

MARCAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE BIODISTRIBUIÇÃO DO ÁCIDO 15-(p-iodofenil) PENTADECANOICO (IPPA-¹³¹I)

MARIA TEREZA COLTURATO, MARYCEL F. DE BARBOZA, EMIKO MURAMOTO, RODZA S.V. GONÇALVES, NILDA S. DE PEREIRA E MARIA APPARECIDA T.M. DE ALMEIDA
IPEN-CNEN / SP

Caixa Postal 11049, CEP 05422-970, São Paulo-BRASIL

RESUMO

O ac. 15-(p-iodofenil) pentadecanoico marcado com ¹³¹I (IPPA-¹³¹I) é utilizado em Medicina Nuclear para cintilografia do miocárdio, expressando o comportamento metabólico neste músculo. A marcação com ¹³¹I foi realizada de acordo com os procedimentos descritos por Dougan e col. (1986). A pureza radioquímica do composto foi avaliada por: (1) cromatografia em papel; (2) eletroforese em papel e (3) cromatografia de alta resolução (HPLC). O produto de 95,00 a 98,50 % de pureza, manteve-se estável por 10 dias. O estudo da biodistribuição foi realizado em ratos da raça Wistar: A afinidade do IPPA-¹³¹I pelo tecido cardíaco e a lipofilicidade foram determinadas "in vitro". A toxicidade do produto foi determinada em ratos, com doses 500 vezes maior que a dose empregada em diagnóstico.

INTRODUÇÃO

O ácido 15-(p-iodofenil)-pentadecanoico marcado com ¹³¹I (IPPA-¹³¹I) é utilizado em Medicina Nuclear para cintilografia do miocárdio, expressando o comportamento metabólico deste músculo.

Inicialmente Evans e col. usaram ac. oleico marcado com ¹³¹I como agente para obtenção de imagens do infarto de miocárdio em animais de experimentação e em humanos. Estes estudos tiveram sucesso limitado devido ao comportamento biológico inapropriado da molécula marcada ou a característica desfavorável do radionuclídeo.[1]

A reavaliação no uso de ac. graxos radiodados foi dirigida em termo da alteração estrutural-ação biológica, onde o átomo de iodo ocuparia posição e tamanho correspondente ao grupo metil terminal, ou seja correspondente a C_{n-1} "grupo fisiológico". Tais alternativas conduziram a uma radiodação eficiente dos ac. graxos, assim como a resultados promissores em vista da sua afinidade às células do miocárdio.

Diversas formas estruturais e métodos de marcações foram estudadas; Bierwalters e col. (1975)[2] e Poe e col. (1975)[3] investigaram o ac. oleico e linoléico pela adição do I, ou ICl a dupla ligação; o inconveniente encontrado foi a baixa atividade específica.

Na marcação de ac. graxos com radioiodo o método de escolha foi o de substituição, e em especial o mecanismo de substituição nucleofílica. Otimização na variação das condições de reação foram estudadas por Machulla e col. (1980)[4]. Os referidos pesquisadores propuseram e sintetizaram IPPA-¹²³I, iodinando ac. alifáticos na posição terminal com ¹²³I, verificando a via catabólica (beta-oxidação) sendo o IPPA degradado a ac. p-¹²³I- benzóico o qual é rapidamente excretado como ac. hippúrico-¹²³I.

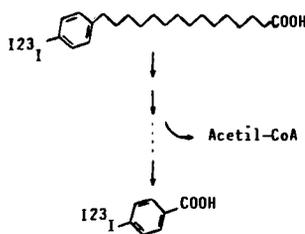


FIGURA 1 - CATABOLISMO DO IPPA-¹²³I VIA B-OXIDAÇÃO.[4]

O propósito deste trabalho é estudar os parâmetros de marcação do IPPA com ¹³¹I, estabelecendo a metodologia de controle de qualidade (radioquímica e biológica), determinando a lipofilicidade e avaliando a toxicidade do radiofármaco.

