

Produção de conjuntos reativos liofilizados para obtenção de L,L-EC-^{99m}Tc*

Elaine B. de Araújo¹, Olga G. de Carvalho², Emiko Muramoto³, Maria A.T.M. de Almeida⁴

O L,L-EC-^{99m}Tc é um radioisótopo recentemente proposto para avaliação da função renal em substituição ao Hippuran-¹³¹I e com características comparáveis ao MAG₃-^{99m}Tc. O presente trabalho descreve a obtenção de conjuntos reativos liofilizados de L,L-EC para marcação com ^{99m}Tc, compostos de 1 mg de L,L-EC e 250 μg de SnCl₂.2H₂O em tampão fosfato pH 12. Os conjuntos reativos estéreis e aprotogênicos apresentam estabilidade superior a quatro meses quando estocados em condições ideais, mostrando-se estáveis após a marcação por período superior a quatro horas. Os estudos de distribuição biológica em camundongos evidenciam rápida depuração sanguínea e eliminação urinária do complexo, com captação desprezível em órgãos adjacentes aos rins. *Unitermos:* L,L-EC-^{99m}Tc. Estudo da função renal.

Araújo EB, Carvalho OG, Muramoto E, Almeida MATM. Produção de conjuntos reativos liofilizados para obtenção de L,L-EC-^{99m}Tc. *Radiol Bras* 1995;28:147-150.

INTRODUÇÃO

O orto-iodo-hippurato de sódio-¹³¹I (OIH), apesar de apresentar as desvantagens atribuídas ao ¹³¹I, ainda é um radiofármaco bastante utilizado para avaliação da secreção tubular renal.

Nos últimos dez anos, foram realizados esforços no sentido de se obter compostos marcados com ^{99m}Tc para estudo da função renal. Complexos de ^{99m}Tc do tipo diamino ditiol, como o DADS-^{99m}Tc, mostraram secreção tubular ativa em animais^(1,2). O derivado carboxilado DADS-CO₂-^{99m}Tc apresentou características renais ainda mais favoráveis. Porém, a complexação promove a formação de epímeros quelados, exigindo purificação em HPLC antes de sua administração⁽³⁾.

Com o intuito de eliminar o problema de formação de isômeros, foi desenvolvido um ligante do tipo N₃S, mercaptoacetiltriglicina-^{99m}Tc (MAG₃-^{99m}Tc), apresentado como substituto potencial do OIH⁽⁴⁾.

Estudos preliminares realizados com um novo composto, L,L-etilenodicitesteína (L,L-EC), demonstraram que o complexo L,L-EC-^{99m}Tc exibe características renais comparáveis às do MAG₃-^{99m}Tc⁽⁵⁾.

A partir da síntese e da caracterização química do L,L-EC em nosso meio⁽⁶⁾, realizamos estudos que estabeleceram os parâmetros de marcação desse composto com ^{99m}Tc⁽⁷⁾.

Este trabalho apresenta a preparação de conjuntos reativos liofilizados para obtenção de L,L-EC-^{99m}Tc, permitindo a avaliação de sua real utilidade como agente de função renal.

MATERIAIS E MÉTODOS

O composto L,L-etilenodicitesteína foi preparado de acordo com procedimento descrito por Bondeau e cols.⁽⁸⁾, e sua toxicidade, avaliada pelo método da DL₅₀.

Todos os reagentes utilizados na preparação dos conjuntos reativos liofilizados foram de grau analítico sem purificação adicional.

A manipulação foi realizada em capela de fluxo laminar, com técnicas assépticas, utilizando vidraria estéril e aprotogênica.

Os conjuntos reativos liofilizados de L,L-EC foram preparados mediante dissolução sob nitrogenação de 100 mg de L,L-EC em 50 ml de tampão fosfato/NaOH 0,1 M, pH 12, preparado com água bidestilada. Adicionaram-se a essa solução 2,5 ml de solução de cloreto estânico, SnCl₂.2H₂O (10 mg/ml), preparada em HCl 0,05 N sob nitrogenação. Ajustou-se o pH ao valor de 12 com solução de NaOH 0,1 N e completou-se o volume para 100 ml com o tampão.

