

TOPICOS EM... DIAGNÓSTICO

Estudo do Ditiocarbamato de Espiperona - Tc 99m como agente potencial para diagnóstico de patologias cerebrais relacionadas aos receptores dopaminérgicos do tipo D-2

Spiperone Dithiocarbamate - ^{99m}Tc kit a potential diagnosis agent for dopaminergic D2 brain pathologies - biodistribution

Unitermos: Ditiocarbamato de Espiperona - Tc99m, patologias cerebrais, receptores dopaminérgicos.
Uniterms: Spiperone Dithiocarbamate Complex, brain pathologies, D2 dopamine receptors.

RESUMO

A Psicofarmacologia tem descoberto muito a respeito dos receptores dopaminérgicos D-2 e sua inter-relação 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 com Doença de Parkinson geralmente possuem evidências anatomopatológicas na substância negra e fibras dopaminérgicas nigroestriadas de forma a diminuir as taxas de ação dopaminérgica nesses locais.

Assim, agentes psicotrópicos antagonistas dos D-2, 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- ^{99m}Tc estudado por nós é um potencial agente diagnóstico por ser acentuadamente lipossolúvel e altamente afin pelos receptores D-2, além de ser emissor gama, possibilitando o uso da técnica SPECT ("Single Photon Emission Computed Tomography") que é mais viável economicamente quando comparada à técnica de PET ("Positron Emission Tomography").

Destarte, o ditiocarbamato de espiperona (SPDC ou spiperon dithiocarbamate) 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 captções esplênica, cardíaca, hepática, estomacal, pulmonar, renal, sangüínea, 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 a obtenção do produto marcado.

Marcos Moisés Gonçalves
Maria A. T. M. de Almeida
Emiko Muramoto

IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CNEM - São Paulo. Setor de Radiofarmácia).

INTRODUÇÃO

A Psicofarmacologia tem descoberto muito a respeito dos receptores dopaminérgicos e sua inter-relação com as patologias cerebrais, tais como Mal de Parkinson, Esquizofrenia, Doença de Huntington.

Com efeito, agentes terapêuticos como o neuroléptico espiperona, que possuem grande afinidade por receptores D-2, têm sido transformados em radiofármacos emissores de pósitrons ou emissores-gama com a finalidade de mapear regiões cerebrais e possibilitar o diagnóstico dessas doenças.

O presente trabalho discorre sobre a marcação da espiperona com tecnécio 99m e estudos de distribuição biológica do produto marcado, bem como sua curva de decaimento plasmático. A preparação de fármacos marcados com emissores-gama destinam-se à utilização da técnica diagnóstica qualitativa e semi-quantitativa de SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography).

MÉTODOS

Processo de marcação

A espiperona não é capaz de se ligar ao Tc-99m. Portanto, para possibilitar a marcação é mister transformá-la num conjugado com poder complexante. Uma alternativa consiste em modificar o grupamento amínico secundário da espiperona com a formação de um ditiocarbamato⁽¹⁾ (Fig. 1):

