Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**OTIMIZAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE PREPARAÇÃO,
MARCAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DO
GLUCARATO-^{99m}Tc PARA DIAGNÓSTICO DO INFARTO
AGUDO DO MIOCÁRDIO**

ANA CLAUDIA CAMARGO

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de Mestre
em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear –
Aplicações.**

Orientadora: Dra. Constância P. G. da Silva

**São Paulo
2007**

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**OTIMIZAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE PREPARAÇÃO,
MARCAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DO
GLUCARATO-^{99m}Tc PARA DIAGNÓSTICO DO INFARTO
AGUDO DO MIOCÁRDIO**

ANA CLAUDIA CAMARGO

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de Mestre
em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear –
Aplicações.**

Orientadora: Dra. Constância P. G. da Silva

**São Paulo
2007**

Dedico minha dissertação a Deus que me ilumina a todo instante e à minha querida família que está sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP) pela oportunidade da realização de minha dissertação.

À minha orientadora Dra. Constância P. G. da Silva pelo ensinamento, apoio e carinho.

À MSc. Marycel Figols Barboza pela oportunidade proporcionada desde minha Iniciação Científica e acima de tudo pela dedicação, apoio e ensinamento prestados durante todo este período.

Ao MSc. Jair Mengatti, gerente do Centro de Radiofarmácia por ter sido facilitador de algumas situações.

À Dra. Emiko Muramoto pela excelente dedicação e contribuição nos ensaios biológicos.

Aos docentes, pesquisadores e funcionários do Centro de Radiofarmácia do Ipen pela colaboração na realização deste trabalho, em especial ao Dr. João Alberto Osso Júnior, à Dra. Bluma L. Faintuch, à biomédica Renata M. Couto e ao técnico Edson Vieira Alves.

Ao Prof. Dr. Paulo Tucci e aos pesquisadores Ednei Luiz Antonio e Camila Picollo do Laboratório de Fisiologia e Fisiopatologia Cardíaca Profº. Sílvia Borges da UNIFESP que contribuíram com a realização e ensinamento dos ensaios cirúrgicos do infarto agudo do miocárdio em ratos.

“O coração é a fonte de todos os movimentos, pois nele a alma se liga aos órgãos.”

Aristóteles

OTIMIZAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE PREPARAÇÃO, MARCAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DO GLUCARATO-^{99m}Tc PARA DIAGNÓSTICO DO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO

Ana Claudia Camargo

RESUMO

As doenças cardiovasculares encontram-se entre as maiores causas de morbidade e mortalidade no adulto. Apesar dos avanços da medicina preventiva, o infarto agudo do miocárdio continua sendo freqüente e a dificuldade do diagnóstico diferencial é causa adicional de eventos fatais. O seu diagnóstico baseia-se na tríade: dor anginosa típica, alterações no eletrocardiograma e elevação das enzimas cardíacas no sangue. Porém, muitos casos podem cursar sem a síndrome completa, tornando de extrema importância o desenvolvimento de ensaios não invasivos para o diagnóstico precoce dos danos do miocárdio. O glucarato-^{99m}Tc é um radiofármaco de grande interesse para a aplicação em Medicina Nuclear, pois marca tecidos necrosados na fase precoce do evento. Baseado em uma revisão da literatura, este trabalho descreve a otimização dos procedimentos de preparação, liofilização, marcação e controle de qualidade do glucarato. A pureza radioquímica foi avaliada pela técnica de cromatografia ascendente em papel e os resultados de marcação com variação do tempo de reação do produto, volume e atividade de ^{99m}TcO₄⁻ apresentaram-se superiores a 97%. Em condições adequadas de temperatura (2 a 8°C), o reagente liofilizado manteve-se estável durante 12 meses. O estudo de biodistribuição em camundongos *Swiss* sadios demonstrou rápido clareamento sangüíneo, eliminação renal e baixa captação em órgãos adjacentes ao coração. O estudo cintilográfico em ratos *Wistar* sadios comprovou os resultados da biodistribuição e o estudo cintilográfico em ratas infartadas comprovou a sensibilidade do método.

OPTIMIZATION OF PREPARATION, LABELLING AND QUALITY CONTROL PROCEDURES OF ^{99m}Tc -GLUCARATE FOR THE DIAGNOSIS OF ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION

Ana Claudia Camargo

ABSTRACT

Cardiovascular diseases account for the main causes of morbidity and mortality among the adult population. Despite the advances of preventive medicine, acute myocardial infarction continues to be frequent and the difficulty of the differential diagnosis is an additional cause of fatal events. Its diagnosis is based on the triade: typical chest pain, alterations in the electrocardiogram and elevation of serum cardiac enzymes. However, many patients evolve without the complete syndrome. Therefore the development of non-invasive assays for the early detection of damaged myocardium is of extreme importance. ^{99m}Tc -glucarate is a radiopharmaceutical of great interest for application in Nuclear Medicine, because it is referred as a potential marker of necrotic tissues in the early phase of an acute coronary event. This presentation describes the optimization of preparation, lyophilization and labelling as well as quality control procedures of ^{99m}Tc -glucarate, based on former studies published in the literature. Radiochemical purity was evaluated by the ascending paper chromatography technique. Labelling efficiency as a function respectively of time of reaction, volume and activity of $^{99m}\text{TcO}_4^-$ was consistently higher than 97%. The lyophilized kit was stable during 12 months of storage. Biodistribution in healthy Swiss mice showed rapid blood clearance, renal excretion and low uptake by organs adjacent to the heart. Scintigraphic studies of injected Wistar rats confirmed the results of the biodistribution obtained by direct organ counting. Scintigraphies of infarcted female rats proved the sensitivity of the method.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Histórico da radiação nuclear	1
1.2 Utilização da radiação em Medicina Nuclear	2
1.3 Conceitos em Radiofarmácia	2
1.3.1 O radioisótopo tecnécio-99m (^{99m}Tc) – obtenção e química	3
1.3.2 O radiofármaco	5
1.3.2.1 Processo de liofilização	6
1.3.2.2 Controle de qualidade em Radiofarmácia	7
1.3.2.2.1 Teste de esterilidade	8
1.3.2.2.2 Teste de apirogenicidade	8
1.3.3 Importância do radiofármaco em Medicina Nuclear	9
1.4 Epidemiologia das síndromes coronarianas agudas no Brasil	10
1.5 Fisiopatologia e diagnóstico do infarto agudo do miocárdio	11
1.6 Medicina Nuclear aplicada à Cardiologia	13
1.6.1 Marcadores cardíacos	14
1.6.2 Glucarato- ^{99m}Tc	16
2 OBJETIVO	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Materiais	19
3.1.1 Reagentes, soluções e outros	19
3.1.2 Instalações e equipamentos	20
3.1.3 Animais	20
3.2 Métodos	21
3.2.1 Preparo e liofilização do glucarato	21
3.2.2 Marcação do reagente liofilizado com $^{99m}\text{TcO}_4^-$ para determinação da pureza radioquímica	23
3.2.3 Estudo da distribuição biológica do glucarato- ^{99m}Tc em camundongos	25

Swiss sadios	
3.2.4 Estudo da distribuição biológica do glucarato- ^{99m} Tc em ratos <i>Wistar</i> sadios	28
3.2.5 Estudo cintilográfico do glucarato- ^{99m} Tc em ratos <i>Wistar</i> sadios	28
3.2.6 Estudo cintilográfico do glucarato- ^{99m} Tc em ratas <i>Wistar</i> infartadas	29
3.2.6.1 Técnica cirúrgica do infarto agudo do miocárdio	30
3.2.7 Estudo <i>in vitro</i> da estabilidade do glucarato- ^{99m} Tc no plasma humano ..	32
3.2.8 Estudo microbiológico	33
4 RESULTADOS	34
4.1 Análise da variação do pH da solução	34
4.2 Análise da variação do volume de ^{99m} TcO ₄ ⁻	34
4.3 Análise da variação da atividade de ^{99m} TcO ₄ ⁻	35
4.4 Análise do tempo de armazenagem do reagente liofilizado de glucarato .	36
4.5 Estudo da distribuição biológica do glucarato- ^{99m} Tc em camundongos <i>Swiss</i> sadios	37
4.6 Estudo da distribuição biológica do glucarato- ^{99m} Tc em ratos <i>Wistar</i> Sadios	40
4.7 Estudo cintilográfico em ratas <i>Wistar</i> sadias	41
4.8 Estudo cintilográfico em ratas <i>Wistar</i> infartadas	42
4.9 Estudo <i>in vitro</i> da estabilidade do glucarato- ^{99m} Tc no plasma humano	43
4.10 Estudo microbiológico	44
5 DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico da radiação nuclear

Em 1896, Henri Becquerel verificou que sais de urânio emitiam radiações semelhantes aos raios-X, capazes de impressionar chapas fotográficas e de ionizar gases. Posteriormente, Pierre e Marie Curie (1898) deram ao fenômeno o nome de radioatividade e verificaram que era característico de cada elemento. Através de laboriosas pesquisas demonstraram a natureza radioativa do urânio e descobriram os elementos radioativos naturais: rádio, polônio e tório.^[1]

Após alguns anos, Rutherford e Soddy explicaram o fenômeno da radioatividade e verificaram que os átomos radioativos não são estáveis, mas transformam-se, ou seja, ao emitirem radiações, transmutam-se em outro elemento.^[1]

A desintegração radioativa ocorre por emissão de partículas alfa (α) ou beta (β), sendo que freqüentemente associada a esta, ocorre emissão de radiação gama (γ).^[1]

As emissões alfa foram detectadas por Rutherford que, posteriormente, as identificou como núcleos de átomos de hélio. As emissões beta foram analisadas por Becquerel, que demonstrou tratarem-se de elétrons com carga negativa. Rutherford provou que os raios gama eram emissões eletromagnéticas semelhantes aos raios-X.^[1]

Em 1934, o casal Frédéric e Irene Joliot Curie induziram a radioatividade artificial em elementos leves pelo bombardeio de núcleos de átomos com partículas alfa do polônio-210 (^{210}Po).^[1] A partir desta descoberta, desenvolveram-se todos os usos de radioisótopos em ciência e tecnologia.

1.2 Utilização da radiação em Medicina Nuclear

As grandes descobertas científicas do final do século XIX, notadamente da física e da química lançaram as bases para a Medicina Nuclear. Dentre os precursores mais significativos destacam-se Henri Becquerel (1852-1908), Pierre Curie (1859-1906), Marie Curie (1867-1934) e George Von Hevesy (1885-1966).

