

CNEN/SP

ipen **Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares**

**MARCAÇÃO DE N-ISOPROPIL-p-I-ANFETAMINA (IMP-¹³¹I) E
BIODISTRIBUIÇÃO EM RATOS**

**Marycel Figols de Barboza, Ródza da Silva V. Gonçalves, Emiko Muramoto,
Setsuko Sato Achando, Diana Yolanda Freire Martinez, Maria Tereza Colturato,
Constância Pagano Gonçalves da Silva, e Jochen Knust**

PUBLICAÇÃO IPEN 208

SETEMBRO/1988

SÃO PAULO

**MARCAÇÃO DE N-ISOPROPIL-p-I-ANFETAMINA (IMP-¹³¹I) E
BIODISTRIBUIÇÃO EM RATOS**

**Marycel Figols de Barboza, Ródza da Silva V. Gonçalves, Emiko Muramoto,
Setsuko Sato Achando, Diana Yolanda Freire Martinez, Maria Tereza Colturato,
Constância Pagano Gonçalves da Silva, e Jochen Knust**

DEPARTAMENTO DE PROCESSAMENTO

**CNEN/SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
SÃO PAULO - BRASIL**

Série PUBLICAÇÃO IPEN

INIS Categories and Descriptors

B13.30

C21.20

BENZEDRINE

LABELLING

IODINE 131

RADIONUCLIDE KINETICS

IPEN - Doc - 3084

Aprovado para publicação em 30/06/87.

Nota: A redação, ortografia, conceitos e revisão final são de responsabilidade do(s) autor(es).

MARCAÇÃO DE N-ISOPROPIL-p-I-ANFETAMINA (IMP-¹³¹I) E BIODISTRIBUIÇÃO EM RATOS*

Marycel Figols de Barboza, Ródza da S.V. Gonçalves, Emiko Muramoto, Setsuko Sato Achando, Diana Yolanda Freire Martinez¹, Maria Tereza Colturato, Constância Pagano Gonçalves da Silva e Jochen Knust²

RESUMO

A marcação e o procedimento de purificação da N-Isopropil-p-I-Anfetamina (¹³¹I-IMP) descritos neste trabalho representa um método rápido e eficiente para obter um composto com todas as características de pureza para sua aplicação "in vivo". O rendimento de marcação variou de 68-78% e a pureza radioquímica foi de 97-99%. Os estudos de distribuição biológica realizados em ratos demonstraram sua afinidade pelo cérebro, possibilitando o estudo clínico das doenças cerebrais quando marcada futuramente com ¹²³I.

LABELING OF N-ISOPROPIL-p-I-ANPHETAMINE (IMP-¹³¹I) AND ITS BIOLOGICAL DISTRIBUTION IN RATS

ABSTRACT

The described labeling and purification preparation of N-Isopropil-p-¹³¹I-anphetamine (¹³¹I-IMP) represents a fast and efficient method to obtains a compound that fullfills all criterions of purity for its application "IN VIVO". The labeling yield was 68-78% and the radiochemical purity performed by paper chromatography and electrophoresis was 97-99%. As demonstrated in animal experiments, the cerebral affinity offers a possibility to study brain diseases in clinical studies when the product will be labelled with ¹²³I.

INTRODUÇÃO

As aminas são os principais mediadores químicos da função cerebral⁽¹⁾. Apesar de um número limitado de aminas estarem envolvidas normalmente na função do cérebro, qualquer alteração no seu metabolismo neurohumoral manifesta-se na maioria dos estados patológicos, inclusive nas disfunções tais como esquizofrenia e psicose maníaco-depressivo.

(*) Trabalho apresentado no "XI Congreso de la Asociación Latino America na de Sociedade de Biología y Medicina Nuclear" - Cidade do México - México, de 16 a 21 de novembro de 1987.

(1) Bolsista da IAEA - Dirección General de Energía Nuclear - Guatemala.

(2) Perito da IAEA - Universidade de Essen - Alemanha.

2.

Vários pesquisadores (2,3) estudaram diversas aminas análogas as anfetaminas em macaco e encontraram um rápido clareamento sanguíneo e alta captação da radioatividade pela retina.

