



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**Producción y control de calidad del aminoácido L-[<sup>14</sup>C-metil]-metionina para  
el diagnóstico de gliomas de bajo grado.**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA  
Gabriela Contreras Castañón

Dr. Miguel Ángel Ávila Rodríguez  
Facultad de Medicina

MÉXICO, D.F. MARZO 2014.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dra. Sofía Guillermina Burrillo Amezcua

**VOCAL:** Dr. Juan Manuel Navarrete Tejero

**VOCAL:** Dra. Martha Pedraza López

**VOCAL:** Dr. Andrés Navarrete Castro

**VOCAL:** Dra. María Isabel Gamboa de Buen

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**UNIDAD PET/CT-CICLOTRÓN, DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN, FACULTAD DE MEDICINA-  
UNAM, PLANTA BAJA DEL NUEVO EDIFICIO DE INVESTIGACIÓN, CIUDAD  
UNIVERSITARIA, MÉXICO, D. F. C. P. 04510.**

**ASESOR DEL TEMA:**

**Dr. Miguel Ángel Ávila Rodríguez**

\_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE (S):**

**Gabriela Contreras Castañón**

\_\_\_\_\_

# ***Dedicatorias.***

***A mis padres***

***Ricardo Contreras Ramírez***

***María Otila Castañón Ibarra***

***Y a mis hermanas***

***Verónica Contreras***

***Nayelli Contreras***

# **Agradecimientos**

Al Dr. Miguel Ángel Ávila Rodríguez por la dirección asesoría y apoyo durante este proyecto, por la formación adquirida bajo su asesoría al igual que sus enseñanzas, paciencia, dedicación y tiempo, muchas gracias.

A los miembros del comité sinodal por la revisión minuciosa de la tesis al Dr. Miguel Ángel Ávila Rodríguez, a la Dra. Sofía Guillermina Burillo Amezcua, al Dr. Juan Manuel Navarrete Tejero, a la Dra. Isabel Gamboa de Buen, al Dr. Andrés Navarrete Castro y a la Dra. Martha Pedraza López.

A la unidad PET/CT-Ciclotrón de la Facultad de Medicina por su apoyo para la realización del proyecto y permitirme utilizar sus instalaciones. A los trabajadores de la unidad en especial a los operadores del ciclotrón M. en C. Adolfo zarate morales, al Fis. Armado Flores Moreno y a mis compañeros de radiofarmacia al Dr. Efraín Zamora Romo, al I.B.Q. Juan Carlos Manríquez Arias y al M. en I. Fernando Trejo Ballado por ayudarme y facilitarme la operación del módulo de síntesis.

Al personal del microPET M. en C Víctor Manuel Lara Camacho y a la M. en C. Mayelly Carolina Ávila García por su ayuda en la realización de los estudios en animales.

A mis voluntarios sanos Rafael Hernández Díaz y el M. en C. Eduardo Molina Jijón, por su participación en el proyecto.

# ***Agradecimientos***

A mi familia por su gran apoyo, comprensión, facilitarme el trabajo y la motivación para seguir adelante.

A mis amigos de ya casi una vida Liliana Salvatierra, Lila Domínguez, Rocío Navarro, Eduardo Molina.

A mis nuevos amigos por las nuevas aventuras y experiencias acumuladas Alejandra Orona, Eduardo Galicia y Gabriela Carrillo.

A mis amigos del laboratorio la Dra. Victoria López, al M. en I. Fernando Trejo Ballado, al M. en Ciencias Rodrigo Espartaco Cárcamo, al Sr. Einar García Faro y al Sr. Alfonso Guzmán Pérez por su amistad, consejos tanto académicos como en la vida.

Resumen.....	- 1 -
Introducción .....	- 2 -
Objetivos .....	- 4 -
Objetivo general.....	- 4 -
Específicos.....	- 4 -
Antecedentes .....	- 5 -
Aminoácidos.....	- 5 -
Metionina.....	- 7 -
Funciones de la metionina .....	- 7 -
Metionina como un radiofármaco para PET .....	- 9 -
Biodistribución normal (Farmacocinética).....	- 10 -
Farmacodinamia .....	- 11 -
Radiotoxicidad .....	- 12 -
Aplicaciones de la [ <sup>11</sup> C]- metionina en PET.....	- 13 -
Monografía propuesta del producto <sup>[32-36]</sup> .....	- 15 -
Producción de L-[ <sup>11</sup> C]-metionina.....	- 17 -
Módulo de síntesis TRACERlab FX C Pro .....	- 17 -
Procedimientos involucrados en la producción de [ <sup>11</sup> C]-metionina. ....	- 20 -
Producción de [ <sup>11</sup> C]-CO <sub>2</sub> . ....	- 20 -
Reducción del [ <sup>11</sup> C]-CO <sub>2</sub> a Metano ([ <sup>11</sup> C]-CH <sub>4</sub> ).....	- 20 -
Síntesis de Ioduro de metilo ([ <sup>11</sup> C]-CH <sub>3</sub> I).....	- 22 -
Reacción de metilación con el [ <sup>11</sup> C]-CH <sub>3</sub> I (Marcado del aminoácido).....	- 24 -
Primera purificación del producto. ....	- 25 -
Acondicionamiento del producto.....	- 25 -
Segunda purificación .....	- 25 -
Esterilización del producto.....	- 26 -
Desarrollo experimental.....	- 27 -
Producción de la [ <sup>11</sup> C]-MET.....	- 27 -
Reactivos. ....	- 27 -
Materiales. ....	- 27 -

Condiciones de los equipos.....	- 27 -
Metodología del control de calidad.....	- 29 -
Determinación del pH.....	- 29 -
Determinación de la pureza química y pureza radioquímica.....	- 29 -
Reactivos.....	- 29 -
Insumos y condiciones del equipo.....	- 29 -
Pureza enantiomérica del producto.....	- 30 -
Reactivos.....	- 30 -
Insumos y equipos.....	- 30 -
Metodología.....	- 30 -
Pureza radionucleídica.....	- 31 -
Identificación del radionucleido [ <sup>11</sup> C]-C.....	- 31 -
Disolventes residuales.....	- 31 -
Cuantificación de L-homocisteína.....	- 32 -
Determinación de la actividad específica.....	- 33 -
Cuantificación de flúor.....	- 33 -
Cuantificación de pirógenos.....	- 34 -
Integridad de la membrana.....	- 35 -
Estudios preclínicos en roedores.....	- 36 -
Estudios preclínicos en voluntarios sanos.....	- 36 -
Resultados y Discusión de resultados.....	- 37 -
Producción de [ <sup>11</sup> C]-metionina.....	- 37 -
Reducción del [ <sup>11</sup> C]-CO <sub>2</sub> a [ <sup>11</sup> C]-CH <sub>4</sub> .....	- 37 -
Síntesis de [ <sup>11</sup> C]-Ioduro de metilo ([ <sup>11</sup> C]-CH <sub>3</sub> I).....	- 37 -
Reacción de metilación con el [ <sup>11</sup> C]-CH <sub>3</sub> I (Marcado del aminoácido).....	- 38 -
Purificación.....	- 39 -
Cuantificación de la actividad en los cartuchos de purificación.....	- 39 -
Cuantificación de L-Homocisteina presente en la [ <sup>11</sup> C]-MET.....	- 40 -
Cuantificación de flúor presente en la [ <sup>11</sup> C]-MET.....	- 42 -
Determinación de la actividad específica.....	- 43 -
Control de calidad.....	- 45 -
Certificado de control de calidad.....	- 48 -



Estudios preclínicos en roedores.....	- 49 -
Pruebas en voluntarios sanos.....	- 50 -
Discusión.....	- 52 -
Conclusiones.....	- 54 -
Referencias.....	- 55 -
Anexo1. Consentimiento informado.....	- 58 -

## Resumen

---

El aminoácido esencial L-[<sup>11</sup>C-metil]-metionina ([<sup>11</sup>C]-MET), marcado con carbono-11, es un radiofármaco empleado en la tomografía por emisión de positrones (PET) para el diagnóstico de neoplasia tumorales, especialmente glioblastomas de bajo grado. La [<sup>11</sup>C]-MET es un compuesto muy prometedor debido a sus propiedades bioquímicas en los procesos tumorales así como su alta especificidad y selectividad en tumores cerebrales y los altos rendimientos de síntesis.

El objetivo de este trabajo es implementar en México la producción de la [<sup>11</sup>C]-MET en el módulo de síntesis química semi automatizado TRACERlab C Pro, utilizando una reacción de alquilación facilitada por un soporte sólido (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/KF) en una fase alcohólica, además de establecer la pruebas fisicoquímicas necesarias para la evaluación de la calidad del producto para su posible uso clínico.

El radiofármaco [<sup>11</sup>C]-MET se sintetizó satisfactoriamente con un rendimiento promedio del 70% corregido por decaimiento y una pureza química y radioquímica mayor al 95 % (n=11). El producto [<sup>11</sup>C]-MET cumplió satisfactoriamente con los pruebas de control de calidad establecidas y con las especificaciones necesarias para su administración en humanos. Se realizaron estudios de biodistribución en ratones sanos y en un modelo tumoral de la línea celular C6 (glioblastoma) en ratones atómicos. Se obtuvieron imágenes de la biodistribución normal en voluntarios sanos.

En el 2008 una de las principales causas de muerte a nivel mundial fue el cáncer, ocasionado 7.6 millones de defunciones (aproximadamente un 13 % del total). La frecuencia y el tipo de cáncer difieren dependiendo la edad y el sexo de la población, siendo los más frecuentes los cánceres de pulmón, estómago, hígado, colon y mama [1]. En México el cáncer es la tercera causa de muerte, de acuerdo a las cifras más recientes del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) con una tasa de mortalidad en el 2009 de 65 por cada 100,000 habitantes [2,3]. Los principales tipos de cánceres que afectan a la población mexicana son: próstata 16 %, mama 14 %, pulmón 13 %, cérvix 11 % y estómago 9 % [4].

El cáncer relacionado al sistema nervioso central y cerebral representa el 3 %. Los tumores cerebrales se pueden clasificar en dos tipos: primarios (originados en el cerebro) y metastásicos derivados de otros tipos de cánceres como el de mama y pulmón. Los tumores cerebrales se clasifican de acuerdo a las células que le dan origen, entre ellos se encuentran los tumores oligodendrogiales, astrocíticos y los meningiomas. Los astrocitomas representan el 40-45 % de los tumores cerebrales (6.5 casos por 100 000 personas por año) y de estos el 70 % corresponden a glioblastomas [5].

La mortalidad debida al cáncer se puede reducir con un diagnóstico adecuado y oportuno, sin embargo, debido a la gran diversidad de la sintomatología en los tumores cerebrales, el diagnóstico generalmente se realiza en etapas tardías cuando el tumor evolucionó a una neoplasia más agresiva, de ahí la importancia de desarrollar métodos de diagnóstico temprano más precisos.

Las técnicas de imaginología más utilizadas en el diagnóstico de tumores cerebrales son: resonancia magnética, resonancia magnética funcional y tomografía computada, cada una de ellas presenta sus ventajas y desventajas [6]. La principal desventaja de la resonancia magnética es la obtención de una imagen que no proporciona información del metabolismo del tumor por lo que no se pueden delimitar con exactitud los bordes del tumor ni el volumen del mismo mientras que la tomografía por emisión de positrones (PET por sus siglas en inglés), combinada con la tomografía computarizada, fusiona las ventajas de ambas técnicas obteniendo imágenes estructurales y metabólicas de los pacientes, contribuyendo a un mejor diagnóstico y tratamiento de algunas enfermedades.

A nivel mundial existe una amplia variedad de radiofármacos que pueden ser utilizados en la prognosis de tumores cerebrales, sin embargo en México sólo se encuentran disponibles dos de ellos la: [<sup>18</sup>F]-fluorodesoxiglucosa mejor conocida como [<sup>18</sup>F]-FDG y la [<sup>18</sup>F]-flourotimidina ([<sup>18</sup>F]-FLT).

Desde el año 1983 se propuso el uso de aminoácidos como radiofármacos, en particular el empleo de L-[<sup>11</sup>C-metil]-metionina, al brindar mejores imágenes en cuanto a la delimitación, extensión y metabolismo tumoral, por lo que el objetivo de este trabajo es implementar en el país la producción de L-[<sup>11</sup>C-metil]-metionina ([<sup>11</sup>C]-MET) así como evaluar su función como radiofármaco específico para el diagnóstico de glioma de bajo grado, mediante estudios de tomografía por emisión de positrones. Para el cumplimiento de tal objetivo se modificó y acondicionó el módulo de síntesis química TRACERlab FX C Pro (GE, *General Electric*) y se estableció un conjunto de análisis fisicoquímicos que garantiza la seguridad del compuesto para su administración en humanos.

## Objetivo general

Implementar la producción del radiofármaco L-[<sup>11</sup>C-metil]-metionina ([<sup>11</sup>C]- MET) en México y establecer las pruebas fisicoquímicas necesarias para que se utilice en el diagnóstico de gliomas de bajo grado mediante tomografía por emisión de positrones.

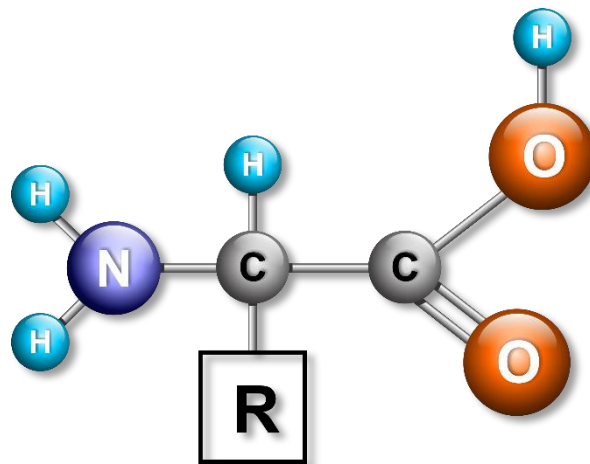
## Específicos

- Modificar y acondicionar el módulo de síntesis química TRACERlab FX C Pro, para una reacción de alquilación facilitada por un soporte sólido (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/KF) en un medio alcohólico.
- Establecer las pruebas de control de calidad indispensables para garantizar la seguridad del producto.
- Obtener imágenes de la biodistribución normal del radiofármaco [<sup>11</sup>C]-MET:
  - En un modelo animal (roedores) mediante estudios realizados en el microPET.
  - En voluntarios sanos para conocer su biodistribución normal

### Aminoácidos

Las proteínas son los compuestos biológicos más abundantes y con la más amplia diversidad de funciones, existen en todas las células y en todas las partes de éstas. Son el resultado final más importante del código genético. Las proteínas son la expresión de la información genética, un polímero lineal covalentemente unido, compuesto de una mezcla de veinte unidades diferentes, llamadas aminoácidos.

Existen 20  $\alpha$ -aminoácidos, al carbono  $\alpha$  se encuentran unidos un ácido carboxílico, un grupo amino, un hidrógeno y una cadena lateral **R**, característica de cada aminoácido (Ilustración 1). El grupo **R** proporciona las características específicas de cada aminoácido, variando en tamaño, carga eléctrica, polaridad y por lo tanto la solubilidad en el agua [7].



*Ilustración 1 Estructural general de un  $\alpha$ -aminoácido.*

Se consideran sales internas ya que al tener los dos tipos de carga su comportamiento químico es similar al de una sal, tienen momentos dipolares grandes, son muy solubles en agua e insolubles en disolventes orgánicos y pueden comportarse como ácidos o bases dependiendo el medio que las rodea.

Diecinueve de los veinte aminoácidos contienen un centro quiral en el carbono  $\alpha$ , lo que indica la existencia de dos posibles configuraciones en el espacio (estereoisómeros), conocidas comúnmente como L y D. Las proteínas presentes en la naturaleza contienen únicamente

aminoácidos con residuos de la configuración L, esta particularidad de las proteínas da origen a que los procesos biológicos sean estero selectivos, sin embargo se han encontrado en bacterias y hongos pequeños péptidos que contienen aminoácidos con una configuración D.

Los aminoácidos pueden clasificarse en 3 categorías (neutros, básicos, y ácidos) y tener subdivisiones; la cadena lateral de 15 de los 20 aminoácidos es neutra, de los 5 restantes, dos de ellos son ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico) y los tres restantes son básicos (lisina, arginina e histidina), entre las posibles subdivisiones están la separación por su aromaticidad y su contenido de azufre (Tabla 1).

Tabla 1 Clasificación de los 20 aminoácidos y su porcentaje en proteínas.

<b>Histidina</b> His 2.3 %						<b>Ácido aspártico</b> Asp 4.3 %
<b>Arginina</b> Arg 5.1 %	<b>Fenilalanina</b> Phe 3.9 %	<b>Alanina</b> Ala 7.8 %	<b>Cisteína</b> Cys 1.9 %	<b>Glicina</b> Gly 7.2 %	<b>Glutamina</b> Gln 6.3 %	<b>Ácido glutámico</b> Glu 4.2 %
<b>Lisina</b> Lys 5.9 %	<b>Leucina</b> Leu 9.1 %	<b>Metionina</b> Met 2.3 %	<b>Asparagina</b> Asn 5.3 %	<b>Serina</b> Ser 6.8 %	<b>Tirosina</b> Tyr 3.2 %	<b>Treonina</b> Thr 5.9 %
<b>Isoleucina</b> Ile 5.3 %	<b>Triptofano</b> Trp 1.4 %	<b>Prolina</b> Pro 5.2%	<b>Valina</b> Val 6.6 %	<div style="display: flex; flex-direction: column; gap: 5px;"> <div style="background-color: #f08080; width: 15px; height: 15px; display: inline-block;"></div> Ácidos</div> <div style="background-color: #f5deb3; width: 15px; height: 15px; display: inline-block;"></div> Polares sin carga		

Otra clasificación importante de los aminoácidos es la de esenciales y no esenciales, los aminoácidos esenciales son aquellos que los mamíferos no son capaces de sintetizar y es necesario obtenerlos de la ingesta diaria, ejemplo de ellos son: metionina, treonina, lisina, isoleucina, valina y leucina. Las síntesis de estos aminoácidos es muy compleja y se encuentran interconectadas llegando a su precursor el oxalacetato posteriormente al aspartato y formando finalmente 4 diferentes aminoácidos metionina, lisina, treonina y asparagina. Las rutas metabólicas de síntesis de éstos varía considerablemente entre plantas, bacterias y hongos [8].

## Metionina

La metionina es uno de los dos aminoácidos que contiene azufre en su cadena lateral (Ilustración 2), es un aminoácido neutro y esencial con un peso molecular de 149 g/mol, sólo cuenta con dos valores de pKa, el del grupo carboxilo y el del grupo amino siendo éstos 2.28 y 9.21, respectivamente, su punto isoeléctrico es de 5.74, y el valor de su coeficiente de partición LogP: -2.19 [9]. Su prevalencia en las proteínas es del 2.3 %.

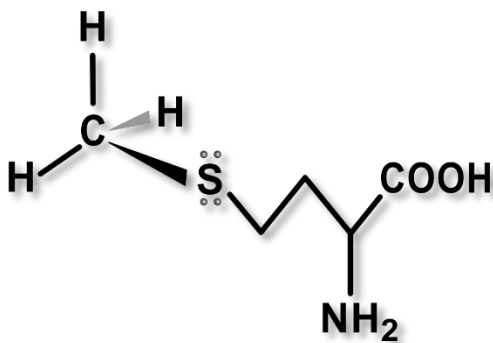


Ilustración 2 Estructura de la L-metionina.

### Funciones de la metionina

- Codón de inicio

La metionina tiene tres funciones principales, la primera de ellas es ser el codón de inicio (AUG) en la síntesis de proteínas, de lo cual se puede concluir que a pesar de no ser el componente mayoritario de éstas, cada proteína en su inicio contiene al menos una metionina en su estructura.

- Co-factor enzimático

Otra de sus funciones es ser el principal co-factor enzimático en las reacciones biológicas de metilación, es una molécula que puede transferir fácilmente su grupo metilo al conjugarse con la adenosina, formando la S-adenosil-metionina (adoMet). El azufre de la metionina es un buen nucleófilo que reacciona con el carbono 5' de la ribosa; con la ayuda de la enzima adenosiltransferasa se rompe el enlace existente entre los fosfatos y la adenosina, formándose la adoMet, un difosfato y un fosfato inorgánico. Una vez formada la adoMet el grupo metilo de la metionina se encuentra muy susceptible a reaccionar en la presencia de cualquier metiltransferasa, donando su grupo metilo y formando la S-adenosil-homocisteína. Una hidrolasa catalizará la separación de la homocisteína y la adenosina. La metionina se regenerará mediante la



metionina sintetasa, la co-enzima B<sub>12</sub> y reaccionando con el N<sup>5</sup>-metiltetrahidrofolato, cierra el ciclo de regeneración de la metionina en las células (Ilustración 3).

