

"ESTUDO "IN VIVO" AND "IN VITRO" DO ÁCIDO 2,6-DIISOPRO-
PIL FENILCARBOILMETIL IMINODIACÉTICO MARCADO COM ^{99m}Tc .
(DISIDA- ^{99m}Tc).

Diana Yolanda Freire Martinez *, Märycel Figols de Barbo-
za, Emiko Muramoto, Setsuko Sato Achando e Constância Pa-
gano Gonçalves da Silva.

* Bolsista da IAEA Dirección General de Energia Nuclear-
Guatemala

Diretoria de Aplicação de Técnicas Nucleares
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Comissão Nacional de Energia Nuclear - SP

Sumário:

Foi realizado um estudo "in vivo" e "in vitro" do DISIDA- ^{99m}Tc a ní-
vel hepatobiliar. Avaliou-se a ligação às proteínas plasmáticas e a que
fração ocorre esta ligação. O coeficiente de partição em n-octanol/sol.
salina foi de 0,41 demonstrando a lipofilicidade do composto. As ima-
gens obtidas em ratos indicam o comportamento de distribuição biológica
assim como a eliminação do radiofármaco na forma inalterada a nível he-
patobiliar.

Abstract:

The "in vivo" and "in vitro" studies on DISIDA- ^{99m}Tc at the hepato-
biliary level were made. The binding of DISIDA- ^{99m}Tc to plasmatic
proteins and the fraction at which this binding occurs were determined.
The distribution coefficient in n-octanol/saline solution was 0.41
showing the lipophilicity of the compound.

The images in rats show the biological distribution as well as the
hepatobiliary clearance of the radiopharmaceutical under its
unmetabolized form.

INTRODUÇÃO:

Dado o desenvolvimento recente de agentes hepatobiliares marcados com ^{99m}Tc , há busca constante de radiofármacos que permitam melhorar a qualidade de imagens na sua aplicação em Medicina Nuclear.

Muitos complexos de ^{99m}Tc tem sido propostos para esse fim incluindo a penicilina (1), tetraciclina (2), ácido mercaptobutírico (3), piridoxilidenedeglutamato (4), e mais de 30 derivados do ácido iminodiacético (IDA) (5). Entre os derivados, os mais utilizados na atualidade são: 2,6 dimetil IDA (HIDA), 2,6 dietil IDA (EHIDA), 2,6 diisopropil IDA (DISIDA) e para-butil IDA (BIDA) pela fácil disponibilidade na forma de conjuntos de reativos liofilizados (6).

As propriedades ideais de um radiofármaco para obter imagens das vias biliares são: rápida extração do sangue pelo fígado, baixa excreção urinária, rápida excreção pelo conduto biliar, não ser reabsorvido pelo intestino e ser de fácil preparação.

Esses derivados do IDA apresentam uma captação elevada pelo fígado e um trânsito rápido para as vias biliares, sendo às vezes excretado pelo rim, diminuindo assim a eficiência e qualidade do ensaio.

Existem vários fatores que intervêm na diminuição da excreção renal da droga, a saber: aumento do peso molecular, formação de complexos, aumento da lipofilicidade e ligação às proteínas plasmáticas (7,8,9,10).

O HIDA tem peso molecular 367, com terminações lipofílicas e hidrofílicas separadas consideravelmente. A quelação com ^{99m}Tc provavelmente forma um dímero decrescendo a natureza hidrofílica do grupo carboxílico e duplicando o peso molecular do composto. A substituição do grupo metil pelo etil aumenta o peso molecular e a lipofilicidade e a substituição pelo grupo 'para' modifica a polaridade. Subramanian e col. e Wiestow e col. (5,15) demonstraram que ao substituir o grupo metil pelo isopropil há aumento do peso molecular e aumento na lipofilicidade (coeficiente de partição octanol/água do metil IDA = 0,038). Isto implica no aumento da captação biliar com uma redução da excreção renal.

Devido a essas diferenças nas propriedades químicas e no comportamento biológico dos diversos derivados do IDA, nos propusemos a estudar 'in vitro' e 'in vivo' o DISIDA- ^{99m}Tc , a nível hepatobiliar.

