

BR 9127163
INIS- BR - - 2657

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**ESTUDO DA BIODISTRIBUIÇÃO E CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DO ÁCIDO
p-[(bis-CARBOXIMETIL) AMINOMETIL CARBOXIAMINO] HIPÚRICO
(PAHIDA) MARCADO COM TECNÉCIO-99m. ESTABELECIMENTO
DOS PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DE DISTRIBUIÇÃO
POR MEIO DE UM MODELO DE COMPARTIMENTALIZAÇÃO.**

ELAINE BORTOLETI DE ARAÚJO



Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Tecnologia Nuclear.

Orientadora: Dra. Maria Aparecida T.M. de Almeida

SÃO PAULO

1990

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP - IPEN

Aos meus pais

Aos meus irmãos

Ao Rivaldo

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, na pessoa de seu Superintendente, Dr. Spero Penha Morato.

À Dra. Constância P. G. da Silva, Chefe do Departamento de Processamento, pela oportunidade concedida.

À Dra. Maria Aparecida T. M. de Almeida, pela orientação, dedicação e apoio recebidos durante a realização deste trabalho.

À Dra. Emiko Muramoto, pelas sugestões e inestimável colaboração.

Às Dras. Nilda P. S. de Pereira, Setsuko S. Achando, Olga G. de Carvalho e às pesquisadoras Elena S. Hamada, Marycel F. Barbosa e Rodza S.V. Gonçalves, pelo apoio e facilidades oferecidas para a execução deste trabalho.

Aos pesquisadores Antonio Soares Gouvea e Edna Maria L. Lopes, pelos trabalhos de computação.

Aos técnicos e amigos do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, que acreditaram e colaboraram na elaboração deste trabalho.

" ESTUDO DA BIODISTRIBUIÇÃO E CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DO ÁCIDO p- [(bis-CARBOXIMETIL) AMINOMETIL CARBOXIAMINO] HIPPURICO (PAHIDA) MARCADO COM TECNÉCIO-99m. ESTABELECIMENTO DOS PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS DE DISTRIBUIÇÃO COM AUXÍLIO DE UM MODELO DE COMPARTIMENTALIZAÇÃO. "

Elaine Bortoleti de Araújo

RESUMO

A distribuição biológica do ácido p- [(bis- carboximetil) aminometil carboxiamino] hippúrico (PAHIDA) marcado com ^{99m}Tc , realizado em ratos Wistar, evidenciou uma captação renal seletiva quando comparada a de outros órgãos e tecidos.

O composto é predominantemente eliminado pela via urinária, com pequena porcentagem de excreção pelo sistema entero-hepático. A análise cromatográfica da urina revelou a presença do produto íntegro e possíveis metabólitos.

O clareamento sanguíneo do PAHIDA- ^{99m}Tc é relativamente rápido, transportado em boa porcentagem pelas proteínas plasmáticas. A fração que se liga aos eritrócitos é significativa após uma hora devido, provavelmente, ao ^{99m}Tc hidrolisado.

A extrapolação da curva plasmática denotou a existência de três exponenciais, sugerindo um modelo correspondente a três compartimentos: um central ou intravascular

e dois periféricos ou extravasculares - troca rápida e troca lenta (retenção). A meia-vida de cada exponencial e as constantes (k) de transferência entre os compartimentos foram determinadas.

A retenção do composto foi reafirmada pelas medidas de corpo inteiro. A decomposição da curva em duas exponenciais permitiu avaliar a meia-vida das componentes.

O modelo compartimental proposto, em concordância com os dados experimentais, evidenciou uma retenção do complexo relacionada, provavelmente, a: ligação a constituintes sanguíneos, possibilidade de metabolização renal do composto ou ainda um possível impedimento estrutural na interação com os receptores das células tubulares.

" BIODISTRIBUTION AND BIOLOGIC CHARACTERISTICS OF p- [(bis-CARBOXYMETHYL) AMINOMETHYL CARBOXYAMINO] HIPPURIC ACID (PAHIDA) LABELED WITH TECHNETIUM-99m. ESTABLISHMENT OF PHARMACOKINETICS PARAMETERS THROUGH COMPARTMENTAL MODEL. "

Elaine Bortoleti de Araújo

ABSTRACT

Biologic distribution of p- [(bis-carboxymethyl aminomethyl carboxyamino)] hippuric acid (PAHIDA) labeled with ^{99m}Tc in Wistar rats, showed a selective renal uptake among the other organs and tissues.

The compound is predominantly eliminated by urinary tract, with small enterohepatic percent of excretion. Chromatographic analysis of urine showed the product and possible metabolites.

PAHIDA- ^{99m}Tc blood clearance is relatively rapid and a good percent is transported by plasmatic proteins. The percent binding to the eritrocits is significant after one hour, this is due probably to hydrolised technetium.

The extrapolation of the plasmatic curve denoted the existence of three exponentials, suggesting a model with three compartments: central or intravascular and two peripherics or extravasculars - rapid and slow exchange (retention). Exponential's half life and the transfer constant (k) among the compartments were determined.

The compound retention was reaffirmed by whole body determination. The decomposition of the curve in two exponentials allowed to assess the component's half-life.

The compartmental model proposed in agreement with the experimental results, showed the complex retention that may be related the binding with the blood components, the possibility of renal metabolization or a structural in pediment in the interation with the tubular cells receptors.

SUMÁRIO

I - INTRODUÇÃO	01
I.1 - O desenvolvimento de radiofármacos renais ...	01
I.2 - Estudos farmacocinéticos empregando-se radio- traçadores: aplicação da Análise Compartimen- tal	12
II - OBJETIVO DO TRABALHO	15
III - MATERIAIS E MÉTODOS	16
III.1 - MATERIAIS	16
III.1.1 - Reagentes e soluções empregados	16
III.1.2 - Material biológico	17
III.1.3 - Equipamentos	17
III.2 - MÉTODOS	18
III.2.1 - Marcação do PAHIDA com ^{99m} Tc e determinação da pureza radioquí- mica	18
III.2.2 - Estudos biológicos	19
III.2.2.1 - Distribuição bioló- gica do PAHIDA marcado com ^{99m} Tc após administra- ção endovenosa	19

III.2.2.2 - Determinação da porcentagem de retenção do PAHIDA- ^{99m} Tc no corpo inteiro	21
III.2.2.3 - Determinação da porcentagem de PAHIDA- ^{99m} Tc eliminada na bile	21
III.2.2.4 - Determinação da porcentagem de PAHIDA- ^{99m} Tc eliminada nas fezes e urina	22
III.2.3 - Estudos "in vitro"	23
III.2.3.1 - Determinação da porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas	23
III.2.3.2 - Determinação da porcentagem de ligação aos eritrócitos	23
III.2.3.3 - Análise cromatográfica da urina	24
III.2.4 - Programas de computador empregados na obtenção do modelo para a Análise Compartmental	25
IV - RESULTADOS	27
IV.1 - Marcação do PAHIDA com ^{99m} Tc	27
IV.2 - Estudos biológicos	27
IV.3 - Estudos "in vitro"	35

IV.4 - Resultados obtidos com a utilização dos Pro gramas Computacionais: análise da curva plasmática e definição de um Modelo de Com partimentalização	38
V - DISCUSSÃO	49
VI - CONCLUSÕES	58
VII - CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

I - INTRODUÇÃO

I.1 - O desenvolvimento de radiofármacos renais

Os rins são órgãos essenciais para a manutenção da vida, exercendo funções excretora, reguladora e endócrina.

Por meio da função excretora, os rins eliminam na urina todas as substâncias desnecessárias ou estranhas ao organismo. Tal mecanismo é dependente da função regulatória, que mantém a homeostase do meio interno, o balanço ácido-base, o pH, o volume extracelular e a composição eletrolítica (32).

A função endócrina contribui para a homeostase do organismo, secretando ou ativando hormônios pelo estímulo do eixo hipotálamo-hipofisário.

No curso da realização destas funções, o rim adulto normal processa aproximadamente 20 a 25% do rendimento cardíaco a cada minuto (1700 litros de sangue por dia) e a cada período de 30 minutos, o equivalente ao volume plasmático do homem é filtrado através dos capilares glomerulares. Neste mecanismo, a reabsorção e secreção tubular adicionam ou subtraem, respectivamente, substâncias solúveis em meio aquoso, resultando na excreção de 1 a 1,5 litros de ultrafiltrado modificado (urina) (13,27).

Várias técnicas como radiografia, ultrassonografia e tomografia computadorizada, disponíveis para estudo da estrutura renal, não estimam a função de forma tão precisa como as técnicas radionuclídicas.

Em Medicina Nuclear, os radiofármacos renais têm sido pesquisados e utilizados de maneira sistemática há alguns decênios, com o intuito de diagnosticar patologias e disfunções através de métodos não invasivos. Um grande número de compostos marcados foram propostos em virtude, principalmente, da facilidade de excreção, visto tratarem-se de complexos com baixo peso molecular. Entretanto, esta não é a única característica determinante para o bom desempenho dos traçadores renais. Muitos radiofármacos que poderiam exibir boa excreção renal, apresentaram problemas adversos a saber: baixa especificidade, sítios de ligação além daquele órgão e/ou tecido de interesse e baixa eficiência de extração resultando em resposta clínica de reduzida confiabilidade (22).

A eficiência de um radiofármaco renal pode ser qualificada pelos informes expressos nas cintilografias estáticas, onde são transcritas e consideradas as formas anatômicas do órgão e possíveis anomalias. Um agente para este fim deve apresentar seletividade renal significativamente alta, baixa captação em órgãos adjacentes, especialmente o fígado e rápida depuração sanguínea (22,40).

O gluceptato de cálcio-^{99m}Tc é largamente utilizado em cintilografia renal em virtude do rápido clareamento sanguíneo e discriminação efetiva do órgão afim (7,22,61). O ácido dimercapto succínico (DMSA) marcado com tecnécio (^{99m}Tc) é excelente para visualização da córtex renal (20,61). Além destes, vários outros descritos na literatura apresentam desempenho similar (13,51,61).

Por outro lado, a avaliação do dinamismo da função renal empregando radiofármacos, requer um composto com alta especificidade para excreção e baixa retenção (22). De

tro deste conceito, clinicamente, pode-se avaliar: a filtração glomerular, o fluxo plasmático renal total, a reabsorção ou secreção tubular e outros caracteres que, por ventura, possam influenciar no diagnóstico a ser realizado.

A obtenção de radiofármacos renais que forneçam informações funcionais específicas, implica em estudos minuciosos que permitam viabilizar a padronização de sua excreção (22). As perspectivas neste campo têm suficiente motivação devido às deficiências apresentadas por alguns complexos disponíveis, principalmente com relação à eficiência de extração e/ou interferências devidas à radiação circulante (22).

Alguns radiomarcados são excretados via filtração glomerular e promovem a medida da "Taxa de Filtração Glomerular" (TFG), ou seja, o volume de ultrafiltrado de plasma produzido por minuto pelo glomérulo renal. A determinação da TFG é um índice de atividade desta função utilizado rotineiramente em clínica para o diagnóstico do comprometimento glomerular nas nefropatias e para estabelecimento do prognóstico e da terapêutica sendo particularmente útil no acompanhamento de pacientes que sofreram transplantes renais (4,33).

A substância a ser utilizada para medida da TFG deve apresentar certas características a saber: não se ligar às proteínas plasmáticas, ser altamente polar, não ser sintetizado ou destruído pelos túbulos renais, reabsorvido ou secretado pelos mesmos e deve ainda ser fisiologicamente inerte (13,22,39,40).

No sistema excretor, a membrana glomerular apresenta "poros" que permitem a passagem por difusão de moléculas com peso molecular inferior a 5000. Desta forma, o ultrafiltrado apresenta-se isento de proteínas plasmáticas e subs

tâncias que se ligam a estas, apresentam taxa de filtração reduzida devido à fração ligada.

O padrão não radioativo para medida da TFG é a inulina, um polímero da frutose com peso molecular de aproximadamente 5000. A inulina marcada com ^{99m}Tc ainda não foi obtida na forma estável e pura (13,22).

Um radiofármaco potencialmente útil para medida da TFG é o ácido dietileno triamino pentacético (DTPA) marcado com tecnécio (^{99m}Tc) (4,13,22,39). Este composto concilia uma série de fatores favoráveis dentre os quais destacam-se a facilidade de obtenção e produção e baixas doses na exposição de radiação ao paciente (4,13,51).

Enquanto compostos utilizados para medida da TFG limitam-se a aproximadamente 20% de eficiência de extração, aqueles secretados pelas células tubulares são quase completamente extraídos quando passam pelos rins, possibilitando a avaliação da função tubular através da medida do "Fluxo Plasmático Renal Efetivo" (FRPE) (19,22).

A secreção tubular renal requer energia para conduzir uma determinada substância desde o plasma até o interior das células (transporte ativo). Para que ocorra este mecanismo há necessidade de que a estrutura molecular do produto marcado garanta não somente a eficiência de ligação às proteínas transportadoras, localizadas na parede das células tubulares, como também a capacidade de introduzi-lo no interior destas células (22).

A ligação de um certo fármaco às proteínas plasmáticas não interfere em seu processo de secreção tubular, uma vez que a fração ligada ao plasma é liberada para a fase

aquosa, sendo desta forma eliminada do organismo.

