

Investigaciones Radiofarmacológicas de un Nuevo Agente para la Centellografía Renal *

E. Silvia VERDERA ^{a **}, Carlos HEUGUEROT ^b, Juan J. LOPEZ ^{a,b}, Roberto TAGLE ^c,
Fernando GARCIA ^{a,b}, Elsa LEON ^a, Patricia OLIVER ^a, James KRONAUGE ^d y Alan JONES ^d

^a Departamento de Radiofarmacia, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Almirante Harwood 6199, 11500 Montevideo, Uruguay; ^b Centro de Medicina Nuclear, Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay; ^c Laboratorio de Técnicas Nucleares, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay; ^d Department of Radiology, Harvard Medical School and Brigham & Women's Hospital, Boston, MA. USA.

RESUMEN. ^{99m}Tc(I)hexakis(carboximetilisonitrilo), ^{99m}Tc-CAMI, obtenido con P.R.Q. > 95%, se evaluó en diferentes modelos experimentales. Estudios de biodistribución en ratón mostraron alta y rápida depuración renal (>80% a 20 min), similar al ^{99m}Tc-MAG₃, radiofármaco rutinario actual. Autorradiografías de riñón de ratas no evidenciaron captación preferencial del compuesto por las estructuras renales médula o corteza, confirmándose el rápido tránsito renal. Estudios centellográficos en perros normales (n = 5), mostraron que la curva renográfica se aproxima morfológicamente a la obtenida con ^{99m}Tc-MAG₃, con parámetros cuantitativos comparables. Las imágenes seriocentellográficas indican menor acumulación hepática con mejor definición de las imágenes renales y ureterales. Análisis de muestras de orina de perros inyectados con el complejo no evidencia metabolización del producto. Las investigaciones realizadas permiten inferir que el ^{99m}Tc-CAMI exhibe apropiadas propiedades biológicas como agente diagnóstico de funcionalidad renal.

SUMMARY. "Radiopharmacological Research of a New Renal Imaging Agent". ^{99m}Tc(I) hexakis(carboxymethylisocyanide), ^{99m}Tc-CAMI, obtained with R.Q.P. > 95%, was studied in experimental models. Mice biodistribution showed high and rapidly renal clearance (> 80% at 20 min) similar to the commercial renal agent ^{99m}Tc-MAG₃. Rat kidney autoradiography confirm these behaviour and demonstrated no significative differences in renal structure radioactivity uptake levels. Scintigraphic studies in normal dogs (n = 5) showed that the new product yields a renographic curve similar to that of ^{99m}Tc-MAG₃. Quantitative analysis of renographic parameters confirm the similar behaviour of the two compounds. The scintigraphic images of ^{99m}Tc-CAMI show less hepatic uptake compared with ^{99m}Tc-MAG₃ so a better definition of the kidneys and ureters is possible. No signs of metabolization were observed in RP-HPLC urine analysis. These data show that ^{99m}Tc-CAMI exhibits appropriate biological properties for a renal function imaging agent.

* Trabajo presentado en el Primer Congreso de la Federación Farmacéutica Sudamericana y II Congreso de Ciencias Farmacéuticas del Cono Sur, Montevideo, Uruguay, 4-7 de noviembre de 1993.

** Autor a quien debe dirigirse la correspondencia.

PALABRAS CLAVE: isonitrilos, ^{99m}Tc, renal.

KEY WORDS: Isonitrile, ^{99m}Tc, renal.

INTRODUCCION

Diferentes compuestos marcados con ^{99m}Tc han sido propuestos como alternativa radiodiagnóstica del o-iodo-hipurato de sodio para evaluación renal, siendo el ^{99m}Tc -mercaptoacetilglicilglicilglicina (^{99m}Tc -MAG₃) el más apropiado y útil a la fecha, de uso rutinario clínico ¹⁻³.