MATERIAIS E MÉTODOS:

DISIDA- ^{99m}Tc : o 2,6 diisopropil IDA utilizado neste estudo foi sintetizado e preparado na forma de conjuntos de reativos liofilizados na Divisão de Radiofarmácia do Departamento de Processamento do IPEN-CNEN/SP, de acordo aos trabalhos de Elena Hamada e col. (11).

Cada frasco liofilizado contém 20mg de DISIDA e 0,5 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ como agente redutor do íon pertecnetato. A marcação foi realizada adicionando 3 a 5ml de uma solução de TcO_4^- eluído esterilmente de um gerador de ^{99}Mo - ^{99m}Tc , produzido no Departamento de Processamento do IPEN-CNEN/SP; o pH do complexo formado é de 5,5.

A pureza radioquímica foi determinada por meio de cromatografia ascendente em papel Whatman nº 3, 30 minutos após a marcação, para favorecer a formação de bicomplexos (12), usando como solvente metanol 85% e cloreto de sódio 30%, que separa adequadamente o Tc hidrolizado ou coloide e o TcO_4^- (livre).

Animais: foram utilizados ratos adultos da raça Wistar com peso médio 250 gramas, mantidos no Biotério do IPEN-CNEN/SP. Os animais foram anestesiados com uma solução de uretana (100 mg/ 100 g de peso corporal) via intraperitoneal.

LIGAÇÃO ÀS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS:

A porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas foi determinada 'in vitro' em soro de ratos que foram injetados com 100 μ Ci de DISIDA-^{99m}Tc, intravenosamente. As amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca 5, 10 e 30 minutos após a dose administrada; o soro foi separado por centrifugação e as diferentes alíquotas foram submetidas a dois procedimentos analíticos: a. precipitação de proteínas com ácido tricloroacético (TCA 10%), b. eletroforese em gel de poli-acrilamida para verificar em qual fração das proteínas a droga se encontra ligada.

a. Precipitação de proteínas com ácido tricloroacético (TCA 10%): A 400 μ l do soro adicionaram-se 400 μ l de TCA 10% a 4°C para precipitar as proteínas plasmáticas. A radioatividade total do soro foi determinada num contador gama, tipo poço, ABBOTT (ANSR) automático. A seguir o soro foi centrifugado a 3000 rpm durante 15 min. a 4°C e o sobrenadante foi descartado e o precipitado retornado com NaOH 4N para manter a geometria de contagem nos tubos. A radioatividade foi contada novamente e a % de ligação calculada de acordo com a seguinte expressão:

$$\% \text{ (ligação)} = \frac{\text{cpm precipitado}}{\text{cpm precipitado} + \text{cpm sobrenadante}} \times 100$$

b. Eletroforese em gel de poli-acrilamida: A fim de verificar em qual fração das proteínas plasmáticas a droga está ligada, realizou-se uma cromatografia em gel de poli-acrilamida com amostras de soro obtidas aos 5, 10 e 30 min. após administração do traçador. Foram analisados paralelamente o comportamento eletroforético da: a. albumina-^{99m}Tc, b. DISIDA-^{99m}Tc para confirmar a corrida (RF) da albumina e do DISIDA-^{99m}Tc, no mesmo sistema.

A técnica utilizada baseou-se no trabalho de Davis (13) que consistiu em separar 10 μ l das amostras em colunas de gel de poli-acrilamida de 12 x 0,5cm, usando-se tampão tris-Glicina 0,4M, pH 8,3, 250V durante 90 minutos a 4°C.

Todas as amostras foram feitas em duplicatas. Para revelar as proteínas utilizou-se uma solução de Ponceau S em TCA 5%, dando uma coloração azul proporcional à concentração. Cada coluna de gel foi cortada em 18 segmentos de 0,5cm e a radioatividade destes foi medida num contador gama automático ABBOTT (ANSR).

ESTABILIDADE IN VIVO DA DISIDA-^{99m}Tc.

Um grupo de 10 ratos Wistar foram submetidos a uma cirurgia abdominal com o intuito de canular o colédoco e coletar a bilis. Injetaram-se intravenosamente 100 μ Ci de DISIDA-^{99m}Tc. As amostras biliares foram coletadas aos 5, 15, 30, 60 e 90 minutos após a administração do traçador. Estas amostras biliares foram analisadas por cromatografia ascendente em papel Whatman 3 (8 x 1cm) nos sistemas metanol 85% e cloreto de sódio 30% a fim de verificar a estabilidade do produto na bilis.