1. Metodologia de síntese do conjugado SPDC, segundo Ballinger & colaboradores:

- dissolver 10 mg de espiperona em

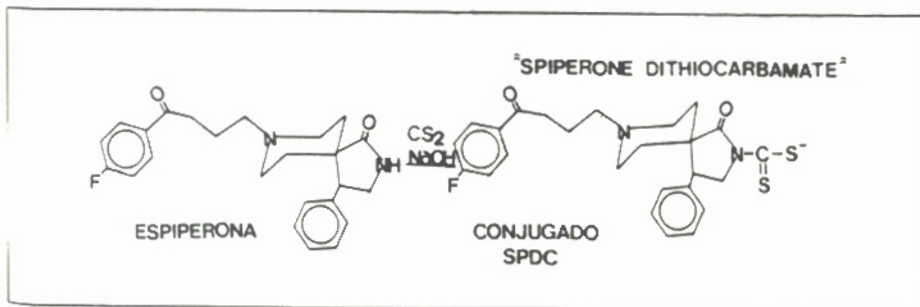


Figura 1

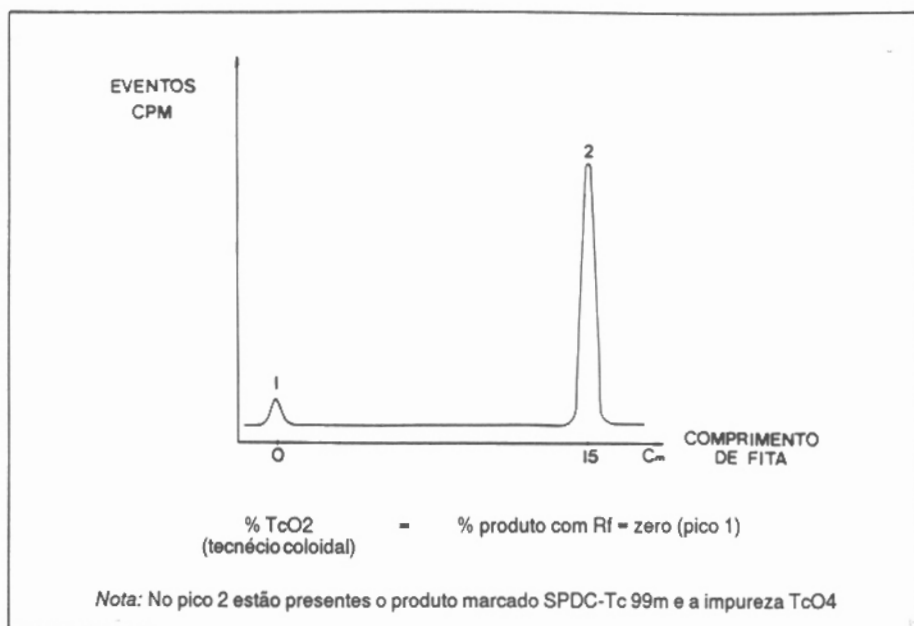


Figura 2

10 ml de etanol absoluto e resfriar o meio com banho de gelo e cloreto de sódio;

- adicionar 0,2 ml de dissulfeto de carbono e alcalinizar o meio com 1 ml de hidróxido de sódio 2,5M;
- deixar reagir, sob agitação, por 20 minutos e evaporar o meio reacional até a secura com aplicação de gás nitrogênio;
- dissolver o resíduo com 30 ml de água e lavar três vezes com 10 ml de cloreto de metileno para eliminar a espiperona não reagida;
- separar a fase aquosa, completar a 25 ml e separar alíquotas de 0,5 ml em frascos tipo penicilina.

2. Procedimento de marcação

A complexação do tecnécio-99m no conjugado SPDC foi sensivelmente modificada e otimizada em nossos laboratórios a partir dos trabalhos de Ballinger e col., como segue:

A cada frasco de penicilina contendo por volta de 230 ug do conjugado SPDC adicionamos consecutivamente:

- 0,5 ml de solução 0,1M de fosfato dibásico de sódio;
- 25 ul de solução redutora (417 ug cloreto estano/ml ácido clorídrico 0,1M);
- após homogenizar suavemente, deixamos o sistema em incubação por 15 minutos.

Para fazer o controle radioquímico do processo de marcação foi utilizada uma metodologia para determinação das impurezas presentes no meio reacional.

3. Controle radioquímico

3.1. Determinação da impureza TcO₂:

Após efetuar o processo de marcação adicionamos por volta de 15 gotas de etanol, homogenizamos e transferimos uma gota para outro frasco, contendo 1ml de etanol.

Fizemos, então, corrida cromatográfica com suporte ITLC-SG em fase cloróformio-metanol (9:1) (Fig. 2).