Winchell e col. (1) testaram vários derivados das iodofenilaminas em ratos: as iodoanilinas, as iodobenzilaminas e as iodofenilaminas. Para derivados N-alkilaminas, a iodação na posição "para" (p) geralmente resulta numa maior captação pelo cérebro em relação a posição "orto" (o), num intervalo de tempo de 5 a 60 min. após administração do traçador. No caso de N-isopropilbenzilaminas, a iodação na posição "meta" (m) foi melhor para se obter uma maior captação pelo cérebro. Nos derivados iodofenilaminas, a substituição pelo grupo "propil ou isopropil" favorece a localização no cérebro.

Em 1980, Winchell e col. (1) demonstraram a estrutura química e a distribuição biológica das iodofenilalkilaminas marcadas com ^{123}I e que levaram a selecionar a N-isopropil-p-I-anfetamina (IMP) como um radiofarmaco ideal para o estudo da função cerebral.

A IMP é uma substância lipofílica clareada do sangue com 90% de eficiência, com um lento "washout", captada pela retina de certos animais (4). Esta alta radiação nos olhos poderia limitar seu uso em humanos. Holman e col. (6) verificaram essa captação em retina de macacos, porém não foi confirmada em humanos.

Em virtude de não dispormos do ^{123}I , radionuclídeo ideal para uso em Medicina Nuclear e baseados nas publicações de Knust e col. (5) nos propusemos marcar a N-isopropil-p-I-anfetaminas com ^{131}I e avaliar os controles de qualidade (radioquímico, biológico e estabilidade do produto) para futuras marcações com ^{123}I .

MATERIAL E MÉTODO

A N-isopropil-p-I-anfetamina (IMP), foi cedida pela Universidade de Essen, Alemanha.

1. Marcação

Colocar num frasco de marcação:

- 20 μl de uma solução de Na^{131}I em NaOH 0,01N e 20 μl Na_2SO_3 (4mg/ml H_2O).
- evaporar a vácuo em banho maria (70°C).
- adicionar 200 μg IMP em 100 μl ácido acético glacial.
- aquecer a solução a 170°C em banho de óleo, durante 20 minutos.
- evaporar a vácuo em banho maria (70°C).
- adicionar ao frasco de marcação 2 ml de H_2O destilada e agitar.

2. Purificação

- preparar, inicialmente, a coluna com a resina em fase reversa RP-C $_{18}$.
- lavar com 1ml de metanol, 2ml de NaOH 0,01N, 3ml de H_2O , 1ml de metanol, 4ml de éter etílico, 1ml de metanol e 2ml de H_2O .
- passar através da coluna o produto marcado diluído em H_2O .

- adicionar à coluna 1ml de uma sol. NaI (0,5 mg/ml NaOH 0,01) e 3 ml de H_2O , que eluirá a I^- (livre).
- eluir a $IMP-^{131}I$, fixada na coluna, com 100 μ l de etanol e 3 ml de éter etílico, coletando-se em um frasco que contém 100 μ l de ácido acético glacial.
- evaporar o éter e o etanol à vácuo e o ácido acético em banho maria à 70°C.
- dissolver a $IMP-^{131}I$ com uma solução salina 0,9%.
- filtrar essa solução por meio de filtro Millipore de 0,22 μ , em um frasco estéril.

3. Controle Radioquímico.

Foram realizados ensaios cromatográficos a fim de determinar a pureza radioquímica. Os sistemas utilizados foram:

- a. Eletroforese em tampão acetato-ácido acético, pH 4,5, 300V durante 40 minutos;
- b. cromatografias ascendentes em papel Whatman nº 1 e 3MM em diferentes solventes: metanol 75%; clorofórmio: metanol: ácido acético (85:15:1), etanol-acetato de etila (1:1).

Determinou-se o Rf de I^- (iodeto) utilizando uma solução de ^{131}I nos mesmos cromatogramas.

4. Controle Biológico.

O controle da distribuição biológica da $IMP-^{131}I$ nos diferentes órgãos foi avaliado em um grupo de ratos machos da raça Wistar com peso médio de 250g, mantidos no biotério do IPEN-CNEN/SP.

Cada animal, foi previamente anestesiado com uma solução de uretana (100 mg/100g de peso corporal) por via intraperitoneal e sacrificado aos 5, 15, 30, 60, 240 minutos e 24 horas após administração endovenosa de 80 μ Ci de $IMP-^{131}I$.

O sangue foi coletado por punção cardíaca, e os seguintes órgãos retirados: coração, cérebro, região ocular, rins, pulmão e fígado, que posteriormente foram lavados, pesados e a radioatividade determinada. Os resultados foram expressos em % de dose/g de tecido e % das contagens totais/g de tecido.