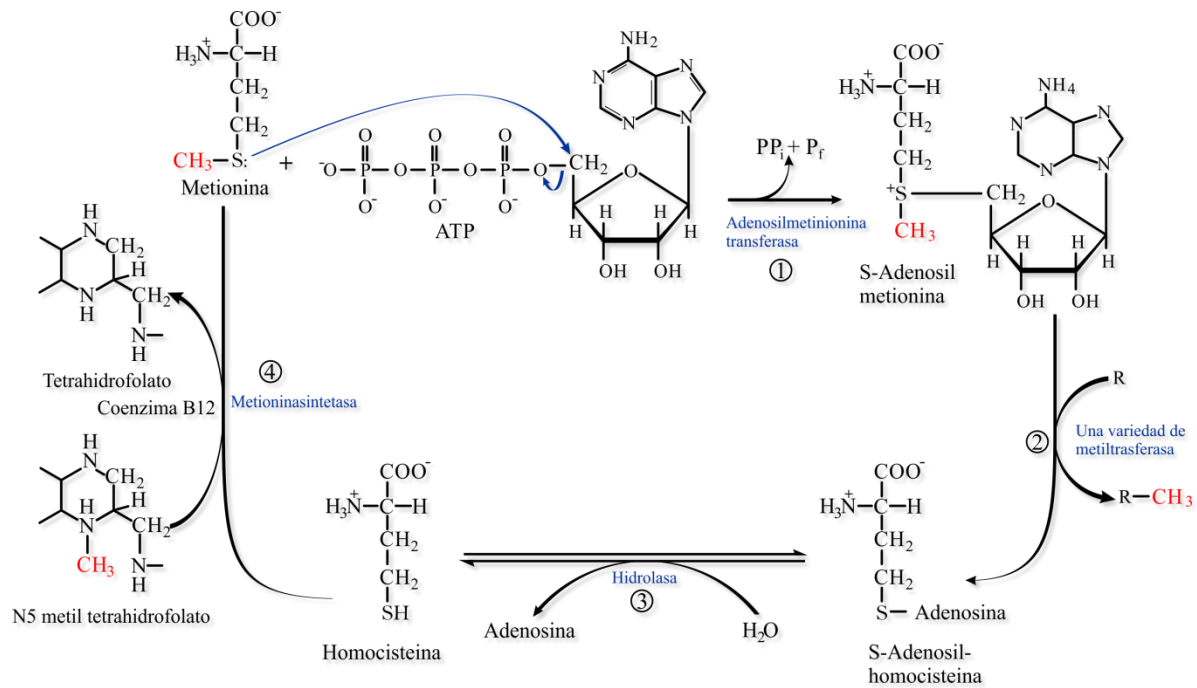


Ilustración 3 Ciclo de la síntesis de S-Adenosilmetionina.

- Fuente de energía en ayunos prolongados

Cuando un organismo se encuentra bajo un ayuno prolongado o padece alguna enfermedad metabólica como la diabetes, el cuerpo necesita buscar fuentes de energía alternas a la degradación de glucosa, comienza degradando sus reservas energéticas (glucógeno y lípidos), hasta llegar al tejido muscular e iniciar a degradar aminoácidos. La metionina será catabolizada hasta formar la molécula succinil-CoA, la cual puede entrar al ciclo de Krebs y continuar su degradación o utilizarse para sintetizar glucosa.

## Metionina como un radiofármaco para PET

---

Diagnosticar temprana y oportunamente los procesos neoplásicos cerebrales primarios o metastásicos es un gran reto al que se enfrentan los médicos neurólogos debido a la gran diversidad de la sintomatología de la enfermedad y a que generalmente el paciente acude al médico cuando el proceso tumoral se encuentra en etapas avanzadas.

La técnica más utilizada para la evaluación, planeación y pronóstico de las neoplasias cerebrales es la resonancia magnética con gadolinio (medio de contraste) al proporcionar una alta resolución de las imágenes anatómicas y un gran contraste entre el tejido blando, sin embargo no proporciona la actividad metabólica tumoral. A pesar de que también existe la resonancia magnética funcional, esta únicamente puede determinar si el proceso tumoral afecta las regiones del habla, aprendizaje y centros motrices.

De ahí la necesidad de desarrollar nuevas técnicas de adquisición de imagen que permitan obtener imágenes estructurales y metabólicas así como de nuevos radiofármacos que proporcionen mayor información. Las características que se desean encontrar para proporcionar un mejor diagnóstico son: la delimitación de la zona tumoral, una mejor selección del tejido tumoral de donde se tomará la biopsia, una mayor diferenciación entre el tumor y el tejido sano, la determinación del grado y la agresividad del tumor, de ser posible, que esta misma técnica permita dar seguimiento a la evolución de los pacientes después de someterse a un tratamiento.

La tomografía por emisión de positrones y tomografía computada (PET/CT) tiene la ventaja de obtener imágenes híbridas (metabólicas y estructurales). El radiofármaco más utilizado en este tipo de estudios es el  $[^{18}\text{F}]$ -FDG, debido al alto metabolismo que presentan los procesos tumorales y por lo tanto su elevado consumo de glucosa comparado con el tejido sano, sin embargo el cerebro es un órgano con un elevado consumo de glucosa en condiciones normales, por lo que el  $[^{18}\text{F}]$ -FDG se acumulará en el cerebro en condiciones normales y en procesos tumorales, dificultando la interpretación del estudio realizado, por lo que el  $[^{18}\text{F}]$ -FDG no es el radiofármaco de elección para realizar estudios PET/CT cerebrales.

Otra posible alternativa para realizar estudios cerebrales es la  $[^{18}\text{F}]$ -FLT, análogo fluorado de la timidina, utilizado para la evaluación de la proliferación celular en tumores malignos. La  $[^{18}\text{F}]$ -FLT

entra a la células donde es fosforilada por la enzima timidinacinasasa-1 (TK1) impidiendo su degradación y su regreso al torrente sanguíneo. La captación de la [ $^{18}\text{F}$ ]-FLT en tejido sano es muy bajo, lo que permite obtener imágenes PET con un menor fondo que las obtenidas con [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG, sin embargo la producción [ $^{18}\text{F}$ ]-FLT presenta un bajo rendimiento, limitando la posibilidad de obtener varias dosis, además es importante considerar que el radiofármaco no tiene la capacidad de cruzar la membrana hematoencefálica a menos que exista un daño previo.

En los últimos años se ha propuesto utilizar aminoácidos marcados como radiofármacos debido a la existencia de transportadores específicos en el cerebro, permitiendo su captación sin la necesidad de que la barrera hematoencefálica se encuentre dañada, además de constituir un grupo indispensable de biomoléculas necesarias en diferentes vía metabólicas como la síntesis de proteínas, neurotransmisores, péptidos activos y como fuente de energía. En tejidos tumorales se ha encontrado un aumento significativo en el consumo de aminoácidos y por lo tanto en el número de transportadores presentes en la barrera hematoencefálica y en las membranas del tejido tumoral, en algunos casos el desarrollo tumoral es dependiente de la concentración de aminoácidos [10-13]. El aminoácido de elección para estudios PET/CT es la L-[ $^{11}\text{C}$ ]-metionina ([ $^{11}\text{C}$ ]-MET) por sus propiedades fisicoquímicas, su carácter de aminoácido esencial y su alto rendimiento en la producción.

### Biodistribución normal (Farmacocinética)

La administración de la [ $^{11}\text{C}$ ]-MET es por vía intravenosa por lo cual no existe un proceso de absorción, es necesario esperar 10 minutos antes de pasar al paciente a la cámara PET/CT, tiempo en el cual se lleva a cabo la biodistribución, obteniéndose la captación máxima en las zonas afectadas. La captación del radiofármaco en las lesiones puede ser detectada después de 60 minutos de su administración [14].

La acumulación de la [ $^{11}\text{C}$ ]-MET en los órganos dependerá del estado de salud del paciente y de ciertos aspectos bioquímicos, pero existen ciertos órganos donde la captación de [ $^{11}\text{C}$ ]-MET es normal, debido al alto número de transportadores presentes en el tejido o a su participación en la eliminación. Los sitios donde es normal la acumulación del radiofármaco son: médula ósea estómago, páncreas, hígado, intestino, glándulas salivales y mucosa de la cavidad oral [15, 16]. En

roedores el radiofármaco se acumula en tres órganos principalmente: páncreas, hígado y riñón [16].

Al tratarse de una molécula presente en los seres vivos su metabolismo seguirá el proceso normal de la metionina. Se incorpora a la síntesis de proteínas, a los 5 minutos posteriores a su administración se forma el metabolito 4-metiltio-2-oxobutirato representando el 11% del total de la actividad presente en el torrente sanguíneo, el segundo metabolito corresponde al aminoácido serina el cual es detectado después de 30 minutos contribuyendo el 3%. En roedores se ha encontrado un tercer metabolito adenosilmetionina, sin embargo éste no se ha podido cuantificar en el plasma humano [17, 18]. La incorporación de la [<sup>11</sup>C]-MET en proteínas plasmáticas se ha reportado como la principal vía de eliminación, la actividad del radiofármaco se reduce a su mínimo al pasar una vida media biológica de 12 minutos [14].

## Farmacodinamia

La barrera hematoencefálica es una membrana muy activa que contiene uniones estrechas que inhiben el transporte paracelular, evitando el intercambio de compuestos de una célula a otra, se divide en dos zonas, la luminal (el área que se encuentra en contacto con el torrente sanguíneo) y abluminal (el área interna, se encuentra en contacto con el cerebro). La principal función de esta membrana es mantener la homeostasis en el cerebro y protegerlo de agentes tóxicos.

La membrana presenta diferentes tipos de transportadores para abastecer al cerebro de los nutrientes necesarios, los transportadores de aminoácido se clasifican en 17 tipos; entre los más importantes para el transporte de aminoácidos esenciales, como la metionina, están el sistema L1 y el transportador LNAA/Na<sup>+</sup> (aminoácidos de cadena larga neutra). El sistema L1 se localiza en la zona luminal y abluminal en una relación 2:1, es un sistema saturable, estereoselectivo, presenta una inhibición competitiva en la presencia de diferentes aminoácidos y no es dependiente del gradiente de sodio.

El transportador LNAA/Na<sup>+</sup> se encuentran únicamente en la membrana abluminal, se encarga de disminuir la concentración de aminoácidos del fluido extracelular manteniendo la homeostasis cerebral, es un transporte activo al ir en contragradiante y depender del sodio, transporta aminoácidos esenciales [19].

La [ $^{11}\text{C}$ ]-MET entra a la célula mediante dos tipos de transporte celular: difusión facilitada (L1) y transporte activo acoplada a canales de  $\text{Na}^+$  LNAA/ $\text{Na}^+$  [20]. Tal y como se muestra en la Ilustración 4, la metionina puede entrar y salir de la células sin ningún mecanismo que la atrape en su interior. La acumulación en los tejidos tumorales se debe a la gran cantidad de transportadores y a la alta demanda de aminoácidos, los transportadores permiten el paso principalmente al isómero L ya que el isómero D casi no entra a las células [20].

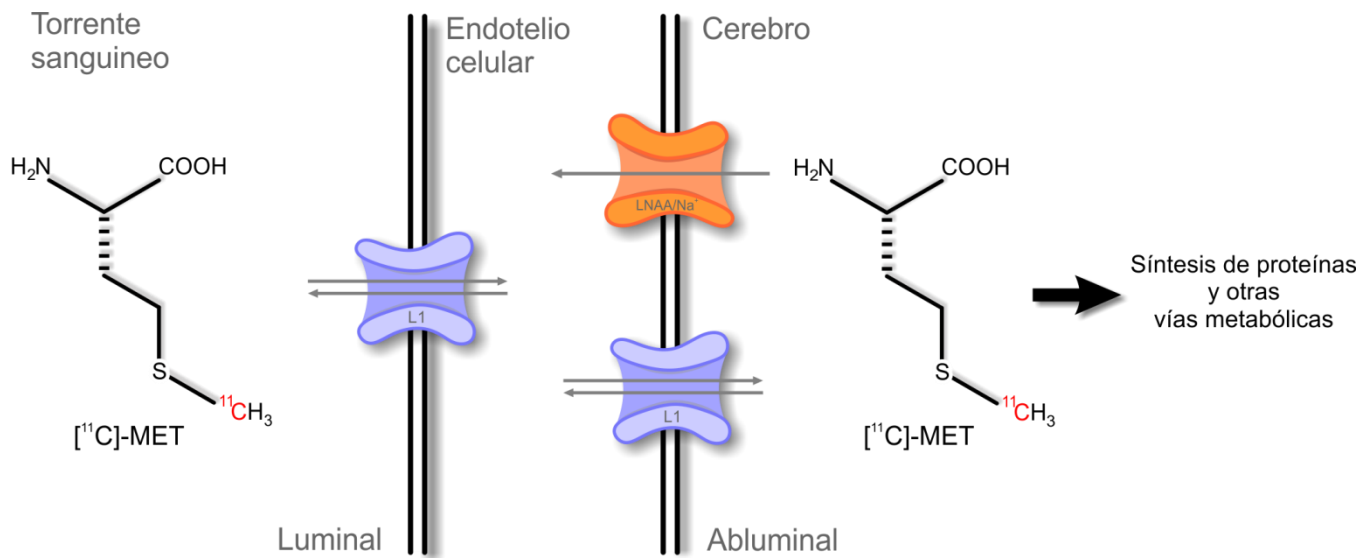


Ilustración 4 Transportadores de aminoácidos sistema L1 y LNAA/ $\text{Na}^+$ .

## Radiotoxicidad

La dosimetría reportada para la [ $^{11}\text{C}$ ]-MET muestra que los órganos críticos son: la vejiga, el hígado y la médula ósea tanto para hombres como para mujeres, sin embargo la actividad a inyectar estimada se encuentra dentro de los límites asociados a los exámenes realizados dentro de la medicina nuclear [21].

## Aplicaciones de la [<sup>11</sup>C]- metionina en PET

Se ha utilizado la [<sup>11</sup>C]-MET como radiofármaco para el diagnóstico de tumores cerebrales, principalmente de glioma de alto y bajo grado, debido al claro contraste entre la captación basal y la del tejido neoplásico y al no necesitar que la barrera hematoencefálica se encuentre dañada. Una mayor captación del radiofármaco en los gliomas de bajo grado se asocia a una mejor respuesta a la radioterapia y una reducción en la captación posterior al tratamiento se relaciona con el éxito de ésta, lo que disminuye la probabilidad de que el paciente presente una progresión tumoral subsecuente [22]. También se ha empleado en el diagnóstico de cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, linfomas, próstata y metástasis de hueso y cerebro originadas por cáncer de tiroides. Otra posible aplicación es en el diagnóstico de hiperparatiroidismo primario y secundario [23-26]. En la Tabla 2 se enlistan las principales aplicaciones clínicas de la [<sup>11</sup>C]-MET.

Tabla 2 Resumen de las aplicaciones clínicas de la [<sup>11</sup>C]-MET en tumores cerebrales [24-29].

Aplicación	Comentarios
Diagnóstico inicial.	Alta sensibilidad y especificidad. Confiabilidad en los resultados positivos. Poca probabilidad de falsos positivos. Complementar con resonancia magnética.
Posibles recurrencia después de la radioterapia.	Alta confiabilidad en el resultado. Más funcional que los estudios con [ <sup>18</sup> F]-FDG.
Clasificación.	Menos funcional que los estudios con [ <sup>18</sup> F]-FDG visualmente. Permite diferenciar entre glioma de alto y bajo grado con técnicas semi cuantitativas. Alta captación en áreas anaplásicas Observa una reducción en la captación en áreas necróticas.
Extensión tumoral.	Se obtiene una mejor delimitación de los bordes tumorales en especial de los tumores metastásicos [29]. Permite definir la infiltración de algunos tumores anaplásicos.
Planeación de la radioterapia.	El volumen tumoral calculado en los estudios con [ <sup>11</sup> C]-MET es mayor que el obtenido mediante resonancia magnética con gadolinio, el cual requiere de un daño en la barrera hematoencefálica para su captación.
Valoración de la terapia.	Existe una disminución en la captación de [ <sup>11</sup> C]-MET después de la radioterapia, quimioterapia y cirugía.

Ventajas de la [ $^{11}\text{C}$ ]-MET con respecto al [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG en el diagnóstico de neoplasias tumorales:

- Escasa captación basal en cerebro.
- Diferenciación clara entre el tejido sano y el tejido neoplásico.
- No hay captación en procesos inflamatorios, infecciosos ni necróticos.
- Una mayor sensibilidad y especificidad.
- No interferencia en pacientes con hiperglucemia.
- No se requiere esperar semanas para realizar los estudios de seguimiento después de la terapia.
- Tiene un tiempo de biodistribución mucho menor, permitiendo que los estudios duren menos tiempo, lo que compensa su vida media corta.

A pesar de la gran cantidad de ventajas que presenta no es favorable utilizarla como única técnica de diagnóstico, es más recomendable utilizarla como complemento a los resultados de otras técnicas para obtener un mejor diagnóstico y pronóstico de la enfermedad [30, 31].

## Monografía propuesta del producto [32-36].

### Metionina C 11, Inyección

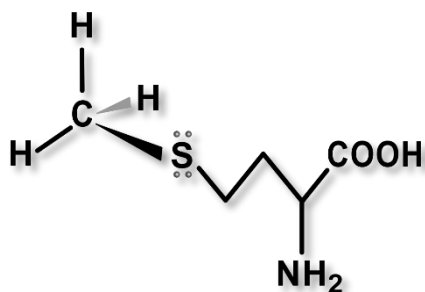


Ilustración 5. L-[<sup>11</sup>C]-metil-metionina

#### Definición.

La [<sup>11</sup>C]-metionina es una solución etanólica estéril, adecuada para administración intravenosa, de L-[<sup>11</sup>C]-metil-metionina, en la cual una porción de las moléculas están marcadas con <sup>11</sup>C radiactivo. Contiene no menos del 90.0 % o más de 110.0 % de la cantidad (actividad) declarada a la hora indicada en el etiquetado.

#### Características

**Apariencia.** Es un líquido transparente, incoloro, y libre de partículas suspendidas.

**Tiempo de vida media.** 20.4 min, con un decaimiento por emisión de positrones con una energía máxima de 0.959 MeV seguida por la aniquilación y emisión de dos fotones con una energía de 0.511 MeV cada uno.

**Actividad específica:** sin agregado de portador isotópico.

**Envasado y almacenamiento:** conservar en envases monodosis o multidosis debidamente blindados

**Estándares de referencia:** L-metionina, ABX No Catálogo 2220, D-metionina Catálogo 2229, L-homocisteina ABX No Catálogo 2200.

#### Identificación:

**A:** Su vida media, determinada con el empleo de un sistema detector apropiado, es de 19.1 a 21.13 minutos.



**B:** El tiempo de retención obtenido para la [<sup>11</sup>C]-MET en el cromatograma de la solución de prueba corresponde al tiempo de retención obtenido en el cromatograma de la solución estándar.

**Pruebas de control de calidad.**

**pH:** entre 4.5-7.5.

**Endotoxinas bacterianas.** No contiene más de 175/V Unidades de Endotoxinas (UE) por mL, en donde V es el volumen total de la producción, en mL.

**Pureza química.** Esta sección se refiere a las impurezas potencialmente asociadas al método de síntesis del producto y se enlistan a continuación:

**Límite de flúor.** No contiene más de 4.52 mg /V.

**Límite de L-homocisteína.** Evaluar mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia. El valor del área correspondiente al pico de la L-homocisteína de la solución de prueba no es mayor al obtenido en la solución estándar de L-homocisteína (2 mg/V).

**Disolventes residuales.** La concentración de etanol en la solución de prueba no excede el 10 %.

**Pureza radionucleídica.** Con un espectrómetro de rayos gamma adecuado obtener un espectro gamma, donde las emisiones observadas corresponden a un sólo fotopico de 0.511 MeV.

**Pureza radioquímica.** Evaluar mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia. El valor del tiempo de retención de la [<sup>11</sup>C]-MET (determinado mediante un detector de radiactividad) se corresponde con el valor de la solución estándar de MET. La radiactividad de la [<sup>11</sup>C]-MET no es menor al 95% de la radiactividad total.

**Pureza enantiomérica.** Examinar mediante cromatografía en capa fina, utilizando como *fase estacionaria* sílica gel C18 para separaciones quirales, como *fase móvil* emplear metanol:agua (50:50), eluir mínimo 8 cm.

