



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Farmacêutica
Mestrado Profissional

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**FORMULAÇÃO DE UM COLD KIT OTIMIZADA PARA MARCAÇÃO COM
 ^{99m}Tc PARA DIAGNÓSTICO DE TUMOR NEUROENDÓCRINO**

Bruna Fernandes

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª.Marlise Araújo dos Santos

Porto Alegre, 2015

BRUNA FERNANDES

**FORMULAÇÃO DE UM COLD KIT OTIMIZADA PARA MARCAÇÃO COM
^{99m}Tc PARA DIAGNÓSTICO DE TUMOR NEUROENDÓCRINO**

Dissertação apresentada como requisito ao Programa de Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica da PUCRS parcial e último para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Farmacêutica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a.Marlise Araújo dos Santos

Porto Alegre, 2015

RESUMO

No mundo, diversas empresas produzem kits para diagnóstico de tumores neuroendócrinos para marcação com ^{99m}Tc . Com a intenção de nacionalizar esse tipo de produto no Brasil, uma formulação foi proposta e baseada na metodologia desenvolvida por Guggenberg *et al*, utilizando HYNIC-TOC, SnCl_2 , EDDA, tricina, manitol e ácido ascórbico. Para marcação do *cold kit*, foi utilizado o radionuclídeo tecnécio metaestável (^{99m}Tc), produzido por um gerador de ^{99}Mo . O produto foi armazenado em temperaturas de 0 a 8°C e a 25°C antes da marcação. Após marcação do produto, esse foi mantido em temperatura ambiente por até quatro horas. O tempo de exposição foi suficiente para observar a vida do produto em cada método de armazenamento. Considerando-se um limite de PRQ (pureza radioquímica) de 80%, o produto se mostrou estável durante os oito meses, quando armazenado entre 0 a 8°C antes da marcação, e até quatro horas pós-marcação. Sendo assim, possível a utilização desse produto, em centro de medicina nuclear, por período mais longo durante o dia.

Palavras-chave: tecnécio, octreotide, somatostatina, radiofarmácia, pureza radioquímica.

ABSTRACT:

Several companies worldwide produce kits with ^{99m}Tc labelling for diagnosing neuroendocrine tumors. Aiming at producing this kind of product in Brazil, a formulation was proposed, based on the methodology developed by Guggenberg *et al*, using HYNIC-TOC, SnCl_2 , EDDA, tricine, mannitol and ascorbic acid. For labelling the cold kit, metastable radionuclide technetium (^{99m}Tc), produced by a ^{99}Mo generator was used. The product was stored at temperatures of 0 to 8°C and at 25°C before labelling. After the product was labelled, it was kept at room temperature for up to 4 hours. The time of exposure was sufficient to observe the shelf life of the product for each storage method. Considering a radiochemical purity (RCP) of 80%, the product remained stable during the eight-month storage at 0 to 8°C before labelling and up to 4 hours after labelling. Therefore, the use of this product is possible in centers of nuclear medicine for a longer period during the day.

Key Words: technetium, octreotide, somatostatin, radiopharmacy, radiochemical purity.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	ARTIGO.....	19
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
	REFERÊNCIAS	40
	ANEXO A	42

1 INTRODUÇÃO

A maioria dos tumores neuroendócrinos humanos expressam alta densidade de receptores de somatostatina. A família da somatostatina consiste em somatostatina-14 e somatostatina-28 e pode ser de origem sintética. Ela pode ser inibida por um amplo espectro de funções fisiológicas, incluindo a secreção de hormônios peptídicos. A somatostatina pode ser considerada um neurotransmissor, um neurohormônio ou um hormônio que atua através de mecanismos locais autócrinos ou parácrinos. (REUBI, 2003).

A ação da somatostatina, é mediada pela alta afinidade destes aos receptores localizados na membrana plasmática das células alvo. Tumores neuroendócrinos expressam esses receptores até cem vezes mais do que apresentado normalmente no organismo humano. Há cinco subtipos de receptores de somatostatina humana: sst1, sst2, sst3, sst4 e sst5. Esses subtipos pertencem à superfamília dos receptores acoplados à proteína G que, juntos, têm vários efeitos sistêmicos intracelulares (REUBI, 2003).