Um 'pool' do conteúdo biliar marcado obtido nos diferentes tempos foi reinjetado intravenosamente em 3 ratos Wistar, para estudar o comportamento da bilis marcada a nível hepatobiliar.

Outro grupo de ratos (controle) foram injetados por via intravenosa com 100 μ Ci de DISIDA-^{99m}Tc. Realizaram-se estudos comparativos de distribuição biológica entre estes dois grupos de animais, por meio de cintilografia linear serial, num cintilador da Nuclear Chicago (Pho-Dot) desde 5 minutos após a administração do produto marcado.

DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO:

O coeficiente de partição foi determinado no sistema n-octanol-água/sol. sal

na, onde o octanol é o solvente hidrofóbico e a solução salina hidrofílica.

Diluíram-se 50 µl de DISIDA-^{99m}Tc em 5 ml de solução salina. A 1 ml desta mistura adicionou-se 1 ml de n-octanol agitando-se por 1 min., centrifugou-se durante 5 min. a 300 rpm. As fases foram separadas e foi determinada a radioatividade em 10 µl de cada fase, num contador gama.

O coeficiente de partição foi determinado pela relação da medida da atividade em n-octanol e sol. salina.

$$\text{Coeficiente de partição} = \frac{\text{cpm n-octanol}}{\text{cpm sol. salina}}$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Pureza radioquímica: nos controles radioquímicos realizados por cromatografia ascendente em papel 30 min. após a adição do pertecnetato de sódio, obteve-se em média 95% de pureza radioquímica.

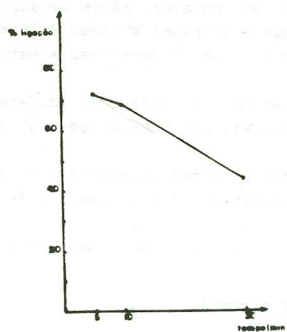
A porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas calculada nos diferentes tempos (5, 10 e 30) estão ilustrados na Tabela I.

TABELA I

Tempo (min.)	% Ligação
5	77,35
10	69,78
30	44,22

Observa-se aos 5 minutos uma ligação de 77,35% decrescendo a 44,22% aos 30 min. Estes resultados estão ilustrados no gráfico 1.

GRÁFICO I



Porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas

Na eletroforese em gel de poliacrilamida revelou-se que a DISIDA-^{99m}Tc encontra-se ligada às proteínas plasmáticas, na fração albumina (10), como está ilustrado no gráfico II.

Por estar ligada à proteína plasmática a captação renal da DISIDA-^{99m}Tc é diminuída conforme trabalhos de Smith e col. (8).

Os resultados da estabilidade da DISIDA-^{99m}Tc em bilis de ratos nos diferentes tempos, mostra que após 90 min. 94,11% do complexo DISIDA-^{99m}Tc está inalterado, (Tabela II)

TABELA II

Tempo (min.)	DISIDA- ^{99m} Tc (%)	TcO ₄ ⁻ (%) ⁴
5	95,09	4,91
15	94,37	5,63
30	92,72	7,28
60	94,04	5,96
90	94,11	5,89

Nas figuras II e III apresentam-se os mapas realizados em ratos injetados intravenosamente com o conteúdo biliar marcado e com DISIDA-^{99m}Tc, respectivamente. O estudo comparativo entre os dois grupos de animais evidencia a estabilidade 'in vivo' da droga, o que sugere que ela foi excretada na sua forma radioquímica original, não sofrendo dissociação e metabolização (14). Não foi observada concentração do radiofármaco no estômago ou baço, que são sítios de captação do íon TcO₄⁻ e Tc hidrolizado ou colóide, respectivamente.

O coeficiente de partição octanol/sol salina obtido (0,42), estão de acordo com os trabalhos de Molter e Kloss, (7).

Na tabela III estão ilustrados os resultados dos coeficientes de partição encontrados.

