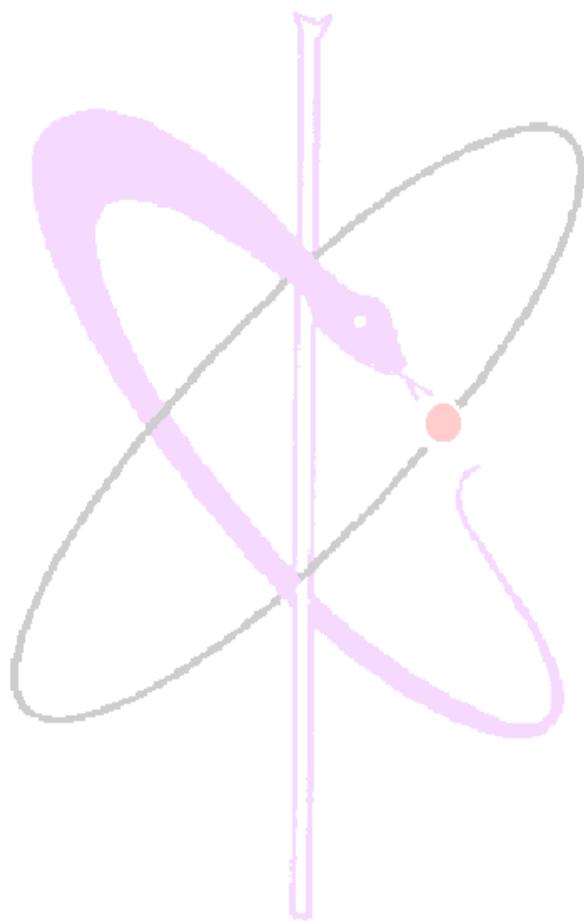


Conceitos e Artefactos da Marcação de Células Sanguíneas com Radiotraçadores e Radiofármacos



Jorge Manuel Pereira Veiga

- 2013 -

O autor pretende com este trabalho, versar determinados aspectos teóricos e técnicos, da marcação de células sanguíneas com radiotraçadores e radiofármacos. Para o efeito, este decidiu previamente condicionar a sua apresentação a oito principais capítulos. Deste modo, apresenta-se nos dois capítulos iniciais, alguns considerandos gerais para a introdução do tema, nomeadamente na síntese de radiofármacos, e ainda em conceitos de biodistribuição de radiotraçadores e radiofármacos. Ainda assim, e de seguida, o autor aduz as principais metodologias de radiomarcação para os eritrócitos, leucócitos e trombócitos. Para finalizar, este, decidiu-se pela exposição dos principais artefactos na radiomarcação dos elementos celulares anteriormente citados.

Convém referir, de que alguns dos considerandos expostos, reflectem a experiência inovadora e criativa desenvolvida pelo autor, na área em causa, promovida ao longo de um tempo superior a uma década, e mais concretamente desde o ano de 1995.

Preâmbulo

A Medicina Nuclear é uma especialidade médica que se apoia no estudo e no desenvolvimento de processos físicos, químicos e biológicos, mas que beneficia também da investigação realizada em radiofarmácia.

Em medicina nuclear utilizam-se radiotraçadores e radiofármacos para investigação, diagnóstico ou mesmo para o tratamento de enfermidades. O radiofármaco contém um radionuclídeo como parte integrante da sua composição, seja esta orgânica ou inorgânica. Verifica-se habitualmente, a ligação de um componente radioactivo a um composto químico, tendo este último a capacidade de formar ligações covalentes. Este conjunto apresenta um tropismo para o órgão alvo ou sistema de interesse, relacionados com a biodistribuição natural do fármaco.

Os radiofármacos para diagnóstico que utilizados em medicina nuclear são administrados geralmente por via endovenosa, numa veia do antebraço, em quantidades da ordem dos microgramas, não devendo, no entanto, apresentar a capacidade de iniciar uma resposta terapêutica, toxicidade ou reacções adversas.

A posterior detecção da radioactividade expressa no organismo, realiza-se através da colocação de um detector de radiação gama (câmara gama) próxima da região anatómica que se pretende estudar. Os órgãos, podem ser assim visualizados como áreas activas, contra zonas de baixa actividade, de acordo com a maior ou menor captação do radiotraçador ou radiofármaco na zona em avaliação. Graças a esta capacidade poder-se-á realizar um estudo anátomo-fisiológico da área pretendida.

Nos radiofármacos utilizados em terapêutica, existe a capacidade de localização do radiotraçador, no órgão ou sistema biológico a tratar, graças ao tropismo da parte química e farmacêutica do composto, aliado ao efeito destrutivo do radioisótopo incorporado.

Neste trabalho pretende-se apresentar alguns aspectos técnicos da marcação de células sanguíneas com substâncias radioactivas, não sendo no entanto possível, o seu total isolamento de todos os processos concomitantes, e que combinam a preparação de radiofármacos autólogos celulares. O uso de radiotraçadores e radiofármacos associados a elementos celulares do sangue é de grande utilidade no diagnóstico precoce em medicina nuclear.

Capítulo I

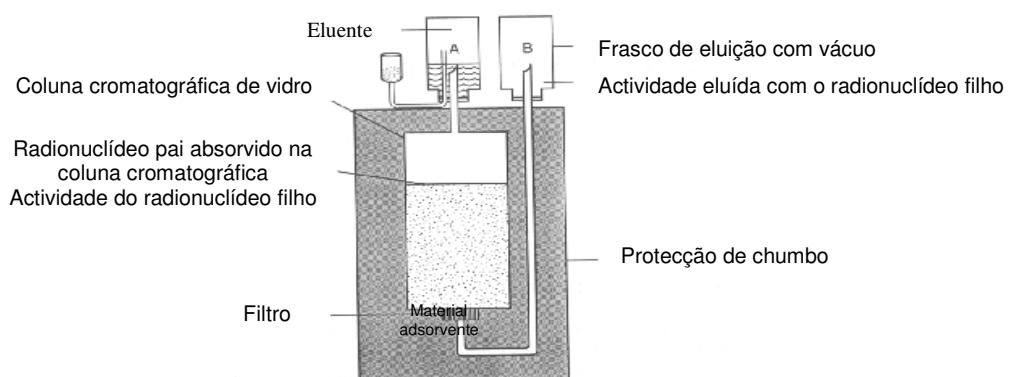
Introdução

O gerador de radionuclídeos corresponde a um equipamento que contém um radionuclídeo de período de desintegração físico longo que se transforma, gerando outro, curto, empregue na preparação extemporânea de radiofármacos.

O sistema gerador de radioisótopos, denominado de Molibdénio/Tecnécio ($^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$), foi desenvolvido com a finalidade de permitir uma utilização do $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ (perteconetato de sódio) sempre que necessário, em locais afastados da sua produção. Existem dois tipos genéricos destes aparelhos, correspondendo uns a sistemas de coluna seca e outros a sistemas de coluna húmida. A diferença fundamental entre os dois sistemas prende-se com o facto de, no de coluna húmida, existir um reservatório salino permanentemente em contacto com a coluna de troca iônica.

Geralmente estes dois sistemas específicos de geradores de radioisótopos, são constituídos por uma coluna de troca aniónica, formando um cilindro de vidro ou de plástico, contendo óxido de alumínio, onde o ^{99}Mo está adsorvido. A coluna cromatográfica apresenta a capacidade de reter este último, permitindo que apenas o perteconetato de sódio seja eluído. O gerador possui uma determinada espessura de chumbo de maneira a oferecer uma elevada segurança radiológica ao técnico manipulador.

A eluição do gerador húmido consiste na colocação de um frasco de solução isotónica salina (0,9% NaCl), com volumetria variável (5-20 ml) e de um outro frasco de vácuo protegido por chumbo de maneira a permitir a recollecção da solução isotónica salina final de perteconetato de sódio (Legenda 1).



Legenda 1: Gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ de coluna húmida.

Um radiofármaco poderá considerar ideal quando cumpridos determinados requisitos. Este deverá ser fácil de obter, apresentar baixo custo e o controlo de qualidade ser ensaiado através de procedimentos simples. Em diagnóstico, o radionuclídeo utilizado no processo de radiomarcação terá que apresentar um período de desintegração curto, mas com um tempo suficiente de permanência no órgão alvo de maneira a permitir a realização do estudo.

O radioisótopo empregue no processo de marcação deverá ser preferencialmente um emissor gama puro, com energias da ordem 100-300 KeV (Kilo Electron Volt), sem a emissão de partículas alfa (α) ou beta (β), utilizadas estas últimas, em terapêutica.

Os radiofármacos correspondem assim, a preparações farmacêuticas utilizadas em explorações diagnósticas e terapêuticas, contendo na sua constituição componentes radioactivos. Estes estão sujeitos a disposições que regulam a sua produção, comercialização e utilização, atendendo ora ao seu carácter de medicamento, ora ao de substância radioactiva.

As operações de fraccionamento, de diluição e de reconstituição, devem realizar-se sempre em boas condições higiénicas, devendo as doses preparadas ser etiquetadas, de maneira a identificar o radiofármaco, a actividade e o prazo de validade. As condições de higiene na preparação e na manipulação de radiofármacos devem ser as mesmas utilizadas na preparação de medicamentos injectáveis.

A preparação de cada radiofármaco deve realizar-se seguindo escrupulosamente as instruções particulares fornecidas pelo produtor.

Nos radiofármacos de preparação extemporânea, deve-se verificar a pureza radioquímica (não garantida pelo produtor), após a preparação e respectiva incubação.

A cromatografia é uma técnica simples e rápida usada para determinar a qualidade dos radiofármacos preparados. A cromatografia em papel ou em camada fina de sílica gel, em solução aquosa salina de NaCl 0,9% é usada para testar a presença de perteценato de sódio livre e de outras impurezas radioquímicas.

Ao contrário das macromoléculas, as células sanguíneas apresentam vários componentes (proteínas membranares, proteínas citoplasmáticas, pequenas moléculas reactivas e outros organitos celulares) que ligam os iões de perteценato de sódio reduzido, de acordo com a sua abundância, facilidade de acesso e locais reactivos, resultando assim, numa distribuição não homogénea das várias espécies de perteценato de sódio nas células marcadas. De uma maneira geral, as proteínas citoplasmáticas (hemoglobinas) existentes nos eritrócitos, ligam preferencialmente, os iões reduzidos de perteценato de sódio.

As lipoproteínas ligam os complexos lipossolúveis e as proteínas do plasma ligam os iões estanho e pertecnetato de sódio, retardando a incorporação celular. Devido a estes factores, a eficiência de marcação é muito maior no tampão salino do que no ácido, sendo igualmente elevada no meio ácido citrato dextrose (ACD).

As plaquetas e os glóbulos brancos são geralmente marcados com um radiofármaco lipossolúvel, denominado ^{99m}Tc -hexametilpropileno amino oxima (^{99m}Tc -HMPAO), tendo como utilização principal o diagnóstico de processos trombóticos e de infecção, respectivamente. Para o efeito, o processo de separação celular prévia, que inclui a sedimentação eritrocitária, centrifugação diferencial e a remoção de outros conteúdos celulares sanguíneos interferentes. A técnica em causa não específica, utilizada na radiomarcação destes dois tipos de populações sanguíneas, é em tudo semelhante, sendo denominada de *Monovette*, recorrendo ao processo de radiomarcação com hexametilpropileno amino oxima (HMPAO). Aquando deste processo, verifica-se na estrutura radiomarcada a presença de duas formas esterioisómericas (d,l e meso) com assimetria nos carbonos C3 e em C9, em que apenas será lipofílica a forma d,l. Durante a radiomarcação comprova-se a existência de complexos radiomarcados, com formas primárias lipofílicas, e secundárias hidrofílicas, sendo estas últimas do tipo reduzido e hidrolisado, com possibilidade de formação de complexos finais do tipo coloidal. De referir ainda, de que existe sempre a formação de pertecnetato livre, que não tendo sido reduzido previamente não terá sido quelado, ou mesmo proveniente do respectivo processo de reoxidação à sua forma original. O ^{99m}Tc -HMPAO é utilizado na preparação radiomarcada dos leucócitos e de trombócitos, podendo antes da sua incorporação celular ser auferido da sua necessária qualidade radiofarmacêutica. Nesta, poder-se-á realizar uma extracção com octanol, verificando-se o seu factor de repartição para esta fase orgânica ou mesmo através de sistemas simples cromatográficos. Os sistemas cromatográficos utilizados têm necessariamente que ver, com a determinação qualitativa e quantitativa, dos vários componentes radioquímicos, formados aquando do processo de preparação do radiofármaco. Deste modo, poder-se-ão utilizar três sistemas cromatográficos e complementares, em que no primeiro (ITLC-SG/Etilmetilcetona), se avalia a presença do complexo secundário hidrofílico (A), e do tecnécio reduzido e hidrolisado (C1). O segundo sistema cromatográfico (ITLC-SG/NaCl 0,9%), avalia a presença de tecnécio livre (B), enquanto o terceiro sistema cromatográfico (Whatman n.º1/Acetonitrilo), aufere da presença de tecnécio reduzido e hidrolisado (C2). Aquando da verificação final, na determinação da pureza radioquímica poder-se-á utilizar uma simples expressão: ^{99m}Tc -HMPAO + ^{99m}Tc livre = 100 (%A + %B + %C), em que %A = (%A + %C 1) - %C2, para uma

percentagem final desejada superior a 80%. Há que referir de que, apesar de todos os condicionalismos de utilização de uma solução isotónica salina de perteconetato de sódio, obtida a partir de um sistema gerador de Molibdénio/Tecnécio, eluído nas última 24 horas, e não mais do que 2 horas de utilização, os resultados finais para a determinação da Pureza radioquímica, para o radiofármaco em causa, nunca ultrapassam em muito o resultado esperado. Sendo assim, o radiofármaco em causa, deverá no entanto, de ser utilizado quase de imediato, até um prazo limite, nunca ultrapassável, de 45 minutos, após a sua preparação final.

