



CNEN/SP

**ipen** Instituto de Pesquisas  
Energéticas e Nucleares

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO

BR9432021

INIS-BR -- 3316

**PREPARAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA DO COMPLEXO DITIOCARBAMATO DE  
ESPIPERONA-<sup>99m</sup>Tc, AGENTE DIAGNÓSTICO POTENCIAL DE PATOLOGIAS  
CEREBRAIS RELACIONADAS AOS RECEPTORES D-2 APRESENTADO  
SOB FORMA DE CONJUNTO DE REATIVOS  
PARA MARCAÇÃO "IN SITU"**

**MARCOS MOISÉS GONÇALVES**

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**

**1993**

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

PREPARAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA DO COMPLEXO DITIOCARBAMATO  
DE ESPIPERONA- <sup>99m</sup>Tc, AGENTE DIAGNÓSTICO POTENCIAL DE PATOLOGIAS  
CEREBRAIS RELACIONADAS AOS RECEPTORES D-2 APRESENTADO SOB  
FORMA DE CONJUNTO DE REATIVOS PARA MARCAÇÃO "IN SITU"

MARCOS MOISÉS GONÇALVES

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

Orientadora: Dra Maria Aparecida T.M. de Almeida

S ã O P A U L O

1 9 9 3

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Spero Penha Morato , Superintendente do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN - CNEN/SP) e ao Dr José Roberto Rogero Diretor do Setor de Aplicações Técnicas Nucleares que possibilitaram o progresso do presente trabalho.

Ao M.Sc.Haroldo T. Casiglia, Chefe do Departamento de Processamento pela oportunidade cedida e prestímosa cooperação. À CAPES e à Comissão de Pós-Graduação do Ipen.

À Dra Maria Aparecida T. M. de Almeida por orientar, guiar, corrigir e apoiar o desenvolvimento do trabalho. À Mestre Rodza S.V. Chefe do TPF.

Ao Professor Dr.Yukino Miyata, à Dra Emiko Muramoto, à Mestre Marycel Barbosa, à Mestre Elaine Bortoleti Araújo, por inestimável contribuição e colaboração.

À Dra Nilza P.S. Pereira, à Farmacêutica Tereza de Marilaque, ao Dr Carlos Alberto Montanari do Departamento de Química ( ICEB ) Universidade Federal de Ouro Preto, aos Técnicos Alfredo dos Santos, Surli Dall-Evedove, Marina Leonel da Silva , Cláudia F. Castanheira, José A.T.Pires e a todos do Ipen.

**PREPARAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA DO COMPLEXO DITIOCARBAMATO DE ESPIPERONA-<sup>99m</sup>Tc, AGENTE DIAGNÓSTICO POTENCIAL DE PATOLOGIAS CEREBRAIS RELACIONADAS AOS RECEPTORES D-2 APRESENTADO SOB FORMA DE CONJUNTO DE REATIVOS PARA MARCAÇÃO "IN SITU"**

**RESUMO**

A Psicofarmacologia tem descoberto muito a respeito dos receptores dopaminérgicos D2 e sua interrelação com patologias cerebrais, tais como mal de Parkinson, esquizofrenia, doença de Huntington. Esses receptores biológicos possuem afinidade com o agente endógeno dopamina de forma a se complexar e, em indivíduos normais, estes contribuem para estabelecer o equilíbrio entre os níveis de dopamina e acetilcolina livres.

Em especial, estudos com cérebros "post-mortem" de indivíduos esquizofrênicos mostraram que estes possuem um número consideravelmente maior de receptores D2 resultando em taxas menores de dopamina livres quando comparadas às de indivíduos normais.

Por sua vez as pessoas que possuem a doença de Parkinson geralmente possuem evidências anatomopatológicas na substância negra e fibras dopaminérgicas nigroestriadas de forma a diminuírem as taxas de ação dopaminérgica nesses locais.

Assim, agentes psicotrópicos antagonistas dos D2 por apresentarem grande afinidade a esses receptores têm sido transformados em radiofármacos com o intuito de efetuarem-se diagnósticos de neuropatias.

O complexo ditiocarbamato de espiperona-<sup>99m</sup>Tc estudado por nós é um potencial agente diagnóstico por ser acentuadamente lipossolúvel e altamente afin pelos receptores D2 além de ser emissor gama possibilitando o uso da técnica SPECT ("Single Photon Emission Computed Tomography") que é mais viável economicamente quando comparada com a técnica de

PET ("Pósitron Emission Tomography").

Destarte, o ditiocarbamato de espiperona ( SPDC ou spiperon ditiocarbamate) foi por nós sintetizado a partir da espiperona e sua marcação (complexação) através de tecnécio  $^{99m}$  foi efetuada tendo seus parâmetros estudados e otimizados.

Em seguida, a distribuição biológica foi realizada em ratos Wistar com as captações esplênica, cardíaca, hepática, estomacal, pulmonar, renal, sanguínea, intestinal e cerebral sendo determinadas.

Foi estabelecida a curva de decaimento plasmático do complexo SPDC- $^{99m}$ Tc a partir de dados obtidos de ratos Wistar e desenvolvida metodologia de preparo de conjuntos reativos para obtenção do produto marcado.

**SPIPERONE DITHIOCARBAMATE - <sup>99m</sup>Tc KIT  
A POTENTIAL DIAGNOSIS AGENT FOR DOPAMINERGIC  
D2 BRAIN PATHOLOGIES - BIODISTRIBUTION**

*Marcos Moisés Gonçalves*

**ABSTRACT**

Psychopharmacology has been discovering much about the D2 dopamine receptors and their interrelationship to brain pathologies such as Parkinson's Disease, Schizophrenia and Huntington Disease. Those biological receptors have got affinity with dopamine endogenous agent, so that they complex and, in non pathological individuals, the biological receptors contribute to bring the levels of dopamine and free acetylcholine into equilibrium.

"Post mortem" brain studies in schizophrenic individuals have specially showed that they have got a considerable large amount of D2 receptors. Therefore, free dopamine (non complexed) rates are lower than the ones found in non pathological individuals.

On the other hand, Parkinsonian individuals generally have anatomical-pathological evidences such as injuries in the "substantia nigra" and nigrostriatal dopamine fibers, so that dopamine rates are decreased in those areas.

Thus, D2 antagonistic psychotropic agents because of having got strong affinity with those receptors, have been being transformed into radiopharmaceuticals to diagnose these pathological disease of Central Nervous System. The Spiperone Dithiocarbamate complex studied for us is a potential diagnosis agent because of being highly liposoluble and having close

relationship with D2 receptors . Besides, it is a photon emitter, allowing the use of SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) technique, which is economically less expensive if compared to the PET (Positron Emission Tomography) technique.

So, we have synthesized Spiperon Dithiocarbamate from Spiperon and its complexation with Technetium-99m has been prepared with its reaction parameters after being studied and improved.

The SPDC-<sup>99m</sup>Tc complex biological distribution has been made in Wistar rats and the uptake of spleen, heart, liver, stomach, lung, kidney, blood, intestine and brain have been resolved.

The plasmatic clearance curve has been based on Wistar rats data and the know-how of the kit ( for label SPDC with <sup>99m</sup>Tc ) has been achieved. ]

## SUMARIO

I. INTRODUÇÃO.....	1
I.1. Conceitos gerais.....	1
I.2. Classificação farmacológica da espiperona.....	1
I.3. Classificação química da espiperona.....	4
I.4. Surgimento da espiperona na terapêutica.....	6
I.5. Escolha da espiperona para uso diagnóstico.....	13
I.5.1. Introdução: O princípio diagnóstico de patologias como mal de Parkinson, esquizofrenia, doença de Huntington.....	13
I.5.2. A escolha dos radiofármacos no diagnóstico de neuropatologias relacionadas a receptores D <sub>2</sub> .....	24
II. OBJETIVOS.....	26
III. MATERIAIS.....	27
III.1. Reagentes, solventes, soluções, soluções-reagentes.....	27
III.2. Materiais gerais.....	27
III.3. Equipamentos.....	28
III.4. Animais.....	28
IV. MÉTODOS.....	29
IV.1. Processo de marcação.....	29
IV.1.1. Introdução.....	29
IV.1.2. Metodologia da síntese do derivado SPDC.....	30
IV.1.3. Rendimento reacional da síntese.....	31
IV.1.4. Diferenciação entre espiperona e o derivado SPDC.....	32
IV.1.5. Procedimento de marcação do derivado pelo tecnécio-99m.....	32

IV.1.6. Controle radioquímico do produto marcado...	33
IV.1.7. Otimização dos parâmetros de marcação.....	35
IV.2. Determinação do coeficiente de partição do complexo SPDC- <sup>99m</sup> Tc .....	39
IV.3. Desenvolvimento do conjunto de reativos para marcação "in situ".....	40
IV.4. Ensaio de toxicidade biológica.....	41
IV.5. Distribuição biológica.....	42
IV.6. Curva de decaimento plasmático do SPDC- <sup>99m</sup> Tc..	44
 V. RESULTADOS.....	 45
V.1. Processo de marcação.....	45
V.1.1. Rendimento reacional: formação do derivado SPDC- <sup>99m</sup> Tc .....	45
V.1.2. Diferenciação entre espiperona e derivado SPDC.....	45
V.1.3. Técnica de marcação do derivado SPDC com <sup>99m</sup> Tc - escolha do redutor.....	46
V.1.4. Otimização dos parâmetros de marcação....	48
 V.2. Coeficiente de partição.....	 50
 V.3. Conjunto de reativos para marcação "in situ"...	 50
 V.4. Ensaio de toxicidade biológica.....	 51
V.4.1. Dosagem.....	51
V.4.2. Comportamento dos Camundongos ao Ensaio..	51
 V.5. Distribuição Biológica.....	 52

V.6. Volume Plasmático (de cada animal).....	57
V.7. Níveis Plasmáticos de SPDC- <sup>99m</sup> Tc x Tempo de- corrido após a administração da dose.....	58
VI. DISCUSSÃO.....	60
VII. CONCLUSÕES.....	65
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

## I - INTRODUÇÃO

### 1.1. CONCEITOS GERAIS

Como o desenvolvimento do trabalho está intimamente relacionado com o fármaco espiperona, é mister classificá-lo, defini-lo e correlacioná-lo ao que se propõe a dissertação.

### 1.2. CLASSIFICAÇÃO FARMACOLÓGICA DA ESPIPERONA

Com relação à sua ação terapêutica, a espiperona é neuroléptico não tradicional descoberto por Paul A. Janssen e co laboradores (25, 26, 27, 28) sendo introduzida nos Estados Unidos desde 1967 e fabricada pela firma japonesa Eisai desde 1969.

O termo "neuroléptico" foi concebido por Delay e Deniker (20) para classificar dois fármacos estruturalmente diferentes (como clorpromazina e reserpina) com ações farmacológicas similares. Essa classificação visou distinguir esses agentes dos depressores gerais como os hipnóticos-sedativos.

Fármacos neurolépticos, também chamados de antipsicóticos são lenitivos que produzem calma em pacientes psiquiátricos gravemente conturbados e aliviam seus sintomas (40). O uso de neurolépticos tem se restringido às desordens mais sérias que não podem ser tratadas por outros agentes terapêuticos. Eles são usados no tratamento de uma variedade de desordens (22) :

- . Psicose Funcional :
- .. Esquizofrenia ;
- .. Mania ;
- .. Depressão .

- . Desordens Psiquiátricas Orgânicas:
  - .. Demência ;
  - .. Delírio ;
  - .. Psicose induzida por estimulantes .

- . Desordens dos Movimentos :
  - .. Síndrome de Gilles de la Tourette ;
  - .. Doença de Huntington ;
  - .. Hemibalismo ;

. Ansiedade ;

. Náuseas, Vômito ;

Os neurolépticos bloqueiam os seguintes receptores de neurotransmissores (56) :

- . Receptores Dopaminérgicos:
  - .. Pós sinápticos
  - .. Pré sinápticos
  - .. Autoreceptores
- . Receptores alfa-1 e beta-1 adrenérgicos ;
- . Receptores colinérgicos muscarínicos ;
- . Receptores histamínicos H1 e H2 ;
- . Receptores da serotonina.

Na maioria dos casos, o mecanismo de ação terapêutica está relacionado com a habilidade desses fármacos em bloquear especificamente os receptores dopaminérgicos cerebrais.

A classificação que é adotada para diferenciar os tipos de sítios dopaminérgicos é feita segundo a sensibilidade desses locais por dopamina e também por neurolépticos (60):

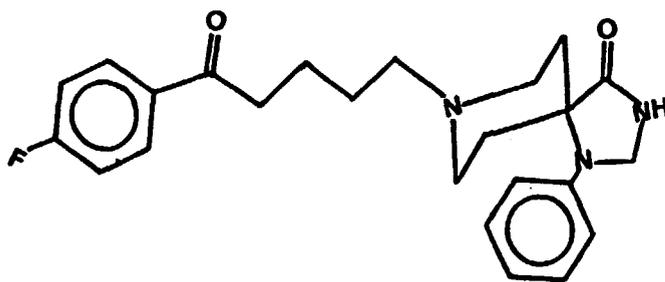
- . Sítios D1: estimulados por concentrações micromolares de dopamina e antagonizados por concentrações micromolares de neurolépticos ;
  
- . Sítios D2: estimulados por concentrações micromolares de dopamina e antagonizados por concentrações nanomolares de neurolépticos ;
  
- . Sítios D3: estimulados por concentrações nanomolares de dopamina e antagonizados por concentrações micromolares de neurolépticos ;

### 1.3. CLASSIFICAÇÃO QUÍMICA DA ESPIPERONA

Espiperona (Espiroperidol):

8-[4-(fluorofenil)-4-oxobutil]-1-fenil-1,3,8, triazaes -  
piro [4,5] decan-4-ona.

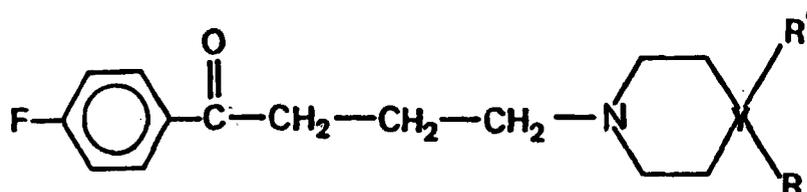
Fórmula Estrutural :



Os agentes antipsicóticos podem ser classificados segundo suas estruturas químicas nos seguintes grupos (22) :

- . Butirofenonas e Difetilbutilaminas ;
- . Alcalóides da Rauwolfia e substâncias relacionadas ;
- . Fenotiazinas ;
- . Tioxantenos ;
- . Derivados indólicos ;
- . Benzamidas substituídas.
- . Arilpiperazinas ;
- . Compostos tricíclicos de 5, 6 e 7 membros ;

A espiperona é classificada como uma butirofenona, que é uma classe de fármacos apresentando a seguinte estrutura em comum:



Y = C, N

Butirofenonas foram descobertas por Paul A. Janssen no ano de 1957 (22,43) quando uma série de propiofenonas, derivadas da norpetidina, estavam sendo ensaiadas devido à sua ação analgésica potencial. Foram encontrados os seguintes tipos de compostos:

- . Analgésicos potentes ; .
- . Analgésicos-neurolepticos;
- . Compostos similares à clorpromazina no perfil farmacológico mas de ações diferenciadas às da morfina.

