

06.81.04

Ana María Marafuschi; Nilda Echegaray; Carlos Cañellas y María Cristina Palcos ⁽¹⁾

nuevos radiofármacos para el diagnóstico centellográfico del sistema hepatobiliar incorporados a la producción de la CNEA ⁽²⁾

Resumen

Se estudió la marcación con $^{99m}\text{TcO}_4$ de tres derivados del ácido iminodiacético. Ellos son: 2-6 dimetil acetanilida, 2-6 dimetil acetanilida, y p-butil acetanilida del ácido iminodiacético.

Se pusieron a punto tres juegos de reactivos que consisten cada uno en un liofilizado de 20 mgr de 2-6 dimetil ó dietil ó p-butil IDA y 0.2 mgr de $\text{Cl}_2 \text{ Sn } 2\text{H}_2\text{O}$. Cualquiera de los tres liofilizados pueden ser marcados con la actividad requerida de $^{99m}\text{TcO}_4$. Todas las preparaciones se realizan en atmósfera de nitrógeno y en condiciones de esterilidad.

Una vez marcado el fármaco con $^{99m}\text{TcO}_4$ se procede a la inyección I.V. del mismo pudiendo seguir en una gamma cámara el pasaje a través de todo el sistema hepatobiliar observándose ya a los diez minutos actividad en duodeno.

El dimetil y el 2-6 dietil IDA presentan comportamientos similares alcanzando mejor concentración en el sistema hepatobiliar el segundo. En caso de pacientes icterícos es conveniente usar el p-butil IDA.

Se realizaron controles cromatográficos, electroforéticos y biológicos usando como modelo biológico ratones CFW.

La conválida clínica mostró resultados satisfactorios.

Summary

The labelling of three derivatives of the acid aminodiacetic was studied; these were the 2-6 methyl acetanilido, the 2-6 diethyl acetanilido and p-butyl acetanilido imino diacetic acid.

The three kits developed consist each of a freeze-dried mixture of 20 mg of 2-6 dimethyl or 2-6 diethyl or p-butyl IDA and 0.2 mg of $\text{Cl}_2 \text{ Sn } 2\text{H}_2\text{O}$. All preparations are made under nitrogen, in sterile conditions, and can be labelled with the required amount of $^{99m}\text{TcO}_4$.

nitrogen, in sterile conditions, and can be labelled with the required amount of $^{99m}\text{TcO}_4$. Once labelled, the pharmaceutical is injected intravenously and its passage through the hepatobiliary system is followed in a gamma camera, where activity can be seen in the duodenum after ten minutes.

The dimethyl and diethyl IDA have similar behaviour, reaching the second one a better concentration in the biliary tree.

In case of icteric patients it is advisable to use the p-butyl IDA.

Quality control of the labelled compounds was done by means of chromatography, electrophoresis and biological distribution in CFW mice.

The clinical evaluation was made with satisfactory results.

Key words: ^{99m}TC , methyl-IDA; diethyl p-IDA; p-butyl-IDA.

(Rev. Biol. Med. Nucl. 13: 11-15, 1981).

Ante la selección de un radiofármaco para el sistema hepatobiliar resulta conveniente señalar las funciones que cumple la vesícula:

- a) Concentración y almacenaje de bilis.

- b) Descarga de bilis en el duodeno en respuesta a un estímulo apropiado.

En base a lo cual las características que debe reunir un agente hepatobiliar serían:

- 1) Una rápida extracción del plasma por la célula poligonal del hígado.
- 2) Una alta concentración biliar.

(1) Dirección de Radioisótopos y Radiaciones, Centro Atómico Ezeiza, CNEA, Argentina.

(2) Recibido octubre 1, 1980. Aprobado febrero 23, 1981.

3) Una mínima concentración en el tracto urinario.

En cuanto a sus características estructurales es conveniente que:

a) Su peso molecular oscile entre 300 y 1000. El aumento de peso molecular mejora la excreción biliar dentro de dicho rango.

b) El compuesto tenga un grupo polar fuerte con buena solubilidad lipídica.

c) Estructuras preferentemente cíclicas colocadas en diferentes planos.

d) Finalmente es necesario un cierto grado de unión proteínica, para disminuir una rápida filtración a través de los glomerulos renales.

