

AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA DO RADIOFÁRMACO ETILENODICISTEÍNA DIETIL ÉSTER-^{99m}Tc (ECD-^{99m}Tc)

Elaine Bortoleti de Araújo*, Olga G. de Carvalho*, Emiko Muramoto*, Maria A.T.M. de Almeida*, Carlos H. de Mesquita*

*Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP)
Caixa Postal 11049, São Paulo, Brasil

RESUMO

O composto Etilenodicisteína dietil éster (ECD) marcado com ^{99m}Tc vem sendo utilizado como novo radiofármaco para estudos de perfusão cerebral. Neste trabalho elaboramos um modelo compartimentalizado de distribuição farmacocinética para o complexo, utilizando resultados de estudos de distribuição biológica realizados em camundongos. O modelo formado de 7 compartimentos, foi ajustado pelo programa ANACOMP, definindo-se as funções exponenciais representativas do modelo e as constantes (k) de velocidade de transferência entre os compartimentos, além das constantes de eliminação do complexo. Amostras de urina, plasma e bile dos animais foram avaliadas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência para identificação de espécies metabolizadas do composto administrado.

INTRODUÇÃO

O composto Etilenodicisteína dietil éster (ECD) forma com ^{99m}Tc um complexo estável, neutro e lipofílico, que vem sendo utilizado em estudos de perfusão cerebral regional [1,2].

Estudos realizados indicam a promissora utilização do complexo ECD-^{99m}Tc na avaliação de inúmeras desordens cerebrais [3,4,5]. A excelente estabilidade do complexo (maior que 6 horas), oferece uma vantagem potencial para uso rotineiro [1,4].

Comparativamente ao HM-PAO-^{99m}Tc, o complexo ECD-^{99m}Tc apresenta melhor qualidade de imagem, parcialmente devida ao rápido clareamento dos tecidos extra cerebrais [4].

A retenção cerebral do complexo está, provavelmente, relacionada a sua transformação *in vivo* por meio de hidrólise enzimática de suas funções éster, com a rápida conversão do complexo a uma forma complexada mais polar [1].

O objetivo deste trabalho é realizar a avaliação farmacocinética do complexo ECD-^{99m}Tc em

camundongos, com elaboração de um modelo compartimentalizado de distribuição e determinação de parâmetros farmacocinéticos de interesse.

MATERIAIS E MÉTODOS

O composto ECD foi sintetizado e os reativos liofilizados de ECD foram produzidos conforme procedimentos previamente descritos [6,7,8] e marcados com cerca de 74MBq de solução de pertecnetato de sódio (^{99m}Tc), 37MBq/ml.

A pureza radioquímica das marcações foi avaliada por cromatografia em camada delgada (TLC-SG-60, Merck), com NaCl 20% e acetona como solventes [1,9].

Os estudos de distribuição biológica foram realizados em camundongos *Swiss*, administrando-se cerca de 1,85MBq/0,1ml do radiofármaco em veia caudal. Após administração da dose e tendo transcorrido o tempo pré-estabelecido para cada grupo de animais (n=10), estes foram sacrificados e o sangue coletado em frascos heparinizados. Determinou-se a porcentagem de dose

presente no sangue e em diversos órgãos de interesse. Realizou-se também determinação da retenção de corpo inteiro, captação de urina e fezes, com animais mantidos em gaiolas metabólicas.

Amostras de urina, plasma e bile coletados após administração do radiofármaco foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para identificação de possíveis formas metabólicas do composto. As condições da CLAE foram: coluna Nucleosil C18 (250x4,6mm;5µm), com fluxo de 1ml/min. de mistura gradiente de tampão fosfato 0,05M pH2,5 e etanol: etanol 0-60% (0-40 minutos); etanol 60% (40-60 minutos). O efluente passou por detector de radioatividade LN 2040, Berthold. Obteve-se também um perfil de CLAE padrão das espécies de-esterificadas do ECD-^{99m}Tc, submetendo-se amostra do produto marcado à hidrólise alcalina conforme procedimentos previamente descritos [9].