#### I.4. SURGIMENTO DA ESPIPERONA NA TERAPÊUTICA:

Ao comparar os neurolépticos usados na década de 60 (os fenotiazínicos) os pesquisadores concluíram que a butirofenona haloperidol se mostrou muito importante como agente terapêutico:

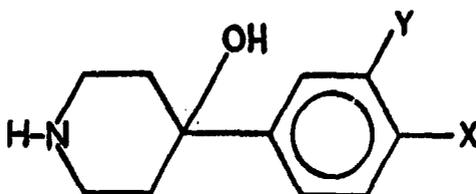
- .Neuroléptico potente;
- .Menos tóxico do que as fenotiazinas;
- .Indicado em todos os estados neuróticos agudos e manifestações psicossomáticas onde se necessita diminuir o tônus mental, a tensão psíquica e atuar no estado emocional;
- .Não possuía influência tão pronunciada sobre a insônia;

Conseqüentemente, a espiperona foi descoberta na experimentação de novos derivados de butirofenona que foram sintetizados.

#### Rotas Sintéticas que Conduziram à Obtenção da Espiperona

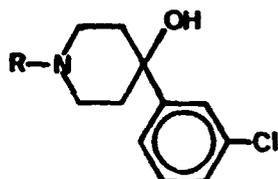
Ao rever as pesquisas da Janssen Farmacêutica, fica evidente que o Precursor-A usado na síntese do haloperidol do tipo 4-aryl 4-hidroxipiperidino não conduz à formação da espiperona, mas sim, a outros fármacos:

Precursor-A do tipo 4-aryl 4-hidroxipiperidino :

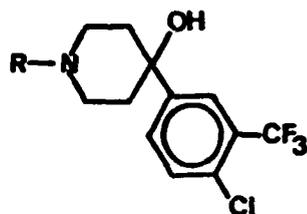


Os fármacos resultantes do Precursor A foram os seguintes:

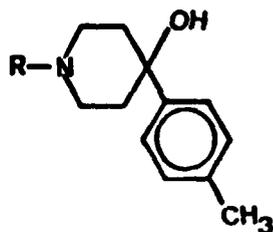
Haloperidol



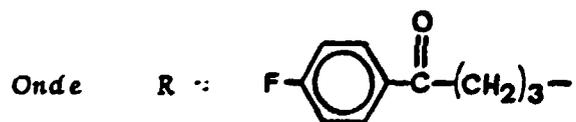
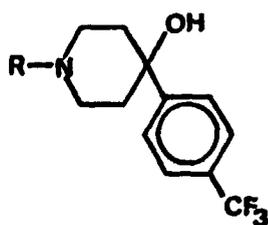
Clofluperidol



Moperona

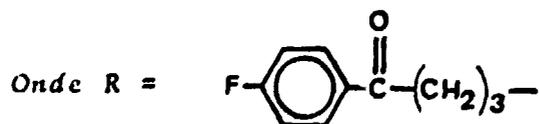
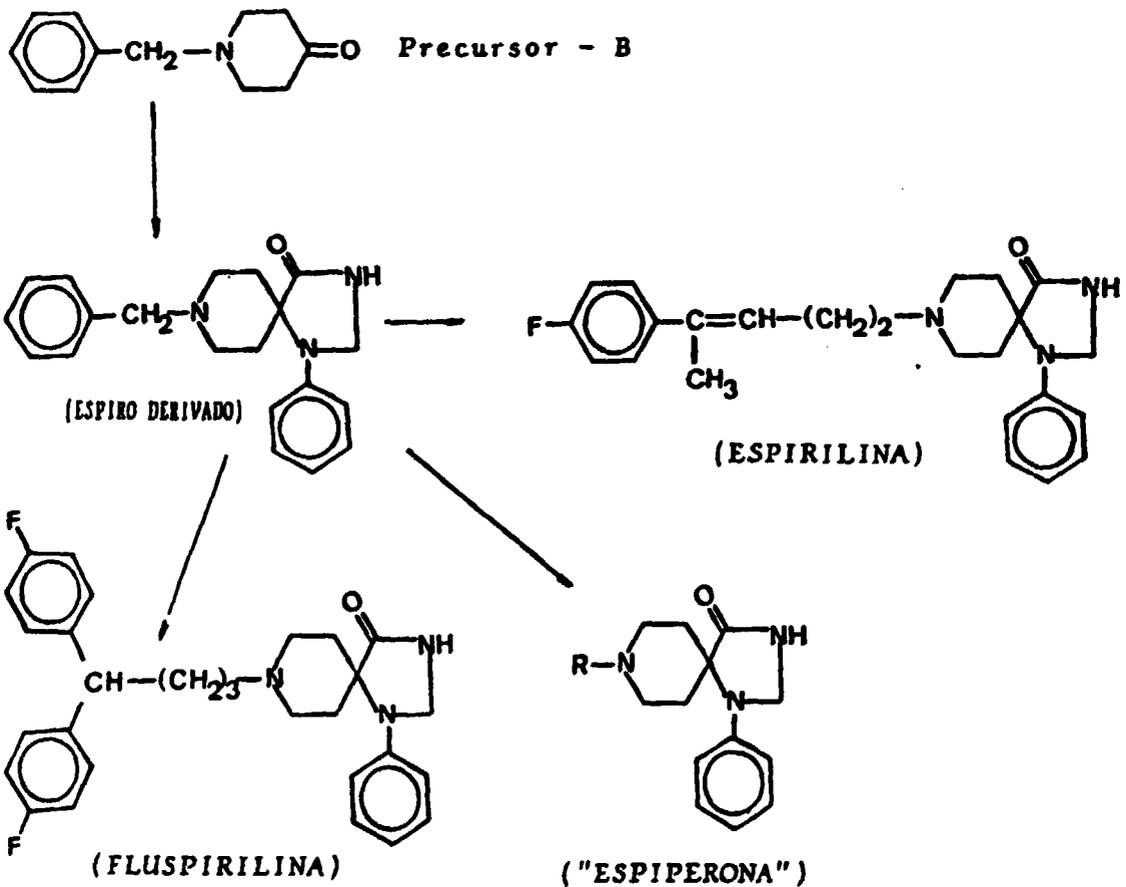


Trifluperidol

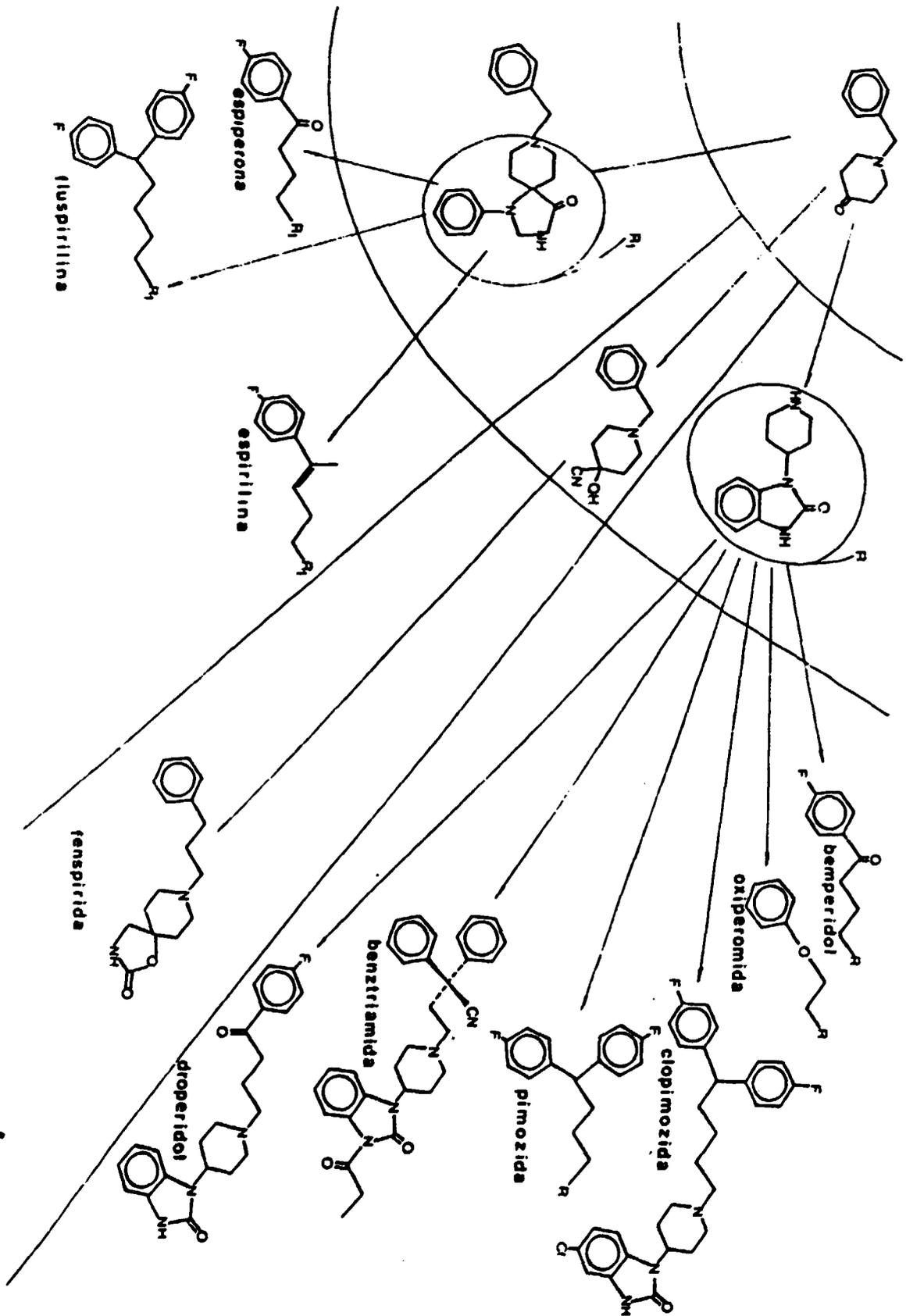


Na realidade a espiperona só viria a ser concebida a partir de uma outra estrutura chave, o Precursor-B (piperidônico), que origina inclusive fármacos não-butiropenônicos:

---Precursor - B do tipo piperidônico transformando-se em espirofármacos em que um dos anéis é do tipo imidazolidona (43) :



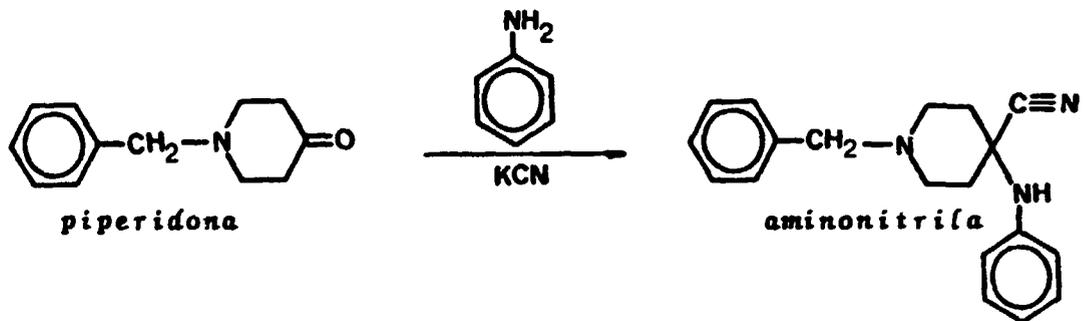
FARMACOS OBTIDOS A PARTIR DO DERIVADO PIPERIDÔNICO



ROTA DE SÍNTESE EFETUADA PARA A ESPIPERONA  
(Efetuada por Paul A. Janssen e Colaboradores)

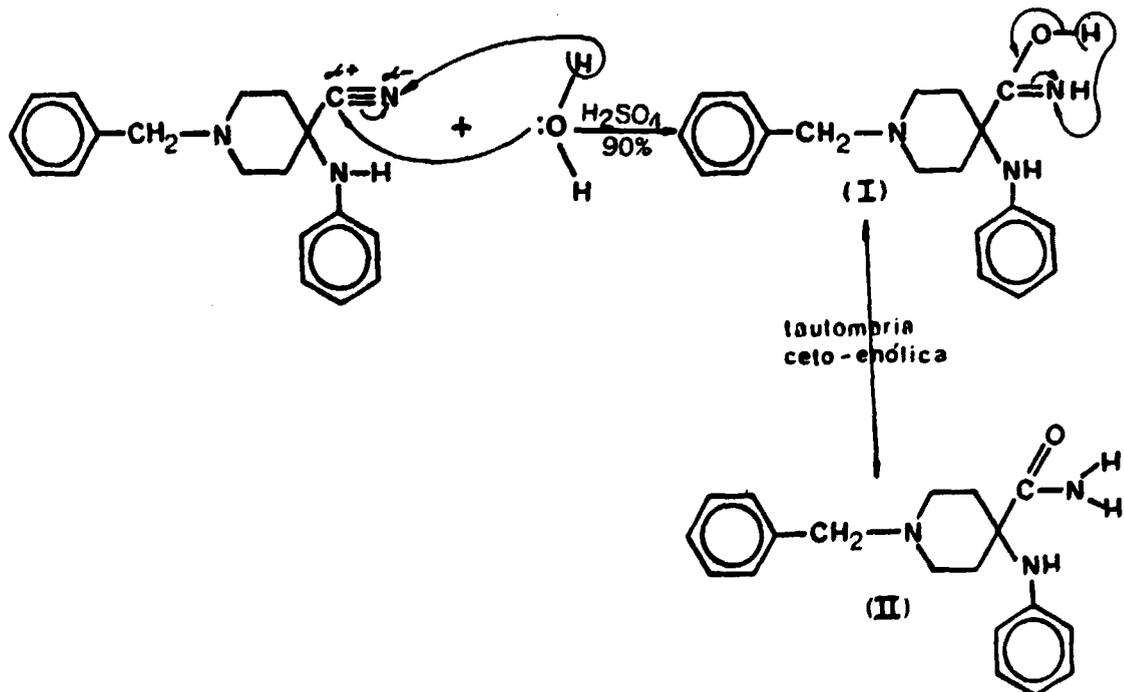
FORMAÇÃO DA AMINONITRILA

A etapa inicial dessa síntese utiliza o precursor piperidônico para a formação da aminonitrila correspondente (a piperidona está benzilada para que o grupamento aminico esteja protegido do meio reacional)



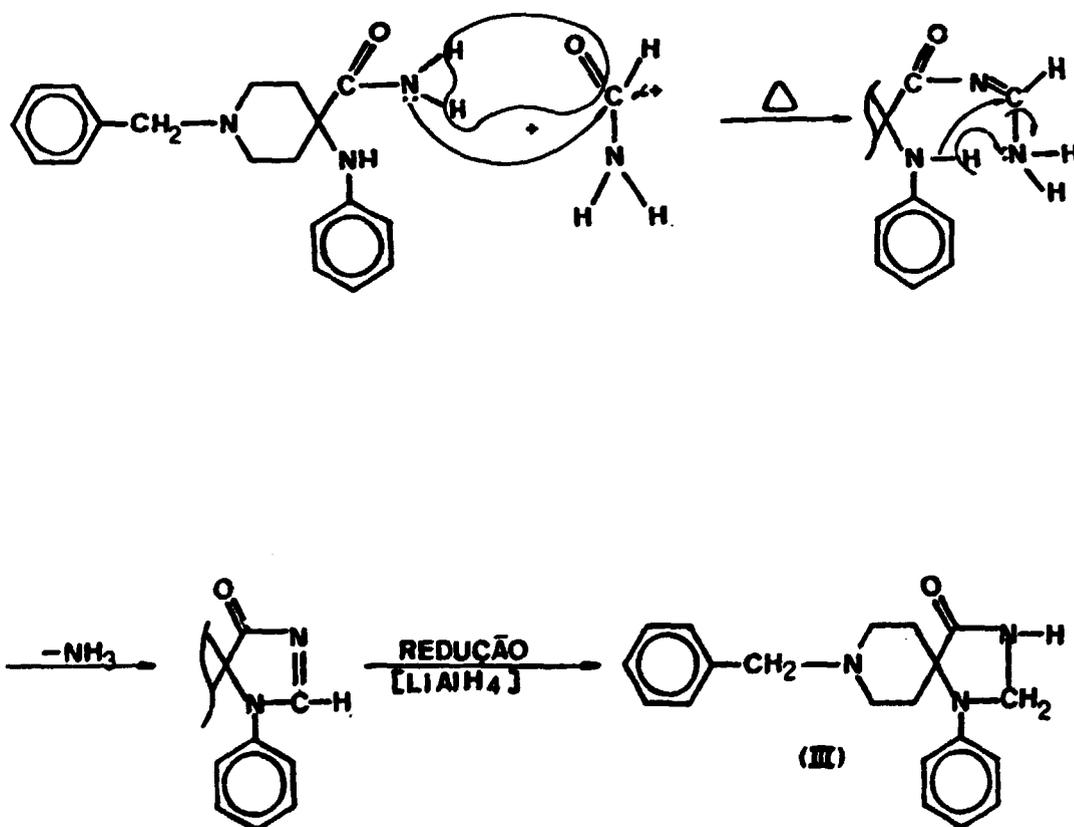
HIDRÓLISE ÁCIDA DA AMINONITRILA

Pela adição nucleofílica da água ao grupo nitrila surge o composto amídico correspondente :

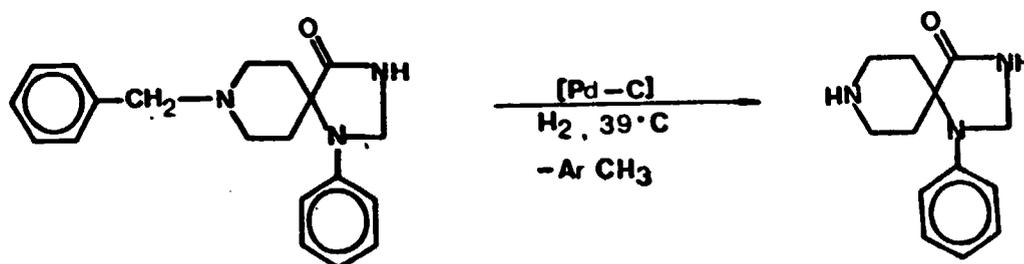


Como a forma cetônica (II) é muito mais estável que a forma enólica (I) há grande predominância de existência da forma II.

