

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

Olga G. de Carvalho¹, Elaine B. de Araújo², Emiko Muramoto³, Maria A.T.M. de Almeida⁴

Estudos recentes têm demonstrado que o radiofármaco L,L-ECD-^{99m}Tc apresenta estabilidade *in vitro* e características favoráveis para o estudo da perfusão cerebral. O presente trabalho descreve a obtenção de conjuntos reativos liofilizados de L,L-ECD para pronta marcação com ^{99m}Tc, compostos de 1 mg de L,L-ECD, 0,125 mg de SnCl₂.2H₂O, 24,0 mg de manitol e 0,36 mg de EDTA em pH 2,0-3,0. Os conjuntos reativos estéreis e apirogênicos 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 mostram rápido clareamento sanguíneo e a habilidade do complexo de atravessar a barreira hemato-encefálica. As captações cardíaca e pulmonar são inexpressivas e o complexo é eliminado pelas vias renal e intestinal. As imagens estáticas planares anterior e lateral mostram uma captação intensa e persistente do complexo no cérebro do cachorro. *Unitermos:* L,L-ECD-^{99m}Tc. Agente de perfusão cerebral.

Carvalho OG, Araújo EB, Muramoto E, Almeida MATM. Produção de conjuntos reativos liofilizados para obtenção de L,L-ECD-^{99m}Tc. *Radiol Bras* 1996;29:135-137.

INTRODUÇÃO

Uma série de ligantes do tipo diamino-ditiol têm sido estudados como potenciais agentes de perfusão cerebral por formarem complexos neutros e estáveis com ^{99m}Tc.

Entre esses compostos, o ligante L,L-etilenodicisteína-dietil-éster (L,L-ECD) marcado com tecnécio-^{99m} apresenta-se como promissor agente para avaliação do fluxo regional cerebral^(1,2).

Estudos comparativos preliminares entre L,L-ECD-^{99m}Tc e HMPAO-^{99m}Tc em humanos demonstram a conveniência para o uso clínico do primeiro complexo devido à sua estabilidade *in vitro*, menor atividade em tecidos moles e dosimetria mais favorável⁽³⁾.

A praticidade do uso do L,L-ECD-^{99m}Tc, combinada com sua retenção cerebral seletiva e rápida excreção renal, sugerem a expansão de sua utilização rotineira na determinação dos padrões de perfusão cerebral^(1,4).

Tendo em vista o que foi considerado, este trabalho tem a finalidade de apresentar a preparação de conjuntos reativos liofilizados para a obtenção de L,L-ECD-^{99m}Tc a partir da síntese, caracterização química do L,L-ECD em

nosso meio⁽⁵⁾ e estudos para estabelecimento dos parâmetros de marcação desse composto com ^{99m}Tc, possibilitando, dessa forma, a avaliação da sua real utilização como agente de perfusão cerebral.

MATERIAIS E MÉTODOS

O composto L,L-ECD foi preparado de acordo com procedimento descrito por Blondeau e cols.⁽⁶⁾ e sua toxicidade foi avaliada pelo método da DL₅₀. Todos os reagentes utilizados na preparação dos conjuntos reativos foram de grau analítico, sem purificação adicional. A manipulação foi feita em capela de fluxo laminar, com técnicas assépticas, utilizando vidraria estéril e apirogênica.

Os conjuntos reativos liofilizados de L,L-ECD foram preparados mediante dissolução sob nitrogenação de 100 mg de L,L-ECD, 36 mg de EDTA e 2,4 g de manitol em 50 ml de água bidestilada; 12,5 mg de SnCl₂.2H₂O foram dissolvidos em pequeno volume de HCl concentrado, que foi adicionado à mistura anterior. Após verificar o pH (2,0 a 3,0), acertou-se o volume final para 100 ml com água bidestilada.

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 (frasco A).

Preparou-se solução tampão de fosfato 0,02M, pH 7,0 a 8,0, em água bidestilada, que foi esterilizada em membrana filtrante de poro 0,22 µ, fracionada em volu-

* Trabalho realizado no Departamento de Radiofarmácia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP.

