

CNEN/SP**ipen** Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

ESTUDOS "IN VIVO" E "IN VITRO" DO ÁCIDO 2,6 - DIISOPROPIL
FENILCARBOILMETIL IMINODIACÉTICO MARCADO
COM ^{99m}Tc (DISIDA - ^{99m}Tc)

Diana Yolanda Freire Martinez, Marycel Figueira de Barboza, Emiko Muramoto
Setsuko Seto Achando e Constância Pagano Gonçalves de Silva

IPEN - PUB - 174

PUBLICAÇÃO IPEN 174

JULHO/1988

**ESTUDOS "IN VIVO" E "IN VITRO" DO ÁCIDO 2,6-DIISOPROPIL
FENILCARBOILMETIL IMINODIACÉTICO MARCADO
COM ^{99m}Tc (DISIDA - ^{99m}Tc)**

**Diana Yolanda Freire Martinez, Marycel Figols de Barboza, Emiko Muramoto
Setsuko Sato Achando e Constância Pagano Gonçalves da Silva**

DEPARTAMENTO DE PROCESSAMENTO

**CNEN/SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
SÃO PAULO - BRASIL**

Série PUBLICAÇÃO IPEN

INIS Categories and Descriptors

C21.20

**IMINES
TECHNETIUM 99
METASTABLE STATES
IN VIVO
IN VITRO
LIVER
SCINTILLOGRAPHY**

IPEN - Doc - 3044

Publicação aprovada pela CNEN em 24.09.87

Nota: A redação, ortografia, conceitos e revisão final são de responsabilidade do(s) autor(es)

ESTUDOS "IN VIVO" E "IN VITRO" DO ÁCIDO 2,6-DIISOPROPIL-FENILCARBOILMETIL IMINODIACÉTICO MARCADO COM ^{99m}Tc (DISIDA- ^{99m}Tc) *

Diana Yolanda Freire Martinez¹, Marycel Figols de Barboza, Emiko Muramoto, Setsuko Sato Achando e Constância Pagano Gonçalves da Silva

RESUMO

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

"IN VITRO" AND "IN VIVO" STUDIES OF 2,6-DIISOPROPYL-FENIL-CARBOILMETHYL IMINODIACETIC ACID LABELED WITH ^{99m}Tc (DISIDA- ^{99m}Tc)

ABSTRACT

The "in vivo" and "in vitro" studies on DISIDA- ^{99m}Tc at the hepatobiliary level were made. The binding of DISIDA- ^{99m}Tc to plasmatic proteins and the fraction at which this binding occurs were determined.

The distribution coefficient in n-octanol/saline solution was 0.41 showing the lipophilicity of the compound.

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

INTRODUÇÃO

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

Muitos complexos de ^{99m}Tc tem sido propostos para esse fim, incluindo a penicilina (6), tetraciclina (4), ácido mercaptobutírico (7), piridoxilidene-glutamato (1), e mais de 30 derivados do ácido iminodiacético (IDA) (2). Entre os derivados, os mais utilizados na atualidade são 2,6 dimetil IDA (HIDA), 2,6 dietil IDA (EHIDA), 2,6 diisopropil

(* Trabalho apresentado no II Congresso Geral de Energia Nuclear - Rio de Janeiro, de 23 a 26 de abril de 1988.

(1) Bolsista da IAEA Dirección General de Energia Nuclear - Guatemala.

IDA (DISIDA) e para-butyl IDA (BIDA) pela fácil disponibilidade na forma de conjuntos de reativos liofilizados (9).

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

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

Existem vários fatores que intervêm na diminuição da excreção renal da droga, a saber: aumento do peso molecular, formações de complexos, aumento da lipofilicidade e ligação às proteínas plasmáticas. (8, 11, 13, 15).

O HIDA tem peso molecular 367, com terminações lipofílicas e hidrofílicas separadas consideravelmente. A quelação com ^{99m}Tc provavelmente forma um dímero, decrescendo a natureza hidrofílica do grupo carboxílico e duplicando o peso molecular do composto. A substituição do grupo metil pelo etil aumenta o peso molecular e a lipofilicidade e, a substituição pelo grupo 'para' modifica a polaridade. Subramanian e col. (2) BRIAN e col. (12) demonstraram que ao substituir o grupo metil pelo isopropil há aumento do peso molecular e da lipofilicidade (coeficiente de partição octanol/água do metil IDA = 0,038). Isto implica na elevação da captação biliar e na redução da excreção renal.