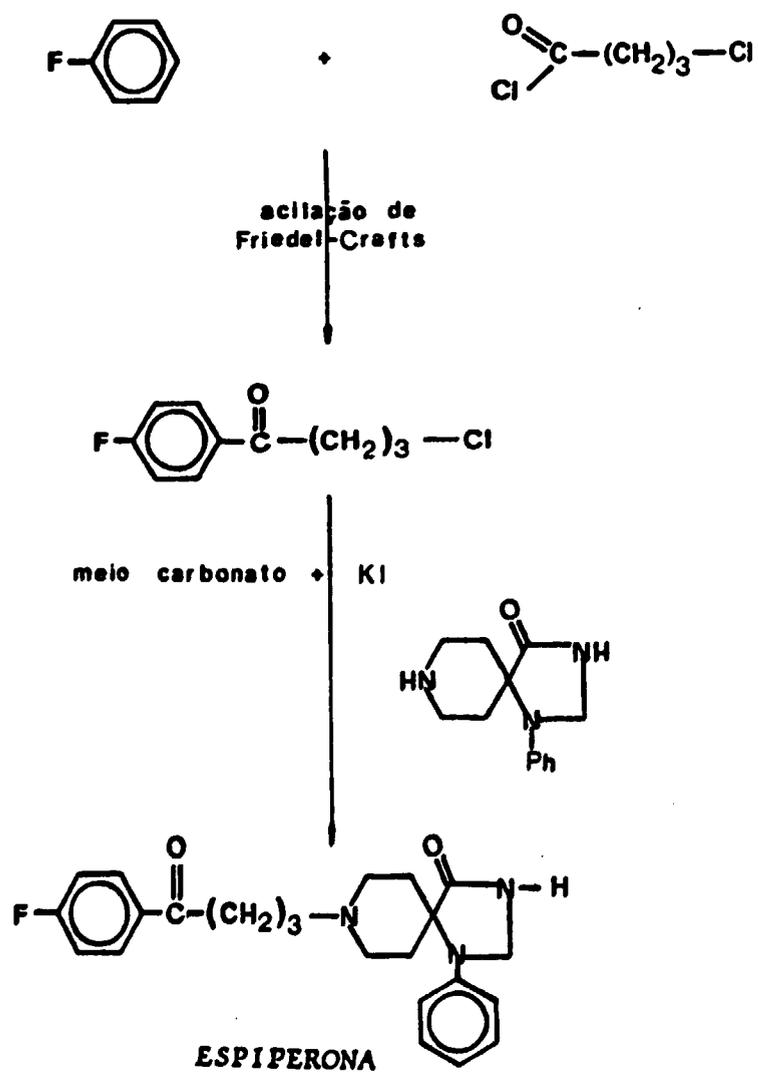
OBTENÇÃO DA IMIDAZOLIDONA (III) (46):



## DES BENZILAÇÃO DA IMIDAZOLIDONA



## FORMAÇÃO DA ESPIPERONA



## I.5. ESCOLHA DA ESPIPERONA PARA USO DIAGNÓSTICO

### I.5.1. INTRODUÇÃO: O PRINCÍPIO DIAGNÓSTICO DE PATOLOGIAS COMO MAL DE PARKINSON, ESQUIZOFRENIA, DOENÇA DE HUNTINGTON.

Algumas neuropatias estão fortemente relacionadas, de alguma forma, com os receptores do tipo D2, presentes principalmente na substância negra e terminais nervosos no "striatum".

Indivíduos esquizofrênicos possuem maior número dos sítios D2 (60) e parkinsonianos geralmente apresentam lesões na substância negra e nas fibras dopaminérgicas nigro-estriadas (46). Dessa forma, os diagnósticos para patologias afins se baseiam no uso de agentes neurolépticos para produção de radiofármacos que se complexem intensa e especificamente com esses receptores dopaminérgicos.

### USO DE FÁRMACOS PARA SIMILAR PROCESSOS FISIOLÓGICOS E PATOGENICOS:

O uso de fármacos como fonte de estudo para desvendar a natureza de processos fisiológicos e processos patogênicos vêm de longa data (11). Em Psiquiatria Kraepelin efetuava estudos com fármacos para testar esta hipótese (41).

### INDÍCIOS DE QUE FÁRMACOS NEUROLÉPTICOS AGEM A NÍVEL DE RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS

#### 1-Hipótese Dopaminérgica da Esquizofrenia:

Essa hipótese diz o seguinte:

" Pelo menos alguns indivíduos esquizofrênicos sofrem de uma hiperatividade de alguns sistemas dopaminérgicos desconhecidos " (50,60).

Esta hipótese é fundamentada em evidências farmacológicas e segundo Matthysse (48) "ela pode tornar-se uma profecia que se completará porque se podemos usar o bloqueio da dopamina como ensaio de comportamento para tranquilizar indivíduos, é inevitável que consideremos todas as substâncias efetivamente neurolépticas como bloqueadoras dopaminérgicas".

Evidências farmacológicas e clínicas que têm reforçado a premissa de que o bloqueio dopaminérgico é o sítio de ação antipsicótica :

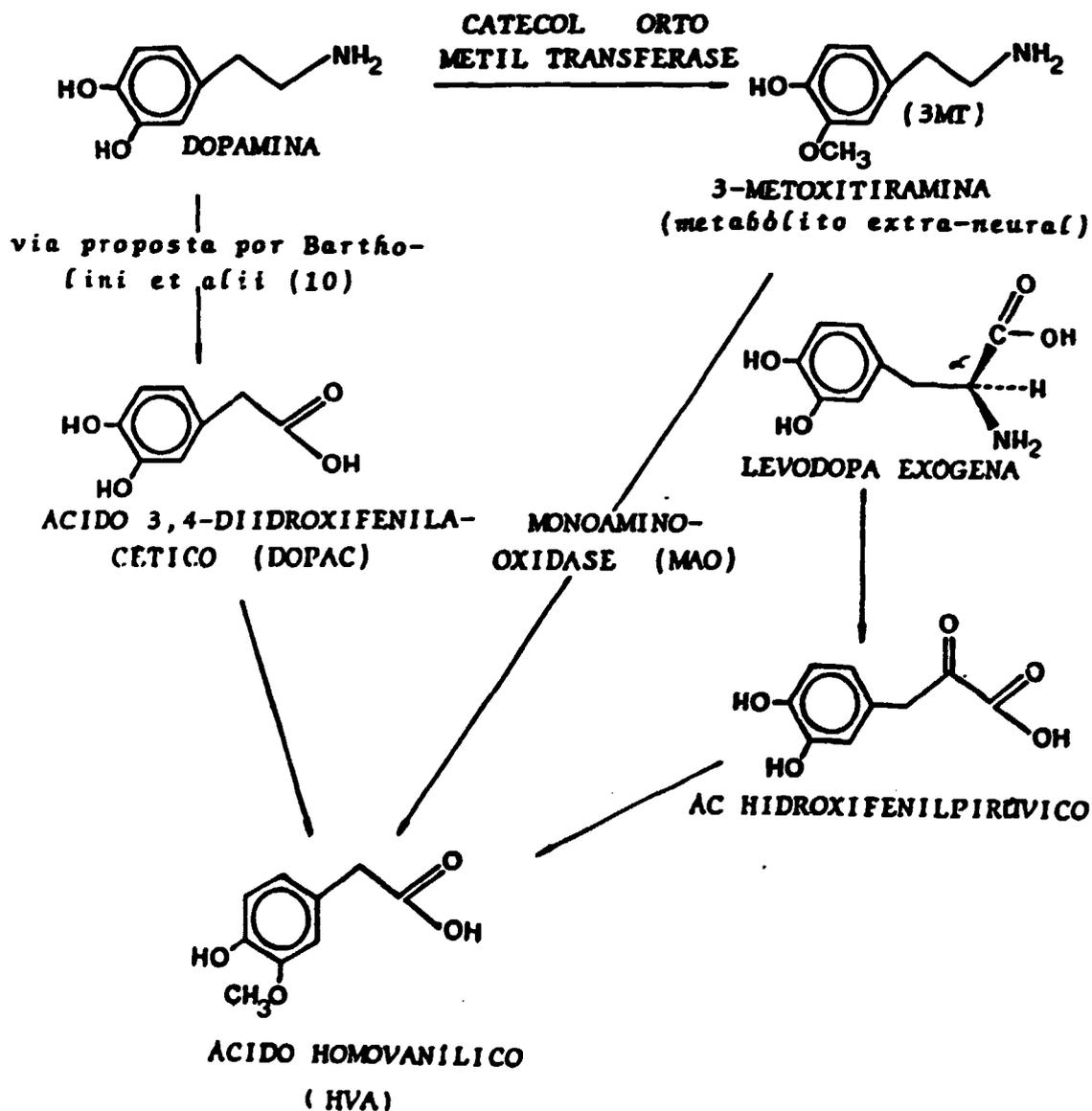
- . A inibição das funções dopaminérgicas sugere existir uma propriedade básica comum a fármacos antipsicóticos sendo as porções mesolímbica e nigroestriada provavelmente os alvos principais para as ações mentais e extrapiramidais desses fármacos (12) ;
  
- . A liberação de dopamina é aumentada pelos neurolépticos(11). Essa afirmação sugere que os neurolépticos se complexem no sítio dopaminérgico ;
  
- . Uma correlação estreita tem sido encontrada entre a ação estimulante dos neurolépticos na síntese da dopamina (a nível de "striatum") e sua ação antagônica a apomorfina (em ratos). Como as doses necessárias para provocar a metade da resposta máxima das duas ações foram aproximadamente as mesmas, isto sugere afinidade similar de receptores envolvidos nessas ações ( 12 ) ;

- . Fármacos que alteram a transmissão dopaminérgica, facilitando-a ou inibindo-a, reforçam a idéia do bloqueio (49);
  
- . Vários congêneres da dopamina reduzem a liberação de prolactina das células pituitárias. Esse efeito é anulado por neurolépticos resultando em hiperprolactinemia e galactorrêia, em algumas instâncias (60).
  
- . Neurolépticos provocam catalepsia em animais(16,23,24) e sinais parecidos aos da doença de Parkinson em pacientes. Hoje se sabe que os indivíduos possuindo Mal de Parkinson são deficitários em dopamina cerebral. Como os neurolépticos não somente intensificam o metabolismo geral da dopamina ("turnover") sem muito alterar seu conteúdo cerebral, fica claro que a ocorrência de catalepsia ou sintomas da doença de Parkinson é devida ao bloqueio dos sítios dopaminérgicos por neurolépticos (60) .

## 2- Metabolismo Geral da Dopamina ("Turnover"):

O metabolismo cerebral da dopamina é caracterizado pelo equilíbrio nas taxas de síntese e destruição desta amina sob condições metabólicas normais. Fármacos antipsicóticos promovem aumento da taxa de metabolização e, portanto, acréscimo da atividade dopaminérgica a nível de trato nigroestriado para compensar o bloqueio sináptico ( 3, 4, 5, 8, 13, 17, 18, 19, 38, 42, 47, 52, 54, 55, 58, 59, 60, 63, 67).

Como reflexo da intensificação dessa metabolização, há aumento de formação do ácido homovanílico (HVA), produto principal do metabolismo da dopamina (21) :



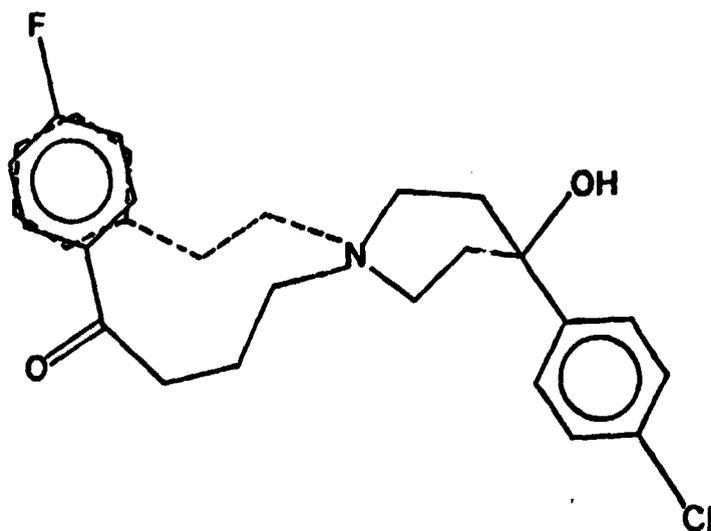
Existe, inclusive, uma boa correlação entre as doses clínicas usadas para causar ação antipsicótica e as doses necessárias para elevar a concentração de HVA (com algumas poucas exceções) (60).

### 3- Similaridades Conformacionais entre Dopamina e Neurolépticos:

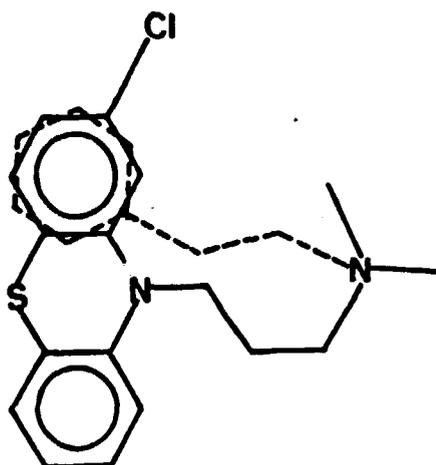
Evidências indiretas da interação de fármacos neurolépticos em sítios dopaminérgicos se baseiam em similaridades conformacionais existentes entre a estrutura da dopamina (composto endógeno de referência) e as estruturas dos neurolépticos.