MATERIAIS E METODO

O sal IPPA utilizado foi da EMKA-CHEMIE e o Na-¹³¹I produzido no reator IEA-R, livre de carregador e redutor. A técnica de marcação foi baseada no trabalho de Dougan e col. [5] que consiste em: (1) preparação de uma solução de 4 mg IPPA em 1,0 ml de TDP (Tween 80 10%, Dextrose 80% e 1.2 Propileno glicol 10%), aquecida a 100°C e agitada por 5-10 minutos; (2) foi adicionado num frasco de marcação 300 µl da sol. IPPA, 3 µl de CuSO₄.5H₂O (50 mg/ml H₂O destilada), 10 mg de ac. ascórbico e 30 µl de NaI¹³¹I (1 - 10 mCi), nitrogenada por 10 min., e aquecida a 107°C durante 60 minutos e (3) no frasco contendo o IPPA-¹³¹I foi acrescido 2 - 3 ml de uma solução contendo 8,0 ml de álcool etílico; 1,6 ml de Tween 80% e 50,4 ml de solução fisiológica e o volume final completado com solução fisiológica, de maneira que a concentração radioquímica fosse 1 mCi/ml.

A pureza radioquímica foi avaliada utilizando-se os seguintes procedimentos: (1) eletroforese em papel Whatmann N^o 1; tampão acetato-acético pH 5,4; 350 V, durante 45 minutos, (2) cromatografia ascendente em papel Whatmann 3MM (14 X 1cm) e (8 X 1cm) em dioxano:clorofórmio:ac. acético glacial (50:49:0,1) e (3) cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) CG modelo 480C, detector UVCG-435B em 254 nm, fluxo 2 ml/min., coluna F.A.A.(WATERS) em heptano:ac. acético glacial(100:0,35).

Estudos da distribuição biológica foram realizados em ratos Wistar, peso médio 250g, anestesiados com uretana (100mg/100g peso). Os animais foram sacrificados aos 30 segundos, 2, 5, 10, 30, e 60 minutos após a administração endovenosa do traçador (50-60µCi/0,1 ml), os órgãos de interesse foram removidos, lavados, pesados e a radioatividade determinada num contador gama Berthold-MAG 312; os resultados foram expressos em % dose/g de tecido e % dose/órgão.

A fim de verificar "in-vitro", a afinidade do IPPA-¹³¹I pelo músculo cardíaco, foram incubados corações de ratos normais com 3ml de uma solução contendo 8µCi IPPA-¹³¹I em 3ml de sol. fisiológica, durante 60 minutos a 40°C.

A lipofilicidade do radiofármaco foi avaliada determinando o coeficiente de partição em n-octanol e solução salina (2,0 ml de n-octanol, 2,0 ml de sol. salina, 15µCi/20µl de IPPA-¹³¹I, agitando-se por 2 minutos e centrifugando-se 5 min. a 3000 rpm). A toxicidade do produto foi verificada num lote de ratos Wistar administrando-se doses 500 vezes maior que a dose empregada em humano (70 kg.), observando-se a ação do radiofármaco por 48 horas.

RESULTADOS

Os rendimentos de marcação variaram de 80-90 %, com uma pureza radioquímica de 98,50 - 95,00 % do 1^o e 10^o dia após a marcação respectivamente, utilizando-se o sistema cromatográfico em papel (14 X 1 cm) e de 96,31 - 92,50 % por eletroforese, no mesmo intervalo de tempo (Tabela 1).

Observou-se que na determinação por eletroforese em papel não houve uma boa separação entre o produto marcado e o $^{131}\text{I}^-$ livre (Figura 2). A Figura 3 ilustra o perfil dos cromatogramas realizados em papel Whatmann 3MM, apresentando o IPPA- ^{131}I um $R_f = 1.0$ e o $^{131}\text{I}^-$ um $R_f = 0.0$, verificando-se uma boa definição na separação. No estudo realizado por cromatografia em HPLC, o IPPA- ^{131}I apresentou um tempo de retenção $R_t = 2.5$ minutos e o $^{131}\text{I}^-$ $R_t = 7.0$ minutos (Figura 4).