No início dos anos 40, Keston observou pela primeira vez a captação de radioisótopos do iodo pelo tecido tireoidiano. Em 1942, Seidlin realizou com sucesso o primeiro tratamento de metástases de câncer da tireóide com iodo-131 (^{131}I). Estes avanços científicos constituíram historicamente o nascimento da nova especialidade que foi denominada Medicina Nuclear.

1.3 Conceitos em Radiofarmácia

Radiofarmácia é um ramo da ciência que estuda os aspectos químicos, farmacológicos, bioquímicos, fisiológicos e disciplinas similares, que se relacionam com o desenvolvimento de substâncias marcadas com radioisótopos.

Atualmente, todos os radioisótopos de uso clínico são produzidos em reator nuclear e ciclotron. Os radioisótopos naturais, como, por exemplo o urânio, possuem meia-vida longa, emissões inadequadas para detecção, são pesados e tóxicos, por isso não tem função clínica ou diagnóstica em Medicina Nuclear.

O reator nuclear promove o bombardeio de núcleos de peso atômico médio, originando radioisótopos ricos em nêutrons que sofrem decaimento beta negativo. Esta reação denomina-se ativação por nêutrons. Uma vez que o produto filho é o mesmo elemento, os átomos radioativos e os estáveis não podem ser separados, resultando num produto de baixa atividade específica e quantidade significativa de carreador do material alvo original. A ativação por nêutrons do molibdênio-98 (^{98}Mo) foi o primeiro método usado para obter o molibdênio-99 (^{99}Mo) para o sistema gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$.^[3]

O bombardeio do urânio-235 (^{235}U) enriquecido com nêutrons resulta em produtos de fissão, entre eles, o ^{99}Mo .

1.3.1 O radioisótopo tecnécio-99m (^{99m}Tc) – obtenção e química

O tecnécio-99m (^{99m}Tc), descoberto por Segré e seus colaboradores em 1938, é o elemento radioativo reconhecido como a força motriz do diagnóstico em Medicina Nuclear, devido a uma excelente combinação de propriedades nucleares e químicas. Dois fatores contribuem para a importância da utilização do ^{99m}Tc : a disponibilidade de obtenção por gerador numa forma pura, envolvendo operações simples e seguras, e sua grande utilização para marcação de reagentes liofilizados devido sua afinidade química por vários traçadores.^[4]

O tecnécio é um metal de número atômico 43 que ocupa no quadro periódico o grupo VII B do quinto período, sendo sido posteriormente verificado que possui um comportamento químico semelhante ao dos halogênios (grupo VII A). Todos os seus isótopos conhecidos são radioativos, mas somente o ^{99m}Tc tem sido rotineiramente empregado em Medicina para investigações clínicas por apresentar características físicas apropriadas.^[1,2]

Constitui produto de desintegração do molibdênio-99 (^{99}Mo) que é produzido em reator nuclear. É um emissor de fóton gama único de energia adequada de 140keV e meia-vida curta ($T_{1/2} = 6,02\text{h}$); apresenta as vantagens de ausência de emissão de partículas ionizantes, dosimetria favorável, fácil disponibilidade e afinidade química por vários tipos de marcadores de tecidos biológicos.^[3,5]

O ^{99m}Tc é obtido a partir da eluição de um gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ por uma solução de salina (Figura 1) e apresenta-se na forma de pertecnetato de sódio ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) com estado de oxidação +7.

Figura 1: Gerador de ^{99m}Tc produzido pelo Ipen.

O sistema do gerador é simples e compreende um par em equilíbrio radioativo transiente. É constituído de uma coluna de vidro, contendo alumina como suporte, à qual se acha adsorvido o ⁹⁹Mo. Este radioisótopo pai ($T_{1/2} = 67$ horas) decai para o radioisótopo filho ^{99m}Tc ($T_{1/2} = 6,02$ horas). O ^{99m}Tc resultante do decaimento é facilmente eluído da coluna por meio de solução salina. (Figura 2)

Figura 2: Sistema do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Para marcar fármacos, o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ deve ser reduzido do estado de oxidação +7, permitindo ligações estáveis. Na prática, essa redução é obtida com o íon estanoso, devido a sua alta eficiência de redução, facilidade de manipulação e baixa toxicidade.^[4]

1.3.2 O radiofármaco

Radiofármaco é um composto radioativo usado em diagnóstico e tratamento de doenças. Em Medicina Nuclear cerca de 95% dos radiofármacos são utilizados com fins diagnósticos e apenas 5% para terapia.^[2]

O radiofármaco ideal, do ponto de vista do marcador radioativo, deve ser emissor gama com energia entre 100 e 200keV para a detecção externa. A meia-vida efetiva deve ser longa o bastante para a aplicação desejada e não deve emitir partículas ionizantes. A atividade específica deve ser alta. Em relação ao fármaco, as características ideais incluem uma biodistribuição adequada para o estudo específico e ausência de toxicidade ou efeitos secundários. Os

radiofármacos não devem sofrer dissociação *in vivo* e nem *in vitro*; devem ter fácil disponibilidade e possuírem custo razoável.

A terminologia em radiofarmácia deve ser observada com rigor. O termo "radioisótopo" refere-se apenas ao átomo radioativo. Quando um radioisótopo se combina com uma molécula química e tem propriedades de localização desejadas, é referido como um "radioquímico". O termo "radiofármaco" é reservado para materiais radioativos que preenchem os requisitos para serem administrados a pacientes. O uso em humanos requer adição, ao radioquímico, de agentes estabilizadores e de tamponamento.^[3]

O termo "livre de carreador" significa que o radioisótopo não está contaminado por núclídeos estáveis ou radioativos do mesmo elemento. A presença de material carreador pode influenciar a biodistribuição e a eficiência do processo de marcação radioativa. O termo "atividade específica" refere-se à radioatividade por unidade de massa (mCi/mg). Amostras de um radioisótopo livre de carreador têm a mais alta atividade específica.^[3]

Os reagentes liofilizados (*kits*) utilizados para marcação com ^{99m}Tc e que estão disponíveis no comércio contêm: uma quantidade apropriada do íon estano, o fármaco a ser complexado e agentes estabilizadores e tampões. Dentre os agentes estabilizadores encontra-se o ácido gentísico. Para evitar que o ar penetre nos frascos e prejudique a reação de marcação pela reoxidação do tecnécio, eles podem ser nitrogenados; preenchidos com outro gás inerte ou serem fechados em atmosfera de vácuo.^[3]

Além do potencial de oxido-redução, vários fatores devem ser considerados no processo de marcação com ^{99m}Tc , a saber: a natureza do ligante, a estequiometria da reação, a ordem de adição dos diferentes reagentes e ainda o pH da reação. O grau de estabilidade do complexo que se forma dependerá, sobretudo, do tempo e da temperatura de reação.^[4] Estes fatores são avaliados por métodos cromatográficos e por estudos de biodistribuição em animais de laboratório.

1.3.2.1 Processo de liofilização

A liofilização é definida como uma técnica que permite a desidratação de um produto previamente congelado, do qual a água é removida por sublimação

sob pressão reduzida.^[4] É realizada em três fases: congelamento inicial, secagem primária e secagem secundária.

É um método ideal para produtos ou substâncias de natureza complexa com constituintes sujeitos a alterações por calor, presença de oxigênio e umidade.

A liofilização possui vantagens para produção de fármacos.^[4] São elas:

- a baixa temperatura mantida durante todo o processo evita qualquer alteração química das substâncias sensíveis ao calor e à umidade;
- redução da perda de constituintes voláteis;
- fácil reconstituição devido à estrutura porosa resultante da saída de água, o que garante a reprodução fiel do produto original uma vez em contato com a fase líquida primitiva;
- redução na tendência de aglomeração que alguns produtos apresentam quando são dessecados por outras técnicas;
- maior estabilidade dos sólidos liofilizados que as soluções aquosas equivalentes.

Estas propriedades prolongam a vida útil do conjunto de reagentes liofilizados (*kit*), que é da ordem de seis meses; permitindo confiabilidade processual e facilidade de reconstituição.

1.3.2.2 Controle de qualidade em Radiofarmácia

O radiofármaco deve ser: estéril, apirogênico, atóxico, isotônico e possuir pH adequado. Deve estar isento de impurezas químicas, radioquímicas, radionuclídicas e de material particulado, com exceção das suspensões. Por isso, todo radiofármaco necessita passar por um controle de qualidade rigoroso para ser administrado no ser humano.

Basicamente, o controle de qualidade envolve vários testes específicos e medidas que possam garantir a pureza, a segurança biológica, a eficácia e a identidade do produto. Geralmente, os controles começam a ser realizados no início da produção, perdurando até o fim.^[2]

Os testes de controle de qualidade dividem-se em^[2]:

- testes físicos e físico-químicos que garantem as características organolépticas, determinam o pH, a isotonicidade e a força iônica, o tamanho e o número de partículas, a calibração da atividade e a pureza radionuclídica;

- testes químicos e radioquímicos que avaliam a pureza química e radioquímica e a estabilidade do produto.

A pureza radioquímica consiste na determinação da porcentagem do radionuclídeo presente na forma química de interesse. É avaliada através de técnicas cromatográficas como:

- cromatografia em papel;
- cromatografia em camada delgada;
- cromatografia em coluna;
- cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);

- Os testes biológicos determinam esterilidade, apirogenicidade, distribuição biológica e toxicidade do radiofármaco.

1.3.2.2.1 Teste de esterilidade

Esterilidade implica na ausência de microrganismos viáveis. Utiliza-se como forma de esterilizar uma solução, a membrana filtrante de 0,22µm, pois possui um diâmetro de poro menor do que os microorganismos, possibilitando sua retenção.^[3]

Os testes de esterilidade foram padronizados pelas Farmacopéias Americana (USP) e Brasileira.^[3] Meios padronizados, tais como o meio líquido de tioglicolato (*Fluid Thioglycollate Medium - FTM*) ou o meio de caseína de soja (*Tryptcase Soy Broth - TSB*), são usados para diferentes categorias de microorganismos, incluindo bactérias aeróbicas, anaeróbicas e fungos.

1.3.2.2.2 Teste de apirogenicidade

Os pirogênios são proteínas ou polissacarídeos, metabólitos de microorganismos ou outras substâncias que causam reações febris e que podem estar presentes em preparações estéreis.^[2] Ensaios para verificação da presença de pirogênio devem ser realizados antes da sua utilização.

Apirogenicidade é a ausência de pirogênios em um produto. Devido ao fato de muitos radiofármacos serem preparados no momento do uso, é impossível realizar alguns testes antes de sua administração ao paciente. Isto redobra a necessidade dos cuidados com assepsia em radiofarmácia.^[2]

O teste de pirogênio pode ser realizado através de 2 métodos:

A. Resposta febril obtida em coelhos após administração endovenosa do radiofármaco (teste do coelho):

Este é um método histórico que consiste na administração de uma amostra do radiofármaco na veia marginal da orelha de coelhos com posterior medição da variação da temperatura do animal.