Hasta el momento los radiofármacos más utilizados en medicina nuclear para el sistema hepatobiliar han sido el Rosa de Bengala o la Bromosulfoftaleína marcada con I-131.

El reemplazo de los mismos con cualquier otro fármaco que a igualdad de concentración en el sistema hepatobiliar fuera fácil de marcar con Tc-99m, tendría sin duda una rápida y amplia aceptación dadas las ventajas que brindan las características físicas del Tc-99m frente al I-131.

Es así, que se han desarrollado radiofármacos bifuncionales, los cuáles tienen una parte de su molécula que sigue la vía de excreción biliar y otra que consiste en un grupo quelante responsable de la unión fuerte con el metal radiactivo en nuestro caso el Tc-99m (1, 2).

Los N-derivados del ácido iminodiacético cumplen con dichos requisitos, ya que su concentración en el sistema hepatobiliar es mayor que la del Rosa de Bengala y la Bromosulfoftaleína y pueden marcarse fácilmente con Tc-99m.

Estas características de los N-derivados del ácido iminodiacético, nos ha llevado al desarrollo de tres nuevos juegos de reactivos para el sistema hepatobiliar: el dimetil IDA; el dietil IDA y el p-butil IDA.

Desarrollo experimental

Los tres radiofármacos derivados de la lidocaína, que hemos ensayado son sintetizados a partir de la dimetil, dietil o p-butil anilina, con el alfa cloro cloruro de acetilo y el ácido imino diacético. Dicha síntesis es realizada en el laboratorio de Moléculas Marcadas de la CNEA por el Dr. Mitta quien nos provee de los compuestos ya sintetizados (4).

Después de ensayar varias formulaciones (3) con la 2,6 dimetil acetanilida del ácido iminodiacético (dimetil IDA) logramos un liofilizado de 20 mg de dimetil IDA y 0,2 mg de $\text{Cl}_2\text{Sn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Dicho liofilizado es fácilmente marcado con $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ proveniente de un generador requiriéndose una concentración de actividad de 1 a 3 mCi/ml. El liofilizado tiene la posibilidad de ser marcado hasta con 30 mCi. Después de marcado se agita durante 3 a 4 minutos, después de lo cual el preparado se encuentra en condiciones de ser inyectado.

Se ha desarrollado también un liofilizado del dietil IDA que consta de 20 mg de Dietil IDA y 0,2 mg de $\text{Cl}_2\text{Sn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, también fácil de marcar con 1-5 mCi/ml. de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$. Después de marcado se agita durante 3 a 4 minutos y posteriormente puede ser inyectado. El Dietil IDA es un sustituto del dimetil IDA teniendo la ventaja de una mayor acumulación del radiofármaco en todo el sistema hepatobiliar.

Por último en los casos en que el paciente tiene un alto tenor de bilirrubina en sangre (mayor de 9,7 mg/dl) se ha comprobado que el p-butil IDA es más eficaz debido a su mayor, aunque más lenta, captación hepática (aún en hígado hipofuncionantes); su mayor tiempo de máxima, tm, (intervalo en el cual se alcanza la máxima actividad en el órgano), como así mismo su menor excreción urinaria.

En base a esta información se ha desarrollado también un liofilizado de 20 mg. de p-butil IDA y 0,2 mg de $\text{Cl}_2\text{Sn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, fácilmente marcabable con 1-5 mCi/ml de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$. Luego se agita 3 a 4 minutos y se inyecta.

Suele señalarse que la resolución de los centellogramas es mejor cuando el paciente se encuentra en ayunas.

Preparación de los N-Derivados del ácido iminodiacético

a) Purgar durante 20 minutos 200 ml de agua bidestilada con N_2 .

b) Pesar 2 gramos de dimetil IDA o dietil IDA o p-butil IDA, disolverlos en 30 ml de solución de HONa 0,25 N nitrogenada, controlar el pH que debe estar entre 6 y 6,5.

c) Pesar 20 mg de $\text{Cl}_2\text{Sn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, disolverlos con 1 ml de ClH 0,2 N nitrogenado y llevarlos a 10 ml de volumen final con agua bidestilada nitrogenada.

d) Agregar burbujeo constante de N_2 y agitación mecánica los 10 ml de la solución preparada en b).

e) Llevar a 200 ml. de volumen final con H_2O , manteniendo burbujeo constante de N_2 .

f) Fraccionar en ambiente estéril y nitrogenado pasando la solución por filtro de 0,2 en alícuotas de 2 ml. en frascos adecuados.

g) Liofilizar y cerrar bajo atmósfera de nitrógeno.