**Estándares utilizados.** (A) 2 mg de L-metionina disueltos en 10 mL de agua, (B) 4 mg de L/D-metionina disueltos en el mismo volumen.

**Detección.** Aerosol de Ninhidrina 2 mg/ L, calentar a 60 °C por 10 minutos. Determinar la distribución de actividad utilizando un detector de radiación apropiado. **Factor de retención** L-metionina RF = 0.58, D-metionina = 0.51. **Límites.** Máximo el 10 % de la actividad en la forma química de [<sup>11</sup>C]-metionina, corresponde a la forma D-[<sup>11</sup>C]-metil-metionina.

**Integridad del filtro.** Resiste hasta 50 psi de presión.

# Producción de L-[<sup>11</sup>C]-metionina.

La producción de [<sup>11</sup>C]-MET para el uso en humanos involucra varios procedimientos, entre ellos una serie de reacciones químicas, purificación mediante cartuchos de gel de silicio fase reversa (C18) e intercambio iónico (alumina) y finalizan con el acondicionamiento del producto, para su aplicación como un radiofármaco inyectable. Al tratarse de un compuesto radiactivo es necesario el uso de equipos automatizados y blindados que realicen estos procedimientos, evitando la exposición innecesaria del personal. En el año 2011 la Facultad de Medicina de la UNAM adquirió el módulo de síntesis química TRACERlab FX C Pro de General Electric (Ilustración 6), diseñado para el marcado de moléculas con carbono-11 [37].

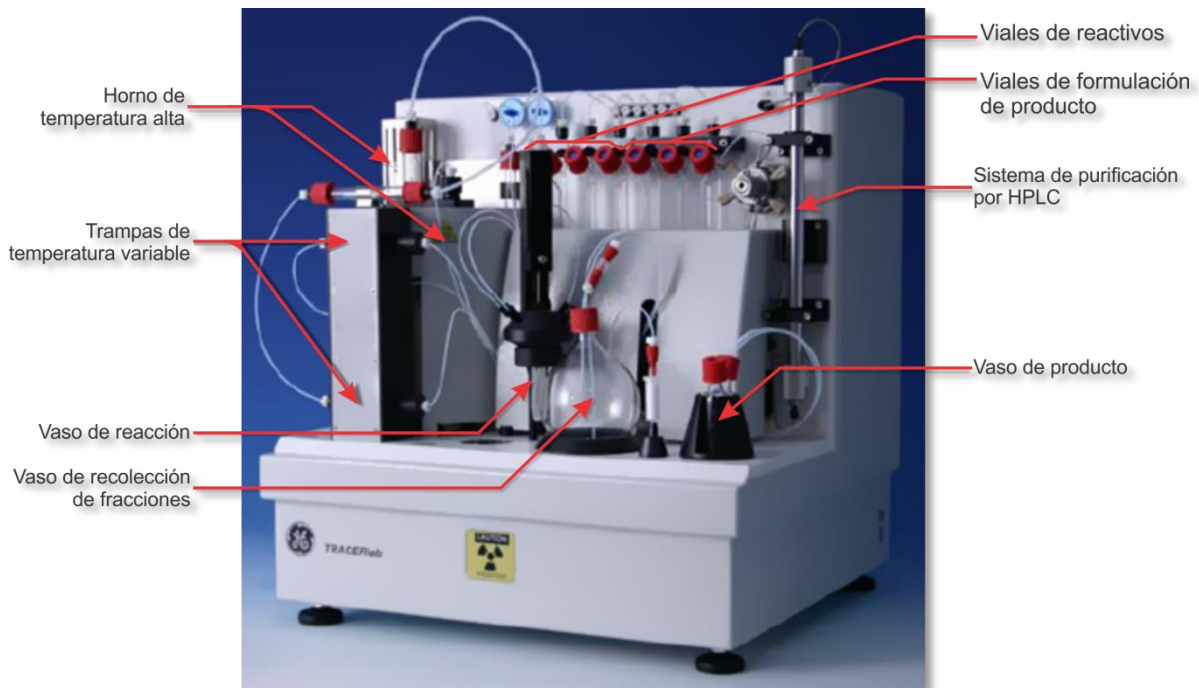


Ilustración 6 Módulo de síntesis TRACERlab FX C Pro.

## Módulo de síntesis TRACERlab FX C Pro

El equipo TRACERlab FX C Pro es un sistema integrado y parcialmente automatizado para el marcado de moléculas a partir de [<sup>11</sup>CO<sub>2</sub>] (reacciones de carboxilación) o después de su reducción a [<sup>11</sup>CH<sub>4</sub>] y transformación a Ioduro de metilo [<sup>11</sup>CH<sub>3</sub>I] (reacciones de metilación). El módulo puede

ser controlado de dos maneras, completamente automatizado (previamente programado) y de manera manual a través de una interfaz conocida como bitmap (Ilustración 7). La interfaz permite al usuario controlar por medio de una computadora las válvulas, el flujo de helio, el flujo del cromatógrafo de líquidos y la temperatura de los hornos. La ventaja de que sea un equipo programable permite al usuario modificar líneas, conexiones, y hasta remover físicamente componentes que no se utilizaran en las diferentes síntesis, como es el caso de la síntesis de  $[^{11}\text{C}]$ -MET.

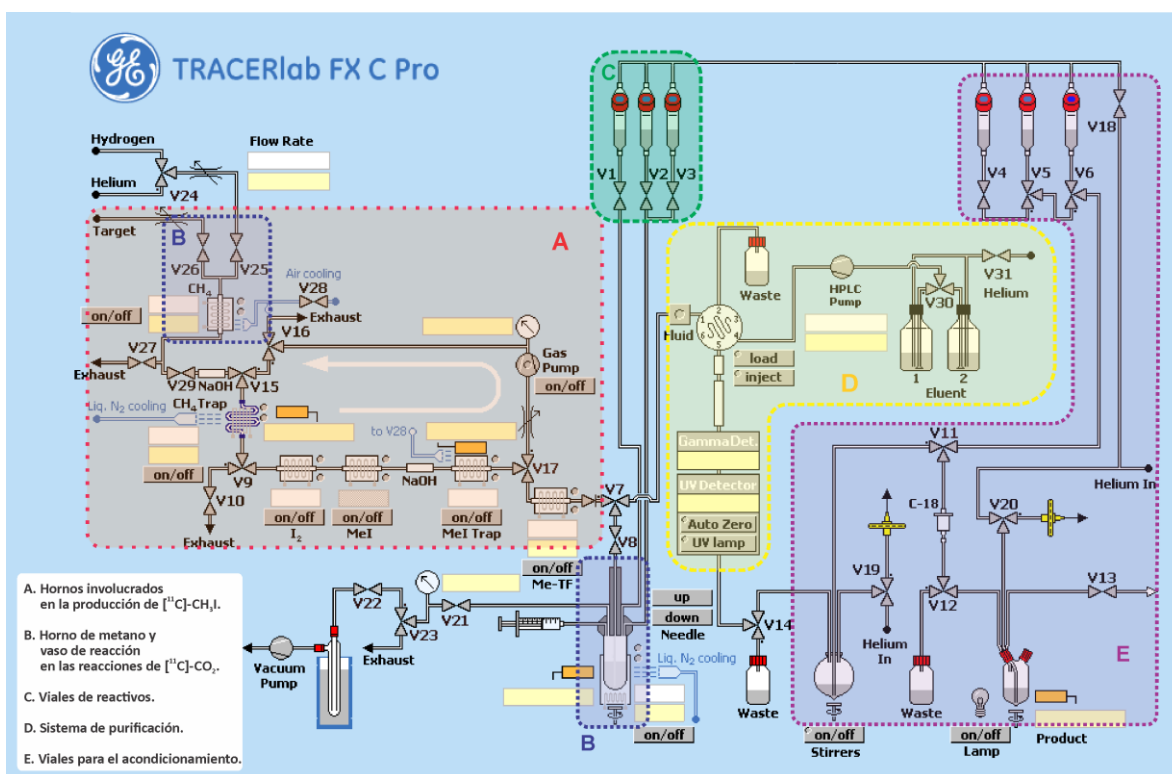


Ilustración 7 Bitmap original del módulo TRACERlab.

Para la síntesis de  $[^{11}\text{C}]\text{-MET}$  se modificó la interfaz original (Ilustración 8) dejando el área correspondiente a la producción de  $[^{11}\text{C}]\text{-Ioduro de metilo}$  (A) y el área de acondicionamiento (B) se utilizó para colocar el vaso de reacción usando el vaso de reacción como trampa criogénica (E) para contener cualquier posible fuga del material radiactivo. También se conservó uno de los viales de acondicionamiento (C) y el vial de producto final (D).

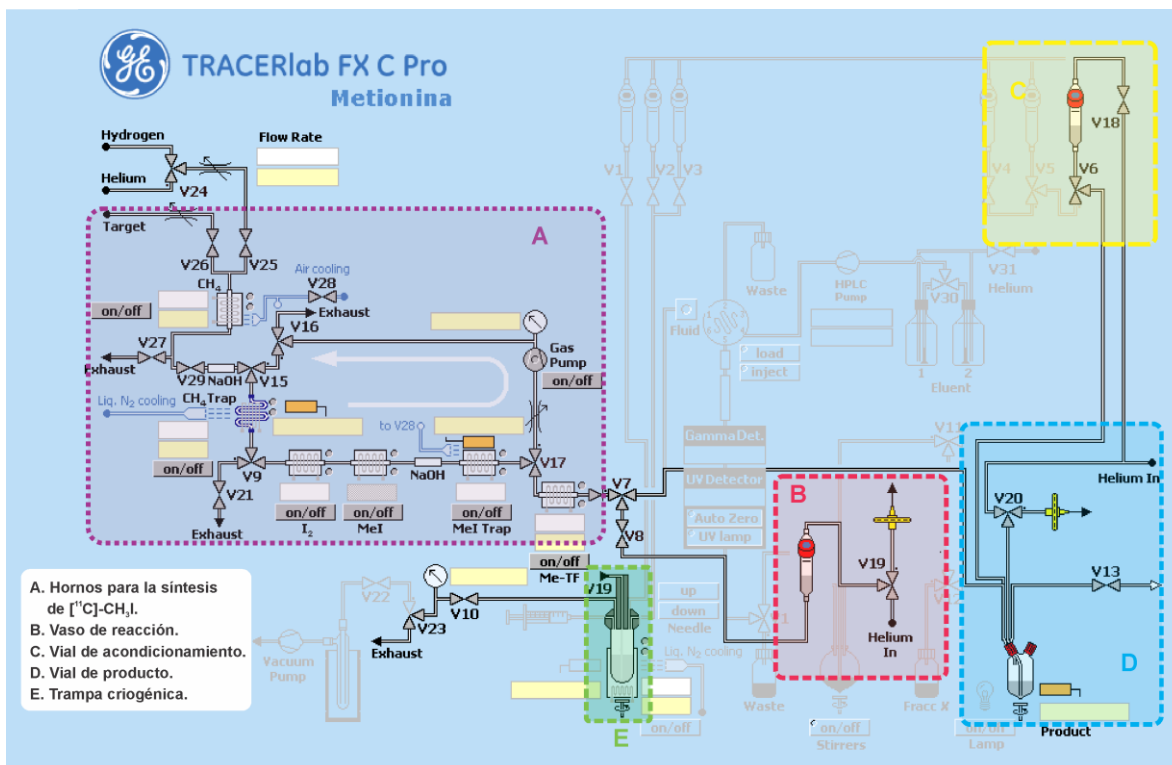


Ilustración 8 Bitmap de síntesis de  $[^{11}\text{C}]\text{-MET}$ .

Se acondicionó uno de los viales de reactivos como vaso de reacción, colocando un filtro adicional en la entrada y salida del vaso; el primer filtro se utiliza normalmente en los viales de reactivos y el segundo filtro se obtuvo de los cartuchos de alumina light de Waters con la finalidad de retener cualquier sólido que pudiera lavarse en el momento de la transferencia de la  $[^{11}\text{C}]\text{-MET}$  al vial de producto (Ilustración 9) [38].

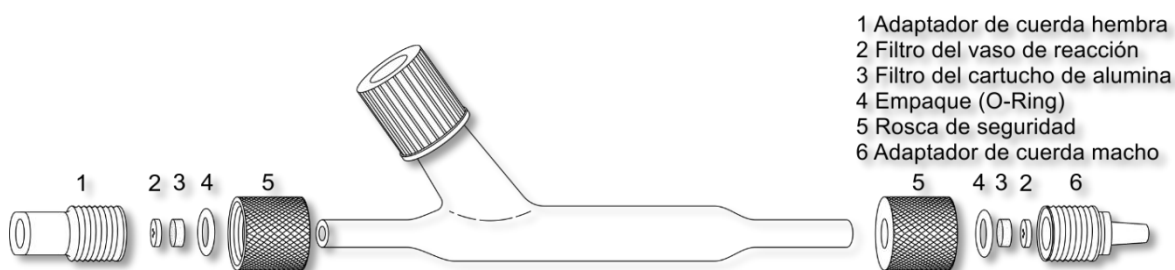


Ilustración 9 Componentes del vaso de reacción

## Procedimientos involucrados en la producción de [<sup>11</sup>C]-metionina.

### Producción de [<sup>11</sup>C]-CO<sub>2</sub>.

El dióxido de carbono ([<sup>11</sup>C]-CO<sub>2</sub>) se produce por la irradiación con protones de un blanco gaseoso constituido por una mezcla de nitrógeno-oxígeno natural al 98 % y 2 %, respectivamente; la reacción nuclear involucrada es <sup>14</sup>N (p,α) <sup>11</sup>C. La irradiación se realizó en el acelerador de partículas de 11 MeV tipo Ciclotrón Eclipse HP de la Unidad PET/CT-Ciclotrón de la Facultad de Medicina.

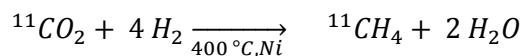
El porcentaje de oxígeno de la mezcla permite obtener al carbono-11 en la forma química de dióxido de carbono. El [<sup>11</sup>C]-CO<sub>2</sub> obtenido se puede utilizar en dos diferentes tipos de reacciones [39]:

- Carboxilaciones: síntesis de [<sup>11</sup>C]-acetato
- Metilaciones: síntesis de [<sup>11</sup>C]-raclopride, [<sup>11</sup>C]-dihidotetrabenacina (DTBZ) y [<sup>11</sup>C]-MET

El oxígeno de la mezcla podría ser remplazado por hidrogeno y se obtendría [<sup>11</sup>C]-metano sin embargo este solo podría ser empleado en reacciones de metilaciones.

### Reducción del [<sup>11</sup>C]-CO<sub>2</sub> a Metano ([<sup>11</sup>C]-CH<sub>4</sub>).

Antes de que se termine el bombardeo del material blanco, la trampa conocida como horno de metano se acondiciona durante 30 min a 350 °C con un flujo de hidrógeno a 100 mL/min; al finalizar el acondicionamiento se enfría a 35-45 °C sin disminuir el flujo de hidrógeno. El [<sup>11</sup>C]-CO<sub>2</sub> obtenido de la irradiación se descarga al horno de metano y se queda atrapado en los componentes del horno (tamiz molecular y Ni-Shimalita). El flujo de hidrógeno se aumenta por unos segundos y se cierra completamente el horno; posteriormente la temperatura se incrementa nuevamente a 400 ° C para permitir la reducción del dióxido de carbono catalizada por níquel (reacción 1).



Reacción 1. Reducción del [<sup>11</sup>C]-CO<sub>2</sub>

Una vez reducido el  $[^{11}\text{C}]\text{-CO}_2$  a  $[^{11}\text{C}]\text{-CH}_4$ , se abre la válvula del horno de metano, se establece un flujo de helio a 30 mL/min y la actividad se transfiere a una trampa de carbofera para continuar con la siguiente etapa (Ilustración 10). Entre el horno y la trampa de metano se encuentra una columna rellena de ascarita y pentóxido de fósforo, en la que se retendrá el agua generada durante la reacción y el  $[^{11}\text{C}]\text{-CO}_2$  residual.

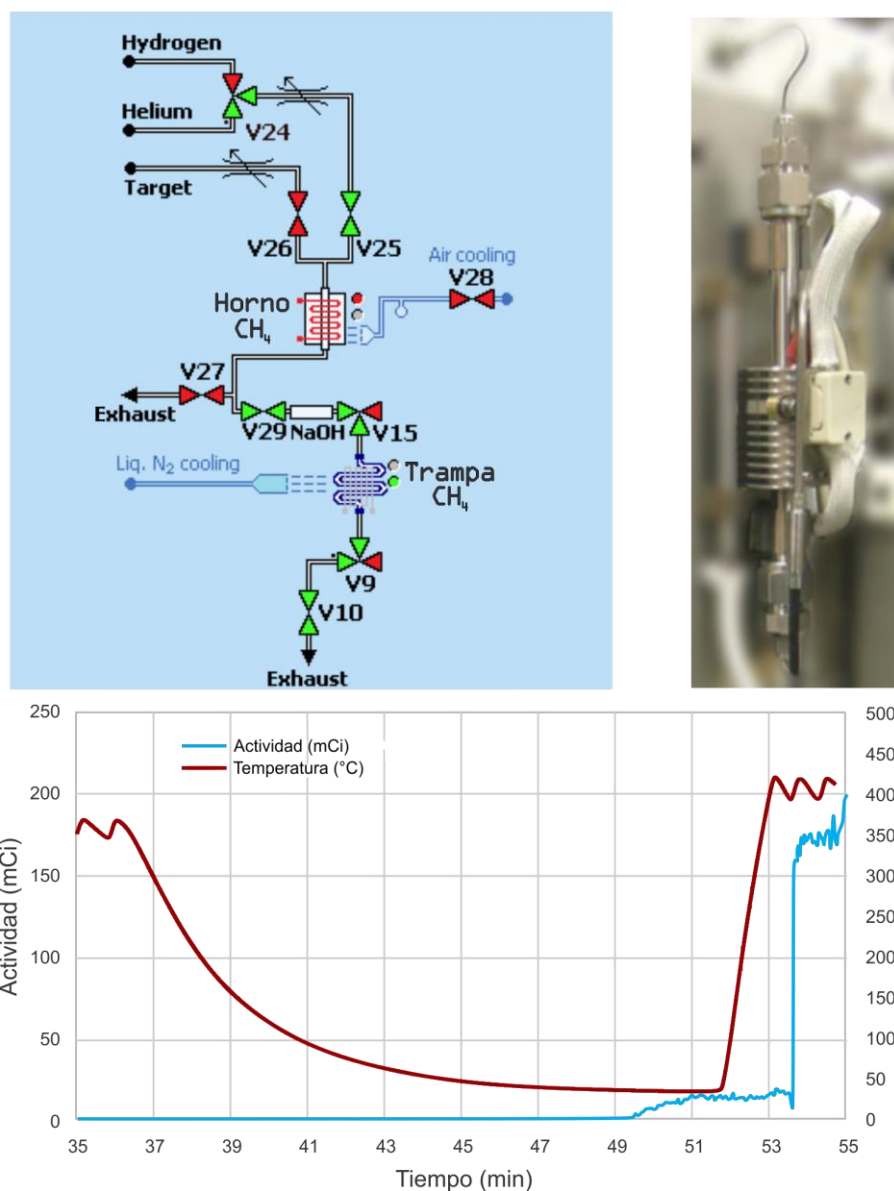
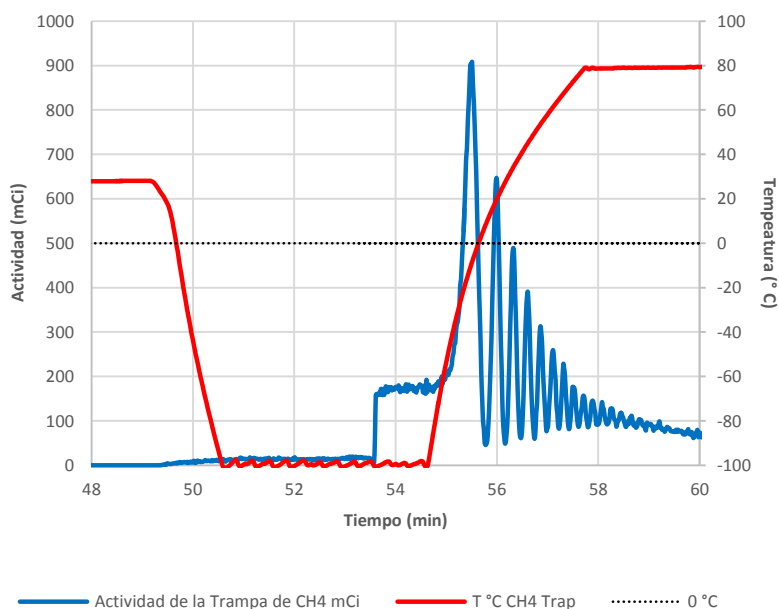


Ilustración 10 Extremo superior izquierdo Interfaz correspondiente al horno y trampa de metano. Extremo superior derecho Fotografía del horno de metano. Parte inferior de la ilustración: Gráfica de la temperatura (línea superior) y actividad con respecto al tiempo (línea azul), durante el acondicionamiento, enfriamiento, recepción de material radiactivo, reacción y transferencia de actividad a la trampa de metano. La actividad en la trampa de metano, se observa un aumento no significativo en la actividad al minuto 50 que corresponde al fondo asociado a la descarga de  $[^{11}\text{C}]\text{-CO}_2$ , el mayor incremento se aprecia al minuto 54 donde la actividad se transfirió en su totalidad a la trampa de metano.

