidroxiapatita com  $^{166}\text{Ho}$ , foi analisada também a massa de HA de 20 a 100 mg e os melhores resultados foram obtidos com a utilização de 40 mg de HA. Neste mesmo trabalho, os autores descrevem a

variação do pH de marcação, tendo obtido bons resultados em diferentes pH. Devido ao fato das partículas de hidroxiapatita serem dissolvidas em pH ácido (pH 3,0), e também ao fato do pH fisiológico ser aproximadamente 7,0, este pH foi definido como o mais adequado para o produto radiomarcado (Unni, 2002).

Na variável do tempo de agitação da amostra, durante o procedimento de marcação, alguns trabalhos da literatura demonstram experimentos com diferentes tempos de agitação, como por exemplo, o trabalho de Khalid e cols (2005), na marcação de HA com  $^{90}\text{Y}$ , onde é descrita a necessidade de centrifugação da amostra durante uma hora. Outros autores como Chattopadhyay e cols (2008) descrevem que o processo de agitação da amostra durante 30 minutos é suficiente para obtenção de ótimos resultados de marcação.

Quanto à centrifugação da amostra, como técnica de purificação, utilizada para separar as partículas radiomarcadas do radionuclídeo livre no sobrenadante, a velocidade da mesma variou de 1000 a 3000 rpm, e de 5 a 10 minutos de centrifugação, dependendo do estudo considerado (Khalid, 2005; Chattopadhyay, 2008; Unni, 2002; Chakraborty, 2006-A).

Na maioria dos protocolos descritos na literatura, o controle de qualidade das marcações foi realizado por meio de centrifugação da amostra, separando-se precipitado e sobrenadante para análise concomitante do rendimento de marcação, e por meio de cromatografia ascendente, realizada para determinação da pureza radioquímica da amostra.

### **1.5.1 Tamanho das partículas**

A determinação do tamanho de partículas coloidais tem sido um problema de grande importância em medicina nuclear, desde que foi reportado afetar no comportamento biológico do radiofármaco (Billinghurst e Jette, 1979).

A aplicação e utilidade das técnicas de determinação do tamanho e forma de partículas da amostra devem ser considerados fatores importantes na seleção do método apropriado para sua avaliação. De acordo com Warbick e cols (1977) outros parâmetros devem ser considerados para a seleção das técnicas:

- Forma e polimorfismo das partículas;
- O número de componentes do sistema;
- A estabilidade das partículas (agregação, floculação e coagulação);
- A facilidade de preparação e de análise da amostra;
- A reprodutibilidade e precisão da técnica;
- A disponibilidade.

As principais técnicas de determinação do tamanho de partículas são: filtração por meio de membranas filtrantes, ultracentrifugação e microscopia eletrônica (Billinghurst e Jette, 1979).

O uso de membranas filtrantes para determinação do tamanho de partículas presentes na amostra é uma técnica rápida e de fácil reprodução, por isso foi a técnica de escolha utilizada neste trabalho. O método baseia-se na utilização de membranas filtrantes de poros de diferentes tamanhos que possibilitam separar as partículas presentes em solução por faixas de tamanho.

A técnica de ultracentrifugação é um processo muito lento onde há a necessidade de um controle muito cuidadoso, tendo em vista a grande variedade de gradientes e condições de centrifugação utilizadas para cada tipo de partícula a ser analisada. Devido a isto, é muito comum a ocorrência de erros experimentais causados pela decantação da amostra (Warbick e cols, 1977).

A técnica de microscopia eletrônica é uma técnica extremamente avançada e de objetivo amplo ([www.bio.ufpr.br](http://www.bio.ufpr.br)).

A escolha pelo método de determinação do tamanho de partículas foi baseada na disponibilidade de equipamentos na Diretoria de Radiofarmácia (DIRF).



## 2 OBJETIVO

O presente trabalho objetivou estudar a marcação de compostos com  $^{90}\text{Y}$  e  $^{177}\text{Lu}$  visando otimizar as condições de produção e controle de qualidade de pureza radioquímica, avaliar a estabilidade dos produtos gerados e realizar estudos preliminares de biodistribuição animal de radiofármacos com potencial para aplicação em radiosinovectomia.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

Este trabalho foi realizado na Diretoria de Radiofarmácia (DIRF) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), o qual disponibilizou toda a infraestrutura e materiais necessários para o desenvolvimento do mesmo. Os principais materiais utilizados neste trabalho foram:

##### 3.1.1 Equipamentos e sistemas

- Agitador magnético com aquecimento, Fisatom, 752<sup>a</sup>, Brasil
- Agitador de tubos de 1,5 mL, Thermomix, Confort Eppendorf , EUA
- Autoclave vertical, 415, Fanem, Brasil
- Balança analítica, Ohaus, Explorer, EUA
- Bomba de vácuo, Fisatom, 825T, Brasil
- Câmara de ionização, Capintec Inc., CRC<sup>R</sup>-35R, EUA
- Centrífuga de tubos, CF 7D2, Himac Hitachi, Japão
- pHmetro Tecnopon, Brasil
- Freezer, LS Logen Scientific, Thermostatic Cabinets, EUA
- Geladeira vertical, 253L, Eletrolab, Brasil
- Gama-câmara, Medical Imagem System - Mediso<sup>®</sup>, Nucline TH 22, Hungria
- Sistema de filtração de partículas, utilizando:
  - Filtro em polipropileno, 13 mm de diâmetro, tipo Swinnex – Millipore
  - Membrana de éster celulose com poros de 5 µm, Millipore

- Membrana de éster celulose com poros de 3  $\mu\text{m}$ , Millipore
- Membrana filtrante Isopore<sup>TM</sup> – RTTP com poro de 1,2  $\mu\text{m}$ , Millipore
- Membrana filtrante Isopore<sup>TM</sup> – TSTP com poro de 3,0  $\mu\text{m}$ , Millipore
- Membrana filtrante Isopore<sup>TM</sup> – TMTP com poro de 5,0  $\mu\text{m}$ , Millipore
- Membrana filtrante Isopore<sup>TM</sup> – TETP com poro de 8,0  $\mu\text{m}$ , Millipore
- Membrana filtrante Isopore<sup>TM</sup> – TCTP com poro de 10,0  $\mu\text{m}$ , Millipore
- Membrana filtrante Isopore<sup>TM</sup> – TKTP com poro de 12,0  $\mu\text{m}$ , Millipore

### 3.1.2 Reagentes e solventes

- Acetato de sódio trihidratado p.a.,  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , Merck, Brasil
- Ácido cítrico monohidratado p.a.,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , Synth, Brasil
- Ácido clorídrico p.a.,  $\text{HCl}$ , Merck, Brasil
- Ácido acético glacial 100% p.a.,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , Merck, Brasil
- Água estéril para injeção, Asterflex, Brasil
- Bicarbonato de sódio,  $\text{NaHCO}_3$ , Sigma Aldrich, Brasil
- Cetamina 10%, Syntec, Brasil
- Citrato de sódio p.a.,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – Merck, Brasil
- Cloreto de ítrio-90 ( $^{90}\text{YCl}_3$ ), Nordion, Canadá
- Cloreto de lutécio-177 ( $^{177}\text{LuCl}_3$ ), IDB, Holanda
- DTPA – ácido dietileno triamino pentacético, Sigma Aldrich, Brasil
- Hidroxiapatita (20  $\mu\text{m}$ ),  $[(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)]$  - Bio Rad, Califórnia
- Hidróxido de sódio p.a.,  $\text{NaOH}$ , Reagen, Brasil
- Nitrato de Ítrio,  $\text{N}_3\text{O}_9\text{Y}$  Merck, Brasil
- Óxido de lutécio Sigma Aldrich, Brasil
- Resina Chellex, Bio Rad, Califórnia
- Solução de xilazina 2%, Sedafarm, Farmabase, Brasil

- Suspensão coloidal de Citrato de  $^{90}\text{Y}$  Cis Bio International, França.

### 3.1.3 Soluções

- Solução de bicarbonato de sódio 0,5 mM
- Solução de nitrato de ítrio 2 mM e 4 mM
- Solução de citrato de sódio 10 mM e 20 mM
- Solução de NaOH 0,1 M e 0,04 M
- Solução de NaCl 0,9% e 8,4%
- Solução de NaCl 0,9% com pH ajustado em 3,0 utilizando-se solução HCl 0,1 M
- Solução de HCl 0,1 M e 0,04 M
- Tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5
- Solução de DTPA 2,5 mM e 5 mM

### 3.1.4 Outros

- Cubas de vidro com tampa e suporte para fitas cromatográficas
- Fita indicadora de pH, Merck, Alemanha
- Fitas cromatográficas de sílica gel (ITLC-SG - *Instant Thin Layer Chromatography-silica gel*), Pall Life Sciences, EUA
- Fitas cromatográficas de papel alumínio recobertas com fina camada de sílica gel 60 (TLC-SG - *Thin Layer Chromatography-silica gel*), Merck, Brasil
- Fitas de papel para cromatografia 3MM Chr, Whatman<sup>®</sup>
- Óleo de silicone
- Material plástico descartável (ponteiras, seringas e tubos de reação)
- Pipetas automáticas

- Unidade filtrante descartável Millex GV - Millipore, Brasil
- Vidrarias de laboratório em geral

### 3.1.5 Animais

Ratos *Wistar*, adultos, machos, pesando entre 250 a 300 g, fornecidos pelo biotério IPEN-CNEN/SP.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Produção de citrato coloidal de $^{90}\text{Y}$

O estudo da produção deste radiofármaco foi baseado no trabalho de Bowen e cols (1975). O Ítrio-90 foi adquirido na forma de solução de cloreto de ítrio ( $^{90}\text{YCl}_3$ ). A solução de  $^{90}\text{YCl}_3$  contendo aproximadamente 37 - 54 MBq (1 - 2 mCi) foi levada à secura em banho-maria a aproximadamente 100° C em frasco de vidro previamente esterilizado, seguida da adição de 1,5 mL de solução de nitrato de ítrio 2 mM, 0,1 mL de citrato de sódio 10 mM e 2,4 mL de água estéril. Ajustou-se o pH da solução em 7,0 com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M. A mistura de reação foi aquecida em banho-maria à 37° C durante 30 minutos. Em seguida, a amostra foi autoclavada à 121° C por 20 minutos e submetida às análises de controle de qualidade.

Foram estudados os seguintes parâmetros de marcação:

- Secagem da solução de  $^{90}\text{YCl}_3$  em banho de óleo de silicone a 150° C;
- Agitação da amostra: foram analisados diferentes tipos de agitação, como a magnética (leve e forte), a manual (de tempos em tempos) e agitação com o auxílio de equipamentos desenvolvidos na DIRF (agitação contínua do tipo magnética, onde o magneto permanecia dentro do frasco de reação);

- Atividade de marcação: 37 a 74 MBq;
- Variação da concentração das soluções utilizadas no procedimento de marcação. Sendo elas:
  - Solução Nitrato de ítrio 4 mM
  - Solução citrato de sódio 20 mM

### 3.2.2 Produção de hidroxiapatita (HA) marcada com $^{90}\text{Y}$

Baseado no procedimento de marcação da HA com  $^{153}\text{Sm}$ , realizado na Diretoria de Radiofarmácia do IPEN, em um frasco de reação adicionou-se 15 mg de ácido cítrico, 0,95 mL de HCl 0,1 N, 0,4 mL de nitrato de ítrio 2 mM, e a solução de  $^{90}\text{YCl}_3$  (37 – 370 MBq). Incubou-se a mistura durante 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 40 mg de hidroxiapatita dissolvida em 0,8 mL de água estéril para injeção. Em seguida, a solução foi incubada à temperatura ambiente durante 30 minutos sob forte agitação e o volume foi levado a 5 mL com NaCl 0,9%. A amostra foi centrifugada a 2000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi reservado e o precipitado foi ressuspendido com 1 – 2 mL de NaCl 0,9%. Este procedimento de lavagem foi repetido 3 vezes. Em seguida, a amostra foi autoclavada à 121° C durante 20 minutos e submetida às análises de controle de qualidade.

Para a marcação da HA com  $^{90}\text{Y}$ , foram estudados os seguintes parâmetros de marcação:

- Volume da solução de nitrato de ítrio 2 mM: 200, 300 e 400  $\mu\text{L}$ ;
- Atividade de marcação: 37 a 370 MBq;
- Tempo de incubação: 15 e 30 minutos;
- Necessidade de lavagem da amostra por centrifugação para remoção de partículas nanocoloidais.

### 3.2.3 Produção de HA marcada com $^{177}\text{Lu}$

Baseando-se no artigo descrito por Chakraborty e cols (2006-A) adicionou-se em um tubo do tipo falcon 0,1 mL da solução de  $^{177}\text{LuCl}_3$  (296 MBq), 0,2 mg de óxido de lutécio, 5 mg de hidroxiapatita e 0,8 mL de solução NaCl 0,9%. Adicionou-se cerca de 0,1 mL de solução de bicarbonato de sódio 0,5 M (para acertar o pH em aproximadamente 9). A solução foi agitada e seu pH foi ajustado para 7,0 com solução de HCl 0,1 M. Após agitação contínua (agitador mecânico) à temperatura ambiente durante 30 minutos, a amostra foi centrifugada à 1000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante e precipitado foram cuidadosamente separados, ao precipitado foi adicionado 1 mL de solução de NaCl 0,9% e novamente submetido à centrifugação. Este processo de lavagem foi repetido duas vezes. Ao produto final foi adicionado 2 mL de NaCl 0,9%. Após o procedimento de marcação a amostra foi autoclavada à 121° C por 20 minutos. A amostra final foi submetida às análises de controle de qualidade.

Na marcação da HA com  $^{177}\text{Lu}$ , foram estudados os seguintes parâmetros de marcação:

- Atividade de marcação: 37 - 370 MBq;
- Quantidade de óxido de lutécio: 0, 100, 200 e 400  $\mu\text{g}$ ;
- Quantidade de hidroxiapatita: 5 e 20 mg;
- Estudo da marcação da hidroxiapatita com  $^{177}\text{Lu}$  seguindo o procedimento padrão, porém, sem alteração de pH no momento da marcação, isto é, sem a adição de bicarbonato de sódio e ácido clorídrico no momento da reação.
- Estudo da marcação de HA com Lu-177 seguindo o protocolo de marcação da HA com Y-90, utilizando-se 15 mg de ácido cítrico e 40 mg de hidroxiapatita.

