

**MARCAÇÃO DA N-ISOPROPIL-p-IODOANFETAMINA COM ^{123}I (^{123}I -IAMP).
CONTROLES RADIOQUÍMICO E BIOLÓGICO.
AVALIAÇÃO EM ANIMAIS DE MÉDIO PORTE.**

Colturato, M.T.; Muramoto, E.; de Barboza, M.R.F.; de Pereira, N.P.S.;
da Silva, C.P.G. e de Carvalho, O. G.

**Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN)
Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN)
Caixa Postal - 11049 - Pinheiros
CEP: 05508-900 - São Paulo - Brasil**

RESUMO

A n-isopropil-p-iodoanfetamina (IAMP) é uma amina com probabilidades físico-químicas adequadas que permite cruzar a barreira hematoencefálica, possibilitando dessa forma, os estudos das funções cerebrais e avaliação do fluxo cerebral regional. A marcação da IAMP é um processo de substituição nucleofílica isotópica com o Iodo-123, onde o ácido ascórbico é utilizado como agente redutor e o cobre-I como catalizador. A pureza radioquímica foi avaliada por cromatografia ascendente em papel e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A biodistribuição do radiofármaco foi realizada em ratos da raça Wistar os quais foram sacrificados em diferentes tempos, após a administração intravenosa da dose. A captação do ^{123}I -IAMP, no sangue e diferentes órgãos, foram determinadas em %dose/órgão. Imagens cintilográficas foram obtidas para avaliação do fluxo sanguíneo cerebral em coelho.

INTRODUÇÃO

As aminas são compostos lipofílicos que são extraídos do cérebro, na proporção do fluxo sanguíneo. Possuem bastante lipofilicidade para difundir passivamente pela barreira hematoencefálica¹.

Winchell et al. Pesquisaram e observaram que dentro do grupo da iodoanfetamina, a n-isopropil-p-iodoanfetamina (IAMP) mostrou uma alta captação cerebral e uma lenta saída do cérebro² (Figura 1).

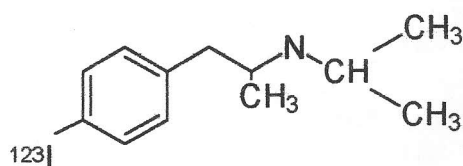


Figura 1. Estrutura da IAMP

Estudos tomográficos com imagem de SPECT, revelam a importância clínica da ^{123}I -IAMP, pois este radiofármaco delinea muito bem zonas isquêmicas melhor que as imagens encontradas em Tomografia Computadorizada. É também utilizada para diagnosticar demência de múltiplo enfarte ou demência senil (Alzheimer), esquizofrenia e psicose maníaco depressiva^{1,3,4,5}. Estudos clínicos ainda mostram uma captação da ^{123}I -IAMP na detecção de melanoma maligno ocular⁶.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de marcação da ^{123}I -IAMP simples e rápido, com pureza radioquímica, pirogênica e microbiológica adequada, para injetar intravenosamente em humano, obtendo imagens cerebrais necessárias às recorrências clínicas.

MATERIAL E MÉTODOS

A técnica utilizada na marcação da IAMP (EMKA-CHEMIE) com o radioiodo se dá por substituição nucleofílica em presença de Cu(I) como agente catalizador e o ácido ascórbico como agente redutor.

A técnica segundo Godoy et al.⁷, consiste em colocar em um frasco de reação de fundo cônico:

- ◆ 2 - 4 mg de IAMP + 50 μl de água
- ◆ 50 μl da solução de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- ◆ 10 μl da solução de ácido ascórbico
- ◆ 50 - 100 μl da solução aquosa de Iodo-123
- ◆ reação à temperatura de 170 - 175 °C por 20 minutos
- ◆ ressuspender com solução fisiológica
- ◆ passar por resina aniônica (Lewatit 400), se necessário

O Iodo-123 é obtido do Cíclotron CV-28 - IPEN pela reação $^{124}\text{Te}(p,2n)^{123}\text{I}$.

A pureza radioquímica da ^{123}I -IAMP foi determinada por⁸:

- 1- Cromatografia ascendente em papel Whatman 3MM (10 X 1 cm) utilizando como solvente a mistura Clorofórmio:Metanol:Ácido Acético Glacial (85:15:1). As contagens foram determinadas em um contador de radiação gama tipo poço ANSR-Abbott.

2- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando:

- a) Coluna Partisil 10 ODS-1 RP-C₁₈ - Whatman (4,6 X 250 mm)
- b) Detector UV/Visível - Waters 486
- c) Radiocromatógrafo com célula de radiação gama - Raiomatic™ 150 TR - Packard
- d) Integrador - Waters 746
- e) Bomba de Solvente - Waters 600 E

A verificação da pureza radioquímica por CLAE foi realizada de acordo com as condições:

- Solvente → Etanol:H₂O:Acetato de Amônio:Ácido Acético Glacial (55:43:1:1)
- Fluxo = 1,0 ml/min, 254 nm, 10 µl da ¹²³I-IAMP (0,22 MBq)

A pureza isotópica da IAMP foi determinada por CLAE, utilizando-se o sistema descrito e as seguintes condições:

- Solvente → Etanol:H₂O:NH₄OH (60:40:1)
- Fluxo = 1,4 ml/min, 254 nm, 10 µl de solução aquosa de IAMP

Todos os solventes utilizados na avaliação da pureza radioquímica e isotópica apresentam as características necessárias de acordo com os testes realizados. A água utilizada na CLAE foi obtida de um purificador de água tipo MILLI-RX 45 da Millipore.

O controle biológico da ¹²³I-IAMP foi realizado em ratos adultos da raça Wistar com peso médio em torno de 200g, a qual foi administrado por via endovenosa uma dose média de 2,22 MBq (60 µCi/0,1 ml) por animal. Os animais foram sacrificados nos tempos de 5, 15, 30, 60, 240 e 1440 minutos após dose e em número de 3 animais por tempo. Foram coletadas amostras sanguíneas e, retirados e lavados os seguintes órgãos: pulmão, coração, tireóide, olho, cérebro, quiasma óptico, fígado, estômago, baço, rins, intestinos (cheio), músculo (pata trazeira) e bexiga. A captação das amostras sanguíneas e dos órgãos foram determinadas em um contador de radiação gama tipo poço BERTHOLD - MAG 312.

Imagens cintilográficas foram obtidas para avaliação do fluxo sanguíneo cerebral em coelho da raça New Zealand pesando 3,6 Kg (sem anestésico) com uma aplicação por via endovenosa da dose de 55,5 MBq (1,5 mCi/0,7 ml) do radiofármaco. O equipamento utilizado é uma Gama Câmara Modelo MB-9200 e as imagens obtidas encontram-se nas posições frontal (20 min.) e lateral (50 min.) após dose.

RESULTADOS

O rendimento de marcação obtido foi em torno de 80-90%.

A pureza radioquímica determinada por cromatografia em papel ficou em torno de 95-98%, apresentando Rf do ¹²³I⁻ = 0,0 cm e Rf da ¹²³I-IAMP = 0,9-1,0 cm (Figura 2).

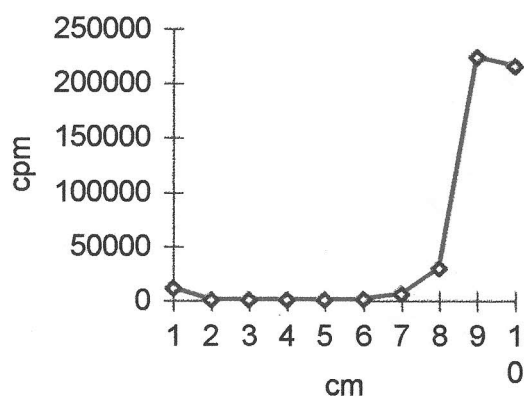


Figura 2 - Pureza Radioquímica ^{123}I -IAMP determinada em papel

Observa-se no radiocromatograma da Figura 3 dois picos, o primeiro com TR = 3,5 min. e o segundo com TR = 6,33 min., sendo respectivamente o $^{123}\text{I}^-$ e ^{123}I -IAMP (TR = Tempo de Retenção).

