

# Aquisição e análise quantitativa de imagens PET em camundongos saudáveis utilizando o radiofármaco $^{11}\text{C}$ -Metionina

## AUTORES

**Kristian Ellon de Melo Oliveira** [kristianellon2010@hotmail.com], tecnólogo em Radiologia pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); **Carlos Malamut** [malamut@cdtn.br], bacharel em Física (UFMG), mestre em Matemática (PUC-RJ) e doutor em Física (PUC-RJ); **Marina Bicalho Silveira** [mbs@cdtn.br], graduada em Farmácia (UFMG), mestre e doutora em Ciência e Tecnologia das Radiações (CDTN/CNEN); **Rodrigo Modesto Gadelha Gontijo** [rodrigogadelhagontijo1@hotmail.com], tecnólogo em Radiologia (CEFET-MG), mestre em Radioproteção e Dosimetria (IRD/CNEN) e doutorando (CDTN/CNEN)

## RESUMO

A  $^{11}\text{C}$ -Metionina é o radiofármaco mais utilizado em oncologia cerebral através da Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET). Devido à alta atividade proliferativa das células tumorais, o transporte transmembrana de aminoácidos é elevado, o que implica em captação diferenciada do radiofármaco pelos tumores. No Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN), estão sendo iniciados os estudos pré-clínicos utilizando a  $^{11}\text{C}$ -Metionina. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de captação da  $^{11}\text{C}$ -Metionina através da técnica de imagem PET. A  $^{11}\text{C}$ -Metionina foi sintetizada utilizando-se o módulo automático TRACERlab FX C PRO (GE). Os estudos foram feitos com camundongos Balb/c machos, saudáveis, com idades entre 3 e 5 semanas e pesando entre 20 e 25g. Os camundongos (n=3) receberam de 11 a 13 MBq/100 $\mu\text{L}$  de  $^{11}\text{C}$ -Metionina e foram mantidos anestesiados com isoflurano. Logo após injeção do radiofármaco, os animais foram posicionados em decúbito ventral. Imagens dinâmicas de 30 minutos foram adquiridas em uma única posição de cama. Outro camundongo (n=1) foi submetido à aquisição de imagem estática em três posições de cama para avaliação da distribuição de corpo inteiro. O software do PET foi empregado para reconstrução das imagens utilizando o método MLEM-2D. Estudos de quantificação foram realizados por meio do software PMOD a partir do fator de calibração determinado através de uma imagem de fantoma. Dados foram expressos em %DI/g. O órgão que apresentou maior captação foi o pâncreas, com 13,6 %DI/g no tempo de 30 minutos após injeção. A  $^{11}\text{C}$ -Metionina também se acumulou em outros órgãos da região abdominal: fígado, estômago, baço e intestino, com captações

## ABSTRACT

$^{11}\text{C}$ -Methionine is the most widely used radiopharmaceutical in cerebral oncology through Positron Emission Tomography (PET). Due to the high proliferative activity of tumor cells, the transmembrane transport of amino acids is high, which implies in differentiated uptake of the radiopharmaceutical by the tumors. In the Nuclear Technology Development Center (CDTN) pre-clinical studies are being initiated using  $^{11}\text{C}$ -Methionine. The aim of this work was to evaluate the uptake profile of  $^{11}\text{C}$ -Methionine through the PET imaging. The  $^{11}\text{C}$ -Methionine was synthesized using the TRACERlab FX C PRO (GE) automated modulus. The studies were done with healthy male Balb/c mice, aged between 3 and 5 weeks and weighing between 20 and 25g. Mice (n = 3) received 11 to 13 MBq/100 $\mu\text{L}$  of  $^{11}\text{C}$ -Methionine and were anesthetized with isoflurane. Soon after injection of the radiopharmaceutical, the animals were positioned in the ventral decubitus position. Dynamic images of 30 minutes were acquired in a single bed position. Another mouse (n = 1) was submitted to the acquisition of static image in three bed positions to evaluate the distribution of the whole body. PET software was used to reconstruct the images using the MLEM-2D method. Quantification studies were performed using the PMOD software from the calibration factor determined through a phantom image. Data were expressed as % DI/g. The organ that presented the highest uptake was the pancreas, with 13.6 %DI/g in the time of 30 minutes after injection.  $^{11}\text{C}$ -Methionine also accumulated in other organs of the abdominal region: liver, stomach, spleen and intestine, with maximum uptakes of 11.4, 8.8, 7.7 and 5.8% DI/g, respectively.