Paralelamente, se ha puesto en evidencia que los complejos de hexaquis isonitrilos de tecnecio(I) poseen un átomo central de Tc termodinámicamente estable ^{4,5}. La variación de los sustituyentes del ligando isonitrilo posibilitan el diseño del comportamiento biológico de la molécula. En particular, la incorporación de un grupo éster en el isonitrilo mantiene la carga neutra del ligando y produce un complejo catiónico hidrofóbico cuando se coordina con el tecnecio. Hidrólisis de los grupos éster da lugar a una molécula hidrofílica y simétrica con carga negativa.

El estudio radiofarmacológico del complejo pentaaniónico $^{99m}\text{Tc}(\text{I})\text{hexaquis}(\text{carboximetilisonitrilo})$, $^{99m}\text{Tc}(\text{CNCH}_2\text{COO})_6$ ^{1,5} (^{99m}Tc -CAMI), es el objetivo del presente trabajo.

MATERIAL Y METODOS

Síntesis y Análisis de los Productos Marcados

El carboetoximetilisonitrilo fue sintetizado y caracterizado en el *Department of Radiology, Harvard Medical School, Brigham and Women's Hospital*, Boston Massachusetts, USA.

La marcación con tecnecio y posterior hidrólisis para obtener ^{99m}Tc -CAMI fue realizada por método descrito previamente, así como el control de pureza radioquímica por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) post-filtración por membrana de 0,22 micras ⁶. Cromatografía en papel fue rutinariamente realizada a fin de cuantificar la presencia de formas hidrolizadas-reducidas del ^{99m}Tc que no fueran eluidas de la columna ⁷.

Se determinó el porcentaje de actividad recuperado luego del pasaje de las muestras a través de la columna y la pureza radioquímica del ^{99m}Tc -CAMI, a 25 °C, durante 24 horas .

Con fines comparativos se preparó y controló ^{99m}Tc -DTPA y ^{99m}Tc -MAG₃ a partir de juegos de reactivos liofilizados ^{8,9}, los cuales presentan demostrada filtración glomerular y tubular, respectivamente.

Evaluación en animales de laboratorio

Biodistribución en ratones

Ratones endocriados (25-30 g peso corporal), fueron inyectados con 0,1 ml/0,10 mCi de las moléculas marcadas (P.R.Q. > 95%) vía i.v. en cola. A diferentes tiempos post-administración se procedió a su sacrificio por tracción cervical y extracción de órganos y muestras de sangre, músculo y hueso. La radiactividad en los diferentes órganos y tejidos fue determinada en cámara de ionización y/o detector de NaI(Tl), calculándose el porcentaje de dosis inyectada.

Macroautorradiografía de riñón en rata

A ratas Wistar (380-430 g de peso corporal) se les administró 0,50 mCi de ^{99m}Tc -CAMI (P.R.Q. > 95%) vía i.v. en cola. A tiempos de distribución de 30 seg, 1, 2 y 5 min, se sacrificaron los animales y se procedió a la extracción de los riñones, realizándose cortes de 20 micras en criomicrotomo con posterior exposición a placas tipo rayos X. Una vez reveladas se evaluó la distribución de radiactividad en las diferentes estructuras renales por densitometría.

Estudios radiofarmacológicos en perros

La cinética del ^{99m}Tc -CAMI fue estudiada en 5 perros machos normales (15 a 20 Kg), en ayuno no menor de 3 horas, anestesiados con tiopental sódico (300 mg/kilo de peso).

Una dosis de 0,10 mCi/Kg en no más de 0,3 ml de solución se administró en cada caso en forma de bolo, a través de una llave de 3 vías conectada a una vena periférica, empujando con 5 ml de suero fisiológico. La dosis efectiva fue calculada por medida de la jeringa antes y después de la administración.

Los estudios fueron obtenidos en una cámara de centelleo de campo grande, 400 mm de diámetro del detector, con cristal de 1/2 pulgada de espesor y 37 tubos fotomultiplicadores (GE 400T, General Electric Corporation), conectada en línea a un computador (ADAC 3300, ADAC Laboratories) y con detector equipado con un colimador de alta resolución para bajas energías. Colocados los perros en posición decúbito ventral, se ubicó el detector sobre la región dorsal, abarcando el campo los sectores torácicos, lumbares y pelvianos.