### 3.2.4 Controle de qualidade das marcações

#### 3.2.4.1 Análise do rendimento de marcação da HA-<sup>90</sup>Y, HA-<sup>177</sup>Lu e Citrato coloidal de <sup>90</sup>Y

O rendimento das marcações foi determinado por meio de centrifugação. As misturas resultantes das marcações foram centrifugadas a 2000 rpm durante 5 minutos no final de cada reação. Em seguida o sobrenadante foi separado cuidadosamente do precipitado e a atividade de ambos medida em câmara de ionização (calibrador de dose) sendo que, no sobrenadante estavam as partículas menores radiomarcadas e os radioisótopos livres (<sup>90</sup>Y<sup>+3</sup> e <sup>177</sup>Lu<sup>+3</sup>), e no precipitado as partículas marcadas com <sup>90</sup>Y e <sup>177</sup>Lu. Em um calibrador de dose foi feita a leitura da atividade das amostras e a porcentagem de cada fração foi determinada. O produto final (precipitado) foi reconstituído em 1,0 – 2,0 mL de solução NaCl 0,9%. O cálculo do rendimento de marcação foi realizado por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento de marcação} = \frac{\text{Atividade do precipitado}}{\text{Atividade total}} \times 100$$

#### 3.2.4.2 Análise da pureza radioquímica

A análise de pureza radioquímica das marcações foi realizada por meio de cromatografia líquida ascendente utilizando diferentes sistemas cromatográficos, onde as fitas foram cortadas em segmentos de 1 cm e submetidos a contagem em contador gama para determinação da radioatividade em contagens por minutos (cpm). Alguns autores, como Bowen e cols (1975) descreveram a obtenção de ótimos resultados nos controles cromatográficos do Cit-<sup>90</sup>Y utilizando como fase



estacionária papel Whatman 3MM e como solvente solução NaCl 0,9%. Para o controle da HA-<sup>90</sup>Y utilizou-se o mesmo sistema cromatográfico do Cit-<sup>90</sup>Y.

A pureza radioquímica da HA-<sup>177</sup>Lu foi determinada segundo Chakraborty e cols (2006-A), utilizando-se papel Whatman 3MM como suporte e solução de DTPA 5 mM como solvente.

Alternativamente, foram estudados outros sistemas cromatográficos, sendo eles: cromatografia em camada delgada de sílica gel 60 (TLC-SG) como suporte e soluções de NaCl 0,9% pH 3,0, NaCl 8,4% e tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 como solventes no estudo do Cit-<sup>90</sup>Y. Na análise da HA-<sup>90</sup>Y foram estudados como suporte TLC-SG e como solvente solução DTPA 2,5 mM e no estudo da HA-<sup>177</sup>Lu utilizou-se ITLC-SG, TLC-SG como suportes e soluções DTPA 2,5 mM e NaCl 0,9% como solventes.

A TAB. 5 a seguir resume os sistemas cromatográficos já descritos na literatura, empregados na determinação da pureza radioquímica das três marcações estudadas.

TABELA 5 - Sistemas cromatográficos empregados na determinação da pureza radioquímica das marcações

Radiofármaco	Suporte	Solvente	Rf* das espécies radioquímicas
Citrato coloidal de <sup>90</sup> Y	papel	solução	Cit- <sup>90</sup> Y = 0,0
	Whatman 3MM	NaCl 0,9%	<sup>90</sup> Y <sup>+3</sup> = 0,9
HA- <sup>177</sup> Lu	papel	solução	HA- <sup>177</sup> Lu = 0,0
	Whatman 3MM	DTPA 5 mM	<sup>177</sup> Lu <sup>+3</sup> = 1,0

Rf\* = distância de migração da espécie radioquímica em relação à frente do solvente

As amostras dos radiofármacos foram armazenadas por até 7 dias, em solução salina 0,9% à temperatura ambiente, para controle da estabilidade *in-vitro*

realizado por meio de sistema de cromatografia ascendente, conforme descritos acima.

### **3.2.4.3 Análise do tamanho das partículas**

Alíquotas de 0,3 – 0,5 mL de Cit-<sup>90</sup>Y, HA-<sup>90</sup>Y e HA-<sup>177</sup>Lu foram filtradas em membranas filtrantes (Millipore<sup>®</sup>) de diferentes tamanhos de poros, posicionadas em seqüência e ordem decrescente (12, 8, 5, 3, 2, 1,2 e 1 µm) seguidas de 5 mL de NaCl 0,9% e ar, sendo que em cada tipo de marcação foi utilizada uma determinada faixa de tamanho de poros. As atividades retidas nos filtros e no filtrado foram medidas num calibrador de dose para determinação das porcentagens relativas a cada faixa de tamanho. A FIG. 5 representa o esquema de montagem dos filtros para determinação da porcentagem de atividade incorporada às partículas de diferentes tamanhos.



FIGURA 5 - Foto ilustrativa dos filtros utilizados para a determinação do tamanho de partículas presentes nas amostras

#### 3.2.4.4 Controle microbiológico

Foram realizados ensaios de esterilidade e pirogênio nas soluções autoclavadas, pelo laboratório de controle de qualidade da Diretoria de Radiofarmácia do IPEN, utilizando-se procedimentos já padronizados. No ensaio de esterilidade uma amostra de cada produto foi semeada em meios de cultura (soja tripticase, tioglicolato e Saboreaud) que foram incubados à 37° C e à temperatura ambiente, por até 14 dias, a fim de verificar o crescimento de bactérias aeróbicas, anaeróbicas e leveduras. Para o ensaio de apirogenicidade, uma amostra de cada produto foi incubada à 37° C por uma hora, em tubo contendo o reagente de *Limulus* que consiste num lisado de amebócitos do caranguejo *Limulus polyphenus* que tem a propriedade de coagular na presença de pirogênios.

### 3.2.5 Estudo de estabilidade em plasma humano da HA-<sup>177</sup>Lu

Uma amostra de 5 mL de sangue humano foi coletado com anticoagulante, e a amostra foi centrifugada 3000 rpm, durante 10 minutos. Após a centrifugação o plasma (a parte líquida do sangue) foi separado dos elementos figurados do sangue (glóbulos brancos, glóbulos vermelhos e plaquetas). A partir da amostra de plasma obtido (aproximadamente 2 mL), foi adicionado a este, 0,2 mL da HA-<sup>177</sup>Lu, sendo que o produto de marcação utilizado neste estudo foi aquele onde seguiu-se o procedimento padrão de marcação, alterando a massa de hidroxiapatita para 20 mg e sem adição de óxido de lutécio. A amostra foi armazenada em banho maria à 37° C, e foram realizados estudos de estabilidade do produto por meio de sistema de cromatografia ascendente.

### 3.2.6 Estudo de distribuição biológica da HA-<sup>90</sup>Y e HA-<sup>177</sup>Lu

Os estudos de biodistribuição foram realizados em ratos *Wistar* machos, com aproximadamente 250-300 g, adquiridos do biotério do IPEN. Para realização dos estudos cintilográficos os animais foram previamente anestesiados com cetamina/xilazina (30mg/1000g animal).

O comportamento biológico da HA-<sup>90</sup>Y e HA-<sup>177</sup>Lu foi estudado a partir da administração intra-articular (joelho) de 18,5 – 22,2 MBq /0,1 mL do respectivo radiofármaco. Foram adquiridas imagens cintilográficas dos animais em gama-câmara (Medical Imagem System - Mediso<sup>®</sup>) 24 horas e 7 dias após a administração dos radiofármacos, para determinar a retenção e o extravasamento da atividade da articulação.

Foi realizado um estudo invasivo, para o composto HA-<sup>90</sup>Y, no qual foi administrada a atividade de 37 MBq, diretamente na articulação do joelho de ratos *Wistar* (n=2). Após 7 dias os animais foram sacrificados, a atividade total do corpo animal determinada em calibrador de dose, e a pata onde foi administrado o

produto foi retirada, os tecidos foram separados da articulação do joelho e a atividade presente na articulação também foi determinada em calibrador de dose. Foi calculada a porcentagem da atividade administrada presente na articulação (% atividade retida na articulação) utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ atividade retida na articulação} = \frac{\text{atividade da articulação}}{\text{atividade total do animal}} \times 100$$

A biodistribuição do  $^{177}\text{LuCl}_3$  também foi avaliada após administração intravenosa de 18,5 – 22,2 MBq / 0,1 mL da solução, e aquisição de imagem cintilográfica 24 horas após a administração.

Os procedimentos de estudo de biodistribuição em animais foram realizados de acordo com as normas da COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). A água e a alimentação estiveram disponíveis durante todo o período de experimentação (“add libidum”).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho foram estudadas as metodologias de marcação e controle de qualidade de três produtos diferentes sendo eles: citrato coloidal de  $^{90}\text{Y}$  (Cit- $^{90}\text{Y}$ ), Hidroxiapatita- $^{90}\text{Y}$  (HA- $^{90}\text{Y}$ ) e Hidroxiapatita- $^{177}\text{Lu}$  (HA- $^{177}\text{Lu}$ ).

### 4.1 Produção do citrato coloidal de $^{90}\text{Y}$

A marcação do Cit- $^{90}\text{Y}$  foi realizada de acordo com os experimentos de Bowen e cols (1975). Os resultados de quatro procedimentos de marcação distintos são apresentados na TAB. 6 a seguir. Estes resultados foram obtidos utilizando-se o sistema cromatográfico descrito na literatura, ou seja, papel Whatman 3MM e solução de NaCl 0,9%.

TABELA 6 - Resultados de pureza radioquímica da produção de Cit- $^{90}\text{Y}$  em quatro preparações distintas

PREPARAÇÃO	% PUREZA RADIOQUÍMICA (% Cit- $^{90}\text{Y}$ )				
	Fita 1	Fita 2	Fita 3	Fita 4	Valor médio
Preparação 1	97,0	16,5	33,3	18,0	41,2 ± 37,9
Preparação 2	88,3	92,3	12,1	97,2	72,5 ± 40,4
Preparação 3	22,0	16,5	14,9	-	17,8 ± 3,72
Preparação 4	62,0	13,3	-	-	37,7 ± 24,4

Os resultados de pureza radioquímica obtidos nas quatro preparações são distintos e apresentaram diferenças significativas nas fitas desenvolvidas para

cada preparação, o que resultou num elevado desvio padrão para o valor médio, na maioria dos casos.

De fato, a primeira dificuldade observada na reprodução do procedimento de marcação descrito por Bowen e cols (1975) foi a falta de reprodutibilidade no resultado da pureza radioquímica das preparações. A variação observada para as diferentes fitas de uma mesma marcação pode estar relacionada à baixa resolução do sistema cromatográfico empregado. Neste sentido, observou-se que a espécie radioquímica  $^{90}\text{Y}^{+3}$  espalhava-se por toda a extensão da fita, sendo muitas vezes difícil definir o  $R_f$  da mesma no sistema cromatográfico, conforme demonstrado na FIG. 6 a seguir.

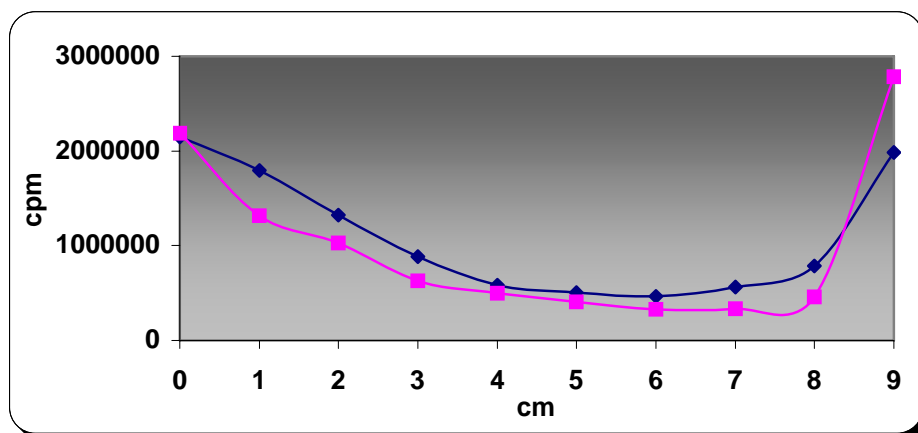


FIGURA 6 - Perfil cromatográfico do  $^{90}\text{YCl}_3$  em solução NaCl 0,9% e papel Whatman 3MM – sistema descrito na literatura (duplicata)

A baixa resolução do sistema cromatográfico pode, inclusive, ter gerado resultados falsos, tendo em vista a variabilidade observada em alguns casos nas diferentes fitas desenvolvidas para uma mesma marcação, conforme demonstrado na FIG. 7 a seguir.

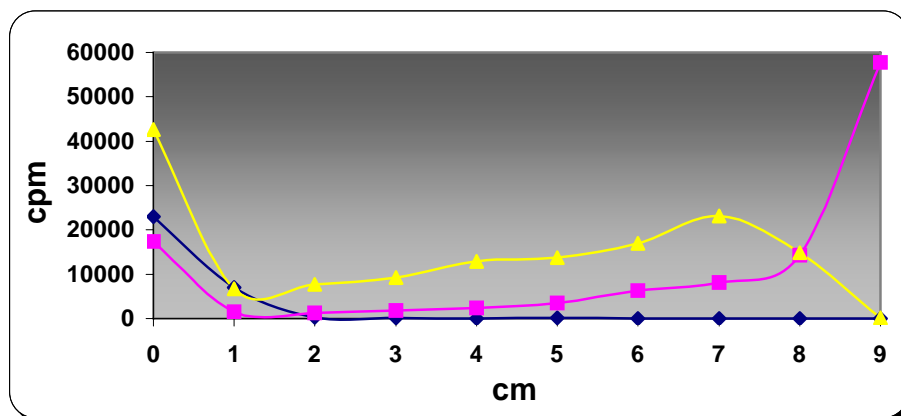


FIGURA 7 - Perfil cromatográfico do Citrato de  $^{90}\text{Y}$  em solução NaCl 0,9% e papel Whatman 3MM – sistema descrito na literatura (triplicata)

Neste sentido, foram estudados alguns parâmetros da marcação, buscando otimizá-la bem como foram avaliados outros sistemas cromatográficos.

Uma das hipóteses levantadas para a falta de reprodutibilidade no resultado da marcação foi a dificuldade de homogeneização da amostra no momento da reação, o que motivou o estudo desta variável. Quando se estudou a agitação da amostra por meio de diferentes equipamentos, a avaliação foi realizada apenas de forma qualitativa, sendo observada a aparência da amostra com relação à homogeneidade da dispersão. Suspensões mais homogêneas foram obtidas quando foi utilizado um suporte para agitação desenvolvido na DIRF, que promoveu agitação contínua do tipo magnética da mistura de reação. Nos demais sistemas de agitação empregados, ocorreu depósito de partículas no fundo do tubo de reação, durante o período de incubação.

Os quatro procedimentos de marcação descritos na TAB. 6 não foram realizados utilizando-se o sistema de agitação desenvolvido na DIRF. Com a utilização deste novo sistema, apesar de melhorar a homogeneidade da preparação, não se observou melhora no rendimento de marcação.

De acordo com os autores (Bowen e col,1975), a secagem do  $^{90}\text{YCl}_3$  foi realizada em banho-maria à  $100^\circ\text{C}$ . Entretanto, a utilização deste método mostrou-se improdutivo por ser muito lenta e incompatível com a realização do



procedimento de marcação em uma rotina de produção. Neste sentido, foram estudados outros métodos de secagem como a utilização de banho de óleo de silicone à 150° C, com o qual foi possível secar totalmente a amostra num tempo de aproximadamente 15 minutos, tempo este compatível com a realização do procedimento em rotina de produção.