A proteína G é responsável pela transdução do sinal entre receptores acoplados a esta proteína. A proteína G é heterotrimérica, constituída pelas subunidades α , β e γ . Ela é intermediadora essencial para o mecanismo de transdução de sinal, ligando-se a diversos receptores acoplados a proteína G (GPCRs), localizados na superfície celular. A inativação desta proteína ocorre pela ação da GTPase na subunidade α , a qual transforma por hidrólise a guanosina trifosfato ativa (GTP) em guanosina difosfato inativa (GDP) (ALBERTS, 2010).

A cascata de sinalização (figura 1) desses receptores com a somatostatina ou com um análogo desta ocorre com a ligação desse peptídeo aos receptores específicos inibindo a adenil ciclase e ativando os canais de potássio e/ou inibindo os canais de

cálcio. Assim, esses receptores são utilizados principalmente como sítios de ligação para um peptídeo análogo, como exemplo, o octreotide (FERONE, 2009).

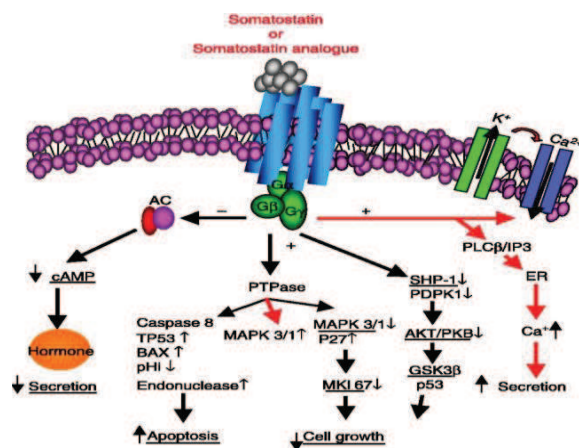


Figura 1 – Processo desencadeador de receptor somatostatina. Fonte: Ferone (2009)

Os receptores tumorais se ligam com alta afinidade a análogos de peptídeos e não a um receptor mediador de ações fisiológicas ou patofisiológicas do peptídeo. Atualmente, esses peptídeos radiomarcados estão sendo utilizados no diagnóstico e na terapia de tumores que expressem em grandes quantidades esses tipos de receptores. O octreotide (Figura 2) possui alta afinidade pelos receptores sst2 e sst5, afinidade moderada pelos receptores do subtipo sst3 e não possui afinidade pelos receptores dos subtipos sst1 e sst4 (REUBI, 2003). Através da injeção do octreotide, marcado com um radionuclídeo, é possível localizar esses tumores e suas metástases por cintilografia.

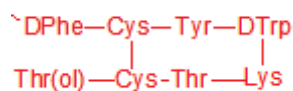


Figura 2 – Estrutura do octreotídeo

No Brasil, o HYNIC-TOC (octreotídeo) é considerado um radiofármaco, o qual recebe esta classificação mesmo para o componente não radioativo, ou seja, o fármaco para marcação, conforme a RDC 64/09, a qual descreve os radiofármacos como “(...) preparações farmacêuticas com finalidade diagnóstica ou terapêutica que, quando prontas para o uso, contêm um ou mais radionuclídeos. Compreendem também os componentes não-radioativos para marcação e os radionuclídeos, incluindo os componentes extraídos dos geradores de radionuclídeos”. Assim como o elemento radioativo é denominado radiofármaco, o *cold kit* também recebe essa denominação no Brasil (ANVISA, 2009).

Já, segundo o órgão americano *Food and Drug Administration* (FDA), radiofármaco é aquele que apresenta um núcleo radioativo, que espontaneamente exhibe desintegração de um núcleo instável com emissão de partículas ou fótons nucleares, acoplado a um fármaco. Assim, este é responsável pela localização em um tecido ou órgão específico e o componente radioativo é responsável pela emissão de raios gama para uma detecção externa ou emissão da radiação de partículas. Os fármacos a serem complexados com a radiação são denominados *cold kits* (PONTO, 1998).