Los estudios se realizaron en dos fases. En la primera se evaluó la llegada del bolo radiactivo, obteniéndose imágenes dinámicas analógicas cada 2,5 seg e imágenes digitales cada 1 seg durante el primer minuto. En la segunda fase renográfica se obtuvieron imágenes analógicas y digitales cada 10 seg durante 30 minutos. Regiones de interés (ROIs) fueron establecidas para corazón, riñón derecho e izquierdo, vejiga, hígado y background en semiluna infrarenal. Se generaron, normalizaron y corrigieron por decaimiento las curvas de actividad/tiempo correspondientes, empleándose para el cálculo de parámetros cuantitativos renográficos. Se calculó el tiempo medio de tránsito renal (MRTT) usando deconvolución de las curvas renográficas previamente tratadas con filtros pasa bajo.

El comportamiento de ^{99m}Tc -CAMI, ^{99m}Tc -DTPA y ^{99m}Tc -MAG₃ fue evaluado en un mismo animal, a fin de evitar diferencias intraespecíficas, con un lapso de 72 horas entre cada estudio.

Muestras de orina de perros inyectados con ^{99m}Tc -CAMI fueron analizadas por RP-HPLC.

RESULTADOS

Las moléculas marcadas presentaron P.R.Q. > 95% en todos los casos; para el ^{99m}Tc -CAMI no varió por neutralización y almacenamiento 24 horas a 25 °C. La radiactividad recuperada de la columna de HPLC fue del orden del 100%, en tanto la retención por filtro de los productos de reacción fue <10%.

Los resultados de biodistribución en ratones se muestran en la Fig. 1. Los estudios por autorradiografía evidenciaron valores comparables de radiactividad en médula y corteza de riñón de rata en todos los tiempos estudiados (Fig. 2).

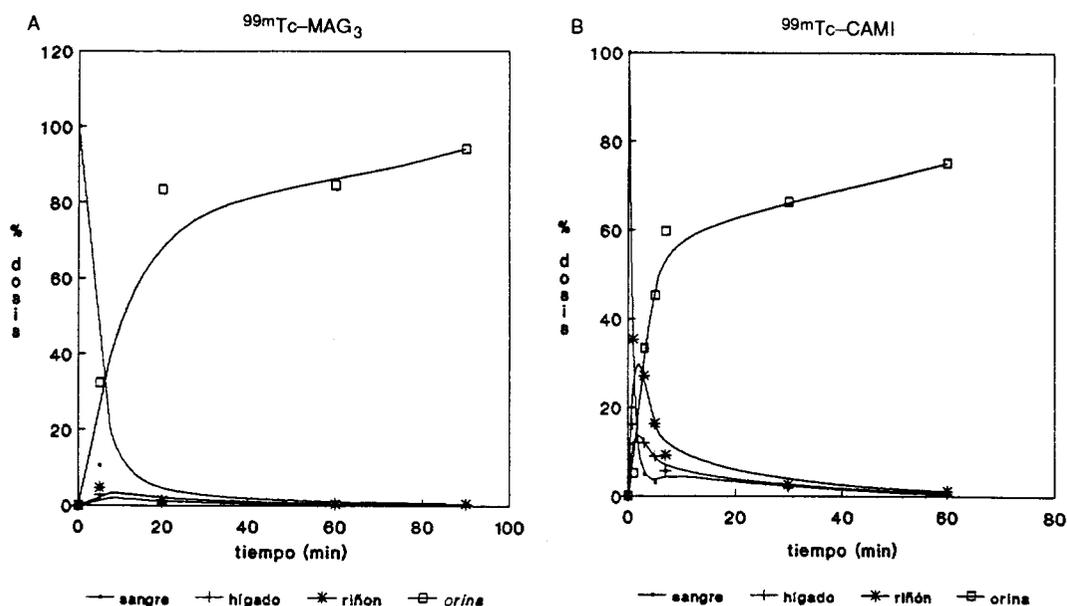


Figura 1. Biodistribución en ratones del ^{99m}Tc -CAMI (A) y ^{99m}Tc -MAG₃ (B). Cada punto representa el valor medio de no menos de 3 animales.