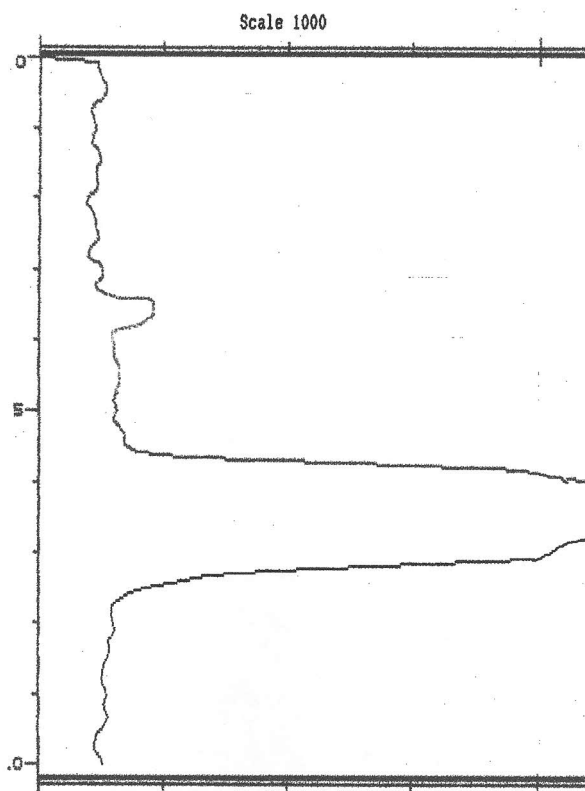
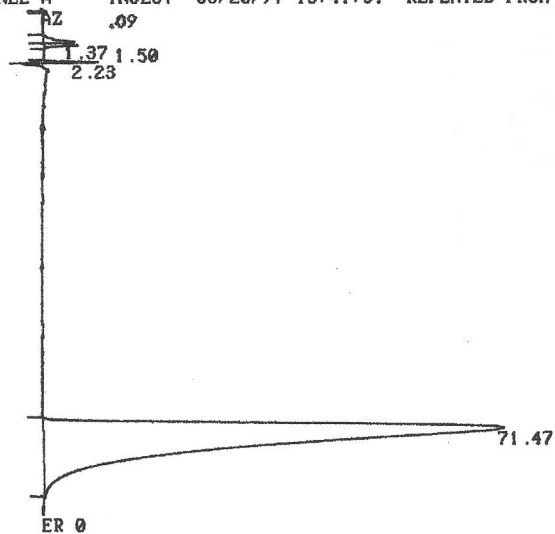


Figura 3- CLAE do ^{123}I -IAMP

O cromatograma da Figura 4 corresponde ao resultado da pureza isotópica da IAMP, o qual observa-se um único pico com TR = 71,47 min.

CHANNEL A INJECT 03/20/97 15:41:51 REPLAYED FROM BIN # 1



FILE	METHOD	RT	AREA BC
1.	0.	3	3
1	0.006	0.09	674 01
2	0.201	1.37	20900 02
3	0.122	1.5	12726 03
4	0.164	2.23	17070 01
5	99.506	71.47	10347011 01

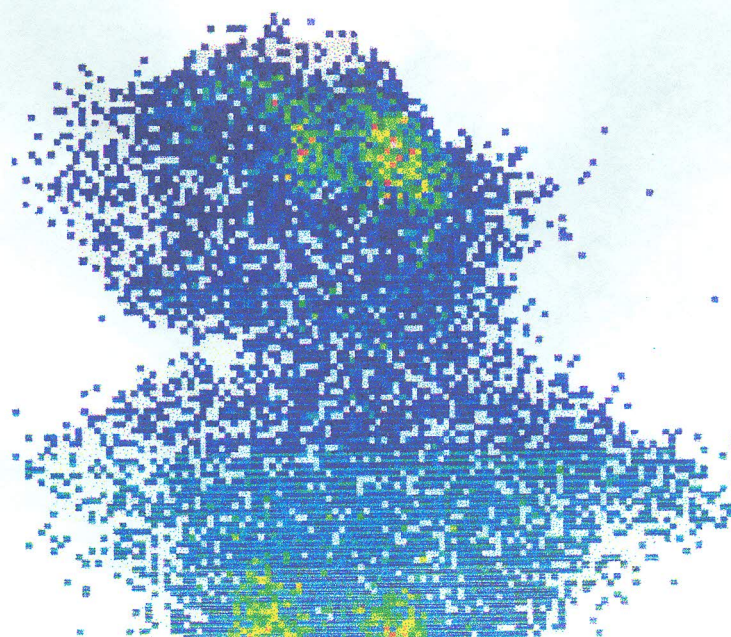
Figura 4- CLAE do sal IAMP

As contagens obtidas durante a distribuição biológica encontram-se na Tabela 1.

