

**PRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE
MOLÉCULAS MARCADAS COM FLÚOR-18 PARA
DIAGNÓSTICO DE CÂNCER DE MAMA E
PRÓSTATA**

Coordenadora: Dra Regina Célia Gorni Carneiro

Centro de Radiofarmácia, IPEN

2017

Resumo

Na última década, o diagnóstico não invasivo e a medição de processos celulares e moleculares em pacientes com câncer por imagem PET associado à Tomografia Computadorizada (PET/CT) tem permitido uma melhora considerável na terapia contra o câncer. Portanto, cada vez mais estudos para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico específicos mais rápidos e eficientes são prioritários para o país.

Recentemente, o Centro de Radiofarmácia do IPEN iniciou a produção de ^{18}F -Colina e ^{18}F -FLT, dois radiofármacos amplamente utilizados no exterior para o diagnóstico de câncer da próstata e mama. Dessa forma e com o objetivo de implementar o uso destes no Brasil, nosso primeiro grande objetivo é realizar os testes pré-clínicos para o registro desses radiofármacos de acordo com a legislação brasileira vigente.

Além disso, é do nosso interesse desenvolver radiofármacos que reconheçam receptores que se encontram super-expressos em câncer. Neste contexto, a melatonina tem surgido como uma possível molécula a ser investigada como radiofármaco para o diagnóstico de câncer da mama. De fato, a melatonina demonstrou uma ação antitumoral *in vitro* e demonstrou uma ligação específica em células tumorais de mama que expressam o receptor de estrógeno. Dessa forma, e com a finalidade de desenvolver radiofármacos inéditos no Brasil e no mundo, nosso segundo objetivo se centra na síntese e caracterização da ^{18}F -fluoroetil melatonina como ferramenta para o diagnóstico de câncer de mama por imagem PET.

Este projeto visa, portanto potencializar e implementar, no Brasil, o uso de radiofármacos já existentes na medicina nuclear. Além disso, pretendemos desenvolver a produção de ^{18}F -fluoroetil melatonina para diagnóstico do câncer da mama.

Índice

Resumo.....	2
1. Introdução.....	4
2. Objetivos.....	6
3. Metodologia.....	7
3.1. Síntese do 18F-fluoroetil melatonina e seu composto padrão	7
3.3. Caracterização físico-química do fluoroetil melatonina	8
3.3 Controle de qualidade da ¹⁸ F-fluoroetil melatonina.....	8
3.4. Cultura de células	8
3.5. Estudo de captação celular específica da ¹⁸ F-fluoroetil melatonina	9
3.6. Experimentos de retenção celular e internalização	9
3.9. Estudos de biodistribuição por método não invasivo (μPET/SPECT/CT).....	10
4. Cronograma físico.....	11
5. Orçamento detalhado.....	12
6. Participantes do projeto	14
7. Infraestrutura e apoio técnico, estimativa de recursos técnicos de outras fontes	14
8. Anuência do responsável pela unidade	15
9. Referências bibliográficas	16

1. Introdução

O diagnóstico não invasivo e a medição de processos celulares e moleculares em pacientes com câncer por imagem PET associado à Tomografia Computadorizada (PET/CT) tem permitido uma melhora considerável na terapia contra o câncer. Uma das maiores vantagens da imageologia pela tecnologia PET (tomografia por emissão de pósitrons) é que os radionuclídeos para PET (^{11}C , ^{13}N , ^{18}F , ^{64}Cu) podem ser rapidamente produzidos por ciclotrons ou por geradores como por ex $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ e incorporados em moléculas de interesse biológico (Ghosh, 1991). A facilidade na instalação de ciclotrons e o gerenciamento de rejeitos radioativo quando comparado às instalações de reatores nucleares permite que essa tecnologia possa ser utilizada em qualquer país.