Segundo demonstram as técnicas de análise por raios-X (36) os métodos de orbital molecular (34) ou modelos de Dreiding (37, 59), existe considerável semelhança conformacional entre dopamina e neurolépticos (14, 35, 36, 38, 65).

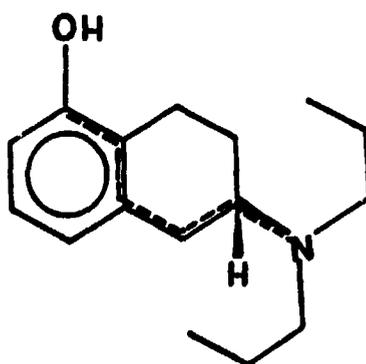
Comparações conformacionais entre dopamina (linhas pontilhadas) e neurolépticos segundo Seeman (60) :



HALOPERIDOL



**CLORPROMAZINA**



**(-)-5-hidroxil-N,N-dipropil-2-aminotetralina**

REQUISITOS DESEJÁVEIS E NECESSÁRIOS AO RADIO-  
FÁRMACO PARA USO EM DIAGNÓSTICOS DE NEUROPATIAS  
RELACIONADAS A RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D2

- . Possuir a maior afinidade possível aos receptores D2, já que estas patologias estão, de alguma forma, relacionadas a eles ;
  
- . Ter alto coeficiente de partição , ou seja, alta lipossolubilidade de forma a permitir a sua passagem pela barreira hematoencefálica e possibilitar a sua passagem ao interior do cérebro ;
  
- . Provocar a menor intensidade possível de respostas biológicas no paciente. Já que para fazer o diagnóstico basta simplesmente que o fármaco se complexe com o receptor biológico, é preferível que este seja um antagonista ao invés de agonista. O antagonista caracteriza-se por complexar com o receptor sem produzir a resposta biológica do agonista, que neste caso é considerada efeito colateral. Na realidade, a quantidade de radiofármaco que efetivamente chega ao cérebro é muito pequena, da ordem de grandeza de nanogramas. Entretanto, mesmo nessas concentrações os neurolépticos são capazes de sensibilizar os receptores D2 ;
  
- . Possuir um tempo de retenção que permita a feitura do mapa da região a ser analisada .

## AFINIDADE DOS NEUROLÉPTICOS PELOS RECEPTORES D2

A potência dos neurolépticos é diretamente proporcional às suas capacidades de bloquear os sítios cerebrais D2. Esta interligação fica evidenciada quando as doses clínicas médias para controlar esquizofrenia (mg/dia) são comparadas com os valores de IC 50, em que existe uma boa correlação.

Onde:

IC 50 = concentrações de antipsicóticos que inibem 50% da ligação estereoespecífica de  $^3\text{H}$ -haloperidol. (IC 50 é uma grandeza que indica quanto o neuroléptico se liga, ou inibe o sítio neuroléptico) (29, 61).

Dos agentes estudados, as butirofenonas demonstraram ser sensivelmente mais potentes que os fármacos fenotiazínicos além de possuírem melhor ajuste a reta  $\log \text{IC } 50 \text{ (moles/l)} \times \text{dose clínica média para controle de esquizofrenia (mg/dia)}$ .

## A IMPORTÂNCIA DIAGNÓSTICA DA ESPIPERONA

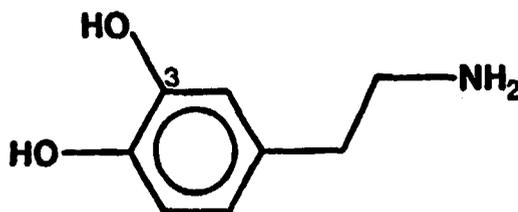
Como dentre as butirofenonas a espiperona demonstrou ser o agente mais potente e, por conseqüência, o mais afim pelos D2, ela é considerada ideal para conceber radiofármacos para diagnósticos em neuropatias relacionadas a sítos dopaminérgicos (espiperona possui um dos menores valores de IC 50 que se tem notícia).

### JUSTIFICATIVA DO BAIXÍSSIMO VALOR DE IC 50 DA ESPIPERONA

A análise dos pré-requisitos estruturais de complexação dos agonistas de receptores D2 (60) ajuda a explicar porque o antagonista espiperona se complexa tão intensamente com esses receptores, como segue :

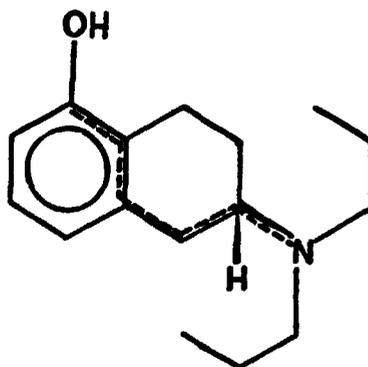
#### Requisitos Necessários e Desejáveis a um Agonista de Receptor Dopaminérgico D2 segundo Seeman (60) :

1- Possuir um grupamento que possa fazer ponte de hidrogênio no local equivalente à posição 3 da dopamina :



Esse grupamento irá interagir com o receptor D2 proporcionando a complexação.

Ex: (-)-5-hidroxi-N,N-dipropil-2-aminotetralina (60) :



Para interagir com o receptor D2, a presença de um segundo grupo capaz de fazer ponte de hidrogênio é desejável mas não essencial para atividade dopaminérgica.

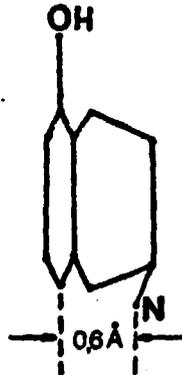
Esse grupo não exerce influência nas aminotetralinas como as 5-N,N-dipropilaminotetralinas ;

## 2- Alta Solubilidade por Lipides :

A alta lipossolubilidade não é característica suficiente mas necessária.

Presumivelmente, segundo Seeman (60), a adição de átomos de carbono "apropriadamente localizados" aumenta a solubilidade em biomembranas e, dessa forma, o agonista entra mais rapidamente no cérebro e mais rapidamente se associa hidrofobicamente com o receptor D2 ;

3- Atomo de nitrogênio posicionado a 0,6 Å do plano do anel que possui o grupamento capaz de fazer ponte de hidrogênio :



Este requisito caracteriza-se por ser essencial à potência dopaminérgica.

A presença do anel fenila não é essencial mas aparentemente serve para auxiliar o posicionamento entre o grupo que pode se ligar através de ponte de hidrogênio (-OH, -F, ...) e o nitrogênio.

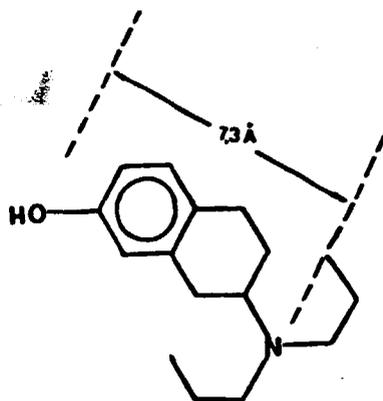
Concluindo, a molécula deve ser suficientemente flexível a ponto de se posicionar de tal forma que permita ao nitrogênio estar a 0,6 Å do plano do anel.

4- Distância menor do que 7,3 Å entre o Grupo Capaz de estabelecer Ponte de Hidrogênio e o Grupo contendo Nitrogênio :

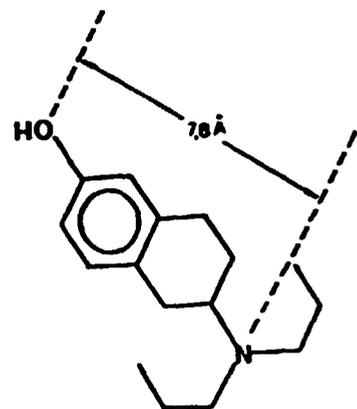
Este requisito está diretamente relacionado com a potência do agonista.

Outrossim, os compostos que possuem as maiores potências são aqueles que possuem uma distância menor do que 7,3Å.

Ex : A ( $\pm$ )-7-hidroxi-N,N-dipropilaminotetralina ou ( $\pm$ )-7-OH-DPAT é mais potente do que a ( $\pm$ )-6-hidroxi-N,N-dipropilaminotetralina ou ( $\pm$ )-6-OH-DPAT (60) :



( $\pm$ ) 7-OH-DPAT



( $\pm$ ) 6-OH-DPAT

Com base nos pré-requisitos de complexação dos agonistas aos sítios D2 ficam esclarecidos vários aspectos da complexação da Espiperona :

- Espiperona possui grupamentos capazes de fazer pontes de hidrogênio com o receptor D2 ;
- Espiperona possui alta lipossolubilidade ;
- Espiperona possui também átomo de Nitrogênio .
- Espiperona possui átomo de nitrogênio a uma distância próxima de 7,3Å com relação ao átomo de flúor .

### 1.5.2. A ESCOLHA DOS RADIOFÁRMACOS NO DIAGNÓSTICO DE NEUROPA- TOLOGIAS RELACIONADAS A RECEPTORES D-2 :

Como afirma Consuelo Arteaga de Murphy (53), o termo "radiofármaco" foi alvo de polêmica já que existem diferenças entre esses compostos químicos radioativos e os fármacos no que diz respeito ao efeito farmacológico no sentido estrito da palavra.

Contudo, como no uso dos primeiros se aplicam os princípios da farmacocinética e de controle de qualidade de fármacos, a denominação "radiofármaco" tem prevalecido (53).

A A.L.A.S.B.I.M.N. "Asociación Latino Americana de Sociedades de Biología y Medicina Nuclear" define os usos medicinais dos radiofármacos (39).

Segundo esta entidade, radiofármacos se caracterizam por possuírem forma farmacêutica, quantidade e tipo de radiação emitida.

Seus usos se resumem em:

. Uso Diagnóstico ;

. Uso Terapêutico.

A ALASBIMN considera que radiofármacos para diagnóstico "são verdadeiros traçadores radioativos que são administrados com finalidade de visualizar a anatomia de um órgão ou sistema, avaliar o comportamento fisiopatológico a nível de tecidos, analisar através de um metabolismo, o comportamento bioquímico ou determinar quantitativamente seus parâmetros farmacocinéticos, comparando esses resultados com os obtidos de um teste feito em seres humanos normais voluntários" (39).

### 1.5.3. ESTUDO DA ESPIPERONA COMO RADIOFÁRMACO PARA USO DIAGNÓSTICO USANDO SPECT :

Como o próprio nome denota, a técnica de SPECT, "Single Photon Emission Computed Tomography", utiliza-se de radiofármacos emissores de radiação gama (ou emissores de fótons) para produzirem as imagens que possibilitem a feitura dos diagnósticos. Portanto, para que a concepção desse radiofármaco diagnóstico seja possível, a marcação da espiperona deve ser efetuada com um isótopo emissor gama adequado.

O isótopo metaestável do Tecnécio ( $^{99m}\text{Tc}$ ) possui características físicas apropriadas para esta finalidade. Destarte, o tecnécio-99m tem sido vastamente utilizado (a nível Mundial) em pesquisa e produção de agentes diagnósticos. Suas principais características físicas são :

- Possuir meia vida radiativa relativamente baixa :

$$t_{1/2} = 6,02 \text{ h}$$

(esse valor de  $t_{1/2}$  impede que o paciente, ao qual se efetua o diagnóstico, fique exposto à radiação por período apreciável de tempo) ;

- Radiações emitidas adequadas à utilização em pacientes :

$^{99m}\text{Tc}$  pode ser considerado um emissor gama puro ;

- Baixa energia dos raios gama emitidos :

$^{99m}\text{Tc}$  emite gamas possuindo uma baixa energia média de aproximadamente 142,7keV (o radiofármaco é desenvolvido de forma a possibilitar que os raios gama emitidos sensibilizem o aparelho de SPECT e este, por sua vez, construa imagens regionais qualitativas e semi-quantitativas) .

## II- OBJETIVOS

Os objetivos que norteiam o seguinte trabalho são :

- II.1. Otimizar o método de marcação da Espiperona com  $^{99m}\text{Tc}$  inicialmente proposto por Ballinger et alii(9);
- II.2. Fazer adequação de metodologia que auxilie o desenvolvimento de conjuntos de reativos congelados para marcação "in situ" destinados ao diagnóstico de doenças cerebrais relacionadas a receptores dopaminérgicos do tipo D2, como mal de Parkinson, esquizofrenia, doença de Huntington ;
- II.3. Fazer estudos de distribuição biológica da espiperona marcada (em tempos pré-determinados) dando ênfase às captações dos seguintes órgãos:
- |            |                          |               |
|------------|--------------------------|---------------|
| 1. Coração | 6. Estômago              |               |
| 2. Pulmão  | 7. Cérebro subdivido em: | . cerebelo    |
| 3. Baço    |                          | . " striatum" |
| 4. Fígado  |                          | . córtex      |
| 5. Rins    |                          |               |
- II.4. Efetuar curva de decaimento plasmático do complexo SPDC - $^{99m}\text{Tc}$ .

## III- MATERIAIS

## III.1. REAGENTES, SOLVENTES, SOLUÇÕES, SOLUÇÕES-REAGENTES :

- .Acetato de amônio P.A.(Merck);
- .Acido acético glacial P.A.(Merck);
- .Acido clorídrico 0,1M;
- .Acido formamidosulfínico - FSA (Sigma);
- .Cloreto estano diidratado P.A. (Merck);
- .Cloreto de metileno P.A. (Riedel de Hæn);
- .Cloreto de sódio 0,9% - solução estéril e apirogênica (Drogasil);
- .Cloreto de sódio P.A. (Merck);
- .Clorofórmio P.A. (Merck);
- .Dissulfeto de carbono P.A. - A.C.S. (Reagen);
- .Ditionito de sódio P.A. (F.Maia);
- .Espiperona (Sigma);
- .Etanol P.A.(Merck);
- .Heparina 5.000 UI/ml - "Liquemine" (Roche);
- .Hidróxido de sódio 0,1M;
- .Hidróxido de sódio 2,5M;
- .Metanol P.A. (Merck);
- .1-octanol P.A. (CAAL);
- .pertecnetato de sódio - solução estéril, apirogênica, eluída de Gerador  $^{99}\text{Mo}$  -  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (IPEN-CNEN);
- .solução fosfato 0,1M pH 9;
- . tampão fosfato 0,05M pH 6,8.

## III.2. MATERIAIS GERAIS :

- .Papel cromatográfico com fibra de vidro ITLC-SG "Instant Thin Layer Chromatography - Silica Gel Impregnated Strips" (Gelman Sciences);
- .Papel Whatman no. 1 (W&R Balston Ltda);
- .Filtro Millipore 0,2 um (Gelman Sciences);
- .Vidraria de uso rotineiro em Laboratórios.

**III.3. EQUIPAMENTOS :**

- .Microcomputador PC, XT 80-88, Modelo Nexus 2100 ;
- .Calibrador de dose modelo Curitest, Siemens (Alemanha);
- .Calibrador de dose Capintec 10BC (Estados Unidos);
- .Centrifuga Sorval GLC-1 (Estados Unidos);
- .Cintilador de Poço com cristal de NaI(Tl) de 1,5"x1,5" modelo ANSR, Abott (Estados Unidos);
- .Cintilador de poço com cristal de NaI(Tl), Berthold (Alemanha);
- .Detector Berthold Spectrometer LB2040 (Alemanha);
- .Espectrômetro de Infravermelho Transform Fourier Perkin-Elmer modelo 1360 (Estados Unidos) ;
- .Aparelhagem padrão de Eletroforese.

**III.4. ANIMAIS :**

- ."Rattus norvegicus albinus" linhagem Wistar, machos com peso no intervalo de 200 a 300g;
- .Camundongos fêmeas suíços com peso no intervalo de 27 a 33g;

Os animais foram alimentados com ração comercial e água "ad libitum".