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

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

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

Endereço para correspondência: Dra. Olga Gonçalves de Carvalho, IPEN-CNEN/SP, Travessa R, nº 400, Cidade Universitária, 05508-900 São Paulo - SP, Caixa Postal 11049.

Recebido para publicação em 29/11/1994. Aceito em 11/4/1996.

mes de 1,0 ml em frascos tipo penicilina de 8,5 ml, posteriormente fechados e lacrados (frasco B).

Para marcação dos conjuntos reativos de L,L-ECD com ^{99m}Tc, reconstituiu-se o frasco A com 1,2 ml de solução fisiológica e transferiu-se 1,0 ml dessa solução para o frasco B. Em seguida, adicionou-se, a este último 1 a 2 ml de solução de pertecnetato de sódio (atividade máxima de 3.700 MBq), homogeneizou-se suavemente por inversão e incubou-se à temperatura ambiente por 30 minutos.

A avaliação da pureza radioquímica foi realizada por cromatografia ascendente em fitas aluminizadas de sílica gel (Kieselgel-60, Merck), utilizando-se NaCl 20% como solvente. Efetuou-se ainda análise por HPLC em coluna Nucleosil C18 (250×4,6 mm – 5μ), com fluxo de 1,0 ml por minuto de mistura gradiente de tampão fosfato 0,05 M, pH 2,5, e etanol: 0–60% etanol (0–4 min.); 60% etanol (40–60 min.). O efluente passou por detector ultravioleta (215 nm) e detector de radioatividade LB-2-40, Berthold.

A estabilidade das marcações foi avaliada por período de quatro horas. A estabilidade dos conjuntos reativos liofilizados conservados à temperatura de 4 a 8°C foi avaliada por período de seis 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 órgão de interesse foi determinada em contador tipo poço (Berthold).

Imagens cintilográficas planares anterior e lateral foram obtidas em cachorros, 30 e 60 minutos após a administração do complexo L,L-ECD-^{99m}Tc.

A pirogenicidade dos conjuntos reativos liofilizados e dos frascos com solução tampão fosfato 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.

A porcentagem de pureza radioquímica determinada por cromatografia em camada delgada foi superior a 98% para volume final de marcação de 1 a 4 ml. Para volumes finais de 5 a 6 ml, tal porcentagem decresce, respectivamente, para 94,45±0,32% e 89,61±0,24%.

Um período mínimo de 30 minutos foi requerido para que as marcações atingissem pureza radioquímica superior a 98%. Variando-se a atividade de 37 a 3.700 MBq,

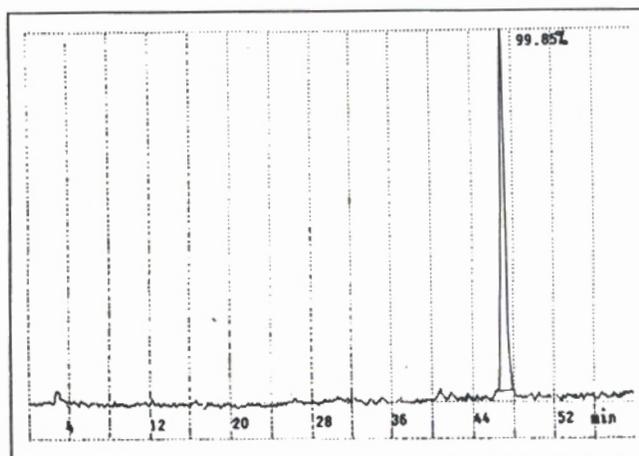


Figura 1 – Espectro de HPLC da marcação de L,L-ECD com ^{99m}Tc.

observamos pureza radioquímica superior a 98% e o complexo manteve-se estável por período avaliado de quatro horas.

O espectro de HPLC obtido para marcação de L,L-ECD com ^{99m}Tc pode ser observado na Figura 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.