Quando essa tecnologia foi descoberta no final da década de 1960 ficou confinada aos laboratórios de pesquisas, mas já na década de 1990 a tecnologia PET começou a ser utilizada para estudos em neurologia, cardiologia e oncologia em hospitais e clínicas de vários países devido a uma facilidade de marcação de moléculas com radioisótopos, alta resolução e acurácia e, sua habilidade em monitorar o comportamento e circulação de radiofármacos no organismo. (Welch, 1991; Wagner Jr, 1998)

Na década de 1990 muitos países já produziam radiofármacos marcados com flúor-18 como ^{18}F -NaF, ^{18}F -FDG, ^{18}F -DOPA e com o passar dos anos mais moléculas marcadas com flúor-18 foram sendo produzidas, muitas delas para a área de diagnóstico em oncologia (Welch, 1991).

Hoje em dia, mais de 90% das pesquisas clínicas na detecção de neoplasias malignas utilizam o [^{18}F]-fluorodeoxiglicose ([^{18}F]FDG). No entanto, este radiofármaco tem-se demonstrado pouco específico no diagnóstico de alguns tumores, possuindo alta captação em locais inflamatórios e órgãos saudáveis levando por vezes ao aparecimento de resultados falsos-positivos (Lee et al, 2009). Dessa forma, o interesse por agentes de imagem alternativos com capacidade de ligação específica, a receptores, antígenos e enzimas têm ganhado cada vez mais interesse na comunidade científica.

O Centro de Radiofarmácia do IPEN começou a produzir ^{18}F -FDG e ^{18}F -NaF em 1997 e 2009 respectivamente e desde então nenhuma molécula marcada com Flúor-18 foi produzida. Entre a descoberta da importância da utilização do ^{18}F -FDG e os dias atuais muitas moléculas marcadas com Flúor-18 foram estudadas pelos grandes centros no mundo inteiro sendo de grande importância os radiofármacos utilizados para diagnóstico de câncer de próstata e mama. É importante ressaltar que esses cânceres estão entre os que mais atingem a população de homens e mulheres (Jemal, 2017). Entre os radiofármacos

para diagnóstico de câncer de próstata e mama temos ^{18}F -colina e ^{18}F -FLT respectivamente (Kenny, 2016; Arboniés, 2017).

Em 2017 lotes pilotos para produção de ^{18}F -Colina e ^{18}F -FLT, no Centro de Radiofarmácia, começaram a ser produzidos. No entanto, vários testes ainda precisam ser realizados para que o Centro de Radiofarmácia possa pedir o registro desses radiofármacos e comercializá-los. Além disso, estudos com moléculas marcadas com flúor-18 que tivessem como característica ligação com receptores traria a possibilidade de produção de radiofármacos teranósticos. Uma das moléculas de interesse no centro de radiofarmácia do IPEN é a melatonina.

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) foi isolada e identificada pela primeira vez em 1958 (Lerner AB et al,1958). É o principal neurohormônio secretado durante o período noturno com ausência completa de luz pelos pinealócitos da glândula pineal (Epstein, 1997). Estudos recentes demonstram que a melatonina se liga a receptores (MT1) que estão superexpressos em câncer de mama ER+ (Jablonska et al, 2013). Além do mais, foi demonstrado que a melatonina é capaz de inibir a proliferação das células MCF-7 via ligação com os receptores MT1 (tipo 1 para melatonina) (Blask, 1986). Estes dados demonstram o potencial da melatonina para ser utilizada no diagnóstico e tratamento de câncer da mama.

Tendo em conta a demanda por novos radiofármacos para o diagnóstico de câncer da mama, a melatonina tem surgido como uma possível molécula a ser investigada para seu uso em medicina nuclear. Atualmente não existe uma molécula de melatonina marcada com um radionuclídeo para esta finalidade e dessa forma é do nosso interesse o desenvolvimento deste novo radiofármaco marcado com ^{18}F para diagnóstico de câncer da mama utilizando a tecnologia de imagem PET. No entanto, a aprovação de um radiofármaco na clínica depende de uma série de estudos pré-clínicos para que se estabeleça o seu mecanismo de ação e os possíveis efeitos que sua administração pode causar ao paciente. Estes estudos são obrigatórios e devem encontrar-se de acordo com a legislação brasileira vigente para a posterior realização de estudos clínicos. Além de ensaios físico-químicos para caracterizar o novo radiofármaco, estes estudos exigem a avaliação do comportamento biológico (*in vivo*) e possíveis efeitos toxicológicos provenientes do uso do radiofármaco.