Na determinação da pureza radioquímica do estudo de variação de atividade utilizando-se o sistema cromatográfico descrito na literatura (papel Whatman 3MM e solução salina 0,9%), os resultados obtidos também não foram reprodutíveis, à semelhança dos resultados obtidos utilizando-se a condição padrão de marcação.

Os resultados discrepantes observados no estudo de pureza radioquímica do Cit-<sup>90</sup>Y utilizando o sistema cromatográfico composto por papel Whatman 3MM e solução salina 0,9% (FIG. 7), motivaram o estudo de outros sistemas cromatográficos buscando obter resultados mais reprodutíveis.

A análise dos resultados baseia-se na resolução do método cromatográfico, ou seja, na capacidade do mesmo em separar as espécies radioquímicas presentes na preparação (partícula ou colóide radiomarcado e radioisótopo livre). Os melhores resultados foram obtidos utilizando-se solução de NaCl 8,4 % e papel Whatman 3MM (fitas de 1,5 x 10 cm), sendo o R<sub>f</sub> do citrato coloidal 0,0 e o R<sub>f</sub> do ítrio livre iônico 0,8 – 1,0.

A FIG. 8 representa o perfil cromatográfico do <sup>90</sup>YCl<sub>3</sub> (duplicata), e a FIG. 9 o perfil do produto Cit-<sup>90</sup>Y (duplicata), mostrando a excelente resolução do sistema cromatográfico avaliado (solução de NaCl 8,4% e papel Whatman 3MM). Os resultados das fitas foram reprodutíveis, ao contrário do sistema cromatográfico descrito na literatura que empregava solução de NaCl 0,9% como solvente.

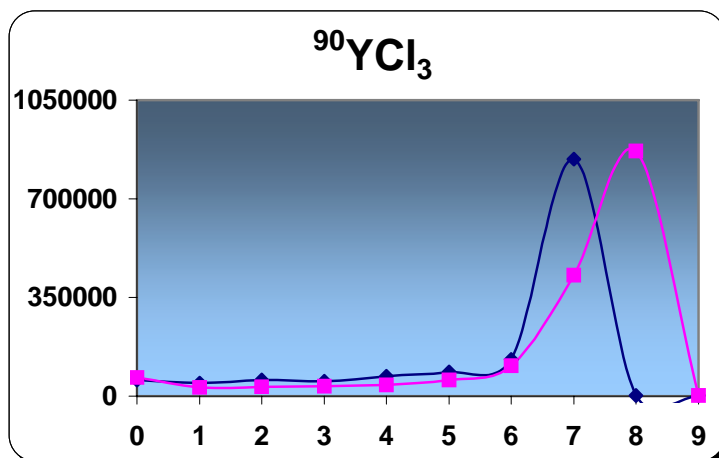


FIGURA 8 - Perfil cromatográfico em solução NaCl 8,4% e papel Whatman 3MM da amostra de  $^{90}\text{YCl}_3$  (duplicata)

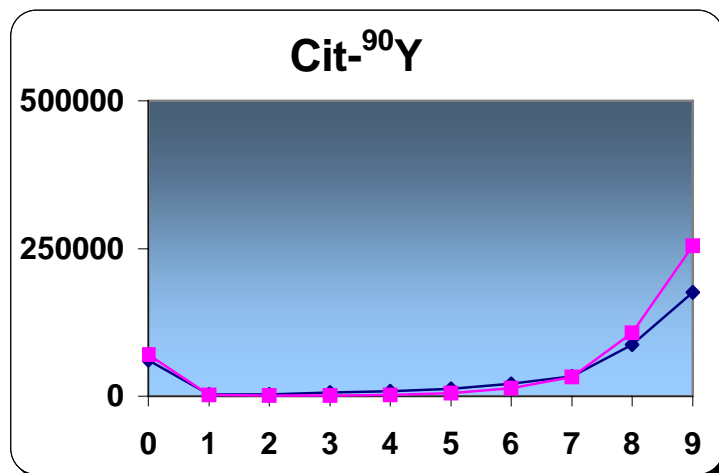


FIGURA 9 - Perfil cromatográfico em solução NaCl 8,4% e papel Whatman 3MM da amostra de Cit- $^{90}\text{Y}$  antes da purificação por centrifugação (duplicata)

A TAB. 7 a seguir representa o resultado de pureza radioquímica de 2 preparações realizadas na condição padrão de marcação utilizando-se sistema cromatográfico em papel Whatman 3MM e solução de NaCl 8,4% como solvente. A análise dos resultados permite concluir que a alteração do sistema cromatográfico resultou em maior reprodutibilidade dos resultados nas diferentes fitas desenvolvidas para cada marcação.

TABELA 7 – Resultados de pureza radioquímica utilizando-se o método cromatográfico com papel Whatman 3MM e solução NaCl 8,4%

% Pureza Radioquímica Cit- <sup>90</sup> Y	
Marcação 1	Marcação 2
14,2 ± 0,2	25,2 ± 3,0

Os controles realizados após a marcação efetuada em condições padrão para determinação do tamanho das partículas radiomarcadas mostraram que o produto originou partículas muito pequenas, uma vez que a maior parte da atividade foi observada no eluente (TAB. 8).

TABELA 8 - Análise do tamanho de partículas na marcação do Cit-<sup>90</sup>Y na condição padrão.

Tamanho dos filtros ( $\mu\text{m}$ )	% de atividade incorporada	
	Marcação 1	Marcação 2
8	9	33
5	5	20
3	4,5	-
eluente	81	47

n=2

Na determinação do tamanho das partículas foi realizada a filtração da amostra por filtros com poros de diferentes tamanhos. As membranas utilizadas neste caso foram de 3  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$  e 8  $\mu\text{m}$ . A partir deste estudo foi determinado que cerca de 30% das partículas são maiores que 3  $\mu\text{m}$  e que cerca de 70% da

atividade retida no eluente representa, em porcentagem, as partículas de diâmetro menor que 3  $\mu\text{m}$  ou o isótopo livre (TAB. 8-9).

Dada a possibilidade da presença de nanocolóides, realizou-se um estudo onde se dobrou a concentração de todas as soluções utilizadas no procedimento de marcação, sendo elas: nitrato de ítrio 4 mM e citrato de sódio 20 mM. O estudo não evidenciou diferenças no tamanho das partículas formadas, como mostra a TAB. 9, onde foram obtidos resultados insatisfatórios, devido a alta porcentagem de atividade observada no eluente após filtração por membranas de diferentes tamanhos de poros, e a falta de reprodutibilidade do procedimento de marcação.

TABELA 9 - Análise do tamanho de partículas na marcação do Cit-<sup>90</sup>Y na condição de concentrações dobradas.

Tamanho dos filtros ( $\mu\text{m}$ )	% de atividade incorporada			
	Marcação 1	Marcação 2	Marcação 3	Marcação 4
8	70	23	18	10
5	-	-	6	-
3	-	-	6	-
eluente	30	77	70	90

n=4

Os resultados dos estudos de filtração demonstram, mais uma vez, a necessidade de realização de estudos mais aprofundados da condição de marcação visando obtenção de melhores rendimentos e de partículas de tamanho adequado na produção do Cit-<sup>90</sup>Y. Tais estudos não foram complementados neste trabalho tendo em vista os resultados satisfatórios obtidos com a produção de hidroxiapatita marcada com <sup>90</sup>Y e a maior facilidade na manutenção do tamanho

médio das partículas deste radiofármaco, conforme será demonstrado nos resultados descritos mais adiante.

Nanocolóides não são ideais para uso em radiosinovectomia, podendo ocorrer extravasamento da articulação. Desta forma, após a produção do Cit-<sup>90</sup>Y, procedeu-se como descrito por Khalid e cols (2005) em seu trabalho sobre preparação de HA-<sup>90</sup>Y, à centrifugação da amostra para separação de partículas nanocoloidais.

AS FIG. 10 e 11 representam o perfil cromatográfico do produto final após a centrifugação sendo o sobrenadante (FIG 10-duplicata) e o precipitado (FIG. 11-duplicata). As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm, durante 10 minutos, e os controles cromatográficos realizados também em papel Whatman 3MM e solução NaCl 8,4%.

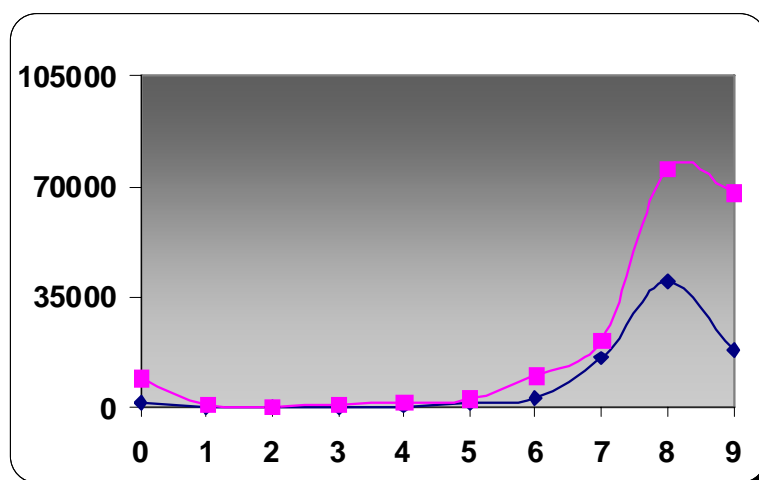


FIGURA 10 - Perfil cromatográfico em solução NaCl 8,4% e papel Whatman 3MM da amostra de sobrenadante após centrifugação da preparação de Cit-<sup>90</sup>Y (duplicata).

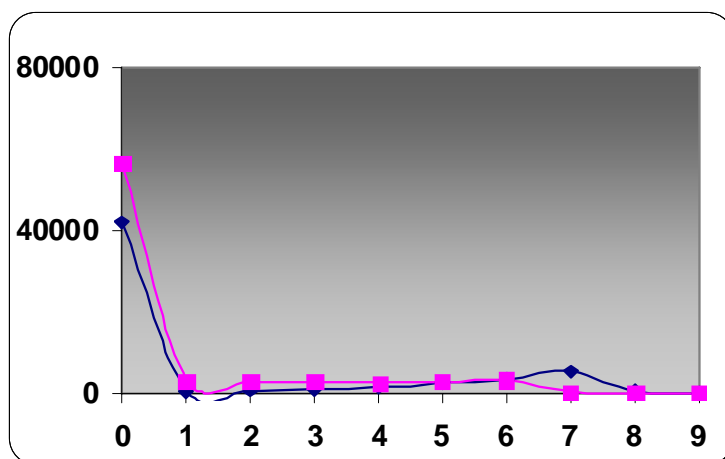


FIGURA 11 - Perfil cromatográfico em solução NaCl 8,4% e papel Whatman 3MM das amostras de precipitado após centrifugação da preparação de Cit-<sup>90</sup>Y (duplicata).

Foi avaliado também o efeito da atividade de ítrio-90 sobre o rendimento da marcação, utilizando-se baixas atividades (18,5; 37 e 74 MBq). Nestes casos o rendimento da radiomarcação foi baixo, em torno de 20%, conforme mostrado na TAB. 10.

TABELA 10 - Rendimento de marcação do Cit-<sup>90</sup>Y em função da variação da atividade de marcação

<b>Atividade de marcação (mCi / MBq)</b>	<b>Rendimento de marcação (%)</b>
0,5 / 18,5 (n=1)	13,0
1,0 / 37,0 (n=2)	17,0 ± 4,2
2,0 / 72,0 (n=1)	27,0

A partir da centrifugação da amostra após a marcação, analisou-se o rendimento de marcação, com a separação do radionuclídeo livre e as partículas menores presentes na amostra (nanocolóides) das partículas de interesse,

eliminando assim aquelas que poderiam extravasar da articulação após administração. Os resultados deste experimento são mostrados na TAB. 11 a seguir.

TABELA 11 - Resultados de pureza radioquímica e rendimento de marcação (obtidos por contagem da atividade da amostra após centrifugação separando-se sobrenadante e precipitado).

% Atividade Incorporada	
Partículas marcadas depositadas na centrifugação	Sobrenadante (nanocolóides e $^{90}\text{Y}^{+3}$ )
21,0 ± 5,5 %	84,0 ± 3,2 %

**n=4**

De acordo com o presente estudo, foram obtidos aproximadamente 20% de partículas do tamanho de interesse para aplicação em radiosinovectomia, sendo que os outros 80% são formados por partículas muito pequenas ou isótopo livre, que extravasariam da articulação.

Apesar do procedimento de centrifugação possibilitar a separação das partículas radiomarcadas de interesse, o baixo rendimento obtido na produção do  $\text{Cit-}^{90}\text{Y}$  inviabiliza sua produção rotineira para utilização clínica, tendo em vista, particularmente, o alto custo do radionuclídeo, atualmente obtido por meio de importação.

Na análise de estabilidade da amostra de  $\text{Cit-}^{90}\text{Y}$  foram realizados controles cromatográficos da amostra total e também do precipitado após centrifugação, também utilizando papel Whatman 3MM e solução NaCl 8,4%, em diferentes tempos até 5 dias após a preparação. O produto purificado apresentou estabilidade superior a 70% em até 5 dias após a marcação (TAB. 12).

TABELA 12 - Estudo da estabilidade do Cit-<sup>90</sup>Y (mistura de marcação) e do precipitado (após centrifugação) em sistema de cromatografia líquida ascendente em papel Whatman 3MM e solução NaCl 8,4%.

Tempo	Pureza Radioquímica (%)	
	Cit- <sup>90</sup> Y	Cit- <sup>90</sup> Y purificado por centrifugação
<b>Imediato</b>	25,3 ± 3,0	99,7 ± 0,2
<b>2 h</b>	26,0 ± 0,1	-
<b>3 dias</b>	14,2 ± 0,2	75,0 ± 2,1
<b>5 dias</b>	21,3 ± 6,4	77,6 ± 7,0

n=2

Para uma análise comparativa e, principalmente, para estudo do tamanho das partículas, foi adquirida uma amostra do produto Cit-<sup>90</sup>Y, comercializado pela empresa CIS Bio. A FIG. 12 representa o perfil cromatográfico do produto adquirido, realizado em papel Whatman 3MM e solução NaCl 0,9%, onde observa-se que o R<sub>f</sub> do produto é 0,0.