A Tabela 1 apresenta os resultados dos estudos de distribuição biológica em camundongos e a Figura 2 apresenta as imagens obtidas em cérebro de cachorro.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Na obtenção de conjuntos reativos liofilizados de L,L-ECD para pronta marcação com ^{99m}Tc, a massa de cloreto estano de 125 μg por frasco mostrou-se adequada; massas inferiores e superiores acarretam diminuição da porcentagem de pureza radioquímica devido ao aumento da porcentagem de pertecnetato e da espécie hidrolisada de tecnécio, respectivamente. Os conjuntos liofilizados assim produzidos mantiveram-se estáveis por período superior a quatro meses, estocados em condições ideais.

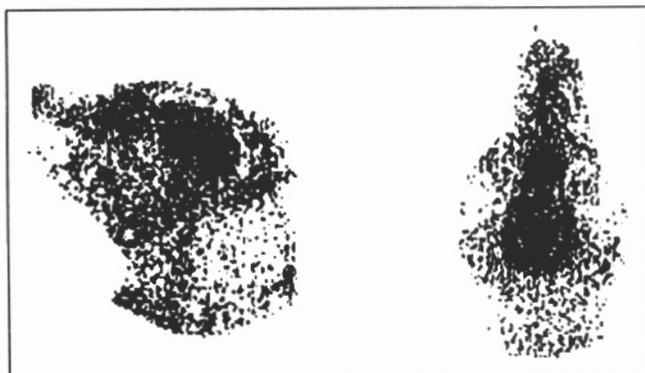
O congelamento com nitrogênio líquido, imediatamente após o fracionamento e seguido de imediata liofilização, também contribuiu para a estabilidade do produto, uma vez que a técnica de congelamento nas prateleiras do liofilizador, habitualmente utilizada, mostrou-se ineficiente.

A pureza radioquímica da marcação é evidenciada no espectro de HPLC, que apresenta um único pico com Rt de aproximadamente 47 minutos para as condições de gradiente empregadas.

Tabela 1 Porcentagem da dose de L,L-ECD-^{99m}Tc/órgão.

Órgão	Tempo após administração da dose (minutos)					
	1	5	15	30	60	120
Coração	0,70±0,02	0,23±0,05	0,11±0,03	0,04±0,01	0,04±0,01	0,02±0,01
Cérebro	1,62±0,39	1,25±0,27	1,12±0,53	0,38±0,14	0,19±0,08	0,07±0,01
Pulmão	2,54±0,32	1,24±0,09	0,66±0,11	0,27±0,05	0,28±0,08	0,13±0,02
Rins	5,19±1,61	4,48±1,19	2,16±0,50	1,53±0,34	1,00±0,29	0,71±0,25
Fígado	19,82±5,02	28,27±4,49	15,84±1,06	11,93±1,78	8,74±1,24	6,69±0,86
Intestino	-	13,03±4,58	23,30±5,78	33,26±9,44	38,25±5,79	43,66±6,90
Sangue	22,29±7,75	9,15±2,74	4,78±1,46	3,17±0,81	1,90±0,48	1,02±0,32
Urina	-	6,20±3,78	18,62±7,49	31,06±6,59	33,81±9,21	39,83±2,79

* Intestino cheio.

Figura 2 - Imagens cintilográficas planares de L,L-ECD-^{99m}Tc em cão: lateral (30 min.) e anterior (60 min.).

A análise dos resultados da distribuição biológica em camundongos mostra um rápido clareamento sanguíneo e a habilidade do complexo de atravessar a barreira hemato-encefálica. As captações cardíaca e pulmonar são inexpressivas e o complexo é eliminado pelas vias renal e intestinal.

As imagens estáticas planares anterior e lateral mostram captação intensa e persistente do complexo no cérebro do cachorro.

O L,L-ECD-^{99m}Tc é um complexo estável que atravessa a barreira hemato-encefálica, apresentando-se como promissor agente para estudos de perfusão cerebral e para avaliação de pacientes com doenças neurológicas.