2. Objetivos

Nosso objetivo principal é desenvolver de forma inédita no Brasil e no mundo, a síntese e caracterização da melatonina radiomarcada com ^{18}F a fim de servir como radiofármaco para o diagnóstico de câncer da mama. Além do mais, pretendemos realizar os estudos pré-clínicos e toxicológicos *in vivo* para os radiofármacos ^{18}F -Colina e ^{18}F -FLT. Esses radiofármacos já são consagrados na medicina nuclear, no entanto estes testes são necessários para o registro e comercialização dos mesmos, além de capacitar pessoal para o aprendizado dessas técnicas. Dessa forma nossos objetivos específicos são:

1. Síntese e caracterização da ^{18}F -fluoroetil melatonina
 - 1.1. Síntese do precursor e padrões da ^{18}F -fluoroetil melatonina
 - 1.2. Caracterização dos intermediários sintéticos e composto final da ^{18}F -fluoroetil melatonina
 - 1.3. Controle de qualidade do processo de obtenção da ^{18}F -fluoroetil melatonina

2. Avaliação *in vitro* da ligação de ^{18}F -fluoroetil melatonina com as células tumorais de mama MCF7
 - 2.1. Estudo de captação celular específica
 - 2.2. Estudo de retenção celular e internalização

3. Avaliação *ex-vivo* da ligação da ^{18}F -fluoroetil melatonina, ^{18}F -Colina e ^{18}F -FLT a tumores de mama ou próstata
 - 3.1. Estabelecimento de tumores derivados das células MCF7 ou PC3 em camundongos Balb/c nude
 - 3.3. Estudos da biodistribuição e farmacocinética

4. Estudos *in vivo* com a ^{18}F -fluoroetil melatonina, ^{18}F -Colina e ^{18}F -FLT
 - 4.1. Estudos por imagem PET/CT da ligação da ^{18}F -fluoroetil melatonina, ^{18}F -Colina e ^{18}F -FLT em modelos tumorais de mama (MCF7) e próstata (PC3)
 - 4.2. Comparação do valor de diagnóstico por imagem PET/CT da ^{18}F -fluoroetil melatonina, ^{18}F -Colina e ^{18}F -FLT com o ^{18}F -FDG (radiofármaco comumente utilizado na clínica) em modelos tumorais de mama e próstata.

3. Metodologia

3.1. Síntese do ¹⁸F-fluoroetil melatonina e seu composto padrão

Processo de síntese do ¹⁸F-Fluoretil tosionato: A amostra do flúor 18 em água enriquecida passará por uma coluna QMA e a seguir, o ¹⁸F será eluído com a mistura K₂CO₃/ Kryptofix 2.2.2 (2,2 mg de K₂CO₃ em 200 µL de água MilliQ / 10,94 mg de Kryptofix 2.2.2 em 800 µL de acetonitrila) em um vial cônico. Após secar o ¹⁸F por destilação azeotrópica repetida (3x) com acetonitrila (1 mL) e com gás nitrogênio, o precursor etilenoglicol 1, 2 - ditosilado (8 mg em 1 mL de acetonitrila) será acrescentado ao vial. A reação ocorrerá a 100 °C por 10 min com o vial fechado sem emprego do gás nitrogênio. A seguir, a mistura reacional será injetada no HPLC semi-preparativo para purificação do composto 1 (coluna ZORBAX ODS 9,2 mm ID x 250 mm (5 µm), 0.1 % TFA/ acetonitrila, 50:50 %, 4 mL/min por 20 min; tempo de retenção (TR) 9 min). A fração coletada de 1 será diluída em água MilliQ até um volume total de 30 mL, e passada por uma coluna C18 a qual foi aquecida a 50 °C por 10 min e conectada ao gás nitrogênio. O ¹⁸F-Fluoroetil tosionato será eluído com 1 mL de DMF aquecido previamente a 50°C. A obtenção do composto será confirmada após analisar pelo HPLC e comparar com o tempo de retenção do composto padrão nas mesmas condições de análise: coluna ZORBAX Eclipse Plus C18 Analytical 4,6 x 250 mm (5 µm), 0.1 % TFA/ acetonitrila, 55:45 %, 1 mL/min por 20 min.