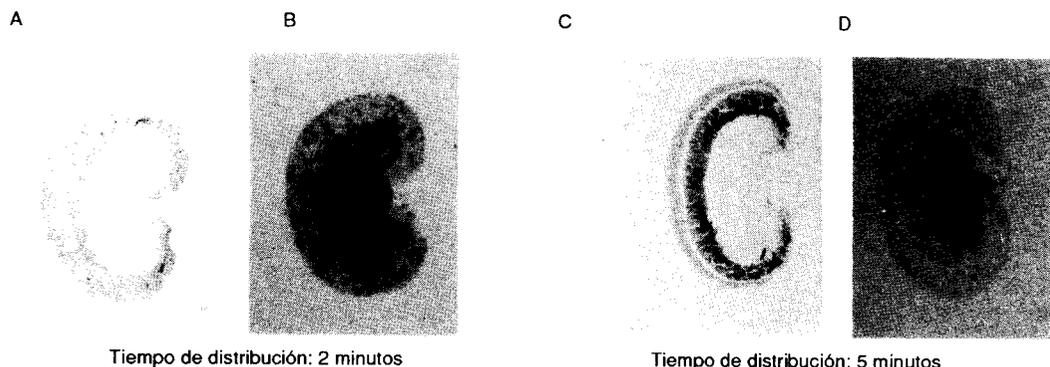


Figura 2. Cortes (A y C) y autorradiografías (B y D) de riñón de rata inyectada con ^{99m}Tc -CAMI.

Los estudios en perro mostraron que el ^{99m}Tc -CAMI presenta una curva renográfica (Fig. 3A), que se aproxima morfológicamente a la obtenida con ^{99m}Tc -MAG₃. En el tiempo vascular, luego del pico de llegada del bolo radioactivo, rápidamente el producto es tomado por el parénquima renal, iniciándose precozmente la fase parenquimatosa (Fig. 3B). La Tabla 1 muestra los parámetros renográficos calculados. Los estudios comparativos efectuados entre el ^{99m}Tc -CAMI, ^{99m}Tc -MAG₃ y ^{99m}Tc -DTPA mostraron que, aplicada la técnica de deconvolución, las curvas obtenidas se ajustan a patrones similares en los dos primeros casos (concavidad, posición del punto de inflexión), a diferencia de la del ^{99m}Tc -DTPA. Sin embargo la curva del ^{99m}Tc -CAMI muestra dos componentes temporales en la fase de eliminación. La diferencia relativa en los MRTT entre el ^{99m}Tc -CAMI y ^{99m}Tc -MAG₃ fue de 0,15 y entre el ^{99m}Tc -CAMI y ^{99m}Tc -DTPA fue de -1,24.

La RP-HPLC de muestras de orina de perro mostró idéntico perfil y tiempo de retención que el ^{99m}Tc -CAMI.

