

BR8510606

ISSN 01001-3084

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR

CNEN/SP

PREPARAÇÃO DE FIBRINOGENIO -^{99m}Tc

Maria Aparecida T. Marcílio de Almeida e Constância Pagano Gonçalves da Silva

PUBLICAÇÃO IPEN 62
IPEN - Pub - 62

MARÇO/1984

ISSN 0101-3084

PUBLICAÇÃO IPEN 62
IPEN - Pub - 32

MARÇO/1984

PREPARAÇÃO DE FIBRINOGENIO --^{99m}Tc

Maria Aparecida T. Marcílio de Almeida e Constância Pagano Gonçalves da Silva

DEPARTAMENTO DE PROCESSAMENTO
TP

CNEN/SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
SÃO PAULO - BRASIL

Serie PUBLICAÇÃO IPEN

INIS Categories and Descriptors

B13

C21

FIBRINOGEN

LABELLING

NUCLEAR MEDICINE

PROTEINS

TECHNETIUM 99

Recebida em Dezembro de 1982.

Aprovada para publicação em Junho de 1983.

Nota: A redação, ortografia, conceitos e revisão final são de responsabilidade dos Autores.

PREPARAÇÃO DE FIBRINOGENIO - ^{99m}Tc

Maria Aparecida T. Marcílio de Almeida e Constância Pagano Gonçalves da Silva

RESUMO

Apresenta-se um método simples para marcação de fibrinogênio com ^{99m}Tc utilizando-se cloreto estanozo como redutor do ion $^{99m}\text{TcO}_4^-$.

A 20 mg de fibrinogênio dissolvidos em 2 ml de solução tampão de carbonato de sódio pH = 8 adicionam-se 0,3 ml de solução de cloreto estanozo 0,2%. Coloca-se rapidamente a solução de pertecnetato de sódio ^{99m}Tc eluída esterilmente de um gerador Mo - Tc e deixa-se em repouso durante 30 minutos. O rendimento é de 70%, aproximadamente.

Os conjuntos de reativos liofilizados apresentam também rendimentos de 70%, ss. do portanto adequados para uso médico.

INTRODUÇÃO

A marcação de fibrinogênio com ^{131}I ou ^{125}I tem sido amplamente estudada nos últimos anos por causa do interesse na detecção radioisotópica de trombos em veias profundas^(4,5). Entretanto, o uso do fibrinogênio ^{125}I é impróprio para visualização de trombos em câmaras de cintilação, dada a energia baixa de emissão gama do ^{125}I e, no caso do ^{131}I a energia gama encontra-se acima do intervalo ideal dessas câmara, podendo gerar imagens insatisfatórias.

O ^{99m}Tc em virtude de emitir radiação gama de 140 keV é o radioisótopo ideal para marcar Fibrinogênio destinado a obtenção de imagens de trombos.

A literatura relata preparações de fibrinogênio - ^{99m}Tc em pH abaixo de 4^(6,7), entretanto, nessas condições ocorre denaturação do produto acompanhada de perda de atividade biológica.

Harving⁽²⁾ utiliza o método eletrolítico para a preparação de Fibrinogênio - ^{99m}Tc com rendimento de 70 a 80%; mais recentemente Jeghers⁽³⁾ preparou o mesmo produto a partir da redução de pertecnetato com cloreto estanozo em meio alcalino.

Neste trabalho apresenta-se um método simples de preparação de Fibrinogênio marcado com ^{99m}Tc utilizando-se cloreto estanozo como redutor do ion pertecnetato em pH alcalino e em solução tampão de carbonato de sódio.

O estudo da influência do pH do meio da reação, das massas de redutor e de Fibrinogênio, e do tempo de reação, permitiram a padronização de condições adequadas de marcação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes

1. Fibrinogênio humano liofilizado "Behring".

2. $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em solução salina, eluido de Gerador Mo – Tc IPEN – SÃO PAULO).
3. Solução de cloreto estânico em HCl 0,01N, preparada por dissolução do $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Merck.
4. Soluções Tampões:
 - a) Solução Tampão de citrato de sódio, pH = 6,0
 - b) Solução Tampão de citrato de sódio, pH = 7,0
 - c) Solução Tampão de carbonato de sódio, pH = 8,0
 - d) Solução Tampão de carbonato de sódio, pH = 8,5
 - e) Solução Tampão de carbonato de sódio, pH = 9,0
 - f) Solução Tampão de carbonato de sódio, pH = 10,0

Técnica de Marcação:

A 20 mg de fibrinogênio dissolvidos em 2 ml de solução tampão de carbonato de sódio pH = 8 foram adicionados 0,3 ml de uma solução de cloreto estânico 0,2% e rapidamente a solução salina contendo $^{99m}\text{TcO}_4^-$. A mistura foi deixada em repouso à temperatura ambiente durante 30 minutos.