TABELA III

Produto	% octanol	% sol. salina	C.P
DISIDA- ^{99m} Tc	28,86	71,14	*0,41

* média de 6 determinações.

CONCLUSÃO:

Pelos resultados obtidos neste estudo, foi demonstrado que o DISIDA-^{99m}Tc é transportado pelas proteínas plasmáticas, principalmente pela albumina, quando injetado intravenosamente em ratos. O coeficiente de partição em n-octanol/sol. salina foi de 0,41, demonstrando a propriedade lipofílica do composto.

GRAFICO Nº 2

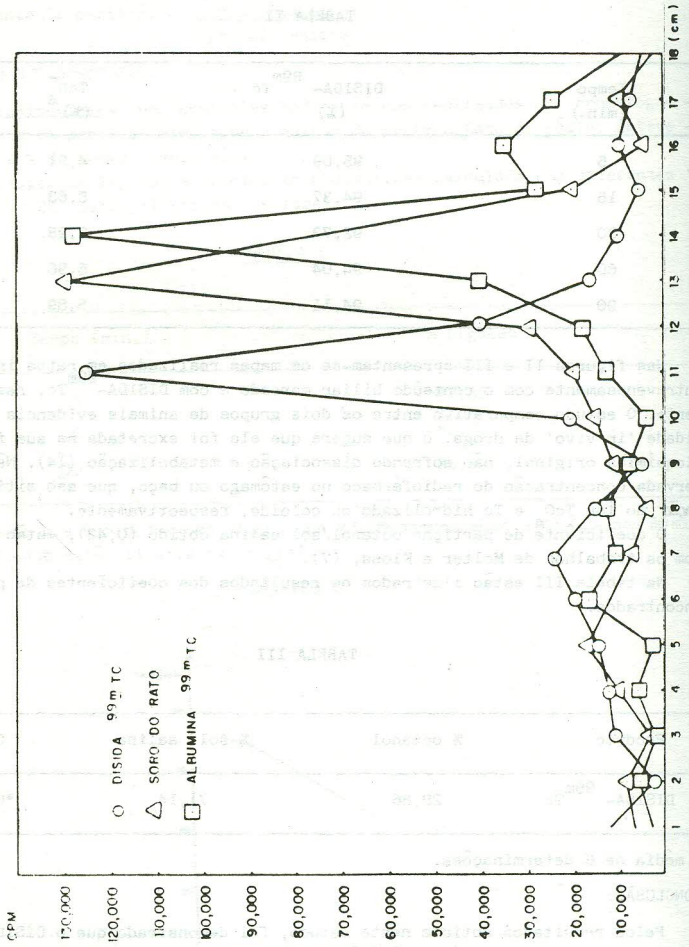
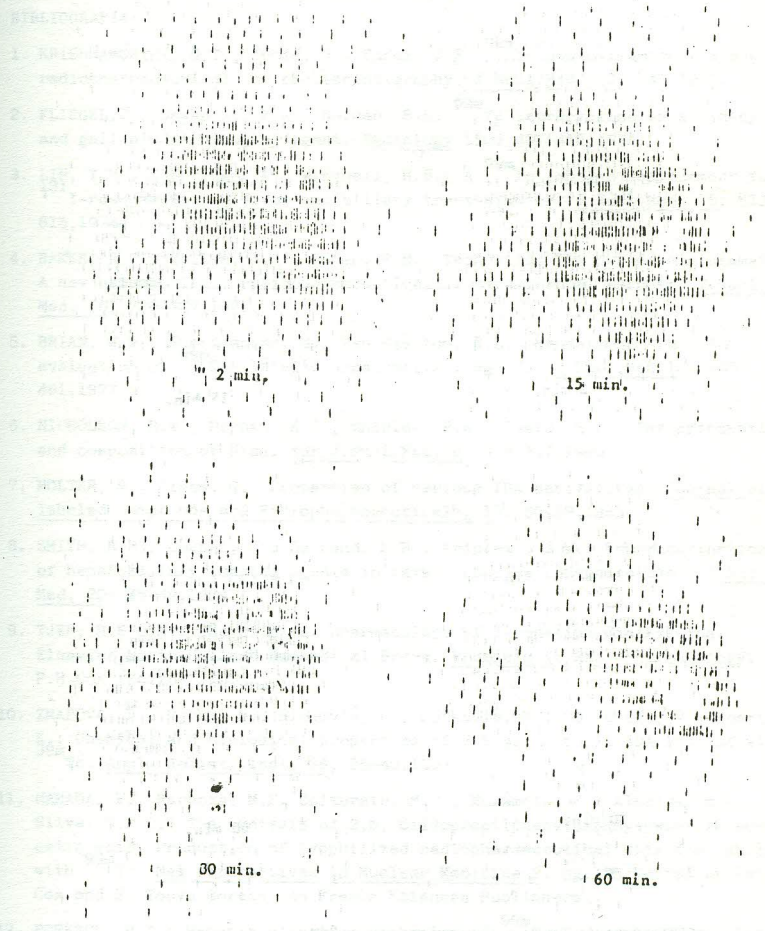
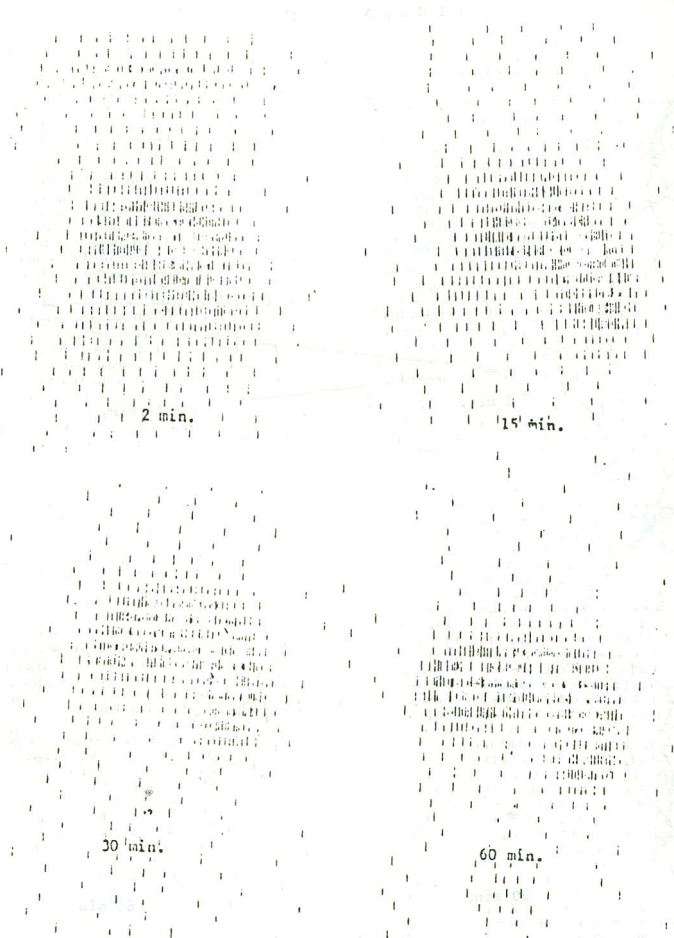