El  $[^{11}\text{C}]\text{-CH}_4$  se adsorbe a  $-100^\circ\text{C}$  en la trampa de metano (carbosfera) bajo un flujo de helio constante que removerá cualquier residuo de dióxido de carbono durante unos minutos. Se redireccionan la válvulas, se incrementa la temperatura de la trampa a  $80^\circ\text{C}$  para liberar el  $[^{11}\text{C}]\text{-metano}$  e iniciar la síntesis de  $[^{11}\text{C}]\text{-CH}_3\text{I}$  (Gráfica 1).



Gráfica 1 Comportamiento de la actividad en la trampa de metano al variar la temperatura con respecto al tiempo. A  $-100^\circ\text{C}$  se atrapa el  $[^{11}\text{C}]\text{-metano}$  a  $-20^\circ\text{C}$  se empieza a liberar. La trampa se calienta a  $80^\circ\text{C}$  para liberar por completo el  $[^{11}\text{C}]\text{-metano}$  y dar paso a la reacción de iodación.

### Síntesis de Ioduro de metilo ( $[^{11}\text{C}]\text{-CH}_3\text{I}$ ).

La síntesis de  $[^{11}\text{C}]\text{-CH}_3\text{I}$  se realiza en fase gaseosa recirculando el material en seis compartimientos del módulo (

Tabla 3, ilustración 11); este proceso tiene una duración aproximada de 6 minutos y se completan por lo menos 15 ciclos [40]. La reacción se visualiza mediante los detectores de radiación de la trampa de metano y la trampa de ioduro de metilo, se puede observar como disminuye la actividad en una y aumenta en la otra (Gráfica 2); cuando se alcanza el valor máximo de actividad en la trampa de ioduro de metilo se interrumpe el ciclo y se aumenta la temperatura de dicha trampa a  $180^\circ\text{C}$  para transferir el  $[^{11}\text{C}]\text{-CH}_3\text{I}$  producido al vaso de reacción.

Para la formación de  $[^{11}\text{C}]\text{-CH}_3\text{I}$  se propone la siguiente reacción [8,41, 42].

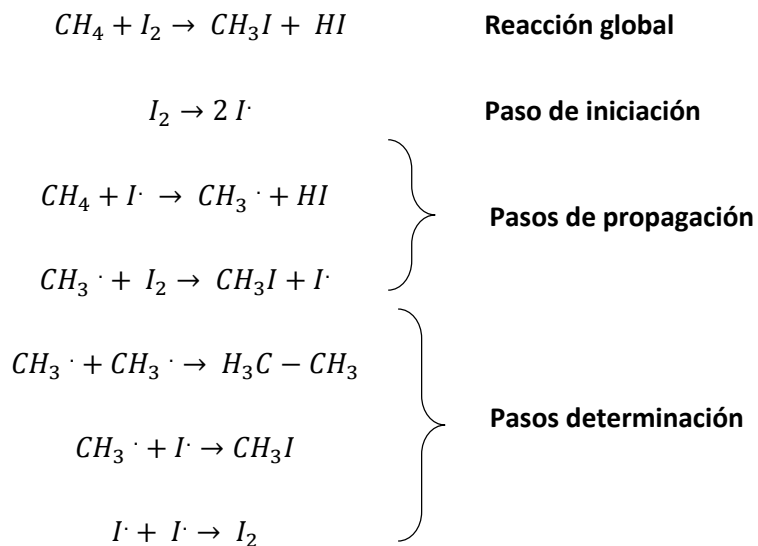


Tabla 3. Compartimentos en orden secuencial en donde se sintetiza en el  $[^{11}\text{C}]\text{-CH}_3\text{I}$  en fase gaseosa.

Compartimiento	Contenido	Temperatura (°C)
Reservorio de Iodo	Iodo bidestilado	100
Horno de $\text{CH}_3\text{I}$	Serpentin de cuarzo	700
Trampa de Iodo	Ascarita	T.A.
Trampa de Iodo	Ascarita	T.A.
Trampa de $\text{CH}_3\text{I}$	Porapak	T.A.
Trampa de $\text{CH}_4$	Carbosfera	80

T.A. temperatura ambiente



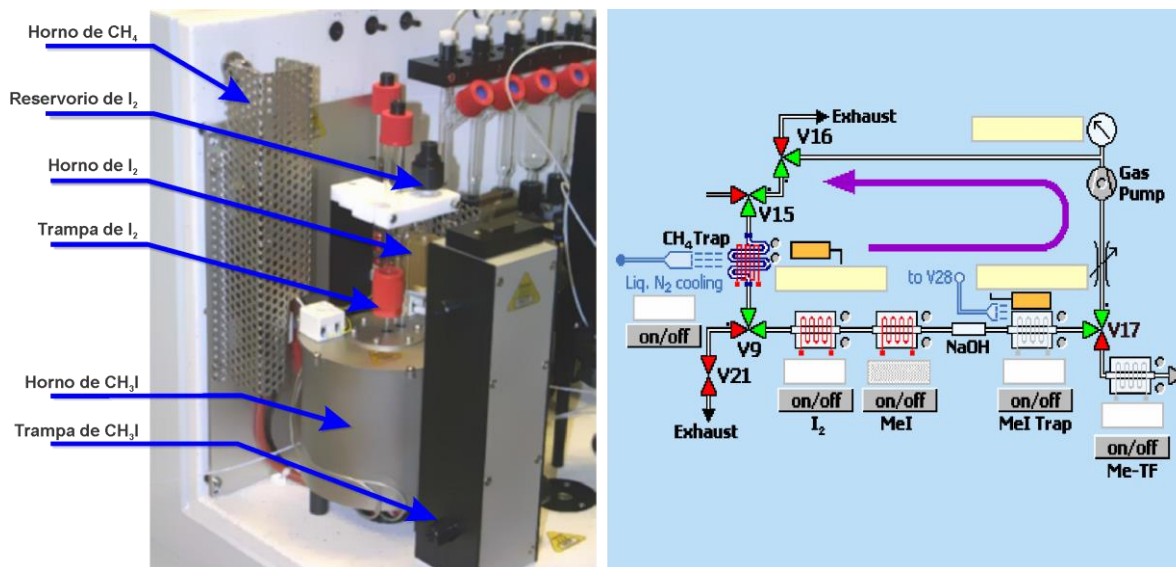
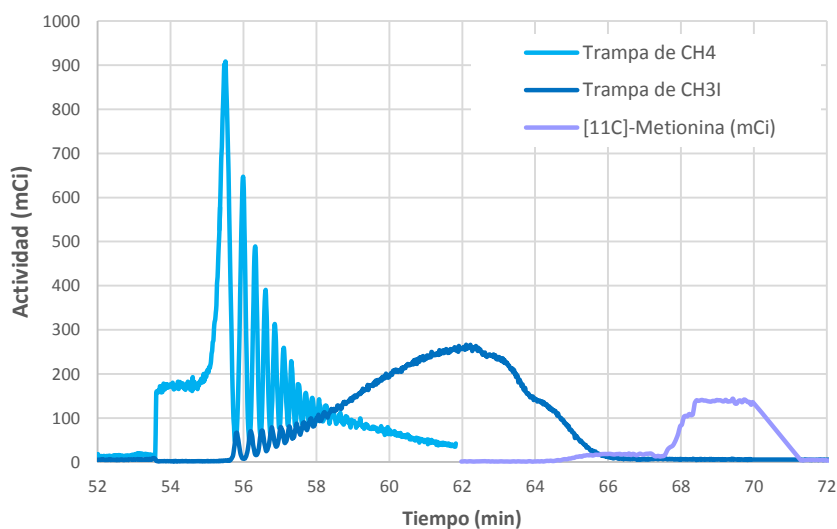


Ilustración 11. Izquierda Fotografía de las diferentes trampas y hornos empleados en la síntesis de  $[^{11}\text{C}]\text{-CH}_3\text{I}$  Derecha. Bitmap correspondiente a los compartimentos involucrados en la síntesis de  $[^{11}\text{C}]\text{-CH}_3\text{I}$ .



Gráfica 2 Comportamiento de la radiactividad en la trampa de metano, la trampa de yoduro de metilo y el vaso de producto. Se observa la transferencia del material de una trampa a la otra, al dar seguimiento a los valores máximos y mínimos en cada ciclo y como se acumula en la trampa de yoduro de metilo.

### Reacción de metilación con el $[^{11}\text{C}]\text{-CH}_3\text{I}$ (Marcado del aminoácido).

El  $[^{11}\text{C}]\text{-CH}_3\text{I}$  se burbujea con un flujo de 20 mL/min durante 4 minutos al vaso de reacción, donde se encuentra 2 mg de L-homocisteína y  $20 \pm 5\%$  de  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{KF}$  resuspendidos en 1 mL de etanol. El marcado del precursor se llevará a cabo mediante una sustitución nucleofílica y la alumina/KF funciona como soporte para la reacción de metilación (Ilustración 12) [43,44].

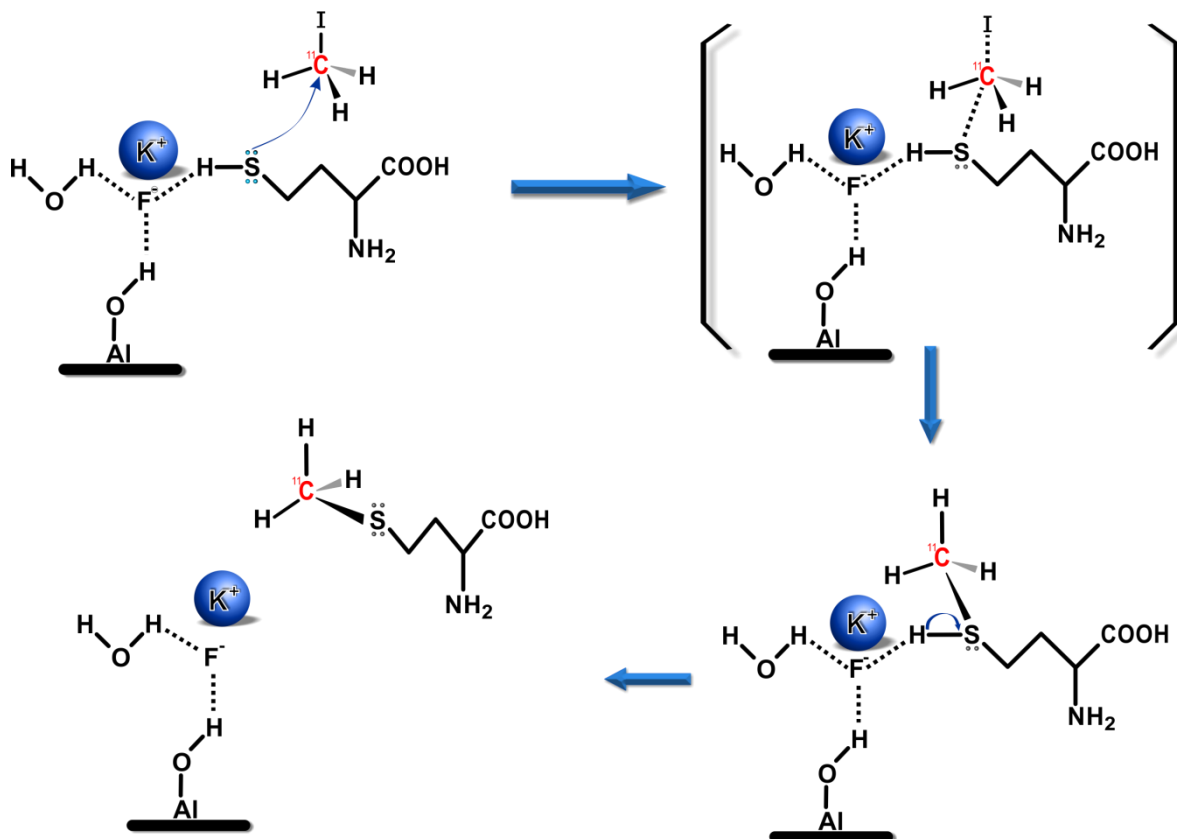


Ilustración 12 Mecanismo de reacción. Marcado de la L-[<sup>11</sup>C]-metionina utilizando un soporte sólido.

### Primera purificación del producto.

La primera etapa de purificación del producto se realiza durante la transferencia del medio de reacción al vial de producto, éste se hace pasar por los dos filtros del vaso de reacción reteniendo los restos de precursor y de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/KF utilizado.

### Acondicionamiento del producto

La [<sup>11</sup>C]-MET se transfiere al vial de producto que contiene 10 mL de 0.05 M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> diluyendo el medio de reacción a una concentración de etanol al 10 %. La [<sup>11</sup>C]-MET una vez acondicionada se transfiere a la última etapa de purificación en línea.

### Segunda purificación

- Cartucho C18 y Cartucho de Alumina.

La segunda y última etapa de purificación se realiza a través de dos cartuchos conectados en línea, el primero de ellos es un cartucho de gel de sílice fase reversa C18 que retendrá las trazas

de precursor disuelto en el medio de reacción, el segundo cartucho es de alumina que adsorberá los iones de flúor disueltos en el producto. Los cartuchos son lavados con 5 mL de 0.05 M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , obteniendo una concentración final de etanol del 6.7 %

#### Esterilización del producto.

Finalmente el producto acondicionado y purificado se filtra con una membrana de  $0.22\ \mu\text{m}$  y se recolecta en un vial vacío estéril y libre de pirógenos.

## Desarrollo experimental.

Los procedimientos utilizados durante la producción de la  $[^{11}\text{C}]$ -MET se explicaron detalladamente en la sección anterior, a continuación sólo se especificaran los insumos requeridos durante la producción y el resto de los métodos empleados.

### Producción de la $[^{11}\text{C}]$ -MET.

#### Reactivos.

Los reactivos e insumos se adquirieron en diferentes compañías, la mayoría de ellos se compraron en Sigma-Aldrich como: Acetonitrilo ( $\geq 99.9\%$  para HPLC) **4998**,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (99%) **331988**, fluoruro de potasio sobre alumina 5.5 mmol F-/ g **60244**, ascaria II absorbente de  $\text{CO}_2$  **223921** y pentóxido de fósforo **79610**. A continuación se enlistan el resto de los reactivos con su número de catalogo y la compañía donde fueron adquiridos: etanol absoluto NF/USP Tecsiquim **EF1555-5**; hidrógeno BIP y nitrógeno ultra alta pureza (99.999 %) Infra, porapak Tipo Q **WAT027059** en WATERS, L-homocisteína **2200.0002** ABX, Iodo sublimado **1.04761.0100** Merck, Carbopack **20273** Supelco, Shimalite-Ni reducido **221-27719** Shimadzu y Tamiz molecular 4 A **5624** GRACE.

#### Materiales.

Filtro de esterilización de 0.22  $\mu\text{m}$  Millex-GS **SLGSV255F** y filtro de venteo 0.22  $\mu\text{m}$  Millex-GV **SLGV004SL** Millipore, agujas de 18Gx38 mm, agujas 22Gx32 mm BD, viales de vidrio de 30 mL estériles y libres de pirógenos Hospira, Sep-pak plus C18 **WAT020515** y Sep-pack plus alumina N **WAT020510** WATERS

#### Condiciones de los equipos.

Tabla 4 Volumen de los reactivos y su posición en el módulo

# Vial o insumo	Reactivo o activación
Vial de reacción	2 mg L-Homocisteína en 1 mL de etanol 20 $\pm$ 5 % de $\text{Al}_2\text{O}_3$ / KF
Vial de producto	10 mL $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0.05 M
Vial 6	5 mL $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0.05 M
Trampa criogénica	1 mL Acetonitrilo
Cartucho C18	10 mL de etanol + 10 mL de $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0.05 M
Cartucho Alumina	10 mL de agua inyectable + 10 mL de $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0.05 M

- Módulo de síntesis TRACERlab F C Pro.

Tabla 5 Características de los diferentes procedimientos en el equipo de síntesis.

Parámetros de la síntesis.	Compartimento	Temperatura (° C)	Tiempo (min)	Comentarios
Descarga del $[^{11}\text{C}]\text{-CO}_2$	Horno de metano	40-45	2	Flujo de Helio e hidrógeno. El tamiz molecular atrapa el $\text{CO}_2$ a temperatura ambiente
Reducción del $[^{11}\text{C}]\text{-CO}_2$ a $[^{11}\text{C}]\text{-CH}_4$	Horno de metano	400	1	Atmósfera de hidrógeno
Concentración de $[^{11}\text{C}]\text{-CH}_4$	Trampa de metano	-100	2	Carbosfera retiene únicamente al $[^{11}\text{C}]\text{-CH}_4$
Síntesis de $[^{11}\text{C}]\text{-CH}_3\text{I}$	Trampa de metano	80	5	Recirculación del material por los diferentes compartimentos del módulo. El $[^{11}\text{C}]\text{-CH}_3\text{I}$ se retiene en la trampa de ioduro de metilo
	Reservorio de Iodo	100		
	Horno de ioduro de metilo	725		
	Trampas de Iodo	Temperatura ambiente		
	Trampa de ioduro de metilo			
Liberación del $[^{11}\text{C}]\text{-CH}_3\text{I}$	Trampa de ioduro de metilo	80	3	Flujo de helio 20 mL/ min
Burbujeo del $[^{11}\text{C}]\text{-CH}_3\text{I}$ al precursor	Vaso de reacción	Temperatura ambiente	4	
Trasferencia de la $[^{11}\text{C}]\text{-MET}$	Vial de producto		1	

## Metodología del control de calidad.

### Determinación del pH.

Se realizó con tiras de papel pH (Whatman® Panpeha®).

### Determinación de la pureza química y pureza radioquímica.

Se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia, el equipo se encuentra acoplado con dos detectores uno de UV y otro de radiación, permitiendo observar las impurezas químicas que absorban a la longitud de onda establecida y cualquier probable compuesto que se haya marcado durante la reacción [32-34].

#### Reactivos.

Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma –Aldrich L-metionina  $\geq 98\%$  **M9625**,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $\geq 99.0\%$  **P5655** y se utilizó agua desionizada Milli-Q 18  $\text{M}\Omega\text{-cm}$ .

#### Insumos y condiciones del equipo.

Tabla 6 Condiciones del cromatografo de líquidos para realizar el control de calidad.

Parámetro	Especificaciones
Columna	Largo: 300 mm, Diámetro interno: 3.9 mm Water wat027324 $\mu$ bondapak C18. Tamaño de partícula 10 $\mu\text{m}$ , tamaño del poro 125 A
Temperatura	Ambiente
Fase móvil	1.4 g /L de $\text{K}_2\text{HPO}_4$
Flujo	1.0 mL /min
Detectores	U.V. 216 nm, U.V. 225 nm, Radiación NaI(Tl)
Tiempo de corrida	10 min
Tiempo de retención del producto	3.4-3.6 min
Volumen de inyección	20 $\mu\text{L}$

## Pureza enantiomérica del producto.

Para comprobar que la concentración de D-[<sup>11</sup>C]-MET se encuentra por debajo de los límites permisibles, la pureza enantiomérica se determina mediante cromatografía de capa fina revelando ésta por dos métodos, 0.02 % ninhidrina en etanol y autorradiografía [34].

### Reactivos

De la compañía Sigma-Aldrich se adquirió: Ninhidrina **AL151173**, D-metionina  $\geq 98\%$  **M9375**, L-metionina  $\geq 98\%$  **M9625** y metanol **34860**. Etanol absoluto NF/USP Tecsiquim **EF1555-5** y se utilizó agua desionizada Milli-Q 18 M $\Omega$ -cm.