5. Resultados

- a. Rendimento de marcação: determinou-se o rendimento de marcação relacionando-se a atividade final com a inicial. O rendimento variou de 67 a 87% em 8 ensaios.

- b. Controle radioquímico:

Eletroforese: no controle radioquímico realizado por eletroforese obtiveram-se os seguintes resultados, $IMP-^{131}I = 96,8\%$; $I^- = 1,0\%$; $IO_3^- = 0,09\%$. Os Rf determinados neste sistema cromatográfico são: $IMP = 0,21$; $I^- = 0,7$ e $IO_3^- = 0,5$.

4.

Pureza Radioquímica.

IMP- ^{131}I	I^- (Iodeto)	IO_3^- (Iodato)
97,6	2,2	0,2
96,1	1,7	0,2
99,1	0,8	0,1
99,4	0,6	0,03
99,3	0,6	0,1
99,6	0,3	0,1
$\bar{X} = 98,8$	1,0	0,09

Cromatografia ascendente em papel.

Nos ensaios realizados em papel Whatman nº 1 e 3MM (2 x 25cm) a migração da IMP, I^- e IO_3^- coincidiram, obtendo a mesma resolução em diferentes solventes. Os resultados expressos em porcentagem observam-se na seguinte tabela.

solvente	metanol 75%		acet. etila-etanol (1:1)		clorof.met.lac.acet. (85:15:1)	
Papel	What.1	What.3MM	What.1	What.3MM	What.1	What.3MM
IMP- ^{131}I	98,7	99,0	98,0	98,0	96,4	96,9
I^-	0,96	0,87	1,9	1,4	0,9	0,5
IO_3^-	0,32	0,13	0,09	0,58	0,61	0,59

$\bar{X} = 6$ ensaios

Os Rf determinados em papel Whatman nº 1 e 3MM (2 x 25cm) foram:

solvente	metanol 75%		acet. etila-etanol		clorof.met.ac.acet.	
Papel	What.1	What.3MM	What.1	What.3MM	What.1	What.3MM
IMP- ^{131}I	0,87	0,93	1,0	0,91	0,96	1,0
I^-	0,76	0,76	0,08	0,11	0,07	0,06
IO_3^-	0,4	0,4	0,5	0,48	0,55	0,50

Estabeleceu-se para o controle radioquímico da IMP-¹³¹I a cromatografia ascendente em papel Whatman nº 1 (2 x 25cm) desenvolvida no solvente; cloroformio: metanol: ac. acético, na proporção de 85:15:1 durante 1h.10 minutos Rf IMP = 1,0; I⁻ = 0,06; IO₃⁻ = 0,55.

Controle Biológico.

A tabela I ilustra a distribuição biológica da IMP-¹³¹I em ratos (n=7), expressa em % da contagem total/g de tecido nos diferentes órgãos, 5, 15, 30, 60, 240 min. e 24 horas após a administração do traçador (80µCi). Observa-se uma captação elevada de 12,9, 13,6 e 13,9% de atividade total/g de tecido aos 30,60 e 240 min. respectivamente no cérebro. No pulmão a captação é de 51,9% aos 5 min. e 37,1% às 24 horas. No entanto, a região ocular apresentou uma variação significativa de 1,88% aos 5 min. até 15,9% às 24 horas. A captação média no sangue foi de 1,5 a 2,9% no decorrer do experimento.

A tabela II apresenta a distribuição biológica da IMP-¹³¹I em ratos (n=7), expressa em % dose/g de tecido. Observa-se uma captação elevada no pulmão de 5,5 a 1,24% dose/g, no intervalo de 5 min. a 24 horas e uma captação de 1,06, 1,08 e 1,05% no cérebro aos 15, 30 e 60 min., após a administração da dose.

As figuras I e II ilustram graficamente a distribuição biológica da IMP-¹³¹I em ratos (n=7), referente às tabelas I e II supra citadas.

CONCLUSÃO.

A técnica da marcação, assim como o uso da coluna em fase reversa RP-C₁₈ na purificação, mostraram-se eficientes na obtenção do radiofármaco com todas as qualidades requeridas para seu uso "in vivo". O produto obtido, com uma pureza radioquímica de 98%, apresenta afinidade biológica pelo cérebro em animais de experimentação (ratos).

AGRADECIMENTO.