O composto cujo clareamento mais se aproxima do fluxo plasmático renal total é o ácido p-amino-hippúrico (PAH). Cerca de 10 a 20% do composto é excretado por filtração glomerular e aproximadamente 80% por secreção tubular, o que resulta em uma eficiência de extração efetiva de aproximadamente 90% (22). Seu análogo radioativo é o o-iodo-hippurato de sódio (Hippuran-¹³¹I), cuja eficiência de extração efetiva relatada é de cerca de 85% (7,22,42).

O Hippuran-¹³¹I (IOH), desenvolvido por Tubis em 1960 (7), é um dos poucos radiofármacos com características fisiológicas convenientes e comercialmente disponível para o estudo da função tubular renal (22). Entretanto, existem certos inconvenientes que norteiam sua utilização. Uma impureza radioquímica comum desta preparação é o iodeto inorgânico, que aumenta com a armazenagem do produto, influenciado por vários fatores como luz, temperatura e atividade específica. A presença de (¹³¹I⁻) deve ser detectada antes da utilização "in vivo" para prevenir erros nos valores obtidos (7,58).

A depuração do IOH é menor que a do PAH, sendo a razão IOH/PAH de aproximadamente 0,85. Tal fato relaciona-se não somente à presença do iodeto livre nas preparações de IOH, mas também a diferenças observadas no transporte tubular e ligação dos produtos a constituintes plasmáticos.

Além disso, no emprego do Hippuran-¹³¹I a dose de radiação absorvida pelo paciente é relativamente alta, mesmo quando baixas doses diagnósticas são administradas (14). As características físicas do ¹³¹I contribuem para isto: meia-vida física de 8,04 dias, emissão de radiação ga

ma de alta energia (364 keV) e ainda presença de emissão beta (608 keV). A emissão gama de alta energia dificulta a aquisição de imagens cintilográficas de boa resolução (18).

A marcação do Hippuran com ^{123}I diminui a exposição do paciente à radiação (7). Sua meia-vida física é de 13,3 horas e a desintegração radioativa se faz por processo de captura eletrônica com emissão de radiação gama de energia 159 keV, proporcionando melhor resolução de imagem em câmaras cintilográficas (18). Produzido exclusivamente através de ciclotron, apresenta custo elevado, dificultando sua utilização em centros médicos distantes do local de produção.

Paralelamente, conhecem-se bem as vantagens do emprego do tecnécio-99m em Medicina Nuclear. Este elemento foi descoberto por Perrier e Segré em 1937, como consequência direta da invenção do ciclotron (36,51). Irradiando-se molibdênio com dêuterons, observou-se o surgimento de uma radioatividade desconhecida e bastante forte, que após ser analisada concluiu-se ser proveniente do elemento de número atômico 43, até então desconhecido. O novo elemento foi denominado "tecnécio", que em grego significa "artificial", nome bastante próprio para o primeiro elemento produzido artificialmente (36).

A aplicação do tecnécio em Medicina Nuclear deu-se em 1963, quando Sörensen e Harchanbanth administraram ^{99}Mo com a finalidade de visualizar a área hepática empregando um mapeador retilíneo (50,60). No ano seguinte, Harper e colaboradores utilizaram o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ na forma de pertecnetato ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$) com a finalidade de obter imagens cintilográficas da glândula tireóide (30).

O interesse em substituir o ^{131}I e outros isótopos pelo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ está relacionado a suas propriedades determinantes: tempo de meia-vida mais curto (6,02 horas), emissão de raios gama de baixa energia (140 keV) e nenhuma emissão beta (34).

O conjunto destas características proporciona baixas doses de exposição ao paciente principalmente quando comparadas com as ocasionadas pelo uso do ^{131}I (43,49), permitindo eventuais repetições de exames em intervalos de tempo menores. O tecnécio é facilmente colimado pelos aparelhos cintilográficos de uso em Medicina Nuclear, resultando na obtenção de excelentes imagens (34).

Este elemento radioativo pode ser facilmente obtido pela eluição de geradores do tipo $^{99}\text{Mo}-^{99\text{m}}\text{Tc}$ (52) na forma do íon pertecnetato ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$). Nesta forma radioquímica, entretanto, não pode ser utilizado eficientemente para determinação da função renal, em virtude de sua lenta concentração no parênquima renal e excreção urinária relativamente baixa, uma vez que aproximadamente 86% do filtrado é reabsorvido pelos túbulos renais (7).

Neste sentido, ampliam-se os interesses pela síntese e estudo das propriedades biológicas de radiofármacos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ a serem utilizados no estudo das funções renais, em particular da função tubular, em substituição ao Hippuran- ^{131}I .

Em 1979, Davison e colaboradores introduziram uma classe de agentes quelantes para marcação com o tecnécio do tipo N_2S_2 (16). Faz parte desta série o N,N'-bis (mercaptoacetamido) - etilenodiamina (DADS).

De acordo com estudos realizados por Fritzberg e colaboradores (24), a excreção renal deste composto é significativamente mais rápida que do DTPA e ligeiramente mais longa que do OIH, sugerindo excreção por meio de secreção tubular. A porcentagem do composto ligada às proteínas plasmáticas é grande, inviabilizando desta forma a filtração glomerular, além da retenção renal do composto ser desprezível.

Entretanto, se a eficiência de extração do DADS é boa para pacientes normais, o mesmo não se pode dizer para aqueles com disfunção renal, nos quais a excreção hepatobiliar do composto torna-se significativa (25). Pode-se dizer, portanto, que apesar da eficiência de extração renal apresentada ser maior que a de outros compostos até então marcados com ^{99m}Tc , as propriedades biológicas são inferiores às do OIH (37).

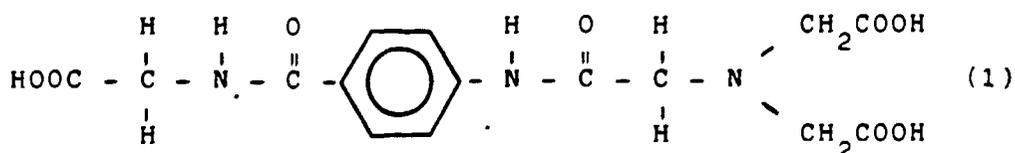
Na busca de um composto com características fisiológicas satisfatórias, Fritzberg e colaboradores (25) sintetizaram alguns derivados do DADS, dentre eles um análogo carboxílico (DADS-CO_2), com propriedades superiores e comparáveis às do OIH.

Administrado a animais com função renal normal, o DADS-CO_2 (N,N'-bis (mercaptoacetil) - 2,3 - diaminopropionato) mostrou excreção renal equivalente ao OIH. Sua excreção biliar, na ausência da função renal é bastante inferior ao DADS (25). Entretanto, sua ligação com o tecnécio resulta na formação de epímeros quelados dos quais somente um dos isômeros demonstra propriedades biológicas satisfatórias (25, 38).

Esforços concentrados na síntese de um derivado N_3S levaram Fritzberg e colaboradores a produzirem o mercaptoacetil-glicilglicilglicina (MAG_3).

A grande vantagem deste composto, que possui características de excreção semelhantes à do Hippuran- ^{131}I , é a de não apresentar problemas de estereoisomeria (23,57). Sua preparação e marcação envolvem complicado processo de síntese e purificação que oneram sua aplicabilidade clínica (62).

Na pesquisa de radiofármacos para diagnóstico, um outro composto foi sintetizado por Chervu e colaboradores em 1984 (14): ácido p-[(bis-carboximetil)-aminometil carboxiamino] hippúrico (PAHIDA), cuja estrutura (1) é a seguinte:

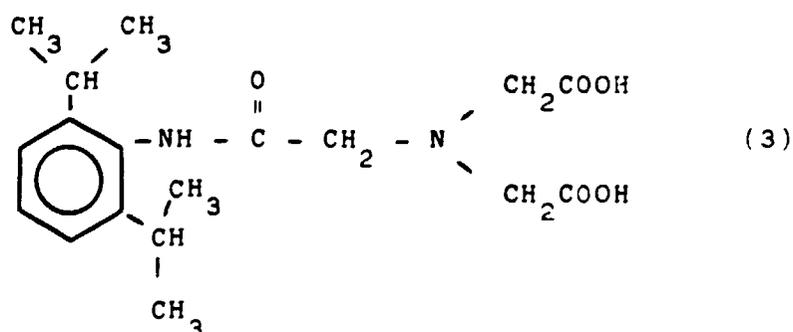
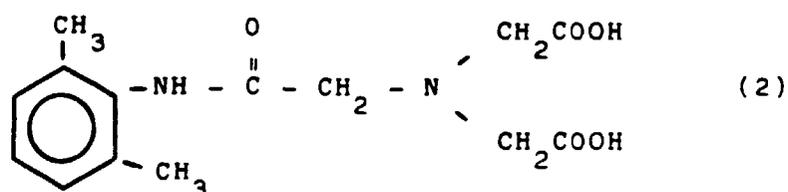


A síntese compreende a ligação do ácido p-amino hippúrico com o ácido nitrilotriacético anidro.

A princípio, seria de se esperar que compostos com estrutura similar à do ácido p-amino hippúrico (PAH) apresentassem comportamento semelhante a ele, com alta eficiência de extração. Sob este aspecto, o PAHIDA satisfaz os requisitos estruturais para secreção tubular devido a presença do grupo $R-C:O-NX(CHR')_n-COOH$, análogo ao PAH. Representados na fórmula, os grupos R e R' podem ser alifáticos ou

aromáticos e X pode ser um átomo de hidrogênio ou um grupo metila (17).

Apesar da estrutura do PAHIDA ser similar a de certos agentes hepatobiliares como Dimetil-IDA (ácido (2,6 dimetil fenil carbamoilmetil) iminodiacético) (2) e diisopropil-IDA (ácido (2,6 diisopropil fenil carbamoilmetil) iminodiacético) (3), a diferença na lipofilicidade dos grupos ligantes do anel benzênico garante sua excreção renal (21).

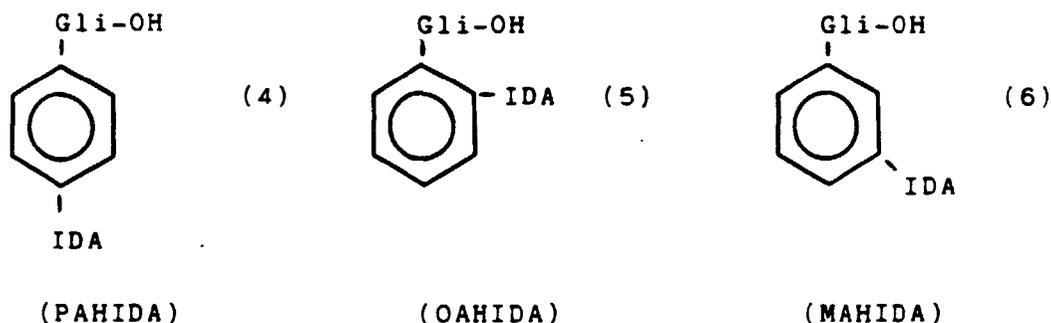


Estudos preliminares de distribuição do PAHIDA-^{99m}Tc realizados em ratos, revelaram excelentes características de excreção renal. Os valores encontrados para depuração renal são menores que os obtidos para o Hippuran-¹³¹I, mas significativamente maiores que os esperados para agentes empregados na medida da TFG (14).

Estudos realizados em pacientes demonstraram que o composto promove ótima visualização renal. Sua pers

pectiva na avaliação da dinâmica do rim está condicionada a expectativa de uma padronização, em virtude de diversificações no comportamento biológico ⁽⁶²⁾.

Com o objetivo de avaliar a influência da estrutura no transporte renal, dois outros derivados do PAH foram sintetizados, nos quais o grupo quelante para o ^{99m}Tc, (ácido iminodiacético) foi colocado em posição orto (OAHIDA) e meta (MAHIDA). A depuração destes dois complexos foi menor que do PAHIDA ⁽⁶⁾.



Seria de se esperar que as propriedades excretoras do PAHIDA pudessem ser melhoradas com a introdução de vários substituintes no anel aromático, que causassem significantes alterações nos valores de pKa e/ou sobre a polaridade da molécula. Neste sentido, vários derivados do PAHIDA foram estudados, sendo que o derivado metilado na posição 3 do anel benzênico apresentou particularidades de excreção favoráveis com clareamento sanguíneo mais rápido e menor atividade entero-hepática, constituindo-se num primeiro passo para estudos de alteração na estrutura original do PAHIDA ⁽¹²⁾.

I.2 - Estudos farmacocinéticos empregando radiotraçadores: aplicação da análise compartimental

A farmacocinética é o estudo da velocidade de transferência da concentração de fármacos e seus metabólitos nos fluidos biológicos, tecido e excretas, relacionando os processos de absorção, distribuição, biotransformação e eliminação.

O estudo farmacocinético distingue-se entre outras coisas, pela construção de modelos matemáticos, muitas vezes compartimentalizados, que representem um sistema em estudo. Pressupõe o sistema dividido em um número finito de regiões, chamadas compartimentos, caracterizados pela similaridade de comportamento fisiológico como fluxo sanguíneo e afinidade por fármacos (8,9,10).

Após a introdução de um traçador na corrente sanguínea, este se distribui através dos compartimentos por um processo reversível e geralmente rápido. A eliminação de uma substância de um determinado compartimento obedece a um processo de primeira ordem, isto é, a quantidade de substância que sai na unidade de tempo é aproximadamente igual à quantidade nele presente, definindo assim a propriedade de linearidade dos compartimentos. A excreção, bem como a biotransformação do fármaco são processos irreversíveis e caracterizam os mecanismos de eliminação (10).