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

MATERIAIS E MÉTODOS

Disida- ^{99m}Tc : o 2,6 diisopropil IDA utilizado neste estudo foi sintetizado e preparado na forma de conjuntos de reativo liofilizado na Divisão de Radiofarmácia do Departamento de Processamento do IPEN-CNEN/SP. (5).

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

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

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

Ligação às proteínas plasmáticas:

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

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

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

b. Eletroforese em gel de poliacrilamida: A fim de verificar em qual fração das proteínas plasmáticas o radiofármaco está ligado, realizou-se uma cromatografia em gel de poliacrilamida com amostras de soro obtidas aos 5, 10 e 30 min.

Foram analisados paralelamente o comportamento eletroforético da: a) albumina-^{99m}Tc, b) DISIDA-^{99m}Tc para confirmar a corrida (Rf) da albumina e do DISIDA-^{99m}Tc, no mesmo sistema.

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

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

Estabilidade 'in vivo' da DISIDA-^{99m}Tc:

Um grupo de 10 ratos Wistar foram submetidos a uma cirurgia abdominal com o intuito de canular o colédoco e coletar a bilis. Injetaram-se intravenosamente 100 μ Ci de DISIDA-^{99m}Tc e amostras biliares foram coletadas aos 5, 15, 30, 60 e 90 minutos após a administração do traçador. Estas amostras foram analisadas por cromatografia ascendente em papel Whatman nº 3 (8 x 1cm) nos sistemas metanol 85% e cloreto de sódio 30% a fim de verificar a estabilidade deste produto através desta via.

Um 'pool' do conteúdo biliar marcado de acordo com a metodologia

4.

acima mencionada, foi reinjetado intravenosamente em 3 ratos Wistar, para estudar o comportamento a nível hepatobiliar.

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

Determinação do coeficiente de partição:

O coeficiente de partição foi determinado no sistema n-octanol-água/sol. salina, onde o octanol é o solvente hidrofóbico e a solução salina hidrofílico.

Diluíram-se 50 μ l de DISIDA-^{99m}Tc em 5 ml de solução salina. A 1 ml desta mistura adicionou-se 1 ml de n-octanol agitando-se por 1 min., centrifugou-se durante 5 min. a 3000 rpm. As fases foram separadas e foi determinada a radioatividade em 10 μ l de cada fase, num contador gama.

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

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pureza radioquímica: nos controles radioquímicos realizados por cromatografia ascendente em papel após 30 minutos de reação, obteve-se em média 95% de pureza radioquímica.

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

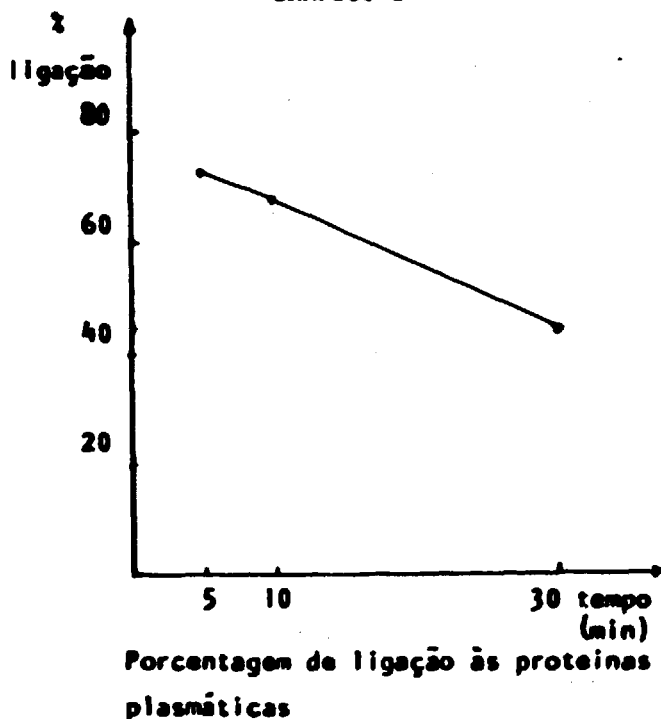
TABELA I

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

Observa-se aos 5 minutos uma ligação de 77,35% decrescendo a 44,22% aos 30 min.