Controle de Marcação:

Fizeram-se os controles de rendimentos de marcação por cromatografia em camada delgada utilizando-se sílica Gel G e precipitação do fibrinogênio marcado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; completou-se com o ensaio de afinidade biológica ao coágulo de sangue de coelho.

1. Para o cálculo da percentagem de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ livre utilizou-se o método cromatográfico com o emprego de placas de sílica Gel G e como fase móvel o solvente metanol 85%. Após o tempo de migração do solvente a placa foi dividida em segmentos de 1 cm e a radioatividade deles, medida em contador gama tipo esteira para 300 amostras, Berthold MAG 312. O Fibrinogênio marcado permanece na origem enquanto o $^{99m}\text{TcO}_4^-$ livre migra com R_f igual a 0,56⁽⁸⁾.

2. A precipitação do Fibrinogênio foi obtida colocando-se em cada frasco de reação 2 ml de uma solução aquosa de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40%. O precipitado foi separado do sobrenadante por centrifugação, em seguida foi lavado com água e medida sua radioatividade.

3. A fim de ser calculada a radioatividade incorporada ao coágulo, adicionaram-se 2 ml de solução de fibrinogênio marcado a 2 ml de sangue de coelho e deixou-se a mistura em incubação durante três horas à temperatura ambiente; separou-se o coágulo por centrifugação e retirou-se o soro. A medida da atividade do sangue total e do coágulo separadamente permitiram calcular a percentagem de Fibrinogênio marcado e incorporado ao coágulo⁽⁸⁾.

RESULTADOS

A Tabela I mostra o rendimento de marcação em função da massa de SnCl_2 mantendo-se constantes a massa de Fibrinogênio em 20 mg, pH = 8 e tempo de reação de 30 minutos. A partir de 0,5 mg até 1,0 mg o rendimento foi constante.

A Tabela II apresenta o rendimento de marcação em função da massa de fibrinogênio mantendo-se constante o pH em 8, tempo de reação 30 minutos e a massa do redutor 0,50 mg. Verificou-se que não há variação no rendimento no intervalo de 5 mg até 30 mg de fibrinogênio.

Tabela I

Influência da Quantidade do Agente Redutor no Rendimento de
 Marcação de Fibrinogênio Humano com ^{99m}Tc

SnCl ₂ · 2H ₂ O (mg)	Rendimento %
0,17	50 ± 2
0,33	60 ± 4
0,50	78 ± 4
0,67	77 ± 6
1,00	79 ± 4

Massa de Fibrinogênio = 20mg, pH = 8 e tempo de reação 30 minutos.

Tabela II

Influência da Massa do Fibrinogênio no Rendimento de Marcação de
 Fibrinogênio Humano com ^{99m}Tc

Fibrinogênio (mg)	Rendimento %
5	76 ± 2
10	76 ± 2
20	78 ± 3
30	72 ± 1

pH da reação = 8, tempo de reação 30 minutos e massa de redutor = 0,50 mg.

A Figura 1 mostra os rendimentos de marcação em função do pH determinados por: prova de afinidade biológica (curva 1) e por precipitação com solução de sulfato de amônio 40% (curva 2).