TABELA 1

PUREZA RADIOQUÍMICA DO IPPA- ^{131}I
EM FUNÇÃO DO TEMPO (DIAS) APOS A MARCAÇÃO

TEMPO (dias)	ELETROFORESE	CROMATOGRAFIA PAPEL (14 x 1 cm)
1	* 96.31	98.50
2	95.50	98.30
4	94.70	97.40
6	94.00	96.60
8	93.00	96.10
10	92.50	95.00

* % (n=3)

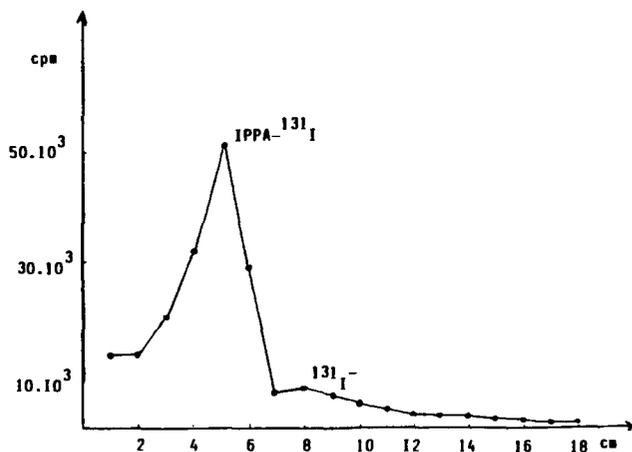


FIGURA 2 - PERFIL ELETROFORÉTICO DO IPPA- ^{131}I

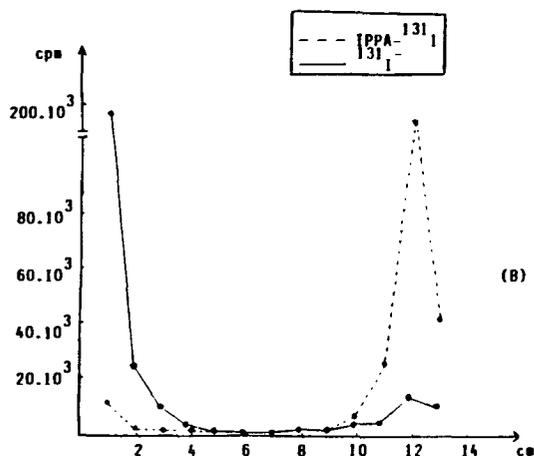


FIGURA 3 - CROMATOGRAMAS DO IPPA- ^{131}I EM PAPEL WHATMANN 3MM (14 X 1 cm)

TABELA 2

DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA DO IPPA- ^{131}I EM RATOS WISTAR EXPRESSO EM % DOSE/ORGÃO

Órgãos	Tempo (minutos)					
	0.5	2	5	10	30	60
Rins	1,11*	1,38	1,21	1,26	1,27	1,08
Fígado	0,83	1,52	1,69	1,64	1,04	0,78
Pulmão	1,25	1,37	0,95	0,93	0,64	0,53
Tireóide	0,36	0,47	0,54	0,64	0,70	0,54
Músculo	0,19	0,29	0,31	0,27	0,18	0,14
Coração	1,76	2,19	1,54	1,19	0,69	0,46
Estômago	0,19	0,28	0,39	0,50	0,54	0,52
Baço	0,40	0,59	0,67	0,65	0,48	0,38
Plasma (1 ml)	2,11	2,36	1,82	1,57	1,41	1,19
Sangue (1 ml)	1,87	1,46	1,05	0,97	0,71	0,63

* (n = 9)