Obtenção do ¹⁸F-fluoroetil melatonina: O procedimento será baseado na referência de Elsinga (2002). O ¹⁸F-Fluoroetil tosionato será acrescentado gota a gota ao vial cônico contendo a melatonina (5 mg) e hidreto de sódio (5 eq.) em DMF anidro (30 µL). Deixa-se reagir por 10-30 min a 85 °C em agitação e atmosfera de nitrogênio. O avanço da marcação será monitorado pelo HPLC com as condições: coluna ZORBAX Eclipse Plus C18 Analytical 4,6 x 250 mm (5 µm), 0.1 % TFA/ acetonitrila, 0-100 % de acetonitrila em 30 min, 1 mL/min. Vai ser purificado por HPLC semi-preparativo.

Síntese do composto padrão fluoroetil melatonina: O composto padrão Fluoroetil melatonina será obtido através da reação da melatonina com o Fluoroetil tosionato - (proporção de 1:1 molar). O produto será isolado por cromatografia em coluna de sílica e caracterizado por ¹H – RMN.

3.3. Caracterização físico-química do fluoroetil melatonina

O produto isolado por cromatografia em coluna de sílica será analisado por TLC, HPLC, Espectrometria de Massas, e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono, Hidrogênio e flúor ($^{13}\text{C}/^1\text{H}/^{19}\text{F}$ – RMN).

Espera-se encontrar o grupo Fluoroetil ligado na posição 2 da melatonina conforme visto na marcação da melatonina com outros halogênios como o bromo (Durati et al, 1992) e o iodo (Hing-Sing, 1992).

3.3 Controle de qualidade da ^{18}F -fluoroetil melatonina

Identidade radioquímica: A medição da meia-vida será realizada através da medição em calibrador de dose em dois ou mais intervalos de tempo. A meia-vida é então calculada aplicando-se os dados à equação de decaimento da radioatividade. O intervalo de tempo entre cada medição deve ser suficientemente longo para permitir um decaimento significativo da radioatividade. Ao mesmo tempo, os resultados deste método também pode sugerir a identidade radionuclídica.

Pureza radioquímica: A pureza radioquímica será confirmada por HPLC e TLC. Este parâmetro determina o nível de radioatividade (%) incorporada pelo traçador. Para calcular a pureza radioquímica (%), a radioatividade obtida para o produto purificado (^{18}F -Fluoretil melatonina) será dividida pela radioatividade total injetada em HPLC, e multiplicada por 100.

Atividade específica: A atividade específica será determinada por HPLC por injeção de uma alíquota do produto em comparação a área do pico de absorbância de UV para uma quantidade conhecida do produto padrão. A atividade específica é tipicamente apresentada em unidades de atividade por mole, a quantidade de padrão deve ser convertida em moles, calculados dividindo-se a massa (em g) pelo peso molecular (MW, em g / mol).

pH: O valor de pH de um injetável deve ser o mais próximo do pH fisiológico possível e ajustado com solução de bicarbonato de sódio, se necessário usando um medidor de pH eletrônicos.

3.4. Cultura de células

As células de câncer de mama MCF7 (ATCC: HTB22 – positivas para ER) e as células de câncer da próstata PC3 (ATCC: CRL-1435) serão mantidas em meio DMEM ou RPMI (Invitrogen), respectivamente. Todas as linhagens serão suplementadas com 10% de

soro fetal bovino (GIBCO) e gentamicina (50 µg/mL) (GIBCO). As células serão mantidas a 37°C com 5% CO₂.