### Insumos y equipos.

Cromatoplaaca de C18 para separaciones quirales de 10 cm x 2.5 cm **99697 Sigma-Aldrich**, vaso de precipitado de vidrio 250 mL, tapa de vidrio, papel filtro Whatman, micropipeta de 0.1-10  $\mu$ L. Equipo de autorradiografía (Storage Phosphor System Cyclone Plus, **PerkinElmer**) y horno Fisher-Scientific.

### Metodología.

Se preparó una solución estándar de 0.2 mg/mL de L-metionina en agua y una solución estándar de la mezcla de los isómeros a 0.4 mg/mL de D/L-metionina en agua. La cromatoplaaca se dividió en tres carriles, en el primero se colocó 1  $\mu$ L del estándar de L-metionina, en el segundo 1  $\mu$ L del producto y en el tercero 0.5  $\mu$ L de la mezcla de isómeros. La cromatoplaaca se dejó eluir 8 centímetros y se reveló rociando ninhidrina al 0.2 % en etanol y calentando durante 10 minutos a 65°C; con el equipo de autorradiografía (Ilustración 13) se obtuvo el perfil de actividad en la cromatoplaaca y se comparó con el obtenido en el revelado con ninhidrina.

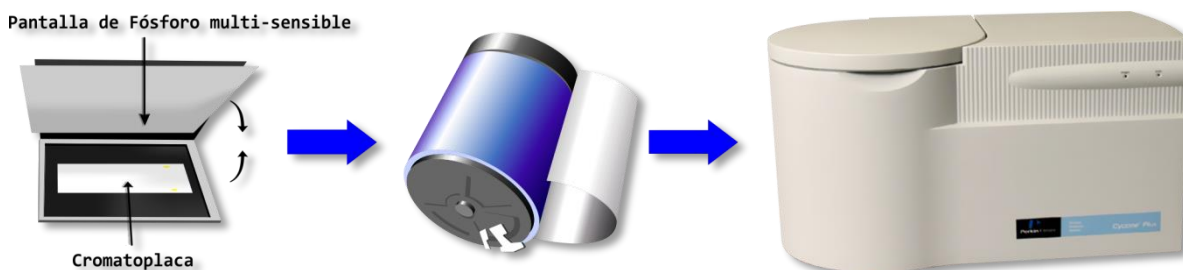


Ilustración 13 Fotografía del equipo de autorradiografía, Storage Phosphor System Cyclone Plus, PerkinElmer

## Pureza radionucleídica.

Una pequeña porción del producto se coloca en el pozo del equipo “Wiper™ Single Detector Wipe Test / Well Counter” (detector de NaI(Tl)), la obtención del espectro gamma tarda 1 min y se obtiene un foto pico a los 511 keV, lo que verifica que la molécula está marcada con un radionucleido emisor de positrones.

## Identificación del radionucleido [<sup>11</sup>C]-C.

Se utiliza una cámara de ionización o activímetro CRC-ULTRA CAPINTEC, INC., comúnmente llamado “calibrador de dosis”. En el interior del activímetro se introduce una muestra del producto y se realiza la lectura de la actividad, se deja transcurrir un intervalo de tiempo conocido y se realiza una nueva lectura de la muestra. Los valores obtenidos de las lecturas se sustituyen en la ecuación 1, mediante la cual se obtiene el tiempo de vida media característico del radionucleido.

$$\tau_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln 2}{\ln A_0 - \ln A} \cdot \Delta t$$

*Ecuación 1. Cálculo de la vida media, donde A=Actividad obtenida en la segunda lectura en milicuries, A<sub>0</sub>=Actividad inicial en milicuries y Δt=minutos transcurridos entre las dos mediciones.*

## Disolventes residuales.

Se busca principalmente la presencia de etanol en el producto. Las características y las condiciones del cromatógrafo de gases se enlistan a continuación:

### Detector de ionización a la llama.

Temperatura 300 °C

Flujo de aire 400 mL /min

Flujo de hidrógeno 35 mL /min

Flujo de helio 25 mL /min



## Inyector

Modo dividido	Relación de la apertura 40:1
Temperatura 250 °C	Flujo de la apertura número 80
Presión 20.2 psi	Flujo total: 84.5 mL /min
Volumen de la muestra 2 µL	

## Horno

Temperatura 50°C	Flujo de helio 2 mL /min constante
Tiempo inicial 1 minuto	Velocidad 42
Tasa de cambio 20	Temperatura final 80°C
Intervalo de temperaturas 20 °C -250/260 °C.	Tiempo final 4 minutos

## Columna

DB-WAX 122-7032 (ALIGENT TECHNOLOGIES)	Diámetro interno 0.250 mm
Longitud 30 m	Capa 0.250 µm

## Cuantificación de L-homocisteína

La concentración de L-homocisteína se calculó con la ecuación obtenida de la curva de calibración realizada mediante cromatografía de líquidos. Se trabajó con dos longitudes de onda (225 nm y 216 nm), las condiciones indicadas en la Tabla 6 y se inyectó por triplicado 20 µL de las siguientes concentraciones de L-homocisteína: 0.0315, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, en mg/mL.

Para realizar el análisis del producto se obtuvieron 3 muestras antes y después de la purificación en línea, de las que de cada una se inyectó 20 µL en el cromatógrafo de líquidos en las mismas condiciones de la curva de calibración.

## Determinación de la actividad específica.

Para la curva de calibración se inyectó por triplicado 20 µL de 7 concentraciones diferentes de L-metionina: 0.01575, 0.0315, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 en mg/mL.

Se tomaron 3 muestras de 1 mL de diferentes producciones, se midió la actividad presente en las muestras y se calculó la concentración de actividad. De esas muestras se inyectaron 20 µL de cada una de ellas en el cromatógrafo de líquido con las condiciones de la Tabla 6 y se determinó el área bajo la curva. Del área bajo la curva se calculó la concentración de L-metionina con la ecuación resultante de la curva de calibración.

Con los datos obtenidos de la masa de L-metionina y la actividad presente en los 20 µL de la muestra se utilizó la ecuación 2 para determinar la actividad específica.

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{Actividad}}{\text{Masa}} [=] \frac{Ci}{\mu\text{mol}}$$

*Ecuación2. Calculo de la actividad específica del producto.*

## Cuantificación de flúor.

La cuantificación de flúor antes y después de la purificación con el cartucho de alúmina se realizó mediante la técnica de colorimetría con el equipo HANNA INSTRUMENTS HI 96729 (Ilustración 14), el intervalo de cuantificación del equipo es de 0.00-2.00 mg /L. Para determinar la concentración de flúor se agregan 10 mL de la muestra o blanco más 2 mL del reactivo HI 93729-01 en la celda, se agita y se lee con el equipo. El valor obtenido aparece en la pantalla del equipo después de dos minutos de iniciada la lectura. Durante la cuantificación del flúor de las muestras fue necesario utilizar una dilución 1:100 para las muestras antes de purificar y un blanco de etanol al 6 % mientras que para las muestras ya purificadas se utilizó el factor de dilución 1:33 y un blanco de etanol al 4 % [45].



Ilustración 14 Fotografía del equipo utilizado en la cuantificación de flúor iónico HI96729.

## Cuantificación de pirógenos

La prueba de pirógenos no se realiza como lo sugiere la FEUM 8ª edición [32], se utiliza un sistema automatizado de detección de endotoxinas aprobado por la Food and Drug Administration (FDA), “Endosafe Portable Test System (Endosafe® PTS)”, cuyo principio es el mismo de la prueba de lisado de amebocitos de *Limulus polyohemus* propuesto por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Los motivos principales por lo que no se realiza de acuerdo a la normatividad es que el sistema automatizado permite obtener el resultado en un menor tiempo además de requerir una menor manipulación de la muestra.

- **Reactivos y materiales.**

Agua libre de pirógenos (LAL Reagent Water) Charles River Laboratories W1-10, cartuchos Endosafe® PTS 20 Charles River Laboratories PTS20F, tubos de dilución de endotoxinas 13·100 mm Charles River Endosafe, puntas libres de pirógenos para pipeta de 25 µL, pipeta de 25 µL.



Ilustración 15. A. Equipo Endosafe® PTS, B. Cartucho utilizado en la prueba.

- **Condiciones del equipo.**

El aparato es un sistema portátil que contiene un espectrómetro con cuatro detectores de UV (395 nm), una bomba de vacío, una cámara de incubación y requiere de cartuchos especiales. Los cartuchos contienen cuatro orificios, dos de ellos contienen una cantidad de endotoxina conocida la cual funciona como control positivo, los otros dos pozos no contienen endotoxina y sirven para la cuantificación de las endotoxinas presentes en la muestra, por duplicado. El procesamiento de la muestra es sencillo y requiere de pocos pasos, el primero de ellos es permitir que el equipo así como el cartucho tengan una temperatura de 37 °C (se realiza de manera automática), segundo se requiere de una dilución adecuada de la muestra, siendo ésta 1:50, de la cual se aplica 25 µL en cada orificio del cartucho. El tiempo en total en que se realiza el ensayo es de 20 minutos aproximadamente [46].

### Integridad de la membrana.

Después de que el producto es filtrado se corrobora la integridad de la membrana utilizada. La prueba se realiza conectando el filtro a una aguja sumergida en un vial de vidrio con 20 mL de

agua, en la parte superior del filtro se acopla una línea de alimentación de nitrógeno y se ajusta a una presión mayor que 50 psi durante 1 min. Si no se observa un burbujeo en el agua la membrana se encuentra intacta y la esterilización por filtración se realizó correctamente.

### Estudios preclínicos en roedores.

Se realizaron estudios de biodistribución en ratones (*Mus musculus (nude)*) inoculados con células de glioblastoma C6 y en ratones sanos (*Mus musculus (CD1)*), se les administró vía intravenosa una actividad del radiofármaco [<sup>11</sup>C]-MET de 0.2-1 mCi, se realizaron estudios dinámicos y estáticos en el microtomógrafo, MicroPET Focus 120 Concorde Microsystem, Siemens, de la Facultad de Medicina. Las imágenes se reconstruyeron con el algoritmo OSEM2D.

### Estudios preclínicos en voluntarios sanos.

Después de que se hicieran las pruebas en los ratones y una vez que el radiofármaco cumplió con todas las pruebas de control de calidad, se realizaron pruebas de biodistribución en dos voluntarios sanos. A los voluntarios se les administró vía intravenosa 10 mCi de actividad de [<sup>11</sup>C]-MET, se les dio un tiempo de biodistribución de 15 minutos, para posteriormente adquirir la imagen en el tomógrafo PET/CT Siemens Biograph 64, de la Facultad de Medicina. Las imágenes se reconstruyeron con el algoritmo OSEM2D.

## Resultados y Discusión de resultados.

### Producción de [<sup>11</sup>C]-metionina.

#### Reducción del [<sup>11</sup>C]-CO<sub>2</sub> a [<sup>11</sup>C]-CH<sub>4</sub>.

Los valores de actividad que nos proporcionan los detectores de radiación del módulo de síntesis TracerLab FX C Pro, no son confiables, ya que el valor dependerá de la geometría del detector y de la geometría de la fuente de radiación, así como de la distancia, la calibración, el volumen y el fondo. Sin embargo, nos proporciona una idea general del comportamiento de la actividad en el transcurso de la síntesis, permitiéndonos calcular rendimientos parciales. Dando seguimiento a la actividad en la trampa de metano podemos darnos de cuenta que la reducción del [<sup>11</sup>C]-CO<sub>2</sub> a [<sup>11</sup>C]-CH<sub>4</sub> es mayor al 90 %, este valor lo podemos inferir al comparar el valor teórico de la actividad al final del bombardeo ( $A_{EOB}$ ) obtenido en un cierto tiempo de irradiación y corriente (ecuación 3), con el valor máximo detectado en la trampa de metano, ( $A_{EOSB}$ ).

$$A_{EOB} = A_{EOSB} (1 - e^{-\lambda t})I$$

En donde :

$$\lambda = \frac{\text{Ln } 2}{20,4 \text{ min}}$$

$t$  = tiempo de irradiación (min)

$I$  = corriente de irradiación ( $\mu\text{A}$ )

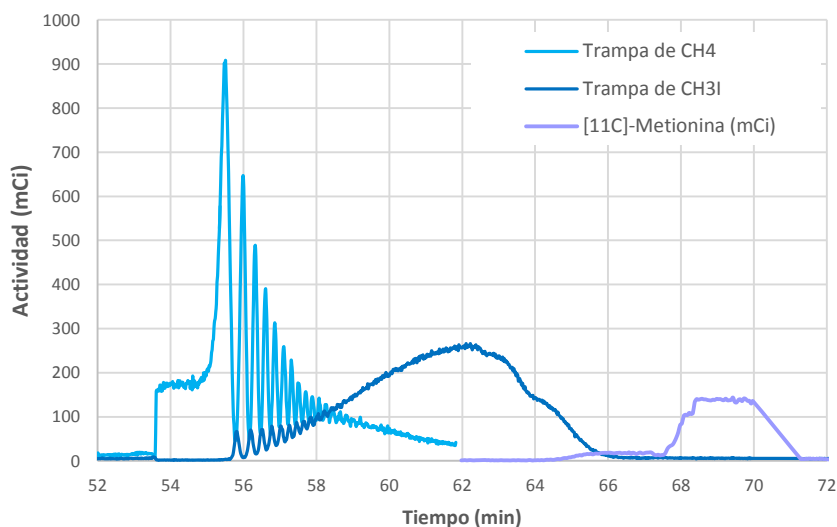
$A_{EOB}$  = Actividad al final de bombardeo

$A_{EOSB}$  = Actividad de saturación al final de bombardeo  $\frac{\text{mCi}}{\mu\text{A}}$

*Ecuación 3. Cálculo de la actividad al final de bombardeo.*

#### Síntesis de [<sup>11</sup>C]-Ioduro de metilo ([<sup>11</sup>C]-CH<sub>3</sub>I).

En la Gráfica 3 se observa la fluctuación de la actividad en las trampas de ioduro de metilo y metano durante la síntesis de [<sup>11</sup>C]-CH<sub>3</sub>I, siendo apreciable la baja eficiencia de la reacción; al iniciar con una actividad aproximada de 900 mCi y obtener únicamente 260 mCi. La conversión de [<sup>11</sup>C]-CH<sub>4</sub> a [<sup>11</sup>C]-CH<sub>3</sub>I muestra el rendimiento más bajo de la síntesis siendo el punto crítico en la producción; el rendimiento se calculó con el valor máximo de actividad leído en la trampa de metano y el valor máximo de la trampa de ioduro de metilo, siendo de  $36.4 \pm 5.5$  % (n=13).



Gráfica 3 Comportamiento de la actividad a lo largo de la síntesis de  $[^{11}\text{C}]\text{-MET}$  en los diferentes compartimentos del módulo de síntesis.

La reacción depende de la formación de los dos radicales libres y su propagación, sin embargo la homólisis del yodo no es termodinámicamente favorecida dependiendo de la temperatura de reacción y la concentración de yodo molecular en fase gaseosa, por lo que un exceso de yodo en lugar de mejorar el rendimiento puede disminuir la eficiencia de la reacción, además de que se pueden formar varias impurezas. Una posible explicación de la baja eficiencia es la diferencia de temperaturas entre los diferentes compartimentos involucrados en la síntesis; dos de ellos se encuentran a temperatura ambiente, en el momento de recircular el medio de reacción entre éstos y un tercero a  $750\text{ }^{\circ}\text{C}$ , la diferencia de temperatura favorecerá la cristalización del yodo atrapando el  $[^{11}\text{C}]\text{-CH}_3\text{I}$  formado [41].

### Reacción de metilación con el $[^{11}\text{C}]\text{-CH}_3\text{I}$ (Marcado del aminoácido).

De las 13 producciones de  $[^{11}\text{C}]\text{-CH}_3\text{I}$ , sólo 11 de ellas se tomaron en cuenta para el análisis de resultados, las dos faltantes no fueron consideradas debido a problemas en el módulo de síntesis que impidieron transferir el material marcado a la celda caliente y poder cuantificar la actividad obtenida.

El rendimiento del marcado de la  $[^{11}\text{C}]\text{-MET}$  se calculó con respecto al  $[^{11}\text{C}]\text{-CH}_3\text{I}$ , considerando como actividad inicial la actividad medida en la trampa de yoduro de metilo y como actividad final la actividad del producto medida en el activímetro (un detector confiable y calibrado anualmente) obteniéndose un rendimiento promedio corregido por decaimiento del  $70 \pm 8\%$ . Sin embargo,

podríamos inferir que la eficiencia de marcado es mayor al 90 %, ya que no se observa actividad en el detector del vaso original de reacción que contiene acetonitrilo a -20°C, y que durante la síntesis funge como una trampa de seguridad que atrapa al  $[^{11}\text{C}]\text{-CH}_3\text{I}$  que llegase a escaparse del vial de reacción. La actividad leída en este detector no aumenta durante el burbujeo del  $[^{11}\text{C}]\text{-CH}_3\text{I}$  al vaso de reacción, solo marca el fondo y es muy similar durante toda la producción de  $[^{11}\text{C}]\text{-MET}$ .

La adsorción del precursor en el soporte sólido favorece la alquilación de la L-homocisteína y facilita la purificación del producto. El flúor forma un puente de hidrogeno muy estable con el grupo hidroxilo de la superficie de la alúmina, el potasio permanece como contra ion al igual que el agua presente, mientras el protón ácido de la L-homocisteína forma un puente de hidrógeno con el flúor permitiendo retener al precursor en el soporte sólido. El flúor transfiere un poco de su densidad electrónica a través del puente de hidrógeno aumentando la capacidad nucleofílica del azufre, favoreciendo que la alquilación se lleve a cabo. Una vez que el azufre reacciona con el yoduro de metilo el puente de hidrógeno se rompe y el producto se libera al medio de reacción.

## Purificación.

### Cuantificación de la actividad en los cartuchos de purificación.

El porcentaje de actividad retenida en los cartuchos empleados en la purificación de  $[^{11}\text{C}]\text{-MET}$  se resume en la Tabla 7. El cartucho de C18 adsorberá principalmente el  $[^{11}\text{C}]\text{-CH}_3\text{I}$  que no reaccionó y las trazas de precursor que llegasen a disolverse, mientras que el cartucho de alumina retendrá el flúor presente en el medio de reacción.

*Tabla 7 Porcentaje de actividad retenida en los cartuchos empleados en la purificación en línea de la  $[^{11}\text{C}]\text{-MET}$ .*

Tipo de Cartucho	Porcentaje de actividad retenida en el cartucho.	Porcentaje de actividad retenida en el cartucho.
	Mínimo – Máximo	Promedio
<b>Sep-pack plus C18</b>	0.24-10.8 %	3 %
<b>Sep-pack Alumina N plus</b>	1-35 %	13 %

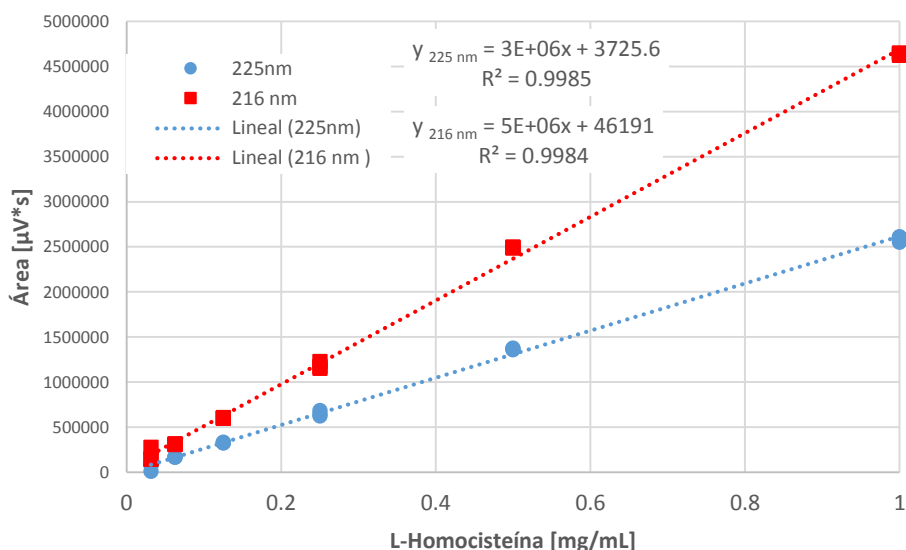
La mayor pérdida de actividad durante la purificación se da en el cartucho de alumina, por lo que fue necesario implementar un lavado de dicho cartucho con 5 mL de 0.05 M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Inicialmente el lavado del cartucho se recolectó en un vial diferente al del producto final y se analizó para garantizar que cumpliera con las características del producto obtenido inicialmente.