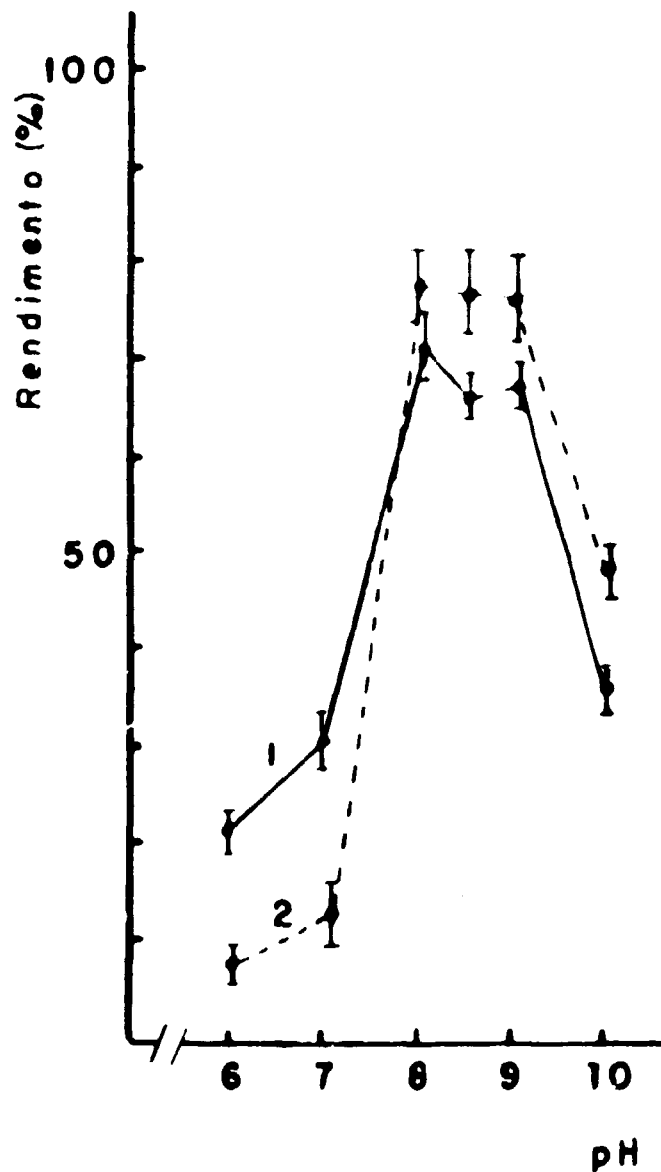


Figura 1 – Rendimento de Marcação em Função do pH, Curva 1 – Rendimento Determinado Pela Prova de Afinidade Biológica; Curva 2 – Pela Precipitação, com Solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40%.

A Figura 2 apresenta o rendimento de marcação em função do pH determinado por cromatografia em camada delgada.

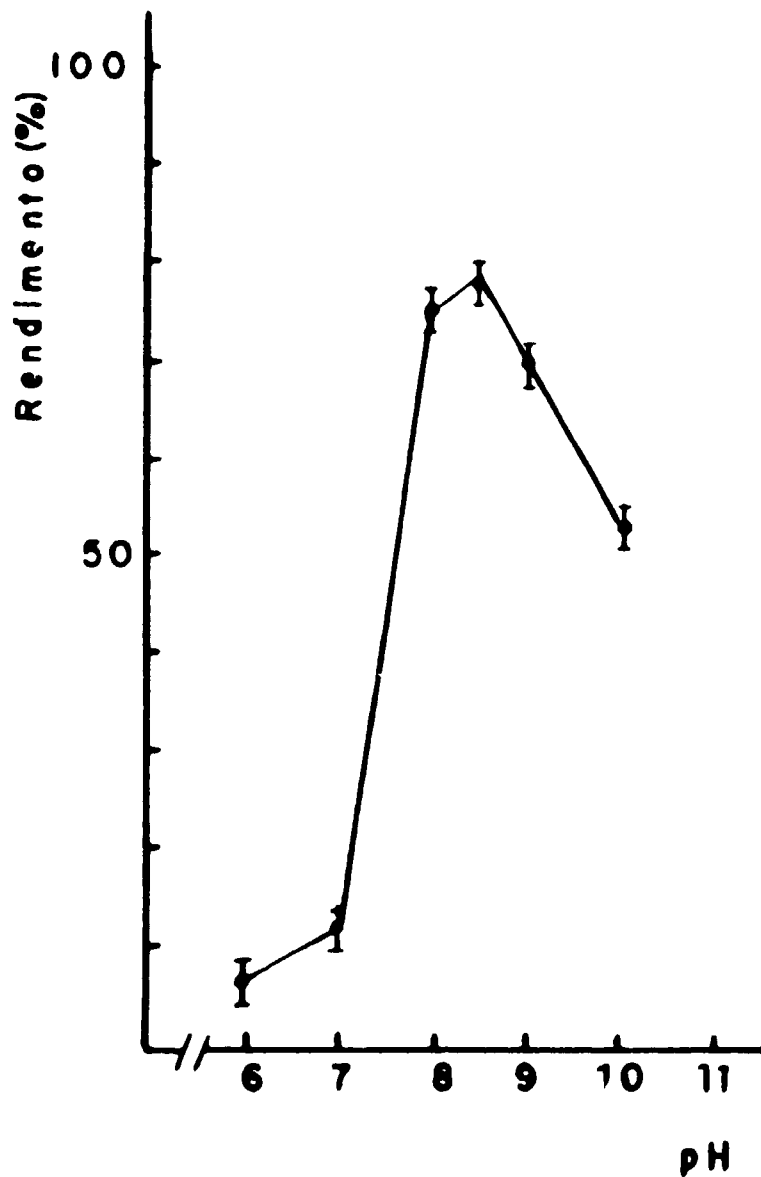


Figura 2 – Variação do Rendimento de Marcação em Função do pH. Rendimento Determinado por Cromatografia em Camada Delgada, com Silica Gel G e Metanol 85%.