FIGURA II



CINTILOGRAFIA EM RATO WISTAR DO CONTEÚDO BILIAR MARCADO COM DISIDA- ^{99m}Tc .

FIGURA I



CINTILOGRAFIA EM RATO MISTAR DA DISIDA-^{99m}Tc

As imagens obtidas nos dois grupos de animais, indicam um comportamento de distribuição biológica similar, confirmando que o radiofármaco não é metabolizado a nível hepatobiliar.

AGRADECIMENTO:

Os autores agradecem a colaboração técnica de Rosângela do Rocio Arkaten e Alfredo dos Santos.

BIBLIOGRAFIA:

1. KRISHNAMURTHY, G.T., Tubis, M., Endow, J.S. ^{99m}Tc -penicillamine - a new radiopharmaceutical for cholescintigraphy. J.Nucl.Med. 13: 447,1972.
2. FLIEGEL, C., Dewanjee, M.K., Holman, B.L. ^{99m}Tc tetracycline as a kidney and gall bladder imaging agent. Radiology 110: 407-412,1974.
3. LIN, T.H., Khentigen, A., Winchell, H.S.: A ^{99m}Tc labeled replacement for ^{131}I -rose bengal in liver and biliary tract-studies. J.Nucl.Med. 15: 613-615,1974.
4. BAKER, R.J., Bellen, J.C., Ronan, P.M.: Technetium-99m pyridoxalglutamate A new hepatobiliary radiopharmaceutical. I experimental aspects. J.Nucl. Med. 16: 720-727,1975.
5. BRIAN, W.W., Subramanian, G., Van Heertum, R.L., Henderson, R.W.: An evaluation of ^{99m}Tc - labeled hepatobiliary agents. J.Nucl.Med 18: 455-461,1977.
6. NICHOLSON, R.W., Hernan, K.J., Shields, R.A., Testa, H.J.: The preparation and composition of Hida. Eur.J.Nucl.Med. 5, 313-317,1980.
7. MOLTER, M., Klass, G.: Properties of various IDA derivatives. Journal of labeled compounds and Radiopharmaceuticals, 18: 56-58,1981.
8. SMITH, R.B., Coupal, J., De Land, F.H., triplett, J.W.: Pharmacokinetics of hepatobiliary imaging agents in rats: (concise communication). J.Nucl. Med. 20: 45-49,1979.
9. TJEN, H.S.L.M.: The clinical pharmacology of technetium diethyl-ida. Elsevier North-Holland Biomedical Press. Progress in Radiopharmacology, P.H.Cox (Editor),1979.
10. ZMABOVA, B., Djoká, D., Ninkoviá, D., Ninkoviá, D., Obradović, V., Kostić, K.: Chemical and biological properties of 2,6 diisopropil IDA labeled with ^{99m}Tc . Appl. Radiat..Isot. 38, 35-40,1987.
11. HAMADA, E., Barboza, M.F. Colturato, M.T., Muramoto, E., Almeida, M.A., da Silva, C.P.G.: The syntesis of 2,6, diisopropilphenylcarbonylmethyliminodiacetic acid. Production of lyophilized radiopharmaceutical kits for labeling with ^{99m}Tc . New Perspectives in Nuclear Medicine 2. pg.135 Edited by Peter Cox and E. Touya-Gordon and Breach Sciences Publishers.
12. POPESCU, H.I.: Hepatic clearance mechanism of ^{99m}Tc -N- (acetanilido)-imino-diacetic acid. Derivatives (Abstract). J.Nucl.Med. 21: 1110-1112,1980.
13. DAVIS, B.J., Disc eletrophoresis. II method and aplication to human serum proteins. Am. N.Y.Acad Sci (2): 404-427,1964.

14. ZIVANOVIC, M.A., Taylor, D.M., Mc Cready, R., Miller, S.T. The stability and distribution of Tc-HIDA 'in vivo' and 'in vitro'. Eur.J.Med. 4: 369-373,1979.
15. Subramanian, G. McAfee, J.G., Henderson, R.W., Rosentreich, M., Krokenberger L.: The influence of structural changes on biodistribution of ^{99m}Tc-labeled N-substituted IDA derivatives (Abstract). J.Nucl.Med. 17: 624,1977.

1. KATSEVITZ, S. L., et al. J. Nucl. Med. 17: 624, 1977.

2. FLEISCH, G., et al. J. Nucl. Med. 17: 624, 1977.

3. LEE, T. H., et al. J. Nucl. Med. 17: 624, 1977.

4. LAKER, P. L., et al. J. Nucl. Med. 17: 624, 1977.

5. REIER, W. W., et al. J. Nucl. Med. 17: 624, 1977.

6. NICHOLSON, R. W., et al. J. Nucl. Med. 17: 624, 1977.

7. WOLTER, W. J., et al. J. Nucl. Med. 17: 624, 1977.

8. SMITH, R. E., et al. J. Nucl. Med. 17: 624, 1977.

9. LUNG, W. S., et al. J. Nucl. Med. 17: 624, 1977.

10. IMAYAMA, S., et al. J. Nucl. Med. 17: 624, 1977.

11. HAMADA, S., et al. J. Nucl. Med. 17: 624, 1977.

12. ROBERTS, M. J., et al. J. Nucl. Med. 17: 624, 1977.

13. DAVIS, S. J., et al. J. Nucl. Med. 17: 624, 1977.