Se comprobó que la actividad retenida en el cartucho correspondía a la [<sup>11</sup>C]-MET por lo que en las producciones subsecuentes el lavado se recolectó en el vial de producto final.

### Cuantificación de L-Homocisteína presente en la [<sup>11</sup>C]-MET.

Se determinó la concentración de L-homocisteína en el producto, antes y después de ser purificado por el cartucho C18 mediante la curva de calibración realizada (Gráfica 4) por cromatografía de líquidos de alta eficiencia.



Gráfica 4 Curva de Calibración de L-homocisteína a dos diferentes longitudes de onda  $\lambda = 216$  nm (línea superior con marcadores cuadrados) y  $\lambda = 225$  nm (línea inferior).

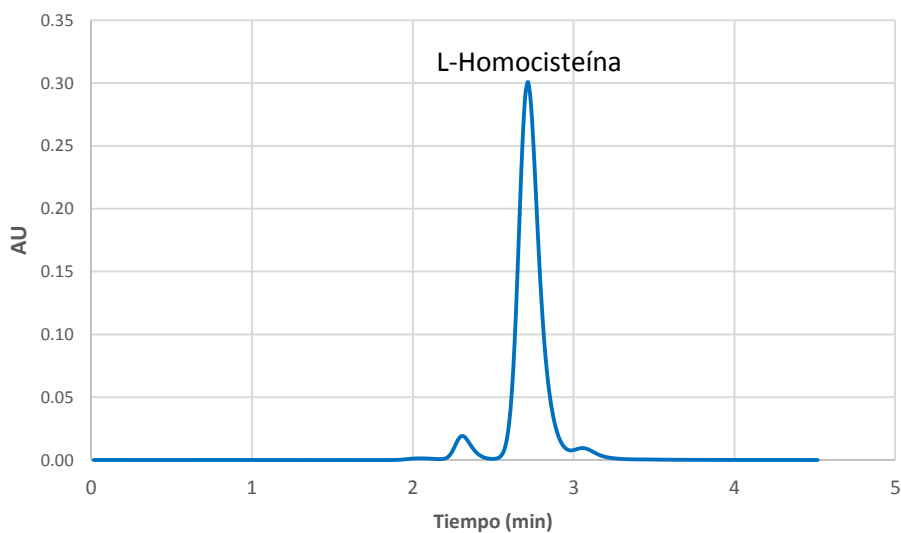
La primera purificación del producto se realizó por filtración antes del acondicionamiento del producto, debido a que la L-homocisteína es muy ligeramente soluble en etanol, por lo que la mayor parte del precursor se quedará retenido en el vial de reacción (>85 %). El poco precursor disuelto en el medio de reacción se adsorbió en aproximadamente un 50 % en el cartucho de C18, como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8 Concentración de L-Homocisteína en la [<sup>11</sup>C]-MET antes y después de la purificación.

	Antes del Cartucho C18	Después del Cartucho C18
<b>L-Homocisteína [mg/mL] ± SEM</b>	0.0232 ± 0.0043	0.0115 ± 0.0016

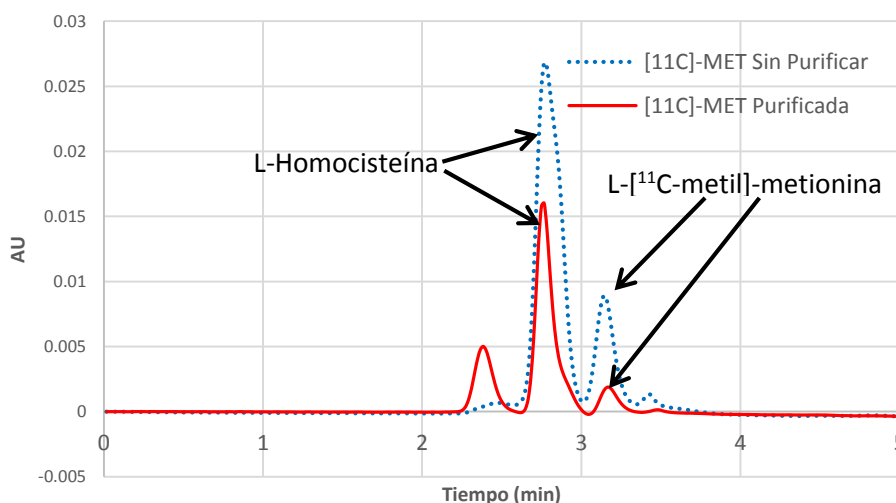
La concentración del precursor en el producto final fue de  $0.0115 \pm 0.0016$  mg /mL, por lo que el producto cumple con lo establecido en la farmacopea europea donde se pide una concentración menor que 0.13 mg / mL. De hecho, el producto cumple con dicha especificación inclusive antes de su purificación, estando 5 veces por debajo del límite antes de purificar y 11 veces por debajo posterior a la purificación.

El Cromatograma 1 muestra el tiempo de retención característico de la L-homocisteína, obtenido para uno de los puntos de la curva de calibración.



*Cromatograma 1 L-homocisteína 1 mg/ mL,  $\lambda = 225$  nm*

El Cromatograma 2 muestra el pico correspondiente al precursor antes y después de la purificación de la [ $^{11}\text{C}$ ]-MET.



*Cromatograma 2 Inyección del producto antes y después de ser purificado. Línea punteada [11C]-MET sin purificar, línea continua producto purificado,  $\lambda = 225$  nm.*

Es indispensable cuantificar la concentración del precursor con la finalidad de no incrementar significativamente la concentración plasmática de L-homocisteína en los pacientes, cuyos niveles normales en sangre son de 6-10  $\mu\text{mol} / \text{L}$  en mujeres, y de 8-12  $\mu\text{mol} / \text{L}$  en hombres. Si se considera que la concentración final presente en el producto es de 85  $\mu\text{mol}/\text{L}$  y a un paciente se le administra 3 mL del producto y tomando un volumen de 4 L, la concentración de L-homocisteína se elevaría 0.064  $\mu\text{mol}/ \text{L}$ , siendo un incremento no significativo comparado con la concentración normal en plasma [47].

### Cuantificación de flúor presente en la [11C]-MET.

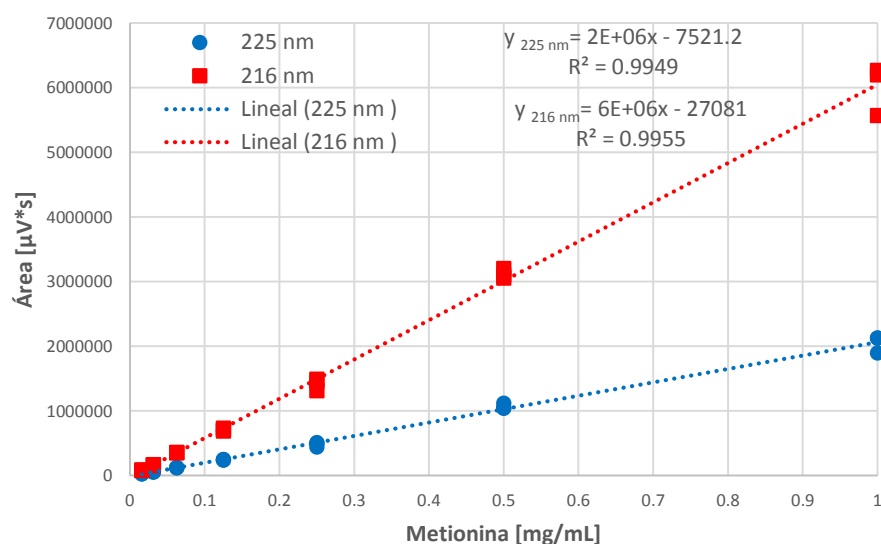
El cartucho de alúmina disminuyó un 98.4 % la concentración de flúor presente al final de la purificación. La cuantificación de flúor antes y después de la purificación (Tabla 9), indica que se encuentra por debajo de los límites establecidos en la farmacopea europea, siendo el límite máximo de 0.3 mg/ mL. La ingesta de bajas concentraciones de flúor (<0.5 mg/L) son indispensables para un buen desarrollo, sin embargo una ingesta mayor que 1.5 mg / L puede causar efectos tóxicos en los humanos. Las concentraciones obtenidas se encuentran muy por debajo de dicho límite, además se debe considerar que los efectos tóxicos se ocasionan por una exposición prolongada a dicho agente, en este caso se trata de una sola exposición [48].

Tabla 9 Concentración del Ion Fluór antes y después del cartucho de Alúmina.

	Antes del Cartucho Alúmina	Después del Alúmina
<b>Fluór [mg/mL] ± SEM</b>	0.160 ± 0.041	0.0025 ± 0.0011

## Determinación de la actividad específica.

Con la finalidad de seleccionar la longitud de onda más adecuada para la determinación de la masa de metionina presente en la muestra, la curva de calibración de L-metionina se realizó a dos diferentes longitudes de onda, 216 nm y 225 nm (Gráfica 5). La longitud de onda seleccionada fue de 216 nm y se obtuvo  $0.000666 \pm 1.6 \cdot 10^{-5}$   $\mu\text{mol}$  de metionina promedio en el producto final, por lo que la actividad específica determinada fue de  $200.8 \pm 4.8$  mCi /  $\mu\text{mol}$ .



Gráfica 5 Curva de Calibración de L-metionina a dos diferentes longitudes de onda  $\lambda = 216$  nm (línea superior con marcadores cuadrados) y  $\lambda = 225$  nm (línea inferior).

El valor de la actividad específica obtenido es muy bajo comparado con el valor teórico de 9214 Ci/  $\mu\text{mol}$  para el carbono -11, esto se debe a la gran cantidad de fuentes de contaminación en el ambiente, siendo la principal de ellas el dióxido de carbono presente en la atmósfera (> 400 ppm) [49].

Al no contar con un módulo de síntesis exclusivo para la producción de radiofármacos mediante reacciones de alquilación, al momento de realizar las modificaciones físicas del equipo

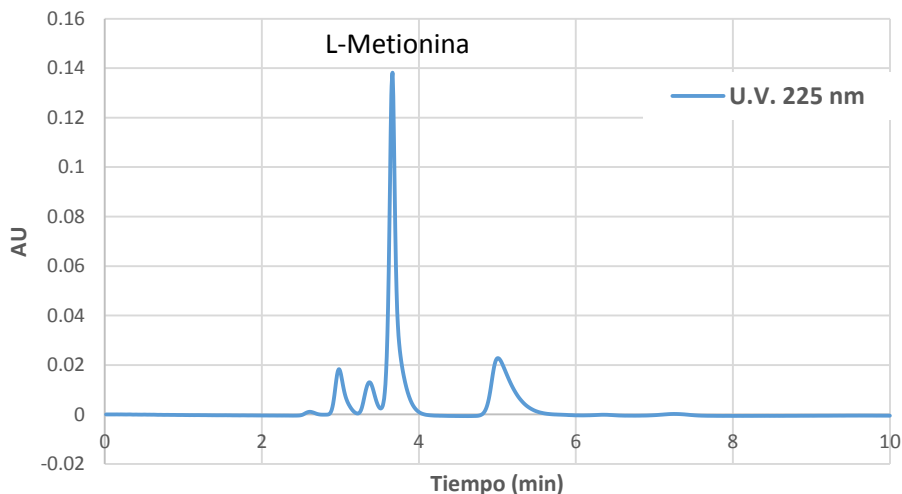
donde se conectan y desconectan varias líneas, el CO<sub>2</sub> atmosférico contamina los compartimentos del módulo de síntesis, el cual reaccionará igual que el [<sup>14</sup>C]-CO<sub>2</sub>.

La farmacopea europea no establece como requisito un límite mínimo del valor de la actividad específica, una de las principales razones es que el blanco molecular del radiofármaco no son receptores, los cuales necesitaran una alta actividad específica, además de tratarse de una molécula endógena.

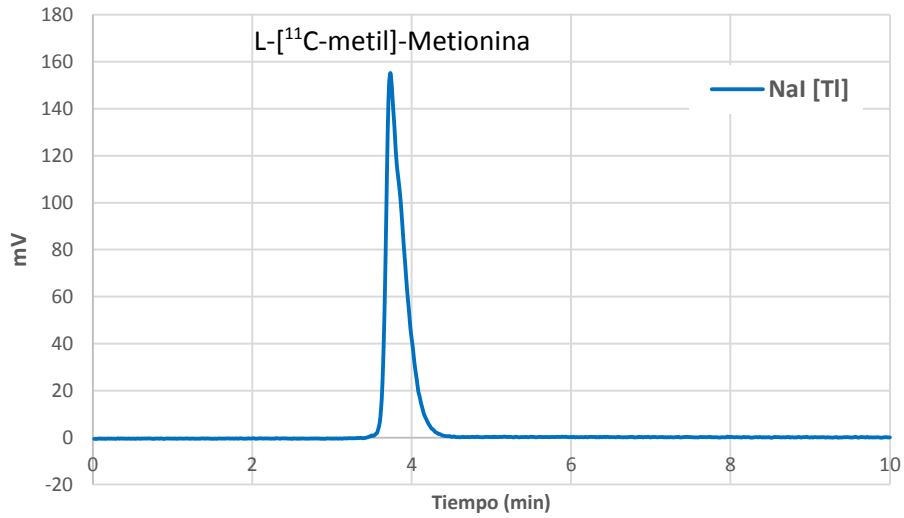
## Control de calidad

El producto cumplió con las especificaciones propuestas en la monografía, siendo una solución incolora y libre de partículas con un pH de 5.5 a 7. El radiofármaco obtenido se identificó como L-[<sup>11</sup>C-metil]-metionina, después de comparar el tiempo de retención del estándar con el del producto (Cromatograma 3 y Cromatograma 4). Para reducir el tiempo en las pruebas posteriores del control de calidad se inyectó una mezcla de 15 µL de producto y 5 µL de estándar; donde el pico correspondiente al estándar se definió primero en el detector de U.V. a 225 nm, de 0.1 a 0.2 segundos después se definió el pico correspondiente al producto en el detector de radiación. El producto presentó una pureza radioquímica mayor al 99.0 % correspondiente a la forma química de L-[<sup>11</sup>C-metil]-metionina (Cromatograma 4), al presentar un tiempo de retención similar al del estándar en el UV y ser el único pico de radiación presente en el radiocromatograma.

Por las características del producto se cuantificó el porcentaje de actividad correspondiente al estereoisómero (D y L)-metionina, el cual también forma parte de la pureza radioquímica. Se obtuvo una pureza radioquímica del estereoisómero L mayor al 99.0 % (Ilustración 16).



Cromatograma 3 Estándar de L-metionina (1 mg/mL) Detector de U.V. 225 nm.



Cromatograma 4 Inyección del Radiofármaco [<sup>11</sup>C]-metionina, detector de radiación NaI[TI].

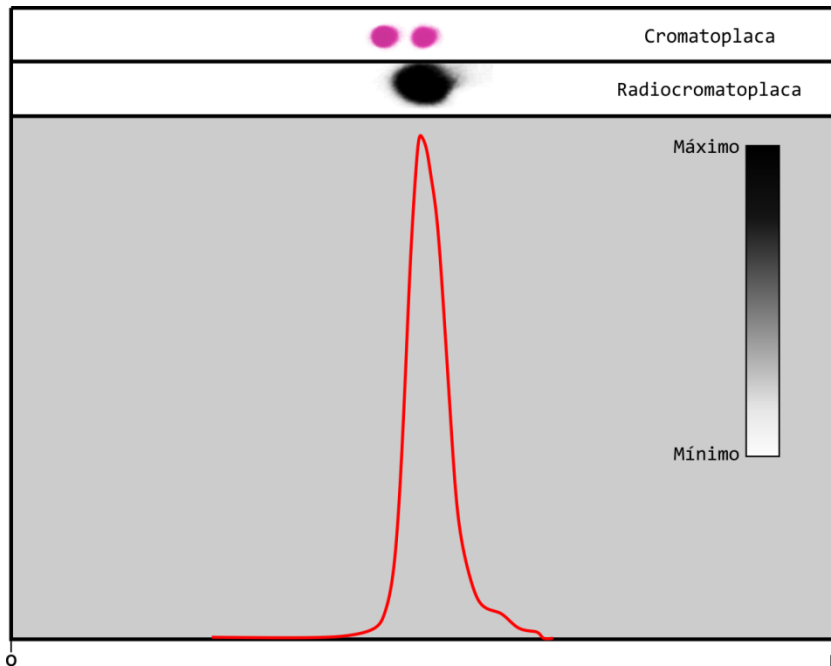


Ilustración 16 Perfil de la cromatografía de capa fina utilizada para la cuantificación de los isómeros L y D.

La autorradiografía (Ilustración 16) mostró una única mancha correspondiente al isómero L-[<sup>11</sup>C]-metionina. La cromatoplaaca superior muestra la distribución de los isómeros sin marcar, la primera mancha corresponde al isómero D-metionina y la segunda corresponde al isómero L-metionina.

El espectro gamma obtenido del producto presenta un único fotopico a 511 keV, lo que nos permite inferir que el radiofármaco se encuentra marcado con un radionucleido emisor de positrones (Ilustración 17), pues dicha energía corresponde a la aniquilación de los positrones. Para garantizar que dicho radioisótopo es  $^{11}\text{C}$  se determinó el tiempo de vida media siendo éste de 20 min.

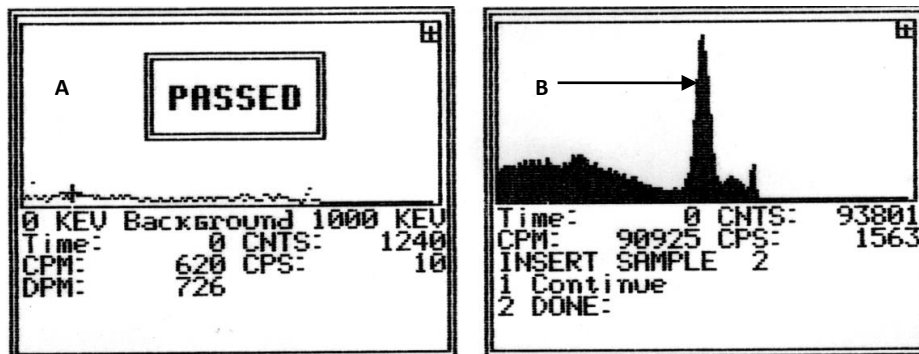


Ilustración 17 Pureza radionucleídica. A Lectura sin fuente radioactiva, B Fotopico a 511 keV, originado por la aniquilación de positrones.

Los resultados de las pruebas biológicas se encuentran dentro de las especificaciones; las membranas utilizadas durante la filtración resistieron una presión de 50 psi lo que confirma su integridad. La cantidad de endotoxinas presentes en el producto es menor que 2.5 UE/mL (Ilustración 18), muy por debajo del límite permitido (11.7 UE/mL si consideramos un volumen de 15 mL).

```

***** ENDOSAFE Test Record *****
          V7.12C  8/25/2011
DateTime: ..... 17-07-13 @ 14:22:06
Device: ..... 2600
OperatorID: ..... GCC
Cartridge: ..... Endotoxin
Temperature: .. Start: 37.0C End: 37.0C
Method: ..... KX-122
Cartridge Lot#: ..... 9349133
Cartridge Cal Code: ..... 513235382938
Range: ..... 5-0.05
Range Time: ..... Sec: 132-753
Onset Times: ..... >753 344 >753 316
Slope: -0.378 ..... Intercept: +2.385
Dilution: ..... 50
Sample Lot: ..... MET170713FC1
Sample ID: ..... MET
Sample Rxn Time CV: ..... 0.0% Pass
Spike Value: ..... 0.393 EU/mL
Spike Rxn Time CV: ..... 6.0% Pass
Spike Recovery: ..... 80% Pass
Test Suitability: ..... Pass
Sample #1 Value: ..... <2.50 EU/mL
Sample #2 Value: ..... <2.50 EU/mL
  
```

Ilustración 18. Resultado de la prueba de pirógenos realizada en el equipo Endosafe® PTS.