A Figura 3 mostra o rendimento de marcação em função do tempo de reação.

A Tabela III apresenta o rendimento de marcação com a técnica descrita e determinada por cromatografia em camada delgada, por precipitação da proteína com solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40% e por prova biológica com sangue de coelho.

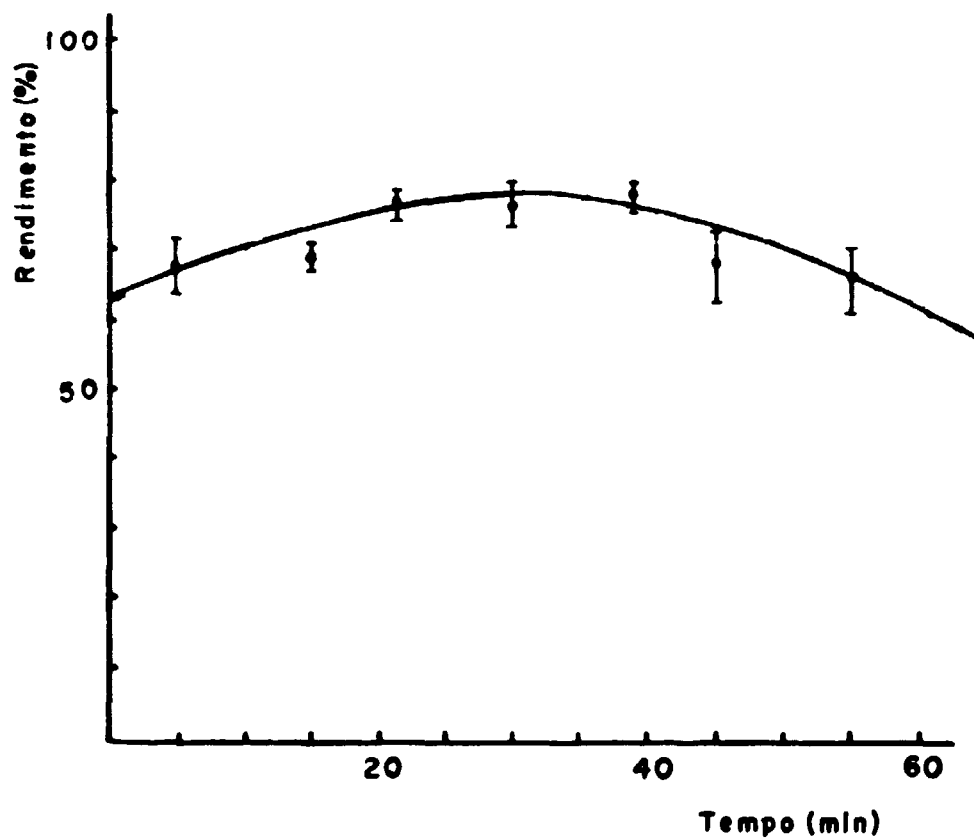


Figura 3 – Variação do Rendimento de Marcação em Função do Tempo de Reação. pH 8. Rendimento Determinado por Precipitação com Solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40%.

Tabela III

Rendimento de Marcação de Fibrinogênio $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Método Analítico	Rendimento de Marcação	Nº de Determinações
Cromatografia em camada delgada com sílica Gel G	75,5 ± 3	6
Precipitado com solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40%	78,0 ± 4	6
Prova biológica com sangue de coelho	71,0 ± 3	4

Massa de Fibrinogênio = 20 mg, pH = 8, tempo de reação 30 minutos.

PREPARAÇÃO DE CONJUNTOS DE REATIVOS LIOFILIZADOS DE FIBRINOGÊNIO HUMANO

Os conjuntos de reativos de Fibrinogênio humano foram preparados da forma seguinte: primeiramente, foi preparada uma solução contendo 20 mg/ml de Fibrinogênio humano dissolvido em solução tampão de carbonato de sódio pH = 8 contendo 1,5 mg/ml de Tween 80. A solução foi tratada com N₂ gasoso por 15 minutos. Em cada frasco a ser liofilizado foram colocados: 1 ml da solução de fibrinogênio, 0,3 ml de solução de cloreto estanoso 0,2% previamente tratada com N₂ durante 15 minutos.