máximas de 11,4, 8,8, 7,7 e 5,8 %DI/g, respectivamente. Tecidos como músculo e osso apresentaram valores de cerca de 2,0 % DI/g. A captação na região cerebral foi comparável ao background. Apesar de algumas limitações, foi possível acompanhar o perfil de captação do radiofármaco nos principais órgãos. A princípio, a  $^{11}\text{C}$ -Metionina não deve ser indicada para estudos de órgãos ou tecidos da região abdominal, devido à alta captação fisiológica. A análise da imagem leva à confirmação da baixa captação cerebral da  $^{11}\text{C}$ -Metionina, propriedade que permite a aplicação deste radiofármaco na detecção de tumores cerebrais. A imagem PET é uma ferramenta valiosa que possibilita investigações de forma não invasiva em pequenos animais. Entretanto, ainda são necessárias melhorias nos protocolos de aquisição das imagens.

**Palavras-Chave:** PET,  $^{11}\text{C}$ -Metionina, Biodistribuição.

Tissues such as muscle and bone presented values of about 2.0% ID/g. The uptake in the brain region was comparable to background. Despite of some limitations, it was possible to follow the profile of radiopharmaceutical capture in the main organs. In principle,  $^{11}\text{C}$ -Methionine should not be indicated for studies of organs or tissues of the abdominal region due to the high physiological uptake. The analysis of images confirms the low cerebral uptake of  $^{11}\text{C}$ -Methionine, a property that allows the application of this radiopharmaceutical in the detection of brain tumors. PET imaging is a valuable tool that enables noninvasive investigations of small animals. However, improvements to the image acquisition protocols are still required.

**Palavras-Chave:** PET,  $^{11}\text{C}$ -Methionine, Biodistribuição.

## INTRODUÇÃO

O radiofármaco mais amplamente utilizado pela Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET) é o Fluordesoxiglicose (FDG) marcado com flúor-18, um marcador de metabolismo celular que possui alta sensibilidade para o diagnóstico e o estadiamento de diversos carcinomas [1]. Porém, nem todos os carcinomas apresentam alto consumo de glicose e, além disso, o uso de  $^{18}\text{F}$ FDG em PET tem limitações, como alta taxa de excreção urinária interferindo com a detecção de tumores na região pélvica; alta captação em inflamação e alta captação cerebral fisiológica, o que reduz o contraste tumor/background [2]. Assim, para otimizar a detecção de células neoplásicas, é necessário desenvolver novos radiofármacos direcionados para alvos moleculares estratégicos que sirvam como marcadores tumorais [3].

O radionuclídeo  $^{11}\text{C}$  é um elemento importante em radiofarmácia e radioquímica por estar presente nas biomoléculas e, portanto, extremamente adequado para ser usado na marcação destes, uma vez que não altera a estrutura química e tampouco as propriedades bioquímicas do composto. A meia-vida física do  $^{11}\text{C}$  é de 20,4 minutos, tendo sua partícula  $\beta^+$  energia máxima de 0,96 MeV [4].

Entre as biomoléculas, destacam-se os aminoácidos, cada vez mais utilizados como marcadores tumorais na área de radiodiagnóstico. Os aminoácidos são captados por células tumorais devido à elevada atividade metabólica em relação às células normais e podem, por

exemplo, ser incorporados às proteínas, metabolizados para obtenção de energia e divisão celular [5].

A L-[Metil-( $^{11}\text{C}$ )] Metionina ou  $^{11}\text{C}$ -Metionina é um radiotraçador amplamente utilizado em neuro-oncologia. Células tumorais superexpressam os receptores de metionina e, portanto, captam com maior intensidade o radiofármaco. Além disso, esse radiofármaco atravessa a barreira hematoencefálica não apresentando captação significativa pela massa cinzenta, o que permite a aquisição de imagens PET com alto contraste, aprimorando o diagnóstico de tumores cerebrais [6].