B. Teste de *Limulus* (*Limulus Amebocyte Lysate* – LAL):

O princípio deste método consiste na formação de gel sólido a partir da solução de lisado de amebócito do sangue do caranguejo em forma de ferradura *Limulus Polyphemus*, em presença de pequenas quantidades de endotoxinas bacterianas ou fúngicas e substâncias pirogênicas. Este preparado se gelifica na presença de pirogênio.^[2,3]

O teste de *Limulus* é mais rápido, mais sensível e mais fácil de executar do que o teste do coelho.^[2]

1.3.3 Importância do radiofármaco em Medicina Nuclear

A riqueza da capacidade diagnóstica em Medicina Nuclear reside na diversidade dos radiofármacos disponíveis no mercado, os quais retratam a fisiologia ou a fisiopatologia do sistema em estudo. Os radiofármacos possuem a propriedade altamente desejável de não alterar as funções orgânicas porque não causam nenhum efeito farmacológico, apenas agem como traçadores.

Atualmente, uma das áreas de maior aplicação da Medicina Nuclear é o diagnóstico de doenças cardiovasculares, notadamente das síndromes coronarianas.

1.4 Epidemiologia das Síndromes Coronarianas Agudas no Brasil

A doença cardiovascular continua sendo a principal causa de morbidade e mortalidade em âmbito mundial.^[6] No Brasil, segundo dados do Datasus (2003), as doenças cardiovasculares são responsáveis por aproximadamente 85 mil óbitos anuais.^[7]

Na última década, porém, observou-se a ocorrência da redução da mortalidade em países desenvolvidos, a qual não foi acompanhada pelos países em desenvolvimento. No Brasil, dados dos SUS (Sistema Único de Saúde) mostraram que, entre 1993 e 1997, o infarto agudo do miocárdio e outras formas de doenças isquêmicas agudas e subagudas representaram 26,6% e 13,9%, respectivamente, de todas as causas de doenças isquêmicas do coração. Na década de 1990, a doença cardiovascular foi responsável por 30% de todas as causas de morte.^[6]

O infarto agudo do miocárdio (IAM) acomete, em nosso país, cerca de 100 mil pessoas por ano com 35 mil óbitos, correspondendo a um terço de todos os óbitos por doenças cardiovasculares, ocupando o segundo lugar na taxa de mortalidade, atrás apenas das doenças cérebro-vasculares. Desde o final dos anos 1960, sabe-se que a maioria destas mortes ocorre nas primeiras horas das manifestações clínicas da doença, sendo 40% a 65% na primeira hora a partir do início dos sintomas e aproximadamente 80% nas primeiras 24 horas. Assim, a maioria destas mortes acontece fora do hospital, sendo muitas delas desassistidas pelos médicos e até mesmo pelos familiares.^[7]

Nos últimos 40 anos, grandes avanços na medicina e especialmente na cardiologia, trouxeram benefícios inestimáveis aos pacientes coronariopatas.

Foi de grande importância a identificação dos fatores biológicos e dos hábitos de vida que aumentam o risco de infarto, tais como antecedentes familiares de doença coronariana, hipertensão arterial, diabetes melito, tabagismo, obesidade, dislipidemia e vida sedentária.^[6] Porém, apesar das medidas de prevenção dos fatores de risco, o infarto agudo do miocárdio continua sendo freqüente^[7] e métodos de diagnóstico precoce são fundamentais para prevenir a mortalidade.

1.5 Fisiopatologia e diagnóstico do infarto agudo do miocárdio

A lesão aterosclerótica (Figura 3) tem como origem uma alteração do endotélio vascular, podendo ser uma lesão física ou um distúrbio de função. Considera-se que a presença de um endotélio disfuncional pode desencadear o desenvolvimento da aterosclerose. Processos patológicos e hábitos de vida podem perturbar a função endotelial, destacando-se o diabetes, a hipertensão arterial, o tabagismo e a dislipidemia^[4], como já foi dito.

Através de mecanismos comuns, como o estresse oxidativo, os fatores de risco são capazes de promover um endotélio disfuncional, caracterizado por alterações de suas propriedades homeostáticas normais. Ao contrário de uma superfície predominantemente antiadesiva, antiproliferativa e anticoagulante, ganha espaço um endotélio apresentando monopólio de forças opostas de fenótipo propício para o recrutamento de células inflamatórias circulantes e a conseqüente formação de placas ateroscleróticas e de trombos.^[6] A placa espessa-se continuamente, reduzindo a luz do vaso e obstruindo a livre passagem do sangue. A diminuição crítica leva à isquemia do território irrigado pela artéria obstruída.

Figura 3: Corte de artéria coronária humana corada em vermelho. As estrias de gordura no pericárdio aparecem em vermelho vivo e a placa, rica em lipídeos, aparece em rosa.^[32]

A isquemia miocárdica é classicamente descrita como um desequilíbrio entre oferta e consumo de oxigênio. A redução da oferta ocorre por redução de fluxo ou por redução do conteúdo arterial de oxigênio.^[6]

Nas síndromes coronárias crônicas e estáveis, as lesões ateroscleróticas geram obstruções significativas ao fluxo arterial epicárdico, limitando a oferta de oxigênio a valores fixos. Com o aumento da demanda, por exemplo, durante exercícios físicos, a oferta torna-se insuficiente, gerando isquemia, clinicamente caracterizada por angina aos esforços.^[6] (Figura 4)

Figura 4: Corte seccional em necropsia de coração mostrando infarto posterior recente. O músculo infartado aparece em amarelo vivo.^[32]

Nas síndromes coronárias instáveis a redução do fluxo é aguda. A ruptura ou erosão de uma placa aterosclerótica determina a formação de trombos compostos por plaquetas, fibrina e hemácias.^[6] Neste caso, a isquemia ocorre mesmo em situações de baixa demanda, como no repouso.

O músculo cardíaco tem metabolismo predominantemente aeróbico, com elevada extração de oxigênio e baixa margem de reserva. Adicionalmente, não há estoques de oxigênio disponíveis em quantidade significativa no miocárdio. Durante a isquemia, ocorre redução da remoção de metabólitos e a elevação de fosfatos inorgânicos com conseqüente redução da sensibilidade de miofilamentos ao cálcio. Portanto, a isquemia ocasionada por redução de oferta e/ou elevação de consumo determina profundas alterações metabólicas, elétricas e de contratilidade no miocárdio.^[6]

Necrose, edema e inflamação na área infartada ocorrem desde algumas horas após a interrupção do aporte de sangue por oclusão da artéria, seguidos de um prolongado período de proliferação fibroblástica e deposição de colágeno (cicatrização).

O diagnóstico baseia-se normalmente na tríade: dor anginosa típica, alterações do eletrocardiograma (ECG) e elevação das enzimas cardíacas no soro. Muitos casos podem, no entanto, cursar sem a síndrome completa. A dificuldade do diagnóstico diferencial é por si só causa adicional de eventos fatais, portanto, o desenvolvimento de ensaios não invasivos para a detecção precoce dos danos do miocárdio é de extrema importância.

Em um momento de grandes avanços na instrumentação técnica em medicina, não se deve desvalorizar a adequada coleta de dados da história clínica. A história clínica cardiovascular deve ser detalhada, mas guiada por sintomas.^[6] Dentre os sintomas fundamentais cardiovasculares, especial atenção deve ser dada à investigação da precordialgia. A caracterização clínica da dor torácica deve ser minuciosa, conduzindo o diagnóstico a várias síndromes clínicas, guiando assim a solicitação e interpretação de exames complementares.^[6]

Os danos celulares podem ser identificados por técnicas cintilográficas que apresentam boa acurácia na avaliação de vários parâmetros funcionais e metabólicos. A imagem deve informar não somente sobre a presença, mas também sobre a extensão do dano, permitindo assim, a orientação à terapia e estratificação do prognóstico.

1.6 Medicina Nuclear aplicada à Cardiologia

No Brasil, a Medicina Nuclear aplicada à Cardiologia tem sido atualizada de forma paralela aos grandes centros internacionais. A metodologia radioisotópica cresceu com novos traçadores, novas modalidades de estresse, novas aplicações, novos avanços tecnológicos nos aparelhos de aquisição e nos de processamento de imagens. Esses avanços trouxeram crescimento à experiência mundial, proporcionando excelente custo/efetividade no diagnóstico

das diversas situações agudas e crônicas, nas seleções cirúrgicas e na identificação da reversibilidade da disfunção do ventrículo esquerdo.^[6]

Avanços significativos têm sido realizados nas últimas décadas com relação à obtenção de imagens do coração com traçadores radioativos em pacientes portadores ou com suspeita de doença arterial coronária (DAC) para a detecção de isquemia, determinação da viabilidade do miocárdio, avaliação pré-operatória dos riscos cardíacos em pacientes que realizam cirurgias não cardíacas e avaliação da eficácia dos procedimentos de revascularização.

1.6.1 Marcadores cardíacos

Os estudos em Medicina Nuclear são fisiológicos e retratam o aspecto funcional e metabólico da função cardíaca, tendo como vantagem a característica de serem técnicas não invasivas.^[6] Existem marcadores específicos para várias condições cardíacas, como: marcadores de perfusão, de necrose, de inflamação, de metabolismo e de inervação. Com relação à DAC, são importantes os marcadores de perfusão e os de necrose.

²⁰¹Tálio, metoxiisobutil-isonitrila-^{99m}Tc (MIBI-^{99m}Tc), tetrofosmin-^{99m}Tc e teboroxime-^{99m}Tc são reportados como agentes apropriados para o estudo da perfusão do miocárdio. Administrando-se um destes agentes, na presença de infarto recente ou de fibrose por infarto antigo, o segmento comprometido do miocárdio é visualizado como uma imagem fotopênica. A isquemia induzida por esforço também se traduz por uma área fotopênica, de modo que apenas a cintilografia não distingue entre isquemia aguda e necrose.

Durante muitos anos, imagens planares com cloreto de tálio-201 (²⁰¹Tl) constituíram a única técnica cintilográfica adequada para o estudo da DAC. O seu comportamento no coração e nos tecidos é muito semelhante ao potássio. Possui vantagens como rápido clareamento sangüíneo e alta fração de extração, inclusive sob condições de fluxo muito baixo, como o do miocárdio hibernante. Com o surgimento de complexos catiônicos marcados com ^{99m}Tc, o ²⁰¹Tl foi substituído em grande parte, devido a fácil disponibilidade do ^{99m}Tc e também pela melhora da qualidade das imagens.