Estes resultados estão ilustrados no gráfico I.

GRÁFICO I



Na eletroforese em gel de poli-acrilamida revelou-se que a DISIDA-^{99m}Tc encontra-se ligada às proteínas plasmáticas, na fração da albumina (15), como está ilustrado no gráfico II. Esta afinidade reduz a captação renal, estando em concordância com os trabalhos de Smith e col. (11).

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

TABELA II

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

.6.

Nas figuras I e II apresentam-se os mapas realizados em ratos injetados intravenosamente com o conteúdo biliar marcado e com DISIDA-^{99m}Tc respectivamente. O estudo comparativo entre os dois grupos de animais evidencia a estabilidade 'in vivo' da droga, o que sugere que ela foi excretada na sua forma radioquímica original, não sofrendo dissociação nem metabolização (14). Não foi observada a concentração do radiofármaco no estômago e baço, que são sítios de captação do íon TcO_4^- e Tc hidrolizado ou colóide, respectivamente.

O coeficiente de partição octanol/sol. salina obtido (0,42), está de acordo com os trabalhos de Molter e Kloss, (10).

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

TABELA III

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

*média de 6 determinações.

CONCLUSÃO

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

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

AGRADECIMENTO

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

GRÁFICO Nº 2

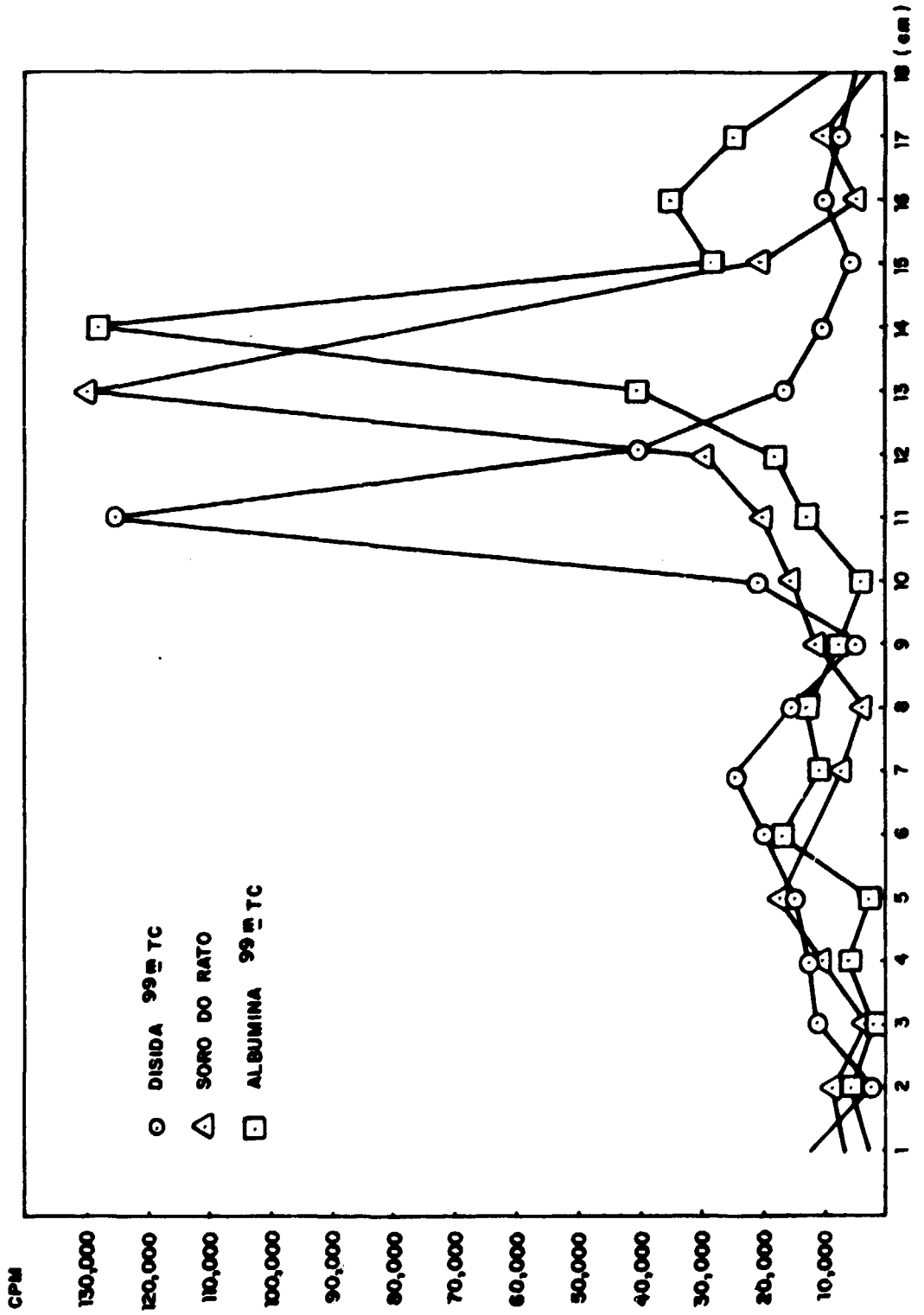
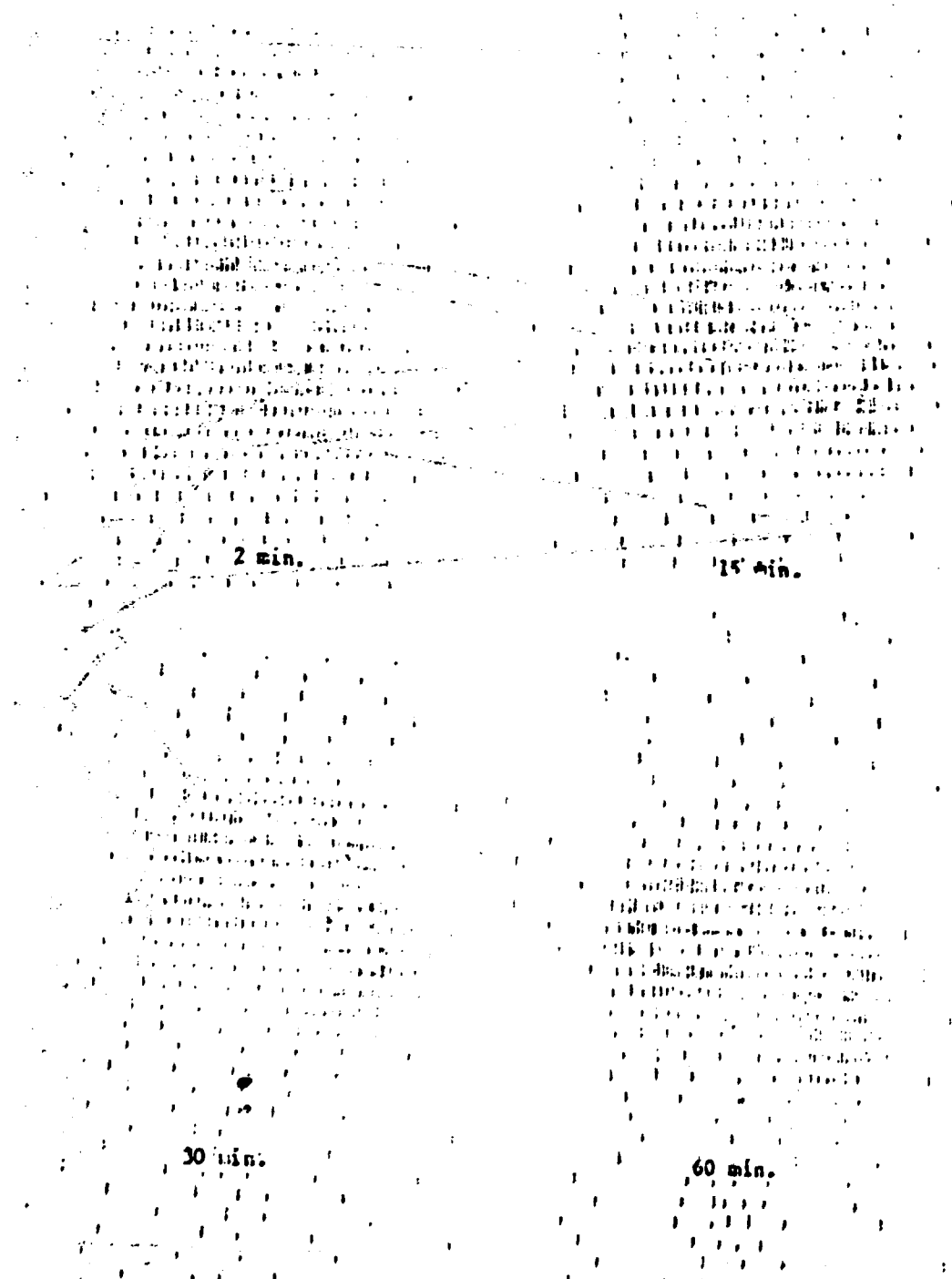
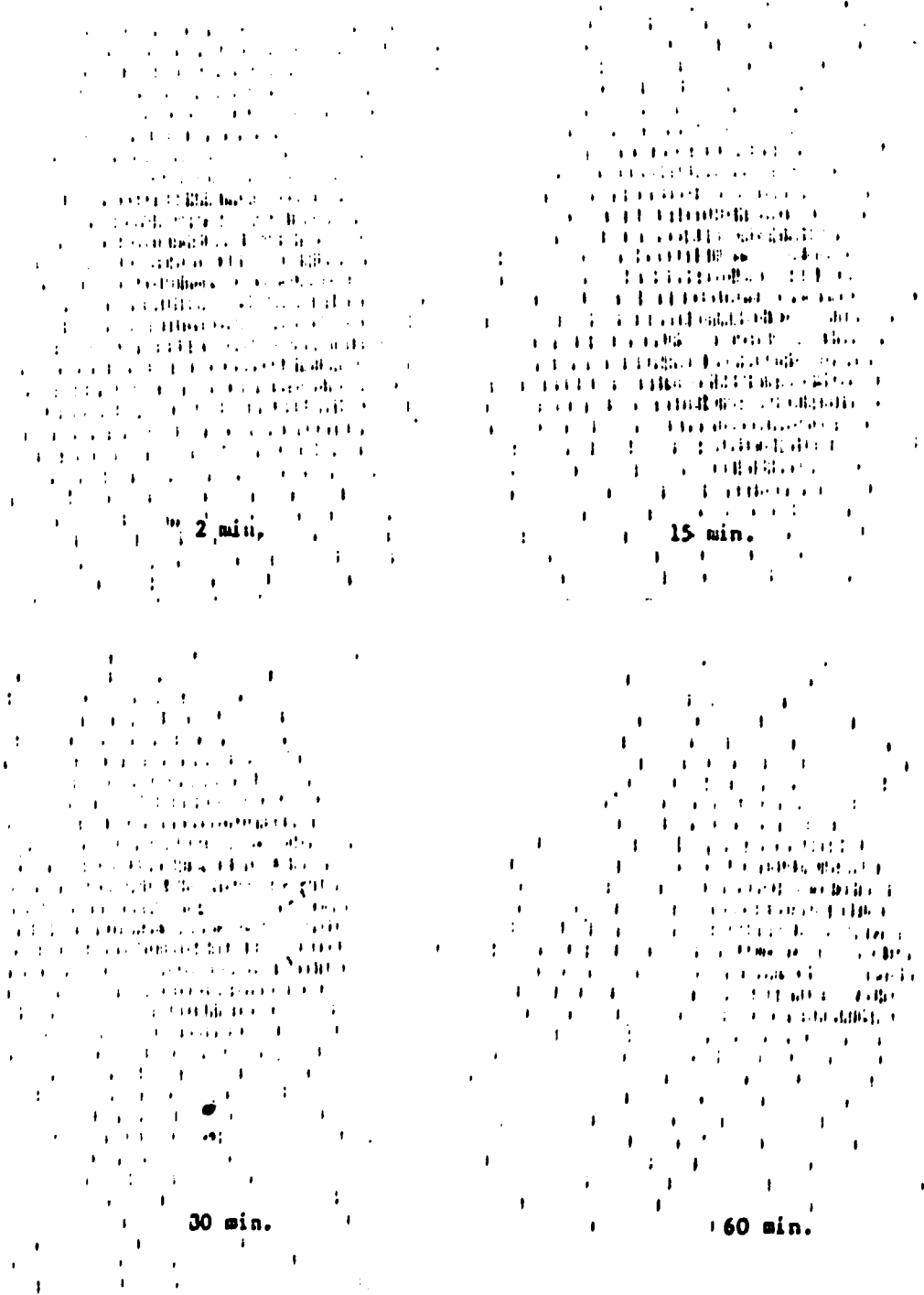