Recentemente, um sintetizador automático para produção de radiofármacos marcados com  $^{11}\text{C}$  foi instalado no CDTN. Seguindo a mesma linha de pesquisa implementada para a  $^{18}\text{F}$ -colina (colina marcada com flúor-18) e  $^{18}\text{F}$ -timidina (timidina marcada com flúor-18), a UPPR do CDTN desenvolveu o processo de síntese e os controles de qualidade necessários para a produção de um novo radiofármaco, a  $^{11}\text{C}$ -Metionina. A etapa a seguir é a execução de ensaios pré-clínicos com este radiofármaco visando inicialmente seu uso em pesquisas clínicas e, futuramente, o registro junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Os radiofármacos enquadrados como medicamentos radiofármacos novos ou inovadores devem ser submetidos a ensaios *in vitro* e *in vivo* para avaliação de sua segurança como requisito para o registro [7].

## METODOLOGIA

Para a realização deste estudo, o protocolo de desenvolvimento da pesquisa foi submetido à avaliação do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), sendo aprovado e resguardado pelo Parecer No 132/13.

As atividades foram desenvolvidas no laboratório da Unidade de Pesquisa e Produção de Radiofármacos – UPPR do CDTN. O Laboratório de Imagens (LIM),

conta com um equipamento PET para pequenos animais da GE, cujo sistema operacional utilizado é o *software* LabPET versão 1.12.0. O sistema LabPET permite a aquisição e reconstrução das imagens. No entanto, o *software* utilizado para a quantificação das imagens foi o Pmod e as imagens foram salvas no formato DICOM.

O sistema de entrega de base anestésico utilizado consiste de uma fonte de oxigênio - O<sub>2</sub>; um medidor de fluxo de O<sub>2</sub>; um vaporizador de precisão, que produz um vapor de um líquido anestésico volátil; um circuito de respiração do paciente (tubagem, conectores e válvulas) e um dispositivo que remove todos os gases anestésicos. O anestésico utilizado foi o isoflurano em concentrações variáveis de 1 a 3%. Durante o processo de anestesia, o O<sub>2</sub> flui através do vaporizador e associa-se ao anestésico. A mistura de O<sub>2</sub>-isoflurano flui através do circuito de respiração e em seguida para dentro dos pulmões do camundongo, por geralmente ventilação espontânea (respiração).

Os camundongos utilizados são da linhagem Balb/C, albinos, sociáveis; podendo ser mantidos em grupos no interior de gaiolas. São úteis para a investigação de cancro e imunologia, possuem alta atividade locomotora espontânea e alta taxa de micção e defecação. Foram utilizados 04 camundongos, machos, sadios, com cerca de 3 a 5 semanas, pesando entre 20 a 25g. Os animais foram provenientes do Centro de Bioterismo do ICB/UFMG.

O radiofármaco <sup>11</sup>C-Metionina foi manipulado na sala de preparação de material radioativo, para administrar uma atividade (dose) entre 11MBq e 13MBq/100 µL. Após a sedação, os animais (n=4), individualmente, foram posicionados no PET em decúbito ventral e envolvidos por um sistema de aquecimento com o propósito de manter a temperatura corporal do animal estável. Iniciadas as imagens, um animal (n=1) foi submetido a uma aquisição de corpo inteiro (Figura 1)

ao nível de estudos do cérebro (captação cerebral) e da cauda (extravazamento por via de administração), sendo realizadas 3 posições de cama e os outros animais (n=3), com aquisição dinâmica de 30 minutos e com o campo de visão (FOV) abrangendo a região do tórax e do abdômen em um única posição de cama, e no momento da reconstrução, frames (imagens estáticas) de 5, 10, 20 e 30 minutos foram reconstruídos.