## Certificado de control de calidad

<b>Código del producto: [<sup>11</sup>C]-MET</b>		<b>Lote: <u>MET170713FC1</u></b>		
<b>Producto: L-[<sup>11</sup>C-METIL]-METIONINA</b>		<b>Fecha: <u>17072013</u></b>		
Parámetro	Metodología de la prueba	Criterio de aceptación	Resultado	
			Aceptado	Rechazado
<b>Apariencia</b>	Inspección visual	Es un líquido transparente, incoloro, libre de partículas suspendidas visibles	✓	
<b>Medición del pH</b>	Tiras pH Whatman®	pH entre 4.5-8.5	✓	
<b>Identificación</b>				
<b>Identificación química</b>	HPLC columna analítica C18, fase móvil 1.4 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> en agua	El tiempo de retención es de 3.4± 0.2 minutos	✓	
<b>Determinación del tiempo de vida media</b>	Activímetro	20 ± 1 minutos	✓	
<b>Pureza</b>				
<b>Pureza radioquímica</b>	HPLC columna analítica C18, fase móvil 1.4 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> en agua	Mínimo el 95 % de la radiactividad total corresponde a [ <sup>11</sup> C]-carbono en la forma de (L o D)-[ <sup>11</sup> C]-metionina	✓	
	TLC (C18 para compuestos quirales) Fase móvil Metanol:Agua	Mínimo el 90 % de la radiactividad total corresponde a [ <sup>11</sup> C]-carbono en la forma de L-[ <sup>11</sup> C]-metionina	✓	
<b>Pureza radionucleídica</b>	Obtención del espectro Gamma	Presencia de un único fotopico con una energía de 511 keV	✓	
<b>Determinación de disolventes residuales</b>	Cromatografía de gases	Contiene únicamente etanol	✓	
<b>Concentración de Flúor</b>	Hanna Instrument	≤ 0.30 mg/ mL	✓	
<b>Concentración de L-homocisteína</b>	HPLC columna analítica C18, fase móvil 1.4 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> en agua	≤ 0.13 mg/ mL	✓	
<b>Pruebas biológicas</b>				
<b>Prueba de pirógenos</b>	Endosafe® PTS	No contiene más de 11.7 UE/mL	✓	
<b>Integridad del filtro</b>	Presión con nitrógeno	Resiste hasta 50 psi de presión	✓	

## Estudios preclínicos en roedores.

Se realizaron pruebas de biodistribución del radiofármaco en ratones sanos para comprobar que su captación concordara con lo reportado en la literatura, la Ilustración 19 corresponde a las imágenes obtenidas del estudio microPET realizado a un ratón sano. Los principales órganos en donde se acumuló la  $[^{11}\text{C}]\text{-MET}$  son: el tracto gastrointestinal, el hígado y el páncreas, también se puede observar una ligera captación en glándulas salivales mientras que en el cerebro no se observa captación del radiofármaco.

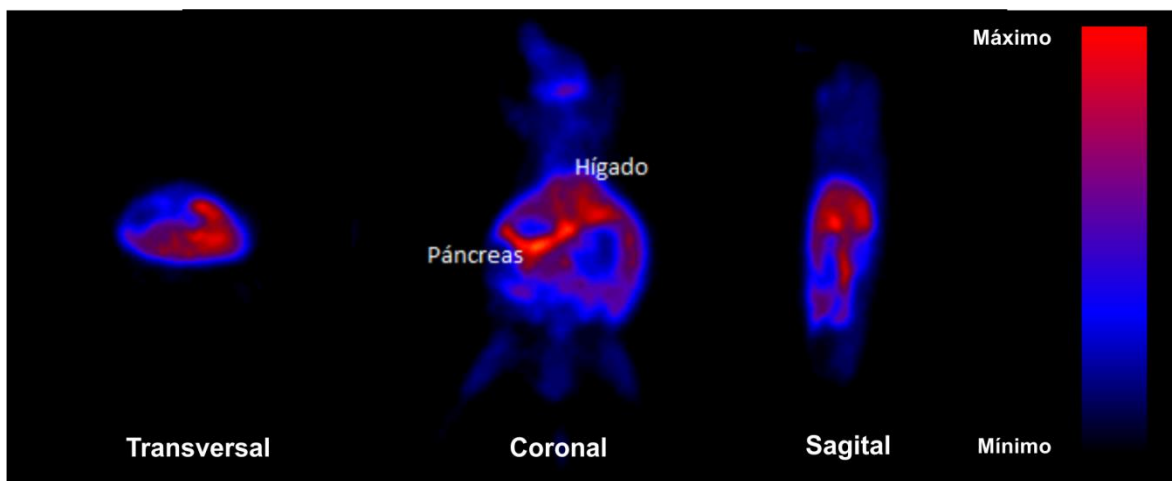
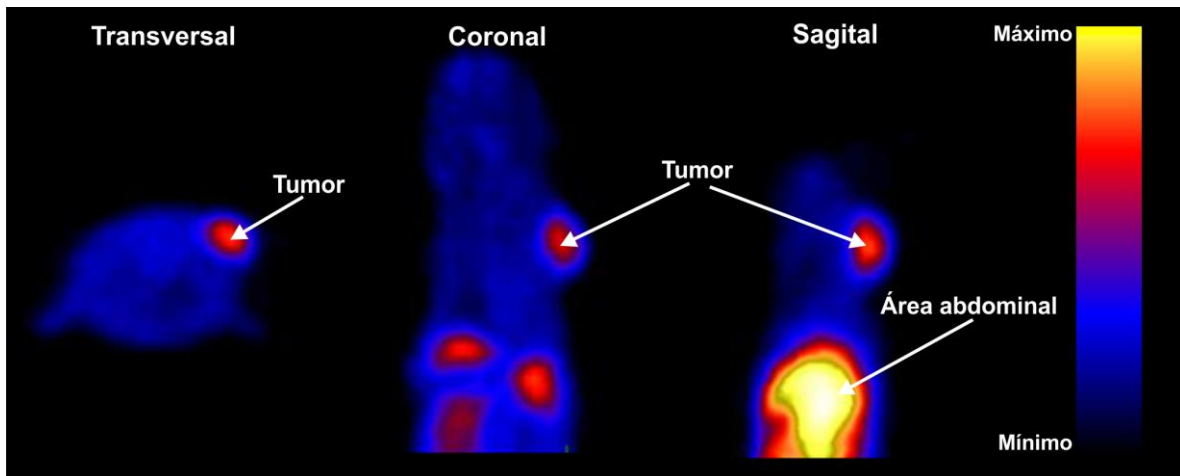


Ilustración 19 Biodistribución del radiofármaco  $[^{11}\text{C}]\text{-MET}$  en un ratón macho sano (*Mus musculus* (CD1)). Estudio estático de 20 min después de 10 minutos de biodistribución. Actividad neta inyectada 289.4  $\mu\text{Ci}$ . Algoritmo de reconstrucción OSEM2D.

Una vez obtenida la captación normal del radiofármaco, se realizaron pruebas de biodistribución en un modelo tumoral con células de glioblastoma C6 en ratones atímicos. La Ilustración 20 corresponde a las imágenes obtenidas del estudio microPET realizado a un ratón de dicho modelo tumoral inoculado en el hombro derecho del animal.

En el corte sagital y coronal se observa la captación normal del radiofármaco, se puede distinguir el tracto gastrointestinal. En el corte transversal se observa únicamente la captación del radiofármaco por el tumor, en los otros dos cortes en el extremo superior derecho también se observa esta captación correspondiente al tumor. La concentración de actividad en el tejido neoplásico fue de  $32 \pm 6 \mu\text{Ci}/\text{cc}$  y el valor estandarizado de la captación promedio en tejido neoplásico (SUV promedio) de  $0.86 \pm 0.17$



*Ilustración 20 Biodistribución del radiofármaco  $[^{11}\text{C}]\text{-MET}$  en un ratón atímico macho sano (*Mus musculus (nude)*) inoculado con células de glioblastoma C6. Estudio estático de 20 min después de 10 minutos de biodistribución. Actividad neta inyectada 677.1  $\mu\text{Ci}$ . Algoritmo de reconstrucción OSEM2D.*

## Pruebas en voluntarios sanos.

Las pruebas en voluntarios sanos se realizaron después de que la  $[^{11}\text{C}]\text{-MET}$  cumpliera satisfactoriamente con todas las pruebas de control de calidad y que se realizaran los estudios de biodistribución en roedores. El estudio de PET/CT con  $[^{11}\text{C}]\text{-MET}$  se realizó en dos voluntarios sanos, se les administró 10 mCi del radiofármaco vía intravenosa con un tiempo de reposo de 15 minutos antes de la adquisición de la imagen.

La Ilustración 21 y 22 muestran las imágenes de la tomografía por emisión de positrones con  $[^{11}\text{C}]\text{-MET}$  de los voluntarios sanos y su fusión con las imágenes obtenidas en la tomografía computada. El primer voluntario (Ilustración 21) se adquirió de cuerpo completo mientras que al segundo voluntario solo se adquirió de media cabeza a medio muslo (Ilustración 22). En ambos se observa una captación normal en los siguientes órganos: médula ósea, glándulas salivales, hígado, estómago y una baja captación en el intestino delgado, no se observa captación en vejiga ni en el tejido cerebral a pesar de que no se adquirió de cuerpo completo al segundo voluntario.

Se observó una captación más intensa en el estómago en el segundo voluntario comparado con el primero, esta captación se consideró normal y se asoció a diferencias en el metabolismo de cada voluntario.

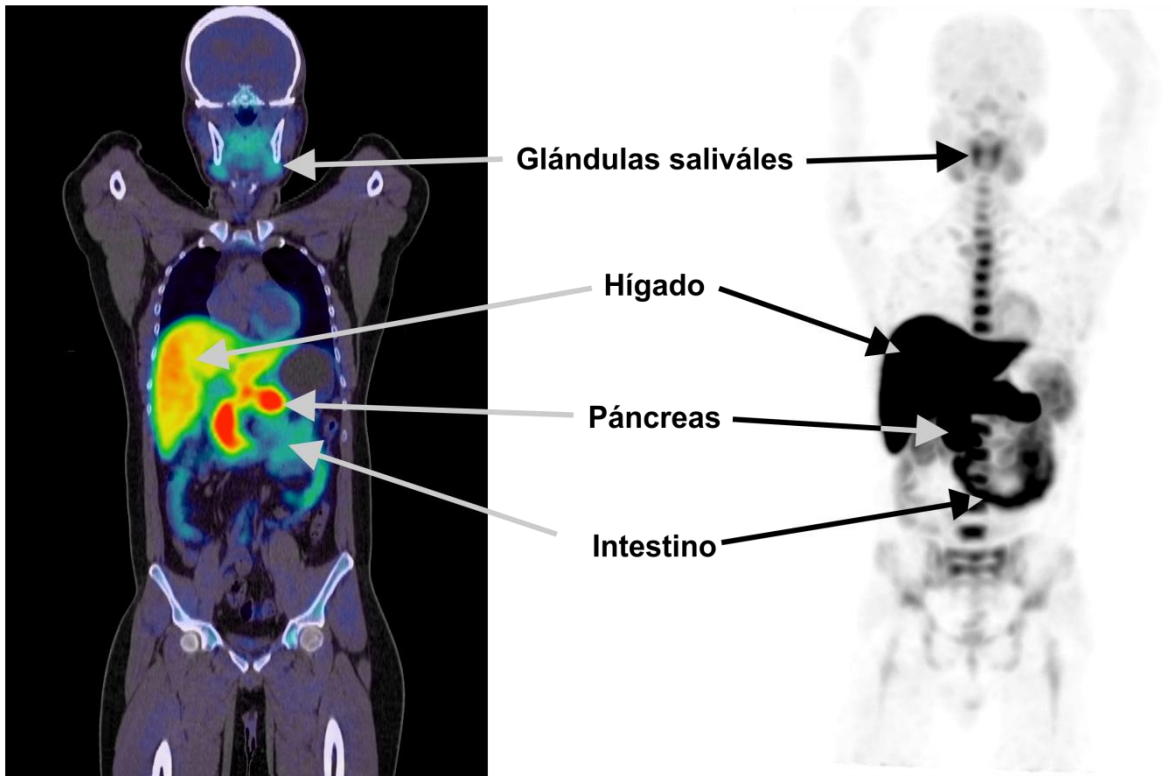


Ilustración 21 Voluntario 1, Izquierda. Estudio PET/CT fusionado cuerpo completo. Derecha. Estudio PET cuerpo completo.

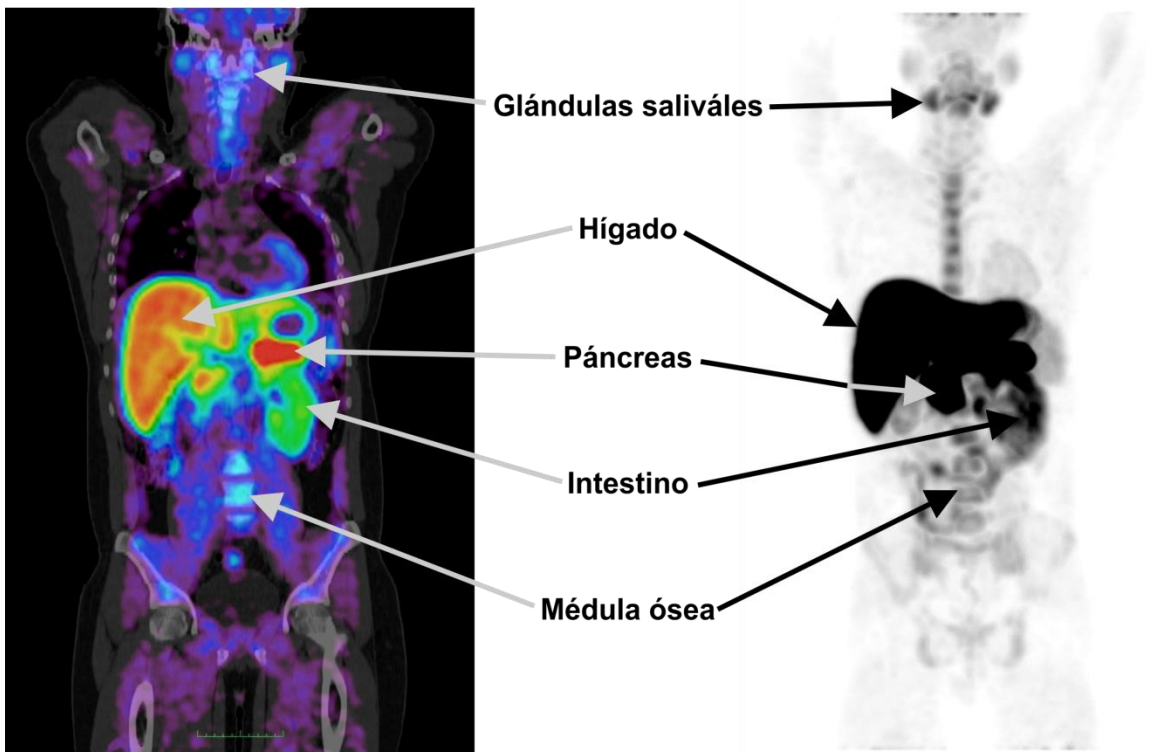


Ilustración 22. Voluntario 2. Izquierda. Estudio PET/CT fusionado. Derecha. Estudio PET.

Para la producción de L-[<sup>11</sup>C-metil]-metionina existen dos principales métodos y sus variables, la diferencia primordial entre ellos es el precursor utilizado. Cuando se utiliza L-homocisteína como precursor es necesario añadir un soporte sólido para facilitar la reacción de alquilación, este soporte sólido pueden ser KF en alúmina o un cartucho de C18 impregnado con el precursor; mientras que si se emplea la L-homocisteína tiolactona es indispensable hacer reaccionar el precursor previamente con hidróxido de sodio para abrir el ciclo de la tiolactona y su posterior metilación [38, 46, 50, 51].

Otra variable importante en la síntesis de [<sup>11</sup>C]-MET es la obtención del [<sup>11</sup>C]-CH<sub>3</sub>I, éste se puede obtener por dos métodos diferentes conocidos como el método en fase gaseosa y el método húmedo. En el método húmedo la reducción del [<sup>11</sup>C]-CO<sub>2</sub> se realiza con hidruro de litio y aluminio (LiAlH<sub>4</sub>) y se adiciona ácido yodhídrico para formar el yoduro de metilo, una vez formado se destila al vaso o al reservorio en donde se encuentra el precursor [52].

Los métodos seleccionados para la producción de [<sup>11</sup>C]-MET fueron: la síntesis de yoduro de metilo en fase gaseosa y la metilación facilitada con KF en alúmina, se eligieron estos métodos por que el módulo de síntesis cuenta con los hornos necesarios para realizar la conversión en fase gaseosa además la producción se facilita al disminuir el número de reactivos a preparar en cada producción, en la fase gaseosa las columnas utilizadas se cambian cada tres meses aproximadamente, al disminuir el número de reactivos que se preparan al instante y se exponen al medio ambiente, se reduce la contaminación con dióxido de carbono ambiental, evitando disminuir aún más la actividad específica [40, 41, 52].

Se prefirió utilizar como soporte sólido el KF/ alumina y como precursor la L-homocisteína en lugar de la L-homocisteína tiolactona, la principal razón fue el hecho de que se necesita una reacción previa con la base, esto podría disminuir el rendimiento de la reacción de metilación si no se rompe el ciclo de tiolactona de todas las moléculas del precursor.

Para poder realizar la síntesis con un soporte sólido se acondicionó físicamente el módulo de síntesis, agregando un vaso de reacción con dos filtros, los cuales retuvieron a la alúmina y al precursor sin reaccionar. Los filtros ayudaron a la primera etapa de purificación del producto y

evitaron que el sólido obstruyera alguna otra línea indispensable en las síntesis realizadas en dicho módulo.

A pesar de que las concentraciones del precursor y del flúor iónico empleados para la síntesis se encuentran por debajo de los límites establecidos en la farmacopea europea se cuantificó la concentración de éstos antes y después de la purificación. La concentración de flúor se encuentra 100 veces por debajo del límite establecido por la farmacopea europea en la monografía de fluoruro de sodio, por lo que podría ser aconsejable sustituir el cartucho de alúmina plus por un cartucho de alúmina light, aumentando la eficiencia de la producción al disminuir el porcentaje de actividad retenida en el cartucho durante la purificación.

La concentración de L-homocisteína en el producto final se encuentra 11 veces por debajo del límite establecido, la concentración obtenida en el producto final en este trabajo ( $0.0115 \pm 0.0016$ ) es menor que la concentración de 0.051 mg /mL reportada Gómez et al [50] mientras que es mayor que la concentración de 0.0005 mg /mL obtenida por Schmitz et al [43]. Estas variaciones dependen de la concentración inicial utilizada y de la solubilidad del precursor en los solventes empleados. Lo importante a resaltar es que las tres concentraciones en los diferentes casos se encuentran por debajo de lo establecido en la farmacopea europea.

El valor de la actividad específica obtenido 0.2 Ci / $\mu$ mol es menor pero del mismo orden de magnitud comparado con los valores obtenidos por Schmitz et al. [43] (1 Ci / $\mu$ mol) y por Gómez et al. [50] (0.77 Ci/ $\mu$ mol), a pesar de que en el segundo, el yoduro de metilo se sintetizó por vía húmeda. Sin embargo, estos resultados son mucho mayores comparados con los reportados Ming-Rong et al. donde la producción de [ $^{11}$ C]-MET se realizó con L-homocisteína tiolactona y yoduro de metilo producido por vía humedad, donde reportaron una actividad específica de 0.000012 Ci/ $\mu$ mol [53].

Existen muchas fuentes de contaminación con carbono-12 que pueden disminuir drásticamente el valor de la actividad específica, entre ellas están el material del cuerpo del blanco, las posibles fugas en la líneas de descarga, el abrir y cerrar las líneas al medio ambiente sin purgar, y un mal o escaso acondicionamiento de las trampas. Sin embargo, por el tipo de blanco molecular de la [ $^{11}$ C]-MET, el valor de la actividad específica de este radiofármaco no es tan crucial, al tratarse de transportadores [53].

El producto cumplió con todas las pruebas de control de calidad satisfactoriamente, permitiendo realizar las pruebas preclínicas en los roedores con el modelo tumoral y en los voluntarios sanos.

## Conclusiones.

---

Se logró implementar satisfactoriamente la producción de L-[<sup>11</sup>C-metil]-metionina ([<sup>11</sup>C]-MET), sin precedentes en México, obteniendo un rendimiento promedio corregido por decaimiento del 70 % con respecto a la actividad registrada de yoduro de metilo.

Con las modificaciones realizadas al módulo de síntesis TracerLab FX C Pro, es posible diversificar e incrementar el número de moléculas marcadas con carbono-11, actualmente se pueden sintetizar cuatro diferentes radiofármacos utilizando ese mismo módulo.

El uso de KF sobre alúmina permite obtener mejores rendimientos en la metilación y facilitar la purificación del producto utilizando una simple filtración y dos cartuchos conectados en línea, el uso del cartucho de C18 disminuye el 50 % del contenido de precursor en el producto final y el cartucho de alúmina plus reduce 100 veces la cantidad del ion flúor en el producto.