O modelo de distribuição compartimental do complexo foi elaborado utilizando-se o programa ANACOMP [10] para análise dos dados experimentais, cálculo dos coeficientes de transferência (k) e simulação do modelo proposto. O programa foi alimentado com as seguintes amostragens experimentais: amostragem 1 = sangue; amostragem 2 = corpo inteiro; amostragem 3 = urina; amostragem 4 = fezes; amostragem 5 = fígado; amostragem 6 = cérebro.

Assumiu-se que para o tempo zero, 100% da dose administrada encontrava-se no compartimento sanguíneo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os estudos realizados com o composto ECD-^{99m}Tc

evidenciaram a formação de um complexo estável, obtido com pureza radioquímica superior a 97% em todas as marcações realizadas.

Os estudos de distribuição biológica em camundongos evidenciaram rápido clareamento sanguíneo do composto e duas rotas de eliminação, a urinária e a fecal, que contribuem para a rápida eliminação do composto (Tabela 1).

Submetendo-se o produto de hidrólise alcalina do ECD-^{99m}Tc à análise por CLAE (Figura 1), encontrou-se perfil cromatográfico conforme descrito na literatura [9], com quatro picos, correspondentes à espécie não metabolizada do quelato (Rt = 47 minutos), às duas espécies mono-éster (Rt = 25 e 30 minutos) e à espécie di-ácida (Rt = 17 minutos). Tanto neste caso, como no caso da hidrólise provocada por metabolismo *in vivo*, a espécie mono-éster eluída primeiramente é formada em quantidade menor que a espécie eluída posteriormente, conforme mostra o espectro de CLAE da urina (Figura 2).

Estudos realizados em humanos observaram que após seis horas, 75% da dose administrada do ECD-^{99m}Tc havia sido excretada na urina. Toda a atividade urinária era correspondente às espécies metabolizadas do composto. A presença observada em nossos estudos da forma íntegra do composto na urina de 60 minutos, deve-se, muito provavelmente, às diferenças no processo de metabolização do composto, quando se considera diferentes espécies.

Dos órgãos avaliados, além do cérebro, que mostrou captação persistente do composto, o fígado também apresenta captação significativa (Tabela 1), representando um órgão de metabolização do composto, conforme indica o espectro de CLAE da amostra de bile

TABELA 1. Porcentagem da dose administrada de ECD-^{99m}Tc em camundongos em função do tempo

TEMPO (min.)	PORCENTAGEM DA DOSE ADMINISTRADA							
	SANGUE	C.I.	URINA	FEZES	PULMÃO	FÍGADO	RINS	CÉREBRO
1	22,29±7,75	-	-	-	2,45±0,32	30,04±6,60	5,19±1,61	2,29±0,39
3	13,09±5,01	-	-	-	1,75±0,19	33,27±4,03	4,71±0,98	1,14±0,21
5	9,15±2,74	78,34±12,44	6,20±3,78	-	1,24±0,09	28,27±4,49	4,48±1,19	1,25±0,27
10	6,45±0,69	-	-	-	0,84±0,11	16,79±1,51	2,59±0,51	-
15	4,78±1,46	72,07±7,18	18,62±7,49	-	0,66±0,11	14,88±3,02	2,16±0,50	1,12±0,53
30	3,17±0,81	66,84±10,19	31,06±6,59	-	0,27±0,05	8,74±1,67	1,53±0,34	0,38±0,14
60	1,90±0,48	62,12±5,38	33,81±9,21	-	0,26±0,08	8,05±0,66	1,00±0,29	0,19±0,08
120	1,02±0,32	56,98±10,32	39,83±2,79	-	0,13±0,02	6,14±0,44	0,71±0,25	0,07±0,01
240	-	35,92±3,91	49,63±7,26	1,37±2,26	-	-	-	-
480	-	-	-	13,96±2,69	-	-	-	-
960	-	2,24±1,18	-	16,69±2,27	-	-	-	-
1440	-	-	-	28,23±3,12	-	-	-	-