3.5. Estudo de captação celular específica da ¹⁸F-fluoroetil melatonina

Brevemente, 2x10⁵ células serão plaqueadas em placas de 6 poços um dia antes do ensaio. Para determinar a captação específica celular, um grupo de células será bloqueada 30 min antes do ensaio com a fluoroetil melatonina não radioativos (um excesso de 200 vezes) e posteriormente incubadas com 3,7 KBq de ¹⁸F-fluoroetil melatonina a 37°C durante 1 hora. Em seguida, as células serão lavadas com PBS a fim de remover a ¹⁸F-fluoroetil melatonina não ligada e lisadas com 0.5 mL de 0.1M de NaOH. As células recolhidas serão medidas num contador-γ.

3.6. Experimentos de retenção celular e internalização

Para avaliar a internalização celular, 2x10⁵ células serão plaqueadas em placas de 6 poços um dia antes do ensaio. De seguida, as células serão incubadas com a ¹⁸F-fluoroetil melatonina a 4°C. Ao final de 1 hora, o meio será removido e as células serão lavadas com meio de cultura sem soro gelado. 1mL de meio de cultura completo será adicionado a cada poço e as células serão posteriormente incubadas a 37°C em estufa com 5% CO₂. Ao fim de 0, 30 min, 1, 2 e 24 horas, um grupo de células será removido da estufa, o meio será colectado e as células serão lavadas com meio de cultura sem soro gelado. Para remover a radioatividade ligada à membrana celular, as células serão incubadas com 1 mL de tampão ureia-citrato (8M urea, 0.1M sodium citrate, 3mM EDTA, pH 8.0), por 5 min no gelo e esta solução será colectada. As células serão novamente lavadas com 1mL de PBS gelado e lisadas com 0.5 mL de 0.1M de NaOH. As frações ligadas à membrana e internalizadas serão medidas num contador-γ.

3.7. Estabelecimento de modelo tumoral *in vivo*

Os camundongos Balb/c nude serão criados no biotério do IPEN e todos os experimentos serão realizados de acordo com as diretrizes relevantes e com o comitê de ética animal local aprovado. Quando os animais atingirem entre 6 a 8 semanas, as células MCF7 ou PC3 serão inoculadas subcutâneamente na presença de 20% de Matrigel. Cada grupo consistirá de 5 animais. Quando os tumores atingirem aproximadamente 0,8 cm³, os ensaios de biodistribuição ou imageamento serão realizados.

3.8 Estudos de biodistribuição

Para os ensaios de biodistribuição, 1-2 MBq de ¹⁸F-fluoroetil melatonina, ¹⁸F-Colina e ¹⁸F-FLT será injetado na veia caudal de camundongos Balb/c nude saudáveis ou

previamente inoculado com as células MCF7 ou PC3. Ao final de 1, 4, 6, 8 e 24 horas os animais serão sacrificados e os órgãos de interesse incluindo o tumor serão excisados. A radioatividade de cada órgão de interesse será medida em um contador- γ e a %ID/g será calculada.

3.9. Estudos de biodistribuição por método não invasivo (μ PET/SPECT/CT)

Para o ensaio no microPET, 10-25 MBq de ^{18}F -fluoroetil melatonina, ^{18}F -Colina e ^{18}F -FLT será injetado na veia caudal de animais Balb/c nude saudáveis ou previamente inoculado com células MCF7 ou PC3 e analisados ao final de 1 hora. Os animais serão anestesiados com isoflurano por inalação (concentração inicial 0.5%- anestesia geral 1 a 1.87%), colocados na câmara de escaneamento e analisados no microPET/SPECT/CT (microPET focus 220 siemens) no centro de radiofarmácia do IPEN. Os ROI's e as atividades nos órgãos (%DR) serão obtidos utilizando-se o software PMOD (PMOD Technologies, Zurich).