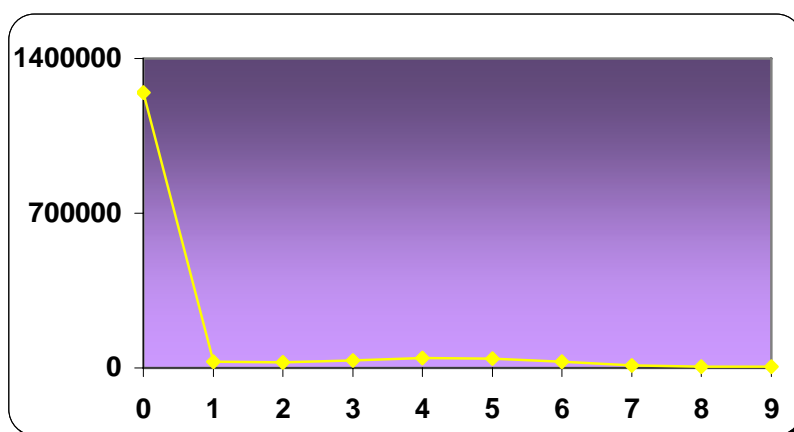


FIGURA 12 - Perfil cromatográfico do produto Cit-<sup>90</sup>Y (CIS Bio) em papel Whatman 3MM e solução NaCl 0,9%

Na análise do tamanho das partículas do Cit-<sup>90</sup>Y (CIS-Bio), pode-se concluir que o produto é formado em aproximadamente 80% por partículas maiores de 5  $\mu\text{m}$  (FIG 13). Enquanto que as partículas geradas neste estudo encontram-se entre 1 e 3  $\mu\text{m}$  (aproximadamente 80%).

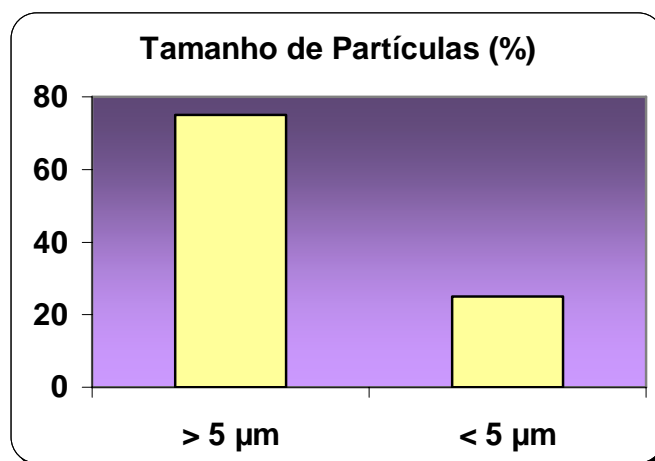


FIGURA 13 - Filtração da amostra de Cit-<sup>90</sup>Y (CIS Bio) em filtro Millipore com membrana de 5  $\mu\text{m}$

## 4.2 Produção de HA marcada com $^{90}\text{Y}$

A marcação da HA- $^{90}\text{Y}$  foi feita de acordo com o procedimento de marcação utilizado no IPEN para marcação da HA com  $^{153}\text{Sm}$  (condição padrão), sendo que as condições de marcação empregadas também foram descritas por Unni e cols (2002) para marcação de HA com  $^{166}\text{Ho}$ . Porém, o método ainda não foi avaliado para marcação com ítrio, não tendo sido encontrados relatos neste sentido.

Na condição padrão de marcação os resultados de rendimento obtidos foram de  $97,3 \pm 1,6\%$  (n=10). Embora os resultados obtidos tenham sido excelentes, foram variados alguns parâmetros no procedimento de marcação da hidroxiapatita com  $^{90}\text{Y}$  para otimizar a marcação e avaliar os limites correspondentes.

O primeiro parâmetro avaliado foi referente à quantidade de nitrato de ítrio utilizado no procedimento de marcação.

Na análise da quantidade de nitrato de ítrio 2 mM utilizado no procedimento de marcação foram realizados experimentos com diferentes volumes sendo eles: 200, 300 e 400  $\mu\text{L}$ . Os resultados obtidos são demonstrados na TAB. 13, onde pode-se observar que o rendimento de marcação aumentou à medida que aumentou-se a quantidade de nitrato de ítrio, sendo que os melhores resultados foram obtidos utilizando-se 400  $\mu\text{L}$  da solução de nitrato de ítrio 2 mM, conforme utilizado no procedimento padrão de marcação da HA com  $^{153}\text{Sm}$  utilizado no IPEN.

TABELA 13 - Estudo da variação da quantidade de solução de nitrato de ítrio 2mM no procedimento de marcação da HA-<sup>90</sup>Y

Quantidade de solução de nitrato de Ítrio 2mM ( $\mu$ L)		Rendimento de marcação (%)
200	(n=3)	87,0 $\pm$ 2,8
300	(n=3)	94,3 $\pm$ 2,1
400	(n=10)	97,3 $\pm$ 1,6

A FIG. 14 a seguir mostra o perfil da influência do volume da solução de nitrato de ítrio 0,2 mM utilizado no procedimento de marcação, confirmando os dados anteriores, onde se observa que aumentando a quantidade de nitrato na amostra o rendimento de marcação aumenta gradualmente.

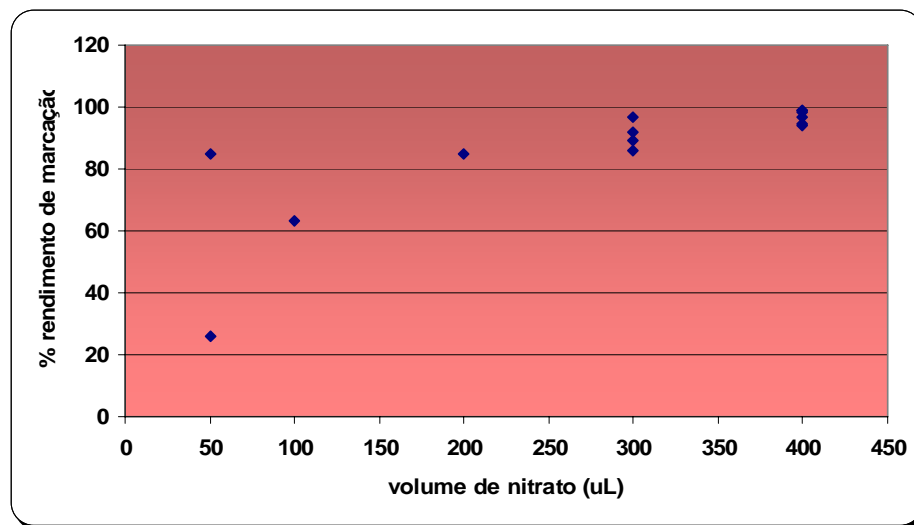


FIGURA 14 - Influência do volume de nitrato de ítrio-90 no rendimento da marcação

Na análise da % de atividade incorporada às partículas maiores de 8  $\mu\text{m}$ , verificou-se a influência da variação do volume de nitrato de ítrio (massa) na porcentagem de partículas radiomarcadas. Os resultados obtidos são demonstrados na FIG. 15. A variação da quantidade de nitrato de ítrio parece não influenciar na porcentagem de atividade incorporada às partículas maiores de 8  $\mu\text{m}$ , tendo como referência a condição padrão de marcação na qual foram utilizados 400  $\mu\text{L}$  da solução.

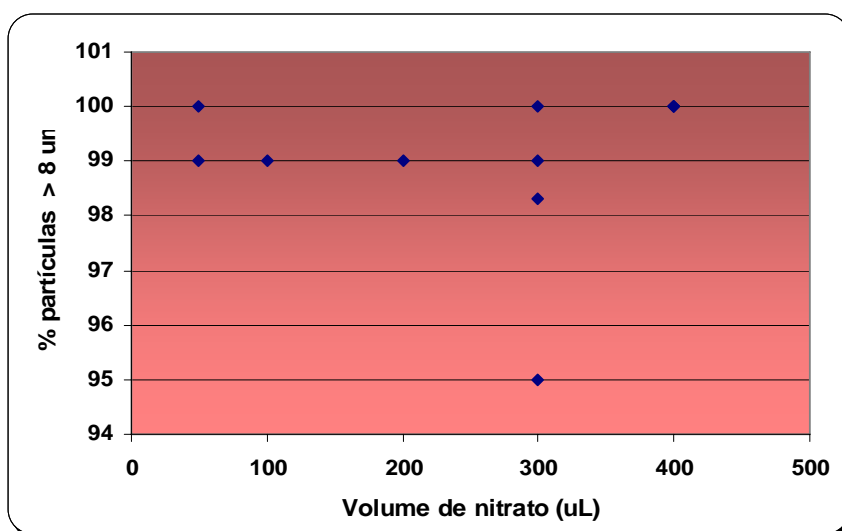


FIGURA 15 - Variação do volume de nitrato de ítrio e sua influência na % de atividade incorporada às partículas maiores de 8  $\mu\text{m}$

Uma das vantagens da marcação da HA com  $^{90}\text{Y}$  quando comparada à produção do citrato coloidal de ítrio é que as partículas de HA adquiridas comercialmente possuem um tamanho médio pré-determinado pelo fabricante, no caso deste trabalho 20  $\mu\text{m}$ , enquanto que no caso do citrato, a suspensão coloidal é formada no momento da reação, sendo aparentemente mais vulnerável à formação de partículas de tamanhos diferentes em função de variações nas condições de preparação.

Os estudos de filtração realizados com as preparações de HA-<sup>90</sup>Y visaram, sobretudo, verificar se as condições de reação empregadas poderiam causar quebra das partículas ou a geração de espécies coloidais de <sup>90</sup>Y.

Khalid e cols (2005) realizaram experimentos de marcação da HA com <sup>90</sup>Y utilizando tempo de agitação de 1 hora em procedimento de marcação semelhante que, porém, não utiliza o nitrato de ítrio no meio de reação.

No presente trabalho, porém, foram obtidos excelentes rendimentos de marcação utilizando-se 15 e 30 minutos de reação, conforme demonstrado na TAB. 14 a seguir. Portanto, o tempo de reação de 15 minutos mostrou-se suficiente para obtenção de ótimos resultados na marcação, otimizando este parâmetro para uma produção rotineira.

TABELA 14 - Estudo da influência do tempo de reação no rendimento da marcação de HA com <sup>90</sup>Y

<b>Tempo de reação</b>	<b>Rendimento de marcação</b>
<b>(minutos)</b>	<b>(%)</b>
15 (n=3)	95,0 ± 1,4
30 (n=5)	95,7 ± 5,0

Na avaliação das lavagens por meio de centrifugação, existem alguns dados conflitantes, como por exemplo, nos experimentos de Chattopadhyay e cols (2008) os autores sugerem que a mesma seja realizada apenas uma vez, durante 5 minutos e com velocidade de 2000 rpm. Entretanto, o trabalho de Chakraborty e cols, descreve a necessidade da segunda e terceira lavagem da amostra para remoção das partículas nanocoloidais.

Os resultados obtidos neste experimento são representados na TAB. 15, onde se pode observar, por meio da análise dos sobrenadantes, que não há a necessidade de mais de uma lavagem durante o procedimento para separação

das partículas de tamanho ideais das nanocoloidais que permanecem no sobrenadante.

Alguns autores relatam também a velocidade de 3000 rpm durante 5 minutos, (Chattopadhyay, 2008) mas nossos experimentos demonstraram que apenas uma centrifugação de 2000 rpm por 5 minutos é suficiente para remoção total das partículas não ideais e do ítrio livre.

TABELA 15 - Estudo de lavagem da amostra de HA-<sup>90</sup>Y por centrifugação para remoção de <sup>90</sup>YCl<sub>3</sub>.

% Atividade da amostra total		
Rendimento de marcação	Sobrenadante da lavagem 1	Sobrenadante das lavagens 2+3
88,9 ± 3,8	9,7 ± 3,3	1,4 ± 0,6

**n=3**

Com relação à determinação da pureza radioquímica da preparação de HA-<sup>90</sup>Y, alguns autores sugerem a avaliação apenas por meio de centrifugação da amostra (Davis, 1989; Pandey, 2001). Chakraborty e col. (2006-A) em estudo de marcação de HA-<sup>177</sup>Lu, recomenda a utilização de técnica cromatográfica utilizando solução de DTPA 5mM e papel cromatográfico para avaliação da pureza radioquímica da preparação. Devido às características químicas do lutécio e do ítrio serem muito parecidas, foi utilizado sistema semelhante para a análise da HA-<sup>90</sup>Y, porém utilizando-se TLC-SG como suporte, uma vez que a utilização de papel Whatman 3MM apresentou problemas na resolução das espécies.

Entre todos os sistemas cromatográficos avaliados (TAB. 16), os resultados obtidos neste trabalho mostram que a resolução do sistema cromatográfico melhorou ao se utilizar solução de DTPA 2,5 mM em suporte TLC-SG.

TABELA 16 - Sistemas cromatográficos utilizados na avaliação da pureza radioquímica da HA-<sup>90</sup>Y

Suporte	Solvente	R <sub>f</sub> das espécies radioquímicas
papel Whatman 3MM	solução NaCl 0,9%	HA- <sup>90</sup> Y = 0 <sup>90</sup> Y <sup>+3</sup> = espalhado na fita
	solução DTPA 2,5 mM	HA- <sup>90</sup> Y = 0,9 <sup>90</sup> Y <sup>+3</sup> = 0,9
	solução DTPA 5 mM	HA- <sup>90</sup> Y = 0,9 <sup>90</sup> Y <sup>+3</sup> = 0,9
	solução NaCl 0,9%	HA- <sup>90</sup> Y = 0 <sup>90</sup> Y <sup>+3</sup> = 0
	solução DTPA 2,5 mM	HA- <sup>90</sup> Y = 0 <sup>90</sup> Y <sup>+3</sup> = 0,7-0,8
	solução DTPA 5 mM	HA- <sup>90</sup> Y = espalhado na fita <sup>90</sup> Y <sup>+3</sup> = 0,7-0,8

A FIG. 16 mostra o perfil cromatográfico do <sup>90</sup>Y<sup>3+</sup> onde o R<sub>f</sub> é 0,7-0,8, e a FIG. 17 mostra o perfil da HA-<sup>90</sup>Y, onde o R<sub>f</sub> é 0,0, ambos realizados em fitas TLC-SG como suporte e solução DTPA 2,5 mM como solvente.