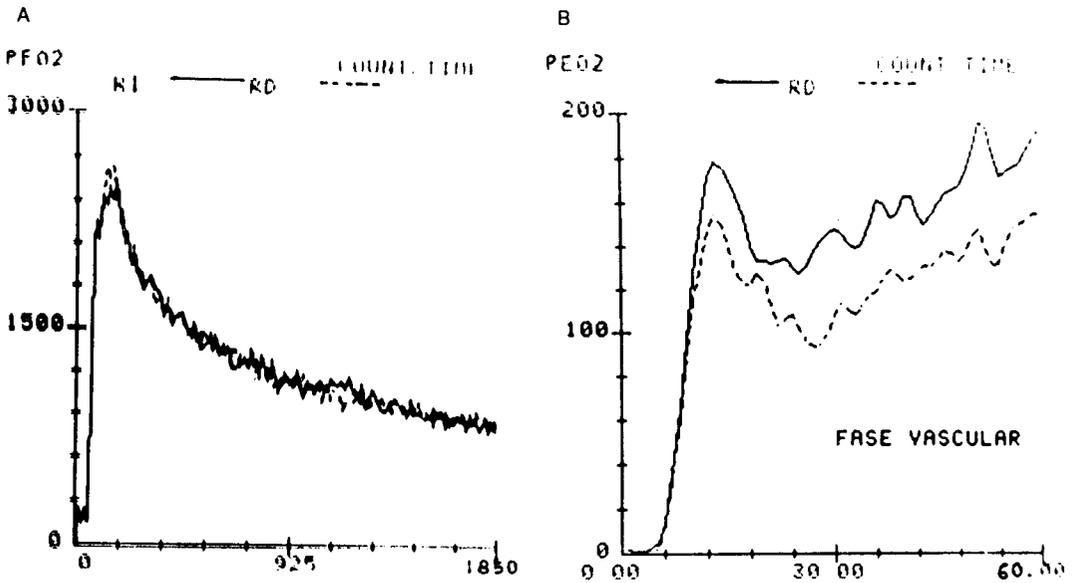


Figura 3. ^{99m}Tc-CAMI: curva renográfica (A) y fase vascular (B) de estudio centellográfico representativo realizado en perro.

riñón:	^{99m} Tc-CAMI*		^{99m} Tc-MAG3#	
	derecho	izquierdo	derecho	izquierdo
T _{MAX} (seg)	150,4 ± 16,5	168,4 ± 21,8	200	200
T _{1/2} clearance (seg)	550 ± 158	564 ± 141	420	400
Riñón/Hígado (a T _{MAX})	2,45 ± 0,32	2,19 ± 0,55	2,59	2,01
Riñón/Hígado (a 30 min)	2,10 ± 0,28	2,11 ± 0,66	1,00	0,70
Residual (% de Max a 30 min)	21,0 ± 5,0	23,0 ± 6,0	19,0	17,0
Riñón/BG (30 min PI)	12,0 ± 6,1	14,0 ± 3,4	8,9	7,1
Riñón/BG (a T _{MAX})	5,5 ± 2,3	5,3 ± 2,1	2,1	1,8
Riñón/Corazón (30 min PI)	2,03 ± 0,63	1,81 ± 0,42	3,04	2,9
Riñón/Corazón (a T _{MAX})	1,24 ± 0,31	1,17 ± 0,19	2,58	2,25

Tabla 1. Parámetros renográficos calculados * promedio ± d.s., (n = 5), # promedio ± d.s., (n = 2).

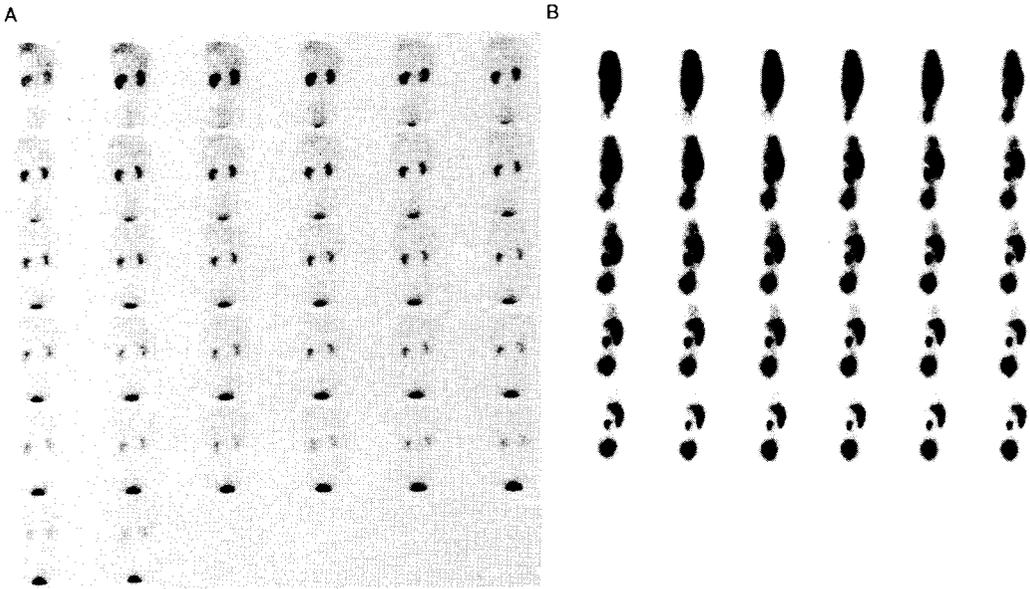


Figura 4. Imágenes seriocentellográficas de estudio analógico basal en perro con ^{99m}Tc -CAMI (A) y ^{99m}Tc -MAG₃ (B).