A solução foi imediatamente congelada com gelo seco e em seguida liofilizada. O produto liofilizado foi submetido ao controle de marcação para cálculo do rendimento de ^{99m}Tc incorporado à molécula de Fibrinogênio. A cada um dos frascos foram adicionados 2 ml de solução salina contendo ^{99m}Tc. O rendimento de marcação meia hora após a adição do ^{99m}Tc foi de 70%, aproximadamente, utilizando-se a prova de precipitação com solução de sulfato de amônio 40%.

CONCLUSÕES

O uso de solução tampão de carbonato de sódio pH = 8 apresenta resultados satisfatórios para marcação de fibrinogênio humano com ^{99m}Tc. Este pH corresponde ao indicado na literatura para soluções injetáveis de Fibrinogênio⁽⁶⁾.

Em pH = 6 a 7 os rendimentos de marcação são baixos, da ordem de 10 a 30%.

As massas de Fibrinogênio entre 10 e 30 mg não alteram sensivelmente o rendimento de marcação; optamos pela massa de 20 mg condizente com a quantidade empregada por diferentes autores^(3,1).

A tentativa de obtenção de jogos de reativos liofilizados permitem a estocagem do produto facilitando sua marcação e emprego. A adição de Tween 80 na preparação de Fibrinogênio humano liofilizado constitui um recurso para facilitar a redissolução do produto após liofilização, evitando a formação de grumos.

O rendimento mínimo de 70% é descrito como aceitável para fibrinogênio humano marcado com ^{99m}Tc⁽⁶⁾.

ABSTRACT

A simple method of preparation of ^{99m}Tc labeled Fibrinogen using stannous chloride as reducer of ^{99m}TcO₄⁻ ion is presented. A sample of 20 mg of Fibrinogen is dissolved in 2 ml of buffer carbonate pH 8 and 0.3 ml stannous chloride 0.2% is added. A sterile solution of sodium pertechnetate ^{99m}Tc eluted from a Mo - Tc generator is immediately added. The mixture rests for 30 minutes and after this period the obtained yield is about 70%. The liohylyzed kits also presented a yield of 70%, being therefore suitable for medical applications.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA*

1. ARGUELLES, M. & PALCOS, M. C. Estudio de las condiciones de marcación de fibrinogenio humano con ^{99m}Tc. In: BIOLOGIA y medicina nuclear: 6º congreso Argentino y 3º jornada del cono Sur, Buenos Aires, 24 a 28 de novembro, de 1980.

(*) As referências bibliográficas relativas a documentos localizados pelo IPEN - CNEN/SP foram revistas e enquadradas na NB-66 da Associação Brasileira de Normas Técnicas.

2. HARWING, I.; HAWIG, S.; WELLS, L.; WELCH, M. Preparation and "in vitro" properties of ^{99m}Tc -fibrinogen. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, 27:5-13, 1976.
3. JEGHERS, O.; ABRAMOVICI, J.; JOUCKHEER, M.; ERMANS, A. A chemical method for the for the labeling of fibrinogen with ^{99m}Tc . *Eur. J. Nucl. Med.*, 3:95-100, 1978.
4. KROHN, K.; SHERMAN, L.; WELCH, M. Studies of radioiodinated fibrinogen. 1. Physicochemical properties of the ICL chloramine T and electrolytic reaction products. *Biochem. Biophys. Acta*, 285:404-13, 1972.
5. KROHN, K. & WELCH, M. Studies of radioiodinated fibrinogen. 2. Lactoperoxidase iodination of fibrinogen and model compounds. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, 25:315-18, 1974.
6. MANUAL de controles radiofarmaceuticos. Buenos Aires, Argentina, Asociaçõ Argentina de Biologia y Medicina Nuclear, Comite de Radiofarmacie, 1960. p.70.
7. WELCH, M. & KROHN, K. Critical review of radiolabeled fibrinogen. Its preparation and use. In: SUBRAMANIAN, G.; RHODES, B.; COOPER, J.; SODD, V. eds. *Radiopharmaceuticals*. New York, The Society of Nuclear Medicine, 1975. p. 499.
8. WONG, D. & MISHKIN, F. ^{99m}Tc human fibrinogen. *J. Nucl. Med.*, 16:343-47, 1975.

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Caixa Postal, 11049 – Pinheiros
CEP 05508
01000 – São Paulo – SP

Telefone: 211-6011
Endereço Telegráfico – IPENUCLEAR
Telex – (011) 23592 · IPEN · BR