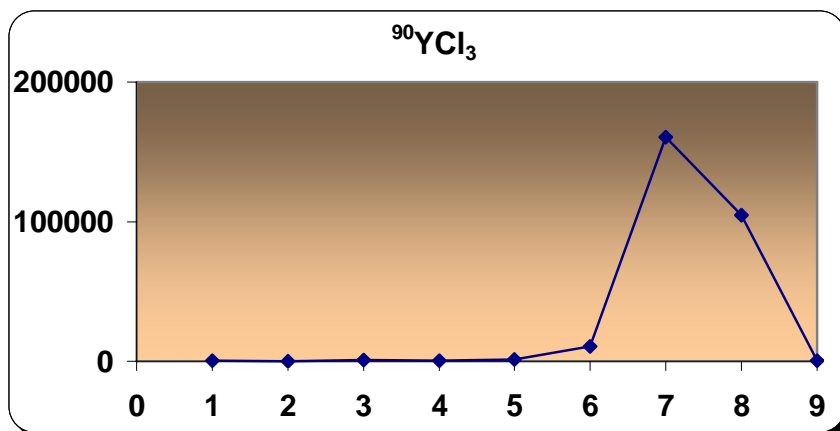


FIGURA 16 - Perfil cromatográfico do  $^{90}\text{YCl}_3$  em sistema de cromatografia em camada delgada (TLC-SG) e solução DTPA 2,5 mM

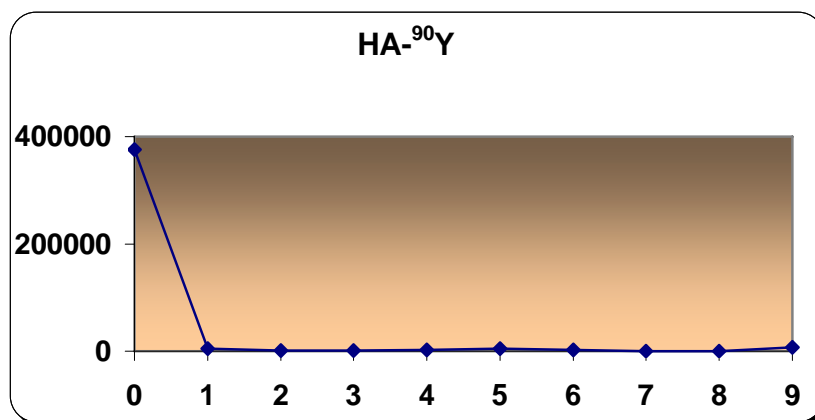


FIGURA 17 - Perfil cromatográfico da  $\text{HA-}^{90}\text{Y}$  em sistema de cromatografia em camada delgada (TLC-SG) e solução DTPA 2,5 mM

De acordo com Khalid e cols (2005) a estabilidade do produto é maior quando incubado em solução salina à temperatura ambiente. Nestas condições, a estabilidade do produto foi analisada utilizando-se o sistema cromatográfico descrito acima por até 5 dias, apresentando uma pureza radioquímica superior a 90% (TAB. 17).



TABELA 17 - Estudo da estabilidade da HA-<sup>90</sup>Y incubada em solução salina à temperatura ambiente utilizando sistema de cromatografia em camada delgada (TLC-SG) e solução DTPA 2,5 mM.

<b>Tempo (dias)</b>	<b>Pureza radioquímica (%)</b>
1	94,46 ± 4,06
5	92,10 ± 2,09

**n=2**

Na análise de tamanho de partículas, utilizando-se filtros com membranas com poros de 12, 10 e 8 µm, observou-se que o produto é formado por partículas de tamanho superior a 12 µm, sendo estáveis por mais de 72 h, como mostra a TAB. 18 e a FIG. 18.

TABELA 18 - Estudo do tamanho das partículas formadas de HA-<sup>90</sup>Y (ensaio de membranas filtrantes) e estabilidade das partículas

<b>Tamanho dos poros</b>	<b>% Atividade retida nos filtros</b>			
	<b>Imediato</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>
<b>12 µm</b>	99,0	99,3	99,4	98,0
<b>10 µm</b>	-	-	-	-
<b>8 µm</b>	-	-	-	-
<b>Eluente</b>	1,0	0,7	0,6	2,0

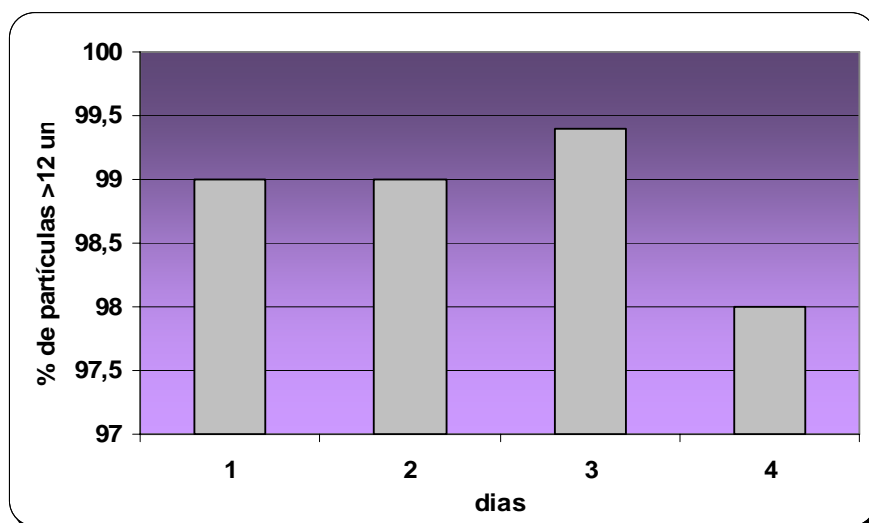


FIGURA 18 - Estabilidade das partículas de tamanho superior a 12 μm

Existem na literatura dados conflitantes a respeito do tamanho ideal das partículas de hidroxiapatita, como por exemplo, Deustsch e cols (1993) descrevem o tamanho ideal das partículas como sendo de 2 – 5 μm, já Pandey e cols (2001) descrevem o tamanho ideal de 5-20 μm. Porém os últimos estudos publicados demonstram grande eficácia no tratamento de RSV com partículas superiores a 10 μm.

#### 4.3 Produção da HA marcada com Lu-177

De acordo com Chakraborty e col (2006-A). a massa ideal de óxido de lutécio para marcação de hidroxiapatita com 296 MBq de lutécio-177 é de 200 μg e a massa de hidroxiapatita é de 5 mg. As condições de marcação utilizadas por Chakraborty e col. foram reproduzidas neste trabalho e consideradas como condição padrão de marcação.

Os resultados das análises de rendimento de marcação e de porcentagem de atividade incorporadas às partículas maiores de 12 μm obtidas na marcação padrão estão representados na TAB. 19.

TABELA 19 - Resultados obtidos na marcação de HA com  $^{177}\text{Lu}$  utilizando-se a condição padrão de marcação.

<b>Rendimento de Marcação (%)</b>	<b>% Atividade incorporada às partículas &gt; 12<math>\mu\text{m}</math></b>
98,5 $\pm$ 1,6	89,0 $\pm$ 8,4

**n=4**

No estudo da marcação da HA com  $^{177}\text{Lu}$  utilizando-se a condição padrão de marcação, obteve-se uma porcentagem relativamente baixa de partículas maiores de 12  $\mu\text{m}$  incorporadas ao lutécio, quando comparada à porcentagem obtida na marcação da HA com ítrio-90. Por este motivo, foram analisados diversos parâmetros da marcação, buscando diminuir a porcentagem da radioatividade incorporada às partículas de tamanho inferior a 12  $\mu\text{m}$ .

Variando-se a massa de hidroxiapatita na condição padrão de marcação e mantendo-se a massa de 200  $\mu\text{g}$  de óxido de lutécio, pode-se observar na TAB. 20, que o aumento da massa de HA de 5 para 20 mg não alterou o rendimento da marcação, nem pareceu interferir na porcentagem de radioatividade incorporada às partículas maiores de 12  $\mu\text{m}$ .

TABELA 20 - Análise da variável massa de hidroxiapatita no rendimento de marcação da HA com  $^{177}\text{Lu}$ , utilizando-se 200  $\mu\text{g}$  de óxido de lutécio

<b>Hidroxiapatita (mg)</b>	<b>Rendimento de marcação (%)</b>	<b>% Atividade incorporada às partículas &gt; 12<math>\mu\text{m}</math></b>
5 (n=4)	98,5 $\pm$ 1,6	89,0 $\pm$ 8,4
20 (n=2)	98,2 $\pm$ 0,3	67,2 $\pm$ 18,6

Analisando-se ainda a variável massa de hidroxiapatita presente na marcação quando se altera concomitantemente a massa de óxido de lutécio de 200 µg para 400 µg, pode-se observar na TAB. 21 que mesmo aumentando-se a massa de óxido presente na reação, também não ocorreu nenhuma alteração nos rendimentos de marcação. Porém, o excesso de óxido de lutécio em presença de 5 mg de HA resultou na diminuição da % de partículas maiores de 12 µm, ou seja, aumentou a porcentagem de partículas de diâmetro menor, não interessantes para aplicação em RSV.

TABELA 21 - Análise da variável massa de hidroxiapatita no rendimento de marcação da HA com  $^{177}\text{Lu}$  utilizando-se 400 µg de óxido de lutécio.

<b>Hidroxiapatita (mg)</b>	<b>Rendimento de marcação (%)</b>	<b>% Atividade incorporada às partículas &gt; 12µm</b>
5 (n=3)	99,2 ± 1,0	42,0 ± 17,0
20 (n=4)	99,3 ± 0,1	79,1 ± 4,7

A análise da massa ideal de hidroxiapatita foi realizada também nos experimentos de Chakraborty e cols (2006-A), onde foram realizadas marcações utilizando-se 1 a 20 mg de hidroxiapatita. Os estudos relatam que utilizando-se 1 mg de HA no procedimento de marcação, o rendimento foi relativamente baixo (85,2 ± 1,1%) e aumentou-se a massa de HA para 5 mg o rendimento de marcação aumentou, sendo relatado o resultado de 98,6 ± 0,8%, semelhante ao obtido neste trabalho. Entretanto, o aumento da massa de HA para 20 mg não resultou em melhora do rendimento de marcação da HA, conforme descrito por Chakraborty e cols (2006-A).

Nos estudos de variação da atividade de  $^{177}\text{LuCl}_3$ , mantendo-se como padrão 200 µg de óxido de lutécio e 5 mg de hidroxiapatita, o rendimento de marcação da amostra pareceu não se alterar com o aumento da atividade de 37

para 222 e 296 MBq. Porém, a porcentagem de atividade incorporada às partículas maiores de 12  $\mu\text{m}$ , permaneceu muito baixa, não sendo ainda um procedimento ideal para produção em rotina (TAB. 22).

TABELA 22 - Análise da variável atividade de  $^{177}\text{LuCl}_3$  utilizada na marcação da hidroxiapatita utilizando 200  $\mu\text{g}$  de óxido de lutécio e 5 mg de hidroxiapatita

<b>Atividade de <math>^{177}\text{LuCl}_3</math> (MBq/mCi)</b>	<b>Rendimento de marcação (%)</b>	<b>% Atividade incorporada às partículas &gt; 12<math>\mu\text{m}</math></b>
37 / 1 (n = 2)	98,3 $\pm$ 0,4	66,5 $\pm$ 17,7
222 / 6 (n = 1)	97,6	85
296/8 (n =4)	98,5 $\pm$ 1,6	89,0 $\pm$ 8,4

Apesar dos excelentes rendimentos de marcação obtidos na marcação utilizando-se a condição padrão, bem como nos estudos de variação da massa de HA e variação da atividade de  $^{177}\text{LuCl}_3$ , em todas as condições de marcação estudadas a porcentagem de partículas radiomarcadas menores que 12  $\mu\text{m}$  ainda era grande, inviabilizando a aplicação clínica do produto, caso o mesmo não fosse previamente purificado para remoção de tais partículas. Desta forma, foram realizados experimentos adicionais, variando-se a massa de óxido de lutécio presente na marcação, com objetivo de verificar se poderia contribuir para aumentar a porcentagem de atividade incorporada às partículas maiores que 12 $\mu\text{m}$ .

Os resultados obtidos mostram que as massas estudadas não interferiram no rendimento de marcação (TAB. 23). Entretanto, exerceram influência na

porcentagem de atividade incorporada às partículas com diâmetro superior a 12  $\mu\text{m}$ . As partículas radiomarcadas resultantes dos experimentos em que não foi utilizado o óxido de lutécio são 100% de tamanho superior a 12  $\mu\text{m}$ , como mostra a TAB. 23. Quanto maior a quantidade de óxido de lutécio, menor a porcentagem de partículas maiores de 12  $\mu\text{m}$  observadas.

TABELA 23 - Influência da variação da massa de óxido de lutécio na marcação do HA- $^{177}\text{Lu}$  utilizando-se 5 mg de HA e atividade de 296 MBq (8 mCi)

<b>Massa de óxido de lutécio(<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>Rendimento de marcação (%)</b>	<b>% Atividade incorporada às partículas &gt; 12<math>\mu\text{m}</math></b>
Sem óxido	98,3 $\pm$ 0,1	100,0 $\pm$ 0,0
100	98,3 $\pm$ 0,6	88,7 $\pm$ 8,9
200	98,5 $\pm$ 1,6	89,0 $\pm$ 8,4
400	99,1 $\pm$ 1,0	41,9 $\pm$ 17,0

**n=2**

A partir dos resultados obtidos nos estudos de variação da massa de óxido de lutécio, observou-se que o óxido de lutécio não era necessário na marcação e decidiu-se estudar a variação da atividade de  $^{177}\text{LuCl}_3$  de 148 à 370 MBq, sem adicionar-se óxido de lutécio na marcação, e utilizando-se 20 mg de hidroxiapatita. Os resultados encontrados são demonstrados na TAB. 24.

TABELA 24 - Estudo da variação da atividade de  $^{177}\text{LuCl}_3$  na marcação de 20 mg de hidroxiapatita sem adição de óxido de lutécio

<b>Atividade de <math>^{177}\text{LuCl}_3</math> (MBq/mCi)</b>	<b>Rendimento de marcação (%)</b>	<b>% Atividade incorporada às partículas &gt; 12<math>\mu\text{m}</math></b>
148 / 4	99,4 $\pm$ 0,6	98,2 $\pm$ 1,1
296 / 8	99,3 $\pm$ 0,6	86,3 $\pm$ 17,4
370 / 10	97,2 $\pm$ 3,1	85,9 $\pm$ 14,9

**n=2**

A influência da ausência de óxido de lutécio no meio de marcação também foi estudada utilizando-se 5 mg de hidroxiapatita para atividade de até 370 MBq. Na TAB. 25 podemos observar que o rendimento de marcação não foi alterado, e que a porcentagem de atividade do cloreto de lutécio incorporada às partículas > 12  $\mu\text{m}$  correspondeu a 100% do produto.

TABELA 25 - Estudo da variação da atividade de  $^{177}\text{LuCl}_3$  na marcação de 5 mg de hidroxiapatita sem adição de óxido de lutécio

<b>Atividade de <math>^{177}\text{LuCl}_3</math> (MBq/mCi)</b>	<b>Rendimento de marcação (%)</b>	<b>% Atividade incorporada às partículas &gt; 12<math>\mu\text{m}</math></b>
296 / 8	98,3 $\pm$ 0,1	100,0 $\pm$ 0,0
370 / 10	97,1 $\pm$ 0,1	100,0 $\pm$ 0,0

**n=2**

Quando comparados os estudos de marcação sem óxido de lutécio, com atividade de 296 MBq (8mCi) e utilizando-se 5 e 20 mg de hidroxiapatita (TAB. 26), pudemos observar que em ambos os casos o rendimento de marcação foi

excelente, porém apenas quando se utilizou 5 mg de HA a totalidade das partículas radiomarcadas corresponderam a partículas maiores de 12  $\mu\text{m}$ .