4. Cronograma físico

	1º tri	2º tri	3º tri	4º tri	5º tri	6º tri	7º tri	8º tri
Produção do radiofármaco ^{18}F-fluoroetil melatonina								
Aquisição de insumos	X							
Marcação e Controle de qualidade	X	X						
Estudos biológicos <i>in vitro</i> com ^{18}F-fluoroetil melatonina								
Aquisição de insumos	X							
Testes <i>in vitro</i>		X	X					
Análise de dados			X					
Estudos <i>ex-vivo</i> com ^{18}F-fluoroetil melatonina, ^{18}F-Colina e ^{18}F-FLT								
Aquisição de insumos	X							
Estabelecimento dos modelos tumorais			X	X	X	X	X	
Ensaio de biodistribuição				X	X			
Estudos <i>in vivo</i> com a ^{18}F-fluoroetil melatonina, ^{18}F-Colina e ^{18}F-FLT								
Aquisição de imagens PET/CT				X	X	X	X	
Comparação com ^{18}F FDG					X	X	X	
Análise de dados					X	X	X	X
Publicações								X

5. Orçamento detalhado

Reagentes	Quantidade	Valor(R\$)
<i>Testes para radiossíntese de 18F-melatonina</i>		
Melatonina 1G	2	1140,00
Coluna semi-preparativa ZORBAX ODS 9,2 mm ID x 250 mm (5 µm)	1	6 000,00
coluna ZORBAX Eclipse Plus C18 Analytical 4,6 x 250 mm (5 µm),	1	6 000,00
Acetonitrila 4L	20	4 000,00
SOLUÇÃO TAMPÃO PRONTA PARA O USO - INCOLOR pH 7	1	300,00
SOLUÇÃO TAMPÃO PRONTA PARA O USO - INCOLOR pH 4	1	300,00
Potassium carbonate	1	270,00
Trifluoroacetic acid CHROMASOLV®, for HPLC, ≥99.0%	1	900,00
Kryptofix 2.2.2	1	550,00
DMF	1	500,00
hidreto de sódio	1	400,00
<i>Validação biológica in vitro</i>		
DMEM High glucose	4	850,00
RPMI	4	1 000,00
Soro fetal bovino	8	3 000,00
Tripsina	5	1 500,00
Antibiótico e antimicótico	5	600,00
Garrafa T175	300	2 000,00
Garrafa T75	300	1 380,00
Placa de 6 poços	120	1 200,00
Ponteira de 1mL sem filtro	10000	800,00
Ponteira de 200µL sem filtro	10000	500,00
Ponteira de 10µL sem filtro	10000	500,00
Ponteira de 1mL com filtro	4800	2 500,00
Ponteira de 200µL com filtro	4800	2 400,00
Ponteira de 10µL com filtro	4800	2 400,00
Pipeta serológica estéril 5mL	500	1 000,00
Pipeta serológica estéril 10mL	500	1 200,00
Pipeta serológica estéril 25mL	500	1 360,00
Microtubo de 1,5mL	5000	800,00
Tubos de criogenia	1000	1 150,00
Falcon de 15mL	1000	700,00

Falcon de 50mL	500	720,00
DMSO	1	600,00
Phosphate buffered saline	2	1 200,00
HEPES	1	2 200,00
Bicarbonato de sódio	1	200,00
Sistema de filtração a vácuo 0,22µm pacote com 12 unidades	4	2 000,00
<i>Validação biológica ex vivo e in vivo</i>		
Matrigel	2	5 000,00
Isoflurano; anestésicos	50	5 000,00
Contensor de camundongos	1	300,00
TOTAL		64.440,00

6. Participantes do projeto

1. Regina Célia Gorni Carneiro (coordenadora) – Pesquisadora do Centro de Radiofarmácia;
2. Emerson Bernardes, Dr – Pesquisador colaborador do Centro de Radiofarmácia;
3. Sofia Santos, Dr – Pesquisadora pós-doc do Centro de Radiofarmácia;
4. Arian Nario – Aluno de doutorado do Centro de Radiofarmácia;
5. Martha Pijeira – Aluna de doutorado do Centro de Radiofarmácia;
6. Marcelo Taad - Aluno de mestrado do Centro de Radiofarmácia;
7. Alunos de Iniciação Científica