A solução resultante foi esterilizada em membrana filtrante de poro 0,22 μ e fracionada em volumes de 1,0 ml em frascos tipo penicilina de 8,5 ml.

Após fracionamento, os frascos foram submetidos a congelamento com nitrogênio líquido, liofilizados, fechados sob vácuo, lacrados e estocados à temperatura de 4 a 8°C.

* Trabalho realizado no Departamento de Radiofarmácia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN), São Paulo — SP.

1. Mestre em Tecnologia Nuclear pelo IPEN-CNEN/SP. Professora Adjunta da Disciplina de Metodologia e Aplicações de Radioisótopos da PUC Campinas — SP.

2. Doutora em Tecnologia Nuclear pelo IPEN-CNEN/SP. Pesquisadora da Divisão de Radiofarmácia do IPEN-CNEN/SP.

3. Doutora em Biociências pela Universidade de São Paulo. Pesquisadora da Divisão de Radiofarmácia do IPEN-CNEN/SP.

4. Doutora em Tecnologia Nuclear pelo IPEN-CNEN/SP. Pesquisadora da Divisão de Radiofarmácia do IPEN-CNEN/SP.

Endereço para correspondência: Profa. Dra. Elaine B. de Araújo. IPEN-CNEN/SP. Travessa R, n.º 400, Cidade Universitária. Caixa Postal 11049. São Paulo — SP.

Recebido para publicação em 16/5/1994. Aceito em 18/8/1994.

Preparou-se solução de ácido fosfórico 0,05 M em água bidestilada, que foi esterilizada em membrana filtrante de poro 0,22 μ , fracionada em volumes de 7,0 ml em frascos tipo penicilina de 13 ml, posteriormente fechados e lacrados.

O L,L-EC-^{99m}Tc foi obtido reconstituindo-se os liofilizados com 370 MBq (10 mCi) de solução de pertecnetato de sódio (^{99m}Tc), eluída de gerador IPEN-TEC, em volume de 2 a 3 ml.

Transcorrido o período de incubação de 15 minutos à temperatura ambiente, adicionou-se à marcação 1,0 ml da solução de ácido fosfórico.

A pureza radioquímica das marcações foi avaliada por cromatografia ascendente, em fitas aluminizadas de sílica gel (Kieselgel-60, Merck), em dois sistemas de solventes, acetona e ácido acético 0,5 M, para identificação, respectivamente, das formas livre e hidrolisada do ^{99m}Tc.

Efetou-se, ainda, análise por HPLC em coluna Nucleosil C18 (250 \times 4,6 mm — 5 μ), com fluxo de 1,0 ml/min. de mistura gradiente de tampão fosfato 0,05 M e pH 2,5, e etanol: 0—6% etanol (0—10 min.), 6% etanol (10—30 min.). O efluente passou por detector UV (215 nm) e detector de radioatividade LB-2040, Berthold.

A estabilidade das marcações foi avaliada por um período de quatro horas. A estabilidade dos conjuntos reativos liofilizados, conservados à temperatura de 4 a 8°C, foi avaliada por período de quatro meses.

O controle biológico foi realizado pelo método invasivo em camundongos Swiss adultos, pesando entre 20 e 30 g. Os animais foram sacrificados em diversos tempos após a administração da dose e a radioatividade associada ao sangue, urina e órgãos de interesse foi determinada em contador tipo poço (Berthold).

A pirogenicidade dos conjuntos reativos liofilizados e dos frascos com solução de ácido fosfórico foi avaliada pelo teste de Limulus e a esterilidade, pelo método microbiológico clássico.