TABELA 3

DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA DO IPPA- ^{131}I EM RATOS WISTAR EXPRESSO EM % DOSE /g TECIDO

Órgãos	Tempo (minutos)					
	0.5	2	5	10	30	60
Rins	1,11*	1,38	1,21	1,26	1,27	1,08
Fígado	0,83	1,52	1,69	1,64	1,04	0,78
Pulmão	1,25	1,37	0,95	0,93	0,64	0,53
Tireóide	0,36	0,47	0,54	0,64	0,70	0,54
Músculo	0,19	0,29	0,31	0,27	0,18	0,14
Coração	1,76	2,19	1,54	1,19	0,69	0,46
Estômago	0,19	0,28	0,39	0,50	0,54	0,52
Baço	0,40	0,59	0,67	0,65	0,48	0,38
Plasma (1 ml)	2,11	2,36	1,82	1,57	1,41	1,19
Sangue (1 ml)	1,87	1,46	1,05	0,97	0,71	0,63

* (n = 9)

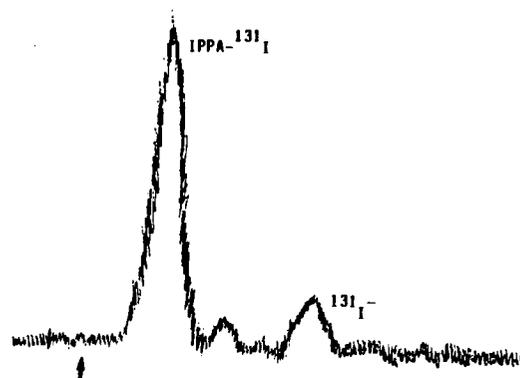


FIGURA 4 - RADIOCROMATOGRAMA EM HPLC DO IPPA- ^{131}I $R_t = 2.5$ min. (IPPA- ^{131}I) - $R_t = 7$ min ($^{131}\text{I}^-$)

Os ácidos graxos são transportados para o coração como ac. graxos livres, em pequenas quantidades principalmente como complexos de albumina ou complexos de triglicéridos com lipoproteínas hidrofílicas. Pelos dados apresentados nas Tabelas 2 e 3 pode-se estimar que, embora uma fração significativa do IPPA-¹³¹I seja transportada pelas proteínas séricas certa percentagem mostra-se ligada ao eritrócito (1,86 % dose/g em sangue aos 30 segundos decrescendo a 0,63% após 60 minutos). A captação do IPPA-¹³¹I pelo músculo cardíaco apresentou um pico máximo aos 2 minutos (2,37% dose/órgão). A reduzida hidrólise "in vivo" do IPPA-¹³¹I foi constatada pela baixa captação radioativa na tireóide e no estômago (0,06 - 0,93 % dose/órgão). A correlação coração/sangue foi de 1,50 e 1,47 aos 2 e 5 minutos respectivamente, atribuindo-se a lenta depuração sanguínea ao anestésico utilizado no ensaio biológico (uretana), ilustrada na Figura 5.[6]