O raciocínio matemático é utilizado na elaboração de modelos farmacocinéticos para estimar parâmetros fisiológicos de interesse. Algumas constantes biológicas comumente utilizadas são o "Volume de Distribuição Aparente"

(Vd), que relaciona a quantidade de fármaco de um organismo com sua concentração plasmática e a "Constante de Velocidade" (k), que caracteriza a velocidade de troca da concentração do fármaco de um compartimento para outro. Desta forma, k_{ij} é o coeficiente de transferência que representa a fração da substância marcada contida no i-ésimo compartimento que é transferida para o j-ésimo compartimento na unidade de tempo.

Na análise cinética de um sistema biológico com auxílio de um traçador, o estudo da variação da concentração em função do tempo, é específico para diferentes compartimentos do sistema.

O primeiro passo para se chegar a um modelo de distribuição de fármacos consiste em analisar os traçados das curvas obtidas, adequando-as a equações matemáticas convenientes. Geralmente inicia-se com a construção da curva de decaimento plasmático (concentração plasmática da substância em estudo em função do tempo), obtida com o emprego de traçadores isotópicos (9,10).

No caso do compartimento plasmático, a expressão matemática que representa a curva é uma função exponencial. Extrapolam-se ao modelo a análise da curva de tal forma que o número de compartimentos seja igual ao de exponenciais do ajuste. Programas computacionais adequados não só calculam os parâmetros da curva como também determinam as constantes de velocidade de transferência do radiofármaco entre os compartimentos. Baseado nestas constantes, tais programas promovem a simulação de um modelo de distribuição entre os compartimentos, por meio de equações diferenciais, que predizem o comportamento do sistema biológico em estudo

sendo somente válido se estiver em concordância com os parâmetros determinados experimentalmente.

Por meio do sistema de equações diferenciais lineares calculam-se coeficientes do tipo $dQ_i(t)/dt$, onde $Q_i(t)$ representa a porcentagem da substância marcada existente no i -ésimo compartimento.

A correta interpretação dos resultados experimentais é fator crítico para a elaboração de um modelo cinético que reproduza com fidelidade o comportamento do fármaco. Vários fatores devem ser levados em conta, como a ligação do composto a constituintes do sangue, que podem alterar a sua difusão para outros compartimentos, a presença de metabólitos e demais transformações.

Os resultados obtidos com os métodos que empregam elementos radioativos como traçadores devem ser considerados com cautela e senso crítico, uma vez que a radioatividade detectada pode representar o produto íntegro ou um produto de seu metabolismo. Somente uma análise criteriosa permite a obtenção de um modelo que seja representativo do sistema em estudo.

II - OBJETIVO DO TRABALHO

A partir da marcação do PAHIDA (ácido p-[(bis-carboximetil) aminometil carboxiamino] hippúrico) com tecnécio-99m - radiofármaco disponível e com propriedades biológicas a serem investigadas - propusemo-nos a estabelecer em ratos da raça Wistar:

- 1 - Distribuição biológica do radiofármaco em tempos pré-determinados.
- 2 - Análise da curva de decaimento plasmático.
- 3 - Avaliação da taxa de retenção e eliminação do composto por via urinária e fecal.
- 4 - Determinação da porcentagem de ligação do composto às proteínas plasmáticas e eritrócitos.
- 5 - Formulação de um modelo de distribuição para o radiofármaco em estudo, por meio da análise compartimental, empregando-se programas computacionais adequados para determinação das constantes de distribuição de interesse.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

III - MATERIAIS

III.1.1 - Reagentes e soluções empregados

- Ácido p- [(bis-carboximetil) aminometil carboxiamino] hip-
púrico (PAHIDA) - frascos liofilizados contendo 10 mg do
sal e 0,25 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ para pronta marcação. Produ-
ção: Divisão de Radiofarmácia do IPEN-CNEN/SP, Brasil.
- Pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) - solução estéril e api-
rogênica obtida através da eluição de gerador ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$.
Produção: Departamento de Processamento do IPEN-CNEN/SP,
Brasil.
- Solução de Heparina, 5000 UI/ml, ("LIQUEMINE"), Roche,
Brasil.
- Acetona p.a., Merck, Brasil.
- Éter etílico p.a., Quimis, Brasil.
- Hidróxido de sódio p.a., Queel, Brasil.
- Cloreto de sódio, solução 0,9%, Drogasil, Brasil.
- Ácido tricloroacético p.a., solução 10%, Merck, Brasil.
- Uretana, Sigma, Estados Unidos.
- Papel cromatográfico - fitas de fibra de vidro impregnadas
com sílica gem para cromatografia em camada delgada ("ITLC-
SG"), de 15,0 x 1,5 cm, Gelman Sciences, Estados Unidos.

III.1.2 - Material biológico

- Animal utilizado - "Ratus norvegicus albinus" da linhagem Wistar, machos, pesando entre 200 e 300 gramas, alimentados com ração comercial e água "ad libitum".

III.1.3 - Equipamentos

- Cintilador de poço com cristal de NaI (Tl) de 3 polegadas Nuclear Chicago, Estados Unidos.
- Cintilador automático com cristal de NaI (Tl) de 1,5 x 1,5 polegadas, Modelo ANSR, Abbot, Brasil.
- Câmara de cintilação com cristal de NaI (Tl) de 4,0 x 15,0 polegadas, Modelo DC-4, Picker Internacional, Estados Unidos.
- Calibrador de radioisótopos, Modelo Mediac, Nuclear Chicago, Estados Unidos.
- Centrífuga Modelo GLC-L, Sorval, Estados Unidos.
- Centrífuga de micro-hematócrito, Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos (CELM), Brasil.
- Gaiolas metabólicas para coleta de fezes e urina, modelo idealizado por Zucas e colaboradores (63).

III.2 - MÉTODOS

III.2.1 - Marcação do PAHIDA com ^{99m}Tc e determinação da pureza radioquímica

Procedeu-se à marcação, adicionando-se ao frasco liofilizado de PAHIDA 3 ml de solução de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$) com atividade de aproximadamente 37 MBq/ml (1 mCi/ml), determinando-se uma atividade específica de cerca de 11,1 MBq/mg (300 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$). Após homogenização suave, a solução foi deixada em repouso por 20 minutos para completar a reação.

A pureza radioquímica do produto marcado foi avaliada por meio de análise cromatográfica ascendente, utilizando-se como suporte fitas de ITLC(SG) e como fase móvel dos sistemas de solventes:

1 - NaCl 0,9%

2 - Acetona

Após o desenvolvimento cromatográfico, as fitas foram cortadas em segmentos de 1 cm e a radioatividade avaliada em contador gama dotado de cristal de NaI (Tl), Abbot.

Para cada produto existente, determinou-se o Rf correspondente ^(1,14) .

III.2.2 - Estudos biológicos

III.2.2.1 - Distribuição biológica do PAHIDA-^{99m}Tc após administração endovenosa

Para a obtenção de dados estatisticamente significantes, foram destinados 10 animais para cada tempo estudado⁽²⁸⁾ a saber: 1, 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 90 minutos e 2, 4, 18 e 24 horas.

Os animais foram anestesiados em vapor de éter etílico pelo sistema de máscara aberta, pesados e 0,1 ml da solução do marcado foi administrado pela veia dorsal do pênis. Transcorrido o tempo estabelecido para cada animal, estes foram sacrificados por decaptação e o sangue coletado em frascos heparinizados.

De imediato retiraram-se os seguintes órgãos: coração, pulmão, estômago, baço, rins, fígado, segmentos dos intestinos grosso e delgado, parte do músculo da pata traseira e testículos.

Os materiais biológicos foram pesados e a radioatividade determinada.

Amostras de sangue foram aliqüotadas da seguinte forma: 1 ml para determinar a radioatividade sanguínea, 1 ml aproximadamente destinado à leitura do hematócrito e o restante centrifugado a 2000 rpm por 15 minutos. O volume de 0,5 ml de plasma serviu para detectar a radioatividade plasmática.

Os cálculos foram efetuados em relação a um padrão contendo exatamente a mesma dose injetada nos animais, mantendo-se a geometria e o tempo de contagem idênticos ao das amostras.

O hematócrito real foi avaliado pela expressão seguinte (56,59):

$$\text{Hematócrito real} = \text{Hematócrito lido} \times 0,91 \times 0,96$$

A volemia e o volume plasmático foram determinados utilizando-se as seguintes fórmulas:

$$\text{Volemia} = \text{Peso do animal} \times 0,0575 \quad (2,41)$$

$$\text{Volume plasmático} = \frac{\text{Volemia(ml)} \times (100 - \text{Hc real})}{100} \quad (27)$$

100

A radioatividade presente nas amostras de sangue e plasma, associada, respectivamente, à volemia e volume plasmático, permitiu a determinação da porcentagem da dose administrada presente no sangue e plasma total de cada animal.

III.2.2.2 - Determinação da porcentagem de retenção do PAHIDA-^{99m}Tc no corpo inteiro

As medidas de corpo inteiro foram efetuadas em um lote de 10 animais. Para marcação do PAHIDA foram utilizados 3 ml de solução de pertecnetato de sódio com atividade de aproximadamente 74 MBq/ml (2 mCi/ml). Injetou-se 0,1 ml da solução do produto marcado em cada animal, pela via mencionada no estudo anterior.

Após a administração da dose, os animais foram mantidos em gaiolas individuais. As medidas da radiação de corpo inteiro foram realizadas com auxílio de uma Câmara de cintilação (Picker Internacional) para os tempos de 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 300 e 360 minutos. Para cada medida efetuou-se a contagem de um padrão consistindo em um frasco de vidro com cerca de 250 ml de volume, preenchido com água e contendo uma dose igual à injetada nos animais, simulando desta forma o corpo dos mesmos.

III.2.2.3 - Determinação da porcentagem de PAHIDA-^{99m}Tc eliminada na bile

O duto biliar foi canulado através de procedimento cirúrgico em dois ratos anestesiados com uretana ⁽³⁾. Administrou-se o PAHIDA-^{99m}Tc endovenosamente com dose idêntica ao estudo de distribuição biológica e as amostras de bile foram coletadas sequencialmente, durante seis horas sen

do contadas frente a um padrão contendo a mesma dose injetada nos animais.

III.2.2.4 - Determinação da porcentagem de PAHIDA-^{99m}Tc excretada nas fezes e urina

Em um grupo de seis animais, mantidos em gaiolas metabólicas individuais, determinou-se a radioatividade presente nas fezes coletadas 24 e 48 horas após a administração da dose.

O radiofármaco foi preparado e administrado conforme descrito anteriormente.

As fezes foram secas a 50°C, trituradas, pesadas e a sua radioatividade foi avaliada.

Para se estabelecer a excreção renal do composto, o pênis do rato foi atado para retenção da urina na bexiga⁽³⁾. Nos períodos de tempo de 1, 5, 15, 30, 60, 90, 120 e 240 minutos após a administração da dose, os animais (6 para cada tempo) foram sacrificados e a bexiga retirada para determinação da radioatividade presente.

III.2.3 - Estudos "In vitro"

III.2.3.1 - Determinação da porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas

A porcentagem do radiofármaco que se liga às proteínas plasmáticas foi determinada pelo método de precipitação (14,62).

Os plasmas utilizados foram obtidos a partir de amostras de sangue coletadas a 1, 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após administração da dose. Foram avaliados quatro animais para cada tempo de interesse.

A 200 µl de plasma, adicionou-se 1 ml de solução de ácido tricloroacético (TCA) para precipitar as proteínas plasmáticas. Após incubação de 30 minutos, em banho de gelo, determinou-se a radioatividade total de cada amostra e procedeu-se à centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos. Após decantação do sobrenadante, ressuspendeu-se o precipitado com 1 ml de solução de NaOH 4N e efetuou-se uma nova contagem. Os resultados foram expressos em porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas, utilizando-se a relação:

$$\text{Porcentagem de ligação às} \quad = \quad \frac{\text{cpm do precipitado}}{\text{cpm total}} \times 100$$

proteínas plasmáticas

III.2.3.2 - Determinação da porcentagem de ligação aos eritrócitos

Este estudo foi realizado empregando-se quatro animais para cada tempo de interesse.

Tendo sido determinadas as atividades contidas em 1 ml de sangue de cada rato injetado com PAHIDA-^{99m}Tc pa

ra os tempos de 1, 15, 30, 60 e 120 minutos (contagem 1), procedeu-se à centrifugação das amostras a 2500 rpm por 15 minutos.

O plasma foi desprezado, os eritrócitos lavados com 1 ml de solução salina 0,9% e novamente centrifugados. Tal procedimento foi repetido por mais duas vezes, totalizando-se três lavagens, após o que determinou-se a radioativaidade de correspondente aos eritrócitos (contagem 2). A porcentagem de ligação aos eritrócitos foi obtida, obedecendo-se às correções devidas ao decaimento do radionuclídeo, através da relação:

$$\text{Porcentagem de ligação aos eritrócitos} = \frac{\text{contagem 2} \times 100}{\text{contagem 1}}$$

Na segunda fase deste estudo, os eritrócitos, com radioatividade já conhecida, foram incubados com 1 ml de plasma não radioativo a 37°C por 30 minutos. Subsequentemente, a mistura foi centrifugada e o plasma decantado para recontagem dos eritrócitos (contagem 3). A partição da radioatividade entre estes e o plasma foi calculada pela relação:

$$\text{Porcentagem de ligação aos eritrócitos} = \frac{\text{contagem 3} \times 100}{\text{contagem 2}}$$

III.2.3.3 - Análise cromatográfica

da urina

A integridade radioquímica do PAHIDA-^{99m}Tc eliminado na urina foi avaliada por meio de análise cromatográfica em amostras obtidas aos 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração da dose.