RESULTADOS

Os liofilizados obtidos mostraram bom aspecto visual e rápida reconstituição com solução de marcação. Os testes de pirogenicidade e esterilidade foram negativos em todos os lotes produzidos.

Tabela 1 Avaliação da pureza radioquímica em função do tempo após a marcação de conjuntos reativos liofilizados de L,L-EC.

Tempo (minutos)	Pureza radioquímica (%)
30	99,88 \pm 0,07
60	99,76 \pm 0,07
120	99,56 \pm 0,16
240	99,44 \pm 0,14

O pH das marcações ficou entre 11 e 12, decaindo para 6 a 7 após a introdução do ácido fosfórico.

Os conjuntos reativos mostraram estabilidade após a marcação superior a quatro horas (Tabela 1).

A estabilidade dos conjuntos reativos estocados em temperatura de 4 a 8°C foi mantida durante os quatro meses já avaliados. Houve reprodutibilidade dos valores de pureza radioquímica para os diferentes lotes produzidos.

Os espectros de HPLC da marcação antes e após a introdução do ácido fosfórico podem ser observados na Figura 1.

Os resultados de distribuição biológica (Tabela 2) evidenciam rápida depuração sanguínea e eliminação urinária do composto, com captação desprezível em órgãos adjacentes aos rins.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A condição de 100 μ g de SnCl₂.2H₂O para 1 mg de L,L-EC, descrita na literatura, promove excelente marcação para misturas reagentes preparadas no momento da marcação. Entretanto, esta massa de agente redutor não resiste ao processo de liofilização. Aumentando-se a massa do cloreto estano para 250 μ g por frasco, ou mesmo utilizando ascorbato de estanho como agente redutor (105,2 μ g de Sn⁺² por frasco), obtivemos conjuntos reativos liofilizados com estabilidade superior a quatro meses, quando estocados em temperatura ideal, compatibilizando a comercialização do produto e permitindo a marcação com atividades de até 3.700 MBq (100 mCi), sem alteração da estabilidade.

A utilização de massa inferior a 250 μ g de cloreto estano por frasco implicou diminuição da pureza radioquímica, devido ao aumento da porcentagem de pertecnetato livre. Massas superiores a 250 μ g diminuem

Tabela 2 Porcentagem da dose administrada de L,L-EC-^{99m}Tc por órgão avaliado.

Tempo	Sangue	Fígado	Rim	Estômago	Intestinos	Urina
1	35,57 \pm 8,42	5,27 \pm 0,66	37,19 \pm 13,18	0,53 \pm 0,08	—	—
5	6,54 \pm 1,10	2,96 \pm 0,45	17,35 \pm 6,46	0,28 \pm 0,06	3,13 \pm 0,45	53,14 \pm 13,14
15	3,31 \pm 0,55	1,90 \pm 0,30	5,55 \pm 2,81	0,16 \pm 0,04	4,01 \pm 0,70	77,35 \pm 4,61
30	1,29 \pm 0,29	1,18 \pm 0,21	3,40 \pm 1,61	0,07 \pm 0,01	5,04 \pm 0,80	85,59 \pm 7,51
60	0,53 \pm 0,08	0,81 \pm 0,13	2,37 \pm 1,65	0,05 \pm 0,01	4,00 \pm 0,81	89,65 \pm 6,09