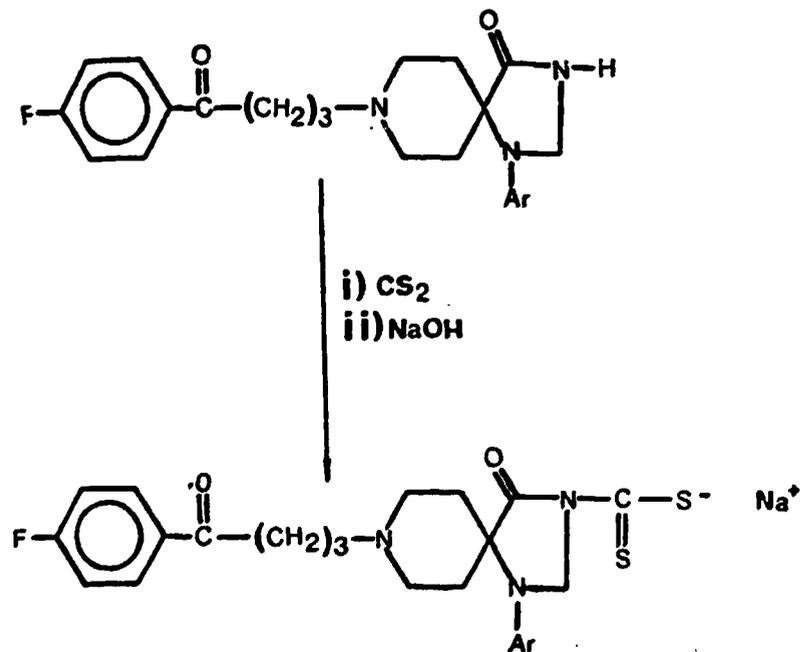
## IV- MÉTODOS

## IV.1. PROCESSO DE MARCAÇÃO

## IV.1.1. INTRODUÇÃO

A espiperona em si não é capaz de se ligar com o tecnécio- 99m. Para possibilitar a marcação é mister transformá-la num derivado com poder complexante.

Uma alternativa consiste em modificar o grupamento amídico secundário convertendo-o num derivado do tipo ditiocarbamato (15,51) num método sugerido por Ballinger et alii (9):



**DITIOCARBAMATO DE ESPIPERONA  
(SPDC)**

**IV.1.2. METODOLOGIA DA SÍNTESE DO DERIVADO SPDC:  
(segundo Ballinger et alii (9) )**

**1-Dissolver 10mg de espiperona em 10ml de etanol absoluto e resfriar o meio com banho de gelo-NaCl ;**

**2-Adicionar 0,2ml de dissulfeto de carbono e alcalinizar o meio com 1ml de hidróxido de sódio 2,5M;**

**3-Deixar reagir por 20 minutos à temperatura ambiente e sob agitação;**

**4-Evaporar o meio reacional até a secura com aplicação local de gás nitrogênio;**

**5-Dissolver o resíduo com 30ml de água e lavar três vezes com 10ml de cloroeto de metileno para eliminar a espiperona não reagida;**

**6-A solução aquosa: separá-la , diluí-la a 25ml com água e envasar alíquotas de 0,5ml em vidros de penicilina ( frascos do derivado SPDC ) .**

## IV.1.3. RENDIMENTO REACIONAL DA SÍNTESE ;

Para determinação do rendimento do processo partimos de de 0,01g de espiperona, seguir a metodologia acima descrita e proceder aos seguintes cálculos :

-Rendimento Teórico (rt) :

$$\begin{array}{rcl} 1 \text{ mol espiperona (C}_{23}\text{H}_{26}\text{FN}_3\text{O}_2) & - & 395,4835\text{g} \\ x & - & 0,0100\text{g} \end{array}$$

$x$  = número de moles de espiperona usados na reação  
logo:  $x = 2,5286 \cdot 10^{-5}$  moles de espiperona

$$\begin{array}{rcl} 1 \text{ mol SPDC (C}_{24}\text{H}_{25}\text{FN}_3\text{O}_2\text{S}_2\text{Na)} & - & 493,6039\text{g} \\ 2,5286 \cdot 10^{-5} \text{ moles} & - & \text{rt} \end{array}$$

logo:  $\text{rt} = 0,0125\text{g}$

-O cálculo do Rendimento Prático (rp) se resume a:

$$\begin{array}{rcl} \text{rt} & - & 100\% \text{ rendimento} \\ y & - & \text{rp} \end{array}$$

Onde:  $y$  = massa de produto obtido em laboratório  
 $\text{rp}$  = rendimento prático

Assim :

$$\begin{array}{rcl} 0,0125\text{g} & - & 100\% \text{ rendimento} \\ 0,0120\text{g} & - & \text{rp} \end{array}$$

#### IV.1.4. DIFERENCIAÇÃO ENTRE ESPIPERONA E O DERIVADO SPDC :

##### Espectros de Infravermelho:

A identificação foi efetuada a partir de duas curvas de infravermelho para espiperona e derivado que apareceram as bandas características de cada composto.

#### IV.1.5. PROCEDIMENTO DE MARCAÇÃO DO CONJUGADO PELO $^{99m}\text{Tc}$ :

No método de marcação utilizou-se frascos SPDC (metodologia IV.1.2.), e adicionou-se sequencialmente :

- 0,5ml de solução  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1M (pH 9) ;
- 0,5ml de solução salina a 0,9% ;
- 25,0ul de solução redutora (417ug  $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}/\text{ml}$  HCl 0,1M);
- 0,5ml de pertecnetato de sódio ( $\text{Na}^+ \text{TcO}_4^-$ ) possuindo atividade de 2 mCi ;

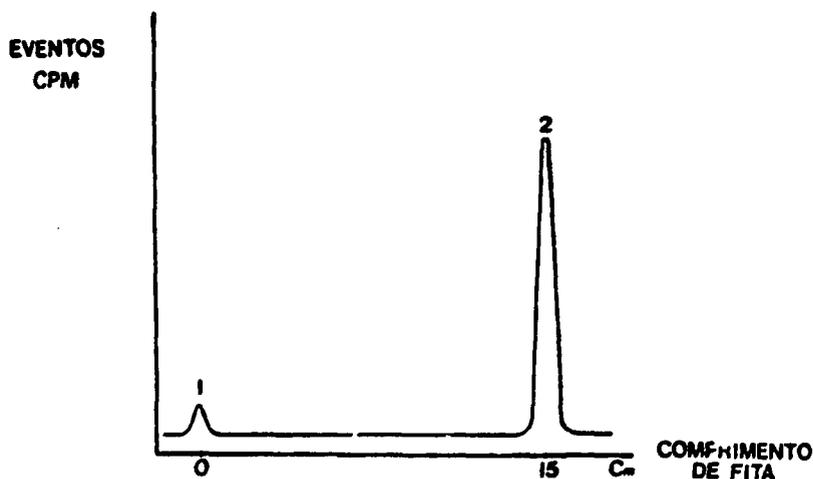
E, após deixar incubando por 15 minutos, adicionou-se 15 gotas de etanol absoluto e homogeneizou-se .

#### IV.1.6. CONTROLE RADIOQUIMICO DO PRODUTO MARCADO :

O controle de pureza radioquímica do complexo SPDC-<sup>99m</sup>Tc foi efetuado através de cromatografia em camada delgada com suporte de fibra de vidro impregnado de sílica gel (cromatografia ITLC-SG) e eletroforese. Para calcular a porcentagem de pureza radioquímica efetuamos adequação da metodologia de forma a determinar primeiramente a porcentagem de impurezas presentes após o processo de marcação:

##### Determinação da Impureza Tecnécio Coloidal (TcO<sub>2</sub>):

A partir do produto marcado descrito acima fez-se corrida cromatográfica ITLC-SG em fase móvel clorofórmio-metanol (9:1), cortamos a fita em 16 partes de 1cm contando-as em cintilador gama.

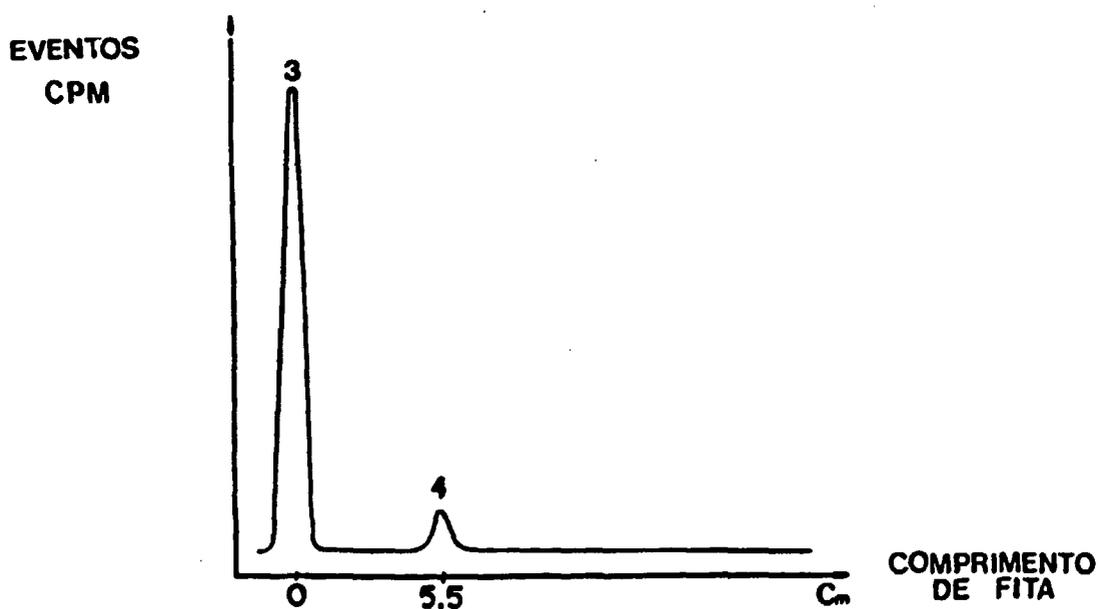


% TcO<sub>2</sub> = % produto R<sub>f</sub> = zero (Pico 1)

No Pico 2 (R<sub>f</sub> 0,938) estão presentes concomitantemente o complexo SPDC-<sup>99m</sup>Tc e o TcO<sub>4</sub>

### Determinação da Impureza $TcO_4^-$ :

Utilizou-se o produto marcado para fazer eletroforese em suporte de papel Whatman no.1( com 12 V/cm de fita ), tampão fosfato pH 6,8(0,05M) e, após 50 minutos de corrida, o papel foi cortado em segmentos de 1cm e contado em cintilador gama. (em contagens por minuto)



%  $TcO_4^-$  = % produto que foi detectado distante do local de aplicação da amostra (Pico 4)

Com os valores das porcentagens de impureza, calculou-se a percentagem de pureza radioquímica:

$$\% \text{ pureza radioquímica} = 100\% - ( \%TcO_2 + \%TcO_4^- )$$

#### IV.1.7. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MARCAÇÃO:

##### ESTUDO DOS PARÂMETROS DE MARCAÇÃO :

###### A) ESCOLHA DO REDUTOR E ADEQUAÇÃO DE SUA ESTEQUIOMETRIA :

A literatura fornece várias opções de redutores que eventualmente poderiam ser utilizados.

Os redutores escolhidos por nós foram o cloroeto estanoso por ser eficiente em vários processos de marcação e o ácido formamidinossulfônico (FSA) (32,33,62) por ser, segundo Ballinger (9) e Fritzberg (30), o mais adequado dentre os tiorredutores .

###### --Metodologia da Marcação Utilizando FSA como Redutor (9):

A cada frasco de penicilina contendo o derivado SPDC adicionar :

- . 0,5ml de solução salina ;
- . 0,5ml de pertecnetato de sódio com atividade de 2,0mCi ;
- . 0,5ml de solução de FSA (10mg/ml) ;

Em seguida, para averiguar a estabilidade da marcação estudar os seguintes tempos de incubação :

t1 = 5 minutos

t2 = 10 minutos

t3 = 15 minutos

Nota : antes de fazer as contagens, efetuar a purificação química do complexo SPDC-<sup>99m</sup>Tc através de extração com cloreto de metileno já que o processo forneceu baixa porcentagem de rendimento radioquímico.

Visando descobrir a pureza radioquímica do método de marcação direto fazer adicionalmente uma reação sem, no entanto, proceder à purificação do produto marcado.

-- Marcação Utilizando Cloreto Estanozo como Redutor :--

A metodologia utilizada na marcação com cloreto estanozo está descrita no item IV.1.5.

Nota: o cálculo de pureza radioquímica foi efetuado sem que o produto marcado fosse previamente purificado .

### *Ensaio da Estabilidade do Produto Marcado :*

O ensaio de estabilidade é efetuado para averiguar se o redutor escolhido possibilita a formação de um produto marcado estável com o decorrer do tempo de incubação (esse procedimento visa saber se esse produto marcado é estável no próprio meio reacional). Dessa forma, são feitas marcações em tempos de incubação crescentes em que são determinadas as respectivas purezas radioquímicas. Caso as purezas radioquímicas decresçam bruscamente com o passar do tempo o produto é considerado instável e sua constante de degradabilidade é calculada pelo método cinético da substituição (para desvendar a qual ordem de reação o processo pertence). No método cinético adota-se uma equação de ordem determinada (primeira, segunda, etc) e calcula-se para cada tempo uma constante de velocidade. Se equação da ordem escolhida fornece valores iguais para as constantes de velocidade essa será justamente a ordem da reação em questão.

#### *Método da Substituição:*

- Testou-se a equação da reação de primeira ordem e calculou-se uma constante de velocidade para cada tempo de reação:

$$k_v = \frac{2,303}{t} \cdot \log_{10} \left( \frac{a}{a-x} \right)$$

Onde:

- $k_v$  = constante de velocidade ;
- $t$  = tempo de reação ;
- $a$  = 100% de complexo íntegro ;
- $x$  = porcentagem de complexo degradado.

Adequação da Estequiometria do Redutor :

Procedeu-se à otimização da quantidade de redutor para evitar as impurezas indesejáveis  $TcO_2$  e  $TcO_4^-$ .

Portanto, para acertar a concentração ideal de redutor fez-se um estudo estequiométrico correlacionando número de moles de SPDC versus número de moles do redutor cloreto estânico ( o parâmetro variável foi a concentração de redutor utilizada) .

**B) TEMPO DE INCUBAÇÃO :**

O parâmetro "tempo" foi estudado de tal forma a determinar o ponto exato de máxima complexação do derivado e a estabilidade do complexo SPDC- $^{99m}Tc$  .

**C) pH :**

O pH do meio reacional foi adequado para possibilitar uma boa marcação. O intervalo de pH estudado foi de 7 a 10.

**D) ATIVIDADE DO TRAÇADOR  $^{99m}Tc$  :**

Não foram estudadas as atividades mais altas, já que na clínica não teriam grande interesse. As atividades testadas foram de 1,5 mCi e 2,0 mCi.

**E) MASSA DE SPDC :**

A adequação da quantidade de SPDC a ser utilizada foi efetuada variando sua massa no seguinte intervalo :

114  $\mu g$  - 600  $\mu g$ .

IV.2. DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO DO COMPLEXO  
SPDC-<sup>99m</sup>Tc :

A um frasco de penicilina contendo o derivado SPDC, procedemos à marcação com <sup>99m</sup>Tc e extraímos o líquido resultante com 2,0ml de 1-octanol. Separamos 1ml de fase orgânica e adicionamos 1ml de água, agitamos vigorosamente por 5 minutos, centrifugamos por 5 minutos e separamos as duas fases resultantes.