Os autores agradecem a colaboração técnica de Marina Leonel da Silva e Alfredo dos Santos.

TABELA I

DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA DA $\text{IMP-}^{131}\text{I}$ EM RATOS, EXPRESSO EM % DAS CONTAGENS TOTAIS/g DE TECIDO EM FUNÇÃO DO TEMPO (min.) APÓS ADMINISTRAÇÃO DA DOSE (n=7).

Órgãos \ Tempo (min.)	5	15	30	60	240	1440
CORAÇÃO	7,61 ± 1,27	6,01 ± 0,97	5,85 ± 1,13	3,89 ± 0,57	3,37 ± 0,45	3,94 ± 0,34
CÉREBRO	6,87 ± 0,75	10,18 ± 2,80	12,95 ± 1,45	13,66 ± 0,93	13,93 ± 1,76	11,51 ± 0,83
REGIÃO OCULAR	1,88 ± 0,49	2,89 ± 0,25	3,31 ± 1,07	3,75 ± 0,48	5,57 ± 0,63	15,19 ± 3,14
RINS	20,50 ± 1,75	20,12 ± 2,23	18,00 ± 3,99	15,90 ± 1,17	14,97 ± 1,60	11,83 ± 0,59
PULMÃO	51,97 ± 3,20	51,56 ± 8,63	39,12 ± 5,75	43,24 ± 6,67	38,71 ± 6,04	37,16 ± 3,52
FÍGADO	7,53 ± 1,78	10,35 ± 3,56	20,22 ± 4,69	19,38 ± 3,69	16,26 ± 6,65	13,63 ± 1,62
SANGUE	1,53 ± 0,33	1,19 ± 0,33	2,24 ± 1,20	1,84 ± 0,79	1,88 ± 0,56	2,99 ± 0,80