Controles químicos

Se probaron cromatografías ascendentes sobre diversos soportes y con diversos solventes (5).

Soportes ITLC (SG); Fibra de vidrio, Whatman 3 MM, Whatman Silicagel; Whatman N° 1.

Solventes: Metil Etil Cetona, Solución Fisiológica; Mezcla de Butanol Metanol Agua (4:1:1); Bicarbonato de sodio 1 %.

La cromatografía de elección fue:

Soporte: Whatman N° 1

Solvente MEC y CO^3HNa 0,1 %

Los Rf. son:

En MEC Compuesto Rf = 0
 $^{99m}TcO_4^-$ Rf = 1

En CO^3HNa 1 % Compuesto Rf = 1
 $^{99m}TcO_4^-$ Rf = 0.6.
 Coloide Rf = 0

La experiencia ha puesto de manifiesto que los controles cromatográficos no son reproducibles y no concuerdan unívocamente con los controles biológicos.

Por esta razón se puso a punto la técnica de electroforesis (6) con un buffer fosfato de pH 7 y molaridad 0.5 M. Se sembró el liofilizado marcado con $^{99m}TcO_4^-$ en tiras de Whatman N° 1 de 2 cm. de ancho y 36 cm.

de largo, embebidas de buffer, realizando la electroforesis de 300 V durante 2 horas.

La medición de actividad de las tiras de electroforesis fue realizada en el Paper Chromatogram Scanner LB 280 marca Berthold.

El $^{99m}TcO_4^-$ y el compuesto marcado migran con movilidades relativas respecto a la siembra de 2 y 1 respectivamente. Esta es una técnica reproducible y concordante con los controles biológicos.

Controles biológicos

Los controles biológicos (7) del Dimetil IDA fueron realizados sobre ratones CFW (aproximadamente entre 25-30 g) determinándose el por ciento de actividad en el órgano, respecto de la dosis inyectada. Se determinó en hígado, vesícula y sistema gastrointestinal a diferentes tiempos de sacrificio.

Como se puede observar en la Tabla I y en el Gráfico N° 1, hay máxima captación



TABLA I

PORCENTAJE DE DOSIS DE DIMETIL-IDA MARCADO CON $^{99m}TcO_4^-$ en HIGADO, VESÍCULA Y SISTEMA GASTROINTESTINAL A DIFERENTES TIEMPOS DE SACRIFICIO. (Ratones CFW).

Tiempo	Hígado	Vesícula	Gastrointestinal
1'	54.8 ± 4.6 %	3.33 ± 0.33 %	37.2 ± 2.28 %
2'	63.1 ± 3.6 %	6.2 ± 2.9 %	36.5 ± 5.7 %
3'	57.6 ± 0.86 %	6.77 ± 0.66 %	36.5 ± 3.5 %
4'	53 ± 2.7 %	8.16 ± 1.1 %	37.5 ± 2.8 %
5'	36.3 ± 0.33 %	13.55 ± 0.5 %	45.5 ± 1.9 %
7' 1/2	32.7 ± 2.8 %	10.4 ± 2.9 %	56.8 ± 7.5 %
10'	15.4 ± 0.14 %	5.04 ± 0.64 %	79.5 ± 0.7 %
20'	6.2 ± 2.1 %	7.06 ± 2 %	86.7 ± 3.4 %
30'	4.8 ± 0.6 %	3.07 ± 0.25 %	80.99 ± 1.0 %
60'	1.36 ± 0.08 %	3.1 ± 0.08 %	88.2 ± 4.4 %

de actividad a los 2 minutos en hígado y a los 5 min. en vesícula comenzando a evidenciarse una captación considerable en el sistema gastrointestinal a los 10 min. Finalmente a los 30 min. podemos decir que la actividad se ha limpiado totalmente del hí-

gado y sigue siendo considerable en vesícula.