Capítulo 2

Síntese de radiofármacos

A preparação de radiofármacos pode ser realizada por diferentes processos. No entanto, as reacções de substituição do isótopo e as de introdução de um grupo radioactivo diferente são as mais usuais.

I - Reacções de substituição do isótopo

Este processo não representa um verdadeiro fenómeno de quelação. Os átomos são substituídos por isótopos do mesmo elemento com diferentes números de massa. A ligação Carbono-íodo apresenta maior estabilidade quando ocorre num sistema aromático (o anel benzénico de resíduos de tirosina é o local preferencial de iodação em proteínas). Esta técnica é geralmente utilizada para preparar compostos radioactivos com aplicações *in vitro* ou em radiofármacos com iodeto ou outros isótopos que emitam radiação β . As propriedades químicas da molécula inicial são idênticas às da molécula marcada com o radionuclídeo. Apresentam-se como exemplos os radiofármacos ^{125}I -triiodotironina e ^{131}I -orto iodo hipurano.

II - Introdução de um grupo radioactivo diferente

O radionuclídeo é conjugado na molécula a fim de produzir um composto radioactivo com a distribuição biológica desejada. O elemento ou o grupo radioactivo introduzido é estranho à molécula. Temos como exemplo a marcação de um fármaco com perteconetato de sódio.

I - Marcação com Tecnécio

O gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ é a fonte de obtenção do $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$. A diferença de carga entre os iões ^{99}Mo e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ permite que só este último seja eluído da coluna.

O Tecnécio é um metal de transição que pertence ao grupo 7-B da Tabela Periódica, apresentando o número atómico 43. O estado de oxidação de um elemento é uma propriedade química que determina o tipo de composto ou de ião formado. Os metais de transição apresentam a capacidade de existir em vários estados de oxidação, cada um com distinta configuração electrónica. O Tecnécio pode apresentar estados de oxidação com valores compreendidos entre (-1) e (+7). O estado de oxidação (+7) é o mais estável, não sendo, no entanto, particularmente reactivo. Este pode ser reduzido a estados mais baixos de oxidação, graças a uma reacção instantânea com estanho (fonte de electrões), não requerendo quaisquer outras manipulações laboratoriais.

As moléculas do ligando (oxigénio, azoto, enxofre e cloro) devem conter elementos capazes de fornecer um par de electrões às orbitais metálicas vazias, de maneira a formar uma ligação coordenada.

O número de ligações (ligando-metal) é usualmente quatro ou seis para a maior parte dos iões metálicos de transição. Quando estes iões são dissolvidos em água existem na forma hexaquo $[M(H_2O)_6]^{n+}$, onde a formação de complexos com outros ligandos envolve a reacção de substituição, nas quais as moléculas de água são progressivamente substituídas por ligandos mais fortes.

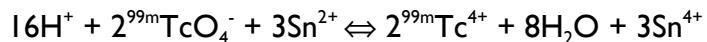
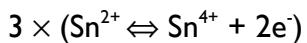
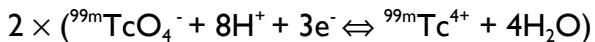
Este processo tende a ser térmico e cineticamente mais estável:



A distribuição biológica é devida essencialmente às propriedades químicas do complexo de coordenação formado entre o $^{99m}TcO_4^-$ e um dador ligando.

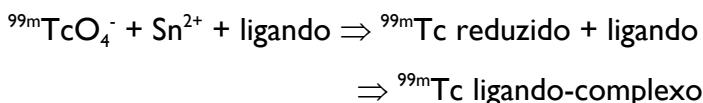
A quantidade de $^{99m}TcO_4^-$ que permanece nos tecidos do corpo é extremamente reduzida, apresentando valores da ordem dos 10^{-6} a 10^{-8} M.

As reacções típicas deste tipo de marcação são as seguintes:



Podem ser encontrados vários estados de oxidação para o Tecnécio $[(+1) \Rightarrow (+6)]$.

De seguida a sua forma reduzida pode reagir com os agentes quelantes de maneira a formar vários radiofármacos. Para que o radiofármaco tenha eficácia é essencial que a quase totalidade de $^{99m}TcO_4^-$ se ligue ao fármaco (superior a 95%).



O pertecnetato de sódio pode existir em pelo menos três formas químicas diferentes: forma de quelato ou de ligando (captada pelo órgão em estudo), forma reduzida ou hidrolisada e forma de ião $^{99m}\text{TcO}_4^-$.

A forma reduzida ou hidrolisada envolve grupos de compostos químicos, como o colóide estanhoso formado na presença de água, o composto coloidal formado com hidróxido estanhoso obtido da hidrólise, e o dióxido de Tecnécio insolúvel na água, obtido como resultado da hidrólise do pertecnetato de sódio reduzido.

O ião $^{99m}\text{TcO}_4^-$ pode estar presente como ião livre ou como produto de reoxidação.

O Tecnécio nos estados de baixa oxidação (+3), (+4) e (+5) é instável, podendo oxidar-se ou dismutar-se de maneira a preservar o seu estado mais estável de oxidação (+7) e a formar complexos com moléculas de água. A forma (+4) gera facilmente óxidos e hidróxidos de Tecnécio. Como consequência, o Tecnécio reduzido deverá ser estabilizado por um ligando capaz de formar complexos estáveis de coordenação.

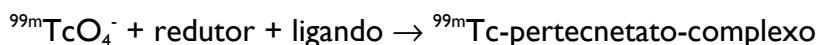
Devido à instabilidade do Tecnécio nos estados de oxidação mais baixos, a marcação deverá estar livre de produtos secundários que são classificados como impurezas.

As impurezas radioquímicas podem competir nas reacções químicas durante o processo de radiomarcação. Estas podem surgir por decomposição do produto final por fenómenos de radiólise, pela presença de agentes oxidantes ou redutores, por trocas de pH ou de temperatura, pela presença de solvente e ainda pela exposição à luz.

As células do sangue podem ser marcadas com pertecnetato de sódio usando métodos *in vitro/vivo*. O estanho e o $^{99m}\text{TcO}_4^-$ difundem para o seu interior. Aqui, o estanho permanece reduzido, provavelmente devido à interacção com grupos intracelulares sulfidrilo.

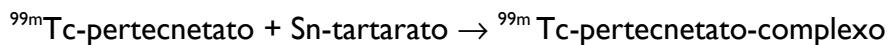
Nos eritrócitos, a adição de estanho seguido de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ resulta na redução e ligação intracelular deste último em cerca de 80% à cadeia β da globina e de 20% ao grupo heme.

De uma maneira geral, a maior parte dos complexos de Tecnécio são preparados pela redução do $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (acção do cloreto de estanho) na presença de um ligando.



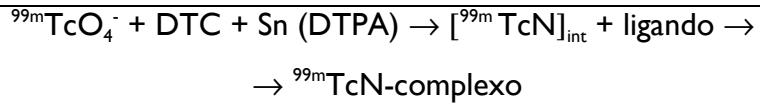
Podem ainda utilizar-se outros agentes redutores, tais como os ácidos sulfínico e formidínico. A reacção de redução engloba a de redução-substituição, para a qual o ligando apresenta propriedades redutoras (tióis, fosfinas e arsinas), incorporando-se na esfera de

coordenação do metal. Um caso particular refere-se ao tartarato estanhoso em que o estanho funciona como agente redutor e o ião tartarato como ligando.



Na via de substituição é envolvida a formação prévia de um complexo intermédio de Tecnécio que possui elevada estabilidade para as reacções de oxidação-redução, mas não para as reacções de substituição. O radiofármaco de Tecnécio é produzido por simples substituição do ligando no substrato intermédio sem troca do estado de oxidação do metal, não existindo qualquer alteração do núcleo de Tecnécio.

Os ligandos lábeis (como o tartarato, o citrato e o glucoheptonato), formam realmente complexos em que os grupos carboxilato e hidroxilo são envolvidos. O composto S-metil, N-metilditiocarbazato (DTC) e o complexo intermédio resultante ligam-se numa reacção de substituição com um ligando apropriado (reacção realizada em meio ácido, à ebulação com fosfina).



Capítulo 3

Biodistribuição

I - Conceitos gerais

De uma maneira geral, os complexos de iões metálicos radioactivos apresentam uma biodistribuição semelhante à do sal do ião metálico livre.

Existe uma competição natural para o metal pelos ligandos naturais (aminoácidos, peptídeos e nucleotídeos). Há proteínas com grande especificidade para a ligação do metal (transferrina para o Fe^{3+} ; ceruloplasmina para o Cu^{2+}).

Por vezes ocorre a possibilidade de substituição do ião central metálico por metais endógenos, capazes de formar complexos mais estáveis com o ligando. A existência de condições variáveis de pH ou de potencial redox pode também ter um efeito pronunciado no comportamento do complexo *in vivo*.

A biodistribuição do radiofármaco depende da quantidade administrada. Para baixas actividades específicas no complexo, pode haver elevadas quantidades do metal não radioactivo. A existência de uma pequena proporção do complexo dissociado poderá provocar a saturação dos locais de ligação do metal nos tecidos.

A biodistribuição dos radiofármacos depende, entre outros factores, do seu peso molecular. Os radiofármacos com peso molecular inferior a 500 são excretados por via renal, e os que apresentam peso molecular situado entre 500-1.000 possuem excreção biliar preferencial, enquanto que, para aqueles com peso molecular superior a 1.000 são retidos na circulação.

II - Factores que alteram a biodistribuição

I - Físico-Químicos

Quando se retira a dose do radiofármaco preparado, dever-se-á evitar a introdução de ar atmosférico, o que poderá provocar a oxidação do complexo de Tecnécio. Este fenómeno geralmente origina o aumento de perteconetato de sódio livre resultando na sua captação pelo estômago, pela tiróide e pelos plexos coróides.

Uma administração deficiente ou a utilização de certos desinfectantes pode provocar o aparecimento de partículas coloidais, com uma subsequente captação nos sistemas retículo endotelial e hepático.

A reacção entre as cânulas de plástico e o ião estanhoso pode interferir com a marcação de eritrócitos *in vivo*, diminuindo a eficácia de marcação e subsequentemente a biodistribuição dos eritrócitos marcados.

Podem surgir fenómenos de radiólise dos compostos marcados com radionuclídeos de período de desintegração elevado.

2 - Interacções toxicológicas

Muitos medicamentos podem interferir com a normal biodistribuição dos radiofármacos.

As drogas citostáticas deprimem o metabolismo podendo haver o risco de acumulação de radiofármacos nos rins devido a efeitos tóxicos nos túbulos renais. A cardiotoxicidade induzida por drogas citostáticas (como a adriamicina), resulta na diminuição da acumulação de Tálio (^{201}TI) no miocárdio.

Muitos antibióticos podem afectar a função tubular renal, resultando num aumento da captação do fosfato marcado com Tecnécio ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$) e de outros complexos.

A bleomicina e a nitrofurantoína induzem inflamação pulmonar provocando um aumento anormal da concentração de ^{67}Ga -citrato nas áreas afectadas.