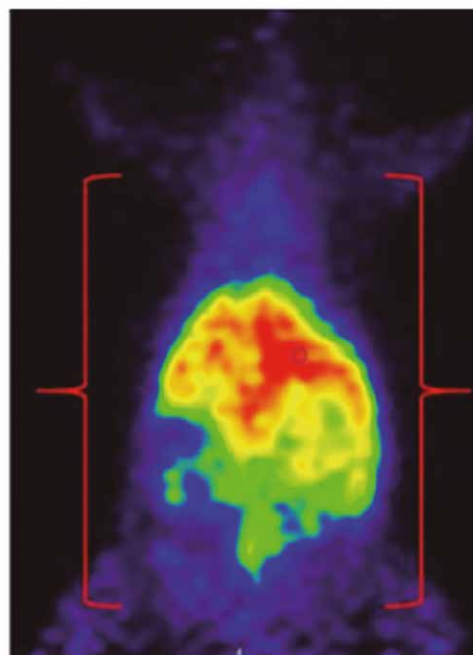


Figura 1. Imagem PET de um camundongo (corpo inteiro) com <sup>11</sup>C-Metionina.

Durante todo o processo de aquisição da imagem, os camundongos foram mantidos anestesiados, 1 a 3% de isoflurano em 2% de oxigênio. Os movimentos respiratórios dos animais estiveram monitorados durante todo o tempo de aquisição das imagens e mantidos dentro da faixa de 30 a 50 respirações por minuto.

Após a aquisição das imagens, os animais foram sacrificados (deslocamento cervical) e colocados juntamente com as carcaças dos demais animais utilizados e em seguida colocados em sacos plásticos brancos apropriados e armazenados em freezer exclusivo para material radioativo, para posterior recolhimento por empresa especializada.

## RESULTADOS

A Figura 2 refere-se a um gráfico apresentando os dados após análise (n=3 animais em cada tempo) e é possível concluir que o pâncreas possui maior captação em relação aos outros órgãos em todos os tempos investigados com 13,6 %DI/g.

O radiofármaco em estudo também descreveu captação em outros órgãos da região abdominal: fígado, estômago, baço e intestino, com captções máximas de

11,4; 8,8; 7,7 e 5,8 %DI/g, respectivamente. E com um valor inferior a 2 %DI/g, o músculo e o osso ilustraram uma baixa captação do radiofármaco no estudo de biodistribuição pela imagem PET.

O cérebro não foi estudado uma vez que apresentou captação ao nível de background (BG). Já a cauda foi quantificada qualitativamente para comprovar o não extravasamento do radiofármaco.

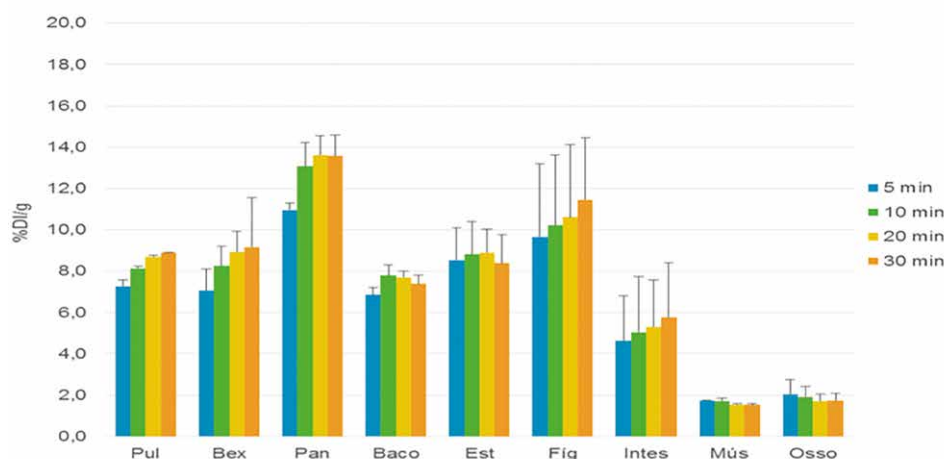


Figura 2. Biodistribuição da  $^{11}\text{C}$ -Metionina por imagens microPET

Ao comparar os dois primeiros tempos (5 e 10 minutos) percebe-se um crescimento na captação da  $^{11}\text{C}$ -Metionina nos tecidos da região tóraco-abdominal no decorrer do tempo.