TABELA 2. Porcentagem da dose administrada de ECD-^{99m}Tc em cada compartimento do modelo

TEMPO (min.)	PORCENTAGEM DA DOSE ADMINISTRADA						
	COMP. 1	COMP. 2	COMP. 3	COMP. 4	COMP. 5	COMP. 6	COMP. 7
0	100,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	24,20	37,86	5,86	4,66	0,20	23,18	4,01
3	11,42	34,20	9,46	5,60	1,24	36,60	1,46
5	8,88	26,78	11,85	4,42	2,14	44,83	1,09
10	5,26	15,13	15,92	2,48	3,65	56,91	0,64
15	3,48	9,42	18,46	1,53	4,53	62,15	0,42
30	1,92	4,48	22,84	0,71	5,87	63,94	0,23
60	1,55	3,47	28,85	0,55	7,49	57,90	0,18
120	1,24	2,78	38,78	0,44	10,14	46,46	0,15
240	0,80	1,79	53,15	0,28	13,98	29,90	0,09
480	0,33	0,74	68,35	0,12	18,03	12,39	0,04
960	0,06	0,13	77,25	0,02	20,40	2,13	0,01
1440	0,01	0,02	78,78	0,01	20,81	0,36	0,00

(Figura 2), no qual podemos observar, a presença de espécies metabolizadas outras que não as formas mono-éster e di-ácida. Neste mesmo espectro, pode-se observar que o perfil de formação das espécies mono-éster se inverte, quando comparado ao perfil da hidrólise alcalina ou das amostras de urina. Observa-se uma maior porcentagem da espécie com $R_t = 25$ minutos, quando comparada à espécie com $R_t = 30$ minutos. De acordo com resultados obtidos em estudos que realizaram a administração isolada destas espécies metabolizadas [9], a espécie eluída primeiramente seria clareada do fígado mais rapidamente (estereoseletividade) e a captação hepática residual observada poderia ser atribuída à espécie eluída mais tardiamente.

Pode-se estabelecer, desta forma, que após sua administração, o complexo ECD-^{99m}Tc sofre ação de enzimas hidrolisantes (esterases) em diferentes sítios do organismo, determinando a eliminação do composto na forma metabolizada por ambas as vias de eliminação.

Com base nos resultados dos estudos de distribuição biológica, elaborou-se um modelo de distribuição compartimental, composto de 7 compartimentos, conforme ilustrado na Figura 3. Tal modelo ajustou-se aos dados experimentais tendo sido simulado por um sistema de equações exponenciais descrito pelo programa ANACOMP:

$$f1 = 49,40 e^{-1,8415t} + 14,33 e^{-0,1441t} - 1320,32 e^{-2,7200t} + 1354,82 e^{-2,7227t} + 1,93 e^{-0,0037t} \quad (1)$$

$$f2 = 36,05 e^{-1,8415t} + 46,35 e^{-0,1441t} + 589,59 e^{-2,7200t} + 604,27 e^{-2,7227t} + 4,31 e^{-0,0037t} \quad (2)$$

$$f3 = 3,18 [1 - e^{-1,8415t}] + 11,87 [1 - e^{-0,1441t}] - 57,71 [1 - e^{-2,7200t}] + 59,16 [1 - e^{-2,7227t}] + 62,62 [1 - e^{-0,0037t}] \quad (3)$$

$$f4 = -20,25 e^{-1,8415t} + 7,71 e^{-0,1441t} - 1439,14 e^{-2,7200t} + 1450,95 e^{-2,7227t} + 0,67 e^{-0,0037t} \quad (4)$$

$$f5 = -0,99 [1 - e^{-1,8415t}] + 4,83 [1 - e^{-0,1441t}] - 47,85 [1 - e^{-2,7200t}] + 48,19 [1 - e^{-2,7227t}] + 16,70 [1 - e^{-0,0037t}] \quad (5)$$

$$f6 = -12,90 e^{-1,8415t} - 53,52 e^{-0,1441t} + 232,82 e^{-2,7200t} - 238,66 e^{-2,7227t} + 72,18 e^{-0,0037t} \quad (6)$$

$$f7 = 22,01 e^{-1,8415t} + 1,78 e^{-0,1441t} + 1766,65 e^{-2,7200t} - 1790,61 e^{-2,7227t} + 0,22 e^{-0,0037t} \quad (7)$$