O complexo MIBI-^{99m}Tc ou sestamibi-^{99m}Tc^[13,14] é o indicador mais utilizado na atualidade, caracterizado como um membro da família química

referido como isonitrilas. Este radiofármaco é um cátion monovalente, no qual o ^{99m}Tc é circundado por 6 ligantes isonitrilas, que entra na célula por mecanismo passivo através do sarcolema, ligando-se as mitocôndrias e praticamente não sofrendo redistribuição. Substituiu o ^{201}Tl nos exames rotineiros para diagnóstico de DAC.

O tetrofosmin- ^{99m}Tc é um agente de imagem do miocárdio de segunda geração e membro da classe química difosfato.^[3] É lipofílico e também se localiza na mitocôndria das células; entra passivamente no músculo cardíaco e apresenta menos de 5% de concentração plasmática após 10 minutos de injeção. O clareamento hepático e pulmonar é rápido, assim as imagens podem ser adquiridas de 5 a 10 minutos após a administração da dose.^[6] É indicado para a detecção de isquemia reversível do miocárdio com acúmulo proporcional ao fluxo sangüíneo.

O teboroxime- ^{99m}Tc é um traçador lipofílico neutro da classe de compostos referidos como ácidos borônicos. Seu mecanismo de captação é desconhecido, possui excelentes qualidades relativas à taxa de extração que se mantém paralela ao aumento de fluxo sangüíneo, porém exibe uma redistribuição e um rápido clareamento do miocárdio; as imagens devem ser obtidas em até 6 minutos pós-dose, por isso não proporciona sucesso nos estudos realizados em pacientes. Não é utilizado na prática e não está disponível no mercado.

No caso de necrose, dentre os traçadores acima, nenhum permite o diagnóstico diferencial entre uma lesão nova de uma pré-existente.

Essas dificuldades levaram os pesquisadores a desenvolver e estudar outras moléculas para o diagnóstico precoce da DAC.

Desde os anos 70, alguns compostos marcados com ^{99m}Tc para a obtenção de imagens de necrose do miocárdio foram descritos na literatura, sendo os mais importantes, o pirofosfato- ^{99m}Tc ^[10,11,12] e o específico anticorpo antimiosina- ^{111}In ^[15,16].

O pirofosfato- ^{99m}Tc foi inicialmente introduzido como radiofármaco de marcação do sistema ósseo. No miocárdio necrosado também ocorre a concentração de pirofosfato marcado devido a três fatores: a presença de fluxo sangüíneo residual, a restauração do fluxo sangüíneo na região infartada e o depósito de fosfato de cálcio na mitocôndria do tecido severamente danificado. Desde o aparecimento da dosagem de troponinas, este método tornou-se restrito,

porque o diagnóstico é tardio. Uma concentração significativa só é detectada após um mínimo de 12 horas e até 5 a 7 dias da ocorrência da isquemia aguda, mas a qualidade da imagem é excelente.

A antimiosina- ^{111}In é dos indicadores o mais específico para detectar danos celulares do miocárdio. Porém, seu uso limitou-se a poucos centros por razões técnicas e logísticas, pois possui alta concentração hepática e clareamento sangüíneo lento, o que permite a realização de imagens somente após 24 horas da administração. Seu custo é elevado, por isso nunca foi usada no Brasil.

O glucarato- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (GLA- $^{99\text{m}}\text{Tc}$) emergiu como um marcador metabólico promissor da inviabilidade do miocárdio demonstrada pela sua elevada afinidade e captação pelo tecido necrosado do miocárdio, nos danos cerebrais agudos e em tumores.^[24]

1.6.2 Glucarato- $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Em 1990 foi publicado o primeiro trabalho de aplicação clínica de um novo marcador de necrose, o glucarato.^[17,34] O GLA- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ foi apontado como um radiofármaco ideal para visualização tanto de tecidos necrosados como de severas isquemias de tecido viável.

O ácido glucárico, também conhecido como ácido sacárico, é um ácido dicarboxílico com 6 moléculas de carbono, sendo um catabólito endógeno natural da UDP (Uridina Difosfato)-glicose excretado principalmente pelo sistema urinário. É um análogo da glicose passível ser marcado com $^{99\text{m}}\text{Tc}$.^[20] (Figura 5)

Figura 5: Estrutura química do ácido glucárico.

O ácido glucárico é estruturalmente similar à frutose e penetra na célula através do sistema de transporte D-frutose, quando esta passa a metabolismo anaeróbio. Sua concentração é desprezível em condições não isquêmicas, quando os ácidos graxos são substratos do metabolismo. Como a frutose é um substrato apreciável no metabolismo das lesões causadas por isquemia prolongada, sua atividade ou captação nas áreas lesadas permanece por mais de 24 horas devido à utilização do sistema de transporte do açúcar no estado de hipoxia.

Em situação isquêmica, pode haver uma elevada captação do GLA- ^{99m}Tc , mas a concentração não é suficiente para ser detectada *in vivo* pela gama-câmara. Na necrose aguda do miocárdio, ocorre a penetração na zona infartada através da circulação colateral e/ou por difusão.^[18,19,21]

A retenção do glucarato- ^{99m}Tc no miocárdio está aumentada no local da isquemia, mesmo na ausência de necroses. Esta retenção não se deve à hipoxia, mas à hipoglicemia do tecido.^[20] Se a captação precoce de glucarato- ^{99m}Tc no infarto agudo do miocárdio é confirmada, com persistência de oclusão na artéria coronária, este radiofármaco pode auxiliar na diferenciação de infarto agudo de infarto antigo.^[21]

Por ser uma molécula pequena, o ácido glucárico possui um clareamento sanguíneo rápido, permitindo a realização de imagens precoces.^[27] Além disso, este radiotraçador possui outra vantagem que é a baixa captação em órgãos adjacentes.^[18,19,22,23]

Os constituintes da formulação do glucarato são: ácido glucárico, ácido gentísico e cloreto estanoso. Seu preparo está descrito no item 3.2.1.

2 OBJETIVO

Este trabalho apresenta uma técnica de preparo do radiofármaco glucarato sob forma de liofilização, objetivando a otimização dos procedimentos de preparação, liofilização, marcação com ^{99m}Tc e controle de qualidade para ser comercializado pelo IPEN-CNEN/SP, com indicação na avaliação do infarto agudo do miocárdio em Medicina Nuclear.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes, soluções e outros

- ácido glucárico - *Sigma*;
- cloreto estanoso ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) - *Merck*;
- ácido gentísico - *Sigma* ou *Merck*;
- acetona – P.A.;
- solução salina 0,9 %;
- água bidestilada;
- ácido clorídrico (HCl) 0,1N;
- hidróxido de sódio (NaOH) 1N;
- solução de pertecnetato de sódio ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$) obtido do gerador de ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (IPEN-TEC);
- fitas para cromatografia ascendente:
 - papel *Whatman* 3MM e
 - ITLC-SG (Al) – fibra de vidro (*Gelman Sciences*);
- membrana filtrante de porosidade $0,22\mu\text{m}$ – *Millipore*;
- papel indicador de pH em papel *Acilit* (pH 0 – 6 e pH 0 - 11) – *Merck*;
- cubas de vidro para cromatografia;
- tubos de ensaio;
- béqueres de vidro;
- frascos estéreis para liofilização;
- capilares de vidro;
- seringas descartáveis de 0,5; 1,0; 3,0; 5,0 e 10,0mL – BD;
- agulhas 13,0 x 3,8 – BD.

3.1.2 Instalações e equipamentos

As instalações e equipamentos utilizados para a realização dos experimentos pertencem à infra-estrutura do Centro de Radiofarmácia do IPEN-CNEN/SP, são eles:

- Laboratórios para marcação e controle de qualidade;
- Capelas de fluxo laminar;
- Centrífuga, modelo HIMAC – CF 7D2, *Hitachi*;
- Contador automático tipo poço com cristal de NaI(Tl), modelo CR 643, Cobra II, *Packard – Canberra* (EUA);
- Estufa de secagem e esterilização, modelo 315SE - FANEM (Brasil);
- Micropipetas de 1 - 1000 μ L, *Weaton Socorex* (Suíça);
- Lacrador e deslacrador manual – *Wheaton* (EUA);
- Agitador Vortex - *Geniee 2* (VWR Scientific);
- Balança analítica, modelo B6 – *Mettler* (Alemanha);
- Aparelho medidor de pH, modelo B374 – *Micronal*;
- Purificador de água (*Water Purification System*), modelo Milli-RX 45 – *Millipore* (EUA);
- Calibrador de doses, modelo CRMTM-35R – *Capintec, Inc*, EUA;
- Liofilizador *Edwards, Supermodulyo 40* (BOC do Brasil);
- Câmara de cintilação, modelo TH22, TH33, TH45, *Mediso (Medical Imaging Systems) - Nucline*;
- Aplicativo *Microsoft – Excel* (versão *Windows XP*).

3.1.3 Animais

- Camundongos da raça *Swiss*, adultos, machos pesando de 25 a 35 gramas – Biotério IPEN-CNEN/SP;
- Ratos da raça *Wistar*, adultos, fêmeas e machos pesando de 200 a 250 gramas – Biotério IPEN-CNEN/SP.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparo e liofilização do glucarato

O preparo do conjunto de reagentes liofilizados (*kit*) de glucarato foi estudado tendo como base uma revisão bibliográfica, por meio da qual se realizou a otimização dos procedimentos.^[20,21,22,24]

A técnica de preparo dos reagentes foi realizada na capela de fluxo laminar. Foi dividida em 9 fases que serão descritas a seguir:

1. Preparar a Solução A:

- pesar 600mg de ácido glucárico em um béquer;
- adicionar 10mL de água bidestilada estéril previamente nitrogenada por 15 a 20 minutos;
- dissolver, aquecendo a solução;
- completar o volume para 30mL.

2. Preparar a Solução B:

- dissolver em um béquer, aquecendo levemente, 100mg de ácido gentísico em 10mL de água bidestilada estéril previamente nitrogenada.

3. Preparar a Solução C:

- dissolver em um béquer 100mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 10mL de HCl 0,1N previamente nitrogenado;
- nitrogenar a solução.

4. Adicionar 2,5mL da solução B no béquer que contém a solução A e nitrogenar.

5. Adicionar 2,5mL da solução C ao béquer que contém a solução A;

- homogeneizar e nitrogenar;
- medir o pH que deve ser 3,5.

6. Acertar o pH da solução para 5,0 com NaOH 1N, utilizando o volume de aproximadamente 1mL;

- quando o pH estiver 5,0, completar o volume com água bidestilada estéril e nitrogenada até 50mL.