El producto cumplió satisfactoriamente todas las pruebas de control de calidad obteniendo una pureza radioquímica del isómero L mayor al 99 %. Al cumplir el radiofármaco con las especificaciones del control de calidad se realizaron las pruebas preclínicas en roedores sanos y un modelo tumoral de gliomas C6, observando una captación específica del radiofármaco [<sup>11</sup>C]-MET por el tejido tumoral. Con estos resultados se probó a la [<sup>11</sup>C]-MET en voluntarios sanos, demostrando la seguridad del producto para la administración en pacientes.

## Referencias.

---

- 1) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- 2) <http://www.spps.gob.mx/noticias/1445-5-tipos-cancer-mas-afectan-mexicanos.html>
- 3) [http://www.inegi.org.mx/sistemas/microdatos2/Microdatos\\_archivos/vitales/doc/Descripcion BD Defunciones 2010.pdf](http://www.inegi.org.mx/sistemas/microdatos2/Microdatos_archivos/vitales/doc/Descripcion BD Defunciones 2010.pdf)
- 4) [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=23003&Itemid=270&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=23003&Itemid=270&lang=es)
- 5) [http://www.hospitalgeneral.salud.gob.mx/descargas/pdf/area\\_medica/neuro/1astrocitomas.pdf](http://www.hospitalgeneral.salud.gob.mx/descargas/pdf/area_medica/neuro/1astrocitomas.pdf)
- 6) Karl Herholz, David Coope, et al. Metabolic and molecular imaging in neuro-oncology. *The Lancet Neurology*, (2007) **6** 711-724.
- 7) David L. Nelson and Michael M. Cox. Lehninger Principle of biochemistry, Fifth Edition. page 71-80, 699, 865.
- 8) John McMurry, Química Orgánica (7ª ed.) Ediciones Paraninfo, S.A., 2009, 1016-1020.
- 9) [http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=CSCC\[C%40%40H\]%28C%28%3DO%29O%29N&source=fpv](http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=CSCC[C%40%40H]%28C%28%3DO%29O%29N&source=fpv)
- 10) Crippa F, Alessi ASerafini GL, et al. PET with radiolabeled aminoacid. *The quarterly journal of nuclear medicine and molecular imaging*, (2012) **56** 151-162.
- 11) Paul Cavuoto a, Michael F. Fenech, et al. A review of methionine dependency and the role of methionine restriction in cancer growth control and life-span extension. *Cancer Treatment Reviews* (2012) **38** 726–736.
- 12) Herholz K, Coope D, , et al. Metabolic and molecular imaging in neuro-oncology. *The Lancet Neurology*. (2007) **6** 711-724.
- 13) Masato Kobayashi, Fumiya Hashimoto, et al. Transport mechanism of <sup>11</sup>C-labeled L- and D-methionine in human-derived tumor cells. *Nuclear Medicine and Biology* (2012) **39** 1213–1218.
- 14) A. Macapinlac, John L. Humm, et al. Differential Metabolism and Pharmacokinetics of I-[<sup>11</sup>C]-Methionine and 2-[<sup>18</sup>F] Fluoro-2-deoxy-d-glucose (FDG) in Androgen Independent Prostate Cancer. *Clinical Positron Imaging* (1999) **2** 173–181.
- 15) Comar D, Cartron J, et al. Labelling and metabolism of methionine-methyl-<sup>11</sup> C. *European journal of nuclear medicine* (1976) **1** 11-14.
- 16) Kunihiro Nakada. The role of methionine PET in oncology (2004) **1264** 88–94.
- 17) K. Ishiwata, J. Hatazawa et al. From tumor biology to clinical PET, A review of positron emission tomography (PET) in oncology, *European journal of nuclear medicine* (1989) **15** 665.
- 18) Karl-Johan Lindner, Per Hartvig et al. Analysis of L-[methyl-<sup>11</sup>C]methionine and metabolites in human plasma by an automated solid-phase extraction and a high performance liquid chromatographic procedure. *Journal of Chromatography B*, (1996) **679** 13-19.
- 19) Richard A. Hawkins, Robyn L. O’Kane, et al. Branched-Chain Amino Acids: Metabolism, Physiological Function, and Application Structure of the Blood–Brain Barrier and Its Role in the Transport of Amino Acids. *Journal of Nutrition*. (2006) **136** 218S–226S.
- 20) Luurtsema G, de Lange EC, et al. Transport across the blood-brain barrier: stereoselectivity and PET-tracers. *Molecular imaging and biology* (2004) **6** 306-318.



- 21) Jasper van der Aart, William A. et al. Radiation dose estimates for carbon-11-labelled PET tracers, *Nuclear Medicine and Biology* (2012) **39** 305–314.
- 22) Singhal T, Narayanan TK, et al. <sup>11</sup>C-L-methionine positron emission tomography in the clinical management of cerebral gliomas. *Molecular imaging and biology* (2008) **10**:1-18.
- 23) Gyo Rgy To Th, Zsolt Lengyel, et al. Detection Of Prostate Cancer With <sup>11</sup>C-Methionine Positron Emission Tomography. *The Journal Of Urology* (2005) **173**, 66–69. January 2005
- 24) Akash Sharma, Jonathan McConathy. Overview of PET Tracers for Brain Tumor Imaging. *PET Clinics* (2013) **8** 29-146
- 25) Sirkku Leskinen-Kallio, Paula Lindholm, et al. Imaging of head and neck tumors with positron emission tomography and [<sup>11</sup>C] methionine. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* (1994), **1** (1195-1199)
- 26) Roland Hustinx, Pacôme Fosse. PET in Brain Tumors Review Article. *PET Clinics* (2010) **5** 185-197.
- 27) Aizhi Zhu, David M. Marcus, et al. Application of Metabolic PET Imaging in Radiation Oncology. *Radiation Research* (2012) **177** 436-448.
- 28) S. Goldman PET for diagnosis and therapy of brain tumors. *Médecine Nucléaire* (2011) **35**: 347–351
- 29) Bich-Ngoc-Thanh, Tang et al. Three-dimensional Gaussian model to define brain metastasis limits on <sup>11</sup>C-methionine PET. *Radiotherapy and Oncology* (2009) **89**:270–277.
- 30) Donald M. Cannon Principles and Application of PET in Brain Tumors. *PET Clinics* (2011) **6** 131–148
- 31) Michael F. Goldberg et al. PET and MR Imaging of Brain Tumors. *PET Clinics* (2009) **3** 293–315
- 32) Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos Volumen I, 9ª Edición, Secretaría de Salud, México 2008.
- 33) British Pharmacopeia Volumen III, 2004 London, The Stationery office.
- 34) European Pharmacopeia 6.0, volumen 1, 2008.
- 35) The United States Pharmacopeia Convention, *The United States Pharmacopeia* USP 31 Volume II, The National Formulary NF 27, 2009 Twinbrook Parkway Rockville MD 20852.
- 36) Gerhart Friedlander, Joseph W. Kennedy, Edward S. Macias, Julian Malcolm Miller, *Nuclear and Radiochemistry*, 3ª edition, Wiley-Interscience, United States of America 1981.
- 37) Technical Publications (DIRECTION 2368517-100 Rev1) TRACERlab FXC Operator Guide, GE Medical Systems GE Medical Systems:, Milwaukee, Wisconsin 53201 U.S.A. (Asia, Pacific, Latin America, North America).
- 38) Markus Mitterhauser, Wolfgang Wadsak, et al. New aspects on the preparation of [<sup>11</sup>C]Methionine—a simple and fast online approach without preparative HPLC. *Applied Radiation and Isotopes* (2005) **62**, 441-445.
- 39) Filippo Lodi, Silvia Trespidi, et al. A simple Tracerlab module modification for automated on-column [<sup>11</sup>C]methylation and [<sup>11</sup>C]carboxylation. *Applied Radiation and Isotopes* (2007) **65** 691-695.
- 40) Torsten Kniess, Katrin Rode, Frank Wuest Practical experiences with the synthesis of [<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>I through gas phase iodination reaction using a TRACERlabFXC synthesis module. *Applied Radiation and Isotopes* (2008) **66** 482-488.
- 41) Jeanne M. Link, Kenneth A. Krohn, John C. Clark. Production of [<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>I by single pass reaction of [<sup>11</sup>C]CH<sub>4</sub> with I<sub>2</sub>. *Nuclear Medicine and Biology* (1997) **24** 93-97

- 42) David M. Golden , Robin Walsh, et al. The Thermochemistry of the Gas Phase Equilibrium  $I_2 + CH_4 \leftrightarrow CH_3I + HI$  and the Heat of Formation of the Methyl Radical. *Journal of the American Chemical Society* (1965) **87** 4053–4057.
- 43) Frédéric Schmitz, Alain Plenevaux, et al. Fast routine production of L-[11C-methyl] methionine with Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>KF. *Applied Radiation and Isotopes*, (1995) **46**, 893-897.
- 44) Junko Yamaki, Takashi ANDO. Potassium Fluoride on Inorganic Solid Supports. A Search for Further Efficient Reagents Promoting Hydrogen-Bond-Assisted alkylations. *Chemistry Letters* (1979), 755-758.
- 45) Instruments Hanna. Instruction Manual Fluoride Low Range ISM HI 96729.
- 46) Charles River, The Endosafe®-PTSTM Portable Test System User's Guide, Version 7, United States of America, 2003.
- 47) Carolyn D Beidani, Handbook of nutrition and food, edited by CRC press (2001) page 1055-1059.
- 48) S. K. Jha<sup>1</sup>, R. K. Singh et al. Fluoride in groundwater: toxicological exposure and remedies. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* (2013) 16:52–66,
- 49) [http://noticiasdelaciencia.com/not/7205/el\\_co2\\_atmosferico\\_ya\\_rebasa\\_el\\_umbral\\_de\\_las\\_400\\_partes\\_por\\_millon/](http://noticiasdelaciencia.com/not/7205/el_co2_atmosferico_ya_rebasa_el_umbral_de_las_400_partes_por_millon/)
- 50) Vanessa Gómez, Juan Domingo Gispert, et al. New method for routine production of L-[methyl-<sup>11</sup>C]methionine: *in loop* synthesis. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* (2008).
- 51) Gomzina NA, Kuznetsova OF. [L-[methyl-(<sup>11</sup>C)]-methionine of high enantiomeric purity production via on-line <sup>11</sup>C-methylation of L-homocysteine thiolactone hydrochloride]. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. (2011) **37** 216-22.
- 52) Vanessa Gómez-Vallejo, Jordi Llop. Specific activity of [<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>I synthesized by the “wet” method: Main sources of non-radioactive carbon. *Applied Radiation and Isotopes*, (2000) **67** 111-114
- 53) Ming-Rong Zhang, Kazutoshi Suzuki. Sources of carbon which decrease the specific activity of [<sup>11</sup>C]CH<sub>3</sub>I synthesized by the single pass I<sub>2</sub> method. *Applied Radiation and Isotopes*, (2005) **62** 447-450.

# Anexo1. Consentimiento informado.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIDAD PET CICLOTRON



## INDICACIONES PARA PACIENTES Y FAMILIARES A QUIENES SE LES HA ADMINISTRADO MATERIAL RADIATIVO

Nombre del paciente: EDUARDO MOLINA JIJÓN

Fecha en que fue administrado el material radiactivo 17 JUL 13

Radionúclido: NaI Actividad: 10.7 (mCi).

Rapidez de exposición a 1m de distancia al egresar 1.0 (mR/h).

Se le acaba de administrar material radiactivo, como parte de su estudio para el diagnóstico, el cual fue indicado por su médico especialista Dr.: Miguel Angel Avila

El material radiactivo se elimina por la orina, excremento, sudor y saliva. Para su seguridad y la de las personas que conviven con Usted se le sugiere haga lo siguiente por lo menos **DURANTE LA(S) SIGUIENTE(S)** 4 HORA(S):

Hora de inyección 12:40 hrs.

- a) Manténgase a distancias mayores a un metro y durante el menor tiempo posible cerca de lactantes, niños y mujeres embarazadas.
- b) De ser posible duerma solo (a) en una cama, aunque en la recámara duerman otras personas.
- c) De ser posible, evitar relaciones sexuales durante el período indicado.
- d) Después de ir al baño, jale el agua del sanitario por lo menos 3 veces.
- e) Tome sus medicinas como le indique su médico y asista a su cita.
- f) Tome suficientes líquidos durante el período indicado.
- g) A los pacientes que se ha administrado Diazepam No deben conducir (Las siguientes 4-6 hrs.)
- h) Evitar lactancia 12 horas posteriores al estudio.
- i) Cualquier otra molestia acuda a su médico tratante.

**LOS RESULTADOS SE ENTREGARAN DESPUES DE 2 A 3 DIAS HABILES,  
A MENOS QUE SURJA ALGUN CONTRATIEMPO AJENO A LA UNIDAD  
HORARIO DE ENTREGA DE 09:00 A 19:00 HRS.  
PREVIA CONFIRMACION TELEFONICA.**

  
FIRMA DE ENTERADO DEL PACIENTE O FAMILIAR

Planta Baja del Nuevo Edificio de Investigación  
Facultad de Medicina-UNAM, Ciudad Universitaria, México, D. F. C.P. 04510  
Tel.: 5623 2299, 5623 2287 5616 3666, 5616 4561, 5616 7369 / Fax 5623-2115



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIDAD PET CICLOTRON



HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

PARA LA APLICACIÓN DE MATERIAL RADIATIVO (PET) Y (MEDIOS DE CONTRASTE)

En los estudios que fueron solicitados por su MEDICO TRATANTE se requiere la administración de sustancias para identificar lo normal de lo patológico. Como cualquier otro medicamento estos no están exentos de provocar reacciones adversas, las cuales pueden ser leves y transitorias (ronchas, prurito, dolor de cabeza, vomito y diarrea). Pero en algunas ocasiones pueden llegar a poner en riesgo la vida. Por tal motivo, solicitamos a usted su autorización para utilizarlas, o no.

Estoy informado (a) que la técnica tiene alta sensibilidad; sin embargo se pueden obtener resultados falsos positivos o negativos y que además este procedimiento no puede detectar enfermedad microscópica, tal y como se reporta en la literatura médica.

Para conocer ciertos factores de riesgo individuales informo lo siguiente:

ANTECEDENTES DE REACCIONES ALERGICAS A MEDICAMENTOS:

SI ( ) NO (X) ESPECIFIQUE A CUAL \_\_\_\_\_

REACCIONES ALERGICAS A MEDIOS DE CONTRASTE

SI ( ) NO (X) ESPECIFIQUE A CUAL \_\_\_\_\_

ENFERMEDADES TALES COMO HIPERTENSION ARTERIAL, DIABETES,

ENFERMEDADES RENALES, ETC. ESPECIFIQUE NO \_\_\_\_\_

ESTUDIOS PREVIOS DE IMAGEN: \_\_\_\_\_

MOTIVO DEL ESTUDIO ACTUAL: PROTOCOLO \_\_\_\_\_

TIPO DE ESTUDIO A REALIZAR: PET/CT WBS METIONINA \_\_\_\_\_

ENTERADO DE LO YA SEÑALADO ACEPTO SE ME ADMINISTRE EL (LOS) MEDIOS DE CONTRASTE Y RADIOFARMACOS PARA LA REALIZACION DEL O LOS ESTUDIOS QUE FUERON PRESCRITOS POR MI MEDICO TRATANTE.

NOMBRE Y FIRMA DEL PACIENTE.

Edmundo Molina Jirón [Signature]

NOMBRE Y FIRMA DEL FAMILIAR QUE LO ACOMPAÑA Y/O PERSONA RESPONSABLE.

[Signature]

Planta Baja del Nuevo Edificio de Investigación
Facultad de Medicina-UNAM, Ciudad Universitaria, México, D. F. C.P. 04510
Tel.:5623 2299, 5623 2287 5616 3666, 5616 4561, 5616 7369 / Fax 5623-2115



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



UNIDAD PET CICLOTRON

INDICACIONES PARA PACIENTES Y FAMILIARES  
A QUIENES SE LES HA ADMINISTRADO MATERIAL RADIACTIVO

Nombre del paciente: RAFAEL DIAZ HERNANDEZ

Fecha en que fue administrado el material radiactivo 17/JUL/13

Radionúclido: MET Actividad: 115 (mCi).

Rapidez de exposición a 1m de distancia al egresar 1.0 (mR/h).

Se le acaba de administrar material radiactivo, como parte de su estudio para el diagnóstico, el cual fue indicado por su médico especialista Dr.: Myael Angel Avila.

El material radiactivo se elimina por la orina, excremento, sudor y saliva. Para su seguridad y la de las personas que conviven con Usted se le sugiere haga lo siguiente por lo menos **DURANTE LA(S) SIGUIENTE(S)** 4 HORA(S):

Hora de inyección 13:13 hrs.

- Manténgase a distancias mayores a un metro y durante el menor tiempo posible cerca de lactantes, niños y mujeres embarazadas.
- De ser posible duerma solo (a) en una cama, aunque en la recámara duerman otras personas.
- De ser posible, evitar relaciones sexuales durante el período indicado.
- Después de ir al baño, jale el agua del sanitario por lo menos 3 veces.
- Tome sus medicinas como le indique su médico y asista a su cita.
- Tome suficientes líquidos durante el período indicado.
- A los pacientes que se ha administrado Diazepam No deben conducir (Las siguientes 4-6 hrs.)
- Evitar lactancia 12 horas posteriores al estudio.
- Cualquier otra molestia acuda a su médico tratante.

**LOS RESULTADOS SE ENTREGARAN DESPUES DE 2 A 3 DIAS HABILES,  
A MENOS QUE SURJA ALGUN CONTRATIEMPO AJENO A LA UNIDAD  
HORARIO DE ENTREGA DE 09:00 A 19:00 HRS.  
PREVIA CONFIRMACION TELEFONICA.**

  
FIRMA DE ENTERADO DEL PACIENTE O FAMILIAR

Planta Baja del Nuevo Edificio de Investigación  
Facultad de Medicina-UNAM, Ciudad Universitaria, México, D. F. C.P. 04510  
Tel.:5623 2299, 5623 2287 5616 3666, 5616 4561, 5616 7369 / Fax 5623-2115



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIDAD PET CICLOTRON



HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

PARA LA APLICACIÓN DE MATERIAL RADIACTIVO (PET) Y (MEDIOS DE CONTRASTE)

En los estudios que fueron solicitados por su MEDICO TRATANTE se requiere la administración de sustancias para identificar lo normal de lo patológico. Como cualquier otro medicamento estos no están exentos de provocar reacciones adversas, las cuales pueden ser leves y transitorias (ronchas, prurito, dolor de cabeza, vomito y diarrea). Pero en algunas ocasiones pueden llegar a poner en riesgo la vida. Por tal motivo, solicitamos a usted su autorización para utilizarlas, o no.

Estoy informado (a) que la técnica tiene alta sensibilidad; sin embargo se pueden obtener resultados falsos positivos o negativos y que además este procedimiento no puede detectar enfermedad microscópica, tal y como se reporta en la literatura médica.

Para conocer ciertos factores de riesgo individuales informo lo siguiente:

ANTECEDENTES DE REACCIONES ALERGICAS A MEDICAMENTOS:

SI ( ) NO (X) ESPECIFIQUE A CUAL \_\_\_\_\_

REACCIONES ALERGICAS A MEDIOS DE CONTRASTE

SI ( ) NO (X) ESPECIFIQUE A CUAL \_\_\_\_\_

ENFERMEDADES TALES COMO HIPERTENSION ARTERIAL, DIABETES, ENFERMEDADES RENALES, ETC. ESPECIFIQUE NO \_\_\_\_\_

ESTUDIOS PREVIOS DE IMAGEN: \_\_\_\_\_

MOTIVO DEL ESTUDIO ACTUAL: PROTOCOLO \_\_\_\_\_

TIPO DE ESTUDIO A REALIZAR: PET/CT WBS METIONINA \_\_\_\_\_

ENTERADO DE LO YA SEÑALADO ACEPTO SE ME ADMINISTRE EL (LOS) MEDIOS DE CONTRASTE Y RADIOFARMACOS PARA LA REALIZACION DEL O LOS ESTUDIOS QUE FUERON PRESCRITOS POR MI MEDICO TRATANTE.

NOMBRE Y FIRMA DEL PACIENTE.

- Rafael Díaz Hernández [Firma] \_\_\_\_\_

NOMBRE Y FIRMA DEL FAMILIAR QUE LO ACOMPAÑA Y/O PERSONA RESPONSABLE.

9607/11

Planta Baja del Nuevo Edificio de Investigación
Facultad de Medicina-UNAM, Ciudad Universitaria, México, D. F. C.P. 04510
Tel.:5623 2299, 5623 2287 5616 3666, 5616 4561, 5616 7369 / Fax 5623-2115