O radiofármaco pode ser utilizado para diagnóstico (monitoramento/diagnóstico de vários estados das doenças, utilizando baixa dose de radiação) e com finalidade terapêutica (tratamento de doenças, normalmente utilizando doses elevadas de radiação atacar as células tumorais e para causar danos no local aplicado) (PONTO, 1998). Esse tem sua preparação final em clínicas ou radiofarmácias hospitalares. Esta última, por sua

vez, é uma parte integrante do departamento do serviço de medicina nuclear (SMN) e é a responsável pela preparação dos radiofármacos com alta qualidade, sendo base para um exame qualificado na medicina nuclear. A maioria dos radiofármacos preparados na radiofarmácia são utilizados, principalmente, para diagnóstico por imagem, sendo esta a principal atividade da medicina nuclear (EANM, 2008).

A radiofarmácia exige área de acesso restrito a pessoas treinadas para realizar a preparação e o controle de qualidade dos radiofármacos. A forma de trabalho deve ser padronizada e deve seguir os procedimentos operacionais padrão (POP), os quais deverão estar prontamente disponíveis neste local. Toda manipulação de materiais radioativos deve ser realizada utilizando técnicas assépticas, dentro de uma estação de trabalho blindada. Não é permitida a presença de comida, bebida, cosméticos, cigarros, etc. Devido à radiação, todos os funcionários que estão expostos a essa área devem usar um dosímetro pessoal e, após a manipulação de materiais radioativos, o manipulador deverá utilizar um medidor de radioações ionizantes como o Geiger Muller (SAHA, 2004) para certificar-se de que não foi contaminado durante o trabalho (EANM, 2008).

A radiofarmácia engloba os estudos relacionados aos aspectos farmacêuticos, químicos, físicos, bioquímicos dos radiofármacos. Ela compreende uma visão racional da concepção, preparação, gestão, seleção, armazenamento, distribuição e uso adequado dos radiofármacos. Assim como os itens citados, o controle de qualidade, o qual avalia a pureza radioquímica (PRQ) é extremamente importante, pois é ele que determina o resultado da complexação do fármaco à radiação (EANM, 2008).

O radionuclídeo mais utilizado nos SMN é o tecnécio, elemento obtido pelo decaimento do molibdênio (figura 3), que possui uma meia-vida de 66 horas e que ao decair gera um emissor β , obtendo-se assim um isótopo de meia-vida curta de 6 horas, o tecnécio 99 metaestável de energia γ (ZOLLE, 2007; SAHA, 2004).

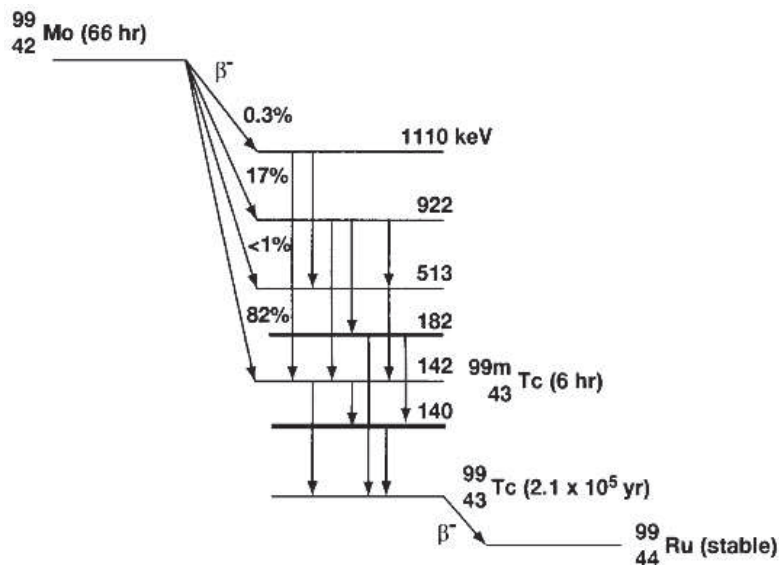


Figura 3 – Decaimento do molibdênio. Fonte: Saha (2004)