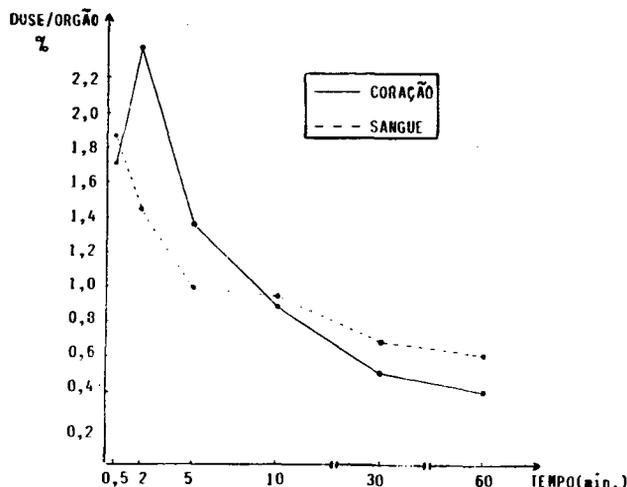


FIGURA 5 - CURVAS DE DECAIMENTO SANGUÍNEO E CARDÍACO DO IPPA-¹³¹I EXPRESSO % DOSE/ÓRGÃO

No estudo do coeficiente de partição verificou-se que 74,98 % do IPPA-¹³¹I foi extraído pela fase orgânica, o que resulta na alta captação hepática do radiofármaco (18,23% dose/órgão aos 2 minutos). No experimento "in vitro", comprovou-se a afinidade do IPPA-¹³¹I pelas células do músculo do miocárdio (11,36 % - n = 5).

A atoxicidade do radiofármaco foi evidenciada pelo comportamento normal dos animais durante 48 horas após a administração de doses 500 vezes superior àquelas utilizadas em humanos de 70 kg.

CONCLUSÃO

Pelos dados apresentados neste trabalho, pode-se concluir que: (1) o método de marcação utilizado proporciona um rendimento de marcação de 80 - 90% na obtenção de IPPA-¹³¹I, com uma pureza radioquímica de 98,50 % no primeiro dia e uma estabilidade de 10 dias (95,00%); (2) baixa deiodação "in vivo"; (3) lipofílico; (4) atóxico e (5) adequado para ser utilizado na obtenção de imagens cardíacas, principalmente para estudos dinâmicos do metabolismo do miocárdio.

REFERÊNCIAS

- [1] EVANS, J.R.; GUNTON, R.W.; BAKER, R.G.; BEANLANDS, D.S.; SPEARS, J.C.: Use of radiodinated fatty acid for photoscans of the heart. *Circ. Res.* 16, 1-10, 1965.
- [2] BIERWALTES, W.H.; ICE, R.D.; SHAW, M.J. and RYO, U.Y.: Myocardial uptake of labelled oleic and linoleic acids. *J. Nucl. Med.* 16: 842-845, 1975.
- [3] POE, N.D.; ROBINSON, G.D. and MACDONALD, N.S.: Myocardial extraction of labelled long-chain fatty acid analogues. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 148, 215-218, 1975.

[4] MACHULLA, H.C.; KNUST, E.J. and VYSKA, K.: Radiodinated fatty acid for cardiological diagnosis. *Appl. Radiat. Isot.* 37, 777-788, 1986.

[5] DOUGAN, H.; LYSTER, D.M. and VINCENT, J.S.: Efficient production of 15-(para-[¹²⁵I]iodophenyl) pentadecanoic acid. *Appl. Radiat. Isot.* 37, 919-921, 1986.

[6] MURAMOTO, E.; ACHANDO, S.S.; ARAUJO, E.B.; HAMADA, H.S.; GONÇALVES, R.S.V.; PEREIRA, N.P.S. e SILVA, C.P.G.: Influência do anestésico (éter etílico e uretana) sobre alguns radiofármacos renais. *Publicação IPEN 287*, 1990.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem a colaboração dos técnicos Alfredo dos Santos, Ananias Fagundes Dias e José Antônio Trindade Pires. (IPEN/CNEN-SP)

ABSTRACT

The 15-(p-¹³¹I iodophenyl) pentadecanoic acid (IPPA-¹³¹I) as myocardial imaging agent have been used in Nuclear Medicine. The labelling method was based according to Dougan et. al. reports. The radiochemical purity was determined by: (1) paper chromatography, (2) electrophoreses and (3) high liquid pressure chromatography (HPLC). The radiochemical purity was 95.00 - 98.50 %, with an stability of 10 days. The biological studies were evaluated in Wistar rats. After endovenous injection the animals were sacrificed, the different organs were removed, washed and the radioactivity measured. The affinity of IPPA-¹³¹I by the cardiac muscle and the lipophilicity were realized "in vitro" studies. The toxicity was determined in rats, with higher doses (500 times) than used in human diagnosis.