3 - Carga iónica

As moléculas sem carga apresentam liposolubilidade penetrando nas membranas celulares. Temos como exemplo os radiofármacos ^{111}In -oxina e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -hexametilpropileno amino oxima. A presença de constituintes lipofílicos permite a sua localização no tecido muscular, nomeadamente no miocárdio (complexos de isonitrilo).

As moléculas carregadas negativamente (carboxilato, sulfeto), co-existindo com grupos hidrofílicos, facilitam a excreção renal.

A existência de anéis aromáticos ou de quelatos (especialmente em mais do que um plano) facilitam a excreção biliar. Esta poderá ainda aumentar, se a molécula contiver igualmente grupos hidrofílicos muito bem separados dos lipofílicos (complexo do ácido iminodiacético marcado com Tecnécio).

Capítulo 4

Radiomarcação de eritrócitos

I - Introdução

Os eritrócitos são marcados frequentemente *in vivo* pelo método da pré-estanhação. Neste tipo de estudo são administrados 2-4 mg de complexo pirofosfato estanhoso. Depois de uma espera de 30 minutos, o doente é injectado com 555 MBq (15 mCi) de $^{99m}\text{TcO}_4^-$. Durante o período de espera, cerca de 30-40% de iões Sn^{2+} localizam-se no tecido ósseo e 40-50% de iões Sn^{2+} são excretados pelos rins. Cerca de 5-8% de Sn^{2+} entra no glóbulo vermelho, ficando aí retido por um longo período de tempo devido à sua ligação à hemoglobina. O $^{99m}\text{TcO}_4^-$ entra nos eritrócitos por difusão, via canais aniónicos, competindo com o Ca^{2+} . Depois da redução intracelular com os iões Sn^{2+} , os iões reduzidos ($\text{Tc} = \text{O}^3$) ligam-se à hemoglobina, preferencialmente à sua cadeia β . Neste processo de marcação aleatório, existe um pequeno número de pequenas moléculas que são igualmente marcadas. Estas pequenas moléculas marcadas com Tecnécio continuam ligadas às células sendo excretadas por via renal.

Existem diversas drogas (heparina, dextrano, doxorubicina, hidralazina, penicilina, quinidina e meios de contraste iodados) e proteínas (imunoglobulinas) que podem inibir o transporte do Sn^{2+} através da membrana do eritrócito, por quelação.

O princípio básico de marcação dos glóbulos vermelhos com pertecnetato de sódio envolve a mistura dos eritrócitos com iões Sn^{2+} seguido da adição de $^{99m}\text{TcO}_4^-$. O ião Sn^{2+} entra no eritrócito e subsequentemente o ião $^{99m}\text{TcO}_4^-$ difunde para o seu interior. O Sn^{2+} reduz o Tecnécio (7+) a um estado de oxidação menor; cerca de 80% deste vai-se ligar à cadeia β da globina e 20% ao heme.

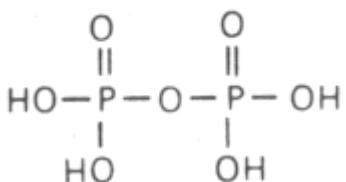
Vários quelatos de Sn^{2+} têm sido propostos dependendo da fonte de estanho. O estanho pode provir do citrato estanhoso, do gluceptato estanhoso ou do pirofosfato estanhoso. Estes são exclusivamente utilizados na marcação de eritrócitos com pertecnetato de sódio. A adição directa de eritrócitos a uma mistura de pertecnetato de sódio não realiza só por si o processo de marcação.

Existem três metodologias geralmente utilizadas na marcação de glóbulos vermelhos com $^{99m}\text{TcO}_4^-$: os métodos *in vivo*, *in vivo* modificado e *in vitro*.

II - Métodos de marcação

I - Método *in vivo*

No método *in vivo*, o *kit* estanhoso (Pirofosfato) é reconstituído com 1-3 ml de solução salina isotónica, sendo administrado ao doente por via endovenosa 10-20 mg/Kg de ião Sn^{2+} (Legenda 2). Depois de uma espera de 20-30 minutos é administrada uma dose de 555 MBq (15 mCi) de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ que se liga de imediato aos eritrócitos. A eficiência de marcação dos eritrócitos é de 80-90%.



Legenda 2: Fórmula estrutural do fármaco pirofosfato.

2 - Método *in vivo modificado*

Este método corresponde a uma modificação do método *in vivo* utilizando um sistema de torneira de três vias. Uma das aberturas de uma torneira de três vias é ligada a uma seringa com 740-1.110 MBq (20-30 mCi) de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$, enquanto que, outra das aberturas se liga a uma seringa heparinizada. Cerca de 20 minutos depois da injeção do *kit* estanhoso, retira-se 3 ml de sangue para uma seringa com perteconetato de sódio para incubação durante 10 minutos, com agitação suave. As células marcadas são então reinjectadas ao doente. Este método apresenta eficiência de marcação de 95%.

3 - Método *in vitro*

O meio salino de lavagem e as células são incubados com 5-50 mg de Sn^{2+} fornecido sob a forma de citrato de estanho ou de pirofosfato estanhoso. O excesso de Sn^{2+} não incorporado é lavado com uma solução salina estéril, oxidada de hipoclorito de sódio. Seguidamente são adicionados 555 MBq (15 mCi) de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ aos eritrócitos e incubados durante 5 minutos. O $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ não ligado é removido por centrifugação. Depois da diluição com a solução salina estéril, as células marcadas com perteconetato de sódio são administradas por via endovenosa. A eficiência de marcação é superior a 95%.

4 - Utilização clínica

Emprega-se frequentemente em imagens de compartimento sanguíneo e na detecção de locais de hemorragia gastrointestinal.

III - Eritrócitos fragilizados pelo calor

I - Utilização clínica

A fragilização dos eritrócitos marcados permite a avaliação de tecido esplénico funcionante, nomeadamente em situações de baço acessório e no estudo funcional de autotransplante após traumatismo esplénico.

2 - Protocolo de marcação

1. Administrar ao doente por via endovenosa, metade do *kit* estanhoso.
2. Após cerca de 20 minutos, colher 5-10 ml de sangue em seringa com 100 unidades de heparina.
3. Introduzir num frasco estéril, com rolha de borracha, aliviando a pressão na seringa, quando necessário.
4. Centrifugar a 2.500 r.p.m. durante 5 minutos e retirar o sobrenadante (colocar agulha de entrada de ar).
5. Aquecer em banho-maria à temperatura estável de 49-50 °C durante 20 minutos, com agitação ocasional.
6. Lavar duas vezes, introduzindo cerca de 10 ml de soro fisiológico, centrifugando a 2.500 r.p.m. durante 5 minutos e retirando o sobrenadante.
7. Introduzir no frasco cerca de 74 MBq (2 mCi) de perteconetato de sódio, misturando bem por inversão do frasco. Deixar em repouso à temperatura ambiente durante 5 minutos.
8. Lavar uma vez com solução isotónica salina (NaCl 0,9%).
9. Após retirar o sobrenadante, ressuspender em NaCl 0,9%, perfazendo um volume de cerca de 8 ml.
10. Administrar por via endovenosa, colhendo imagens a partir dos 30 minutos.

IV - Volume eritrocitário e plasmático

I - Forma de apresentação do Crómio-51

O Crómio-51 (^{51}Cr) apresenta uma vida média física de 17,8 dias. Depois de passar através da superfície membranar dos eritrócitos, o cromato de sódio é reduzido à forma trivalente ligando-se às proteínas, preferencialmente às cadeias β -polipeptídicas da hemoglobina.

O ^{51}Cr apresenta toxicidade para os eritrócitos provavelmente pela sua acção oxidante inibindo a glicólise quando presente numa concentração de 10 mg/ml de eritrócitos (blockeando a actividade da glutationa reductase a uma concentração superior a 5 mg/ml). O sangue não deverá ser exposto a mais que 2 mg de $^{51}\text{Cr}/\text{ml}$ de eritrócitos.

O Na_2CrO_4 radioactivo é apresentado comercialmente com uma actividade específica de 37 MBq/ml (1 mCi/ml). Este é geralmente dissolvido em 9 mg/ml NaCl. É conveniente diluir esta solução padrão com NaCl 0,9% preparando ampolas de 1.850-3.700 GBq (50-100 μCi) que serão posteriormente esterilizadas por autoclavagem.

2 - Marcação de eritrócitos com Crómio-51

Para marcar eritrócitos eficientemente com ^{51}Cr adiciona-se 1.850-3.700 GBq (50-100 μCi) de ^{51}Cr -cromato de sódio a 20-30 ml de sangue humano contendo 3 ml de ACD. A mistura é posteriormente incubada em banho-maria a 37 °C, durante 20 minutos, com agitação ocasional. É de seguida arrefecido durante 10 minutos à temperatura ambiente, adicionando-se 100 mg de ácido ascórbico a fim de reduzir o Cr^{6+} não ligado a Cr^{3+} . As células são de seguida lavadas e suspensas em 10 ml de solução salina para injecção. A eficácia de marcação é cerca de 80-90%. Quando os eritrócitos marcados com ^{51}Cr são utilizados para medir a sua sobrevivência, a mistura marcada é injectada sem lavagem do Cr^{3+} . Este é excretado na urina durante várias horas. A marcação de eritrócitos com ^{51}Cr é frequentemente utilizada para medir a massa de glóbulos vermelhos e a sua sobrevida.

3 - Utilização clínica

A determinação do volume eritrocitário é particularmente útil em doentes com policitémia, especialmente na avaliação da resposta ao tratamento.

A determinação do volume plasmático apresenta aplicação em estudos de síndromes mieloproliferativos (poliglobulias).

4 - Protocolo de marcação (Volume eritrocitário)

Há que obter previamente a história clínica, o peso e a altura do doente.

1. Colher 10 ml de sangue numa seringa com 1,5 ml de ACD.
2. Introduzir a solução num frasco esterilizado com rolha de borracha.
3. Centrifugar a 2.500 r.p.m. durante 10 minutos.
4. Retirar o sobrenadante e camada branca quanto possível (usar agulha 0,9/50 e outra para entrada de ar).
5. Adicionar 0,5 μCi ^{51}Cr (NaCrO_4^-)/Kg de peso, num volume mínimo de 0,2 ml e concentração máxima de 2 mg de $^{51}\text{Cr}/\text{ml}$ de glóbulos vermelhos (agitando continuamente).

6. Incubar durante 20 minutos à temperatura ambiente, com agitação ocasional.
7. Retirar cerca de 2 ml dos glóbulos marcados para novo frasco, sendo estes utilizados nos passos seguintes.
8. Adicionar aproximadamente 10 ml de NaCl 0,9%, misturar bem e centrifugar a 2.500 r.p.m. durante 5 minutos. Retirar o sobrenadante.
9. Repetir a operação anterior.
10. Refazer um volume de aproximadamente 8 ml com soro fisiológico.
11. Misturar bem e retirar 5 ml numa seringa calibrada sem bolhas de ar.
12. Sem mudar de agulha administrar por via endovenosa.
13. Após cerca de 30 minutos, colher 6 ml de sangue em seringa de 10 ml heparinizada, para determinação do micro-hematórito e para contagens.
14. Preparar um padrão com a suspensão administrada - 1 em 100 com NaCl 0,9%.
15. Colher 2 ml de cada amostra para tubo de contagem e hemolizar com uma gota de hemolizante ou pontada de saponina (agitá-lo levemente não invertendo o tubo). Determinar a actividade em contador de poço durante 10 minutos. 1^a e 2^a vez no pico do ⁵¹Cr. Repetir a contagem se houver variação superior a 2%.
16. Contar 2 ml do padrão durante o mesmo tempo, 1^a e 2^a vez.
17. Realizar contagens de fundo.
18. Registar os valores.

O volume eritrocitário pode ser calculado pela seguinte expressão:

$$\text{Volume eritrocitário} = \text{volume sanguíneo} \times \text{hematórito} \times 0,92$$

5 - Protocolo de marcação (Volume plasmático)

Administra-se ao doente por via endovenosa cerca de 1,85-3,7 GBq (50-100 µCi) de uma suspensão de eritrócitos marcados com ⁵¹Cr usando uma alíquota da suspensão como padrão. É colhida uma amostra de sangue cerca de 15-20 minutos depois da administração endovenosa, sendo determinado de seguida o hematórito. A amostra de plasma, a amostra de sangue total e o padrão são contados num contador de poço [NaI (TI)].

$$\text{Volume plasmático} = \text{Cs} \times \text{Vs} / \text{Cp}$$

C_s = radioactividade (contagens / minuto) medida num padrão de 1 ml

V_s = volume (ml) do padrão corrigido

C_p = radioactividade (contagens / minuto) medida em 1 ml de plasma da fracção de dose injectada

$$\text{Volume sanguíneo} = \text{Volume plasmático} / 1 - (\text{hematócrito} \times 0,92)$$

em que 0,92 corresponde ao factor de correcção para a oclusão plasmática nos glóbulos vermelhos e para a diferença entre o hematócrito venoso e de corpo total.