TABELA 26 - Estudo de marcação da HA- $^{177}\text{Lu}$ , sem óxido de lutécio, variando a massa de HA

<b>Quantidade de HA (mg)</b>	<b>Rendimento de Marcação (%)</b>	<b>% Atividade incorporada às partículas &gt; 12<math>\mu\text{m}</math></b>
5	98,3 $\pm$ 0,1	100,0 $\pm$ 0,0
20	99,3 $\pm$ 0,6	86,3 $\pm$ 17,4

**n=3**

Nos estudos de Chakraborty e cols, (2006-A) foi analisada a quantidade de óxido de lutécio adicionada no momento da marcação. Entretanto, o trabalho em questão concluiu que a massa ideal de carregador é de 200  $\mu\text{g}$ , sendo que o rendimento de marcação diminuiu gradualmente nos experimentos em que se aumentou a quantidade de óxido de lutécio na marcação. Os autores, entretanto, não estudaram a marcação sem adição de carregador nem estudaram a influência da quantidade do carregador no tamanho das partículas radiomarcadas geradas.

Na determinação da pureza radioquímica das marcações, o método descrito na literatura (Chakraborty e cols, 2006-A) utiliza sistema cromatográfico em papel e solução DTPA 5 mM, descrevendo  $R_f$  do  $^{177}\text{LuCl}_3$  de 0,9 e o  $R_f$  da HA- $^{177}\text{Lu}$  de 0,0.

Na FIG 19 apresenta-se o perfil cromatográfico de ambas as espécies radioquímicas, obtidos utilizando-se papel Whatman 3MM e solução de DTPA 5mM, onde se pode observar que não foi possível separar as espécies radioquímicas de interesse uma vez que ambas apresentaram o mesmo  $R_f$  de 0,9.



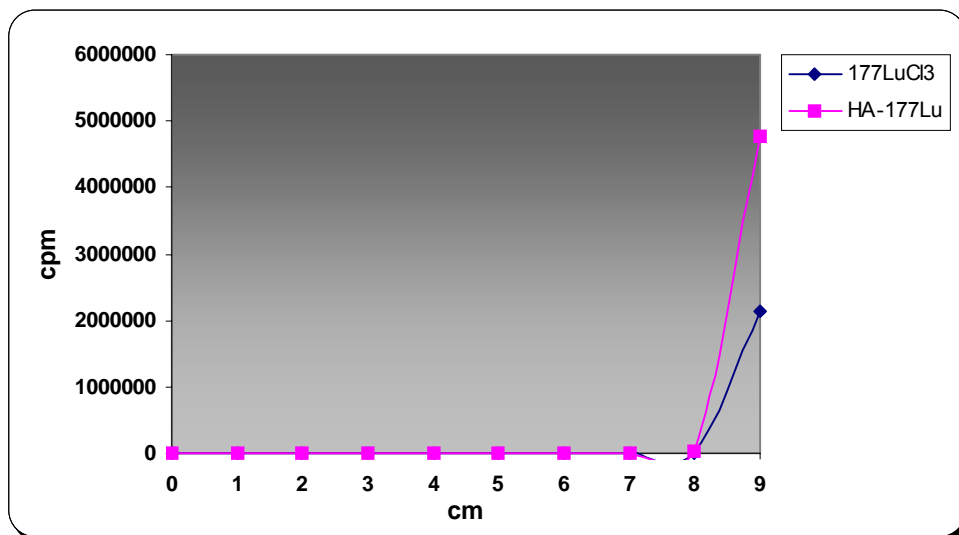


FIGURA 19 - Perfil cromatográfico do  $^{177}\text{LuCl}_3$  e da HA- $^{177}\text{Lu}$  em papel Whatman 3MM e solução DTPA 5 mM

A partir destes resultados foi realizado um estudo com outros tipos de suportes e solventes, buscando definir um sistema capaz de separar as espécies radioquímicas envolvidas na marcação.

Neste sentido, o sistema cromatográfico ideal foi aquele em que se utilizou cromatografia em camada delgada, com fitas de sílica gel (TLC-SG) como suporte e solução de DTPA 2,5 mM como solvente, à semelhança do observado para a marcação de HA com ítrio-90. Neste sistema, o Rf do  $^{177}\text{LuCl}_3$  é 0,8 -0,9 e o Rf da HA- $^{177}\text{Lu}$  é 0,0 (FIG. 20).

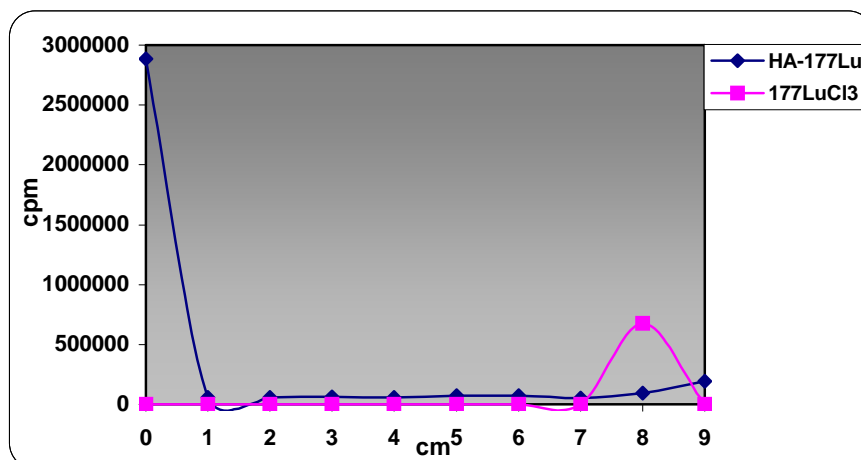


FIGURA 20 - Perfil cromatográfico do  $^{177}\text{LuCl}_3$  e da  $\text{HA-}^{177}\text{Lu}$  no sistema cromatográfico utilizando fita de TLC-SG e solução DTPA 2,5 mM

Utilizando-se este sistema cromatográfico que apresentou excelente resolução, foi realizado o estudo de estabilidade da amostra de  $\text{HA-}^{177}\text{Lu}$ , durante 7 dias, sendo a amostra mantida à temperatura ambiente. Neste estudo, pode-se observar que a amostra permaneceu estável no período de tempo estudado (TAB 27).

TABELA 27 - Estudo de estabilidade da  $\text{HA-}^{177}\text{Lu}$  obtido após marcação de 20 mg de HA, com 148 MBq de  $^{177}\text{LuCl}_3$ , sem óxido de lutécio, mantida à temperatura ambiente (triplicata)

Tempo (dias)	Pureza Radioquímica (%)
Imediato	93,9 ± 0,8
3	92,7 ± 1,6
5	98,3 ± 1,7
7	98,8 ± 1,5

A estabilidade da HA-<sup>177</sup>Lu também foi avaliada quando amostras do produto foram incubadas em plasma humano e em solução de NaCl 0,9% e o produto mostrou-se estável em ambos os meios após 2 dias (TAB 28).

TABELA 28 - Estudo de estabilidade da HA-<sup>177</sup>Lu obtida após marcação de 20 mg de HA, com 370 MBq de <sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub>, sem óxido de lutécio, em plasma humano a 37° C e em solução de NaCl 0,9% à temperatura ambiente (fitas em triplicata)

Tempo (dias)	Pureza Radioquímica (%)	
	Em plasma humano	Em solução NaCl 0,9%
	37° C	T.A
1	89,9 ± 0,9	97,5 ± 0,1
2	99,0 ± 0,2	98,5 ± 0,1

**n = 1**

Foram realizados também experimentos de marcação da HA com <sup>177</sup>Lu seguindo o mesmo protocolo de marcação da HA com <sup>90</sup>Y. O procedimento de marcação foi realizado utilizando-se 15 mg de ácido cítrico, 40 mg de hidroxiapatita, sem adição de óxido de lutécio e atividade de 296 MBq (8 mCi). Os resultados são demonstrados na TAB. 29.

TABELA 29 - Estudo de marcação da HA-<sup>177</sup>Lu seguindo o procedimento de marcação da HA-<sup>90</sup>Y (15 mg de ácido cítrico, 40 mg de hidroxiapatita, sem adição de óxido de lutécio e atividade de 296 MBq de <sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub>)

Rendimento de Marcação (%)	% Atividade incorporada às partículas > 12µm
45,1 ± 7,3	81,0 ± 2,8

**n=2**

Mesmo sendo obtidos baixos resultados de rendimento de marcação e de % de atividade incorporada às partículas maiores que 12  $\mu\text{m}$ , estas mesmas marcações foram analisadas durante 7 dias, por meio de sistema cromatográfico, para determinação da estabilidade. Os resultados obtidos são demonstrados na FIG.21.

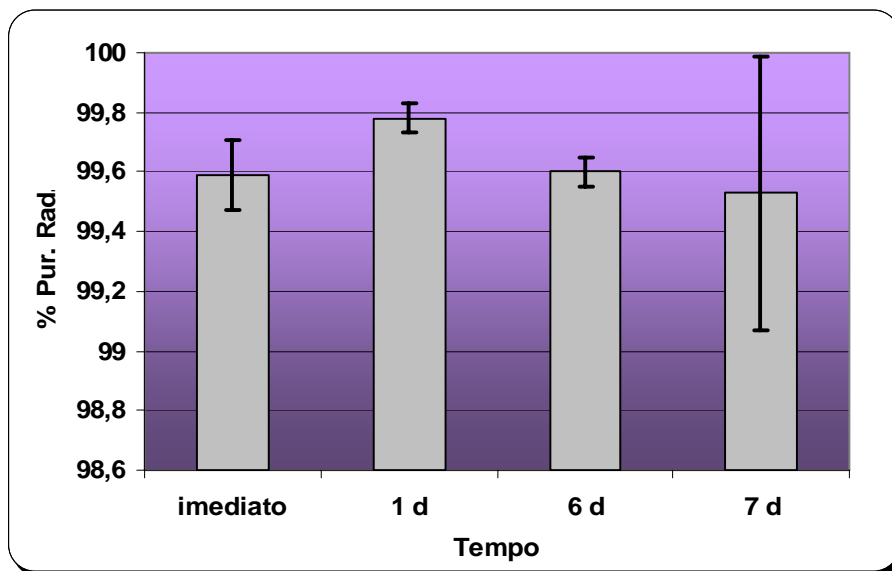


FIGURA 21 - Estudo da estabilidade da pureza radioquímica da HA marcada com  $^{177}\text{Lu}$  seguindo o procedimento de marcação da HA- $^{90}\text{Y}$

A marcação da HA com  $^{177}\text{Lu}$  foi estudada, neste trabalho, a partir da condição de marcação descrita por Chakraborty e cols (2006-A), na qual utiliza-se solução de bicarbonato de sódio 0,5 M para acertar o pH em aproximadamente 9 e, em seguida, o pH foi ajustado para aproximadamente 7,0. A descrição do procedimento de marcação é, inclusive, confusa, tendo em vista que os autores descrevem a utilização de solução de NaOH para rebaixar o pH de 9,0 para 7,0. Por este motivo, decidimos verificar se esta alteração de pH se fazia realmente necessária para efetividade da reação.

Os resultados obtidos nos estudos de marcação da HA com  $^{177}\text{Lu}$ , sem promover elevação do pH e posterior rebaixamento do mesmo (pH final de reação de 6,5) são demonstrados na TAB. 30.

TABELA 30 - Resultados obtidos na marcação da HA com  $^{177}\text{LuCl}_3$  sem alteração de pH no momento da marcação utilizando-se a condição padrão de marcação

<b>Rendimento de Marcação (%)</b>	<b>% Atividade incorporada às partículas &gt; 12<math>\mu\text{m}</math></b>
98,65 $\pm$ 0,8	99,95 $\pm$ 0,1

**n=2**

Nos estudos de Chakraborty e cols (2006-A) foi demonstrado que a variação do pH de marcação de 3,0 a 8,0 não influenciou nos resultados de rendimento. Entretanto, em pH ácido (aproximadamente 3,0) observaram que as partículas de HA são instáveis, sofrendo uma gradual dissolução.

Portanto, verificou-se que o pH ideal de marcação deve ser em torno de 7,0, tendo em vista os excelentes resultados de rendimento de marcação, porcentagem de incorporação às partículas maiores que 12  $\mu\text{m}$  além da vantagem de ser aproximadamente o pH fisiológico.

#### **4.4 Estudo de esterilidade e apirogenicidade**

Na análise dos controles microbiológicos, realizadas pelo laboratório de controle de qualidade da DIRF, não houve o crescimento de bactérias ou fungos e os testes de pirogenicidade foram negativos, mostrando que os procedimentos de preparação utilizados possibilitaram a obtenção de produtos com características microbiológicas adequadas para administração *in-vivo*.

## 4.5 Estudos de biodistribuição

### 4.5.1 Estudos de biodistribuição do HA-<sup>90</sup>Y

A TABELA 31 a seguir apresenta a porcentagem da atividade de HA-<sup>90</sup>Y retida na articulação do joelho de ratos *Wistar*, 7 dias após a administração local do radiofármaco.

TABELA 31 - Estudo invasivo de administração intra-articular de 18,5 MBq de HA-<sup>90</sup>Y: porcentagem da atividade administrada retida na articulação após 7 dias

Órgão	% de atividade retida na articulação
Articulação do joelho	81,3 ± 8,8

**n=2**

O resultado do estudo invasivo mostra grande retenção do composto na articulação. Trata-se, entretanto, de um estudo estimativo uma vez que a determinação da atividade no corpo inteiro do animal muito provavelmente ficou prejudicada em função da geometria da medida no calibrador de doses.

As FIG. 22 e 23 a seguir representam, respectivamente, as imagens cintilográficas de um rato *Wistar* 24 horas e 7 dias após a administração de 37 MBq de HA-<sup>90</sup>Y na articulação do joelho do animal. O estudo cintilográfico mostra a retenção articular do radiofármaco, sem extravasamento para outros órgãos.

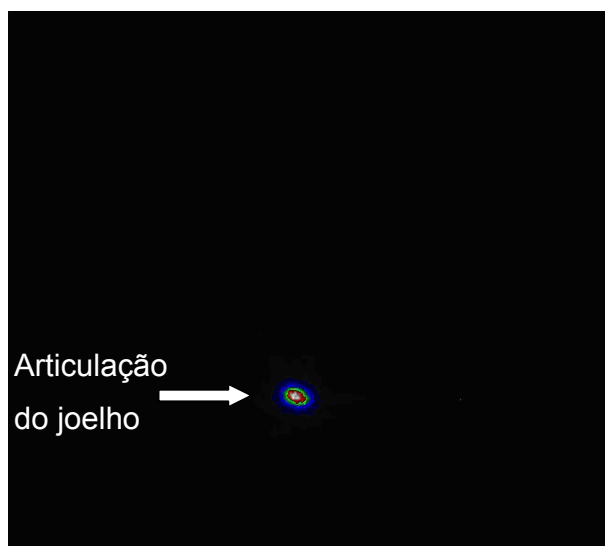


FIGURA 22 - Imagem cintilográfica adquirida em gamma-câmara 24 hs após administração de 37 MBq de HA-<sup>90</sup>Y na articulação esquerda do joelho de um rato *Wistar*



FIGURA 23 - Imagem cintilográfica adquirida em gamma-câmara de 7 dias após administração de 37 MBq de HA-<sup>90</sup>Y na articulação direita do joelho de um rato *Wistar*

A FIG. 24 a seguir é uma ampliação da imagem cintilográfica da região do joelho do rato, para melhor visualização da retenção articular do radiofármaco.