Tal como se pueden deducir del gráfico es posible estudiar morfología y funcionamiento del sistema hepatobiliar. La distribución biológica para el Dietil IDA se consigna en las Tablas 2 y 3.

TABLA II

PORCENTAJE DE DOSIS DE DIETIL-IDA MARCADO CON $^{99m}\text{TcO}_4$ EN HIGADO, VESÍCULA Y SISTEMA GASTROINTESTINAL (Ratones CFW).

Tiempo	Hígado	Vesícula	Gastrointestinal
15'	8.2 $\pm$ 1.7 %	6.3 $\pm$ 1.2 %	57.6 % $\pm$ 2.1 %
30'	4.9 $\pm$ 1.2 %	4.1 $\pm$ 0.6 %	87.6 % $\pm$ 1.5 %
45'	3.0 $\pm$ 2.1 %	5.1 $\pm$ 0.7 %	90 % $\pm$ 3.2 %

TABLA III

PORCENTAJE DE DOSIS DE p-BUTIL-IDA MARCADO CON $^{99m}\text{TcO}_4$ EN HIGADO, VESÍCULA Y SISTEMA GASTROINTESTINAL (Ratones CFW).

Tiempo	Hígado	Vesícula	Gastrointestinal
15'	24.5 $\pm$ 2.8 %	0.83 $\pm$ 0.4 %	63 % $\pm$ 5.8 %
30"	13.3 $\pm$ 5.1 %	2.4 $\pm$ 1.09 %	84 % $\pm$ 9.4 %
60"	5.77 $\pm$ 1.5 %	3.55 $\pm$ 1.9 %	86 % $\pm$ 13.2 %

COMPARACION A LOS 30 MINUTOS DE LOS TRES DERIVADOS DIMETIL, DIETIL y p-BUTIL IDA (Ratones CFW).

	Dimetil-Ida	Dietil-Ida	p-Butil-Ida
Hígado	4.8 $\pm$ 0.6	4.9 $\pm$ 1.2	13.8 $\pm$ 5.1
Vesícula	3.07 $\pm$ 1.25	4.1 $\pm$ 1.6	2.4 $\pm$ 1.09
Gastrointestinal	80.99 $\pm$ 10.1	87.6 $\pm$ 10.5	84 $\pm$ 9.4

Las pruebas en seres humanos fueron realizadas en la gamma cámara de servicio de Medicina Nuclear del Hospital de Niños de la Ciudad de Buenos Aires.

Las fotos consignadas a continuación corresponden a los tres casos que se detallan:

1) Centellografía del sistema hepatobiliar de una niña de 4 años y medio, tomada a los 35 min. post-inyección del dimetil-IDA marcado con 2 mCi $^{99m}\text{TcO}_4$ -, donde se observa una doble vesícula.

2) Centellografía del sistema hepatobiliar de una niña de 2 años destacándose una gran zona fría debida a un tumor hepático. Estudio realizado a los 10 minutos post-inyección.

3) Centellografía del sistema hepatobiliar de una niña de 5 años, 35 minutos post-inyección: Se observa que a la salida de la

vesícula hay una zona fría que ocupa un volumen muy grande lo que determina la visualización de una vesícula agrandada y un hígado pequeño (posible rabdosarcoma embrionario). Se pretende descartar metástasis.

Cabe señalar que estas fotografías nos muestran por supuesto la imagen estática a los tiempos consignados pero que en todos los casos se siguió a través de la imagen en el osciloscopio la dinámica del proceso de captación y pasaje del radiofármaco a través del sistema hepatobiliar.

Observaciones

Los juegos liofilizados de dimetil, dietil y p-butil IDA, se hallan ya en producción de rutina.