O desenvolvimento cromatográfico foi o mesmo utilizado na determinação da pureza radioquímica do radiofármaco.

III.2.4 - Programas de computador empregados na obtenção do modelo para a análise compartimental

O tratamento matemático dos dados referentes à distribuição biológica do PAHIDA-^{99m}Tc foi efetuado em computador IBM-4381.

A curva de decaimento plasmático do composto, expressa em logaritmo da porcentagem da dose administrada presente no plasma em função do tempo, foi ajustada utilizando-se o programa computacional SAS - "Statistical Analysis System" (48).

Para determinação numérica dos coeficientes de transferência e eliminação a partir dos pontos experimentais da curva plasmática, utilizou-se o código computacional SAAM 25 - "Simulation Analysis And Modeling" (5).

Os coeficientes de transferência foram substituídos no sistema de equações diferenciais previsto e a solução foi obtida com o auxílio do sistema CSMP - "Continuous System Modeling Program" (54) - obtendo-se a simulação de um modelo de distribuição para os primeiros 360 minutos.

Os dados experimentais de corpo inteiro, expressos em porcentagem de dose, também foram ajustados pelo programa SAS, obtendo-se o quadrado do coeficiente de correlação (R^2). Este pode ser definido como sendo o quociente entre a soma de quadrados devido a regressão e a soma de quadrados total corrigida para a média.

$$R^2 = \frac{(\hat{y}_i - \bar{y})^2}{(y_i - \bar{y})^2} \quad , \text{ onde:}$$

y_i = valor da i -ésima observação

\hat{y}_i = valor predito da i -ésima observação

\bar{y} = valor médio.

IV - RESULTADOS

IV.1 - Marcação do PAHIDA com ^{99m}Tc

Após a marcação do PAHIDA com a solução de per-
tecnato de sódio a análise cromatográfica realizada nos
solventes apropriados determinou pureza radioquímica supe-
rios a 98%.

O desenvolvimento cromatográfico utilizando ace-
tona como solvente determina $R_f=0$ para o complexo PAHIDA-
 ^{99m}Tc . A forma livre do radioisótopo apresenta $R_f=1$. Uti-
lizando-se como solvente NaCl 0,9%, a forma complexada do
 ^{99m}Tc bem como a livre apresentam $R_f=1$, permanecendo na ori-
gem ($R_f=0$) uma possível forma hidrolisada do composto.

IV.2 - Estudos biológicos

Na Tabela I encontram-se relacionados os resul-
tados de captação do PAHIDA pelos diferentes órgãos e teci-
dos. Os valores obtidos estão expressos em porcentagem da
dose administrada presente por grama de órgão avaliado.

Tabela I - Percentual da dose administrada de PAHIDA-^{99m}Tc por grama de órgão

TEMPO (minutos)	CORÇÃO	PULMÃO	ESTÔMAGO	BAÇO	INTESTINO GROSSO	INTESTINO DELGADO	FÍGADO	MÚSCULO	TESTÍCULOS
1	0,94 ± 0,16	0,92 ± 0,14	0,47 ± 0,04	0,44 ± 0,05	0,43 ± 0,05	0,36 ± 0,04	0,46 ± 0,06	0,24 ± 0,07	-
5	0,42 ± 0,08	0,57 ± 0,10	0,43 ± 0,04	0,27 ± 0,05	0,32 ± 0,04	0,24 ± 0,04	0,33 ± 0,08	0,21 ± 0,09	0,16 ± 0,01
10	0,34 ± 0,06	0,55 ± 0,10	0,39 ± 0,05	0,29 ± 0,05	0,30 ± 0,05	0,19 ± 0,04	0,36 ± 0,07	0,17 ± 0,06	-
15	0,24 ± 0,07	0,36 ± 0,06	0,28 ± 0,05	0,20 ± 0,05	0,23 ± 0,08	0,18 ± 0,03	0,23 ± 0,04	0,13 ± 0,04	0,20 ± 0,02
30	0,19 ± 0,04	0,28 ± 0,03	0,26 ± 0,03	0,16 ± 0,03	0,20 ± 0,04	0,17 ± 0,03	0,18 ± 0,05	0,10 ± 0,02	0,15 ± 0,02
45	0,17 ± 0,05	0,25 ± 0,05	0,22 ± 0,04	0,13 ± 0,03	0,18 ± 0,04	0,13 ± 0,03	0,31 ± 0,05	0,10 ± 0,04	0,10 ± 0,04
60	0,10 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,04	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,03	0,10 ± 0,02	0,31 ± 0,05	0,08 ± 0,02	0,09 ± 0,05
90	0,09 ± 0,03	0,10 ± 0,04	0,12 ± 0,04	0,07 ± 0,02	0,11 ± 0,03	0,12 ± 0,04	0,25 ± 0,05	0,07 ± 0,03	-
120	0,08 ± 0,02	0,10 ± 0,03	0,11 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,12 ± 0,03	0,13 ± 0,04	0,19 ± 0,06	0,08 ± 0,04	0,03 ± 0,01
240	0,018 ± 0,006	0,033 ± 0,006	0,024 ± 0,010	0,023 ± 0,002	0,021 ± 0,009	0,051 ± 0,020	0,044 ± 0,005	0,016 ± 0,008	0,020 ± 0,010
1080	0,016 ± 0,009	0,030 ± 0,016	0,023 ± 0,012	0,033 ± 0,018	0,011 ± 0,004	0,020 ± 0,008	0,053 ± 0,002	0,013 ± 0,006	-
1440	0,007 ± 0,003	0,020 ± 0,006	0,017 ± 0,008	0,008 ± 0,003	0,009 ± 0,002	0,010 ± 0,007	0,150 ± 0,030	0,003 ± 0,001	-

Os resultados da Tabela II, expressos em porcentagem da dose administrada total e por grama de órgão, caracterizam a captação renal do composto.

Tabela II - Porcentagem da dose administrada de PAHIDA-^{99m}Tc presente nos rins

TEMPO (minutos)	% DOSE/ÓRGÃO	% DOSE/GRAMA
1	11,96 ± 3,07	6,09 ± 1,78
5	9,51 ± 3,55	5,14 ± 1,83
10	5,61 ± 2,30	2,84 ± 0,83
15	4,41 ± 1,48	2,34 ± 0,71
30	3,20 ± 1,61	1,59 ± 0,45
45	3,29 ± 1,26	1,85 ± 0,68
60	2,53 ± 0,72	1,24 ± 0,32
90	2,53 ± 0,51	1,34 ± 0,16
120	2,31 ± 0,54	1,45 ± 0,49
240	2,63 ± 0,33	1,24 ± 0,21
1080	2,14 ± 0,30	0,96 ± 0,14
1440	1,78 ± 0,23	1,07 ± 0,12

Os clareamentos sanguíneo e plasmático do composto podem ser observados, respectivamente, nas Tabelas III e IV. Os resultados foram expressos em porcentagem da dose administrada presente no sangue e plasma totais e por unidade de volume (ml).

Tabela III - Níveis sanguíneos do PAHIDA-^{99m}Tc em diversos tempos após administração da dose

TEMPO (minutos)	PORCENTAGEM DA DOSE ADMINISTRADA	
	SANGUE TOTAL	SANGUE/ ml
1	25,22 ± 4,10	2,71 ± 0,54
5	10,61 ± 1,51	1,01 ± 0,11
10	9,12 ± 0,78	0,80 ± 0,07
15	6,80 ± 0,77	0,59 ± 0,06
30	4,11 ± 0,50	0,37 ± 0,04
45	2,36 ± 0,45	0,21 ± 0,05
60	1,61 ± 0,16	0,14 ± 0,01
90	1,08 ± 0,24	0,10 ± 0,02
120	0,94 ± 0,23	0,08 ± 0,01
240	0,76 ± 0,13	0,06 ± 0,01
1080	0,54 ± 0,15	0,04 ± 0,01
1440	0,27 ± 0,13	0,03 ± 0,01

Tabela IV - Níveis plasmáticos do PAHIDA-^{99m}Tc em diversos tempos após a administração da dose

TEMPO (minutos)	PORCENTAGEM DA DOSE ADMINISTRADA	
	PLASMA TOTAL	PLASMA/ ml
1	26,07 ± 4,28	4,93 ± 1,07
5	12,06 ± 1,65	1,80 ± 0,13
10	9,01 ± 1,27	1,54 ± 0,15
15	7,01 ± 0,99	1,05 ± 0,12
30	4,04 ± 0,58	0,54 ± 0,08
45	2,30 ± 0,39	0,36 ± 0,07
60	1,47 ± 0,16	0,21 ± 0,03
90	0,88 ± 0,20	0,15 ± 0,03
120	0,74 ± 0,21	0,11 ± 0,03
240	0,42 ± 0,06	0,06 ± 0,01
1080	0,13 ± 0,03	0,017 ± 0,005
1440	0,06 ± 0,01	0,010 ± 0,005

A Tabela V apresenta os resultados obtidos com as medidas de corpo inteiro. Os valores médios obtidos foram expressos em porcentagem da dose administrada retida no organismo do animal.

Tabela V - Porcentagem da dose administrada de PAHIDA-^{99m}Tc presente no corpo inteiro dos animais nos diferentes tempos do experimento

TEMPO (minutos)	PORCENTAGEM DA DOSE ADMINISTRADA
15	83,55 ± 3,58
20	74,76 ± 3,78
30	62,60 ± 6,71
45	54,01 ± 6,44
60	49,14 ± 11,27
90	43,51 ± 11,19
120	35,40 ± 7,75
180	34,03 ± 4,29
300	30,11 ± 1,58
360	25,33 ± 2,78

Os resultados obtidos com os estudos de eliminação do composto pela urina e fezes encontram-se, respectivamente, nas Tabelas VI e VII. Para a urina, os resultados foram expressos em porcentagem do composto eliminado no conteúdo total da bexiga para os diferentes tempos do experimento. A eliminação através das fezes foi expressa em porcentagem da dose administrada por grama de fezes nas amostras coletadas após 24 e 48 horas.

Tabela VI - Percentual da dose administrada de PAHIDA-^{99m}Tc acumulada na urina

TEMPO (minutos)	PORCENTAGEM DA DOSE ADMINISTRADA
1	0,06 ± 0,03
5	20,40 ± 7,64
15	36,78 ± 4,61
30	48,77 ± 4,93
45	61,83 ± 5,31
60	64,38 ± 5,85
120	70,61 ± 8,16
240	77,39 ± 7,28

Tabela VII - Percentual da dose administrada de PAHIDA-^{99m}Tc presente nas fezes

TEMPO (horas)	% DOSE	VALOR ACUMULADO	% DOSE/GRAMA	VALOR ACUMULADO
24	3,51 ± 0,80	3,51	1,83 ± 0,34	1,83
48	0,21 ± 0,20	3,72	0,13 ± 0,06	1,96

Os resultados da radioatividade presente na bile estão expressos na Tabela VIII em porcentagem da dose administrada nos intervalos de tempo avaliados.

Tabela VIII - Percentual da dose administrada de PAHIDA-^{99m}Tc excretada na bile

TEMPO (minuto)	PORCENTAGEM DA DOSE ADMINISTRADA	VALOR ACUMULADO
15	0,38 ± 0,03	0,38
30	0,45 ± 0,07	0,83
45	0,31 ± 0,02	1,14
60	0,33 ± 0,09	1,47
90	0,37 ± 0,04	1,84
120	0,30 ± 0,02	2,14
180	0,50 ± 0,03	2,64
240	0,40 ± 0,02	3,04
300	0,29 ± 0,02	3,33
360	0,32 ± 0,02	3,65

IV.3 - Estudos "in vitro"

A porcentagem do PAHIDA-^{99m}Tc que se liga às proteínas plasmáticas encontra-se representada na Tabela IX.

A capacidade de ligação aos eritrócitos pode ser estimada através da relação eritrócito/sangue total para diversos tempos expressos na Tabela X. Na mesma tabela os resultados correspondentes à partição entre eritrócito marcado e plasma não radioativo.

Tabela IX - Porcentagem de ligação do PAHIDA-^{99m}Tc às proteínas plasmáticas

TEMPO (minutos)	PORCENTAGEM DE LIGAÇÃO
1	35,10 ± 4,31
5	31,54 ± 1,00
15	32,46 ± 2,16
30	36,84 ± 2,45
60	48,88 ± 4,32
120	64,27 ± 2,45

Tabela X - Porcentagem de ligação do PAHIDA-^{99m}Tc aos eritrócitos

TEMPO (minuto)	ERITRÓCITOS/ SANGUE TOTAL	ERITRÓCITOS REINCUBADOS/ ERITRÓCITOS
1	1,34 ± 0,15	74,34 ± 0,64
15	1,37 ± 0,15	81,37 ± 8,85
30	3,38 ± 0,54	92,93 ± 0,21
60	10,75 ± 1,12	95,18 ± 4,00
120	36,44 ± 2,25	98,03 ± 1,01

Os cromatogramas apresentados na Figura 1 permitem visualizar o desenvolvimento cromatográfico de amostras de urina coletadas em diferentes tempos após a administração do PAHIDA-^{99m}Tc, nos sistemas indicados.