Para cada fase, retiramos 5 alíquotas de igual volume e contamos no calibrador de doses. Fizemos a determinação de 5 coeficientes de partição (c.p.), como segue:

$$\begin{array}{l} \text{coeficiente} \\ \text{de} \\ \text{partição} \end{array} = \log \frac{f.o.}{f.a.}$$

Onde:

f.o. = contagens de eventos na fase orgânica ;

f.a. = contagens de eventos na fase aquosa.

Para o cálculo do coeficiente de partição do complexo temos :

$$\begin{array}{l} \text{coeficiente de par-} \\ \text{tição do complexo} \end{array} = \frac{c.p.}{5}$$

#### IV.3. DESENVOLVIMENTO DO CONJUNTO DE REATIVOS PARA MARCAÇÃO "IN SITU" :

A fim de permitir que o processo de marcação pudesse ser também efetuado fora de nossos laboratórios fez-se o desenvolvimento de um conjunto de reativos para preparação do processo de marcação "in situ".

Para isso, foram testadas várias formas de acondicionamento dos reagentes de marcação. O processo utilizado consistiu no congelamento dos frascos de penicilina da seguinte forma:

- tomar iguais volumes de solução de derivado SPDC e solução de fosfato dibásico de sódio 0,1M e nitrogenar por meia hora ;
- preparar a solução redutora adicionando 8,34mg de cloreto estano em 20ml de solução nitrogenada de ácido clorídrico 0,1N ;
- a cada frasco de penicilina lacrado e possuindo vácuo em seu interior adicionar 1ml da solução SPDC- fosfato e 325 µl da solução redutora e congelar a - 4°C.

Para efetuar a marcação basta degelar o frasco de penicilina, adicionar 0,5ml da solução de pertecnetato de sódio (4mCi/ml) e deixar incubar por 15 minutos.

A estabilidade do conjunto de reativos foi estudada num intervalo de tempo de dois meses. A cada semana, a marcação dos reativos foi efetuada em triplicata e, logo em seguida, foi efetuado o controle radioquímico .

## IV.4. ENSAIO DE TOXICIDADE BIOLÓGICA:

Foi efetuado segundo método da Associação Argentina de Biologia e Medicina Nuclear ( 7 ).

Em lotes de 5 camundongos brancos de 20 a 30g de peso foram injetados 0,1 a 0,2ml da substância em estudo via veia dorsal da cauda ( a administração não deve ser superior a 5 segundos)

Antes da substância ser considerada atóxica, foram aguardadas 6 horas, período no qual não deverá haver morte de nenhum animal.

A quantidade ou volume injetado aos camundongos por quilograma de peso foi várias vezes superior aquelas empregadas em seres Humanos ( de 100 a 500 vezes maior).

Para a execução deste tipo de ensaio, foram utilizados 2 lotes de 5 camundongos e foi administrada uma elevada dose de SPDC não marcado.

Humano adulto	70kg	-	240 $\mu$ g SPDC (1 dose)
1 camundongo	35 $10^{-3}$ kg	-	x

$x = 0,12 \mu$ g (valor equivalente a 1 dose por camundongo)

0,12  $\mu$ g - 1 dose

massa de fármaco  
administrada no animal - y

y = número de doses administrada em 1 animal equivalentes a 1 indivíduo adulto de 70kg.

Após termos injetado o fármaco, os animais foram observados nos seguintes tempos:

10, 20, 30, 60, 120, 240, 1440 minutos.

#### IV.5. DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA:

O estudo de distribuição biológica foi efetuado visando averiguar se o complexo SPDC-<sup>99m</sup>Tc é capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica e permanecer no cérebro por algum tempo de forma a possibilitar a obtenção dos mapas pela técnica de S.P.E.C.T. ("Single Photon Emission Computed Tomography").

Foram utilizados ratos sendo primeiramente os animais anestesiados com uretana e, logo em seguida, injetado através da veia dorsal peniana o complexo SPDC-<sup>99m</sup>Tc. Após esperar decorrer determinados intervalos de tempo, os animais foram sacrificados por decapitação e seus sangues, recolhidos em frascos heparinizados. Os tempos estudados consistiram em 1, 5, 15, 30, 60 minutos e 3 a 5 animais foram utilizados para a determinação de cada tempo.

Visando avaliar a captação do complexo, procedemos à dissecação de cada animal e separação dos respectivos órgãos para contagem em cintilador gama incluindo:

- |           |            |                                |
|-----------|------------|--------------------------------|
| - coração | - fígado   | - intestino delgado            |
| - pulmão  | - rim      | - cérebro ("striatum", córtex, |
| - baço    | - estômago | cerebelo)                      |

Adicionalmente foi efetuada uma nova distribuição biológica similar a supracitada em que os receptores D-2 foram previamente bloqueados com haloperidol (não-marcado) e, após ter decorrido um intervalo de tempo de uma hora o complexo SPDC-<sup>99m</sup>Tc foi administrado.

A partir dessas contagens foram calculados os seguintes parâmetros: \*

$$\% \text{ dose/g} = \frac{\text{CPM/g de órgão}}{\text{dose administrada (CPM)}} \times 100$$

$$\% \text{ CPM/órgão} = \frac{\text{CPM/órgão}}{\text{CPM total dos órgãos analisados}} \times 100$$

Esse parâmetro de estudo caracteriza-se por trabalhar somente com as contagens dos órgãos escolhidos para serem estudados.

$$\% \text{ dose/órgão} = \frac{\text{CPM/órgão}}{\text{dose administrada (CPM)}} \times 100$$

Onde: CPM = contagens por minuto

\* Esses parâmetros foram determinados em microcomputador através de planilha de cálculo.

#### IV.6. CURVA DE DECAIMENTO PLASMÁTICO DO SPDC- $^{99m}\text{Tc}$ :

Para determinação da curva de decaimento plasmático foram colhidos sangues de ratos Wistar nos seguintes tempos :

1 , 5 , 10 , 20 , 45 e 60 minutos  
(para cada tempo foram utilizados 5 animais)

Cada amostra de sangue heparinizado com Liquepine foi centrifugada com uma alíquota de 100  $\mu\text{l}$  de plasma sendo contada em cintilador gama.

Para calcular a porcentagem da dose administrada de SPDC- $^{99m}\text{Tc}$  presente no sangue total em cada tempo estudado fizemos os seguintes cálculos :

$$\% \text{ Dose Plasmática / ml} = Y = \frac{\text{CPM plasma (em ml)}}{\text{CPM padrão}} \times 100$$

$$\% \text{ Dose Plasmática Total} = Y \times \text{volume plasmático}$$

Onde :

$$\text{Volume Plasmático} = \frac{\text{volemia} \times (100 - \text{Hc real})}{100} \quad (31)$$

$$\text{Volemia} = \text{peso do animal} \times 0,0575 \quad (1,45)$$

$$\text{Hc real (Hematócrito real)} = \text{Hc lido} \times 0,91 \times 0,96 \quad (66)$$

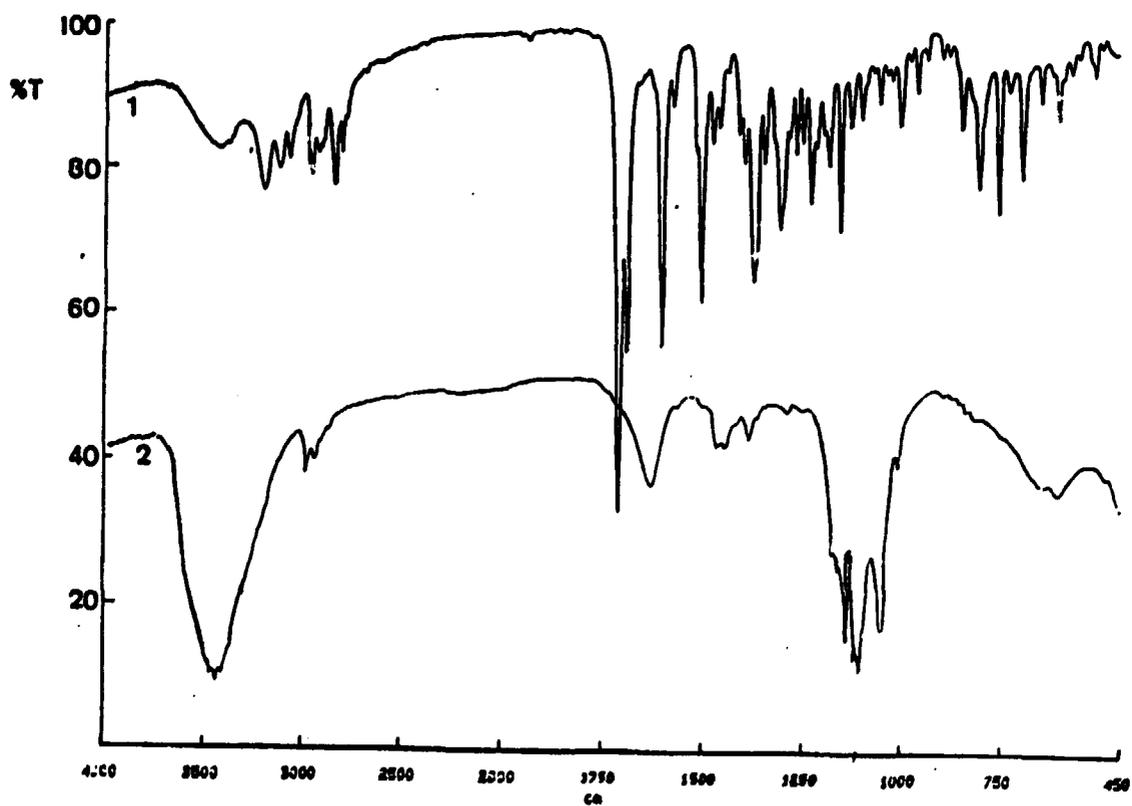
## V-RESULTADOS

## V.1. PROCESSO DE MARCAÇÃO:

## V.1.1. RENDIMENTO REACIONAL - FORMAÇÃO DO DERIVADO SPDC:

O rendimento de reação obtido foi de 96,0%.

## V.1.2. DIFERENCIAÇÃO ENTRE ESPIPERONA COMERCIAL (SIGMA) E O DERIVADO DE ESPIPERONA SINTETIZADO NO LABORATÓRIO

Espectros de Infravermelho dos dois Compostos :

CURVA 1 - ESPIPERONA

CURVA 2 - DITIOCARBAMATO DE ESPIPERONA

freqüências das ligações :

C = S : 1100  $\text{cm}^{-1}$

N - H : 3500  $\text{cm}^{-1}$

V.1.3. TÉCNICA DE MARCAÇÃO DO SPDC COM  $^{99m}\text{Tc}$  -ESCOLHA DO TIPO DE REDUTOR:

ENSAIO DE ESTABILIDADE DO COMPLEXO SPDC- $^{99m}\text{Tc}$

Tempo de Incubação (minutos)	% PUREZA RADIOQUÍMICA	
	FSA	$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
5	95,48	92,17
10	90,77	92,13
15	83,11	92,72
60	57,59	91,56

O processo de marcação que utilizou o redutor cloreto estanozo resultou em complexos estáveis (no intervalo de uma hora). Dessa forma o cálculo da constante de degradabilidade foi efetuado somente para o método de marcação que utilizou o FSA.

DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE DEGRADABILIDADE DO  
PRODUTO DA MARCAÇÃO EFETUADA COM O REDUTOR FSA  
MÉTODO DA SUBSTITUIÇÃO

- Testada a equação da reação de primeira ordem, calculamos as constantes de velocidade para cada tempo de reação:

$$t_1 = 5 \text{ minutos} \quad - \quad k_v 1 = 0,0093 \text{ min}^{-1}$$

$$t_2 = 10 \text{ minutos} \quad - \quad k_v 2 = 0,0097 \text{ min}^{-1}$$

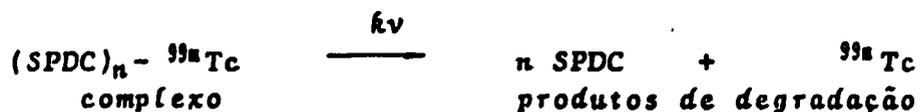
$$t_3 = 15 \text{ minutos} \quad - \quad k_v 3 = 0,0092 \text{ min}^{-1}$$

$$t_4 = 60 \text{ minutos} \quad - \quad k_v 4 = 0,0092 \text{ min}^{-1}$$

$$r = - 0,99$$

As constantes de velocidade calculadas deram valores praticamente iguais :

$$k_v = 0,0094 \pm 0,0003$$



MARCAÇÃO UTILIZANDO FSA COMO REDUTOR  
SEM PURIFICAÇÃO DO COMPLEXO SPDC-<sup>99m</sup>Tc :

A pureza radioquímica obtida nesse processo foi de 50% sendo que 39,10% do tecnécio permaneceu sem complexação, como  $\text{TcO}_4^-$  e os 9,89% restantes consistiram da impureza  $\text{TcO}_2$ .

## V.1.4. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE MARCAÇÃO:

## A) ESTEQUIOMETRIA DO REDUTOR :

Número de Moles SPDC		Número de Moles $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	(%) Pureza Radioquímica
1	:	2	57,81
1	:	1	65,60
7	:	1	87,85
10	:	1	92,72
11	:	1	91,09
15	:	1	90,55

## B) TEMPO DE REAÇÃO :

Tempo de Incubação (minutos)	(%) Pureza Radioquímica
5	92,17
15	92,72
60	91,56

c) pH REACIONAL :

pH	(%) Pureza Radioquímica	(%) TcO <sub>2</sub>
6,0	86,90	13,10
7,5	92,72	7,28
9,0	91,39	8,61

d) ATIVIDADE DE <sup>99m</sup>Tc :

Atividade de <sup>99m</sup> Tc (mCi)	(%) Pureza Radioquímica
1,5	91,22
2,0	92,72

E) MASSA DE SPDC :

massa de SPDC (ug)	(%) Pureza Radioquímica
114	92,72
228	92,77
600	79,19

## V.2. COEFICIENTE DE PARTIÇÃO (C.P.) :

Atividade - Fase Orgânica ( $\mu\text{Ci}$ )	Atividade - Fase Aquosa ( $\mu\text{Ci}$ )	Coefficiente de Partição
37,30	0,62	1,78
28,10	0,59	1,68
25,60	0,60	1,63
27,90	0,62	1,65
27,30	0,63	1,64

$$CP = 1,68 \pm 0,06$$

## V.3. CONJUNTO DE REATIVOS PARA MARCAÇÃO "IN SITU" :

Ao testar a eficiência de marcação do conjunto de reativos constatamos uma pureza radioquímica de 96%. O estudo de estabilidade demonstrou que no intervalo de 2 meses o conjunto de reativos manteve suas características praticamente inalteradas (com degradação menor que 2%).

**V.4. ENSAIO DE TOXICIDADE BIOLÓGICA :**

**V.4.1. DOSAGEM :**

A massa utilizada para ser injetada em cada animal foi de :

500 doses (esse valor a ser administrado em cada animal é equivalente a uma dose 500 vezes maior do que aquela a ser usada no paciente).

**V.4.2. COMPORTAMENTO DOS CAMUNDONGOS AO ENSAIO :**

Após a injeção do fármaco não foi notada nenhuma espécie de mudança no comportamento dos camundongos.