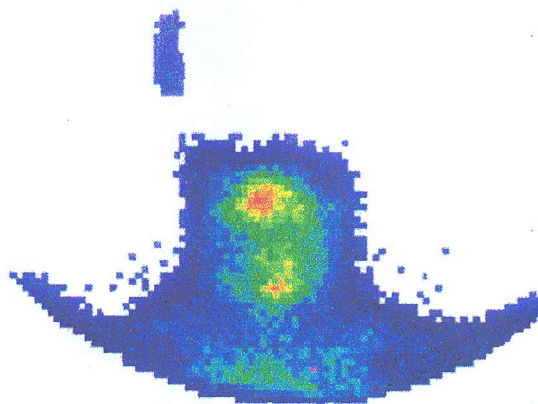
Tabela 1- % Dose/órgão da ¹²³I-IAMP

TEMPO (min.) ÓRGÃOS	05	15	30	60	240	1440
PULMÃO	10,85±0,51	10,13±1,59	6,11±1,71	5,19±0,22	3,20±0,24	2,20±0,13
CORAÇÃO	1,16±0,03	0,81±0,17	0,55±0,44	0,51±0,04	0,33±0,06	0,15±0,04
TIREÓIDE	0,05±0,007	0,07±0,00	0,05±0,02	0,07±0,01	0,12±0,01	0,61±0,09
OLHO	0,20±0,005	0,27±0,01	0,36±0,04	0,43±0,17	1,20±0,61	1,08±0,27
QUIASMA ÓPTICO	0,02±0,007	0,03±0,01	0,03±0,01	0,05±0,01	0,08±0,01	0,02±0,01
FÍGADO	8,66±0,98	11,77±1,13	13,9±0,56	14,28±0,21	8,50±0,12	3,26±0,38
ESTÔMAGO	0,35±0,09	0,44±0,05	0,48±0,07	0,75±0,08	0,76±0,13	0,28±0,06
BAÇO	0,25±0,04	0,61±0,06	0,78±0,09	0,77±0,17	1,09±0,51	0,23±0,02
RINS	3,94±0,20	3,62±0,48	2,90±0,14	3,28±0,31	2,53±0,49	0,87±0,24
BEXIGA	0,03±0,01	0,04±0,01	0,03±0,00	0,03±0,007	0,30±0,09	0,04±0,01
MÚSCULO	0,24±0,04	0,64±0,07	0,22±0,00	0,24±0,04	0,20±0,01	0,04±0,01
CORTEX	1,28±0,09	1,59±0,06	1,82±0,20	2,22±0,32	1,55±0,75	0,71±0,04
CEREBELO	0,26±0,02	0,35±0,05	0,33±0,05	0,34±0,06	0,30±0,09	0,11±0,00
STRIATUM	0,25±0,02	0,24±0,03	0,24±0,02	0,28±0,05	0,23±0,00	0,08±0,01
INT. DELG.	6,83±0,007	7,32±0,54	7,05±0,89	8,12±1,00	12,11±0,66	5,18±0,78
INT. GROS.	1,54±0,08	2,65±0,32	4,01±0,89	3,37±0,14	2,03±0,11	0,73±0,20
SANGUE (1,0 ml)	0,21±0,02	0,15±0,00	0,17±0,02	0,16±0,02	0,13±0,01	0,08±0,007
PLASMA (1,0 ml)	0,20±0,005	0,20±0,00	0,30±0,00	0,30±0,005	0,40±0,005	0,20±0,005

As imagens cintilográficas encontram-se visualizadas na Figura 5.



LATERAL (50 MIN. APÓS DOSE)



FRONTAL (20 MIN. APÓS DOSE)

Figura 5- Imagens Cintilográficas em Coelho da ^{123}I -IAMP

DISCUSSÃO

A técnica de marcação segundo Godoy et al⁷ demonstra ser simples, rápida e de bom rendimento, quando comparada a outras técnicas, facilitando o manuseio e segurança do operador. A preparação relativamente rápida permite a obtenção do ^{123}I -IAMP com níveis aceitáveis de impureza radionuclídica do Iodo-124, oriunda do processo de produção do Iodo-123 em Cíclotron a partir da reação (p,2n) tendo como alvo o Telúrio-124.

A ^{123}I -IAMP foi obtida com uma porcentagem de pureza radioquímica ideal para utilização em humanos.

A cromatografia em papel mostrou ser um método rápido, barato e confiável para determinação da pureza radioquímica em produção rotineira, uma vez que os resultados obtidos com este método foram compatíveis com os obtidos com CLAE.

O cromatograma da Figura 4, mostra que o sal IAMP ou p-IAM encontra-se sem o contaminante isotópico o-IAM, indicando ser um sal puro e adequado para a marcação, pois o produto necessita ser p-IAM para apresentar uma captação ideal no cérebro⁹.