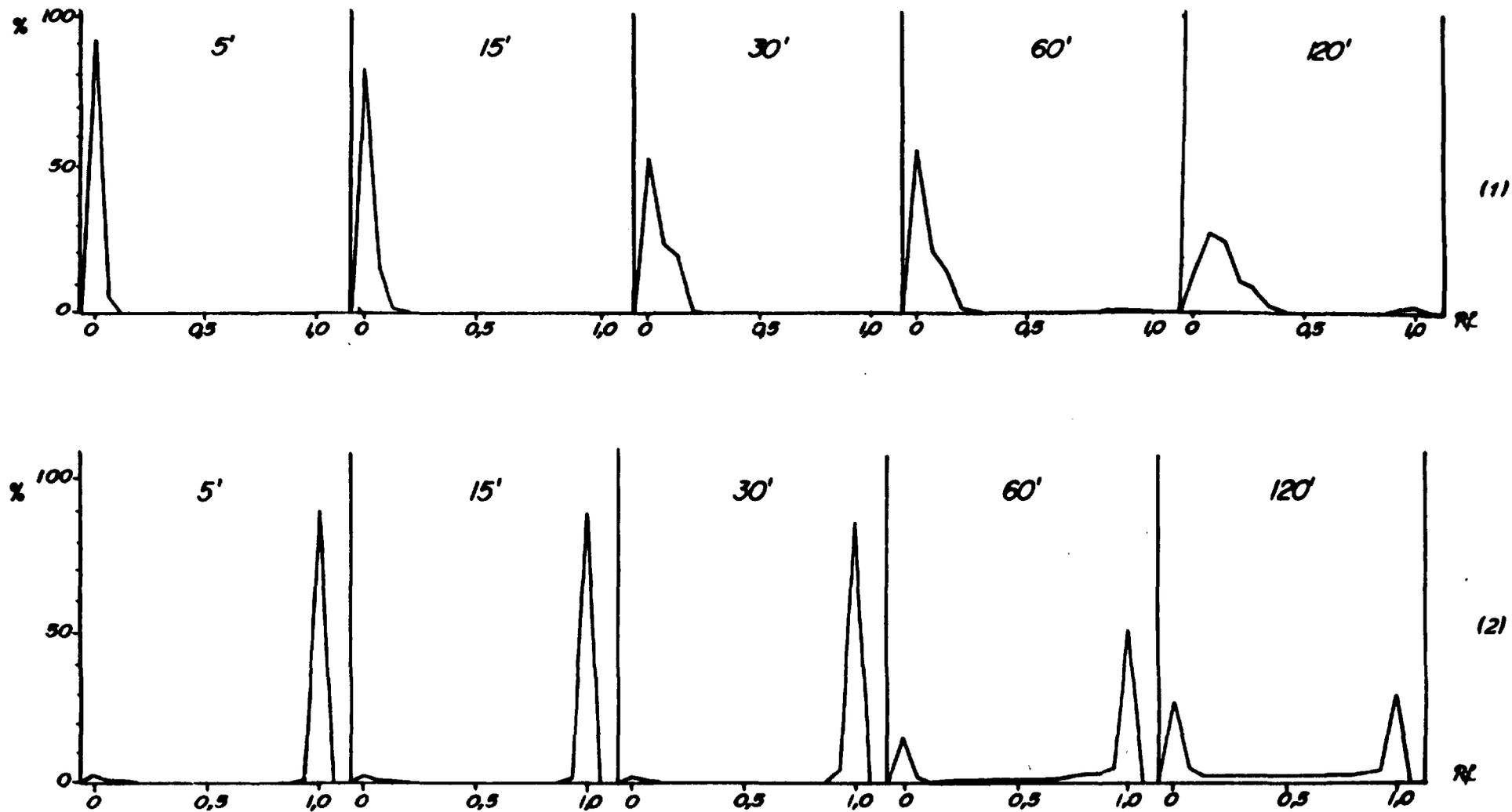


Figura 1 - Análise cromatográfica da urina de ratos Wistar administrados com ^{99m}Tc -PMDA em fitas de TLC (SG) em dois sistemas de solventes: (1) Acetona; (2) NaCl (0,9%).

IV.4 - Resultados obtidos com a utilização dos Programas Computacionais: análise da curva plasmática e de definição de um Modelo de Compartmentalização

O primeiro estágio no estudo da cinética de uma substância no organismo é construir a curva da concentração plasmática em função do tempo. A partir desta curva, pode-se definir o tratamento matemático que leva à determinação dos coeficientes de transferência da droga e à proposição do modelo cinético.

A curva plasmática experimental ajustou-se a uma soma de três exponenciais do tipo:

$$P(t) = A_1 e^{-b_1 t} + A_2 e^{-b_2 t} + A_3 e^{-b_3 t}$$

Obteve-se com o programa "SAS" os seguintes resultados:

$$A_3 = 1,835 \pm 0,642$$

$$b_3 = 0,007 \pm 0,003$$

$$A_2 = 13,680 \pm 0,548$$

$$b_2 = 0,059 \pm 0,005$$

$$b_1 = 2,006 \pm 0,029$$

O ajuste foi realizado com a seguinte restrição:

$$A_1 = 100 - (A_2 + A_3)$$

$$A_1 = 100 - (13,680 + 1,835)$$

$$A_1 = 84,485$$

Tais valores foram estimados para um intervalo de confiança de 95%.

Desta forma, temos a curva plasmática ajustada pelos pontos experimentais:

$$P(t) = 84,485 e^{-2,006t} + 13,680 e^{-0,059t} + 1,835 e^{-0,007t}$$

A Figura 2 mostra a curva plasmática ajustada aos pontos experimentais.

% Dose Administrada

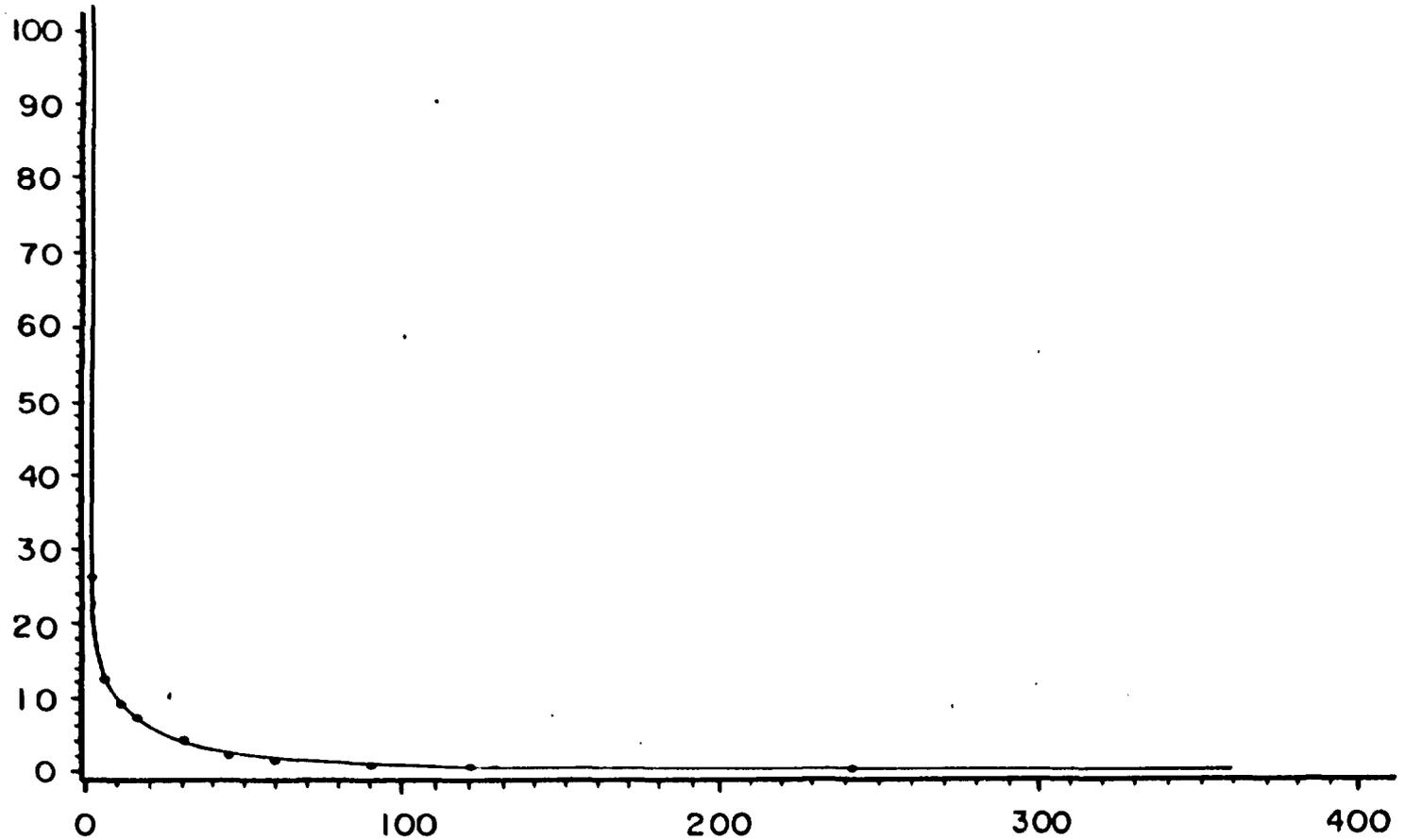


Figura 2 - Curva representativa do decaimento plasmático do ^{99m}Tc em ratos Wistar. (•) pontos experimentais; (—) curva simulada.

Tempo (minutos)

Calculou-se a meia vida ($T_{1/2}$) de cada exponencial da curva plasmática pela expressão:

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{b}$$

Desta forma, obtem-se:

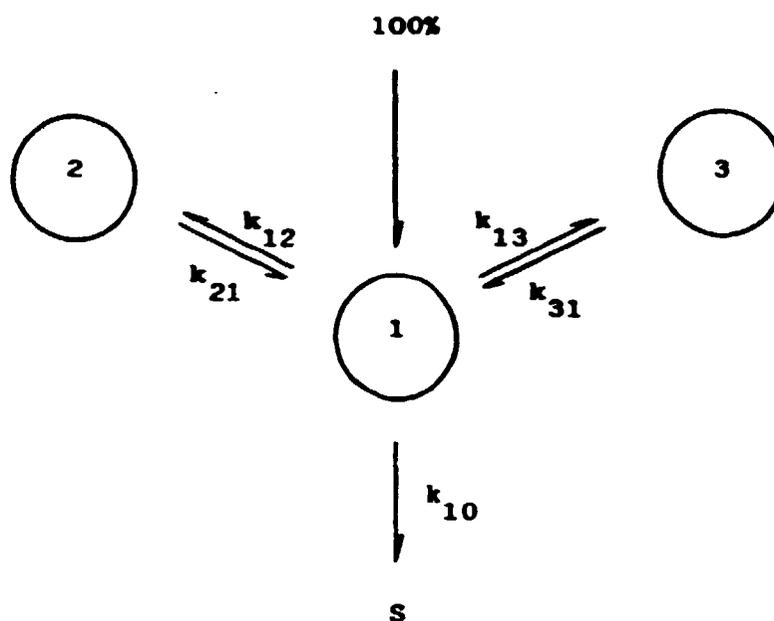
$$(T_{1/2})_1 = \frac{\ln 2}{b_1} = \frac{0,693}{2,006} = 0,35 \text{ minutos}$$

$$(T_{1/2})_2 = \frac{\ln 2}{b_2} = \frac{0,693}{0,059} = 11,75 \text{ minutos}$$

$$(T_{1/2})_3 = \frac{\ln 2}{b_3} = \frac{0,693}{0,007} = 99,00 \text{ minutos}$$

O ajuste dos dados experimentais sugere um modelo de distribuição com três compartimentos, como o esquematizado abaixo:

ENTRADA DO FÁRMACO



De acordo com este modelo, o sistema de equações diferenciais lineares de primeira ordem que descreve a evolução da substância marcada na unidade de tempo, apresenta coeficientes constantes do tipo:

$$dQ_1(t)/dt = -(k_{10} + K_{12} + K_{13}) Q_1(t) + k_{21} Q_2(t) + k_{31} Q_3(t)$$

$$dQ_2(t)/dt = -K_{21} Q_2(t) + K_{12} Q_1(t)$$

$$dQ_3(t)/dt = -k_{31}Q_3(t) + k_{13}Q_1(t)$$

$$dQ_5(t)/dt = k_{10}Q_1(t)$$

As condições iniciais são as seguintes:

$$Q_1(t=0) = 100\%$$

$$Q_2(t=0) = 0$$

$$Q_3(t=0) = 0$$

$$Q_5(t=0) = 0$$

Desta forma, no instante inicial ($t=0$), toda substância encontra-se no compartimento central.

O código computacional "SAAM 25" permitiu calcular os valores dos coeficientes de transferência (k) envolvidos no modelo:

$$k_{12} = 1,3833 \pm 0,1649$$

$$k_{21} = 0,3050 \pm 0,0408$$

$$k_{13} = 0,1437 \pm 0,0102$$

$$k_{31} = 0,0037 \pm 0,0003$$

$$k_{10} = 0,1315 \pm 0,0038$$

Os coeficientes de transferência foram substituídos no sistema de equações diferenciais descrito e a solução foi obtida com auxílio do sistema "CSMP".

A simulação do modelo tri-compartimental foi feita considerando-se os primeiros 360 minutos. Os resultados estão expressos na Tabela XI.