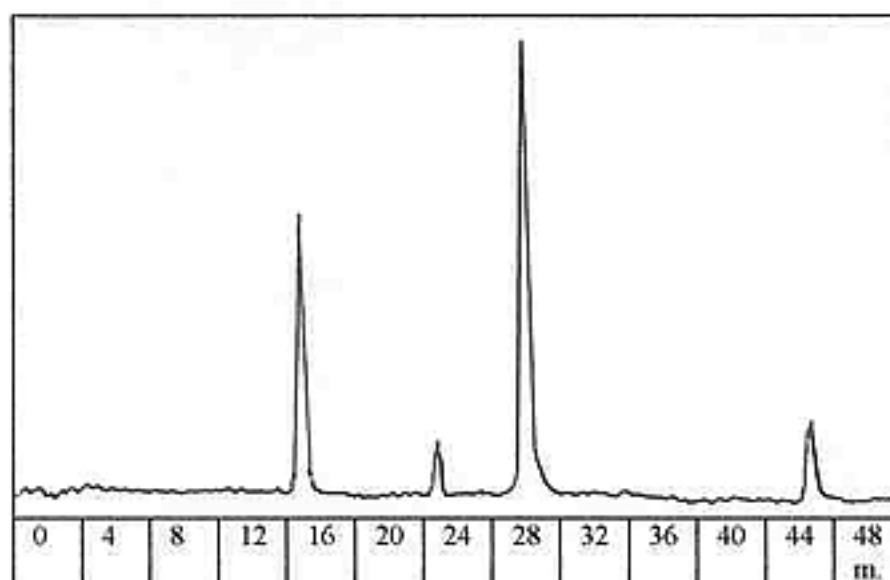


Figura 1. Espectro de CLAE - produtos de hidrólise alcalina do composto ECD-^{99m}Tc

As constantes de transferência (k) calculadas são:

$$k(1,2) = 1,0106 \pm 0,0034 \text{ min}^{-1}$$

$$k(1,3) = 0,1188 \pm 0,0042 \text{ min}^{-1}$$

$$k(1,6) = 0,4767 \pm 0,0001 \text{ min}^{-1}$$

$$k(1,7) = 0,2936 \pm 0,1174 \text{ min}^{-1}$$

$$k(2,1) = 0,0555 \pm 0,0056 \text{ min}^{-1}$$

$$k(4,1) = 2,4651 \pm 0,0006 \text{ min}^{-1}$$

$$k(6,1) = 0,0164 \pm 0,0024 \text{ min}^{-1}$$

$$k(7,1) = 2,5004 \pm 0,0169 \text{ min}^{-1}$$

$$k(2,4) = 0,4012 \pm 0,0087 \text{ min}^{-1}$$

$$k(4,5) = 0,0904 \pm 0,0012 \text{ min}^{-1}$$

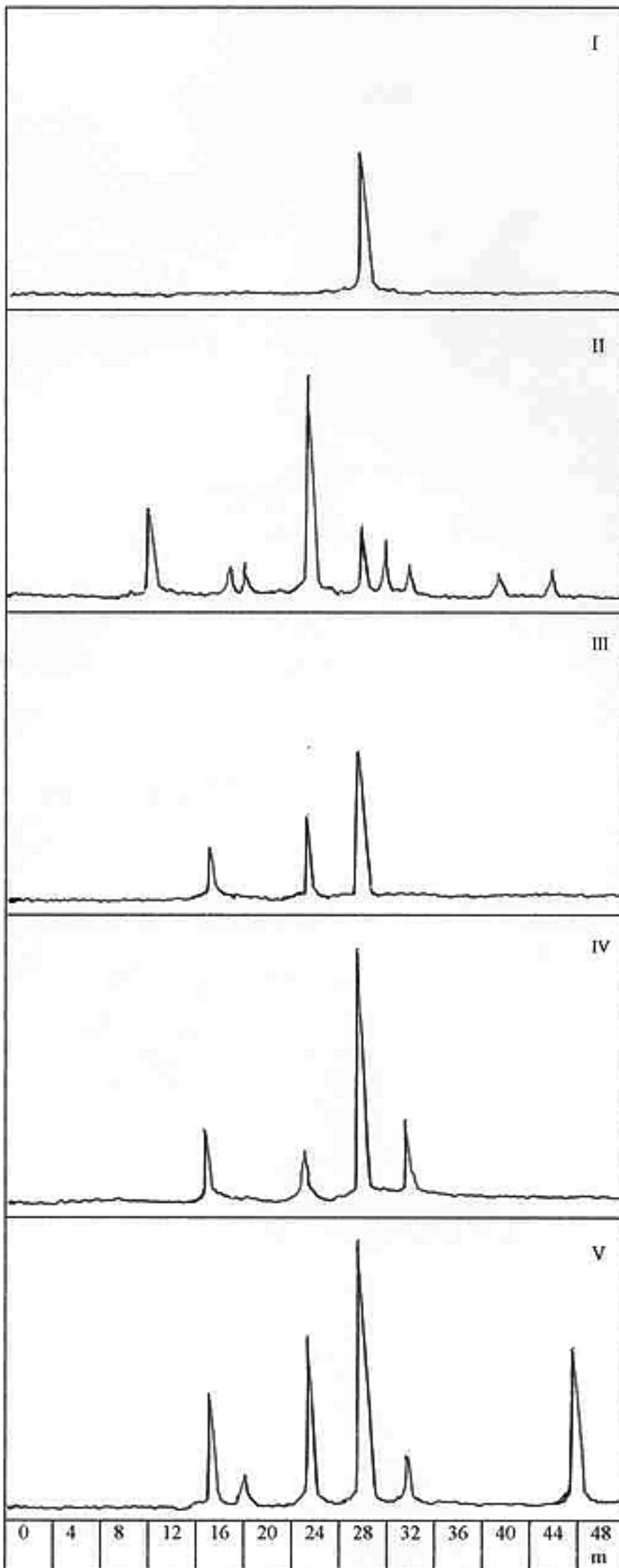
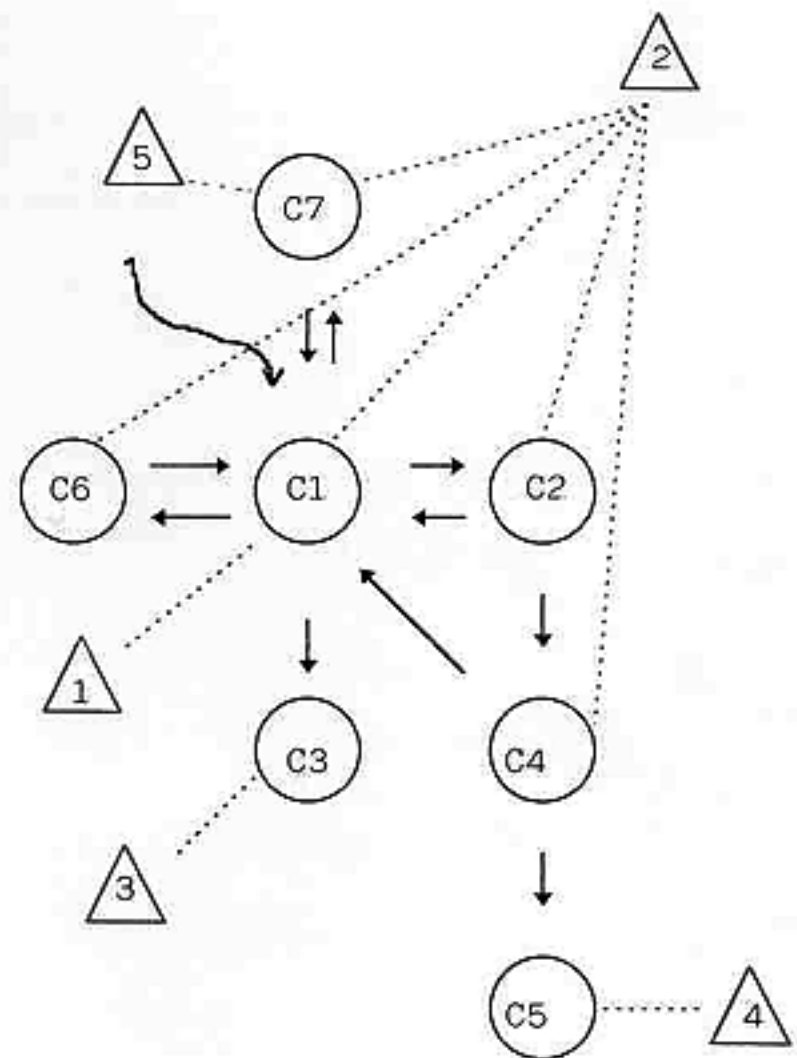