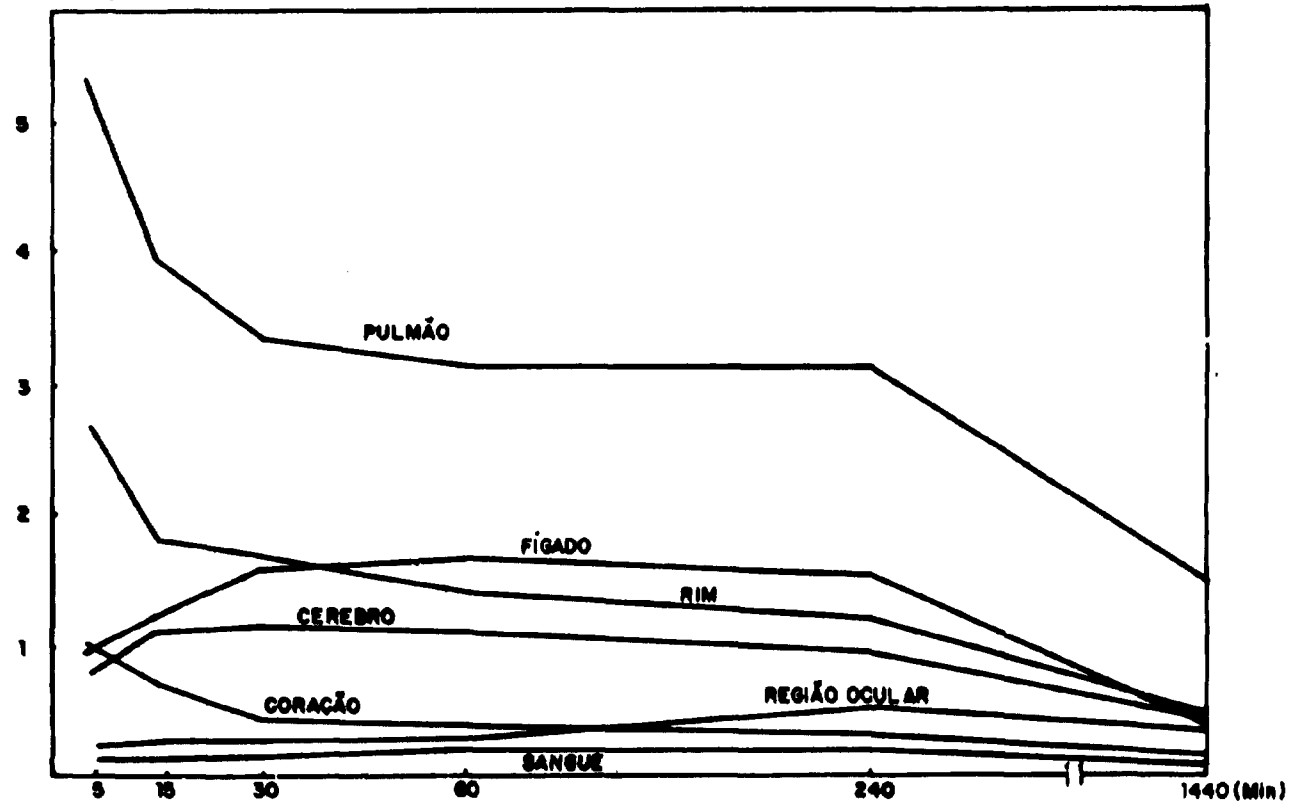
T A B E L A II

DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA DA IMP-¹³¹I EM RATOS, EXPRESSO EM % DOSE/g DE TECIDO EM FUNÇÃO DO TEMPO (min.) APÓS ADMINISTRAÇÃO DA DOSE (n=7).

Tempo (min.) Órgãos	5	15	30	60	240	1440
CORAÇÃO	0,99 ± 0,21	0,72 ± 0,25	0,45 ± 0,12	0,34 ± 0,08	0,27 ± 0,11	0,13 ± 0,04
CÉREBRO	0,81 ± 0,13	1,06 ± 0,22	1,08 ± 0,20	1,05 ± 0,14	0,92 ± 0,15	0,33 ± 0,06
REGIÃO OCULAR	0,22 ± 0,04	0,24 ± 0,04	0,25 ± 0,05	0,29 ± 0,03	0,41 ± 0,07	0,39 ± 0,11
RINS	2,63 ± 0,38	1,72 ± 0,21	1,61 ± 0,20	1,37 ± 0,35	1,17 ± 0,53	0,34 ± 0,05
PULMÃO	5,52 ± 2,71	3,93 ± 0,94	3,38 ± 1,0	3,11 ± 0,29	3,10 ± 0,60	1,24 ± 0,33
FÍGADO	0,94 ± 0,14	1,23 ± 0,49	1,57 ± 0,29	1,59 ± 0,32	1,55 ± 0,61	0,38 ± 0,44
SANGUE	0,19 ± 0,03	0,14 ± 0,04	0,13 ± 0,03	0,16 ± 0,05	0,16 ± 0,07	0,07 ± 0,02