Todas as soluções devem ser nitrogenadas por no mínimo 15 minutos para que não sofram um processo de oxidação pela presença de oxigênio.

Na formulação do reagente, o pH da solução foi avaliado por controle radioquímico, variando entre 3,0; 5,0 e 7,0.

7. Filtrar a solução final utilizando a membrana filtrante de porosidade 0,22 μm (Millipore) para remoção de eventuais microorganismos.

8. Fracionar o produto em 50 frascos estéreis para liofilização contendo 1mL em cada um.

9. Liofilização

Foi realizado o procedimento padrão (IPEN) de liofilização (Figura 6):

- tempo total de processo de 23 horas;
- 1 hora para congelar as prateleiras (-10°C);
- 4 horas de congelamento do produto/amostras (-45°);
- 19 horas de aquecimento gradual para secagem do produto até atingir 20°C .

Cada frasco liofilizado contém: 12mg de ácido glucárico; 0,5mg de ácido gentísico; 0,5mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Figura 6: Liofilizador *Edwards* – IPEN-CNEN/SP.

3.2.2 Marcação do reagente liofilizado com $^{99m}\text{TcO}_4^-$ para determinação da pureza radioquímica

A pureza radioquímica do glucarato- ^{99m}Tc foi avaliada utilizando como técnica a cromatografia ascendente em papel; seguindo a técnica descrita abaixo.^[20,21,22,23,24,35,36]

Foram utilizadas fitas de papel Whatman 3MM (1x10cm) e fitas de ITLC-SG, fibra de vidro (1x10cm) como suportes (fase estacionária) e acetona e solução salina 0,9% como solventes (fase móvel), respectivamente.

Aos 15, 30, 60 e 120 minutos após a adição do $^{99m}\text{TcO}_4^-$, uma alíquota do produto (GLA- ^{99m}Tc) foi semeada na origem das fitas (na distância de 1,5cm da margem inferior da fita) com o auxílio de um capilar de vidro (Figura 7). Após breve secagem, as fitas foram colocadas em cubas previamente preparadas com os respectivos solventes. Todos os controles foram realizados em duplicatas e os frascos de glucarato- ^{99m}Tc permaneceram lacrados até o fim dos experimentos.

Figura 7: Fitas de ITLC-SG (fibra de vidro) sendo semeadas para iniciar a cromatografia ascendente - laboratório IPEN-CNEN/SP.

Ao final da corrida de 10cm, as fitas foram retiradas e colocadas para secar em temperatura ambiente, em seguida, foram cortadas em segmentos de 1cm e colocadas em tubos de contagens para determinação da atividade num contador de radiação gama.

Os cálculos da pureza radioquímica (%) de cada ensaio foram determinados utilizando o programa *Excel* da *Microsoft*.

O padrão de migração (R_f - *relation-front*) adequado em papel Whatman 3MM é para o $^{99m}\text{TcO}_4^- = 1,0$ (porção superior da fita) e para o $^{99m}\text{TcO}_2/\text{GLA}-^{99m}\text{Tc} = 0$ (origem da fita). Utilizando ITLC-SG (fibra de vidro) como suporte o R_f para o $^{99m}\text{TcO}_4^-/\text{GLA}-^{99m}\text{Tc}$ é igual a 1,0 e para $^{99m}\text{TcO}_2$ igual a 0.

Os ensaios para análise da variação do pH da solução foram realizados com atividades variando de 44,4MBq a 66,6MBq (1,2mCi a 1,8mCi) e volume de 1mL de $^{99m}\text{TcO}_4^-$, nos tempos de reação de 30, 60 e 120 minutos.

A marcação do glucarato foi estudada variando o volume de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em 1, 3 e 5mL. Em todos os ensaios, o reagente foi marcado com atividade de 1850MBq (50mCi).

O reagente liofilizado foi marcado com $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em volumes de 1, 3 e 5mL. A atividade variou de 185MBq (5mCi) a 5550MBq (150mCi). O tempo de armazenagem (estabilidade) foi estudado até 12 meses após a liofilização, o

produto foi conservado sob refrigeração em temperatura de 2 a 8°C. Em todos os ensaios o tempo de reação foi avaliado até 120 minutos.

3.2.3 Estudo da distribuição biológica do glucarato-^{99m}Tc em camundongos Swiss sadios

Os experimentos realizados em animais seguem as exigências e os princípios éticos postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

- **Método invasivo**

A biodistribuição do GLA-^{99m}Tc foi estudada para determinação da porcentagem de acúmulo nos órgãos com relação à atividade administrada, considerando-se que a radioatividade medida pode estar associada ao composto injetado ou a um produto de sua degradação.

Realizou-se a distribuição biológica em 20 camundongos machos da raça *Swiss*, pesando de 25 - 35g (Figura 8).

Figura 8: Camundongos *Swiss* sendo preparados para o experimento de biodistribuição - laboratório IPEN-CNEN/SP.

A análise foi realizada nos tempos de 15, 30, 60 e 180 minutos após a administração do radiofármaco. Para cada tempo, 5 camundongos foram estudados.

Iniciou-se com a administração de 1,33MBq em 0,1mL ($36\mu\text{Ci}/0,1\text{mL}$) do radiofármaco na veia caudal de cada um. Ao final de cada tempo estudado, os camundongos foram sacrificados por decapitação. Foram coletadas amostras de 100 μL de sangue do plexo orbital em tubos previamente heparinizados. Posteriormente, os órgãos de interesse foram removidos, pesados e colocados em tubos de contagens para determinação da atividade num contador de radiação gama. (Figura 9)

Os órgãos estudados foram: cérebro, pulmões, coração, baço, fígado, estômago vazio, músculo (fração anterior da coxa esquerda), rins, intestinos delgado e grosso (com conteúdo), sangue total e cauda.

Figura 9: Remoção dos órgãos de interesse dos camundongos laboratório IPEN-CNEN/SP.

As porcentagens de dose captada nos diferentes órgãos (%dose/órgão) e as porcentagens de dose captada por unidade de massa (%dose/massa) foram determinadas a partir de um padrão de dose administrada pelo programa *Excel* da *Microsoft*, utilizando as seguintes equações:

- Equação 1 - Determinação do padrão real
(média cpm dos 3 padrões x 10) – cpm da cauda de cada camundongo

- Equação 2 - Determinação da porcentagem de dose por órgão

$$\frac{\text{cpm órgão} \times 100}{\text{cpm padrão}}$$

Sendo cpm, contagens por minuto.

- Equação 3 - Determinação da porcentagem de dose por grama de tecido

$$\frac{\% \text{ dose} / \text{órgão}}{\text{peso do órgão correspondente}}$$

- Equação 4 - Determinação da porcentagem de dose por grama de músculo

$$\left(\frac{\text{cpm músculo}}{\text{cpm padrão}} \right) \div \text{peso do órgão}$$

Para determinar a porcentagem de dose em músculo total, considerou-se o cálculo de Jones e col.^[30], conforme a equação 5:

- Equação 5 - Determinação da porcentagem de músculo total

$$\% \text{ dose/grama} \times 40\% \text{ do peso corpóreo}$$

Os cálculos da porcentagem de dose administrada presente no sangue total e da volemia foram determinados de acordo com Altman e col.^[31], segundo as equações 6 e 7:

- Equação 6 - Determinação da porcentagem de dose no sangue por mL

$$\text{cpm (100}\mu\text{L)} \times 10 = \frac{\text{cpm (1mL)}}{\text{cpm padrão}} \times 100$$

- Equação 7 - Determinação da porcentagem de dose de sangue total

$$\% \text{ dose sangue/mL} \times \text{volemia animal}$$

Sendo a volemia animal correspondente a 7% do peso corpóreo.

3.2.4 Estudo da distribuição biológica do glucarato-^{99m}Tc em ratos *Wistar* sadios

A biodistribuição do GLA-^{99m}Tc também foi realizada em ratos *Wistar* para determinação da porcentagem de acúmulo nos órgãos com relação à atividade administrada.

Foram estudados 6 ratos *Wistar* sadios, pesando de 250 - 300 gramas. Administrou-se a atividade de 18,5MBq (500μCi) do glucarato-^{99m}Tc na veia caudal de cada rato. Após 60 minutos da administração, os ratos foram sacrificados e seus órgãos foram retirados para serem medidos no calibrador de doses (*Capintec*).

Os órgãos estudados foram: coração, pulmões, músculo total, fígado, rins, intestinos e sangue total.

Os cálculos foram realizados utilizando-se o programa *Excel* da *Microsoft*. Os valores obtidos da contagem do músculo e sangue foram extrapolados para o total de contagem no organismo, correspondendo a 40% e 7%, respectivamente.

3.2.5 Estudo cintilográfico do glucarato-^{99m}Tc em ratos *Wistar* sadios

- **Método não invasivo**

O estudo cintilográfico foi realizado no Laboratório do IPEN-CNEN/SP. As imagens cintilográficas foram obtidas em ratos sadios da raça *Wistar*, pesando 250 - 300 gramas.

O radiofármaco foi marcado com 30mCi de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em um volume de 3mL. Após 30 minutos de reação em temperatura ambiente, foi administrada a atividade de 17,4MBq (470 μ Ci) do glucarato- ^{99m}Tc na veia caudal de cada rato.

Foram realizadas imagens estáticas dos ratos em decúbito ventral, utilizando a câmara de cintilação de experimentação animal do Centro de Radiofarmácia do IPEN, aos 30, 60, 120 e 180 minutos após a administração da dose. (Figura 10)

As imagens foram adquiridas em matriz 256 x 256 por 300 segundos cada. O colimador utilizado foi o de baixa energia e alta resolução (*LEHR – Low Energy High Resolution*).

Figura 10: Câmara de cintilação de experimentação animal do Centro de Radiofarmácia - IPEN.

3.2.6 Estudo cintilográfico do glucarato- ^{99m}Tc em ratas *Wistar* infartadas

- **Método invasivo**

Após aproximadamente 3 horas do procedimento cirúrgico de indução do infarto agudo do miocárdio (IAM) em ratas no Laboratório de Fisiologia e

Fisiopatologia da UNIFESP, que será descrito no item 3.2.6.1, foi realizado o estudo cintilográfico no Laboratório do IPEN-CNEN/SP.

As imagens cintilográficas foram obtidas em 5 ratas (fêmeas) infartadas da raça *Wistar*, pesando 250 - 300 gramas.

O radiofármaco foi marcado com 30mCi de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em um volume de 3mL. Após 30 minutos de reação em temperatura ambiente, foi administrada a atividade de 17,4MBq (470 μ Ci) do glucarato- ^{99m}Tc na veia caudal de cada rata infartada.

