

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA E RADIOBIOLOGIA

FERNANDO HENRIQUE GOERSCH BASTOS

**AVALIAR A INFLUÊNCIA DE FÁRMACOS ANTIFLAMATÓRIOS HORMONAIS E
NÃO HORMONAIS SOBRE A FRAGILIDADE OSMÓTICA E MARCAÇÃO DE
HEMÁCIAS COM ^{99m}Tc EM RATOS**

RECIFE-PE

2003

FERNANDO HENRIQUE GOERSCH BASTOS

**AVALIAR A INFLUÊNCIA DE FÁRMACOS ANTIFLAMATÓRIOS HORMONAIS E
NÃO HORMONAIS SOBRE A FRAGILIDADE OSMÓTICA E MARCAÇÃO DE
HEMÁCIAS COM ^{99m}Tc EM RATOS**

Dissertação apresentada ao
Departamento de Biofísica e
Radiobiologia do CCB-UFPE como
complementação dos requisitos para
obtenção do grau de Mestre em Biofísica
e Radiobiologia

ORIENTADOR: Maria Teresa Jansem de A. Catanho.

RECIFE-PE

2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOFÍSICA E RADIOBIOLOGIA

PARECER DA COMISSÃO EXAMINADORA
DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAR A INFLUÊNCIA DE FÁRMACOS ANTINFLAMATÓRIOS
HORMONAIS E NÃO HORMONAIS SOBRE A FRAGILIDADE OSMÓTICA E
MARCAÇÃO DE HEMÁCIAS COM ^{99m}Tc EM RATOS**

Recife, 16 de dez. de 2003.

Prof.^a PALOMA LYS DE MEDEIROS

Prof.^a. SÔNIA PEREIRA LEITE

Prof.^a. MARIA DO CARMO MEDEIROS

DEDICATORIA

A meus pais, minha esposa Luciana e
minha avó Mirian Goersch, pelo
incentivo e apoio durante toda as
etapas desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus que é a luz da minha vida.

A professora Tereza Jansem pela sua compreensão, paciência e dedicação em seus ensinamentos.

A Dra. Grace Mary e Dra Simey Magnata pela ajuda na realização dos experimentos e revisão final dos trabalhos

Aos alunos de Iniciação Científica Andrezza, Edgar, Nadieshka, Marília e Jailson pela ajuda na realização dos experimentos.

A Universidade Vale do Acaraú (UVA) pela oportunidade do intercambio com a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

RESUMO

A dexametasona (Dex), o complexo B (Com B) e o piroxican (P) são fármacos antiinflamatórios freqüentemente utilizados no tratamento da inflamação de origem neurogênica ou de natureza músculo-esquelética. Este trabalho visa avaliar a influência de fármacos antiinflamatórios sobre a fragilidade osmótica e marcação de hemácias e proteínas plasmáticas com ^{99m}Tc *in vitro*. Amostras de células sangüíneas de ratos Wistar foram tratadas com diferentes concentrações de Dex e Com B por um período de 1 hora e em seguida foram submetidas à centrifugação 1000g/15 min e lavadas por 2 vezes. As hemácias foram submetidas à solução salina de 0,1- 0,9%. Os resultados mostram que o tratamento com Dex e Complexo B provoca uma hemólise de 100% nas concentrações de solução salina de 0,1 – 0,4%, não sendo observado hemólise nas concentrações de 0,7 – 0,9%. Numa segunda etapa, amostras de sangue, com anticoagulante, de ratos Wistar foram incubadas com diferentes concentrações de fármacos antiinflamatórias durante uma hora na presença de cloreto estanoso. Após a incubação o ^{99m}Tc foi adicionado em todas os tubos e incubado por 10 min. As amostras foram centrifugadas e o plasma e as células sangüíneas foram separadas. Alíquotas destas foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) a 5% e as frações solúveis e insolúveis separadas. As percentagens de radioatividade (%ATI) das amostras foram calculadas e os resultados indicam que a Dex, o Com B e o P reduzem a eficiência de captação do ^{99m}Tc . Estes experimentos indicam que os fármacos antiinflamatórios apresentam possível efeito oxidativo, como também competem com o sítio de ligação do íon estanho ou ^{99m}Tc .

ABSTRACT

The dexametasone (DEX), the complex B (ComB) and the piroxican (P) are anti-inflammatory drugs frequently used in the treatment of the neurogenetic or muscle-skeletal nature inflammations. The work seeks to evaluate the influence of anti-inflammatory drugs on the osmotic fragility and on the erythrocytes and plasmatic proteins demarcation with ^{99m}Tc *in vitro*. Samples of sanguine cells of Wistar rats were been treated with different concentrations of Dex and ComB for one hour and afterwards they were submitted to a centrifugalization 1000g/15min and washed twice. The erythrocytes were submitted to a saline solution of 0,1% - 0,9%. The results show that the treatment with Dex and ComB induces a 100% hemolysis in the 0,1% - 0,4% saline solutions, what doesn't happen in the 0,7% - 0,9% saline solution concentrations. In the second stage, blood samples with anticoagulant of Wistar rats were incubated with different concentrations of anti-inflammatory drugs for one hour on the presence of stannous chloride. After the incubation, the ^{99m}Tc was added in every tube and incubated for ten minutes. The samples were centrifuged: the plasma and the sanguine cells were separated, aliquots of these pounced with trichlorine-acetic acid (TCA) at 5% and the soluble and insoluble fractions were separated. The radioactivity percentages (% ATI) of the samples were calculated and the results show that the Dex, the ComB and the P reduce the efficiency of the capitation of the ^{99m}Tc . This experiment shows that the anti-inflammatory drugs have an oxidative effect, and also compete with the linking siege of the tin or ^{99m}Tc ion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1a - Representa a curva da Fragilidade osmótica de hemácias após tratamento com Dexametasona e Dexametasona associada ao complexo de Vitamina B e controle.