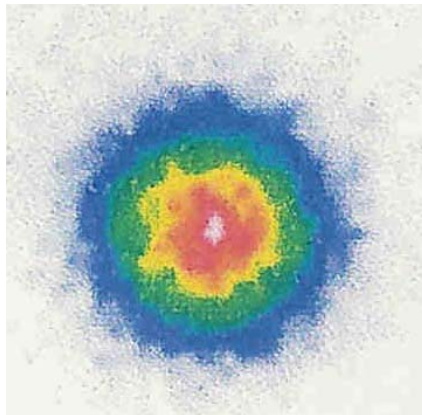


FIGURA 24 - Ampliação da Imagem cintilográfica em gamma-câmara da região do joelho do rato

#### 4.5.2 Estudos de biodistribuição do HA-<sup>177</sup>Lu

Após administração de 37 MBq de <sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub> na veia caudal do animal, a imagem cintilográfica obtida após 24 h apresentada na FIG. 25 mostra a biodistribuição do traçador no sistema ósseo do animal.

Neste caso, se o radiofármaco HA-<sup>177</sup>Lu não apresentar estabilidade *in vivo*, promovendo o desligamento do radioisótopo da hidroxiapatita, o mesmo se acumularia no esqueleto, promovendo danos à medula óssea.



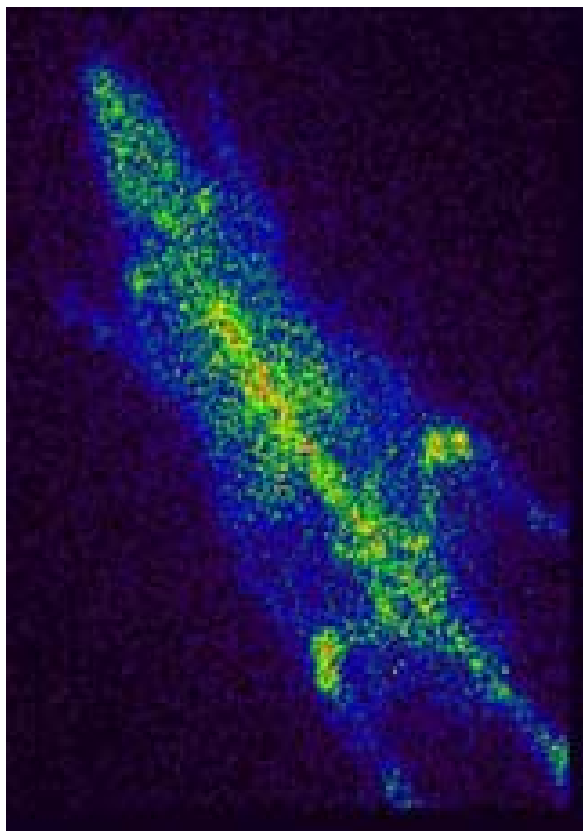


FIGURA 25 Estudo cintilográfico realizado em rato *Wistar*, 24 h após administração de 37 MBq de  $^{177}\text{LuCl}_3$  na veia caudal do animal

Com a administração de 37 MBq de HA- $^{177}\text{Lu}$  diretamente na articulação do joelho do animal pode-se observar na imagem adquirida, também após 24 horas da administração (FIG. 26) que o produto permanece na articulação sem o mínimo extravasamento, conforme desejado para utilização em radiosinovectomia. O produto administrado foi aquele em que se utilizou 20 mg de HA e sem adição de óxido de lutécio no momento da marcação.

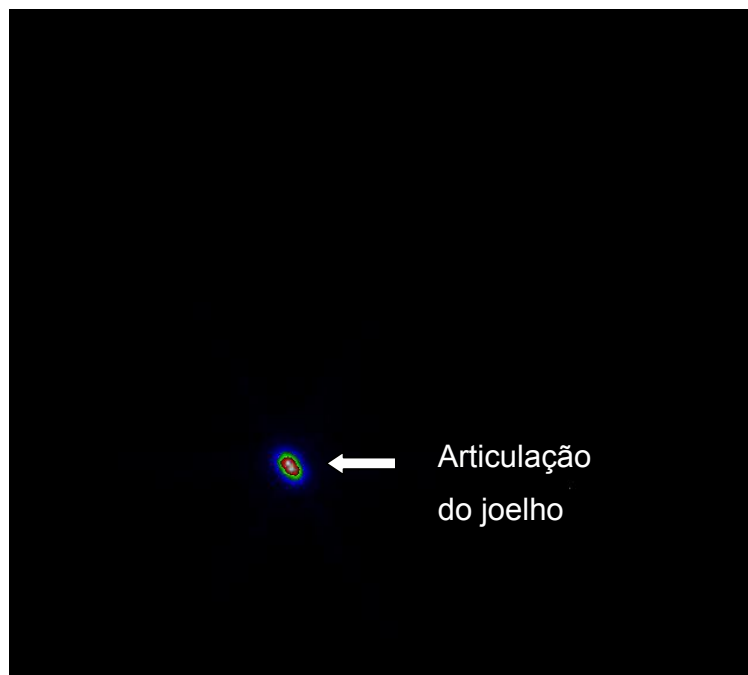


FIGURA 26 - Estudo cintilográfico realizado em rato *Wistar*, 24 h após administração de 37 MBq de HA-<sup>177</sup>Lu diretamente na articulação do joelho do animal.

A FIG. 27 representa a imagem cintilográfica de dois animais, 7 dias após a administração do radiofármaco diretamente na articulação do joelho.

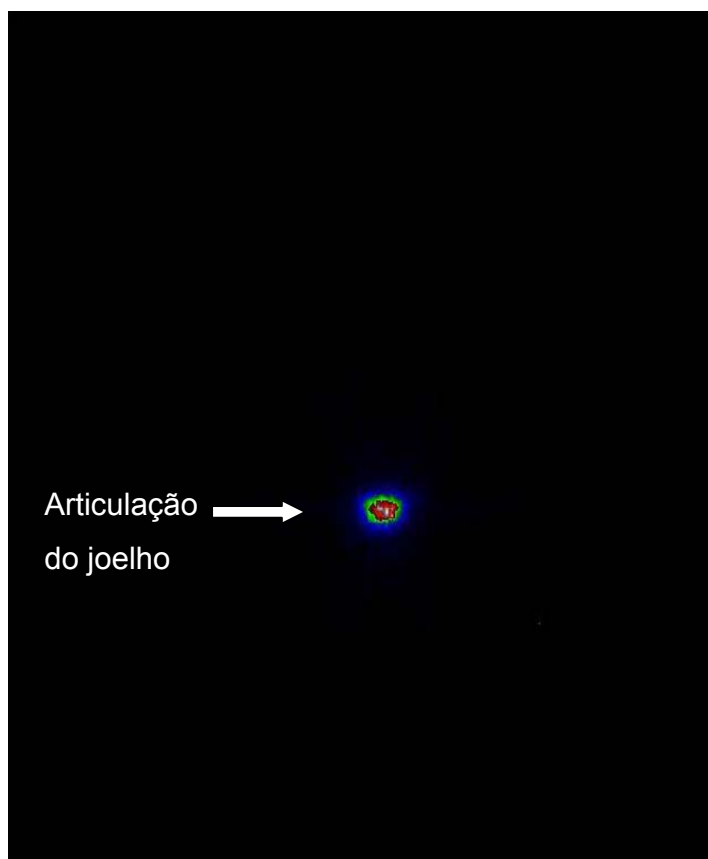


FIGURA 27 - Estudo cintilográfico realizado em rato *Wistar*, 7 dias após administração de 37 MBq de HA-<sup>177</sup>Lu diretamente na articulação do joelho do animal.

Os estudos revelam a excelente estabilidade da HA-<sup>177</sup>Lu *in vivo*, não tendo ocorrido desligamento do radionuclídeo, que poderia ser verificado a partir da observação de captação no tecido ósseo. Também não ocorreu extravasamento do radiofármaco da articulação, pois neste caso, as partículas radiomarcadas caindo na circulação, atingiriam o fígado do animal.

## **5 CONCLUSÕES**

### **5.1 Com relação aos procedimentos de marcação**

#### **5.1.1 Citrato coloidal de $^{90}\text{Y}$**

O método utilizado para produção deste radiofármaco, conforme descrito na literatura, não se mostrou interessante para aplicação em uma rotina de produção, tendo resultado em baixo rendimento de marcação, com baixa porcentagem de atividade ligada às partículas no tamanho apropriado para aplicação em RSV. Apesar de estudar alguns parâmetros da marcação, o presente trabalho não logrou êxito em melhorar os resultados. A técnica de produção deste radiofármaco merece realização de estudos adicionais mais aprofundados para otimização dos resultados.

#### **5.1.2 HA- $^{90}\text{Y}$**

A técnica de marcação utilizada pelo IPEN para marcação da HA com samário-153 foi utilizada na marcação com  $^{90}\text{Y}$ , resultando em excelentes rendimentos de marcação. A reação foi otimizada para aplicação rotineira com a redução do tempo de reação para 15 minutos e utilização de apenas um procedimento de centrifugação e lavagem.

### 5.1.3 HA-<sup>177</sup>Lu

A marcação da HA com <sup>177</sup>Lu utilizando-se procedimento descrito por Chakraborty e cols (2006-A) resultou em excelente rendimento. A porcentagem de ligação do radionuclídeo a partículas com diâmetro maior que 12 um foi otimizada a partir do estudo da massa de óxido de lutécio presente na marcação sendo que os melhores resultados foram obtidos nas marcações realizadas na ausência do carregador. Os estudos também verificaram que a marcação pode ocorrer em um pH fisiológico, sem a necessidade de alteração do pH no momento da reação.

## 5.2 Com relação ao método cromatográfico utilizado na determinação da pureza radioquímica das marcações

### 5.2.1 Citrato coloidal de <sup>90</sup>Y

A cromatografia em papel Whatman 3MM e solução de NaCl 0,9% descrita na literatura (Bowen e cols, 1975) não foi útil na determinação da pureza radioquímica da preparação neste estudo, mostrando-se um sistema de baixa resolução com o espalhamento da espécie radioquímica <sup>90</sup>Y<sup>+3</sup> pela fita. A troca do solvente para NaCl 8,4% resultou em melhor resolução do sistema cromatográfico.

### 5.2.2 HA-<sup>90</sup>Y

O sistema de cromatografia em camada delgada empregando TLC-SG e solução de DTPA 2,5 mM apresentou alta resolução para separação das espécies radioquímicas de interesse, tendo sido eleito o método de escolha para avaliação em produção rotineira.

### 5.2.3 HA-<sup>177</sup>Lu

O mesmo sistema cromatográfico em camada delgada utilizado com êxito na avaliação da HA-<sup>90</sup>Y foi utilizado com sucesso na avaliação da pureza radioquímica da preparação com lutécio-177.

## 5.3 Com relação à estabilidade das preparações *in vitro*

### 5.3.1 Citrato coloidal de <sup>90</sup>Y

Apesar do baixo rendimento de marcação, as partículas radiomarcadas separadas por centrifugação apresentaram estabilidade relativa de cerca de 70% após 5 dias.

### 5.3.2 HA-<sup>90</sup>Y

O produto radiomarcado apresentou estabilidade *in vitro* dentro do período avaliado de 5 dias, armazenado à temperatura ambiente. Tal estabilidade possibilita o armazenamento e transporte do produto radiomarcado em uma rotina de produção.

### 5.3.3 HA-<sup>177</sup>Lu

O produto radiomarcado apresentou estabilidade *in vitro* dentro do período avaliado de 7 dias, armazenado à temperatura ambiente. Tal estabilidade também possibilita o armazenamento e transporte do produto radiomarcado em uma rotina de produção.

#### 5.4 Com relação à biodistribuição

Os estudos de biodistribuição realizados com a Hidroxiapatita marcada com  $^{90}\text{Y}$  e  $^{177}\text{Lu}$  mostraram a estabilidade *in vivo* dos compostos, não tendo ocorrido extravasamento articular nem liberação do radionuclídeo livre para a circulação, confirmando o potencial de ambos para aplicação em radiosinovectomia.

#### 5.5 Considerações finais

O presente trabalho demonstrou a possibilidade de radiomarcagem de HA através da utilização de procedimentos relativamente simples que resultaram em bons rendimentos de marcação e produtos com estabilidade para comercialização. Contribuiu ainda para definição dos sistemas cromatográficos a serem utilizados na determinação da pureza radioquímica no controle de qualidade das preparações tendo colaborado, desta forma, para introdução das metodologias na rotina de produção de radiofármacos do IPEN.

A possibilidade de marcação da HA com dois isótopos beta emissores de energia distintas diversifica o potencial de aplicação em radiosinovectomia, tendo em vista as inúmeras patologias que podem ser tratadas, bem como o tamanho das articulações.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERG A. **Radioactive gold in the treatment of chronic synovial effusion in hemophilia.** In: Ana F. et Denson R. eds: Hemophilia. Proc. VII Congress World Federation of Hemophilia. Amsterdam, Kolland, Teherat Excerpta Medica, p. 212-215, 1971.

BARBOZA, M.F., CASIGLIA, M.T., SOUZA, A.A., HERRERIAS, R., BAMBALAS, E., SANTOS, C., ALVES, J., OSSO Jr, J.A., CALEGARO, J.U.M. **<sup>153</sup>Sm-HA: radiopharmaceutical agent for synovectomy.** Quaternary Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. v. 50, (suppl 1), p. 46-47, 2006.

BILLINGHURST, M. W., JETTE, D. **Colloidal particle-size determination by gel-filtration.** J. Nuc Med. v.20, p. 133-137, 1979.

BITHELL T C. Distúrbios Hereditários da Coagulação. In: Lee, G R; Bithell, TC; Foester, J; Athens, JW; Lukens, JM. **Wintrobe – Hematologia Clínica.** vol.II, ed. Manole. p.1562-616, 1998.

BOIS, M.H.V., PAUWELS, E.K.J., AND BREDVELD, F.C. **New agents for scintigraphy in rheumatoid arthritis .** Eur. J. Nucl. Med. v. 22, p. 1339 - 1345, 1995.