% Dose/g

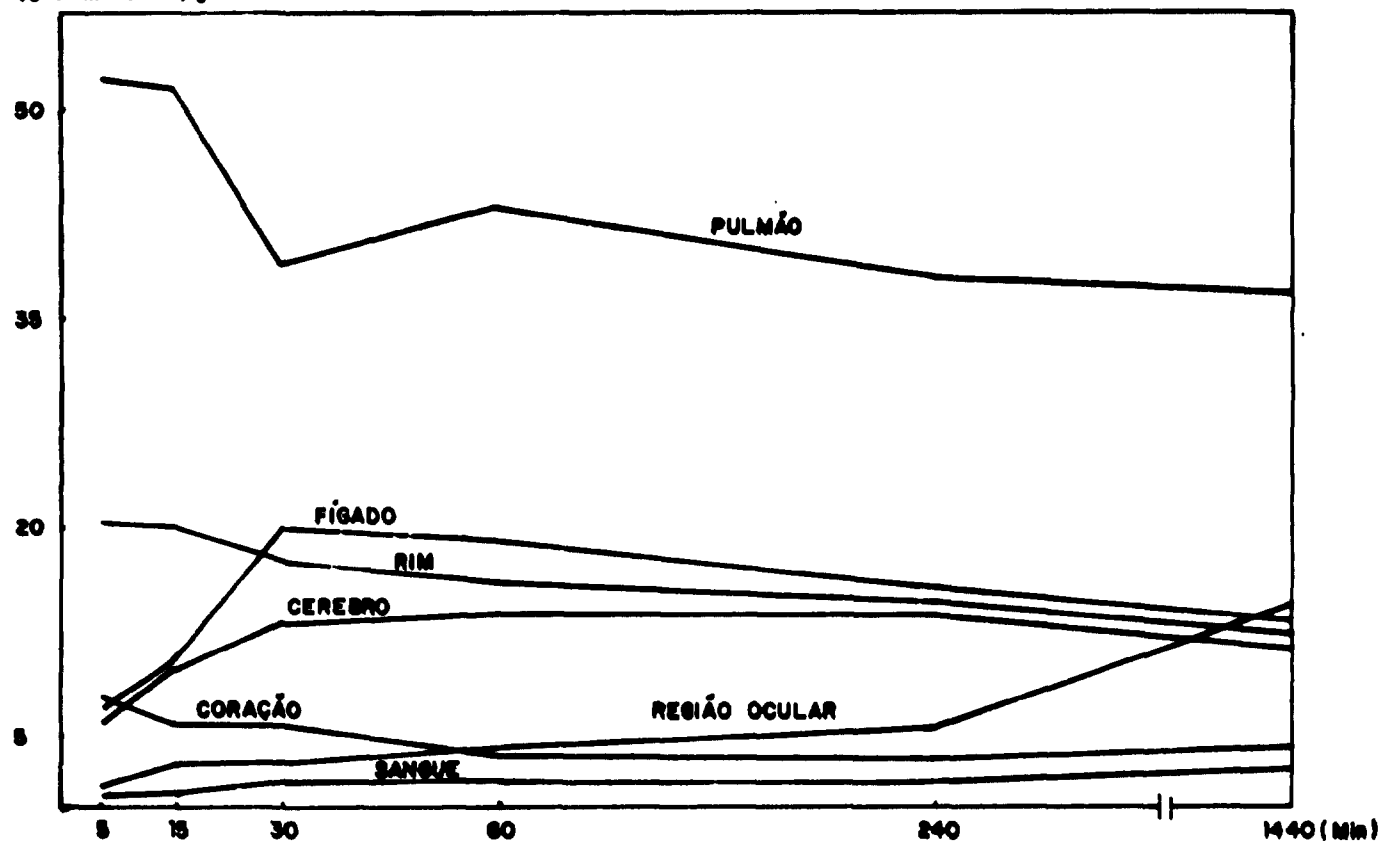
FIGURA I



DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA DA IMP-¹³¹ EM RATOS (n=7) EXPRESSO EM % Dose/g EM FUNÇÃO DO TEMPO APÓS ADMINISTRAÇÃO DO TRAÇADOR.

% CPM Totais/g

FIGURA II



DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA DE IMP-¹³¹I EM RATOS, EXPRESSO EM % DAS CONTAGENS TOTAIS/g DE TECIDO EM FUNÇÃO DO TEMPO (Min) APÓS ADMINISTRAÇÃO DO TRAÇADOR.

.10.

BIBLIOGRAFIA

1. WINCHELL, H.S.; BALDWIN, R.M.; LIN, T.H. Development of ^{123}I labeled amines for brain studies: localization of ^{123}I iodofenylalkyl amines in rats brain. Med. 21:940-946, 1980.
2. SARGENT, T.; BRAUN, U.; BRAUN, G. Brain and retina uptake of radio-iodine labeled psychotomimetic in dog and monkey. J.Nucl.Med. 19: 72, 1978.
3. WINCHELL, H.S.; HORST, W.D.; BRAUN, L.; OLDENDORF, W.D.; HATTNER, R.; PARKER, H. N-isopropyl- ^{123}I -p-iodoamphetamine: single-pass brain uptake and washout, binding to brain synaptosomes, and localization in dog and monkey brain. J.Nucl.Med. 21: 947-952, 1980.
4. COHEN, M.B.; GRAHAM, L.S.; YAMADA, L.S. ^{123}I iodoamphetamine spect imaging. Appl.Radiat.Isot., 17 (8): 749-763, 1986.
5. KNUST, E.J.; MACHULLA, H.J.; BALDWIN, R.M.; CHEN, T.; FEINENDEGEN, L. E. Synthesis of, and animal experiments with N-isopropyl-p- ^{123}I -iodoamphetamine (IMP) and ^{18}F -3-Deoxy-3-Fluoro-D-glucose (3-FDG) as tracers in brain and heart diagnostic studies. Nuklearmedizin, 23: 31-34, 1984.
6. HOMAN, B.L.; HILL, T.C.; LEE, R.G.; ZIMMERMAN, R.E.; MOORE, S.C.; ROYAL, H.D. Brain imaging with radiolabeled amines. In: FREEMAN, L. M.(ed.) Nuclear medicine anual. New York, 1983. p. 131-164.