Figura 2. Espectro de CLAE de amostras de: (I) plasma 1 minuto; (II) bile 60 minutos; (III) urina 5 minutos; (IV) urina 30 minutos; (V) urina 60 minutos.



C1 = Sangue; C2 = Fígado

C3 = Urina; C4 = Bile

C5 = Fezes; C6 = Demais órgãos

C7 = Cérebro

1 = Amostragem sangue; 2 = Amostragem corpo inteiro

3 = Amostragem urina; 4 = Amostragem fezes

5 = Amostragem fígado; 6 = Amostragem cérebro

Figura 3. Modelo compartimental proposto para o complexo $\text{ECD-}^{99\text{m}}\text{Tc}$: os círculos representam os compartimentos e os triângulos as amostragens experimentais.

A Tabela 2 apresenta a porcentagem de dose do radiofármaco presente em cada compartimento do modelo proposto, de acordo com sua simulação.

O modelo proposto ajustou-se aos resultados experimentais, de acordo com análise de variância realizada entre os valores experimentais e os calculados a partir da simulação do modelo. Deve-se considerar que a coleta de dados experimentais, utilizada na elaboração do modelo, considera a atividade total, sem discriminar as frações correspondentes às espécies metabolizadas do composto.

O modelo resultante de tal consideração seria ainda mais complexo que o modelo apresentado, considerando sub-compartimentos dentro de cada compartimento proposto. Entretanto, os resultados obtidos com este estudo, em especial a magnitude das constantes de transferência obtidas, caracterizam o rápido clareamento sanguíneo do composto, identificam os sítios de captação significativa e evidenciam as rotas de eliminação, representando, desta forma, um importante passo para o entendimento da farmacocinética do complexo ECD-^{99m}Tc.