V – Determinação da Semi-vida Eritrocitária

1 - Utilização clínica

Pretende-se com esta metodologia averiguar o tempo de destruição eritrocitário e o local onde se realiza (geralmente no tecido esplénico). Utiliza-se frequentemente para estudos de anemia hemolítica.

Nas situações de anemia tem interesse saber qual o tempo de semivida eritrocitária.

Os eritrócitos normais têm uma semi-vida de cerca de 120 dias com uma perda normal por envelhecimento que ronda os 0,8%.

Este estudo apesar de moroso e obrigar à disponibilidade do doente durante vários dias tem uma particular importância clínica pois, mantém-se como o único método disponível para determinar a semi-vida eritrocitária.

2 - Protocolo de marcação

É administrado ao paciente cerca de 1,85 GBq (50 μ Ci) de ^{51}Cr -eritrócitos, sendo realizada colheita de sangue 24 horas depois (considerada como uma amostra de 100%). Várias amostras de sangue de 6-10 ml são então obtidas cada 48 horas até que a actividade da última amostra seja inferior à amostra considerada como 100%. Uma alíquota de cada amostra de sangue é tomada e seguidamente hemolizada. Todas as amostras são contadas em contador de poço no mesmo dia para evitar a correcção do decaimento. As actividades são de seguida correlacionadas contra o tempo de administração, sendo o tempo de sobrevida eritrocitária calculado através de uma curva. A gama de valores normais encontra-

se entre 25-33 dias, com um valor médio de 28 dias. No caso de doentes com anemia hemolítica o tempo de semi-vida eritrócitária é muito inferior ao valor considerado normal.

Para a marcação dos eritrócitos autólogos com ^{51}Cr utilizam-se os meios técnicos anteriormente descritos.

Para as contagens das amostras sanguíneas utiliza-se um contador de poço.

3 – Procedimentos

Após a realização de uma breve história clínica colhem-se 8,5 ml de sangue para uma seringa de 10 ml com 1,5 ml de ACD (ácido citrato de dextrose).

Marcam-se os eritrócitos autólogos com ^{51}Cr -cromato de sódio.

Após a administração intravenosa dos eritrócitos marcados com ^{51}Cr fazem-se colheitas de 2 ml de sangue em dias sucessivos. A primeira colheita faz-se 1 hora depois (Dia 0) e corresponde à radioactividade basal em circulação. Seguidamente fazem-se 3 colheitas entre o Dia 2 e o Dia 7 e posteriormente realizam-se duas colheitas por semana até que a radioactividade atinja 50% da inicial.

As amostras são armazenadas a 40 °C e deverão ser contadas apenas no final do estudo, eliminando assim, a necessidade de entrar com o factor de decaimento.

Cada amostra é contada duas vezes repetindo-se o procedimento se a variação for superior a 2% e calcula-se a média das duas.

A radioactividade de cada amostra é dividida pelo hematócrito de cada dia para eliminar a influência de variações de volume e comparada com a do Dia 0 (Legenda 3):

Amostra do Dia t

_____ X 100

Amostra do Dia 0

(É necessário fazer a correcção da normal eluição recorrendo a uma tabela de eluição).

Apresenta uma tabela modelo para registo dos resultados:

Day							1	5	8
Média									
Média/Hemató crito (Ht)									
 (A)									
A/Day 0x100 (B)									
BxFactor de eluição (FE)									

Legenda 3: Modelo para registo dos dados obtidos.

Com os valores obtidos constrói-se um gráfico em função do tempo sendo possível obter três gráficos diferentes:

1. Linha recta num gráfico aritmético.

A semivida é dada pelo ponto em que a linha ou o seu prolongamento cruza o eixo das abcissas.

2. Linha recta num gráfico semi-logarítmico.

A semivida é dada pelo ponto em que a linha ou o seu prolongamento cruza o eixo das abcissas multiplicado por 1,44.

3. Não é possível obter uma linha recta nem num gráfico aritmético nem num gráfico semi-logarítmico.

Este tipo de gráfico ocorre quando existe uma “população dupla”.

Sendo assim, opta-se pela realização de um gráfico aritmético e a semi-vida da população total pode ser deduzida aproximadamente desenhando uma tangente à porção inicial da curva e corresponderá ao ponto em que esta tangente cruza o eixo das abcissas.

VI – Determinação dos Locais de Sequestro Eritrocitário

I - Utilização clínica

Perante um quadro de anemia clinicamente diagnosticada com normal produção eritrocitária a nível medular conclui-se que os eritrócitos estão a ser exageradamente destruídos.

Os locais de destruição dos eritrócitos podem ser determinados através da realização de contagens externas em dias sucessivos a nível do baço, fígado e coração.

Podem verificar-se quatro padrões:

a) Acumulação excessiva no baço:

- esferocitose hereditária
- eliptocitose hereditária
- alguns casos de anemia hemolítica hereditária

b) Acumulação excessiva no fígado:

- apenas na anemia falciforme em particular em doentes idosos

c) Acumulação excessiva quer no fígado, quer no baço:

- alguns casos de anemia hemolítica autoimune

d) Ausência de acumulação excessiva quer no fígado, quer no baço:

- alguns casos de anemias hemolíticas associadas a deficiências enzimáticas como a hemoglobinúria paroxística nocturna

Os doentes que apresentem o primeiro padrão e em menor grau os que apresentam o terceiro beneficiarão de esplenectomia. Os restantes por outro lado, apenas terão os inconvenientes de uma intervenção cirúrgica que em nada os beneficiará.

Este estudo apesar de moroso, de difícil realização e obrigar à disponibilidade do doente durante vários dias tem uma particular importância clínica pois mantém-se como o único método disponível para determinar os locais de sequestro eritrocitário.

2 -Protocolo de marcação

Para a marcação dos eritrócitos autólogos com ^{51}Cr utilizam-se os meios técnicos anteriormente descritos.

Para a realização das contagens externas utiliza-se um contador externo.

3 - Procedimentos

Após a realização de uma breve história clínica colhem-se 8,5 ml de sangue para uma seringa de 10 ml com 1,5 ml de ACD (ácido citrato de dextrose).

Marcam-se os eritrócitos autólogos com ^{51}Cr -cromato de sódio.

É essencial que as contagens realizadas em dias sucessivos sejam feitas sempre nas mesmas condições, abrangendo exactamente a mesma área, com o doente e o detector exactamente nas mesmas posições. Para isso é conveniente que o doente esteja sempre em decúbito dorsal e que se marque na pele os locais a contar:

- a) Coração - terceiro espaço intercostal junto ao bordo esquerdo do esterno.
- b) Fígado - linha média entre as linhas médio-clavicular axilar anterior direita, 3 a 4 cm acima do rebordo costal.
- c) Baço - local de máxima actividade na primeira avaliação. (Há trabalhos que recomendam que o baço deve ser visualizado através de um estudo com eritrócitos fragilizados marcados com $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$).

A primeira contagem realiza-se 30 a 60 minutos após a administração intravenosa dos eritrócitos autólogos marcados com ^{51}Cr (Dia 0). Seguidamente realizam-se diariamente e posteriormente em dias alternados perfazendo um total de pelo menos 8 avaliações.

Devem pelo menos obter-se 2.500 contagens por medição e devem fazer-se sempre duas que serão repetidas se a diferença entre elas for superior a 2%.

Depois do Dia 0, as contagens têm que ser corrigidas recorrendo a uma tabela de decaimento.

A contagem do Dia 0, a nível cardíaco é tomada como 1000 e todas as outras são proporcionalmente normalizadas.

A diminuição progressiva das contagens a nível cardíaco será um paralelo da diminuição dos eritrócitos marcados em circulação e teoricamente as contagens a nível hepático e esplénico devem diminuir também de forma paralela. Tal só não acontece se houver sequestro eritrocitário nestes órgãos traduzindo-se por excesso de contagens que será a diferença entre as contagens esperadas atendendo à diminuição a nível cardíaco e aquelas registadas.

É ainda útil calcular um índice Baço/Fígado que reflecte a acumulação relativa dos eritrócitos. Considera-se o índice do Dia 0, como 1.00 e os restantes são proporcionalmente normalizados (Legenda 4).

Apresenta uma tabela modelo para registo dos resultados.

Dia								
<u>Coração</u>								
<u>Fígado (F)</u>								
C. actuais								
C. esperadas								
Excesso								
<u>Baço (B)</u>								
C. actuais								
C. esperadas								
Excesso								
<u>Indice B/F</u>								
Actual								
Normalizado								

Legenda 4: Modelo para registo dos dados obtidos.

Capítulo 5

Radiomarcação de leucócitos

I - Introdução

A medicina nuclear apresenta vantagens sobre outras técnicas de diagnóstico por imagem, como a radiologia convencional, ecografia, tomografia axial computorizada e ressonância magnética nuclear. É a única que pode indicar um foco infeccioso antes da formação do abcesso, sendo útil em doentes onde se perderam as referências normais por cirurgia ou por traumatismos.

Existe uma procura contínua do radiofármaco ideal para a marcação dos leucócitos. Este deve apresentar ampla disponibilidade, baixo custo e ausência de respostas imunológicas. Não deve existir acumulação significativa no sangue, fígado, baço, medula, tracto gastrointestinal, devendo verificar-se rápida localização no local de infecção ou de inflamação.

Desde 1971 que se utiliza o ^{67}Ga -citrato para a localização de lesões inflamatórias. No entanto, este radiofármaco não corresponde ao ideal, pois a sua energia de radiação não é a mais adequada para a câmara gama. Por outro lado, apresenta um tempo prolongado para a obtenção dos resultados (24, 48 e 72 horas), e eliminação intestinal, o que dificulta o estudo da patologia abdominal. Apresenta igualmente falta de especificidade, pois é captado indiferentemente pelo tecido neoplásico, inflamatório e infectado e normalmente pelo fígado, baço e medula óssea.

II - Leucócitos e resposta inflamatória

O homem adulto apresenta aproximadamente 7.000 glóbulos brancos por mm^3 de sangue. Estes compreendem neutrófilos polimorfonucleares (62%), eosinófilos (2,3%) e basófilos (0,4%). Devido à aparência granulada do seu citoplasma são denominados frequentemente de granulócitos. Os restantes leucócitos são os monócitos (5,3%) e os linfócitos (30%). Os valores apresentados são tomados como médios.

A vida média dos leucócitos no sangue circulante está limitada ao tempo necessário para o seu transporte desde o local de produção, na medula óssea ou tecido linfóide, até às zonas do organismo onde são requeridos. O tempo de vida média dos neutrófilos polimorfonucleares, uma vez libertados da medula óssea, é normalmente de 6-8 horas no sangue circulante e de 2-3 dias nos tecidos. Quando se produz uma infecção, este período de tempo encurta-se para umas horas.

Os monócitos apresentam uma vida média curta no sangue, podendo existir nos tecidos, como macrófagos, durante meses.

Os linfócitos podem apresentar uma vida média prolongada, chegando alguns a 100-300 dias e por vezes a anos. Estes são misturados ciclicamente na corrente sanguínea, conjuntamente com a linfa, permanecendo aí poucas horas. Entram nos tecidos por *diapedesis*, reentrando na linfa, de onde voltam ao sangue.

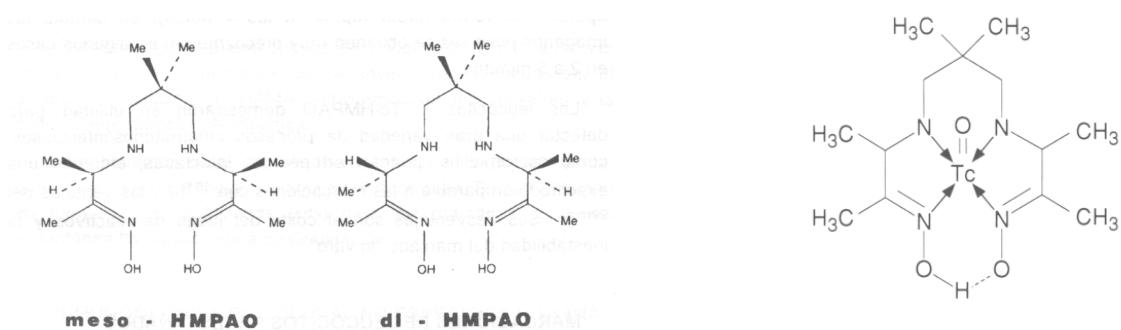
São fundamentalmente os neutrófilos e os monócitos as células envolvidas na resposta inflamatória.