La División Controles realizó los contro-

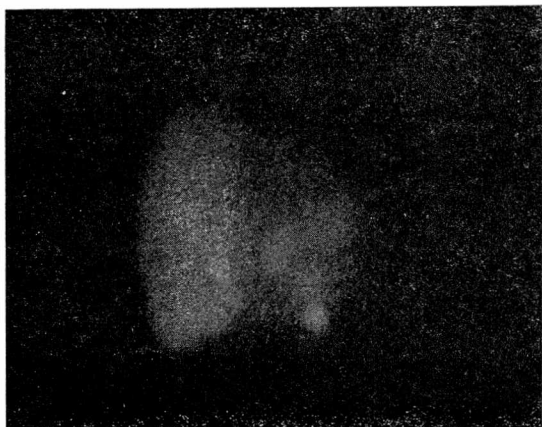
les de toxicidad y pirógenos y estabilidad de los reactivos y de los liofilizados.

Los valores de la toxicidad son expresados como DL_{50} :

—Dimetil-IDA: 168 mg/kg.

—Dietil-IDA: 240 mg/kg.

—p-Butil-IDA: 100 mg/kg.



Cabe señalar que además de la toxicidad hay que tener en cuenta que los tres N-derivados del ácido iminodiacético son como lo hemos señalado derivados de la lidocaína, conservando el grupo amido responsable de las propiedades anestésicas y antifibrilantes de la lidocaína.

Es así que nos vemos en la obligación de puntualizar que la concentración de lidocaína usada como anestésico es de: 2 mg/ml, inyectable, y la dosis usada como antifibrilante es de: 2 mg/kg de peso, inyectable (8).

Estos datos son relevantes sobre todo en el caso de pacientes de temprana edad o lactantes.

En dichos casos hay que tener en cuenta que el liofilizado provee 20 mg de la droga.

Se han hecho ensayos que nos llevan a la conclusión que aún 4 mg de la droga pueden ser marcados con 5 mCi de TcO_4^- , por lo tanto se puede utilizar la quinta parte del liofilizado sin que esto afecte al diagnóstico y en cambio, en el caso de lactantes, nos permite trabajar por debajo de dosis inconvenientes.

Finalmente se ha optado por un control químico electroforético del liofilizado y un control biológico que implica el sacrificio de ratones CFW a los 30,30 y 60 minutos, según se trate de Dimetil, Dietil o p-butil IDA respectivamente.

Conclusiones

De los tres productos se ha resuelto poner en producción el Dietil y el p-Butil IDA.

Las razones, como ya lo hemos señalado, se deben a que el Dietil IDA presenta una mayor captación hepático biliar frente a la del dimetil IDA; siendo los dos aplicables a las mismas patologías lógicamente la mayor demanda es de dietil IDA y el p-butil es el derivado de elección en los casos de ictericia (tenor de bilirrubina en sangre mayor de 9,7 mg/dl). La estabilidad del liofilizado se puede asegurar hasta tres meses. El reactivo ya marcado es estable hasta tres horas posteriores a su marcación.

Se puede concluir que los tres nuevos liofilizados puestos en rutina de producción: dimetil, dietil y p-butil IDA se pueden marcar fácilmente con $^{99m}TcO_4^-$ y su uso da resultados satisfactorios para el diagnóstico centellográfico del sistema hepatobiliar, reemplazando con ventaja al Rosa de Bengala y a la Bromosulfoftaleína marcados con I-131.

Bibliografía

1. LOBERG, M. D. y FIELDS, A. T.: Int. J. Appl. Rad. Isot. Vol. 29 pp. 167-173. 1978.
2. WISTOW, B. W.; SUBRAMANTAN, G.; VAN HEERTUM, R. L. y Col.: J. Nucl. Med 18: 455, 1977.
3. SEWATKAR, A. B. y NORONHA, O. P. D.: Nucl. Med. Bd XV/Heft 6: 290, 1976.
4. ARCIPRETE, C.; GROSS, E. G. y MITTA, A.E.A.: Acta Bioquim. Clin. Latinoamericana, (en prensa).
5. LOBERG, M. D.; COOPER, M.; HARVEY, E. y Col.: J. Nucl. Med, 17: 633, 1976.
6. LOBERG, M. D. y FIELDS, A. T.: Int. J. Appl. Rad. Isot. Vol. 28, pp. 637, 1977.
7. SUBRAMANIAN, G.; CHANDER, J.; SINGH, M. V. y Col.: Nucl. Med. Band. XVI/Heft 2: 83, 1977.
8. The Merck Index. Seventh Edition 1960, Ed. Americana, New Jersey.