REFERÊNCIAS

- [1] WALOVITCH, R.C.; HILL, T.C.; GARRITY, S.T.; CHEESMAN, E.H.; BURGESS, B.A.; O'LEARY, D.H.; WATSON, A.D.; GANEY, M.V.; MORGAN, R.A.; WILLIAMS, S.J. Characterization of Technetium-99m-L,L-ECD for brain perfusion imaging, Part 1: Pharmacology of Technetium-99m ECD in nonhuman primates. **J.Nucl.Med.**, 30: 1892-1901, 1989.
- [2] LÉVEILLE, J.; DEMONCEAU, G.; DE ROO, M.; RIGO, P.; TAILLEFER, R.; MORGAN, R.A.; KUPRANICK, D.; WALOVITCH, R.C. Characterization of Technetium-99m-L,L-ECD for brain perfusion imaging, Part 2: Biodistribution and brain imaging in humans. **J.Nucl.Med.**, 30: 1902-10, 1989.
- [3] HOLMAN, B.L.; HELLMAN, R.S.; GOLDSMITH, S.J.; MENA, I.G.; LEVEILLE, J.; GHERARDI, P.G.; MORETTI, J.L.; BISCHOF, D.A.; HILL, T.C.; RIGO, P.M.; VAN HEERTUM, R.L.; ELL, P.J.; BUELLS, U.; DE ROO, M.C.; MORGAN, R.A. Biodistribution, Dosimetry and clinical evaluation of Technetium-99m Ethyl Cysteinate Dimer in normal subjects and in patients with chronic cerebral infarction. **J.Nucl.Med.**, 30: 1018-24, 1989.
- [4] TSUCHIDA, T.; NISHIZAWA, S.; YONEKURA, Y.; SADATO, N.; IWASAKI, Y.; FUKITA, T.; MOTOBA, N.; MAGATA, Y.; TAMAKI, N.; KONISHI, J. SPECT images of Technetium-99m-Ethyl-cysteinate dimer in cerebrovascular diseases: comparison with other cerebral perfusion tracers and PET. **J.Nucl.Med.**, 35: 27-31, 1994.
- [5] VALLABHAJOSULA, S.; ZIMMERMAN, R.E.; PICARD, M.; STRITZKE, P.; MENA, I.; HELLMAN, A.R.S.; TIKOFSKY, R.S.; STABIN, M.G.; MORGAN, R.A.; GOLDSMITH, S.J. Technetium-99m ECD: a new brain imaging agent. In vivo kinetics and biodistribution studies in normal human subjects. **J.Nucl.Med.**, 30: 599-604, 1989.
- [6] CARVALHO, O.G.; ARAÚJO, E.B. Preparação de L,L-Etilenodicisteína e L,L-Etilenodicisteína dietilester. **Anais do I Fórum Nacional de Ciência e Tecnologia em Saúde**, Caxambu, 20-24 novembro 1992, p. 485-487.
- [7] CARVALHO, O.G.; ARAÚJO, E.B.; MURAMOTO, E.; ALMEIDA, M.A.T.M. Labelling of ECD with ^{99m}Tc. Preliminary distribution studies in animals. In: NICOLINI, M.; BANDOLI, G.; MAZZI, U. (eds) **Technetium and Rhenium in chemistry and nuclear medicine**. New York, Raven Press, 1994, V.4, p.547-550.
- [8] CARVALHO, O.G.; ARAÚJO, E.B.; MURAMOTO, E.; ALMEIDA, M.A.T.M. Produção de conjuntos reativos liofilizados para obtenção de L,L-ECD-^{99m}Tc. **Radiol. Bras.** (no prelo).
- [9] VERBRUGGEN, A.M.; BORMANS, G.; VAN NERON, C.; CLEYNHENS, B.; CROMBEZ, D.; DE ROO, M. Isolation of the mono-ester mono-acid derivatives of ^{99m}Tc-ECD and their biodistribution in mice. In: NICOLINI, M.; BANDOLI, G.; MAZZI, U. (eds) **Technetium and Rhenium in chemistry and nuclear medicine**. New York, Cortine International Verona and Raven Press, 1990, V.3, p. 445, 1990.
- [10] MESQUITA, C.H. **Modelo para determinação da absorção de substâncias radioativas - Aplicação em dosimetria e nutrição**. São Paulo, IPEN-CNEN-USP, 1991 (Tese Doutorado).

ABSTRACT

The biological distribution studies of ^{99m}Tc-ECD in mice were performed in this work. Using ANACOMP computer

program, a compartmental distribution model, composed by seven compartments was adjusted, characterized by a fast blood clearance, an unidirectional renal depuration and intestinal elimination, determined by intense hepato biliar transit. Plasma, bile and urinary samples were analysed by HPLC, showing the in vivo metabolism of the compound.