Foram realizadas imagens estáticas em decúbito ventral, utilizando a câmara de cintilação de experimentação animal do Centro de Radiofarmácia do IPEN, aos 60, 180 e 1800 minutos (1, 3 e 30 horas) após a administração da dose. (Figura 11)

Figura 11 – Rata *Wistar* em decúbito ventral para a realização da imagem cintilográfica após administração do GLA- ^{99m}Tc .

As imagens foram adquiridas em matriz 256 x 256 por 300 segundos. O colimador utilizado foi o de baixa energia e alta resolução (*LEHR – Low Energy High Resolution*).

3.2.6.1 Técnica cirúrgica do infarto agudo do miocárdio

O procedimento cirúrgico de indução do infarto agudo do miocárdio em ratos *Wistar* foi realizado no Laboratório de Fisiologia e Fisiopatologia da UNIFESP, segundo uma técnica popularizada pela literatura e já padronizada no laboratório. É constituído das seguintes fases: (Figura 12 e 13)

1. Anestesiar o animal com quetamina (50mg/kg) e xilazina (10mg/kg);
2. Realizar a entubação orotraqueal com fio guia número 14;
3. Realizar a toracotomia transversa em hemitórax esquerdo, no espaço intercostal em que o coração impacta o gradeado costal;
4. Ampliar o espaço intercostal com o auxílio de uma pinça hemostática e em seguida comprimir o tórax no sentido lateral, possibilitando a exteriorização do coração;

Figura 12: Ilustração das fases iniciais (1, 2, 3 e 4) da indução no IAM.

5. Identificar a artéria coronária interventricular anterior que se localiza na borda inferior do átrio esquerdo;

6. Ocluir a artéria coronária, suturando cerca de 1mm abaixo do bordo ântero-inferior do átrio esquerdo com fio prolene 6-0;
7. Provocar hiperinsuflação pulmonar para que ocorra expansão do pulmão esquerdo;
8. Fechar a toracotomia por sutura em bolsa previamente preparada na parede do tórax.

O procedimento foi realizado em fêmeas porque a taxa de mortalidade é menor do que em machos.

Figura 13: Ilustração das fases 5, 6, 7 e 8 da indução no IAM.

3.2.7 Estudo *in vitro* da estabilidade do glucarato-^{99m}Tc ao plasma humano

Foram coletadas duas amostras de 5mL de sangue de voluntários humanos por punção venosa. Estas foram centrifugadas a 1500rpm por 10 minutos em temperatura ambiente, separando o plasma (sobrenadante) dos elementos sangüíneos.

Foram marcados dois frascos de GLA liofilizado com 166,5MBq (4,5mCi)/ 1mL ^{99m}TcO₄⁻. Posteriormente, 100μL de GLA-^{99m}Tc foi adicionado a

duas amostras de plasma de 2mL cada uma. O volume final foi de 3mL e o pH = 7,0.^[24]

Os controles radioquímicos por cromatografia ascendente foram realizados nos tempos de incubação de 30, 60 e 120 minutos, utilizando os sistemas cromatográficos descritos anteriormente. Os frascos permaneceram fechados durante todo o experimento. Ao final, as fitas totalmente secas foram cortadas em segmentos de 1cm para determinação da porcentagem de pureza radioquímica.

3.2.8 Estudo microbiológico

Os testes de esterilidade foram realizados utilizando os meios de cultura: TSB (*Tryptcase Soy Broth*) e o meio líquido de tioglicolato (*Fluid Thioglycollate Medium – FTM*).

O reagente liofilizado (GLA) foi ressuscitado com 10mL de água bidestilada e posteriormente 2 tubos contendo TSB e 2 tubos contendo FTM foram semeados com 1mL da suspensão cada um. Um tubo de TSB ficou em temperatura de 25°C e os três tubos restantes ficaram na estufa (33°C) por 14 dias. O resultado foi avaliado após o período de 14 dias. A interpretação foi realizada da seguinte maneira: se houve crescimento de microorganismos, o resultado foi positivo e visualizava-se formação de grumos; se as soluções dos meios de cultura se mantiverem límpidas, o resultado é negativo.

Também foi realizado o teste de filtração por membrana (*Sterisolutest*), utilizando o equipamento da *Millipore – Compact*. Os resultados foram avaliados da maneira como foi descrito acima.

O teste de apirogenicidade foi realizado pelo teste de *Limulus*. O reagente liofilizado (GLA) foi ressuscitado com 10mL de água bidestilada, sendo que 0,5mL foi transferido para um frasco a vácuo estéril contendo 9,5mL de água bidestilada. Posteriormente, 0,1mL desta solução foi retirado com uma pipeta e foi adicionado a 2 tubos contendo LAL. Estes tubos foram colocados em banho-maria (37°C) durante 1 hora. Se a solução se apresentar em forma de gel, o resultado seria positivo e se permanecesse líquida, seria negativo.

Todos os testes foram realizados no Laboratório de Radiofarmácia do IPEN-CNEN/SP conforme descrito na metodologia da Farmacopéia da USP.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da variação do pH da solução

O estudo de variação de pH, realizado na formulação do reagente liofilizado, apresentou pureza radioquímica menor em pH = 3 e 7.

Os resultados em pH = 3 variaram entre 95,92% e 96,16%. Em pH = 7, os valores foram bem inferiores e variaram entre 81,74% e 84,84%.

Os melhores resultados obtidos foram em pH = 5, por isso o reagente liofilizado deve estar com pH final 5,0. (Tabela 1)

Tabela 1: Rendimento de marcação do GLA-^{99m}Tc pré-liofilizado em função do pH.

pH	RENDIMENTO (%)		
	30 min.	60 min.	120 min.
3,0	96,16 ± 1,66	96,58 ± 0,91	95,92 ± 2,19
5,0	98,64 ± 1,32	98,76 ± 1,46	98,77 ± 1,46
7,0	82,50 ± 5,12	84,84 ± 4,04	81,74 ± 4,74

*n = 3

4.2 Análise da variação do volume de ^{99m}TcO₄⁻

A pureza radioquímica do reagente liofilizado nesta análise foi superior a 97,72%. (Tabela 2)

Tabela 2: Rendimento de marcação do GLA-^{99m}Tc liofilizado em função do volume de ^{99m}TcO₄⁻.

Volume (mL)	RENDIMENTO (%)		
	30 min.	60 min.	120 min.
1mL	99,17 ± 0,38	99,47 ± 0,36	98,73 ± 1,35
3mL	98,44 ± 0,15	97,96 ± 0,26	98,28 ± 0,30
5mL	97,72 ± 1,30	98,50 ± 0,72	98,87 ± 0,60

*n = 3

4.3 Análise da variação da atividade de ^{99m}TcO₄⁻

Foram estudadas marcações variando a atividade de ^{99m}TcO₄⁻ de 185MBq (5mCi) a 5550MBq (150mCi) durante 120 minutos após a marcação.

Tabela 3: Rendimento de marcação do GLA-^{99m}Tc em função da atividade de ^{99m}TcO₄⁻.

Atividade (MBq – mCi)	RENDIMENTO (%)			
	15 min.	30 min.	60 min.	120 min.
185 – 5	-	98,60 ± 0,41	98,75 ± 0,70	98,69 ± 0,98
555 – 15	-	98,12 ± 0,63	97,90 ± 0,76	98,18 ± 0,58
1850 – 50	-	98,17 ± 0,47	98,21 ± 0,15	98,61 ± 0,12
3700 – 100	98,34 ± 0,63	98,38 ± 0,57	98,19 ± 0,73	98,06 ± 0,41
5550 – 150	98,26 ± 0,51	98,12 ± 1,28	98,24 ± 0,68	99,10 ± 0,52

*n = 3

Os resultados apresentados na Tabela 3 mostram que o rendimento de marcação do produto foi superior a 97,90%, independente da variação da atividade de ^{99m}TcO₄⁻ entre os limites testados.

4.4 Análise do tempo de armazenagem do reagente liofilizado de glucarato

O tempo de armazenagem foi estudado até 12 meses da liofilização. Nestes experimentos, o reagente liofilizado foi marcado com a atividade de 100mCi e volume final de 3mL. As porcentagens obtidas estão demonstradas na Tabela 4 e na Figura 14.

Tabela 4: Rendimento de marcação do GLA-^{99m}Tc em função do tempo de armazenagem.

Tempo de armazenagem (meses)	RENDIMENTO (%)		
	30 min.	60 min.	120 min.
Pré-liofilizado	98,64 ± 1,32	98,76 ± 1,46	98,77 ± 1,46
1 mês	98,00 ± 0,83	97,48 ± 0,33	98,03 ± 0,74
3 meses	98,19 ± 0,97	98,08 ± 0,71	98,38 ± 0,23
4 meses	98,23 ± 0,21	98,31 ± 0,62	98,20 ± 0,42
5 meses	98,18 ± 1,04	98,01 ± 1,37	97,31 ± 0,42
6 meses	97,45 ± 0,22	98,04 ± 0,09	97,48 ± 0,33
8 meses	97,63 ± 0,35	97,77 ± 0,31	98,14 ± 0,19
12 meses	97,02 ± 0,16	96,80 ± 0,31	96,50 ± 0,62

*n = 2

Para cada mês foram realizados dois experimentos. Nestes, pode-se observar que o GLA mostra-se bastante estável durante o tempo de armazenagem. O seu rendimento de marcação apresenta-se menor no décimo segundo mês com porcentagens inferiores a 97%.

*n = 2

Figura 14: Rendimento de marcação do produto liofilizado conservado em temperatura de 2 a 8°C.

Em relação ao tempo de reação do GLA-^{99m}Tc de cada ensaio, o qual foi variado até 120 minutos, não foram observadas variações consideráveis de resultados.

4.5 Estudo da distribuição biológica do glucarato-^{99m}Tc em camundongos Swiss sadios

A biodistribuição foi estudada até 180 minutos após a administração do traçador, demonstrando baixa captação no cérebro, coração, baço, estômago, músculo e intestino grosso.

A excreção mostrou-se renal e hepatobiliar, o que justifica os valores aumentados nos rins, fígado e intestino. O clareamento sanguíneo apresentou-se rápido. A Tabela 5 e a Figura 15 ilustram os resultados obtidos através das porcentagens de dose captada pelos diferentes órgãos.

Tabela 5: Porcentagens de dose captada pelos diferentes órgãos após a administração endovenosa do GLA-^{99m}Tc.