O tecnécio é disponibilizado em um gerador (figura 4) que possui uma coluna cromatográfica de óxido de alumina onde fica retido o radionuclídeo pai, o molibdênio. A separação dos elementos MoO_4^{2-} e TcO_4^- na coluna do gerador é baseada na diferença relativa entre a afinidade do ^{99m}Tc do ^{99m}Mo pela coluna. Quando o eluente, a salina, passa através da coluna de óxido de alumina que contém $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ e $^{99m}\text{TcO}_4^-$ este é eluído (OWNUNWANNE, 1995).

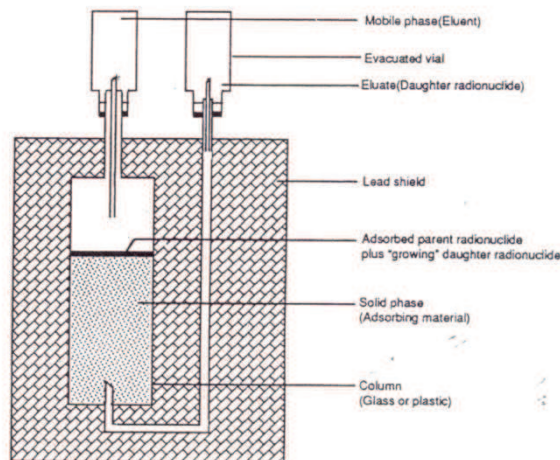


Figure 1.1 A ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ column generator.

Figura 4 – Gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$. Fonte: Ownunwanne (1995)

O tecnécio possui oito estados de oxidação, variando de -1 a +7. Considerando a forma química livre, os estados mais estáveis são 7, 5, 4, 3, 1 e 0. Os estados mais difíceis de estabilizar são 6, 2 e -1. O maior estado de oxidação (+7) é ocupado pelo ânion TcO_4^- (figura 5) que é eluído do gerador $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$, que é desprezível se não ligado diretamente a qualquer ligante (ZOLLE, 2007).

Para a produção dos radiofármacos com $^{99\text{m}}\text{Tc}$, é necessária a redução do tecnécio para um menor estado de oxidação para que ocorra a complexação com a molécula do fármaco. Durante esta redução o ligante deve estabilizar-se no estado de oxidação inferior, caso contrário, é obtida a forma coloidal (TcO_2), sendo esta, uma impureza gerada pelo processo (ZOLLE, 2007).

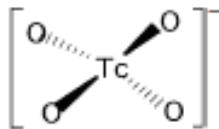


Figura 5 – Tecnécio livre (TcO_4^-). Fonte: Zolle (2007)

Os fármacos complexados com tecnécio são classificados em três gerações, sendo a primeira com foco na distribuição, metabolismo, fluxo e excreção (ex: pertecnato de sódio, colóides, fosfatos e DTPA) e a segunda tendo como objetivo as propriedades moleculares, como tamanho, carga e lipofilicidade (ex: perfusão de miocárdio e cerebral). A terceira geração de radiofármacos é aquela em que os modelos de agentes de imagenologia são baseados na seleção cuidadosa das biomoléculas adequadas para funcionar como vetores eficazes para a administração *in vivo* de radioatividade em alvos biológicos específicos, tais como os receptores e transportadores. Esta estratégia implica na abordagem de marcação utilizada para introduzir um radionuclídeo em uma biomolécula não devendo provocar qualquer distorção em sua atividade biológica. O octreotide (HYNIC-TOC) é um radiofármaco de terceira geração. A introdução do conceito de agente quelante bifuncional (BFCA) e novos produtos químicos, como a Tc-tricarbonyl, Tc-nitrído, complexos ligante Tc-HYNIC e complexos misturados tem ajudado a estabelecer a ligação entre o radioisótopo e a célula alvo (IAEA, 2008).