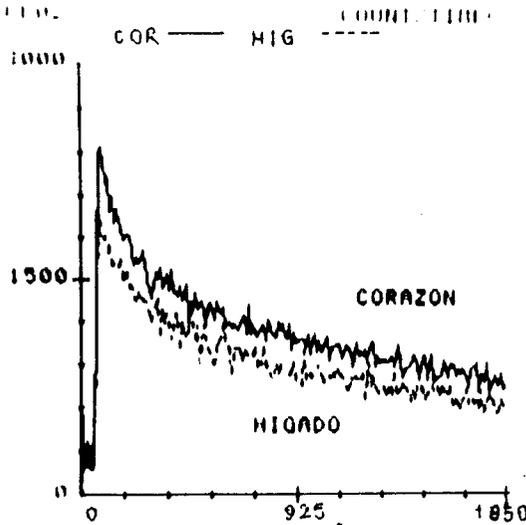


Figura 5. Curva de actividad/tiempo en área cardíaca y hepática de estudio representativo en perro con ^{99m}Tc -CAMI.

DISCUSION

Estudios analíticos *in vitro* y radiofarmacológicos *in vivo* evidencian que el ^{99m}Tc -CAMI es un compuesto estable que presenta características biológicas similares al ^{99m}Tc -MAG₃ en los modelos estudiados, sin captación preferencial por médula o corteza renal. Su excreción renal se ajusta a un modelo bicompartimental y guarda relación con el flujo plásmatico renal efectivo, ERPF, ya que el MRTT es similar al ^{99m}Tc -MAG₃ y significativamente menor que el del ^{99m}Tc -DTPA. A la vez, presenta menor acumulación hepática, obteniéndose mejor definición renal y ureteral respecto al ^{99m}Tc -MAG₃ (Fig. 4). Ello se evidencia al comparar las curvas del área cardíaca y

hepática (Fig. 5), donde esta última reproduce la evolución temporal de la curva cardíaca, no mostrando un componente significativo de incorporación parenquimatososa durante el tiempo de estudio.

En suma, las investigaciones realizadas apoyan la hipótesis de que el ^{99m}Tc -CAMI puede representar una alternativa diagnóstica para estudios de funcionalidad renal.

Auspicios: Comisión Sectorial de Investigaciones Científicas y PEDECIBA, Area Química.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Fritzberg, A.R., C.C. Kuni, W.C. Klingensmith, J. Stevens y W.P. Whitney (1982) *J. Nucl. Med.* **23**: 592
2. Kasina, S., A.R. Fritzberg, D. Johnson y D. Eshima (1986) *J. Med. Chem.* **29**: 1933-40
3. Fritzberg, A.R., S. Kasina, D. Eshima y D. Johnson (1986) *J. Nucl. Med.* **271**: 111-6
4. Abrams, M.J., A. Davison, A.G. Jones, C.E. Costello y H. Pang (1983) *Inorg. Chem.* **22**: 2798-800
5. Kronauge, J.F., M.A. Noska, A. Davison, B.L. Holman y A.G. Jones (1992) *J. Nucl. Med.* **33**: 1357-65
6. Verdera, E.S., J.J. López, R. Tagle, H. Balter, E. León y O. Oliver (1992) *Anais I Forum Nacional de Ciencia Tecnologia em Saude*, Caxambú, Brasil, 480-2
7. Strigman, J. y P. Richards (1974) *Sem. Nucl. Med.* **4**: 269-79
8. Mitta, E.E. y A.M. Robles, eds. (1989) "*Handbook of Radiopharmaceutical Quality Control*". Latinamerican Association of Nuclear Biology and Medicine Societies (ALASBIMN), Montevideo, págs. 58-9
9. *Mallinckrodt technical product data sheet for TechnoScan MAG₃®* Mallinckrodt Medical Inc. St. Louis, MO 63134, USA