III - Técnica de separação

Os leucócitos são inicialmente separados do sangue total por centrifugação e por lavagem com uma solução isotónica salina. É adicionada uma solução salina ou ACD (ácido citrato dextrose) como anticoagulante. O agente sedimentante HES (hidroxietilamida 6%) é adicionado a fim de promover a sedimentação dos eritrócitos. Os leucócitos são separados por centrifugação a 200 G e lavados com solução salina isotónica. Os leucócitos obtidos por esta técnica estão parcialmente contaminados com eritrócitos e plaquetas. O nível da contaminação não deverá comprometer significativamente a eficiência da marcação. A marcação em solução salina é preferível à realizada em plasma, pois o Tecnécio liga a transferrina mais avidamente do que os leucócitos.

IV - Marcação e controlo de qualidade

Em 1986 Peter et al descreveram o uso do hexametilpropileno amino oxima marcado com Tecnécio (^{99m}Tc -HMPAO) para radiomarcar leucócitos. Este composto foi originariamente desenvolvido para perfusão regional cerebral. Nas duas formas esterioisómeras (**d**, **I** e **meso**), existe uma assimetria nos carbonos 3 e 9. A forma **d-I** é no entanto lipofílica, penetrando na membrana celular. Esta, no interior da célula, converte-se numa substância hidrofílica (Legenda 5). Esta marcação requer a separação prévia dos leucócitos, pois a fixação do radiofármaco realiza-se de uma forma relativamente indiscriminada. A cinética dos leucócitos marcados com ^{99m}Tc -HMPAO apresenta actividade predominantemente esplénica com captação hepática e medular. Este radiofármaco constitui um agente amplamente difundido para localizar infecções, proporcionando excelentes imagens do foco infeccioso.



Legenda 5: Esterioisómeros do fármaco hexametilpropilenoamino oxima. Ligação do radionuclídeo ao HMPAO.

O ^{99m}Tc -HMPAO é um complexo neutro lipofílico, semelhante ao ^{111}In -oxina, sendo utilizado como agente de marcação para leucócitos. Os leucócitos separados são suspensos em plasma e ACD e o radiofármaco é-lhes adicionado. As células são incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente, sendo de seguida lavadas com plasma e finalmente suspensas em plasma, para reinjecção. A eficiência da marcação geralmente é da ordem dos 50-60%, mantendo-se a integridade celular.

O perteconetato de sódio utilizado deverá cumprir as especificações da Farmacopeia Europeia, contendo uma elevada concentração radioactiva e procedente de um gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ eluído nas 24 horas anteriores, apresentando menos de 2 horas desde a última eluição.

Com o processo de marcação forma-se um complexo muito lipossolúvel (complexo primário) responsável pelo comportamento deste medicamento, mas instável, pois vai alterando espontaneamente a sua estrutura para originar outro complexo não lipossolúvel (complexo secundário). O radiofármaco preparado apresenta um tempo de utilização de cerca de 30 minutos desde o momento da sua preparação.

No radiofármaco preparado é indispensável a determinação da pureza radioquímica, na qual há que distinguir a presença de Tecnécio nas suas três formas químicas diferentes: complexo secundário, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ livre e complexo reduzido hidrolisado. A fracção de actividade como complexo primário deverá ser superior a 80% da actividade total.

A pureza radioquímica poderá ser controlada por vários métodos, tais como a extracção com octanol e a filtração em coluna de afinidade.

São frequentemente recomendados métodos cromatográficos. São necessários três sistemas diferentes para identificar as várias espécies radioquímicas. Sendo assim, realizam-se na rotina laboratorial diária, duas das cromatografias, nomeadamente, em camada fina de

sílica gel com butanona e solução salina isotónica e uma terceira cromatografia em papel *Whatman* nº 1, com acetonitrilo a 50%. Por comparação dos três meios, calcula-se a fracção de radioactividade correspondente a cada espécie radioquímica, extrapolando-se para a Pureza Radioquímica final.

Pode realizar-se uma extracção com octanol de uma amostra de radiofármaco em que se conhecendo o coeficiente de repartição de cada impureza radioquímica, se determina a fracção correspondente ao complexo primário.

Poder-se-á ainda, realizar a determinação *in vitro* através da filtração de uma alíquota de radiofármaco com uma coluna de afinidade (*Sep-Pak C18^R*). Eluindo a coluna com soro salino fisiológico vai-se extrair a fracção hidrossolúvel, ficando retida na coluna a fracção lipossolúvel correspondente ao complexo primário.

O controlo de qualidade dos leucócitos pode, no entanto, ser realizado *in vivo*. Deste modo, procede-se à recuperação dos leucócitos marcados no sangue, com realização de hemograma em cerca de 0,5 ml da suspensão final. Realiza-se técnica de microscopia em 50 μ l com *tripan blue*.

Pela análise das imagens anatomo-fisiológicas, deverá existir uma marginação pulmonar inicial. Porém, se esta persistir às 2 horas, após a administração dos leucócitos radiomarcados, poderá indicar fragilidade aumentada, ou mesmo possível patologia pulmonar. Deverá predominar ainda, aos 30 minutos, uma actividade relativa no organismo, com a existência de tecido esplénico captante, com a visualização de pouco tecido hepático.

I - Utilização clínica

A marcação de leucócitos com $^{99m}\text{Tc-HMPAO}$ apresenta uma utilização clínica bastante diversificada.

O $^{99m}\text{Tc-HMPAO}$ -leucócitos fornece informação respeitante à presença, extensão e actividade da doença em fase activa inflamatória intestinal (Colite Ulcerosa e Doença de Crohn). Pode ser igualmente útil na pesquisa de infecção abdominal aguda (por exemplo apendicite aguda, abcesso).

A infecção de próteses vasculares está associada a uma elevada mortalidade e morbilidade. É importante estabelecer o diagnóstico correcto num estado precoce, e iniciar prontamente um tratamento adequado. Este processo de radiomarcação (Legenda 6) é um método sensível e específico, permitindo a localização e extensão da infecção.

Os leucócitos marcados com ^{99m}Tc -HMPAO são bastante utilizados para a detecção da infecção em ortopedia. A informação respeitante à localização e à extensão da infecção pode ser importante na decisão clínica a tomar.

2 - Protocolo de marcação

1. Preparar duas seringas:

A (50 ml)

Anticoagulante: ACD - 6 ml (citrato ácido de dextrose)

Sedimentante: HES - 6 ml (hidroxietilamida 6%)

B (10 ml)

Anticoagulante: ACD - 1,5 ml

2. Colheita com *butterfly* de calibre 19

A (volume total - 42 ml)

B (volume total - 10 ml)

3. Separação A (simultaneamente realizar o passo 4)

a) Deixar sedimentar espontaneamente, durante cerca de 30 minutos, até obter um sobrenadante rosado, com aproximadamente $\frac{1}{2}$ do volume inicial, colocando a seringa na vertical com o êmbolo na base.

b) Transferir o sobrenadante (PRC - plasma rico em células) sem agitar para tubo esterilizado, utilizando uma *butterfly* de calibre 19.

c) Centrifugar a 150 G (840 r.p.m. na centrífuga Beckman GPR) durante 5 minutos.

d) Retirar o sobrenadante (PRP - plasma rico em plaquetas) e guardar em tubo, deixando no fundo o botão de leucócitos.

e) Soltar os leucócitos através de agitação leve e adicionar 0,6 ml de PLC (passo 4-b).

f) Centrifugar o PRP a 3.200 r.p.m. durante 10 minutos.

4. Separação B

a) Transferir para tubo esterilizado e centrifugar a 2.000 G (3.200 r.p.m. na centrífuga Beckman, durante 10 minutos).

b) Colher o sobrenadante (PLC - plasma livre de células) numa seringa e guardar.

5. Marcação

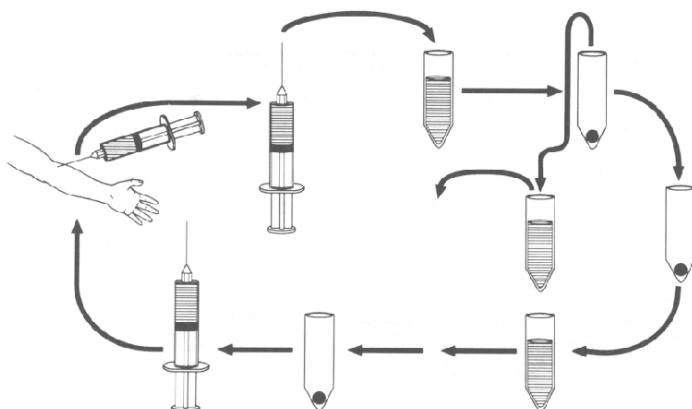
- a) Do ^{99m}Tc -HMPAO utilizar 1.110 MBq (30 mCi). A marcação do ^{99m}Tc -HMPAO deve utilizar ^{99m}Tc -pertecnetato eluído há menos de 2 horas de um gerador que tenha sido utilizado nas 24 horas anteriores.
- b) Adicionar 2,5-3 ml do ^{99m}Tc -HMPAO marcado ao tubo dos leucócitos misturando bem e deixando à temperatura ambiente durante 10 minutos.
- c) Parar a marcação, adicionar cerca de 10 ml do sobrenadante obtido no passo 3-f). Misturar através de agitação leve, centrifugando a 840 r.p.m. durante 5 minutos.
- d) Retirar o sobrenadante deixando no fundo o botão de leucócitos marcados.
- e) Soltar os leucócitos através de agitação leve e suspendê-los em cerca de 5 ml de PLC do passo 4-b).

6. Administração

- a) Colher os leucócitos para uma seringa de 10 ml sem utilizar agulha.
- b) Contar a actividade e administrar com agulha de calibre 21.

7. Imagens

No pé diabético poderão ser obtidas a partir das 4 horas. Na patologia abdominal deverão ser obtidas até aos 30 minutos, 1 hora e 3 horas.



Legenda 6: Processo de marcação dos leucócitos com ^{99m}Tc -HMPAO.

Esta técnica implica reduzida manipulação celular, apresenta elevada eficácia de marcação, é segura e minimamente invasiva. O radiofármaco utilizado não tem acção farmacológica, está associada a uma baixa dose de radiação absorvida pelo doente, e o radionuclídeo usado no processo de marcação possui a energia ideal para a obtenção de imagem.

Capítulo 6

Radiomarcação de plaquetas

I - Introdução

A substância radioactiva utilizada na marcação de plaquetas não é específica para a marcação destas células, marcando igualmente outros elementos celulares sanguíneos e mesmo algumas proteínas. Sendo assim, torna-se necessário isolar as plaquetas de outros componentes antes da sua marcação.

Existe uma grande variedade de métodos para o isolamento das plaquetas. Basicamente estes métodos incluem: centrifugações sucessivas, a fim de obter o aglomerado de plaquetas; centrifugação em presença de soluções criando um gradiente de densidade; estabilização de elementos celulares entre um campo centrífugo e um campo centrípeto, com um fluxo líquido permanente; activação celular por fluorescência.

Em termos práticos, as plaquetas são isoladas do sangue anticoagulado por simples centrifugação diferencial. Pretende-se com esta metodologia obter uma elevada concentração plaquetar, mantendo a qualidade funcional (em termos de viabilidade, de cinética celular, de sobrevida e de locais de sequestração).

A técnica fechada *Monovette* adaptada à marcação de plaquetas combina as necessidades tidas como óptimas: o mínimo volume de sangue (16 ml), o mínimo período *in vitro* (inferior a 60 minutos) e as condições óptimas de marcação (37 °C, 5 minutos). Apesar de teoricamente mais dispendioso, este sistema apresenta condições de esterilidade suficientes sem a necessidade de custos adicionais, como a existência de uma câmara de fluxo laminar e de outros materiais de único uso. A introdução deste sistema torna a técnica de marcação acessível ao uso clínico, mesmo em pequenas unidades de radiofarmácia.