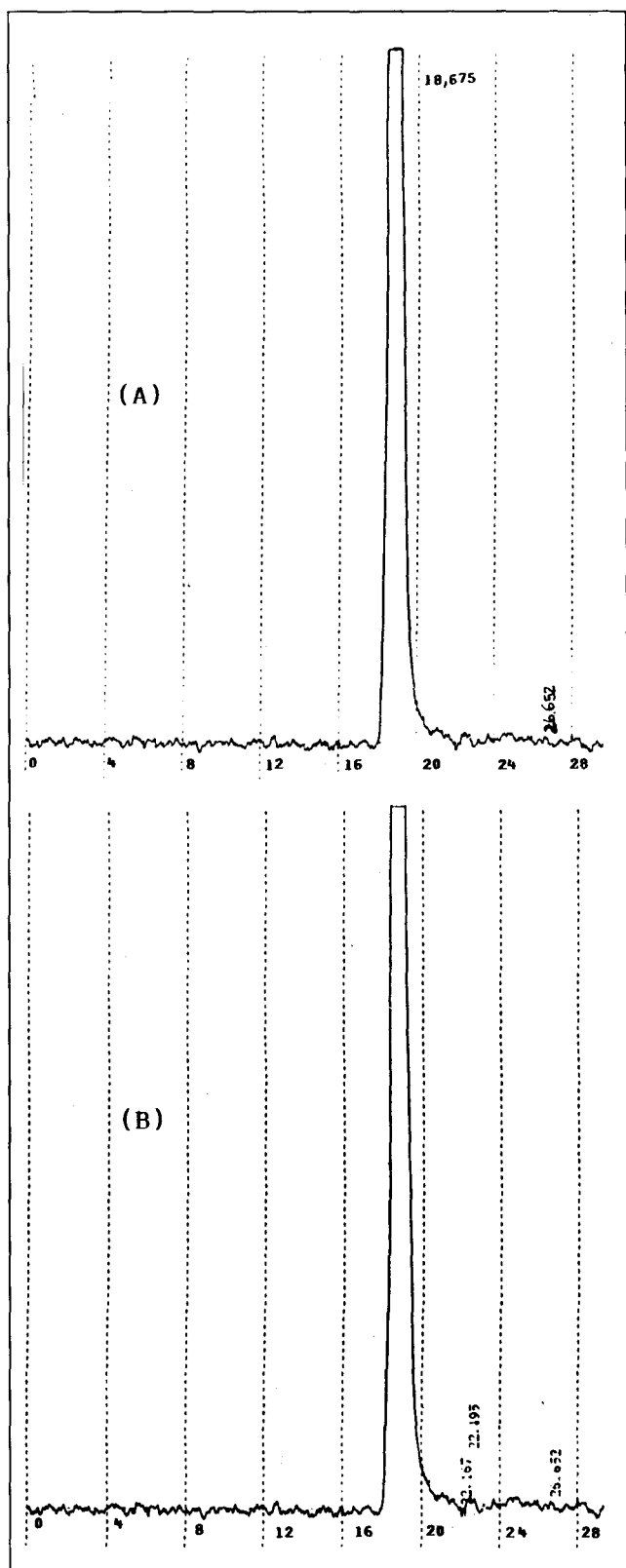


Figura 1 — Espectros de HPLC da marcação de L,L-EC com ^{99m}Tc em pH 12 (A) e após neutralização a pH 7 (B).

a porcentagem de pureza radioquímica, devido à formação da espécie hidrolisada de tecnécio.

O congelamento com nitrogênio líquido, imediatamente após o fracionamento e seguido de imediata liofilização, também contribuiu para a estabilidade do produto, uma vez que a técnica de congelamento nas prateleiras do liofilizador, habitualmente utilizada, mostrou-se ineficiente.

Na avaliação da pureza radioquímica por cromatografia ascendente, agilizamos o procedimento, trabalhando com fitas curtas (1 × 8 cm), cortadas em dois segmentos após a corrida, em vez de fitas longas, após termos realizado estudo comparativo que determinou a eficiência desse método.

A análise por HPLC da mistura reagente evidencia um único pico com Rt de aproximadamente 18 minutos. Tal perfil não se altera quando o pH da marcação é levado a 6-7 após ter transcorrido o período de marcação. Estudos realizados revelam, entretanto, que se a marcação for efetuada em pH inferior a 11 ocorre a formação de uma segunda espécie radioquímica, identificada por estudos de HPLC, que não apresenta as propriedades de distribuição biológica desejadas⁽⁷⁾.