O mesmo fenômeno acontece quando se compara o tempo de 10 minutos com o tempo de 20 minutos. Porém, no tempo de 30 minutos, o baço e o estômago descreveram uma leve queda em relação ao tempo de 20 minutos

descrevendo uma captação 7,4 e 8,4 %DI/g, respectivamente.

O tempo de 5 minutos, quando comparado ao tempo de 30 minutos, apresentou um valor de %DI/g inferior para os tecidos/órgãos como pulmão, bexiga, pâncreas, baço, fígado e intestino. Também foi realizada uma quantificação qualitativa (Figura 3) das imagens PET a fim de observar os níveis de captação do radiofármaco ao longo de cada tempo.

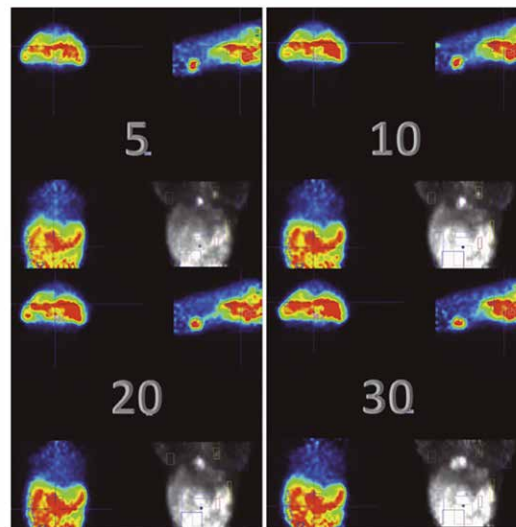


Figura 3. Quantificação qualitativa da  $^{11}\text{C}$ -Metionina em camundongo.

## DISCUSSÃO

O estudo obteve informações relevantes para a procedência da pesquisa, fornecendo dados e informações que poderão ser utilizadas ou até mesmo aprimoradas por outras pesquisas.

O pâncreas demonstrou uma enorme afinidade com o radiofármaco em análise se mantendo sempre captante, o que não é muito fácil demonstrar visivelmente nas imagens pré-clínicas do PET, devido ao fato de seu formato e sua localização anatômica afetarem no delineamento, mesmo assim foi possível

quantificá-lo. O fígado foi o segundo órgão com maior desempenho na captação da metionina, sendo de mais fácil localização e quantificação que o pâncreas.

O músculo e o osso foram os tecidos com o menor índice de captação ao radiofármaco. O que fica visivelmente bem demonstrado nas imagens PET, uma vez que nenhum dos dois tecidos apresenta captação.

O coração e a bexiga descreveram resultados interessantes, o que já era esperado quando se analisa tecidos/órgãos com atividade metabólica ativa.

## REFERÊNCIAS

1. N. GRAF, et al. "Imaging Proliferation to Monitor Early Response of Lymphoma to Cytotoxic Treatment", *Molecular Imaging and Biology*, Vol. 10 (6), pp. 349-55 (2008).
2. CHEN, W. "Clinical Applications of PET in Brain Tumors", *The Journal of Nuclear Medicine*, Vol. 48, pp. 1468-1481 (2007).
3. K. KUBOTA et al., "Comparison of  $^{18}\text{F}$ -fluoromethylcholine and 2-deoxy-D- glucose in the distribution of tumor and inflammation". *Annals of Nuclear Medicine*, Vol. 20, pp. 527-533 (2006).
4. SCHLYER, D. J. "PET Tracers and Radiochemistry", *Annals Academy of Medicine Singapore*, Vol. 33, pp. 146-154 (2004).
5. M. H. SAIER et al., Neutral amino acid transport systems in animal cells: potential targets of oncogene action and regulators of cellular growth, *The Journal of Membrane Biology*, Vol. 104, pp. 1-20 (1988).
6. P. L. JAGER et al., "Radiolabeled amino acids: basic aspects and clinical applications in oncology", *The Journal of Membrane Biology*, Vol. 42, pp. 432-445 (2001).
7. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. "Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos", 1a ed., Brasília, (2010).