Tabela XI - Simulação do Modelo Tri-compartimental

TEMPO (minuto)	COMPARTIMENTO 1	COMPARTIMENTO 2	COMPARTIMENTO 3	CORPO INTEIRO	ELIMINAÇÃO
1	25,963	59,773	7,439	93,176	6,824
5	11,247	59,369	15,257	85,865	14,137
10	9,093	47,926	22,184	79,204	20,796
15	7,382	38,809	27,617	73,809	26,191
20	6,018	31,541	31,861	69,420	30,579
30	4,062	21,125	37,702	62,889	37,111
45	2,375	12,148	42,202	56,725	43,274
60	1,515	7,573	43,894	52,982	47,017
90	0,840	4,002	43,774	48,616	51,382
120	0,645	2,987	42,124	45,757	54,241
180	0,536	2,446	38,203	41,185	58,813
240	0,481	2,193	34,510	37,184	62,813
300	0,433	1,979	31,166	33,571	66,418
360	0,392	1,787	28,144	30,324	69,672

% Dose Administrada

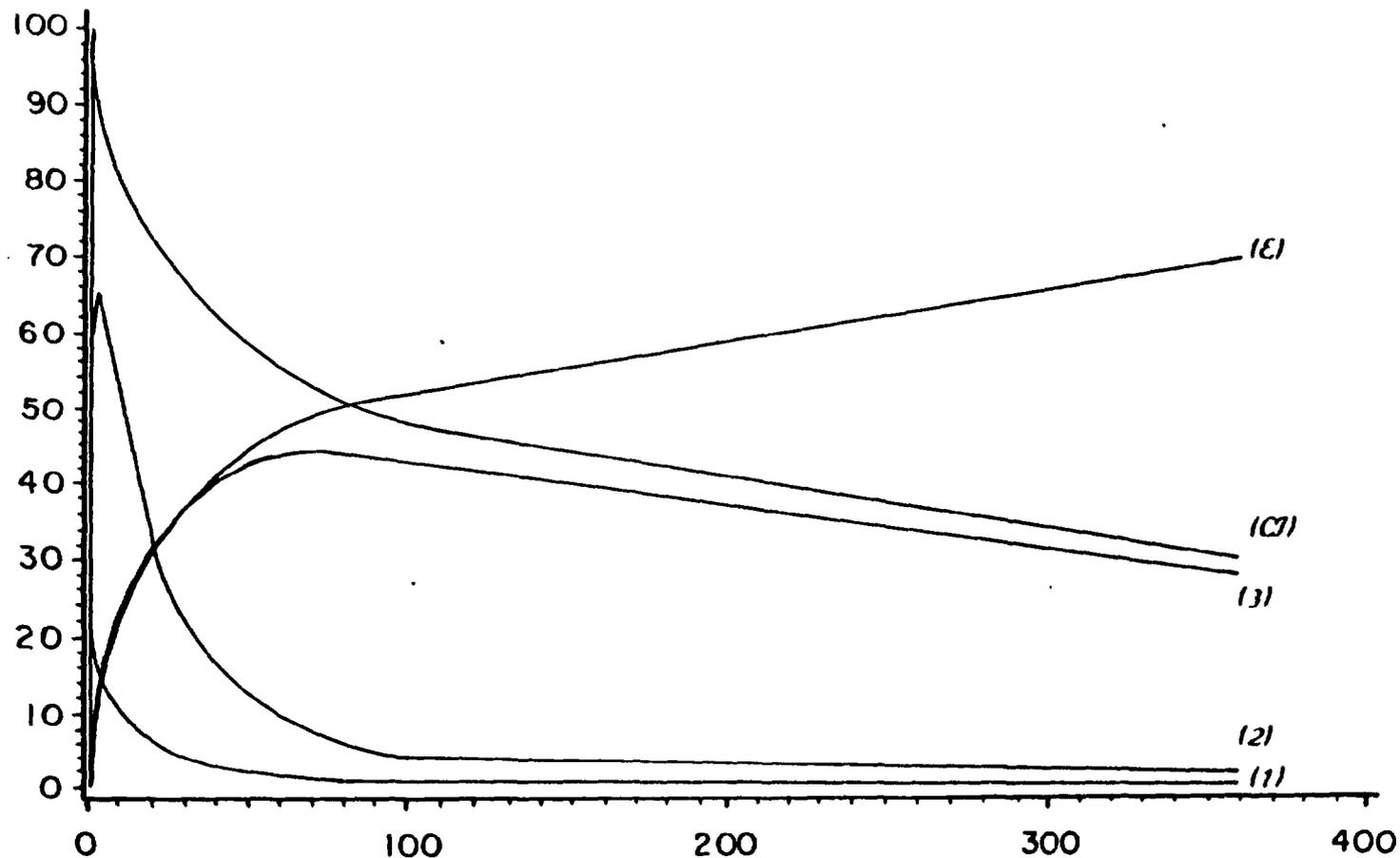


Figura 3 - Curvas representativas da simulação do Modelo de Distribuição do ^{99m}Tc -PMDA em ratos Wistar. (1) Compartimento 1; (2) Compartimento 2; (3) Compartimento 3; (C) Corpo inteiro; (E) Eliminação.

Tempo (minutos)

Os dados experimentais de corpo inteiro, expres-
 sos em porcentagem de dose ajustaram-se a uma soma de duas
 exponenciais do tipo:

$$\text{Curva de corpo inteiro} = A_1 e^{-b_1 t} + A_2 e^{-b_2 t}$$

obtendo-se com o programa "SAS" os seguintes resultados:

$$A_2 = 46,2870 \pm 6,3521$$

$$b_2 = 0,0017 \pm 0,0005$$

$$b_1 = 0,0309 \pm 0,0098$$

O ajuste foi realizado com a restrição:

$$A_1 = 100 - A_2$$

$$A_1 = 100 - 46,2870$$

$$A_1 = 53,7130$$

Tais valores foram estimados com um intervalo de
 confiança de 95%.

Desta forma, temos a curva de corpo inteiro ajustada pelos pontos experimentais:

$$\text{Curva de corpo inteiro} = 53,7130 e^{-0,0309t} + 46,2870 e^{-0,0017t}$$

Obteve-se o quadrado do coeficiente de correlação:

$$R^2 = 0,983897$$

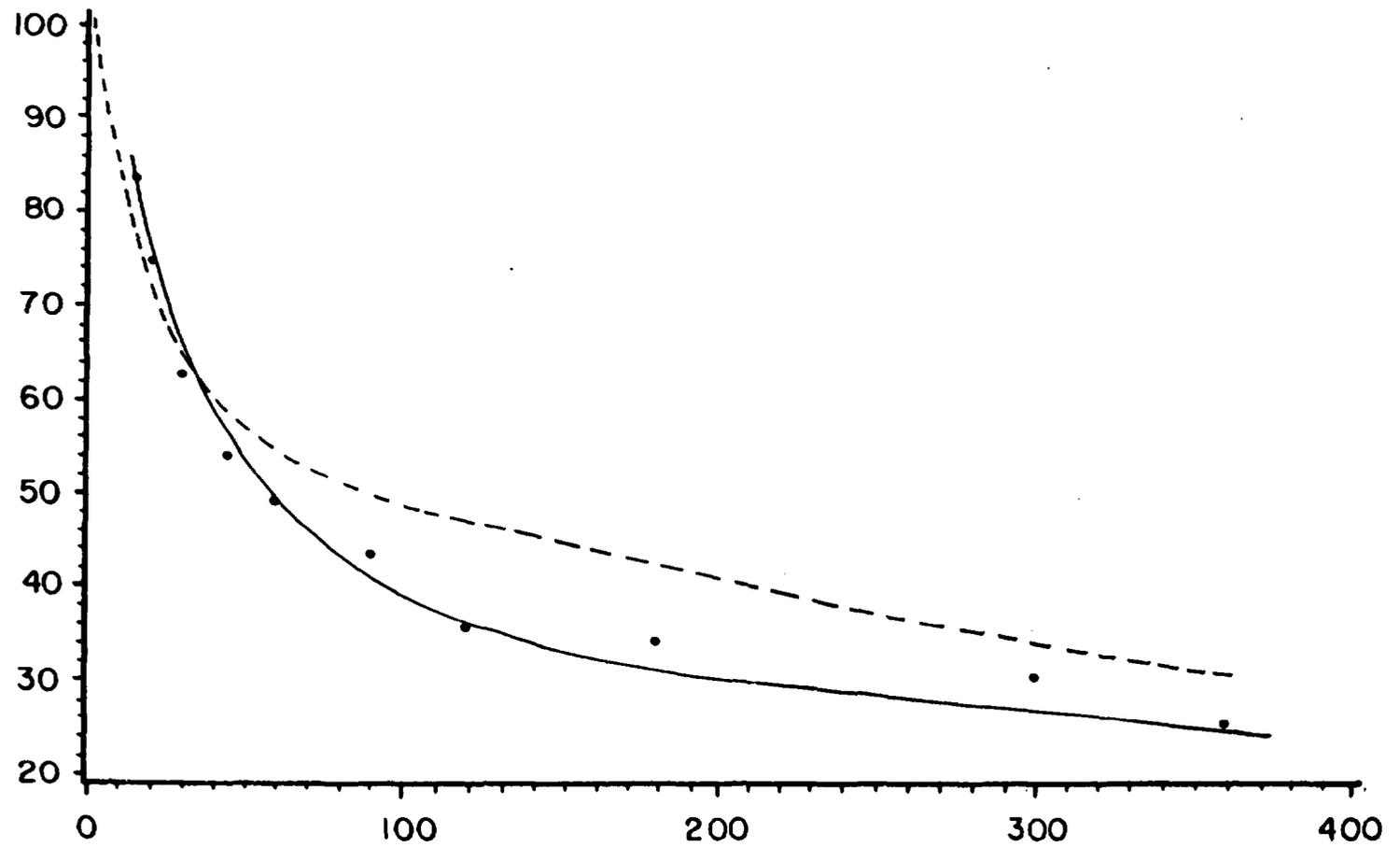
Obtidos os parâmetros da curva de corpo inteiro, determinaram-se os valores das T 1/2 de cada exponencial da curva:

$$(T \ 1/2)_1 = \frac{\ln 2}{b_1} = \frac{0,693}{0,0309} = 22,43 \text{ minutos}$$

$$(T \ 1/2)_2 = \frac{\ln 2}{b_2} = \frac{0,693}{0,0017} = 407,65 \text{ minutos}$$

A Figura 4 relaciona a curva de corpo inteiro obtida com os pontos experimentais com a do modelo simulado pelo programa "CSMP".

*% Dose
Administrada*



*Figura 4 - Curvas representativas da porcentagem de retenção do
PANDA-^{99m}Tc no corpo inteiro em ratos Wistar.
(—) experimental; (- - -) simulado*

Tempo (minutos)

V - DISCUSSÃO

O estudo da biodistribuição do PAHIDA-^{99m}Tc em ratos possibilita viabilizar o grau de seletividade do com posto por órgãos e tecidos afins. A Tabela I demonstra que a radiação corporal é significativamente baixa em relação à captação renal, expressa na Tabela II, indicando, portanto, pequena interferência dos órgãos adjacentes.

O percurso do radiofármaco através do rim é rela tivamente rápido, acumulando no primeiro minuto 11,96% da ra dioatividade total injetada, declinando a 3,2% após 30 minu tos e mantendo-se estável após 60 minutos.

Tais valores são comparáveis aos obtidos para ou tros traçadores empregados em estudos de função renal. Assim por exemplo, o DTPA-^{99m}Tc apresenta um valor máximo de cap tação renal de 15%, decaindo a 3% 15 minutos após admini stra ção em ratos Wistar ⁽³³⁾. Valor semelhante é encontrado em estudos com camundongos ⁽²⁶⁾. Em indivíduos normais, o DTPA-^{99m}Tc atinge um máximo de captação renal nos primeiros 5 minutos após a administração da dose, decrescendo progre sivamente em tempos subsequentes ^(13,55).

Comparando-se também com o Hippuran-¹³¹I, o ra diofármaco mais utilizado para estudos de função renal, ob serva-se que ratos Wistar apresentam um máximo de cap tação renal imediatamente após a injeção (35%), decaindo para cer ca de 2%, 15 minutos após a administração ⁽³³⁾. Em camundon gos, o máximo de captação renal é atingido nos primeiros mi

nutos e decai para valores inferiores a 1% após 30 minutos (26). Em indivíduos normais, a concentração máxima nos rins é alcançada nos primeiros 5 minutos após a injeção, dependendo do grau de hidratação do paciente (55).

Os valores são bastante diferentes dos observados para os traçadores estáticos como o gluceptato- ^{99m}Tc , que após duas horas apresenta captação renal em torno de 20%. No caso do DMSA- ^{99m}Tc , 1 hora após a administração da dose, 54% localiza-se no rim (13).

O PAHIDA- ^{99m}Tc administrado endovenosamente é rapidamente clareado da circulação (Tabela III), transportado, principalmente, pelo plasma como pode ser verificado nos dados da Tabela IV.

Estudos comparativos realizados em animais e humanos revelaram que as depurações sanguínea e renal do PAHIDA- ^{99m}Tc são mais lentas que as do OIH- ^{131}I , sendo contudo de maior amplitude que as esperadas para um traçador excretado exclusivamente por filtração glomerular (52).

Em contraposição, Summerville e colaboradores em estudos realizados em cães, chamaram a atenção para a similaridade entre o comportamento do PAHIDA- ^{99m}Tc e do DTPA- ^{99m}Tc , sugerindo para o primeiro composto eliminação por filtração glomerular (53).