Alguns parâmetros são necessários para evitar as alterações plaquetares. O mais importante diz respeito ao meio de ressuspensão do botão de plaquetas. A função das plaquetas em situações de homeostase requer uma fonte de energia. Alguns autores apresentam o uso da glicose como substracto da função plaquetar e a dependência da função plaquetar do glicogénio como fonte de energia. Foram utilizados ao longo do tempo alguns anticoagulantes, tais como: heparina (pode induzir no entanto a activação plaquetar com diminuição do tempo de semi-vida), citrato (fornece dextrose para a nutrição celular), EDTA (o ácido etilenodiaminotriacético pode danificar as células) e ACD (solução com pH de 6,5 com dextrose).

Quando as plaquetas existem sob a forma de aglomerado podem tornar-se activas, a menos que se preserve o seu estado de lactênia. Isto pode ser realizado sob determinadas

maneiras. A mais simples diz respeito à acidificação do plasma rico em plaquetas (PRP) a um valor da ordem do pH de 6,2-6,5.

As prostaglandinas, como a PGE 1 ou a prostaciclina e a PGI 2, actuam por uma elevação intracelular de AMP cíclico. A adição de prostaglandinas afecta os parâmetros de marcação e os testes de viabilidade *in vitro* de maneira favorável. Estas estabilizam a membrana plaquetar minimizando os danos artificiais.

O aglomerado de plaquetas pode ser facilmente suspenso num pequeno volume de tampão ou de plasma. De uma maneira geral, as plaquetas são melhor preservadas em meios plasmáticos de maneira a manterem a sua função plaquetar normal. As plaquetas marcadas em plasma apresentam uma função *in vitro* superior, com poucos sinais ultra estruturais de activação apresentando uma elevada viabilidade. Contudo, o aumento excessivo do tempo de incubação provoca o aumento do dano celular. Foi demonstrada a necessidade de o tempo de incubação no tampão ser o menor possível.

A integridade celular deverá ser mantida através de uma manipulação suave. A centrifugação e os procedimentos de lavagem podem provocar danos irreversíveis nas plaquetas.

A incubação das plaquetas no meio salino com ACD aumenta a permeabilidade membranar, permitindo a incorporação do radiofármaco.

II - Processo de marcação

I - Obtenção das plaquetas

As plaquetas são isoladas por separação inicial de um plasma rico em plaquetas (PRP), depois de uma centrifugação do sangue total a 200 G, a fim de remover os eritrócitos e os leucócitos, seguido de centrifugações do PRP a 1.500 G. Como a heparina promove a agregação plaquetar, não deverá ser usada como anticoagulante. Por outro lado, o ACD é adicionado ao sangue na relação Sangue/ACD de 6/1, mantendo o pH = 6,5, a fim de prevenir a agregação plaquetar. A marcação de plaquetas é preferível numa suspensão de plasma misturado com ACD em vez de numa solução salina, prevenindo a função plaquetar.

2 - Avaliação da viabilidade plaquetar

Está demonstrado que as plaquetas, mesmo depois de várias centrifugações e da exposição ao material radioactivo, se mantêm viáveis durante algum tempo, não se alterando significativamente no meio plasmático livre.

A determinação da integridade funcional das plaquetas é examinada pela resposta a agentes agregantes (colagénio, ácido araquidónico e epinefrina), pela capacidade de aderir a superfícies estranhas e pela utilização da microscopia electrónica. É frequente a avaliação sensível da sua biodistribuição *in vivo*.

Os testes realizados *in vitro* para verificação da função plaquetar, como a agregação, a adesão e a migração, falham na previsão correcta dos danos celulares resultantes do processo de marcação. Poder-se-ão excluir da aplicação clínica de rotina, evitando-se falsos negativos.

3 - Marcação com $^{99m}\text{Tc-HMPAO}$ e com $^{111}\text{In-oxina sulfato}$

Devido à ausência de proteínas e de cálcio, a incubação das plaquetas no meio salino com ACD provoca o aumento da permeabilidade membranar, aumentando por conseguinte a incorporação do radiofármaco, a eficácia de marcação e a viabilidade celular. A eficácia de marcação não depende da concentração de $^{99m}\text{Tc-HMPAO}$ adicionada. Não existe diferença significativa entre a forma I e r do fármaco.

O radiofármaco $^{99m}\text{Tc-HMPAO}$ -plaquetas é suficientemente estável fornecendo boas imagens da deposição plaquetar. Contudo, a velocidade relativamente elevada de eluição (8% / hora) do Tecnécio para as plaquetas resulta numa excreção gastrointestinal e renal do produto marcado, aumentando significativamente a actividade abdominal e pélvica. Este radiofármaco como marcador plaquetar apresenta as mesmas desvantagens que o $^{111}\text{In-sulfato oxina}$, em que a elevada velocidade de eluição e o curto período de desintegração do Tecnécio, não permite a realização de estudos plaquetares de sobrevivência.

4 - Influência no processo de marcação

Existe uma série de factores que pode fazer variar o processo de marcação, dos quais se destaca a densidade plaquetária, o tipo de procedimento, a utilização de anticoagulante, o tempo e a temperatura de incubação, a idade do doente, a existência de proteínas plasmáticas (especialmente transferrina), de iões cálcio, de lípidos, de colesterol, de lipoproteínas de baixa densidade, de prostaglandinas e de óxido nítrico.

A temperatura de incubação é um factor importante que influencia a eficácia de marcação apresentando um valor óptimo a 37 °C.

Com o aumento das concentrações de ião cálcio, a eficácia de marcação diminui em meio salino-ACD. As concentrações variáveis de ião cálcio no plasma podem influenciar a eficácia de marcação, daí que alguns autores refiram a utilização de meio salino-ACD e não de plasma.

O colesterol e as lipoproteínas de baixa densidade estão negativamente correlacionados com a eficiência de marcação. Para quantidades de colesterol da ordem de 251-300 mg/dl, existe uma diminuição da eficácia de marcação.

5 - Utilização clínica

As plaquetas humanas representam um importante papel no desenvolvimento da aterosclerose participando em diferentes mecanismos vasculares, desenvolvimento de lesões trombo murais e acções bioquímicas de substâncias intraplaquetares.

Os trabalhos realizados já demonstraram a acumulação de plaquetas no local da lesão vascular pode ser visualizada pela sua marcação com Tecnécio. A contribuição das plaquetas residentes, marcadas *versus* plaquetas circulantes nas veias, pode ser avaliada através do uso de um segundo radiotraçador distribuído unicamente no compartimento sanguíneo (^{99m}Tc -eritrócitos).

As imagens cintigráficas obtidas com plaquetas radiomarcadas com Tecnécio podem igualmente fornecer informação relativa à eficácia de drogas inibidoras da formação de trombos plaquetares (aspirina, dipiridamol, bloqueadores dos canais de cálcio), na doença arteriosclerótica e, em particular, na doença vascular periférica.

As imagens obtidas da acumulação de plaquetas podem prever a trombogenicidade em situações posteriores a intervenções cirúrgicas.

As plaquetas apresentam um importante papel na detecção de anomalias em próteses e enxertos. A sua deposição excessiva pode resultar em trombose aguda, em fenómenos tromboembólicos ou promover uma rejeição tardia do enxerto.

As plaquetas acumulam-se unicamente em trombos activos. A cintigrafia com plaquetas não revela unicamente a localização dos trombos, mas fornece igualmente informação funcional, não invasiva, da actividade trombótica das estruturas suspeitas.

A cintigrafia com o radiofármaco ^{99m}Tc -HMPAO-plaquetas é uma alternativa plausível aos métodos radiológicos para demonstrar tromboflebite venosa aguda. O seu uso particular é importante na avaliação de doentes que apresentem contraindicações relativas à venografia de contraste.

Existe deposição do radiofármaco ^{99m}Tc -HMPAO-plaquetas num enxerto renal sujeito a uma rejeição aguda. A rápida diminuição da sobrevida plaquetária durante a rejeição aguda sugere o consumo plaquetário como um factor importante.

Poder-se-á utilizar a metodologia da marcação de plaquetas com ^{111}In -sulfato oxina (Legenda 7) para a avaliação da cinética plaquetar normal (produção, sobrevida e degradação), activação plaquetar e seu consumo em patologias caracterizadas por

fenómenos tromboembólicos, diferenciação da causa da trombocitopenia (redução do débito, mudanças na distribuição no órgão ou aumento da sequestração das plaquetas do sangue), estudo da patogenicidade relacionada com plaquetas em alterações vasculares com anomalias endoteliais. Poderá também ter utilidade na verificação de efeitos terapêuticos de drogas inibidoras plaquetárias em alterações tromboembólicas ou em trombocitopenia, detecção de estados pré-trombóticos, avaliação dos efeitos dos factores de risco (factores ambientais, lesão vascular, materiais protésicos, tabaco, intervenções farmacológicas), avaliação de diferentes técnicas de separação de células, acondicionamento ou procedimentos de transfusão de plaquetas.

6 - Protocolos de marcação com $^{111}\text{In-sulfato oxina}$

Protocolo I

1. Três tubos tipo Monovette
2. Solução ACD, 4 ml
 - 0,25 g de citrato de sódio
 - 0,08 g de ácido cítrico
 - 0,12 g de dextrose
 perfazendo o volume de 10 ml com água destilada, esterilizada a 120° C.
3. Seringas hipodérmicas, duas agulhas tipo *butterfly* e seis agulhas comuns, com diâmetro internam não inferior a 1 mm.
4. Seringas de plástico, uma seringa de 20 ml, duas seringas de 1 ml com graduação em μl e uma seringa de 2 ml.
5. Tampão *tyrode*, 1 ml;

Preparação do tampão *tyrode*: 50 ml da solução I, 20 ml da solução 2 e 1 g de dextrose são homogeneousmente misturados, perfazendo o volume de 1 l com água destilada para injectáveis (bidestilada). Ajustar o pH a 6,2.

Solução I

- 160 g NaCl
 - 4 g KCl
 - 20 g NaHCO₃
 - 1 g NaH₂PO₄
- perfazendo o volume de 1 l com água destilada para injectáveis (bidestilada). Ajustar o pH a 7,5 com HCl.

Solução 2

0,1M MgCl₂.6H₂O, 20,3 g

perfazendo o volume de 1 l com água destilada para injectáveis (bidestilada).

6. ¹¹¹In-oxina sulfato (100-150 µCi, 10 µg sulfato oxina/ml).

7. Prostaciclina (500 ng), dissolvida em 100 µl de tampão glicina, antes do seu uso.

Separação das plaquetas e sua marcação

1. Retirar (2x8) ml de sangue da veia cubital sem oclusão venosa, em dois tubos tipo Monovette usando (2x2) ml de ACD como anticoagulante, adicionando (2x250) ng de prostaciclina como agente antiagregante com seringa de insulina imediatamente a seguir à recolha da amostra.

2. Depois de retirar a agulha, o tubo tipo Monovette deverá ser fechado a fim de se manter a esterilidade. Deixa-se 10 minutos à temperatura ambiente, aguardando a sedimentação dos glóbulos vermelhos.

3. Seguidamente centrifugam-se os tubos a 150 G/5 min.

4. O PRP é transferido de maneira asséptica para outro tubo estéril tipo Monovette, usando *butterfly*.

5. O PRP é de seguida centrifugado a 500 G/10 min.

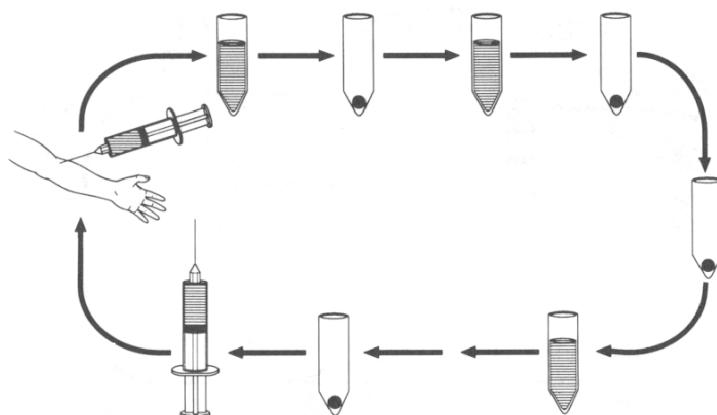
6. As plaquetas ficam sedimentadas na forma de um botão no fundo do tubo. Retirar a tampa. O plasma sobrenadante pobre em plaquetas (PPP) é retirado para seringa estéril de 20 ml preservando cuidadosamente o botão de plaquetas no fundo do tubo.