7. Infraestrutura e apoio técnico, estimativa de recursos técnicos de outras fontes

O projeto conta com a infra-estrutura fornecida pelo Centro de Radiofarmácia: Laboratório de Pesquisa para marcação e realização de testes, Laboratório de Controle de Qualidade e Laboratório de Imagens pré-clínicas (LABIM – IPEN/USP).

Espera-se contar com 1 aluno de iniciação científica, 1 mestrado e 2 doutorandos com tempo parcial e 1 pesquisadora pos-doc.

8. Anuência do responsável pela unidade

Jair Mengatti

9. Referências bibliográficas

- Arboniés JC, Alfonso BR, Rasilía, JM, Ballesteros CM, Paz IZ, Soriano AP, Rodriguez JC, Casanovas MM. La PET/TC com 18F-Coína em la estadificación y recidiva bioquímica de pacientes com câncer de próstata: câmbios em la clasificación y planificación de radioterapia. Ver *esP Med Nucle Imagem Mol* in press 2017
- Blask DE, Hill SM. Effects of melatonin on cancer: studies on MCF-7 human breast cancer cells in culture. *J Neural Transm Suppl.*;21:433-49. 1986
- Duranti, E., Stankov, B., et al. 2-bromomelatonin: synthesis and characterization of a potent melatonin agonist. *Life Science*, Vol. 51, pp479-485, 1992
- Elsinga, PH., Synthesis and evaluation of [¹⁸F] fluoroethyl SA4503 as a PET ligand for the sigma receptor. *Synapse*, 43(4):259–67. 2002.
- Epstein, Franklin. Melatonin on Humans. *The New England Journal of Medicine*. Vol. 336, N. 3, p. 186-95, 1997.
- Ghosh PR. The international state of PET. *J Nucl Med*. Apr;32(4):28N, 32N-33N, 51N. 1991
- Hing-Sing, Yu. Melatonin: Biosynthesis, Physiological Effects and Clinical Applications. CRC PRESS, 1992
- Jablonska k, Pula B Zemla A et al. Expression of Melatonin receptor MT1 in cells of human invasive ductal breast carcinoma. *J. Pineal Res*; 54:334-345 2013
- Jemal A, Ward EM, Johnson CJ, Cronin KA, Ma J, Ryerson B, Mariotto A, Lake AJ, Wilson R, Sherman RL, Anderson RN, Henley SJ, Kohler BA, Penberthy L, Feuer EJ¹, Weir HK Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2014, Featuring Survival. *J Natl Cancer Inst*. Sep 1;109(9). 2017
- Kenny L. The Use of Novel PET Tracers to Image Breast Cancer Biologic Processes Such as Proliferation, DNA Damage and Repair, and Angiogenesis. *J Nucl Med*. Feb;57 Suppl 1:89S-95S. 2016
- Kinker, Gabriela, M., Sueli, et al, Melatonergic system-based two-gene index is prognostic in human gliomas. *J. Pineal Res.*;60:84-94 2016
- Lee TS, Ahn SH, Moon BS, Chun KS, Kang JH, Cheon GJ, Choi CW, Lim SM. Comparison of 18F-FDG, 18F-FET and 18F-FLT for differentiation between tumor and inflammation in rats. *Nucl Med Biol*. Aug;36(6):681-6. 2009
- Lerner, AB, Case JD, Takahashi, Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc*. 80: 2587-2589 1958.
- Wagner HN Jr. A brief history of positron emission tomography (PET). *Semin Nucl Med*. Jul;28(3):213-20. 1998
- Welch MJ. Research in the development of PET radiopharmaceuticals. *J Nucl Med*. Apr;32(4):44N, 54N. 1991