ÓRGÃO	15 minutos	30 minutos	60 minutos	180 minutos
Cérebro	0,038 ± 0,010	0,018 ± 0,010	0,013 ± 0,008	0,006 ± 0,003
Pulmões	0,537 ± 0,166	0,318 ± 0,060	0,067 ± 0,018	0,025 ± 0,006
Coração	0,163 ± 0,024	0,067 ± 0,011	0,019 ± 0,003	0,007 ± 0,001
Baço	0,052 ± 0,014	0,025 ± 0,004	0,020 ± 0,026	0,005 ± 0,001
Fígado	1,330 ± 0,091	0,702 ± 0,064	0,290 ± 0,247	0,304 ± 0,047
Estômago Vazio	0,278 ± 0,070	0,117 ± 0,038	0,048 ± 0,013	0,026 ± 0,006
Músculo total	0,177 ± 0,111	0,055 ± 0,023	0,024 ± 0,025	0,010 ± 0,010
Rins	3,092 ± 0,304	1,925 ± 0,291	1,410 ± 0,075	0,851 ± 0,113
Intestino delgado	1,170 ± 0,124	0,735 ± 0,085	0,665 ± 0,070	8,660 ± 0,364
Intestino grosso	0,498 ± 0,076	0,185 ± 0,017	0,077 ± 0,017	0,150 ± 0,069
Sangue total	6,885 ± 0,989	3,184 ± 0,776	1,237 ± 0,679	0,406 ± 0,080

*n = 5

Figura 15: Biodistribuição do GLA-^{99m}Tc em camundongos Swiss - dose/órgão.

Utilizando as mesmas contagens dos órgãos dos camundongos, foram realizados cálculos para obtenção das porcentagens de dose captada por unidade de massa (gramas), demonstradas pela Tabela 6 e pela Figura 16.

Tabela 6: Porcentagens de dose captada por unidade de massa após a administração endovenosa do GLA-^{99m}Tc.

ÓRGÃO	15 minutos	30 minutos	60 minutos	180 minutos
Cérebro	0,093 ± 0,046	0,064 ± 0,022	0,032 ± 0,020	0,011 ± 0,001
Pulmões	1,151 ± 0,579	1,013 ± 0,150	0,287 ± 0,072	0,103 ± 0,024
Coração	1,162 ± 0,320	0,449 ± 0,100	0,129 ± 0,004	0,053 ± 0,016
Baço	0,963 ± 0,243	0,388 ± 0,103	0,116 ± 0,015	0,069 ± 0,023
Fígado	0,929 ± 0,122	0,535 ± 0,084	0,335 ± 0,017	0,234 ± 0,046
Estômago Vazio	1,214 ± 0,165	0,522 ± 0,126	0,183 ± 0,056	0,097 ± 0,032
Músculo total	0,015 ± 0,009	0,002 ± 0,002	0,003 ± 0,002	0,001 ± 0,001
Rins	7,916 ± 0,955	4,702 ± 0,755	2,814 ± 0,347	2,078 ± 0,141
Intestino delgado	0,928 ± 0,166	0,578 ± 0,156	0,535 ± 0,038	0,407 ± 0,135
Intestino grosso	0,673 ± 0,057	0,259 ± 0,040	0,084 ± 0,011	0,263 ± 0,167
Sangue/mL	3,261 ± 0,458	1,444 ± 0,248	0,409 ± 0,026	0,193 ± 0,057

*n = 5

Figura 16: Biodistribuição do GLA-^{99m}Tc em camundongos Swiss - %dose/grama.

4.6 Estudo da distribuição biológica do glucarato-^{99m}Tc em ratos *Wistar* sadios

O estudo da biodistribuição do GLA-^{99m}Tc foi realizado em 6 ratos *Wistar* sadios para avaliação dos valores de porcentagem de dose injetada em diferentes órgãos.

O estudo foi realizado aos 60 minutos após a administração do radiofármaco, porque neste tempo já ocorreu grande parte do clareamento sangüíneo. Observa-se baixa captação do GLA-^{99m}Tc no coração e nos pulmões. A excreção mostra-se renal e hepatobiliar como visto no estudo em camundongos. (Tabela 7)

Tabela 7: Porcentagens de dose injetada pelos diferentes órgãos após 60 minutos da administração endovenosa do GLA-^{99m}Tc em ratos *Wistar* sadios.

Órgãos	%DI (dose injetada)
	60 minutos
Coração	0,03 ± 0,02
Pulmões	0,06 ± 0,02
Músculo total	1,42 ± 0,82
Fígado	0,38 ± 0,14
Rins	3,58 ± 0,69
Intestinos	0,40 ± 0,53
Sangue total	1,22 ± 0,61

*n = 6

4.7 Estudo cintilográfico em ratos *Wistar* sadios

O estudo cintilográfico em ratos *Wistar* sadios ilustra a biodistribuição do GLA-^{99m}Tc conforme o tempo. (Figura 17)

Aos 60 minutos após a administração do radiofármaco, evidencia-se principalmente concentração renal e óssea. Os músculos são evidenciados em menor proporção e a concentração sanguínea apresenta-se bem diminuída.

Figura 17: Imagens cintilográficas de um rato *Wistar* aos 30, 60, 120 e 180 minutos após a administração do GLA-^{99m}Tc.

4.8 Estudo cintilográfico em ratas *Wistar* infartadas

Após aproximadamente 3 horas do procedimento de indução do infarto, foram realizadas imagens cintilográficas das ratas com 1, 3 e 30 horas após a administração do GLA-^{99m}Tc.

As imagens evidenciam maior captação do GLA-^{99m}Tc na região cardíaca, onde a lesão foi provocada (Figura 18), comprovando a sensibilidade do método.

Figura 18: Imagens cintilográficas após 1, 3 e 30 horas da administração do GLA-^{99m}Tc em duas ratas *Wistar* após aproximadamente 3 horas da intervenção cirúrgica de infarto do miocárdio.

4.9 Estudo *in vitro* da estabilidade do GLA-^{99m}Tc no plasma humano

Este estudo demonstrou que o GLA-^{99m}Tc não se descomplexa no plasma humano, permanecendo bastante estável durante o tempo estudado. Os resultados estão demonstrados na Tabela 8 e Figura 19.

Tabela 8: Porcentagens da estabilidade no plasma do produto liofilizado nos tempos de 30, 60 e 120 minutos pós-marcação.

Tempo de reação	Rendimento (%)
30 minutos	97,86 ± 1,40
60 minutos	98,16 ± 1,36
120 minutos	98,14 ± 0,39

*n=2

*n=2

Figura 19: Porcentagens da estabilidade em plasma do GLA-^{99m}Tc.

4.10 Estudo microbiológico

Os resultados dos testes de esterilidade, apirogenicidade e de *Limulus* do reagente liofilizado apresentaram-se dentro dos padrões estipulados pelas Farmacopéias Americanas (USP) e Brasileiras.

O glucarato apresentou-se estéril (ausência de microorganismos viáveis) e livre de pirogênios.

5 DISCUSSÃO

O desenvolvimento do reagente liofilizado glucarato foi discutido pelos membros da Sociedade Brasileira de Biologia e Medicina Nuclear e Imagem Molecular (SBBMM) e pelo Comitê Científico em consulta aberta durante três meses, concluindo-se que ele deveria ser um dos radiofármacos prioritários para aplicação clínica em âmbito nacional, porque é um traçador que permite o diagnóstico precoce do infarto agudo do miocárdio através de uma técnica não invasiva.

O preparo do glucarato foi retirado das referências já citadas. A literatura só apresentou até agora o produto na forma líquida e baseado nestas referências foi desenvolvido pela primeira vez o reagente na forma liofilizada. Foram produzidos 6 lotes do reagente liofilização e não foi necessário introduzir grandes alterações dos parâmetros, realizando-se apenas sua otimização.

Para os controles cromatográficos elegeu-se a técnica de cromatografia ascendente em papel. Foram utilizadas fitas de papel Whatman 3MM (1x10cm) e fitas de ITLC-SG, fibra de vidro (1x10cm) como suportes (fase estacionária) e acetona e solução salina 0,9% como solventes (fase móvel), respectivamente. Esta técnica mostrou-se bastante eficiente no decorrer dos ensaios.

O pH do reagente liofilizado de glucarato deve estar em 5, porque nesta condição os resultados foram superiores a 98%, conforme a Tabela 1.

A marcação é rápida, simples e estável. O volume de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ pode variar de 1 a 5mL e a atividade de 5mCi (185MBq) a 150mCi (5550MBq), ou seja, seu rendimento de marcação em baixas e altas atividades mostrou-se superior a 97,9%.

Os ensaios cromatográficos confirmaram a facilidade de marcação do produto, sendo que após 15 minutos de reação em temperatura ambiente o

radiofármaco se apresenta pronto para ser administrado ao paciente por via endovenosa, tornando o diagnóstico do IAM precoce.

Conforme mencionado por Ballinger^[22], o ácido gentísico que é componente de sua formulação, aumenta o tempo de armazenamento do GLA. Os resultados da Tabela 4 comprovam sua estabilidade se estiver conservado em temperatura de 2 a 8°C^[24], apresentando bons rendimentos de marcação até 12 meses de sua produção. É importante ressaltar que ocorreu pequena queda de rendimento após a marcação do reagente a partir de 6 meses de armazenamento, que se mantém com 8 meses e baixa com 12 meses.

O estudo de biodistribuição em camundongos *Swiss* mostrou baixa captação em órgãos como: cérebro, coração, baço, estômago, músculo e intestino grosso. A excreção mostrou-se renal e hepatobiliar. Por ser uma molécula pequena, o GLA-^{99m}Tc permite rápido clareamento sangüíneo, conforme mostra a Tabela 5. Este fato possibilita melhor visualização da área de interesse, ou seja, da possível lesão no miocárdio.

No estudo cintilográfico em ratos *Wistar* sadios, observou-se captação renal e óssea que decrescem no decorrer do tempo. Este fato não compromete a visualização da área lesada, conforme observado no estudo cintilográfico realizado em ratas infartadas.

As imagens cintilográficas em ratas *Wistar* infartadas comprovam a sensibilidade do método para diagnosticar infarto agudo do miocárdio com eficácia e rapidez, pois a lesão pode ser bem visualizada após 1 hora da administração do radiofármaco.

Conforme estudos realizados por Flotas^[21] e Mariani^[33], o GLA-^{99m}Tc identifica necrose do miocárdio quando injetado até 9 horas após o início da dor precordial, podendo-se visualizar a lesão miocárdica com ou sem reperfusão da região infartada. Após este tempo, relata-se que o método não é mais sensível.

O GLA-^{99m}Tc mostrou-se bastante estável no plasma humano, não se descomplexando neste meio até o tempo de 2 horas.

Os resultados dos testes microbiológicos mostraram-se dentro do padrão esperado para disponibilização do produto em âmbito comercial.