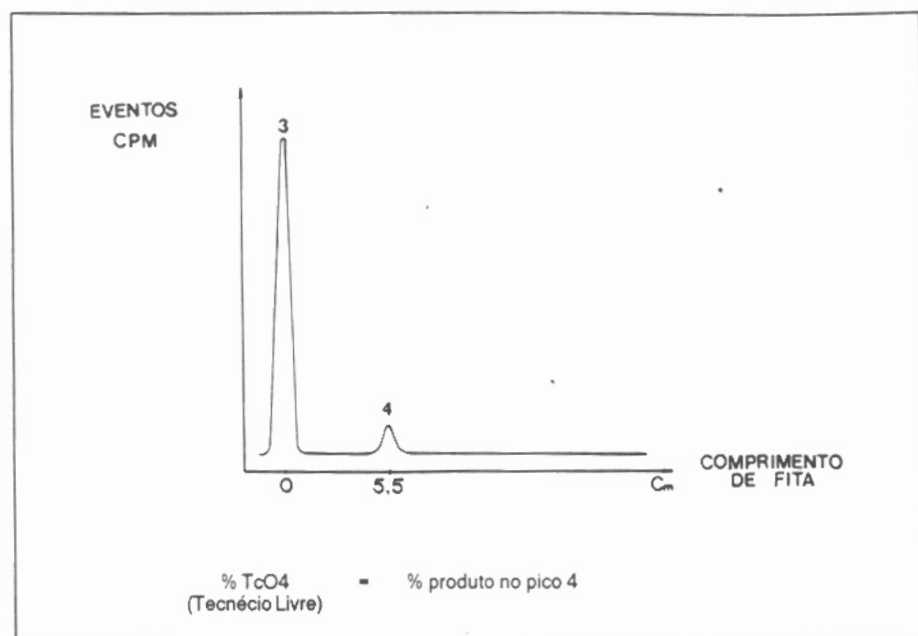


Figura 3

4. Determinação da impureza "Tecnécio Livre":

Utilizamos o mesmo líquido preparado anteriormente para efetuar eletroforese em suporte de papel Whatman número 1 em fase móvel tampão fosfato (0,05M) voltagem 180V (12V por centímetro de fita), 50 minutos de corrida (Fig. 3).

A pureza radioquímica pode ser calculada com a seguinte expressão:

$$\% \text{ pureza radioquímica} = 100\% - (\% \text{ TcO}_2 \text{ pico 1} + \% \text{ TcO}_4 \text{ pico 4})$$

DISTRIBUIÇÕES BIOLÓGICAS

1. Distribuição biológica 1

Em *Ratus norvegicus albinus* de linhagem Wistar, machos anestesiados com uretana, foi administrado 0,1 ml de mistura contendo o produto marcado através da veia dorsal peniana. Após a ocorrência de intervalos determinados de tempo, os animais foram sacrificados tendo seus órgãos retirados, lavados e contados em cintilador-gama tipo poço.

2. Distribuição biológica 2

Nova distribuição biológica foi efetuada com o prévio bloqueio dos receptores D-2. Dessa forma, primeiramente os animais receberam uma injeção de Haloperidol e, após o decorrer de uma hora, administramos 0,1 ml de produto marcado e procedemos aos passos posteriores como citado acima.

3. Curva de decaimento plasmático

Para determinação do decaimento

plasmático do produto marcado fez o estudo dos respectivos níveis plasmáticos nos seguintes tempos após a administração: 1, 5, 20, 30, 45, 60 minutos. Os animais foram anestesiados e, a intervalos de tempo estabelecido, decapitados e o sangue destes foi lido em frascos heparinizados. Um volume de 1 ml de sangue foi utilizado para leitura de hematócrito, o restante foi centrifugado a 2000 rpm por 15 minutos. 100 ul de plasma foi utilizado para leitura em cintilador de poço. Foi feito um padrão contendo a mesma dose utilizada em cada animal e foram usados também para determinação da % da Dose Plasmática Total, conforme demonstra Fig. 4 abaixo.