## V.5. DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA

Tabela 1 - Captação do complexo SPDC-  $^{99m}\text{Tc}$  :

TABELA - 1

	% DOSE / g				
	1 MIN.	5 MIN.	15 MIN.	30 MIN.	60 MIN.
coração	1,81±0,21	0,78±0,10	0,73±0,16	0,62±0,20	0,49±0,18
pulmão	2,38±0,44	1,85±0,30	1,73±0,45	1,71±0,32	1,36±0,13
bazo	0,72±0,37	1,82±0,45	2,21±1,86	2,22±0,58	1,67±0,17
fígado	1,88±0,42	3,71±0,26	4,39±1,12	4,35±0,78	4,10±0,57
rim	1,18±0,05	1,58±0,16	2,92±0,11	5,10±2,42	3,47±0,57
estômago	0,16±0,03	0,17±0,04	0,17±0,01	0,25±0,08	0,20±0,08
int. del.	0,24±0,05	0,37±0,07	1,01±0,26	1,59±0,97	0,71±0,40
cerebelo	0,17±0,03	0,09±0,03	0,06±0,03	0,08±0,03	0,05±0,01
striatum	0,21±0,02	0,10±0,02	0,06±0,02	0,07±0,01	0,05±0,01
cortex	0,11±0,01	0,08±0,02	0,05±0,02	0,05±0,02	0,04±0,01
sg. total	4,69±0,65	2,74±0,29	2,58±0,65	2,32±0,30	1,78±0,22

Na Tabela 2 os valores de captação estão expressos em % da dose administrada / órgão :

TABELA 2

	% DOSE / ORGÃO				
	1 MIN.	5 MIN.	15 MIN.	30 MIN.	60 MIN.
coração	1,25±0,71	0,66±0,10	0,59±0,08	0,50±0,17	0,33±0,04
pulmão	3,02±0,68	2,40±0,62	2,01±0,38	2,08±0,69	1,91±0,06
bazo	0,33±0,16	0,87±0,15	0,81±0,72	0,79±0,15	0,80±0,19
fígado	18,23±3,12	33,94±1,55	36,49±6,04	36,01±5,13	36,41±0,83
rim	1,93±0,18	2,57±0,33	4,39±0,54	7,21±3,26	6,10±0,74
estômago	0,24±0,03	0,25±0,03	0,24±0,01	0,34±0,11	0,25±0,12
int.del.	0,18±0,04	0,32±0,09	1,01±0,22	1,56±0,87	0,39±0,26
cerebelo	0,05±0,01	0,02±0,01	0,02±0,01	0,02±0,01	0,01±0,01
striatum	0,05±0,01	0,03±0,01	0,02±0,01	0,02±0,01	0,01±0,01
cor'tex	0,12±0,01	0,09±0,03	0,06±0,02	0,06±0,02	0,05±0,01
sg. total	62,17±7,91	34,47±0,87	30,28±6,29	28,09±6,12	20,97±0,78
somatório	87,57±8,56	75,62±1,92	75,92±8,78	76,68±8,70	67,23±1,97

A fim de estudar as porcentagens de captação somente dos órgãos dissecados fizemos estudo do parâmetro %CPM/órgão. Esse parâmetro é calculado dividindo-se a captação do órgão pela soma das captações dos órgãos dissecados (Tabela 3).

TABELA - 3

	% CPM / ÓRGÃO				
	1 MIN.	5 MIN.	15 MIN.	30 MIN.	60 MIN.
coração	1,91±0,24	0,87±0,11	0,77±0,05	0,65±0,23	0,48±0,04
pulmão	3,40±0,53	3,18±0,74	2,65±0,06	2,70±0,82	2,84±0,12
báço	0,38±0,20	1,15±0,19	0,97±0,74	1,02±0,11	1,19±0,25
fígado	20,92±4,56	44,87±0,74	48,21±1,14	46,85±4,20	54,17±0,86
rim	2,20±0,03	3,40±0,46	5,85±0,74	9,67±5,18	9,05±0,80
estômago	0,27±0,03	0,33±0,04	0,32±0,05	0,45±0,13	0,37±0,17
int.del.	0,20±0,03	0,43±0,12	1,32±0,05	2,11±1,34	0,58±0,37
cerebelo	0,05±0,01	0,03±0,01	0,02±0,01	0,03±0,01	0,02±0,00
striatum	0,05±0,01	0,04±0,01	0,02±0,00	0,02±0,01	0,02±0,01
cortex	0,14±0,01	0,12±0,04	0,08±0,00	0,08±0,03	0,08±0,01
sg. total	70,48±4,14	45,59±0,81	39,78±0,91	36,42±5,48	31,19±0,09

DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA EFETUADA COM  
ADMINISTRAÇÃO PRÉVIA DE HALOPERIDOL

TABELA\_4

	% DOSE / g	
	30 MINUTOS	60 MINUTOS
coração	0,34±0,01	0,50±0,14
pulmão	0,71±0,14	0,74±0,08
baço	0,69±0,20	0,65±0,20
fígado	1,60±0,48	1,69±0,31
rim	1,07±0,14	1,55±0,19
estômago	0,10±0,05	0,09±0,01
int. delg.	0,48±0,09	0,50±0,34
cerebelo	0,03±0,00	0,04±0,01
striatum	0,04±0,02	0,03±0,01
córtex	0,03±0,01	0,03±0,01
sg. total	0,10±0,03	0,13±0,02

DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA EFETUADA COM  
ADMINISTRAÇÃO PRÉVIA DE HALOPERIDOL

TABELA\_5

% DOSE / ÓRGÃO		
	30 MINUTOS	60 MINUTOS
coração	0,41±0,03	0,56±0,30
pulmão	1,25±0,22	1,38±0,39
baço	0,34±0,09	0,28±0,05
fígado	15,46±3,04	16,22±1,52
rim	2,21±0,48	3,17±0,33
estomago	0,16±0,07	0,18±0,07
int.delg.	0,36±0,06	0,56±0,52
cerebelo	0,01±0,00	0,01±0,00
striatum	0,01±0,00	0,01±0,00
córtex	0,04±0,01	0,04±0,01
sg.total	1,76±0,36	1,90±0,29

## V.6. VOLUME PLASMÁTICO E HEMATÓCRITO DE CADA ANIMAL :

TABELA\_6

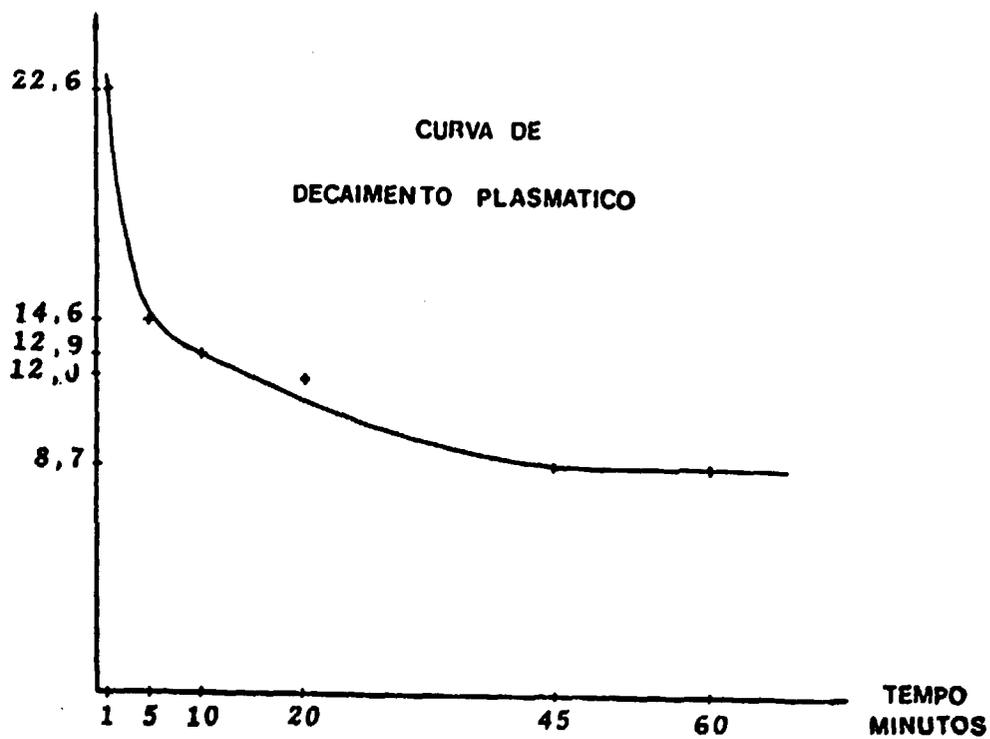
Número Rato	Peso(g)	Volume Plas- mático (ml)	Hematócrito
1	115	4,65	34
2	118	4,60	37
3	96	3,54	41
4	105	3,82	42
5	108	4,15	38
6	105	4,03	38
7	100	3,79	39
8	120	4,19	45
9	116	4,11	44
10	95	3,65	38
11	105	3,61	46
12	92	3,40	41
13	99	3,70	40
14	110	4,12	40
15	167	5,91	44
16	186	6,59	44
17	143	5,13	43
18	159	5,87	41
19	152	5,30	45
20	136	5,02	41
21	132	5,34	34
22	162	5,98	41
23	144	5,31	41
24	138	5,30	38
25	132	4,67	44
26	134	4,81	43
27	162	5,90	42
28	133	4,78	43

V.7. NIVEIS PLASMÁTICOS DE SPDC-<sup>99m</sup>Tc x TEMPO DECORRIDO APOS  
A ADMINISTRAÇÃO DA DOSE :

TABELA 7

tempo ( min. )	PORCENTAGEM DA DOSE ADMINISTRADA	
	PLASMA TOTAL	PLASMA / mL
1	22,63 ± 3,00	4,48 ± 0,78
5	14,61 ± 1,91	2,71 ± 0,34
10	12,91 ± 2,22	2,34 ± 0,04
20	11,98 ± 4,02	3,25 ± 1,12
45	8,68 ± 0,39	2,15 ± 0,16
60	8,68 ± 1,19	2,10 ± 0,19

CURVA DE DECAIMENTO PLASMATICO DE SPDC-<sup>99m</sup>Tc EM  
RATOS WISTAR (% DOSE ADMINISTRADA X TEMPO DECORRIDO)



## VI-DISCUSSÃO

A síntese do derivado SPDC foi efetuada com alto rendimento e o produto foi posteriormente isolado quimicamente do meio reacional para que sua pureza fosse ainda maior.

O processo de marcação foi inicialmente estudado com a utilização de dois tipos de redutores diferentes.

O FSA, confirmando os resultados de Ballinger (9) proporcionou uma incorporação de apenas metade do  $^{99m}\text{Tc}$  enquanto que para o cloroetano estânico obtivemos valores próximos de 100%. Processos utilizando ion pertecnetato como traçador e o cloroetano estânico como redutor podem ser considerados clássicos devido à sua vasta utilização em radiofarmácia. Pertecnetato promove as marcações de vários tipos de moléculas após sofrer redução em presença de soluções ácidas de cloroetano estânico.

Estudos de estabilidade do produto marcado foram feitos tendo em vista que sua integridade é muito importante para a feitura de uma boa distribuição biológica. Dessa forma, estudando o parâmetro estabilidade até o intervalo de tempo de 1 hora ficou evidenciado que cloroetano estânico forma produtos marcados que praticamente não se alteram e FSA (proposto no trabalho original de Ballinger(9)) os concebe com instabilidade.

Os cálculos de degradabilidade foram efetuados para os complexos obtidos através do redutor FSA e, através do método cinético da substituição verificamos que, quando testada uma equação de primeira ordem, obtivemos valores fixos para as constantes de velocidade (para os diferentes tempos estudados). Ficou então comprovado que o processo de degradação obedece a cinética de uma reação de primeira ordem.

Os resultados dos ensaios para a escolha do redutor deixaram claro que o FSA é um redutor insatisfatório se comparado ao cloreto estanoso .

#### COM RESPEITO AOS PARÂMETROS DE MARCAÇÃO TEMOS :

##### - Estequiometria do redutor Cloreto Estanoso :-

Demonstrou influenciar sensivelmente o rendimento de marcação e a relação estequiométrica ideal (em termos de número de moles) foi de:

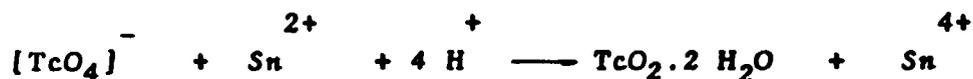
CONJUGADO	10	:	1	REDUTOR
(SPDC)				(CLORETO ESTANOSO)

##### - Tempo de Reação :-

No intervalo de tempo estudado a pureza radioquímica praticamente não se alterou. Então, em termos de praticidade e dinâmica de marcação, os tempos menores foram os escolhidos mormente o tempo de 15 minutos por promover um valor de pureza radioquímica um pouco maior.

- pH Reacional :

O meio reacional ácido propicia a formação de tecnécio coloidal ( $TcO_2$ ) (2,6,64,68) :



Pudemos verificar que os teores de  $TcO_2$  como impureza foram diminuídos em pH's menos ácidos. Por isso que os pH's mais alcalinos demonstraram ser mais adequados e responsáveis pela redução dos teores de tecnécio coloidal. O pH adotado por nós foi o de 7,5 por ser o mais próximo do pH fisiológico.

- Atividade de  $^{99m}Tc$  :

Verificou-se que o parâmetro atividade do traçador não altera significativamente o processo de marcação já que a quantidade de tecnécio é muito menor do que a quantidade da substância a ser marcada; dessa forma testamos duas atividades e adotamos 2,0 mCi para todas as marcações.

- Massa do Derivado SPDC :

A massa escolhida foi de 228  $\mu g$  porque proporciona a melhor marcação.

- Rendimento de Marcação :

Esse parâmetro foi considerado bom .

Com relação ao alto valor calculado do coeficiente de partição podemos dizer que ele indica que o produto marcado é favorável a estudos cerebrais.

É interessante notar que o coeficiente de partição do complexo SPDC-<sup>99m</sup>Tc ( 1,68 ) é um valor muito próximo ao da própria espiperona ( 1,75 ). Isso significa dizer que, mesmo depois de transformar a espiperona no derivado SPDC e marcar esse último com <sup>99m</sup>Tc, não houve significativa mudança nas características farmacocinéticas desse fármaco com relação a seu coeficiente de partição.

Com respeito ao conjunto de reativos podemos dizer que seu desempenho de marcação foi satisfatório e que esse fator é muito favorável à utilização desse radiofármaco.

Segundo o Ensaio de Toxicidade, o derivado é considerado inócuo "in vivo". Apesar da espiperona estar entre os neurolépticos mais potentes que se conhece, o seu derivado quando injetado em camundongos não provocou nenhuma resposta biológica que se refletisse no comportamento desses animais.

De posse dos dados de distribuição biológica realizados notamos que a principal via de metabolização do produto marcado parece ser a hepática. Como demonstra a Tabela 2, após decorridos os primeiros 5 minutos cerca de 34% de toda a dose administrada se encontra nesse órgão, permanecendo então praticamente constante.

A fim de se estudar as porcentagens de captação somente dos órgãos dissecados fizemos estudo do parâmetro % CONTAGENS POR MINUTO / ÓRGÃO (Tabela 3).

Essa tabela corrobora para a teoria de que o produto marcado seja metabolizado pela via hepática pois enquanto o clareamento sanguíneo está acelerado nos 5 minutos iniciais, a captação do fígado está praticamente se duplicando.

A captação expressa em % CPM / ÓRGÃO também evidencia a afinidade do complexo ( produto marcado ) pelo cérebro mormente pelas regiões do "striatum" e cerebelo já que no intervalo de 15 para 60 minutos esses valores permaneceram constantes. A fixação principalmente no "striatum" é muito importante e favorável ao uso desse produto como agente diagnóstico.