6 CONCLUSÕES

Adotando a metodologia recomendada pela literatura e extraída da revisão bibliográfica, realizou-se a otimização dos procedimentos de preparação, liofilização, marcação e controle de qualidade do glucarato.

Em concordância com a literatura, a formulação liofilizada do reagente para marcação com ^{99m}Tc apresentou ótimos resultados de rendimento de marcação, avaliando-se volume e atividade de $^{99m}\text{TcO}_4^-$; tempo de reação em temperatura ambiente; estabilidade de armazenagem e estabilidade ao plasma humano.

O estudo de biodistribuição em animais sadios e cintilográfico em animais sadios e infartados mostraram que o GLA- ^{99m}Tc é um reagente viável para estudos cardíacos em humanos.

Com os resultados apresentados nesta dissertação, conclui-se que o glucarato pode ser inserido em um protocolo de validação em humanos para final aprovação e posteriormente ser produzido de forma rotineira pelo IPEN-CNEN/SP para ser comercializado a clínicas e hospitais nacionais para uso médico diagnóstico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ROCHA, A.F.G.; HARBERT, J.C. **Bases da Medicina Nuclear**. R.J.: Guanabara Koogan, 1979. 20p.
- 2 SAHA, G.B. **Fundamentals of Nuclear Pharmacy**. Fourth Edition. Springer-Verlag New York, Inc., cap. 8, 9, 1998.
- 3 THRALL, J. H.; ZIESSMAN, H. A. **Medicina Nuclear**. Ed. Guanabara Koogan, 2ª ed., cap. 5, 2003.
- 4 INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY – IAEA. **Preparation of kits for ^{99m}Tc radiopharmaceuticals**. Viena: IAEA, 1992, p.93.
- 5 CASTRO JR, A., ROSSI, G., DIMENSTEIN, R. **Guia Prático em Medicina Nuclear – A instrumentação**. S.P.: Senac, 2000. 10p.
- 6 NOBRE, F.; SERRANO Jr.; C.V. **Tratado de Cardiologia**. SOCESP – Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo. Ed. Manole Ltda, SP, 2005; seção 1 – cap. 2, 3 e 4, seção 3 – cap. 1 e 8, seção 6 – cap. 1 e 2.
- 7 TIMERMAN, A.; FEITOSA, G.S. **Síndromes coronárias agudas**. Ed. Atheneu, SP, cap. 7, 9, 17, 2003.
- 8 LOTUFO, P.A.; BENSEÑOR, I.J.; LOLIO, C.A. Tabagismo e mortalidade por doença isquêmica do coração. Estudo comparativo das capitais de regiões metropolitanas do Brasil, 1988. **Arq Bras Cardiol**, 1995; 64:7-9.
- 9 HOLMAN, B.L.; LESCH, M; ZWEINMAN, F.G. Detection and sizing of acute myocardial infarcts with ^{99m}Tc (SN) tetracycline. **N. Engl. J. Med.**, 291: 159 – 163, 1974.
- 10 RUDE, R.; PARKEY, R.W.; BONTE, F.J. et. al. Clinical implication of the “doughnut” pattern of uptake in myocardial imaging with technetium-99m stannous pyrophosphate. **Circulation**, 56: m-561, 1977.

- 11 MASSIE, B.M.; BOTVINICK, E.H.; WERNER, J.A.; et. al. Myocardial scintigraphy with technetium-99m stannous pyrophosphate: an insensitive test for nontransmural myocardial infarction. **Am. J. Cardiol.**, 43: 186 – 192, 1979.

- 12 CORBETT, J.R., LEWIS, M.; WILLERSON, J.T. et. al. ^{99m}Tc-pyrophosphate imaging in patients with acute myocardial infarction: comparison of planar imaging with single-photon tomography with and without blood pool overlay. **Circulation**, 69: 1120 – 1128, 1984.

- 13 LEVINE, M.G.; MCGILL, C.C.; AHLBERG, A.W.; WHITE, M.P.; GIRL, S.; SHAREEF, B. et. al. Functional assessment with electrocardiography gated single-photon emission computed tomography improves the ability of technetium-99m sestamibi myocardial perfusion imaging to predict myocardial viability in patients undergoing revascularization. **Am. J. Cardiol.** 83: 1 – 5, 1999.

- 14 TAILLEFFER, R. LAMBERT, R. ESSIAMBRE, R.; PHANEUF, D.C.; LEVEILLE, J. Comparison between thallium-201, technetium-99m-sestamibi and technetium-99m-teboroxime planar myocardial perfusion imaging in detection of coronary artery disease. **J. Nucl. Med.** 33: 1091 – 1098, 1992.

- 15 STRAUSS, H.W.; NARULA, J.; KHAW, B.A. **Acute myocardial infarction imaging with technetium-99m and indium-111 antimyocin Fab.** In: Khaw, B.A.; Narula, J. and Strauss, H.W., eds. Monoclonal Antibodies in Cardiovascular Diseases. Philadelphia, Pa: Lea & Febiger, p. 30 – 42, 1994.

- 16 DEC., G.W.; PALÁCIOS, I.F.; YASUDA. T. et. al. Antimyosin antibody cardiac imaging: its role in the diagnosis of myocarditis. **J. Am. Coll. Cardiol.** 16: 97 – 104, 1990.

- 17 NUNN, A.D.; Radiopharmaceuticals for imaging myocardial perfusion. **Semin. Nucl. Med.** 20: 111 – 118, 1990.

- 18 KHAW, B.A.; NAKAZAWA, A.; O'DONNELL, S.M.; PAK, K.Y.; NARULA, J. Avidity of technetium-99m-glucarate for the necrotic myocardium: In-vivo and in-vitro assessment. **J. Nucl. Cardiol.** 4: 283 – 290, 1997.

- 19 BEANLANDS, R.S.B.; RUDDY, T.D.; BIELAWSKY, L. Differentiation of myocardial ischemia and necrosis by technetium-99m-glucaric acid kinetics. **J. Nucl. Cardiol.** 4: 274 – 282, 1997.

- 20 OKADA, D.R.; JOHNSON, G 3rd; LIU, Z.; HOCHERMAN, S.D.; KHAW, B.A.; PAK, K.Y. OKADA, R.D. Myocardial kinetics of Tc-99m glucarate in low flow, hipoxia, and aglycemia. **J. Nucl. Cardiol.** 10: 168 – 176, 2003.
- 21 FLOTAS, A. and CARRIÓ, I. Non-invasive in vivo imaging of myocardial apoptosis and crosis. **Eur. J. Nucl. Med.** 30: 615 – 620, 2003.
- 22 BALLINGER, J.R.; PROULX, A.; RUDDY, T.D. Stable kit formation of technetium-99m-glucarate. **Appl. Radiat. Isot.** 42: 405 – 406, 1991.
- 23 NARULA, J.; PETROV, A.; PAK, K.Y.; LISTER, B.C.; KHAW, B.A. Very early noninvasive detection of acute experimental nonreperfused myocardial infarction with ^{99m}Tc- labelled glucarate. **Circulation.** 95: 1577 – 1584, 1997.
- 24 BABBAR, A.K.; SHARMA, R.K. Formulation of lyophilized cold kit for instant preparation of ^{99m}Tc-glucarate and its scintigraphic evaluation in experimental models of infarction. **Indian Journal of Pharmacology**, 38: 13 – 20, 2003.
- 25 PERRIER, C & SEGRÈ, E. Some chemical properties of element, 43. **J. Chem. Phys.**, 5: 712 - 716, 1937.
- 26 LEBOWITZ, E. and RICHARD, P. Radionuclide generator systems. **Semin. Nucl. Med.** 4(3): 257 – 262, 1974.
- 27 KHAW, B.; NARULA, J. **New Approaches to Infarct-Avid Imaging.** In: Iskandrian, A. E.; Verani, M. New Developments in Cardiac Nuclear Imaging. Futura Publishing Company, Inc. Armonk, New York, 8: 171 - 202, 1998.
- 28 BELLER, G.A.; ZARET, B.L. Contributions of nuclear cardiology to diagnosis and Prognosis of patients with coronary artery disease. **Circulation**, 101: 1465 – 1484, 2000.
- 29 TENKATE, G.; FISCHMAN, A.J. Tc99m glucaric acid: a glucose analog. **Eur. J. Nucl. Med.** 31 - 451, 1990.
- 30 JONES, A.G.; ABRAMS, M.J. and DAVISON, A. Biological studies of a new class of technetium (I) cations. **Int. J. Nucl. Med. Biol.**, V.11, p.225-235,1984.

- 31 ALTMAN, P. & DITTMER, D. Blood and Other Body Fluids. Biological Hand Books. Federation of American Society for Experimental Biology, Washington, D.C., p. 1-19.
- 32 DYMOND, D.S. **Enciclopédia de Séries Médicas Visuais. Atlas de Infarto do miocárdio e suas complicações cardiovasculares.** Parthenon Publishing Group Ltd., vol.II, p. 35 – 44, 1997.
- 33 MARIANI, G.; VILLA, G.; ROSSETTIN, P.F.; SPALLAROSSA, P.; BEZANTE, G.P.; BRUNELLI, C.; PAK, K.Y.; KHAW, B.A.; STRAUSS, H.W. Detection of acute myocardial infarction by ^{99m}Tc -labeled D-glucuric acid imaging in patients with acute chest pain. **J. Nucl. Med**, vol. 40: 1832 – 1839, 1999.
- 34 YAOITA, H.; JUWEID M.; WILKINSON R.; et al. Detection of myocardial reperfusion injury with Tc99m glucarate. **J. Nucl. Med**, vol. 31: 795, 1990.
- 35 OKADA, D.R.; JOHNSON, G.; LIU, Z.; HOCHERMAN, S.D.; KHAW, B.; OKADA, R.D. Early detection of infarct in reperfused canine myocardium using ^{99m}Tc -glucarate. **J. Nucl. Med**, vol. 45: 655 – 664, 2004.
- 36 LIU, Z.; BARRETT, H.H.; STEVENSON, G.D.; et al. High-resolution imaging with ^{99m}Tc -glucarate for assessing myocardial injury in rat heart models exposed to different durations of ischemia with reperfusion. **J. Nucl. Med**, vol. 45: 1251 -1259, 2004.
- 37 ORLANDI, C.; CRANE, P.D; EDWARDS, D.S.; et al. Early scintigraphic detection of experimental myocardial infarction in dogs with technetium-99m-glucuric acid. **J. Nucl. Med**, vol. 32: 263 – 271, 1991.
- 38 YAOITA, H.; FISCHMAN, A.J.; et al. Distribution of deoxyglucose and technetium-99m-glucarate in the acutely ischemic myocardium. **J. Nucl. Med**, vol. 34: 1303 – 1308, 1993.