Os estudos de distribuição biológica, realizados em camundongos, salientam a seletividade renal do composto, mostrando-se concordantes com os relatados na literatura⁽⁹⁾, e sugerem investigação clínica minuciosa que permita estabelecer resultados conclusivos sobre a viabilidade da utilização do complexo L,L-EC-^{99m}Tc nos estudos de função renal.

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir pela viabilidade do preparo de conjuntos reativos liofilizados de L,L-EC para marcação com ^{99m}Tc.

Abstract. *Production of lyophilized kits for labelling L,L-EC with technetium-99m.*

^{99m}Tc-L,L-EC is a newly developed radiopharmaceutical proposed as a substitute of ¹³¹I-o-iodohippuric acid (IOH) in tubular secretory imaging studies, that exhibited renal characteristics comparable to ^{99m}Tc-MAG₃. This paper presents the preparation of lyophilized L,L-EC kit to labelling with ^{99m}Tc with 1 mg of L,L-EC, 250 µg of SnCl₂·2H₂O in phosphate buffer pH 12. The stability of the sterile and pyrogen free kit was higher than 4 months when stored in ideal conditions. Also the stability after the labelling with ^{99m}Tc was higher than 4 hours. Biological distribution studies in mice showed a rapid blood clearance and urinary elimination of the complex, with low uptake in liver and lungs. *Key words:* L,L-EC-^{99m}Tc. Renal function. Tubular tracer.

REFERÊNCIAS

1. Davison A, Sohn M, Orving C, Jones AG, Le Tegola MR. A tetradentate ligand designed specifically to coordinate technetium. *J Nucl Med* 1979;20:641 (Abstract).

2. Fritzberg AR, Whitney WP, Klingensmith WC, Kuni CC. Chemical and biological studies of Tc-99m N,N'-bis (mercaptoacetamido)-ethylenediamine: a potential replacement for I-131 iodohippurate. *J Nucl Med* 1981;22:258-63.
3. Fritzberg AR, Kuni CC, Klingensmith WC, Stevens J, Whitney WP. Synthesis and biological evaluation of Tc-99m N,N'-bis (mercaptoacetyl)-2,3-diaminopropanoate: a potential replacement for ¹³¹I-o-iodohippurate. *J Nucl Med* 1982;23:592-8.
4. Fritzberg AR, Kasina S, Eshima D, Johnson DL. Synthesis and biological evaluation of technetium-99m MAG₃ as a hippuran replacement. *J Nucl Med* 1986;27:111-5.
5. Van Nerom C, Waer M, Claeys C, De Roo M, Verbruggen A. Clinical evaluation of ^{99m}Tc L,L-EC as a alternative for ^{99m}Tc MAG₃ in renal transplant patients. *Eur J Nucl Med* 1991;18:562 (Abstract).
6. Carvalho OG, Araújo EB. Preparação de L,L-etilenodicisteína e L,L-etilenodicisteína-dietiléster. *Rev Esp Med Nucl* octubre 1993; resúmenes de comunicación 96.
7. Araújo EB, Muramoto E, Carvalho OG, Almeida MATM. Labeling of ethylenedicysteine (EC) with ^{99m}Tc. Preliminary distribution studies in mice. *Rev Esp Med Nucl* octubre 1993; resúmenes de comunicación 95.
8. Blondeau P, Berse C, Gravel D. Dimerization of an intermediate during sodium in liquid ammonia reduction of L-thiazolidine-4-carboxylic acid. *Can J Chem* 1967;45:49-52.
9. Mansur S, Jehangir M, Stathaki S, Papadopoulos M, Mastrotamatis S, Chiotellis E. Renal elimination of some ^{99m}Tc-labelled cysteamine derivatives. *Nucl Med Biol* 1993;20:819-23.

Agradecimentos. As autoras agradecem a Rosana Herrerias, Claudia Castanheira e Alfredo dos Santos, pela colaboração técnica.