BOWEN, B.M., DARRACOTT, J., GARNETT, E.S., TOMLINSON, R.H. **Yttrium-90 citrate colloid for radioisotope synovectomy.** Am J Hosp Pharm v. 32, p. 1027-1030 (oct) 1975.

CALEGARO, J.U. **Avaliação clínica após um ano da sinovectomia por samário-153 hidroxiapatita em pacientes com artrite hemofílica.** Tese (Mestrado) Faculdade de Medicina de Brasília, Brasília, 2007.

CHAKRABORTY S., DAS T., BANERJEE S., SARMA H. D., VENKATESH M. **Preparation and preliminary biological evaluation of <sup>177</sup>Lu-labelled hydroxyapatite as a promissin agent for radiation synovectomy of small joints.** Nuclear Medicine Communications v. 27, p. 661-668, 2006(A).



CHAKRABORTY S., DAS T., BANERJEE S., SUBRAMANIAN S., SARMA H. D., VENKATESH M.  **$^{175}\text{Yb}$ -labelled hydroxiapatite: a potencial agente for use in radiation synovectomy of small joints.** Nuclear medicine and biology v.33, p. 585-591, 2006(B).

CHAKRABORTY, S., DAS, T., SARMA, H.D., VENKATESH, M., BANERJEE, S. **Preparation and preliminary studies on  $^{177}\text{Lu}$ -labeled hydroxyapatite particles for possible use in the therapy of liver cancer.** Nuc Med and Biol. v. 35, p. 589-597, 2008.

CHANDRA, RAMESH. **Introductory physics of Nuclear medicine.** 4<sup>Th</sup> ed. Philadelphia-Lea and Febiger p. 55-67, 1992.

CHATTOPADHYAY S., VIMALNATH K.V., SAHA S., KORDE A., SARMA H.D., PAL S., DAS M. K. **Preparation and evaluation of e new radiopharmaceutical for radiosynovectomy,  $^{111}\text{Ag}$ -labelled hydroxyapatite (HA) particles.** Applied Radiation and Isotopes 66 (2008) 334-339.

CHRAPKO, B., ZWOLAK R., NOCUJ, A., GOIDBIEWSKA, R., MAJDAN, M. **Radiation synovectomy with  $^{90}\text{Y}$  colloid in the therapy of recurrent knee joint Vusions in patients with inflammatory joint diseases** Rheumatol Int v. 27, p. 729–734, 2007.

CLUNIE, G., ELL, P.J. **A survey of radiation synovectomy in Europe, 1991-1993.** Eur. J. Nucl. Med. v. 22, p. 970-976, 1995.

DAS, B.K., PRADHAN, P. K., SHUKLA, A. K., MISRA, R. **Role of radiosynovectomy in rheumatoid arthritis.** J. Indian. Rheumatol. Assoc. v. 12, p. 0-0, 2004.

DAS, B.k., **Role of radiosynovectomy in the treatment of rheumatoid arthritis and hemophilic arthropathies.** Biomed Imaging Interv J. v.3(4), p. 45, 2007.

DEUTSCH, E., BRODACK, K.F., DEUTSCH, K.F. **Radiation synovectomy revisited.** Eur. J. Nucl. Med. v. 20, p. 1114 – 1127, 1993.

DORENBOSCH, L.L.J.H., VET, H.C.W., **Yttrium radiosinoviorthesis in the treatment of knee arthritis in rheumatoid arthritis: a systematic review.** Ann Rheum Dis v. 59, p. 583-586, 2000.

ERCAN, M.T. **In microheads, microcapsules & lipossomes**. Arshady, R. Ed.: STC Books: London, p. 283-342, 1999.

FLORES, G.F., OVIEDO, O.H., MURPHY, C.A., TENDILLA, J.L., GUZMÁN, F.M., LÓPEZ, K.A. [<sup>166</sup>Dy]Dy/<sup>166</sup>Ho hydroxide macroagregates: **na in vivo generator system for radiation synovectomy**. Appl Rad and Isto. v. 61, p, 1227-1233, 2004.

GEDIK, G.K., UGUR, O., ATILLA, B., PEKMEZCI, M. **Comparassion of extraarticular leakage values of radiopharmaceuticals used form radionuclide synovectomy**. Annals of Nucl. Med. v. 20, n.3, p. 183-188, 2006.

GINELLI, A., BOAS, C.V. **Sinovite Vilonodular Pigmentada**. Disponível em: <http://www.ctscan.com.br>. Acesso em 15 de abril de 2005.

GRANIER, R., GAMBINI, D.J. **Applied Radiation biology and protection**. New York: Ellis Horwood, p. 335, 1990.

**Guideliness European Association of Nuclear Medicine** disponível em [http://eanm.org/scientific\\_info/guideliness/gl\\_radio\\_synovectomy\\_php](http://eanm.org/scientific_info/guideliness/gl_radio_synovectomy_php). Acesso em: 06/01/2009.

GUMPEL, J.M., FARRAN, H.E.A., WILLIANS, E.D. **Use of yttrium 90 in persistent synovits of the knee. II. Direct comparassion of yttrium colloid resin and yttrium citrate**. Ann. Rheum. Dis. v. 33, p. 126127, 1974.

GUMPEL, J.M., WILLIANS, E.D., GLASS, H. I. **Use of yttrium 90 in persistent synovits of the knee. I. Retention in the knee and spread in the body after injection**. Ann. Rheum. Dis. v. 32, p. 223-226, 1973.

HAYER, E., NEWSELY, H. Pentacalcium **mono hidroxy orthophosphate Hidroxyapatite**. Inorg. Synth.; v.7, p.63 – 67, 1963.

HILTUNEN, J. **Arthritis and Radiosynovectomy**. Comunicação Pessoal. MAP Medical Technologies Oy, Finlandia, 1996 - 2000.

JAHANGIER, Z.N., JACOBS, J.W.G., LAFEVER, F.P.J., MOOLENBURGH, J.D., SWEN, V.A.A., BRUYN, G.A.W., GRIEP, E.N., BORG, E.J. **Is radiation synovectomy for arthritis of the knee more effective than intraarticular treatment with glucocorticoids?** Arthritis & Rheumatism. v. 52, n. 11, p. 3391-3402, 2005.

JUNQUEIRA, L.C.U., CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10º Ed. Ed. Guanabara Koogan, 2004.

KAMPEN, W.U., HELLWEG, L., MASSOUDEI-NICKEL, S., CZECH, N., BRENNER, W., HENZE, E. **Clinical efficacy of radiation synovectomy in digital joint osteoarthritis**. European Journal of nuclear medicine and molecular imaging v. 32, n. 5, may 2005.

KAMPEN, W.U., MATIS, E., CZECH, N., SOTI, Z., GRATZ, S., HENZE, E. **Serious complications after radiosynoviorthesis**. Nuklearmedizin. v. 45, p. 262-268, 2006.

KHALID, M., MUSHTAQ, A. **Preparation and in vitro stability of (n, $\gamma$ ) yttrium-90 hydroxyapatite**. Applied Radiation and Isotopes v. 62, p. 587-590, 2005.

KOWALSKY, R.J., PERRY, J.R. **Radiopharmaceuticals in nuclear medicine practice**. Norwalk, conn: Appleton & Lange, 1987.

KRAFT, O., KASPAREK, R., STEPIEN, A. **Radiosynoviorthesis of the knee**. Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals. v. 20 n.3 p. 356-362, 2005.

LAURINDO, I.M.M., XIMENES, A.C., LIMA, F.A.C., PINHEIRO, G.R.C., BATISTELLA, L.R., BERTOLO, M.B, ALENCAR, P., XAVIER, R.M., GIORGI, R.D.N., CICONELLI, R.M., RADOMINSKI, S.C.. **Artrite reumatóide: diagnóstico e tratamento**. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina – Projeto Diretrizes, 2002.

LAURINDO, I.M.M. **Doença Reumatóide**. Disponível em: <http://www.fm.usp.br>. Acesso em 12 de abril de 2005.

LORENZI, T.F. Patologia da Hemostasia. In:Lorenzi T F. **Manual de Hematologia: Propedêutica e Clínica**. 2.ª ed. Rio de Janeiro. Medsi, p. 521-601, 1999.

- NABARRETE, A.A. **A incidência de lesão no ligamento cruzado anterior.** Disponível em <http://www.riototal.com.br>. Acesso em 12 de abr de 2005.
- PACHECO, L. R.L. **Sinovectomia artroscópica do joelho em pacientes hemofílicos.** Tese (doutorado) Universidade Federal do Paraná, 2006.
- PANDEY, U., MUCKHERJEE, A., CHAUDRAY, P.R., PILLAI, M.R.A., VENKATESH, M. **Preparation and studies with <sup>90</sup>Y-labeled particles for use in radiation synovectomy.** Applied Radiation and isotopes v. 55, p. 471-475, 2001.
- PATTI J.E., MAYO W.E. **Arthroscopic synovectomy for recurrent hemarthrosis of the ankle in hemophilia.** Arthroscopy v. 12, p. 652-656, 1996.
- PAVELKA, K., MEIER-RUGE, W., MULLER, W., FRIDRICH, R. **Histological study of effects of colloidal 90 yttrium on knee joint tissues of rabbits.** Ann Rheum. Dis. v. 34, p. 34, 1975.
- PILLAI, M.R.A., CHAKRABORTY, S., DAS, T., VENKATESH, M., RAMAMOORTHY. **Production logistics of <sup>177</sup>Lu for radionuclide therapy.** Appl. Rad and Isot. V.59, p. 109-118, 2003.
- RAMSEY, N.Y.: **Retention of Yttrium-90 in patients with rheumatoid arthritis.** Ann. Rheum. Dis. 32: Supplement 38, 1973.
- ROBERTS, H.R., HOFFMAN, M. **Haemophilia and related conditions – inherited deficiencies of prothrombin (factor II), factor V and factors VII to XII.** In: Williams Hematology. 5<sup>th</sup> ed. Ed. Mc Graw Hill, p.1413-39, 1995
- ROOSEDAAL, G., MAUSER-BUNSCHOTEN, E.P., KLEINN, P., HEIJNEN, L., VAN DEN BERG, H.M., VAN RINSUM, A.C., LAFEBER, F.P.J.G, BIJLSMA, W.J. **Sinovium in haemophilic arthropathy.** Haemophilia.v.4, p. 502-505, 1998.
- ROSCH, F. **Radio lanthanides in endoradiotherapy: an overview.** Radio Chem. Acta v. 95, p. 303-311, 2007.
- SAHA, G.B. **Fundamentals of Nuclear Pharmacy.** Ed Spronger, 5<sup>o</sup> ed. Ed. Springer, 2003.
- SANTOS, J.S. **Obtenção de grupo prostético radioiodado para marcação de proteínas por via indireta.** Dissertação (mestrado) – Instituto de pesquisas Energéticas e Nucleares, 2001.

SCHNEIDER, P., FARAHATI, J., REINERS, C. **Radiosynovectomy in reumathology, ortopedics, and hemophilia.** The journal of nuclear medicine vol 46 No 1 january 2005.

SHABAT, S., KOLLENDER, Y., MERIMSKY, O., ISAKOV, J., FLUSSER, G., NYSKA, M., MELLER, I. **The use of surgery and yttrium 90 in the management of extensive and diffuse pigmented villonodular synovits of large joints.** Rheumatology. v. 41, p.1113-1118, 2002.

SHUKLA, A.K., KHERUKA, S.C., WERNER, E., WAHL, W., DAS, B.K., GAMBHIR, S., PRADHAN, P.K., KUMAR, U. **Localization and quantification of incorporated Beta emitting radionuclides using Bremsstrahlung imaging.** Indian Journal of Nuclear Medicine v. 21, nº2, june 2006.

SIEGEL, H.J., LUCK Jr, V.J., SIEGEL, M.E., **Advances in radionuclide therapeutics in orthopaedics.** J. Am. Acad. Orthop. Surg. v. 12, p. 55-64, 2004.

SILVA, J.B.J. **Estudo experimental da iontoforese como via de administração de fármacos no quadro agudo de hemartrose e no modelo de artropatia crônica hemofílica.** Universidade de Campinas. Dissertação (mestrado), 2006.

SPOOREN, P.M.J., RASKER, J.J., ARENS, R.P.J.H. **Synovectomy of the knee with <sup>90</sup>Y.** J Nucl Med. v.10, p. 441-445, 1975.

TAYLOR, W.J., CORKILL M.M., RAJAPASKE, C.A.N. **A retrospective review of yttrium-90 synovectomy in the treatment of the knee arthritis.** Br J Rheumatol v. 36, p. 1100-1105, 1997.

TEIXEIRA, C., MARTINS, G., COSTA, A., FERRER-ANTUNES, J., PEDROSO L. **<sup>90</sup>Y-Bremsstrahlung: Efeitos produzidos na imagem para efeito da avaliação da eficácia da radiosinovectomia.** Disponível em: [WWW.huc.mim-saude.pt/mednuclear/12-encontroP4.html](http://WWW.huc.mim-saude.pt/mednuclear/12-encontroP4.html). Acesso em 30/06/08.

TURKMEN C., ZULFLKAR, B., TASER. O., TOKMAK, H., KILIÇOĞLU, O., MUDUN, A., UNAL, S., ADALET, I., CANTEZ, S. **Radiosynovectomy in hemophilic synovits: Correlation of therapeutic response and blood-pool changes.** Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals. v. 20, n.3, p. 363-370, 2005.

UGUR, O., GEDIK, G.K., ATILLA, B., RUBELLO, D. **Radiosynovectomy: current status in the management of arthritic conditions.** Nuc Med Commun, v.29, p. 755-758, 2008.

UNAK, T. **Recent advances in medical radionuclide production and the future perspective of compact medical cyclotrons.** Progress Nuclear Energy., v. 37, n.1-4, p. 333-337, 2000.

UNNI, P.R., CHAUDHARI, P.R., VENKATESH, M., RAMAMOORTHY, N., PILLAI, M.R.A. **Preparation and bioevaluation of  $^{166}\text{Ho}$  labeled hydroxiapatite (HA) particles for radiosynovectomy.** Nuclear Medicine and Biology. v. 29, p. 199-209, 2002.

VAN KASTEREN, M.E., NOVAKOVA, I.R., BOERBOOMS, A.M. **Long-term follow up of radiosynovectomy with yttrium-90 silicate in haemophilic haematrosis.** Ann Rheum. Dis. v. 52(7), p. 548, 1993.

VOTH, M., KLETT, R., LENGSELD, P., STEPHAN, G., SCHMID, E. **Biological dosymetry after yttrium-90 citrate colloid radiosynoviorthesis.** Nukleamedizin v. 45, p. 223-228, 2006.

WARBICK, A., EGE, G. N., HENKELMAN, R.M., MAIER, G., LYSTER, D.M. **An evaluation of radiocolloid sizing techniques.** J Nucl Med. v. 18, p. 827-834, 1977.

Yttrium [ $^{90}\text{Y}$ ] colloid suspension for local injection. **CIS Bio International.** CIS Bio International, filiale de Schering S.A.