4. Toxicidade biológica

Foi efetuado o Ensaio de Toxicidade segundo método da Associação Americana de Biologia e Medicina Nuclear.

RESULTADOS

O processo de preparo do conjugado SPDC demonstrou rendimento de 93% e, por sua vez, a marcação do conjugado pelo Tc-99m resultou em 93% de pureza radioquímica. Adicionalmente, fiz um estudo de estabilidade e verifico que, após uma hora decorrida do fim da marcação, o rendimento ainda se manteve por volta de 92%.

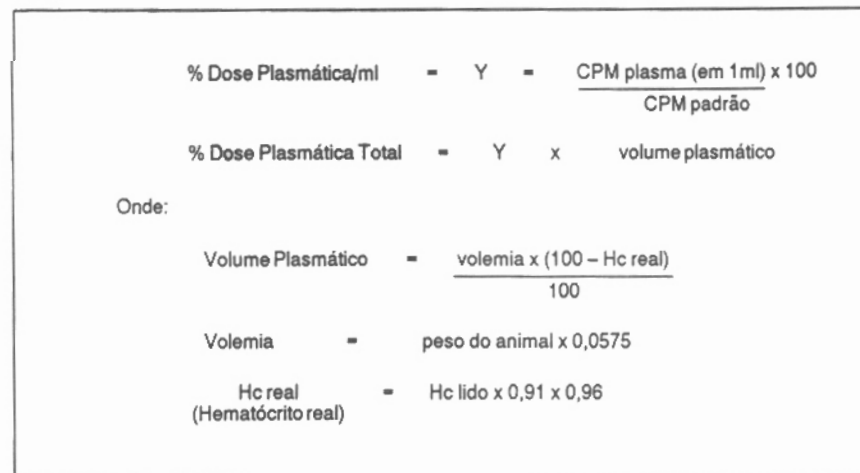


Figura 4

DECAIMENTO PLASMÁTICO

tempo (min.)	Plasma/ml	Plasma total
1	4,48 ± 0,78	22,63 ± 3,00
5	2,71 ± 0,34	14,61 ± 2,24
10	2,34 ± 0,04	12,91 ± 2,14
20	3,25 ± 1,12	11,97 ± 4,02
45	2,15 ± 0,16	8,68 ± 0,39
60	2,10 ± 0,19	8,68 ± 1,19