7. O botão de plaquetas existente no fundo do tubo é ressuspensido cuidadosamente em 1ml da solução tampão preparada (usando seringa de 2 ml), agitando cuidadosamente o tubo. Seguidamente, adiciona-se 100 µCi de ¹¹¹In-oxina sulfato com seringa de insulina.

8. Fechar novamente o tubo e incubar a 37° C, durante 5 minutos em banho-maria.

9. A mistura incubada contendo as plaquetas marcadas é ressuspensida com o PPP.

10. Reinjectar o doente com a solução preparada.



Legenda 7: Processo de marcação das plaquetas com ^{111}In - sulfato oxina.

Dose administrada: até 18 MBq (0.48 mCi)

Colheita de amostra de sangue

1. Preparar um tubo estéril de 20 ml (Tubo A) contendo 3 ml de ácido citrato de dextrose (solução 1).
2. Preparar um tubo estéril de 200 ml (Tubo B) contendo 1 ml de solução de citrato (solução 2).
3. Numa seringa de 20 ml recolher 26 ml de sangue, dos quais 17 ml são transferidos para o tubo A e 9 ml para o tubo B. Homogeneizar os conteúdos com leves inversões.

Preparação do plasma (pobre em plaquetas) obtidos a partir do ACD (solução 1)

1. Centrifugar o tubo B a 200 G (1.048 rpm) durante 10 minutos.
2. Retirar 5 ml (ou o que for possível) do plasma sobrenadante e centrifugar a 1.000 G (2.400 rpm) durante 10 minutos.
3. Retirar o plasma sobrenadante e guardar a 37°C até ser necessário.

Isolamento e marcação de plaquetas

1. Centrifugar o tubo A a 1.048 rpm durante 10 minutos.
2. Remover 5 ml do sobrenadante (plasma rico em plaquetas) e adicionar 5 ml de tampão Tyrode livre de cálcio contendo prostaglandina E1 previamente aquecida a 37°C (solução 4).
3. Centrifugar o diluído (plasma rico em plaquetas) a 1.877 rpm durante 10 minutos.
4. Retirar o sobrenadante (plasma tamponado) e guardar a 37°C até necessário.

5. Com cuidado lavar o botão de plaquetas com tampão tépido e ressuspender em 2.5ml de tampão tépido.

6. Adicionar cerca de 18 MBq (0.48 mCi) em não mais de 0.5 ml e incubar a 37° C durante 1 minuto.

7. Adicionar 7.5 ml de plasma tamponado, homogeneizar com cuidado mediante leves inversões e centrifugar a 1.877 rpm durante 10 minutos.

8. Retirar o sobrenadante e desprezar.

9) Ressuspender o botão de plaquetas marcadas no plasma citratado, pobre em plaquetas e calibrar a actividade.

7 - Protocolo de marcação com ^{99m}Tc -HMPAO

Protocolo I

Dose administrada: até 200 MBq (5.4 mCi)

Colheita de amostra de sangue

1. Preparar um tubo estéril de 20 ml (Tubo A), contendo 3 ml de ácido citrato de dextrose (solução 1).

2. Preparar um tubo estéril de 200 ml (Tubo B) contendo 1 ml de solução de citrato (solução 2).

3. Numa seringa de 20 ml recolher 26 ml de sangue, dos quais 17 ml são transferidos para o tubo A e 9 ml para o tubo B. Homogeneizar os conteúdos com leves inversões.

Preparação do plasma (pobre em plaquetas) obtidos a partir do ACD (solução 1)

1. Centrifugar o tubo B a 200 G (1.048 rpm) durante 10 minutos.
2. Retirar 5 ml (ou o que for possível) do plasma sobrenadante e centrifugar a 1.000 G (2.400 rpm) durante 10 minutos.

3. Retirar o plasma sobrenadante e guardar a 37° C até ser necessário.

Isolamento e marcação de plaquetas

1. Centrifugar o tubo A a 1.048 rpm durante 10 minutos.
2. Remover 5 ml do sobrenadante (plasma rico em plaquetas) e adicionar 5 ml de tampão Tyrode livre de cálcio, contendo prostaglandina E1 previamente aquecida a 37° C (solução 4).
3. Centrifugar o diluído (plasma rico em plaquetas) a 1.877 rpm durante 10 minutos.
4. Retirar o sobrenadante (plasma tamponado) e guardar a 37° C até necessário.

5. Adicionar cerca de 500 MBq (13.5 mCi) em não mais de 0.5 ml de ^{99m}Tc -HMPAO e incubar a 37° C durante 10 minutos.
6. Adicionar 7.5 ml de plasma tamponado, homogenizar com leves inversões e centrifugar a 1.877 rpm durante 10 minutos.
7. Remover o sobrenadante e desprezar.
8. Ressuspender o botão de plaquetas marcadas com plasma citratado, pobre em plaquetas e calibrar a actividade.

Soluções utilizadas na radiomarcação de plaquetas

Solução 1: Solução de ácido citrato

2.5 g de citrato trissódico dihidratado
1.49 g de ácido cítrico monohidratado
água para injectáveis até 100 ml

Solução 2: Solução de citrato

3.8 g de citrato trissódico dihidratado
água para injectáveis até 100 ml

Solução 3: Tampão *Tyrode* livre de cálcio com prostaglandina E1

(para marcação com ^{111}In -sulfato oxina)
8.0 g de cloreto de sódio
0.2 g de cloreto de potássio
1.0 g de bicarbonato de sódio
0.05 g de dihidrogénio de sódio ortofosfato dihidratado
0.4066 g de cloreto de magnésio hexahidratado
25.000 unidades de heparinato de sódio
água para injectáveis até 1000 ml

Solução 4: Tampão *Tyrode* livre de cálcio com prostaglandina E1

(para marcação com ^{99m}Tc -HMPAO)
8.0 g de cloreto de sódio
0.2 g de cloreto de potássio
1.0 g de bicarbonato de sódio
0.05 g de dihidrogénio de sódio ortofosfato dihidratado

0.4066 g de cloreto de magnésio hexahidratado
água para injectáveis até 1000 ml

O pH final deverá ser ajustado até 6.5 com ácido hidroclórico 1M.

Colocar a solução em alíquotas de 10 ml em frascos estéreis, selados e refrigerar a -20° C.

Posteriormente colocar 6 µl de Prostina VR no líquido anteriormente congelado em cada frasco e acondicionar a -20° C, até ser necessário.

Capítulo 7

Artefactos na marcação

I - Introdução

Existe uma série de factores que pode alterar a eficácia de marcação das células sanguíneas com radionuclídeos. Ao longo deste capítulo apresentam-se os mais comuns.

No processo de radiomarcação de eritrócitos com tecnécio, pode advir uma série de artefactos externos, tais como a existência de alterações à centrifugação, remoção do meio de suporte plasmático, presença de metais em quantidades vestigiais, e o diâmetro das agulhas utilizadas. De referir ainda de que a presença de fonte salina isotónica poderá induzir à formação de baixo índice de radiomarcação.

Para a técnica de radiomarcação de leucócitos, há que referir o facto de que se poderá auferir da existência ou não de determinados artefactos ao longo do processo de preparação autóloga. Deste modo, poder-se-á realizar estudo em 0,5 ml da suspensão final, em que se analisa a respectiva viabilidade celular, utilizando técnica microscópica, recorrendo a 50 µl de *tripan blue*. Ainda assim, poderá comprovar-se *in vivo*, inicialmente da existência de uma marginação pulmonar inicial, que poderá manter-se até às 2 horas em processos patológicos, havendo igualmente uma visualização da captação esplénica aos primeiros 30 minutos após a administração final. Por outro lado, convém denotar ao longo do estudo imagiológico, de uma baixa captação hepática.

O processo de radiomarcação de trombócitos apresenta-se com um nível de exigência, em quase tudo semelhante ao dos leucócitos. No entanto, é fundamental ter especial atenção às, concentração celular, qualidade funcional, viabilidade, cinética celular, tempo de semi-vida, e locais de sequestração. É desejável que o botão plaquetário obtido não esteja alterado, e se apresente no estado lactente, com baixa activação celular. Ainda por este meio, é desejável uma elevada função e viabilidade *in vitro*. A avaliação da viabilidade plaquetar, poderá ser auferida através da resposta a agentes agregantes (colagénio, ácido araquidónico), estudos de adesão à superfície, aliados a avaliações em microscopia electrónica. Por outro lado, os trombócitos obtidos não são alterados com a existência no meio celular de plasma livre de células, sendo sempre desejável que se verifique para um baixo volume. A presença do anticoagulante heparina poderá induzir activação plaquetar, enquanto que a utilização de EDTA não será de todo aconselhável, pois poderá provocar o denominado dano celular. Ainda deste modo, há que usar o anticoagulante ACD, e a pH 6,5, de modo a facilitar o respectivo aumento da permeabilidade membranar. Convém ainda referir de que poderá verificar-se a utilização de tampões de glucose, e citrato, como

possíveis fontes de substratos energéticos. A eficiência de marcação de plaquetas com ^{99m}Tc -HMPAO apresenta uma eficiência de marcação de 50% na presença de solução isotónica salina, e de 40% na presença de plasma. Ainda assim, neste processo é requerida a ausência de proteínas e de Ca^{2+} , sendo recomendada a incubação em solução isotónica salina, mesmo na presença de vestígios de ACD. Por tudo isto, é dado comprovado, de que a eficiência de marcação *in vitro*, apresenta baixos índices, na presença elevada de Ca^{2+} , colesterol (25-300mg/dl) e lipoproteínas de baixa densidade. Para finalizar, deverá prestar-se especial atenção ao facto, de que existem determinado tipo de varáveis *in vivo*, que poderão influenciar em definitivo todo processo, tais como: densidade plaquetar, procedimento, anticoagulante, temperatura de incubação (37° C), idade do doente, e presença de proteínas plasmáticas.

II - Eritrócitos

1 - Presença de pertecnetato de sódio

A presença de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ livre manifesta-se na imagem imagiológica através da visualização de tiróide, plexos coróides, estômago, rins e bexiga.

2 - Quantidade de Sn^{2+}

As pequenas quantidades de Sn^{2+} limitam a sua capacidade redutora, traduzindo-se numa diminuição da eficácia de marcação com posterior aumento da impureza $^{99m}\text{TcO}_4^-$, denotando-se actividade específica baixa, e baixa retenção esplénica.

A existência de um aumento das quantidades de Sn^{2+} resulta, por seu lado, na formação de impurezas coloidais de Tecnécio, com elevada captação esplénica, e na diminuição da eficácia de marcação.

3 - Concentração celular

A velocidade e a extensão de marcação dos eritrócitos com pertecnetato de sódio são afectadas pela concentração celular. A incorporação de Tecnécio nos eritrócitos está directamente relacionada com o hematócrito (ou concentração de eritrócitos) e não com o número total de células.

A administração de um grande número de glóbulos vermelhos ou uma baixa actividade específica de eritrócitos fragilizados marcados com Tecnécio pode resultar numa prolongada retenção no compartimento sanguíneo e numa diminuição de fixação no baço.

Uma grande quantidade de eritrócitos fragilizados, marcados com Tecnécio pode, em determinadas situações, saturar a capacidade de sequestração esplénica, de maneira a obter uma baixa relação baço/compartimento sanguíneo.

4 - Temperatura

A temperatura utilizada para fragilizar os eritrócitos marcados com $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ou com ^{51}Cr para estudos de sequestração eritrocitária é um factor fundamental. Uma baixa temperatura resulta numa fragilização insuficiente dos eritrócitos, com significativa actividade no compartimento sanguíneo. Por outro lado, uma temperatura mais elevada, provoca uma fragilização excessiva dos eritrócitos, originando deficiente captação esplénica e aumento da captação hepática.

A quantidade de eritrócitos fragilizados marcados com pertecnetato de sódio varia directamente com a duração do tempo de aquecimento. Um aquecimento inadequado ou prolongado resulta numa insuficiente ou excessiva fragilização, respectivamente. A duração óptima de aquecimento é variável, dependendo do tipo de aparelho, do volume e do meio utilizado.

A utilização de grandes volumes de eritrócitos marcados com pertecnetato de sódio pode provocar insuficiente fragilização para sequestração esplénica, quando comparada com os pequenos volumes aquecidos para o mesmo período de tempo.