## VII. CONCLUSÕES :

- A síntese do derivado SPDC foi viabilizada com alto rendimento e o produto obtido foi posteriormente purificado quimicamente ;
  
- O processo de marcação foi desenvolvido de forma a obter uma alta taxa de incorporação de  $^{99m}\text{Tc}$  no derivado SPDC sem, no entanto, ser necessária nenhuma purificação posterior ;
  
- Os conjuntos de reativos congelados demonstraram viabilidade de dispensação do radiofármaco para marcação "in situ" com  $^{99m}\text{Tc}$  ;
  
- O produto marcado demonstrou possuir alto valor de coeficiente de partição. Esta característica é muito favorável e importante para os agentes a serem utilizados em estudos cerebrais já que a passagem pela barreira hematoencefálica é grandemente favorecida por compostos lipossolúveis ;

- O fármaco espiperona demonstrou possuir baixa toxicidade ;
  
- A otimização das condições de marcação incluíram tempo de reação, pH, redutor, massa de espiperona ;
  
- O produto marcado demonstrou possuir afinidade pelos tecidos cerebrais como o "striatum", córtex e cerebelo. No "striatum", região onde se encontram os receptores dopaminérgicos D2 em grandes quantidades, foram verificados os maiores níveis de captação cerebral ( expressa em % dose/g ) ;
  
- Após ocorrer o bloqueio dos receptores D2 (cérebro) ficou demonstrado que as captações nessas três regiões cerebrais ficaram iguais (Tabelas 4 e 5) fortalecendo a idéia da existência de interação do tipo fármaco-receptor, ou seja, afinidade do produto marcado pelos receptores D2 ;

FINALIZAÇÃO

Com o desenvolvimento de um fármaco como a espiperona, servindo a múltiplos propósitos dentro da moderna Psicoradiofarmacologia, julgamos ter logrado um tento no desenvolvimento da moderna Radiofarmácia e Medicina Nuclear.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALTMAN, P., comp. & DITMER, D. *Blood and other body fluids*. Washington, D.C., Federation of American Societies for Experimental Biology, p.1-19.
2. ALVAREZ, C.J.; MAASS, E.R.; ARRIAGA, S.C. Un nuevo compuesto para estudios gammafrácticos perfusorios con radioisótopos de vida média corta, 1 Reunión anual Soc. Mex. Med. Nucl., p.29-35, 1967. apud MURPHY, C.A. *El Tecnecio en la medicina nuclear*. México, D.F., Sociedad Mexicana de Medicina Nuclear, 1989 apud CONTALL, B. & NAYLOR, R.J. Neuroleptic and non-neuroleptic epilepsy. *Arzneimittel Forschung*, 23:674-683, 1973.
3. ANDÉN, N.E. Dopamine turnover in the corpus striatum and the limbic system after treatment with neuroleptic and anti-acetylcholine drugs. *J. Pharm. Pharmacol.*, 24:905-906, 1972.
4. ANDÉN, N.E.; BUTCHER, S.G.; CORRODI, H.; FLUXE, K.; UNGERSTEDT, U. Receptor activity and turnover of dopamine and noradrenaline after neuroleptics. *Eur. J. Pharmacol.*, 11:303-314, 1970.
5. ANDÉN, N.E. & STOCK, G. Effect of clozapine on the turnover of dopamine in the corpus striatum and the limbic system. *J. Pharm. Pharmacol.*, 25:346-348, 1973.

6. ANDERS, E. *The radiochemistry of technetium*. Washington D.C., Atomic Energy Commission, 1960.
7. ASSOCIACION ARGENTINA DE BIOLOGIA Y MEDICINA NUCLEAR. *Manual de controles radiofarmaceuticos*. Buenos Aires, 1980. p.13.
8. BACOPOULOS, N.G.; HENINGER, G.R.; ROTH, R.H. Effects of haloperidol and probenecid on plasma and CSF dopamine metabolites in the rhesus monkey (*macaca mulatta*). *Life Sci.* **23**:1805-1812, 1978.
9. BALLINGER, J.R.; GULENCHYN, K.Y.; HASSAN, M.N. Technetium-99m spirone dithiocarbamate: A potential radiopharmaceutical for dopamine Receptor Imaging with SPECT. *Appl. Radiat. Isotop.*, **40** (6):547-549, 1989.
10. BARTHOLINI, G.; KURUMA, I.; PLETSCHER, A. The metabolic pathways of 1-3-O-methyl dopa. *J. Pharmacol. and Experimental Therapeutics*, **183**:65-72, 1972.
11. BARTHOLINI, G.; STADLER, H.; GADEA-CIRIP, M. The use of the push-pull cannula to estimate the dynamics of acetylcholine and catecholamines within various brain areas. *Neuropharmacology*, **15**:515-519, 1976.

12. CARLSON, A. Antipsychotic drugs, neurotransmitters, and schizophrenia. *Am. J. Psychiatry*, 135(2):164-172, 1978.
13. CARLSON, A. & LINDQUIST, M. Effect of chlorpromazine or haloperidol on formation of 3-methoxy-tyramine and normetanephrine mouse brain. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 30:140-144, 1963.
14. CARNMÅLM, B.; JOHANSSON, L.; RANSEY, S.; STJERNSTRÖM, N.E.; WÄGNER, A. Absolute configuration of potentially neuroleptic receptor. *Acta Pharm. Suec.*, 16:239-246, 1979.
15. CLIFFORD, A.M. & LICHTY, J.G. The reaction of diazonium salts on sodium alkylthiocarbamates. *J. Am. Chem. Soc.*, 54(1): 1163-1166, 1932.
16. CONTALL, B. & NAYLOR, R.J. Neuroleptic and non-neuroleptic catalepsy. *Arzneimittel Forschung*, 23:674-683, 1973.
17. CORRODI, H; FUYE, K; HOKFELT, T. The effect of neuroleptics on the activity of central catecholamine neurons. *Life Sci.*, 6: 767-774, 1974.
18. COSTA, E.; CHENEY, D.L.; MAO, C.C.; MORONI, F. Action of anti-schizophrenic drugs on the metabolism of gamma-aminobutyric acid and acetylcholine in the globus pallidus, striatum and nucleus accumbens. *Fed. Proc.*, 37:2408-2414, 1978.

19. DA PRADA, M. & PLETSCHER, A. Acceleration of the cerebral dopamine turnover by chlorpromazine. *Experientia*, 22:465-466, 1966.
20. DELAY, J. & DENIKER, O. *Caracteristiques psycho-physiologiques des medicaments neuroleptics, in the psychotropics drugs.* Amsterdam, Elsevier, 1957.
21. ELLIOTT, K.A.C.; PAGE, I.H.; QUASTEL, J.H. *Neurochemistry.* 2.ed. Illinois, Charles C. Thomas, 1962.
22. ENNA, S.J. & COYLE, J.T. *Neuroleptics: neurochemical behavioral clinical perspectives.* New York, Raven, 1983. p.11-14.
23. EZRIN-WATERS, C.; MILLER, P.; SEEMAN, P. Catalepsy induced by morphine or haloperidol: Effects of Apomorphine and cholinergic drugs *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 54:516-519, 1976.
24. EZRIN-WATERS, C. & SEEMAN, P. Tolerance to haloperidol catalepsy *Eur. J. Pharmacol.*, 41:321-327, 1977.

25. ESTADOS UNIDOS. US Patent 3.125.578. *4-(2,6-dioxo-3-piperidil) piperidines*. JANSSEN, P.A. Nov. 3, 1964.
26. ESTADOS UNIDOS. US Patent 3,155,669. *2-4-8-Triazaspiro [4,5] dec-2-enes*. JANSSEN, P.A. Nov. 3, 1964.
27. ESTADOS UNIDOS. US Patent 3,155,670. *1-Oxo-2,4,8, triazaspiro [4,5] decanes*. JANSSEN, P.A. Nov. 3, 1964.
28. ESTADOS UNIDOS. US Patent 3,161,664. *1-Benzyl-4-substituted piperidines* JANSSEN, P.A. Nov. 15, 1964.
29. FRIER, M. & HESSLEWOOD, S.R., eds. *Quality Assurance of Radiopharmaceuticals*, London, Chapman and Hall, 1980. p.21-23.
30. FRITZBERG, A.R.; LITTE, D.M.; DOLPHIN, P.H. Evaluation of formamidine sulfinic acid and other reducing agents for use in the preparation of Tc-99m labelled radiopharmaceuticals. *J. Nucl. Med.*, 18(6):553-557, 1977.
31. GANONG, W.F. *Fisiologia médica*. 2ed. São Paulo, SP, Atheneu, 1973. p.557-581.
32. GOLOVNYA, V.A. & BOLOTOVA, G.T. Reduction properties of thiourea dioxide and of its decomposition products. *Zh. Neorjklim, G.*, 6:2254-2262, 1961 (*Chem. Abstr.* 56:9696.5, 1962).

33. GORE, P.F. Thiourea dioxide as an organic reducing agent. *Chem. Ind.*, 1355, 1954.
34. GROL, C.R. & ROLLEMA, H. Conformational analysis of dopamine by the INDO molecular orbital method. *J. Pharm. Pharmacol.*, **29**: 153-156, 1977.
35. HOLLISTER, L.E.; DAVIS, K.L.; BERGER, P.A. Butaclamol hydrochloride in newly admitted schizophrenics. *Psychopharmacol. Commun.*, **1**:493-500, 1975.
36. HORN, A.S.; POST, M.L.; KENNARD, O. Dopamine receptor blockade and the neuroleptics, a crystallographic study. *J. Pharm. Pharmacol.*, **27**:553-563, 1975.
37. HORN, A.S. & SNYDER, S.H. Chlorpromazine and dopamine: Conformational similarities that correlate with antischizophrenic activity of phenothiazine drugs. *Proc. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**:2325-2328, 1971.
38. HUMBER, L.G.; BRUDERLEIN, F.T.; PHILIPP, A.H.; GOTZ, M.; VOITH, K. Mapping the dopamine receptor 1. Features derived from modifications in Ring E of the neuroleptic butaclamol. *J. Med. Chem.*, **22**:761-767, 1979.

39. INTER-AMERICAN NUCLEAR ENERGY COMMISSION ASSOCIATION LATINOAMERICANA DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA E MEDICINA NUCLEAR. *Manual de Control de Calidad de Radiofármacos*, Montevideo, s.l., 1986.
40. KOROLKOVAS, A. & BURCKHALTER, H.J. *Química Farmacêutica*. Rio de Janeiro, Guanabara Dois, 1982.
41. KRAEPELIN, E. *über die beeinflussung einfacher psychischer vorgänge durch einige arzeimittel*. Jena, Gustav Fischer, 1982. p.227.
42. LAVERTY, R & SHARMAN, D.F. Modification by drugs of the metabolism of 3,4-dihydroxyphenylethylamine, noradrenaline and 5-hydroxytryptamine in the brain. *Brit. J. Pharmacol.*, 24:759-772, 1965.
43. LEDNICER, D. & MITSCHER, L.A. *The organic chemistry of drug synthesis* New York, N.Y., Wiley Interscience, 1977. v.1, p.306-311.
44. LEDNICER, D. & MITSCHER, L.A. *The organic chemistry of drug synthesis* New York, N.Y., Wiley Interscience, 1980. v.2, p.290-292.
45. LEE, H.B. & BLAUFOX, M.D. Blood volume in rat. *J. Nucl. Med.*, 22:333-338, 1981.

46. MACHADO, A. *Neuroanatomia Funcional*. São Paulo, Atheneu, 1980  
p.210.
47. MATTHISSE, S. Antipsychotic drug actions a clue to the neuropathology of schizophrenia? *Fed. Proc.*, 32:200-205, 1973.
48. MATTHISSE, S. Dopamine and the pharmacology of schizophrenia. The state of evidence. *J. Psychiat. Res.* 2:107-113, 1974.
49. MATTHISSE, S. & LIPINSKI, J. Biochemical aspects of schizophrenia. *Annu. Rev. Med.*, 26:551-565, 1975.
50. MELTZER, H.Y., ed. *Psychopharmacology the third generation of Progress*. Cleveland, Ohio, Raven, 1987.
51. MEURLING, P.; SJOBERG, K.; SJOBERG, B. Methylsulfinyl carbanion II. Preparation and decomposition of xanthates *Acta Chem. Scand.*, 26(1):279-284, 1972.
52. MOLEMAN, P.; BRUINVELS, J.; VAN VALKENBURG, C.F.M. On the relation between haloperidol induced alteration in DA release and DA metabolism in rat striatum. *Life Sci.*, 23:611-616, 1978.

53. MURPHY, C.A. *El tecnécio en la medicina nuclear*. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubiran - Sociedad Mexicana de Medicina Nuclear, 1989.
54. NYBACK, H. Effect of brain lesions and chlorpromazine on accumulation and disappearance of catecholamines formed in vivo from C-14-tyrosine. *Acta Physiol. Scand.*, 84:54-64, 1972.
55. NYBACK, H.; BORZECKI, Z.; SEDVALL, G. Accumulation and disappearance of catecholamines formed from tyrosine-C-14 in mouse brain : effect of some psychotropic drugs. *Eur. J. Pharmacol.*, 4:395-403, 1968.
56. PEROUTKA, S.J. & SNYDER, S.H. Relationship of neuroleptic drug effects of brain dopamine, serotonin, alfa-adrenergic, and histamine receptors of clinical potency. *Am. J. Psychiatry*, 137: 1518-1519, 1980.
57. PHILIPP, A.H.; HUNTER, L.G.; VOITH, K. Mapping the dopamine receptor. 2. Features derived from modifications in the ring 5 A/B region of the neuroleptic butaclamol. *J. Med. Chem.*, 22:768-773, 1979.

58. ROBINSON, S.E.; BERNEY, S.; MISHRA, R.; SULSER, F. The relative role of dopamine and norepinephrine receptor blockade in the action of antipsychotic drugs : metoclopramide, thiethylperazine and molindone as pharmacological tools. *Psychopharmacology*, 64:141-147, 1979.
59. ROLLEMA, H.; WESTERNICK, B.H.C.; GROL, C.J. Correlation between neuroleptic induced suppression of stereotyped behaviour and HVA correlations in rat brain. *J. Pharm. Pharmacol.*, 28: 321-323, 1976.
60. SEEMAN, P. Brain dopamine receptors. *Pharm. Rev.*, 32(3):229-313, 1980.
61. SEEMAN, P.; LEE, T.; CHAU-WONG, M.; WONG, K. Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. *Nature.*, 261:717-719, 1976.
62. SHASHOUA, V.E. Formamidine sulfinic acid as a biochemical reducing agent. *Biochem.*, 3:1719-1720, 1964.
63. STAWARZ, R.J.; HILL, H.; ROBINSON, S.E.; SETTER, P.; DINGELL, J. V.; SULSER, F. On the significance of the increase in homovanillic acid (HVA) caused by antipsychotic drugs in corpus striatum and limbic forebrain. *Psychopharmacologia.*, 43: 125-130,

1975.

64. STEIZMAN, J.; MEINKEN, G.; RICHARDS, P. The reduction of pertechnetate-99m by stannous chloride. -I. The stoichiometry of the reaction in HCl in a citrate buffer and in a DTPA buffer. *Int. J. Appl. Radiat. and Isot.*, **26**:601-609, 1975.
65. TOLLENAERE, J.P.; MOERREELS, H.; KOCH, M.H.J. On the conformation of neuroleptic drugs in the three aggregation states and their conformational resemblance to dopamine. *Eur. J. Med. Chem.*, **12**:199-211, 1977.
66. VEALL, N. & VETTER, H. *Técnicas con radioisótopos para la investigación y el diagnóstico en clínica*. Buenos Aires, Universidad de Buenos Aires, 1964. p.236.
67. WESTERNICK, B.H.C. Effect of centrally acting drugs on regional dopamine metabolism. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **12**: 225-266, 1978.
68. ZUCCHINI, G.L.; TARRONI, G.; MARINELLI, M.; MANGON, L. *Tecnicio Tc-99m proprietà fisico chimique. Produzione ed impiego inn medicina nucleare*. Torino, Gros Monti, 1982.