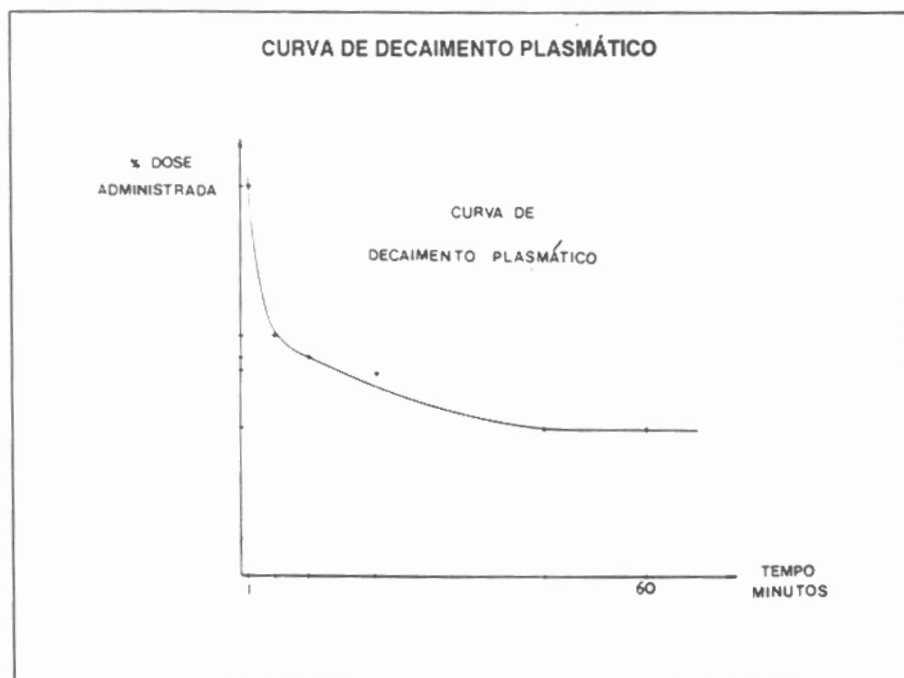


Figura 5

TABELA 1
DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA - 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
Baço	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
Intestino delgado	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
Córtex	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

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O processo de marcação mostrou-se prático, com bom rendimento e de relativamente rápido preparo, além de demonstrar boa estabilidade no intervalo de uma hora. Segundo cálculos efetuados, o coeficiente de partição do produto marcado SPDC-Tc99m resultou em 97,27%, valor muito próximo ao da espiperona (98,27%). Isto quer dizer que, mesmo depois de transformar a espiperona num conjugado e marcá-lo com Tc-99m, não houve significativa mudança nas características farmacocinéticas no que diz respeito a coeficiente de partição.

Por outro lado, o elevado valor de 97,92% indica que o produto marcado é favorável a estudos cerebrais. O ensaio de toxicidade demonstrou que o conjugado é inócuo "in vivo", pois uma concentração administrada em camundongos equivalente a 500 doses para indivíduo adulto (70 kg) não causou nenhuma mudança perceptível no comportamento dos animais.

Segundo dados obtidos das Distribuições Biológicas expressos em % dose administrada/g tecido (Tabela 1), temos para a região cerebral uma captação maior a nível de striatum indicando a preferência do produto marcado por este local. Conforme indicam os dados da Tabela 2 (expressos em % dose/órgão), o produto marcado, que no primeiro minuto está concentrado no sangue, passa rapidamente para o fígado e aí permanece. Com respeito ao estudo biológico efetuado com o prévio bloqueio dos receptores D-2, ficou evidenciado o aparecimento da perda de seletividade do produto marcado por striatum, córtex e cerebelo, pois seus valores de captação expressos em % dose/g (Tabela 3) resultaram em valores praticamente iguais nos tempos de 30 e 60 minutos (com os receptores D-2 ocupados pelo haloperidol o produto marcado fixou-se indiferentemente nos tecidos cerebrais).

A Tabela 4 (% dose/órgão) mostra que não houve (nos intervalos de 30 e 60 minutos) mudança nos valores de captação, reforçando idéia da afinidade do radiofármaco pelo cérebro "mesmo estando este com seus receptores D-2 bloqueados".

TABELA 2

	% DOSE/ÓRGÃO				
	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
Baço	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
Intestino delgado	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
Córtex	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

TABELA 3
DISTRIBUIÇÃO BIOLÓGICA - 2

Distribuição biológica efetuada com administração prévia de haloperidol

	% 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
Intestino delgado	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

SUMMARY

Psychopharmacology has been discovering much about the D2 dopamine receptors and their interrelationship to brain pathologies such as Parkinson's Disease,

TABELA 4

Distribuição biológica efetuada com administração prévia de haloperidol

	% 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
Estômago	0,16 ± 0,07	0,18 ± 0,07
Intestino delgado	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

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 shown 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 transformed into radiopharmaceuticals to diagnose these pathological diseases of Central Nervous System. The Spiperone Dithiocarbamate complex studied for use 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 Spiperone Dithiocarbamate from Spiperone and its complexation with Technetium-99m has been prepared with its reaction parameters after being studied and improved.

The SPDC-^{99m}Tc complex biological distribution have 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 Tc) has been achieved.