Por outro lado, a ligação do radiofármaco às proteínas plasmáticas - determinada pela aplicação da metodologia de precipitação com TCA (Tabela IX) - é quantitativamente superior a descrita para o DTPA- ^{99m}Tc (39,55). Tal observação permite-nos considerar que se o PAHIDA fosse excretado

exclusivamente por filtração glomerular, apresentaria um clareamento sanguíneo mais lento que o DTPA e uma meia-vida biológica maior.

Embora o transporte do PAHIDA-^{99m}Tc pela corrente sanguínea seja feito em grande parte pelas proteínas plasmáticas, cerca de 10% encontra-se ligado aos eritrócitos aos 60 minutos (Tabela X). Este valor aumenta para 36% aos 120 minutos. Esta ligação seria, talvez, um dos fatores a contribuir para a retenção da radioatividade no organismo, podendo ainda indicar biotransformações que estariam ocorrendo com o radiofármaco, uma vez que a porcentagem de ligação a tais células aumenta com o decorrer do tempo após a administração da dose.

Jovanović e colaboradores ⁽³⁵⁾, estudando métodos cromatográficos para determinação de pureza radioquímica em preparações de Dietil-IDA-^{99m}Tc, observaram uma certa porcentagem da radioatividade ligada às células vermelhas e atribuiu-a como originária do colóide-^{99m}Tc na forma hidrolisada, não a relacionando, portanto, ao produto íntegro.

Apesar da similaridade já destacada entre a estrutura do PAHIDA e a de certos agentes hepatobiliares, a excreção do composto em estudo foi predominantemente renal (Tabela VI).

A importância dos grupos carbonil e carboxil na estrutura da molécula do PAHIDA já foi descrita como indispensável para a interação com os receptores das células transportadoras ⁽¹⁷⁾.

A presença de substituintes alquil hidrofóbicos no anel benzênico causariam excreção hepatobiliar do composto que pode ser considerada como uma segunda rota de excreção. Ao final de 6 horas de coleta ininterrupta de bile, acumulou-se uma excreção por esta via de pouco mais de 3% da dose administrada (Tabela VIII). Tal valor, bastante próximo do encontrado nas fezes de 24 e 48 horas (Tabela VII), confirma a predominância de excreção renal do composto.

Considerando, desta forma, as observações experimentais e as relativas à estrutura do PAHIDA, poderíamos supor que o composto em estudo apresentasse excreção renal via secreção tubular, com uma componente glomerular associada, maior que a observada para o ácido p-amino hippúrico (PAH) (22). A eficiência de extração diminuída do PAHIDA poderia ser atribuída a considerações estéricas ou de carga, que dificultassem a interação do substrato com os receptores (53).

Baseando-se nesta hipótese, a componente de excreção tubular explicaria o rápido clareamento sanguíneo inicial e a glomerular justificaria a eficiência de extração diminuída quando comparada à do PAH.

A análise do perfil cromatográfico da urina sugere que nos instantes iniciais da excreção, o PAHIDA-^{99m}Tc mantém sua integridade. Todavia, em tempo subsequente, surgem formas radioquímicas diferentes, cujas concentrações vão aumentando gradativamente com o transcorrer dos minutos (Figura 1).

As diferentes formas radioquímicas observadas sugerem a presença de produtos de metabolização do composto.

não determinados, originados de uma possível ação enzimática (15).

A estabilidade de um radiofármaco "in vivo" e "in vitro" são importantes fatores para um trabalho clínico de alta qualidade em Medicina Nuclear. Alterações "in vivo" na estrutura do Hippuran-¹³¹I foram consideradas passíveis de serem explicadas por diferentes processos metabólicos: de iodação resultando no ácido hippúrico, transformação em ácido benzóico, glicina e iodeto livre ou hidrólise originando ácido o-¹³¹I-benzóico e glicina (18).

Assim, além da possibilidade da excreção glomerular do PAHIDA, temos que considerar também o possível processo de metabolização renal do composto, originando formas radioquímicas diferentes.

Análise do Modelo Matemático de Distribuição do PAHIDA-^{99m}Tc

O modelo cinético do PAHIDA foi extrapolado a partir dos dados obtidos dos níveis da radioatividade plasmática na unidade de tempo. A formulação baseou-se no provável comportamento fisiológico do radiofármaco.

A metodologia aplicada com auxílio de computador permite a interpretação da dissociação da curva em equações exponenciais representada graficamente em escala semilogarítmica, onde é possível reconhecer o número provável de compartimentos pelos quais se distribui o composto marcado.

A utilização do programa computacional "SAS" permitiu um ajuste bastante preciso da curva plasmática através de sua decomposição em três exponenciais.

A primeira exponencial, a de distribuição, resulta do rápido clareamento da radioatividade sanguínea com meia-vida bastante curta, de 0,35 minutos. No primeiro minuto após a administração do PAHIDA-^{99m}Tc, cerca de 25% da dose encontra-se no compartimento sanguíneo (central). As duas outras exponenciais, com meia-vida maiores, caracterizam a seletividade e retenção do composto.

Desta forma, a decomposição da curva plasmática em três exponenciais, sugere um modelo de distribuição em três compartimentos, que pode ser definido da seguinte forma: um compartimento central (1), intravascular, do qual o radiofármaco injetado é transferido através da membrana biológica para o compartimento adjacente (2). Deste, uma quantidade relativamente alta de radioatividade é efetivamente eliminada no decorrer do tempo pelas vias urinárias e uma pequena fração, que por um processo metabólico ainda não definido permanece retida, por um período mais prolongado, caracterizando o terceiro compartimento (3).

A grandeza dos coeficientes de proporcionalidade k_{12} e k_{13} indicam a quantidade fracional de transferência do compartimento intravascular para os extravasculares, exprimindo a velocidade de depuração sanguínea do PAHIDA-^{99m}Tc.

Analisando este processo de troca entre compartimentos, observa-se que, uma quantidade ponderável de radioatividade retorna ao compartimento 1 (k_{21} e k_{31}) para então ser excretada pelas vias urinárias com seu coeficiente de

eliminação k_{10} .

Ao considerar-se a diferença entre k_{13} e k_{31} observa-se o grau de retenção do composto no organismo. Tal resultado é confirmado pelas medidas de corpo inteiro (Tabela V). A excreção deste componente se faz pela mesma via que o primeiro (k_{21}). O fato da existência de mais uma fração radioativa foi constatado pela análise cromatográfica da urina (Figura 1).

A partir deste modelo de compartimentalização, obteve-se os valores simulados em termos de porcentagem de retenção no corpo inteiro (somatória dos dados obtidos nos três compartimentos) e de eliminação (diferença entre a dose administrada e a retida no organismo).

A decomposição da curva de corpo inteiro, com o auxílio do programa "SAS", em duas exponenciais, possibilita exprimir a meia-vida biológica do composto.

O valor obtido para o quadrado do coeficiente de correlação (R^2), indica que o modelo explica quase que a totalidade (100%) dos dados experimentais.

A segunda componente da curva, significativamente mais lenta que a primeira, comprova com maior nitidez a fixação do radiofármaco em determinado órgão e/ou tecido por um período de tempo mais prolongado.

A compartimentalização proposta e os valores obtidos com a simulação do modelo parecem ilustrar bem a distribuição do PAHIDA- ^{99m}Tc , adequando-se aos valores obtidos experimentalmente.

Os parâmetros farmacocinéticos obtidos com tal estudo, facilitam a comparação entre o PAHIDA e outros radiofármacos empregados em estudos renais dinâmicos.

O DTPA-^{99m}Tc, sabidamente excretado por filtração glomerular, apresenta curva de clareamento sanguíneo em indivíduos normais caracterizada por três exponenciais com meia-vida de aproximadamente 10, 90 e 600 minutos (39,55).

Estimativa feita em ratos para os primeiros 60 minutos, demonstraram para a curva de clareamento sanguíneo do DTPA-^{99m}Tc, duas exponenciais com meia-vida de 3,05 e 19,52 minutos (45).

Cerca de 10% de retenção no organismo do animal foi encontrado após 24 horas da administração da dose (33), caracterizada principalmente pela componente mais lenta da curva plasmática. Tal fato tem sido discutido por diversos autores, sendo atribuído à tendência do composto em se ligar às proteínas plasmáticas na faixa de 5 a 10%, retardando sua excreção por filtração glomerular (29,47). Na verdade, o grau de ligação às proteínas plasmáticas varia de acordo com a preparação farmacêutica, podendo ainda estar relacionado a impurezas e produtos de degradação (11,31,44).

O Hippuran-¹³¹I apresenta curva de clareamento sanguíneo em indivíduos normais com 3 exponenciais, de tempo de meia-vida de aproximadamente 6, 11 e 22 minutos (46).

Em ratos Wistar, o clareamento sanguíneo é bastante mais rápido que para o DTPA-^{99m}Tc. Estudos de captação de corpo inteiro realizados também em ratos, deter

minaram para o composto uma retenção de 0,5%, 24 horas após a administração da dose (33).

Equacionando-se os dados obtidos pela curva de corpo inteiro do PAHIDA-^{99m}Tc, encontramos para t = 24 horas (1440 minutos), cerca de 4% de retenção. A análise comparativa entre PAHIDA-^{99m}Tc, DTPA-^{99m}Tc e Hippuran-¹³¹I, no que diz respeito às meias-vidas plasmática e de corpo inteiro, estabelece para o primeiro uma retenção intermediária à dos outros dois radiofármacos, sugerindo mais uma vez que seu processo de excreção renal não se dá exclusivamente por filtração glomerular.

VI - CONCLUSÕES

Os estudos realizados e a interpretação de seus resultados, levou-nos a definir certas propriedades e características do PAHIDA-^{99m}Tc:

1. Alta especificidade pelos rins e baixa pelos órgãos e tecidos adjacentes
2. Rápido clareamento sanguíneo
3. Excreção predominantemente renal, com baixa excreção por via entero-hepática
4. Ligação às proteínas plasmáticas relativamente alta, aumentando com o tempo após a administração da dose. Ligação significativa aos eritrócitos em tempos mais tardios
5. Excreção na urina sob forma íntegra apenas nos primeiros minutos, com o surgimento de formas radioquímicas diferentes em período subsequente, sugerindo uma possível metabolização renal do composto
6. Farmacocinética ajustada a um modelo de três compartimentos, sendo um central e dois periféricos
7. As meias-vidas das exponenciais da curva plasmática evidenciam a rápida distribuição do composto no organismo e expressam seletividade e retenção através das componentes mais lentas

8. A curva de corpo inteiro foi ajustada a uma soma de duas exponenciais com meias-vidas distintas. A componente mais lenta também caracteriza a retenção do composto
9. A retenção, observada nas medidas de corpo inteiro e eliminação urinária, sendo confirmada ainda nos estudos de compartmentalização, pode estar relacionada a vários fatores a saber: ligação do composto a constituintes sanguíneos, componente de excreção glomerular associada à excreção tubular, possibilidade de metabolização renal do composto e ainda dificuldade de interação com receptores das células tubulares por impedimento estrutural.

VII - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos de biodistribuição realizados bem como o modelo de compartimentalização proposto para o complexo PAHIDA-^{99m}Tc, avaliaram uma série de propriedades biológicas essenciais para a caracterização do composto.

A padronização do perfil de um determinado radiofármaco é fator de extrema importância uma vez que os conhecimentos adquiridos são aplicados na realização de estudos clínicos confiáveis e de alta conceituação em Medicina Nuclear.

O estudo apresentado fundamenta um passo determinante no direcionamento de novas investigações, que ampliem ainda mais as discussões aqui encaminhadas.

Neste sentido, julgamos que, com o auxílio da farmacologia aplicada ao desenvolvimento de um novo radiofármaco, pudemos oferecer alguma contribuição para o emprego de traçadores renais dentro das técnicas da atual Medicina Nuclear.

VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, M.A.T.M.; HAMADA, E.S.; MURAMOTO, E.; COLTURATO, M.T.; HERREIRAS, R. Síntese e preparação de conjuntos reativos liofilizados do ácido p- [(bis-carboximetil) aminometil carboxiamino] hippúrico. São Paulo, Instituto de Pesquisas Energética e Nucleares, jul. 1988. (Publicação IPEN 177).
2. ALTMAN, P., comp. & DITTMER, D., ed. Blood and other body fluids. Washington, D.C., Federation of American Societs for Experimental Biology, p.1-19. (Biological handbooks).
3. ATALLAH, M.R. & GLENN, H.J. Animal handling, drug administration, dissection and tissue and fluid sampling techniques. In: GLENN, H.J. Biologic applications of radiotracers. Boca Raton, Fl., CRC, 1982. cap.6, p.129-49.
4. BARBOUR, G.L.; CRUMB, C.K.; BOYD, C.M.; REEVES, R.D.; RASTOGI, S.P.; PATTERSON, R.M. Comparison of inulin, iothalamate, and ^{99m}Tc-DTPA for measurement of glomerular filtration rate. J. Nucl. Med., 14(4): 317-20, 1976.