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

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

Recent studies have showing the *in vitro* stability of ^{99m}Tc-L,L-ECD and the ability for brain perfusion studies. This paper describes the preparation of lyophilized L,L-ECD kits to label with ^{99m}Tc using 1 mg of L,L-ECD, 0.125 mg of SnCl₂·2H₂O, 24.0 mg of manitol and 0.36 mg of EDTA at pH 2.0-3.0. The stability of the sterile and pyrogen free kits was higher than four months when stored in ideal conditions; also the stability after the labelling with ^{99m}Tc was higher than four hours. Biological distribution studies in mice show the rapid blood clearance and the ability of the complex to cross the blood brain barrier. The heart and lung uptake are inexpressive and the complex is

eliminated by both renal and intestinal route. Anterior and lateral planar static images show intense and persistent uptake of ^{99m}Tc complex in the brain of dog. **Key words:** L,L-ECD-^{99m}Tc. Brain perfusion agent.

REFERÊNCIAS

- Lèveillé J, Demonceau G, De Roo M, et al. Characterization of technetium-99m-L,L-ECD for brain perfusion imaging. Part 2: biodistribution and brain imaging in humans. *J Nucl Med* 1989;30:1902-10.
- Walovitch RC, Hill TC, Garrity ST, et al. Characterization of technetium-99m-L,L-ECD for brain perfusion imaging. Part 1: pharmacology of technetium-99m-ECD in nonhuman primates. *J Nucl Med* 1989;30:1892-901.
- Lèveillé J, Botez MI, Taillefer R, Gagnon A, Douesnard JM, Lefebvre B. A clinical comparison of Tc-99m ethyl cysteinate dimer (ECD) in normal volunteers and patients as brain perfusion imaging agent. *J Nucl Med* 1989;29:844(Abstract).
- Vallabhajosula S, Zimmerman RE, Picard M, et al. Technetium-99m-ECD: a new brain imaging agent; *in vivo* kinetics and biodistribution studies in normal human subjects. *J Nucl Med* 1989;30:599-604.
- Carvalho OG, Araújo EB. Preparação de L,L-etilenodocistina e L,L-etilenodocistina dietil éster. *Rev Esp Med Nucl* 1993; resúmenes de comunicacion 96.
- Blondeau P, Berse C, Gravel D. Dimerization of an intermediate during the sodium in liquid ammonia reduction of L-thiazolidine-4-carboxylic acid. *Can J Chem* 1967;45:49-52.

Agradecimentos. Os autores agradecem ao grupo do Serviço de Radioisótopos do Instituto do Coração, em especial à farmacêutica responsável Iris J.C. Coelho, pelas imagens cintilográficas planares obtidas em cães.

RESUMOS E COMENTÁRIOS DA LITERATURA ATUAL: ABDOMINAL E GASTROINTESTINAL

Causas de aumento do espaço pararenal anterior direito aos ultra-sons.

Chen JJ, Chagchien CS, Kuo CH. Causes of increasing width of right anterior extrarenal space seen in ultrasonographic examinations. *J Clin Ultrasound* 1995;23:287-92.

O espaço pararenal anterior direito é composto pela fáscia peritoneal, espaços peri e pararenal anterior direitos e a cápsula hepática. Para esclarecer as possíveis causas do aumento da largura deste espaço, ela foi medida por ultra-sons, durante um período de oito meses. O espaço pararenal anterior foi medido 3 cm acima do pólo renal superior e foi usada a menor largura obtida nos diferentes planos de corte.

Em 1.114 exames de ultra-sons, foram encontrados 35 pacientes com aumento do espaço pararenal anterior. Entre os 35 casos, as causas prováveis foram encontradas em 27. Oito pacientes tinham hiperecogenicidade neste espaço, condição considerada como sendo devida a inflamação aguda, inclusive pancreatite aguda, apendicite aguda, diverticulite cecal aguda, isquemia intestinal, colangite aguda, abscesso hepático e úlcera duodenal perfurada. As inflamações crônicas de órgãos adjacentes, história prévia de laparotomia, neoplasia maligna com metástases peritoneais e corticoterapia foram consideradas as causas nos 19 pacientes com ecogenicidade normal. Para os outros oito pacientes, as causas não foram encontradas durante o período de seguimento.

Este estudo indica que doenças com risco de vida, como doenças inflamatórias agudas ou crônicas e neoplasias malignas do abdome, poderiam ser as causas de aumento deste espaço.

Vivian Schivartche