5 - Período de estanhação

Previamente à marcação dos eritrócitos com $^{99m}\text{TcO}_4^-$ dever-se-á proceder à sua estanhação através de uma incubação com Sn^{2+} . O tempo óptimo para este processo de estanhação varia entre 5 e 30 minutos. A velocidade e a extensão da incorporação de Sn^{2+} são afectadas negativamente pela concentração de ACD. Um período de estanhação insuficiente, antes da radiomarcação, poderá resultar numa diminuição da pureza radioquímica.

6 - Período de incubação

O período óptimo de incubação com o $^{99m}\text{TcO}_4^-$ varia entre 10 e 30 minutos.

O passo limitante na velocidade de radiomarcação dos eritrócitos está relacionado com o transporte dos iões de pertecnetato de sódio através da sua membrana.

A velocidade e a extensão da marcação de eritrócitos com pertecnetato de sódio estão relacionadas com a temperatura, com moderada ou marcada diminuição a 22°C e 4°C , respectivamente.

7 - Presença de anticoagulante

A marcação *in vitro* de eritrócitos com a subsequente reinjecção requer que a amostra de sangue seja anticoagulada. Contudo, a presença de um anticoagulante, geralmente heparina ou ACD, pode afectar ainda que de modo diferente a marcação e a biodistribuição dos eritrócitos marcados. Por exemplo, usando a técnica *in vivo/vitro*, a marcação dos eritrócitos com perteconetato de sódio na presença de heparina origina maior actividade extravascular e maior excreção urinária do que na presença de ACD.

Por outro lado, o excesso de anticoagulante ACD pode provocar a sequestração dos iões Sn^{2+} diminuindo a velocidade e a extensão do processo de estanhação dos eritrócitos. Este efeito ocorre igualmente quando se usa EDTA como anticoagulante.

8 - Agentes sequestrantes

Na marcação de eritrócitos *in vitro* com perteconetato de sódio é utilizado o hipoclorito de sódio para oxidar o excesso de Sn^{2+} extracelular, de maneira a obter uma elevada eficácia de marcação. São obtidas óptimas eficácia de marcação com Tecnécio na ausência de Sn^{2+} extracelular. Utilizam-se agentes quelantes, como o EDTA ou o ACD, para sequestrar o excesso extracelular de Sn^{2+} tornando-o disponível para o hipoclorito. Dos dois agentes sequestrantes, o ACD é preferível já que o EDTA pode causar lesão nos eritrócitos. Os eritrócitos lesados têm uma semi-vida encurtada e apresentam acumulação esplénica.

9 - Presença de alumínio (Al^{3+})

O Al^{3+} pode actuar como agente de aglutinação eritrocitária. Estudos realizados *in vitro* mostraram que a concentração crítica para este efeito é de aproximadamente 5 mg Al^{3+}/ml a um pH de 4-5. Como as condições necessárias para a aglutinação dos eritrócitos pelo Al^{3+} não ocorrem *in vivo*, a aglutinação intravascular com a administração do eluado contendo Al^{3+} aparece altamente improvável.

III - Leucócitos e plaquetas

I - Efeito da concentração

A marcação de leucócitos e de plaquetas com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO está dependente do número de células isoladas e da concentração do radiofármaco. Uma baixa eficácia de marcação pode resultar da utilização de um inadequado número de células ou de uma inadequada concentração de radiofármaco. Convém referir de que se aponta para um volume mínimo de 16 ml.

Um excesso de plasma pode também interferir em certo grau com a marcação de leucócitos. De maneira semelhante, um excesso de ACD e de plasma no meio de marcação pode diminuir a marcação das plaquetas. Uma quantidade excessiva de eritrócitos e de plaquetas, durante a radiomarcação de leucócitos, resulta numa radiomarcação deficiente destes últimos.

2 - Período de incubação

Os tempos de incubação situados entre 10 a 20 e 30 a 40 minutos são requeridos para atingir um máximo de eficácia de marcação de leucócitos e de plaquetas, respectivamente. Há que evitar o dano celular desnecessário, o que poderá ser minimizado através de um tempo de incubação correcto. A incubação a 37° C não afecta significativamente a velocidade de marcação de leucócitos com ^{99m}Tc -HMPAO quando comparada com a realizada à temperatura ambiente. Quando da realização dos procedimentos de limpeza e purificação do respectivo extracto celular sanguíneo, há que proceder a uma manipulação suave, evitando os movimentos bruscos e rápidos.

3 - Efeito do anticoagulante

Na preparação de leucócitos e de plaquetas radiomarcados, o ACD é preferido à heparina como anticoagulante. O ACD diminui a tendência de adesão dos neutrófilos ao plástico dos tubos e das pipetas. Contudo, o excesso de ACD no meio final de marcação pode reduzir a eficácia de marcação.

4 - Efeito de pH

A eficácia máxima de marcação de leucócitos com ^{99m}Tc -HMPAO requer um pH próximo da neutralidade.

O pH do meio de suspensão é um factor decisivo na marcação das plaquetas. Estas, quando fora do meio plasmático natural, devem ser mantidas a um pH inferior a 6,5 de maneira a evitarem a agregação e a sedimentação. A sedimentação dos leucócitos pode ocorrer durante ou depois do processo de radiomarcação, resultando numa localização pulmonar.

A existência de um pH muito acídico pode resultar numa aglutinação ou em hemólise de eritrócitos.

5 - Factores externos

A remoção do meio plasmático protector, a centrifugação e a exposição a quantidades vestigiais de metais durante a preparação de células radiomarcadas (leucócitos e plaquetas) pode causar dano celular.

Os leucócitos danificados, podem apresentar localização hepática, esplénica e pulmonar.

A centrifugação e a passagem através de pequenas agulhas, durante a preparação das plaquetas radiomarcadas, podem também causar agregação plaquetar ou dano celular. As plaquetas danificadas apresentam pequena sobrevida *in vivo* com localização hepática e esplénica.

Deve ser utilizado material de plástico na preparação e na manipulação das plaquetas radiomarcadas pois estas tendem a aderir ao vidro. O acondicionamento prolongado das plaquetas marcadas com $^{99m}\text{Tc-HMPAO}$ deverá ser evitado pois o radiofármaco tende a migrar do interior para o exterior das células, ao longo do tempo.

Capítulo 8

Discussão

A marcação de células sanguíneas com radiotraçadores e radiofármacos apresenta uma utilização bastante diversificada em medicina nuclear, permitindo o diagnóstico precoce de variadas alterações fisiológicas.

A marcação de eritrócitos com radiotraçadores, é no entanto, das técnicas apresentadas, a mais frequente, seguindo-se de imediato a radiomarcação de leucócitos.

Pretende-se com este trabalho dar conhecimento de alguns conceitos, metodologias e artefactos de marcação de elementos celulares do sangue com radiotraçadores e radiofármacos, contribuindo assim para a divulgação de uma das áreas mais recentes e prósperas em termos científicos, no âmbito da Farmácia Hospitalar. Ainda por este modo, pretende-se alertar e incentivar todos aqueles farmacêuticos que, com o espírito mais aguçado e inquieto, pretendam gerir todo o manancial formativo para o tema aqui apresentado e sistematizado, graças a esta nova abordagem. Por tudo isto, aqui fica o meu sério desafio intelectual!

Bibliografia

- 1- Margarida Rodrigues, Helmut Sinzinger, Platelet labeling-methodology and clinical applications, thrombosis research, vol 76, n°5, pp.399-432, 1994, Pergamon.
- 2- Gopal B. Saha, Fundamentals of Nuclear Pharmacy, third edition, Springer Verlag.
- 3- A. V. Hoffbrand, J. E. Pettit, Essencial haematology, third edition, Blackwell Science.
- 4- Clinical applications of Ceretec-labelled leucocyte imaging-an abstract collection, Amersham Healthcare.
- 5- Radiofarmácia, Sociedade Argentina de Radiofarmácia, 1995.
- 6- Suresh C. Srivastava and Rita F. Straub, Blood cell labeling with ^{99m}Tc : Progress and perspectives, Seminars in Nuclear Medicine, vol XX, N°1 (January), 1990: pp 41-51.
- 7- Mirinal K. Dewanjee, The Chemistry of ^{99m}Tc -labeled radiopharmaceuticals, Seminars in Nuclear Medicine, vol XX, N°1 (January), 1990: pp 5-27.
- 8- Jesús Mallol Escobar, Medicamentos radiactivos, radiofármacos y productos radiofarmacéuticos, 1995, Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna.
- 9- European Nuclear Medicine, 1984, 9:320-332, A simple and safe technique for sterile autologous platelet labelling using Monovette vials.

Índice

PREÂMBULO.....	III
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2.....	5
SÍNTESE DE RADIOFÁRMACOS.....	5
I - REACÇÕES DE SUBSTITUIÇÃO DO ISÓTOPO	5
II - INTRODUÇÃO DE UM GRUPO RADIOACTIVO DIFERENTE.....	5
1 - Marcação com Tecnécio	5
CAPÍTULO 3.....	9
BIODISTRIBUIÇÃO.....	9
I - CONCEITOS GERAIS.....	9
II - FACTORES QUE ALTERAM A BIODISTRIBUIÇÃO.....	9
1 - Físico-Químicos	9
2 - Interacções toxicológicas.....	10
3 - Carga iónica	10
CAPÍTULO 4.....	11
RADIOMARCAÇÃO DE ERITRÓCITOS	11
I - INTRODUÇÃO.....	11
II - MÉTODOS DE MARCAÇÃO	12
1 - Método <i>in vivo</i>	12
2 - Método <i>in vivo modificado</i>	12
3 - Método <i>in vitro</i>	12
4 - Utilização clínica.....	12
III - ERITRÓCITOS FRAGILIZADOS PELO CALOR	13
1 - Utilização clínica.....	13
2 - Protocolo de marcação.....	13
IV - VOLUME ERITROCITÁRIO E PLASMÁTICO.....	13
1 - Forma de apresentação do Crómio-51	13
2 - Marcação de eritrócitos com Crómio-51	14
3 - Utilização clínica.....	14
4 - Protocolo de marcação (Volume eritrocitário)	14
5 - Protocolo de marcação (Volume plasmático)	15
V - DETERMINAÇÃO DA SEMI-VIDA ERITROCITÁRIA.....	16
1 - Utilização clínica.....	16
2 - Protocolo de marcação.....	16
3 - Procedimentos	17
VI - DETERMINAÇÃO DOS LOCAIS DE SEQUESTRO ERITROCITÁRIO	19
1 - Utilização clínica.....	19
2 - Protocolo de marcação.....	19
3 - Procedimentos	20
CAPÍTULO 5.....	22
RADIOMARCAÇÃO DE LEUCÓCITOS	22

I - INTRODUÇÃO.....	22
II - LEUCÓCITOS E RESPOSTA INFLAMATÓRIA	22
III - TÉCNICA DE SEPARAÇÃO	23
IV - MARCAÇÃO E CONTROLO DE QUALIDADE	23
1 - Utilização clínica.....	25
2 - Protocolo de marcação.....	26
3 - Resultados.....	27
CAPÍTULO 6.....	28
RADIOMARCAÇÃO DE PLAQUETAS	28
I - INTRODUÇÃO.....	28
II - PROCESSO DE MARCAÇÃO.....	29
1 - Obtenção das plaquetas.....	29
2 - Avaliação da viabilidade plaquetar.....	29
3 - Marcação com ^{99m} Tc-HMPAO e com ¹¹¹ In-oxina sulfato	30
4 - Influência no processo de marcação	30
5 - Utilização clínica.....	31
6 - Protocolos de marcação com ¹¹¹ In-sulfato oxina	32
CAPÍTULO 7.....	38
ARTEFACTOS NA MARCAÇÃO	38
I - INTRODUÇÃO.....	38
II - ERITRÓCITOS	39
1 - Presença de perteconetato de sódio	39
2 - Quantidade de Sn ²⁺	39
3 - Concentração celular	39
4 - Temperatura	40
5 - Período de estanhação	40
6 - Período de incubação	40
7 - Presença de anticoagulante.....	41
8 - Agentes sequestrantes.....	41
9 - Presença de alumínio (Al ³⁺)	41
III - LEUCÓCITOS E PLAQUETAS	41
1 - Efeito da concentração	41
2 - Período de incubação	42
3 - Efeito do anticoagulante.....	42
4 - Efeito de pH.....	42
5 - Factores externos.....	43
CAPÍTULO 8.....	44
DISCUSSÃO	44
BIBLIOGRAFIA	45
ÍNDICE.....	46