FIGURA I



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

FIGURA 11



CISTILOGRAFIA EN RATO WISTAR DO CONTEÚDO BILIAR MARCADO COM DISIDA- 99mTc.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. BAKER, R.J.; BELJEN, J.C.; RONAN, P.M. Technetium-99m pyridoxal-glutamate. A new hepatobiliary radiopharmaceutical. I Experimental aspects. J. Nucl. Med., 16:72C-7, 1975.
02. BRIAN, W.W.; SUBRAMANIAN, G.; VAN HEERTUM, R.L.; HENDERSON, R.W. An evaluation of ^{99m}Tc-labeled hepatobiliary agents. J. Nucl. Med., 18: 455-61, 1977.
03. DAVIS, B.J.; Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Am. N. Y. Acad. Sci. (2):404-27, 1964.
04. FLIEGEL, C; DEWANJEE, M.K.; HOLMAN, B.L. ^{99m}Tc tetracycline as a kidney and gall bladder imaging agent. Radiology, 110:407-12, 1974.
05. HAMADA, E.; BARBOSA, M.F.; COLTURATO, M.T.; MURAMOTO, E.; ALMEIDA, M.A. da; SILVA, C.P.G. The synthesis of 2,6 diisopropylphenylcarbonyl methyl iminodiacetic acid. Production of lyophilized radiopharmaceutical kits for labeling with ^{99m}Tc. In: COX, P.H. & TOUYA, E. eds. New perspectives in nuclear medicine. Pt. 2: instrumentation, laboratory, investigations and in vitro studies. New York, Gordon & Breach, 1986. p. 132 (Monographs in nuclear medicine, 2).
06. KRISHNAMURTHY, G.T.; TUEBS, M.; ENDOW, J.S. ^{99m}Tc-penicillamine - a new radiopharmaceutical for cholescintigraphy. J. Nucl. Med., 13:447, 1972.
07. LIN, T.H.; KHENTIGEN, A.; WINCHELL, H.S. A ^{99m}Tc labeled replacement for ¹³¹I-rose bengal in liver and biliary tract-studies. J. Nucl. Med., 15:613-5, 1974.
08. MOLTER, M. & KLASS, G. Properties of various IDA derivatives. J. Labelled Compd. Radiopharm., 18:56-8, 1981.
09. NICHOLSON, R.W.; HERNAN, K.J.; SHIELDS, R.A.; TESTA, H.J. The preparation and composition of Hida. Eur. J. Nucl. Med., 5:313-7, 1980.
10. POPESCU, H.I. Hepatic clearance mechanism of ^{99m}Tc-N-(acetanilido) - iminodiacetic acid. Derivatives (Abstract). J. Nucl. Med., 21:1110-2, 1980.
11. SMITH, R.B.; COUPAL, J.; DE LAND, F. H.; TRIPLETT, J.W. Pharmacokinetics of hepatobiliary imaging agents in rats. (Concise communication). J. Nucl. Med., 20:45-9, 1979.
12. SUBRAMANIAN, G.; MCAFEE, J.G.; HENDERSON, R.W.; ROSENTRICH, M.; KROKENBERGER, L. The influence of structural changes on biodistribution of ^{99m}Tc-labeled N-substituted IDA derivatives (Abstract). J. Nucl. Med., 17:624, 1977.

13. TJEN, H.S.L.M. The clinical pharmacology of technetium diethyl-ida.
In: COX, P.H. ed. Progress in radiopharmacology. Amsterdam,
Elsevier, North-Holland, 1979, p. 225.
14. ZIVANOVIC, M.A.; TAYLOR, D.M.; MC CREADY, R.; MILLER, S.T. The
stability and distribution of Tc-HIDA 'in vivo' and 'in vitro'.
Eur. J. Med., 4:369-73., 1979.
15. ZMABCVA, B., DJOKA, D.; NINKOVIĆ, D.; OERADOVIĆ, V.; KOSTIĆ, K.
Chemical and biological properties of 2,6 diisopropyl-IDA labeled
with ^{99m}Tc. Appl Radiat. Isot., 38:35-40, 1987.