5. BERMAN, M & WEISS, M.F. User's manual for SAAM (Simulation analysis and modeling), Version SAAM 25. Bethesda, Md., National Institute of Health, 1974.
6. BHARGAVA, K.K.; ZHANG, Z.; CHUN, S.B.; CHERVU, L.R.; BLAUFOX, M.D. Evaluation of iminoacetic acid derivatives of ortho and meta amino hippuric acid analogs as renal function agents. J. Labelled Compd. Radiopharm., 25(9):943-8, 1988.
7. BLAUFOX, M.D.; CHERVU, L.R.; FREEMAN, L.M. Radiopharmaceuticals for quantitative study of renal function. In: SUBRAMANIAN, G., ed. Radiopharmaceuticals. New York, Society of Nuclear Medicine, 1975. cap.41, p.385-95.
8. BROWNELL, G.L.; BERMAN, M.; ROBERTSON, J.S. Nomenclature for tracer kinetics. Int. J. Appl. Radiat. Isot., 19: 249-262, 1968.
9. CABREJAS, M.L. Utilización de la computadora em estudios dinámicos com radioisótopos en medicina: aplicación del análisis compartimental. Rev. Biol. Med. Nucl., 6: 68-74, 1974.
10. CÁRCAMO, E.C. Introducción a la farmacocinética. Washington, D.C., Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, 1982.

11. CARLSEN, J.E.; MOLLER, M.L.; LUND, J.O.; JENSEN, J.T.
Comparison of four commercial Tc-99m (Sn) DTPA preparations used for the measurement of glomerular filtration rate: concise communication. J. Nucl. Med., 21: 126-9, 1980.
12. CHERVU, L.R.; BHARGAVA, K.K.; ZHUANGYU, Z.; BLAUFox, M.D. PAH-iminodiacetic acid analogs as renal function agents. J. Labelled Compd. Radiopharm., 26:433-5, 1989.
13. CHERVU, L.R. & BLAUFox, M.D. Renal radiopharmaceuticals: an update. Semin. Nucl. Med., 12(3):224-45, 1982.
14. CHERVU, L.R.; SUNDORO, B.M.; BLAUFox, M.D. Technetium-99m labeled p-amino hippuric acid analog: a new renal agent: concise communication. J. Nucl. Med., 25:1111-5, 1984.
15. COHEN, Y. & BESNARD, M. Fate of radiometabolites. In: COLOMBETTI, L.G. Principles of Radiopharmacology. Boca Raton, Fl., CRC, 1979. v.2, p.155-63.
16. DAVISON, A.; SOHN, M.; ORVIG, C.; JONES, A.G.; LATEGOLA, M.R. A tetradentate ligand designed specifically to coordinate technetium. J. Nucl. Med., 20: 641, 1979.
17. DESPOPOULOS, A. A definition of substrate specificity in renal transport of organic anions. J. Theor. Biol., 8:163-92, 1965.

18. DEWANJEE, M.K. & RAO, S.A. Principles of radioiodination and iodine-labeled tracers in biomedical investigation. In: RAYUDU, G.V.S. Radiotracers for medical applications. Boca Raton, Fl., CRC, 1983. cap.1, p.3-94.
19. DUBOVSKY, E.V. & RUSSELL, C.D. Quantitation of renal function with glomerular and tubular agents. Semin. Nucl. Med., 12(4):308-29, 1982.
20. ENLANDER, D.; WEBER, P.M.; REMEDIOS, L.V. Renal cortical imaging in 35 patients: superior quality with ^{99m}Tc - DMSA. J. Nucl. Med., 15(9):743-9, 1974.
21. FREEMAN, L.M. & LAN, J.A. Radiopharmaceutical evaluation of the hepatobiliary pathway. Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part B: Nucl. Med. Biol., 17(1):129-39, 1990.
22. FRITZBERG, A.R. Current status of renal radiopharmaceuticals. J. Nucl. Med. Technol., 12(4):177-88, 1984.
23. FRITZBERG, A.R.; KASINA, S.; ESHIMA, D.; JOHNSON, D.L. Synthesis and biological evaluation of technetium-99m MAG_3 as a hippuran replacement. J. Nucl. Med., 27: 111-6, 1986.
24. FRITZBERG, A.R.; KLINGENSMITH III, W.C.; WHITNEU, W.P.; KUNI, C.C. Chemical and biological studies of Tc-99m N,N'-bis(mercaptoacetamido)ethylenediamine. J. Nucl. Med., 22:258-63, 1981.

25. FRITZBERG, A.R.; KUNI, C.C.; KLINGENSMITH III, W.C.; STEVENS, J.; WHITNEY, W.P. Synthesis and biological evaluation of Tc-99m N,N'-bis(mercaptoacetyl)-2,3 - diaminopropanoate: a potential replacement for (¹³¹I) o-iodohippurate. J. Nucl. Med., 23:592-8, 1982.
26. FRITZBERG, A.R.; WHITNEY, W.P.; KUNI, C.C.; KLINGENSMITH III, W.C. Biodistribution and renal excretion of ^{99m}Tc-N,N'-bis(mercaptoacetamido) ethylenediamine. Effect of renal tubular transport inhibitors. Int. J. Nucl. Med. Biol., 9:79-82, 1982.
27. GANONG, W.F. Fisiologia médica. 2.ed. São Paulo, SP, Atheneu, 1973. p.557-81.
28. GLENN, H.J. Distribution studies. In: GLENN, H.J. Biologic applications of radiotracers. Boca Raton, Fl., CRC, 1982. cap.5, p.109-27.
29. GOATES, J.J.; MORTON, K.A.; WHOOTEN, W.W.; GREENBERG, H.E.; DATE, F.L.; HANDY, J.E.; SCUDERI, A.J.; HAAKENSTAD, A.O.; LYNCH, R.E. Comparison of methods for calculating glomerular filtration rate: technetium-99m-DTPA scintigraphic analysis, protein-free and whole-plasma clearance of technetium-99m-DTPA and iodine-125-iothalamate clearance. J. Nucl. Med., 31:424-9, 1990.
30. HARPER, P.V.; BECK, R.; CHARLESTON, D.; LATHROP, K.A. Optimization of a scanning. Nucleonics, 22:50-4, 1964.

31. HOSAIN, F. Quality control of ^{99m}Tc -DTPA by double-tracer clearance technique. J. Nucl. Med., 15: 442-5, 1974.
32. HOUSSAY, B.; BARCIA, R.C.; COVIAN, M.R.; FASCIOLO, J.C.; FOGLIA, V.G.; HOUSSAY, A.B.; HUG, E.; LELOIR, L.F.; LEVIS, J.T.; SOLDATI, L. Fisiologia humana. Buenos Aires, El Ateneo, 1971. p.879-94.
33. JAKUBOWSKI, W.; GRABAN, W.; LICINSKA, I.; KRASUCKI, T.; LACHNIK, E.; ZULCZUK, W.; WIZA, J.; SMOLINSKI, S. Comparative investigation of renal scanning agents. Eur. J. Nucl. Med., 3:33-9, 1978.
34. JEFFRIES, J.F. Nonisotopic labelling. In: COLOMBETTI, L.G., ed. Principles of radiopharmacology. Boca Raton, Fl., CRC, 1979. v.1, p.27-43.
35. JOVANOVIĆ, V.; KONSTANTINOVSKA, D.; MEMEDOVIĆ, T. Determination of radiochemical purity and stability of ^{99m}Tc -Diethyl HIDA. Eur. J. Nucl. Med., 6:375-8, 1981.
36. KENNA, B.T. The search for technetium in nature. J. Chem. Educ., 39:436-42, 1962.
37. KLINGENSMITH III, W.C.; GERHOLD, J.P.; FRITZBERG, A.R.; SPITZER, U.M.; KUNI, C.C.; SINGER, C.J.; WELL III, R. Clinical comparison of $\text{Tc-}^{99m}\text{N,N'}$ -bis (mercapto acetamido) ethylenediamine and (^{131}I) ortho-iodo hippurate for evaluation of renal tubular function: concise communication. J. Nucl. Med., 23:377-80, 1982.

38. KLINGENSMITH III, W.C.; TYLER, H.N.; MARSH, W.C.; HANNA, G.M.; FRITZBERG, A.R.; HOLT, S.T. Effect of hydration and dehydration on technetium-99m CO_2 DADS. Renal studies in normal volunteers. J. Nucl. Med., 26: 875-9, 1985.
39. KLOPPER, J.F.; HAUSER, W.; ATKINS, H.L.; ECKELMAN, W.C.; RICHARDS, P. Evaluation of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA for the measurement of glomerular filtration rate. J. Nucl. Med., 13(1):107-10, 1971.
40. KONIKOWSKI, T.; GLENN, H.J.; HAYNIE, T.P.; JAHNS, M.F. An intercomparison of radiopharmaceutical kidney kinetics in mouse. Int. J. Nucl. Med. Biol., 2:59-65, 1975.
41. LEE, H.B. & BLAUFOX, M.D. Blood volume in rat. J. Nucl. Med., 25:72-6, 1985.
42. McAFEE, J.G.; GROSSMAN, Z.D.; GAGNE, G.; ZENS, A.L.; SUBRAMANIAN, G.; THOMAS, F.D.; FERNANDEZ, P.; KOSKOPF, M.L. Comparison of renal extraction efficiencies for radioactive agents in the normal dog. J. Nucl. Med., 22:333-8, 1981.
43. MEDICAL INTERNAL RADIATION DOSE COMMITTEE. Summary of current radiation dose estimates to humans from ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{126}I , ^{130}I , ^{131}I and ^{132}I as sodium iodine. J. Nucl. Med., 16(9):857-60, 1975. (MIRD/Dose estimate report, 5).

44. MOORE, M. & RHODES, B.A. Is the radiochemical purity of Tc-99m radiopharmaceuticals decreasing? J. Nucl. Med., 23:548-9, 1982.
45. MURAMOTO, E.; ACHANDO, S.S.; HAMADA, E.S.; VALENTE, R.G.; CARVALHO, O.G. Velocidade de depuração e afinidade dos radiofármacos renais aos constituintes sanguíneos em animais submetidos a ação de anestésicos (éter etílico e uretana). Trabalho a ser publicado no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
46. ROCHA, A.F.G. Aplicações em nefrologia. In: ROCHA, A.F.G. Medicina Nuclear. Rio de Janeiro, RJ, Guanabara Koogan, 1976. cap.19, p.335-46.
47. RUSSELL, C.D.; BISCHOFF, P.G.; ROWELL, K.L.; KONTZEN, F.; LLOYD, L.K.; TAUXE, W.N.; DUBOVSKU, E.V. Quality control of Tc-99m DTPA for measurement of glomerular filtration: concise communication. J. Nucl. Med., 24:722-7, 1983.
48. SAS User's guide, version 5. Cary, NC, SAS Institute, 1985.
49. SMITH, E.M. Internal dose calculation for ^{99m}Tc. J. Nucl. Med., 6:231-51, 1965.
50. SORENSON, L.B. Preliminary physiological studies of molybdenum (99Mo) in liver scanning. Radiology, 82:318, 1964.

51. SRIVASTAVA, S.C. & RICHARDS, P. Technetium-labeled compounds. In: RAYUDU, G.V.S., ed. Radiotracers for medical applications. Boca Raton, Fl., CRC, 1983. cap.4, p.107-86.
52. SUBRAMANIAN, G. & McAFEE, J.G. Radioisotope generators. In: TUBIS, M. & WOLF, W., eds. Radiopharmacy. New York, NY, John Wiley, 1976. cap.11, p.255-77.
53. SUMMerville, D.A.; PACKARD, A.B.; BARTYNSKY, B.; LIN, K. S.; CHERVU, L.R.; TREVES, S.T. Evaluation of the renal clearance of technetium-99m PAHIDA in dogs. J. Nucl. Med., 28:907-9, 1987.
54. SYSTEM/360 continuous system modeling program user's manual. White Plains, NY, IBM Technical Publications Department, 1972.
55. TAUXE, W.N. Nefro-urológia. In: ROCHA, A.F.G. & HARBERT, J.C. Medicina nuclear-aplicações clínicas. Rio de Janeiro, RJ, Guanabara Koogan, 1979. cap.7, p.278-99.
56. TAUXE, W.N.; DUBOVSKU, E.V.; KIDD JR., T.; SMITH, L.R.; LEWIS, R.; RIVERA, R. Prediction of urinary excretion of ¹³¹I-orthoiodo hippurate. Eur. J. Nucl. Med., 7: 102-3, 1982.
57. TAYLOR, A.; ESHIMA, D.; FRITZBERG, A.R.; CHRISTIAN, P.E.; KASINA, S. Comparison of iodine-131 OIH and technetium-99m MAG_3 renal imaging in volunteers. J. Nucl. Med., 27:795-803, 1986.

58. USA., Pharmacopeial Convention. The pharmacopeia of the United States of America. 16.ed. 1985. p.547-8.
59. VEALL, N. & VETTER, H. Radioisotope techniques in clinical research and diagnosis. London, Butterworth, 1958. p.223-38.
60. VILLALOBOS, J.P. Estudo da cinética do pertecnetato nas glândulas parótida e submandibulares, em indivíduos normais. São Paulo, 1981. (Dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).
61. YANO, Y. Effect of transport on distribution of radioions and radiometabolites. In: COLOMBETTI, L.G., ed. Biological transport of radiotracers. Boca Raton, Fl., CRC, 1982. cap.9, p.157-87.
62. ZMBOVA, B.; DJOKIĆ, D.; BOGDANOVA, V.; TADZER, I.; ADJINOVIĆ, B.; RASTOVAC, M. Synthesis of p-amino hippuric acid analog and its labeling by technetium-99m. Int. J. Radiat. Appl. Instrum., Part A: Appl. Radiat. Isot., 40(3):225-34, 1989.
63. ZUCAS, J.M.; LAJOLO, F.M.; BARBÉRIO, J.C. Gaiola metabólica para ratos testados por meio de zinco radioativo ⁶⁵Zn. Rev. Fac. Farm. Bioquim., 7(2):353-9, 1969.