Os radiofármacos $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-TOC (imagenologia de tumores neuroendócrinos), desenvolvidos como uma alternativa para ^{111}In -octreotide, e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -TRODAT-1 (único composto com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ para estudos de receptores no cérebro) são os melhores exemplos de terceira geração de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ radiofármacos (IAEA, 2008).

O desenvolvimento de radiofármacos de terceira geração requer muito cuidado devido à sensibilidade do produto. Para o desenvolvimento da formulação do *cold kit* HYNIC-TOC, conforme experimento desenvolvido por Guggemberg, diversas maneiras foram testadas para uma formulação final. Essa, conforme o artigo, contém 20 µg HYNIC-TOC dissolvido em etanol 10%, 10 mg EDDA dissolvido em água, 20 mg TRICINA dissolvido em água, 50 mg MANITOL dissolvido em água e 20 µg CLORETO ESTANOSO HCl 0,1 N. O ciclo de liofilização apresentava as etapas de congelamento (em nitrogênio líquido <-50°C), secagem primária (20 horas em - 10°C), secagem secundária (4 horas em + 10°C) e armazenamento do produto (2 - 8°C). A partir de estudos como esses, produtos podem ser desenvolvidos para beneficiar a população.

Atualmente no Brasil, os medicamentos radiofármacos (ANVISA, 2009) para diagnóstico de tumor neuroendócrino podem ser marcados com ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e ^{68}Ga . Este último é utilizado em equipamentos de *Positron Emission Tomography* (PET); contudo, a maioria dos SMN ainda não possuem esse equipamento devido ao custo elevado. O padrão ouro utilizado então é o ^{111}In -DTPA-[D-Phe1]octreotide (Octreoscan®) para diagnóstico deste tipo de tumor (MAMIKUNIAN, 2009). Para a utilização em equipamentos *Single Positron Emission Computer Tomography* (SPECT), são empregados os radionuclídeos como ^{111}In e $^{99\text{m}}\text{Tc}$. A acessibilidade ao $^{99\text{m}}\text{Tc}$ é maior que a do ^{111}In , pois o tecnécio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) é produzido através de geradores de ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$, assim como o processo de marcação do octreotide, que é realizado dentro do Serviço de Medicina Nuclear. Já o ^{111}In é produzido em ciclotron cujos poucos serviços possuem um, e seu processo de marcação é realizado fora desses serviços. No território nacional, o número de gama câmaras existentes sobressai ao número de equipamentos PET (CNES, 2015). Entre outros benefícios, o tecnécio possui um tempo de meia-vida

física de 6 horas, energia de 140 keV e menor custo de produto (~ R\$400/dose) e energia de 140 keV, uma vez que a gama câmara, equipamento utilizado para a cintilografia, possui uma faixa ideal de energia de 100 a 200 keV, o que permite uma imagem com maior qualidade utilizando tecnécio. O índio-111, por sua vez, possui tempo de meia-vida física 2,83 dias, energia de 245,4 keV, e elevado custo (~ R\$2.000/dose). Uma das grandes vantagens na utilização do HYNIC-TOC-^{99m}Tc, tanto para o paciente quanto para o SMN, é o tempo para a aquisição das imagens (realizadas em 1 e 4 horas após a administração da dose no paciente) que, devido à meia-vida física do radionuclídeo, esta é realizada em apenas um dia, além disso possui uma rápida excreção, o que revela mais uma de suas vantagens, ou seja, menor exposição do paciente à radiação quando comparado ao mesmo produto marcado com ¹¹¹In (GABRIEL, 2003;THRALL, 2003). Porém, hoje, o HYNIC-TOC-^{99m}Tc é importado para o Brasil, não havendo produção nacional deste produto, encarecendo o procedimento. Os radiofármacos são considerados insumos estratégicos para o país e cada vez mais o governo brasileiro tem estimulado indústrias a desenvolverem seus próprios medicamentos ao invés de sua importação (MCTI, 2012).