De acordo com a Tabela 1, observa-se que logo aos 5 min. há 10,85% no pulmão e após uma hora cai para a metade, segundo Helman¹⁰ estudos clínicos sugerem que a captação no cérebro da ¹²³I-IAMP é influenciada pelo clareamento do pulmão. Com relação as tres regiões do cérebro o máximo de captação ocorre aos 60 min. (2,84%), ficando mais uma vez comprovado que o sal encontra-se como p-IAM como demonstra Baldwin et al⁹, observa-se também que o cerebelo e o striatum não apresentam uma alta captação como o cortex, mantendo-se praticamente com porcentagens constantes.

O fígado apresenta um máximo de captação aos 60 min. (14,28%) e decai a 3,26% 24 horas após dose. Observa-se que conforme há um clareamento no fígado há um acrescimo nos intestinos, tendo seu pico aos 240 min. após dose (14,14%). Há um decrescimo da porcentagem com 24 horas provavelmente por ter sido eliminado pelas fezes, porém não fizemos a coleta das mesmas para poder confirmar.

A ¹²³I-IAMP demonstra ser estável *in vivo*, de acordo com as baixas captações que apresentam a tireóide e o estômago.

As imagens cintilográficas realizadas em coelho (Figura 5) apresentam uma boa captação no cérebro e um pouco no pulmão como encontrado por Helman¹⁰ e Dewey¹¹.

Com os resultados obtidos o radiofármaco ¹²³I-IAMP será utilizado em humano, pois demonstrou estar em perfeitas condições de uso para aplicação clínica na obtenção de imagens cerebrais.

BIBLIOGRAFIA

1. Holmes, R.A.. A reawakening of interest in radionuclide brain imaging. *J. Nucl. Med.*, **27**:299-301, 1986.
2. Cohen, M.B.; Graham, L.S.; Lake, R.; Metter, E.J.; Fotten, J.; Kulkarni, M.K.; Levrin, R.; Yamada, L.; Chang, C.C.; Woodruff, N. and Kling, A.S.. Diagnosis of Alzheimer's Disease and Multiple Infarct Dementia by Tomographia Imaging of Iodine-123 IMP. *J. Nucl. Med.*, **27**:769-774, 1986.
3. Hoshi, H.; Jinnouchi, S.; Watanabe, K.; Ueda, T.; Kinoshita, K.; Yamagughi, T. and Takara, Y.. Biodistribution of N-isopropyl-p-iodoamphetamine in Mice. *J. Nucl. Med.*, **15**:127-131, 1988.
4. Holman, B.L.; Zimmerman, R.E.; Schapiro, J.R.; Kaplan, M.L.; Jones, A.G. and Hill, T.C.. Biodistribution and Dosimetry of N-Isopropyl-p-¹²³I]iodoamphetamine in the Primate. *J. Nucl. Med.*, **24**:922-931, 1983.
5. Baldwin, R.M. and Wu, J.L.. *In vivo* chemistry of iofetamine HCl Iodine-123 (IMP). *J. Nucl. Med.*, **29**:122-124, 1988.
6. Holman, B.L.; Hill, T.C.; Lee, R.G.L.; Zimmerman, R.E.; Moore, S.C. and Royal, H.D.. Brain Imaging with Radiolabeled Amines. *Nucl. Med. Anual*, 131-164, 1983.
7. Godoy, N.; Reveco, P.; Mena, P. and Gil, M.C.. Sintesis de Marcacion y Biodistribucion de N-Isoprpyl-¹²³I-p-iodoamphetamine (¹²³IAMP). *Nucleotecnica*, ano 6, **10**:15-22, 1986.
8. Angelberger, P.; Löffler, M.W.; Hruby, E. and Hoter, O.. Radiochemical and Analytical Aspects in Optimized preparation of I-123-N-isopropyl-p-iodoamphetamine (I-123-pIAM), II-P-4, A-2444, Austria, 122-124.
9. Balwin, R.M.; Lin, T.H. and Wu, J.L.. Synthesis and Brain Uptake of Isomeric 123I-Iodoamphetamine Derivatives. California, 94608, p.35-36.
10. Helman, B.L.. SPECT of the Brain and Heard - Future Directions, *J. Nucl. Med.*, **21**:567-570, 1988.
11. Dewey, S.H. and Leonard, J.C.. Ocular Melanoma: Detection Using Iodine-123-Iodoamphetamine and SPECT Imaging. *J. Nucl. Med.*, **31**:375-377, 1990.