Figura 1b - Representa a curva da Fragilidade osmótica de hemácias após tratamento com Dexametasona 400µg/ml e Dexametasona associado ao complexo de Vitamina B (400 µg e 13 mg/mL) e controle.

Figura 2a - A figura representa a curva de fragilidade osmótica de hemácias após tratamento com o complexo de Vitamina B em diversas concentrações.

Figura 2b - A figura representa a curva de fragilidade osmótica de hemácias após tratamento com o complexo de Vitamina B (C - 13mg/mL) e Controle.

Figura 3a - Representa o percentual de ligação do tecnécio em hemácias após tratamento com o Piroxicam na fração de hemácias e plasma.

Figura 3b - Representa o percentual de ligação do tecnécio em hemácias após tratamento com o Piroxicam nas frações insolúveis de hemácias e plasma.

Figura 4a - Representa o percentual de ligação do tecnécio em hemácias após tratamento com a Dexametasona na fração de hemácias e plasma.

Figura 4b - Representa o percentual de ligação do tecnécio em hemácias após tratamento com a Dexametasona na fração insolúvel.

Figura 5 - Representa o percentual de ligação do tecnécio em hemácias após tratamento com a Dexametasona na presença e ausência o complexo B e controle.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Potencia antiinflamatória dos corticosteróides

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ASS	Ácido acetilsalicílico
AI	Antiinflamatório
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
ECI	Elétron de Conversão Interna
EA	Elétron Auger
FIC	Fração insolúvel da célula
FSC	Fração solúvel da célula
FSP	Fração solúvel do plasma
HB	Hemoglobina
LET	Energia de Transferência Linear
Mo	Molibdênio
Mo-99	Molibdênio-99
NaCl	Cloreto de sódio
PGD ₂	Prostaglandinas
SnCl ₂	Cloreto estânico
SnCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto estânico bi-hidratado
Tc	Tecnécio
^{99m} Tc	Tecnécio metaestável
TCA	Ácido tricloroacético
TcO ₄ ⁻	Íon pertecnetato

TcO_4Na

Pertecnetato de sódio

VSC

Volume sanguíneo cerebral

SUMARIO

DEDICATÓRIA	x
AGRADECIMENTOS	xi
RESUMO	xii
SUMMARY	xiii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xiv
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xvi
1 - REVISÃO DA LITERATURA	01
1.1- Aplicações da radiação ionizante e o ^{99m}Tc .	01
1.2- Marcação de espécies biológicas	04
1.3- O sangue e a marcação das hemácias	05
1.3.1- Marcação das proteínas plasmáticas	08
1.4- Estudo dos fármacos na marcação com ^{99m}Tc	09
1.5- Fármacos antiinflamatórios	10
1.5.1- Antiinflamatórios não-esteróides	12
1.5.1.1- Derivados do AAS- ácido acetil salicílico	14
1.5.1.2- Derivados De pirazolona	14
1.5.1.3- Derivados do paraaminofenol	15
1.5.1.4- Derivados do ácido acético	15
1.5.1.5- Derivados do ácido propiônico	16
1.5.1.6- Derivados do ácido fenilantrílico	17
1.5.1.7- Derivados do ácido enólico	17
1.5.2- Antiinflamatórios esteróides	18
1.5.2.1- Dexametasona	21
2- JUSTIFICATIVA	23
3- OBJETIVOS	24
3- Objetivo geral	24
3.1- Objetivos específicos	24
4- MATERIAL E MÉTODO	25
4.1– Equipamentos	25
4.2– Reagentes	25
4.3– Outros	26
4.4– Animais	26
4.5– Determinação da fragilidade osmótica de hemácias	27
4.6– Marcação de hemácias e proteínas plasmáticas <i>in vitro</i>	28
4.7– Análise estatística	31
5- RESULTADOS E DISCUSSAO	32
5.1- Influência de fármacos antiinflamatórios na fragilidade osmótica	32
5.2- Influência da dexametasona e piroxicam sobre a marcação de hemácias com tecnécio	35
6- CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1. REVISAO DE LITERATURA

1.1 Aplicações da radiação ionizante e o ^{99m}Tc .

A radiação proveniente da desintegração dos radionuclídeos é largamente empregada nas ciências da saúde com a finalidade diagnóstica e terapêutica, bem como em modelos experimentais (BERNARDO-FILHO et al., 1993; BERNARDO-FILHO; GUTFILEN; MACIEL, 1994; PLOTKOWSKI, 1993). Mais de 300 hospitais e clínicas do Brasil e da América Latina recebem semanalmente 21 produtos radioativos e 15 tipos de reagentes liofilizados, utilizados em 1,7 milhão de procedimentos médicos (EARLY; SADEE, 1995).

Os radionuclídeos podem ser considerados naturais, quando surgidos no período da formação da terra e artificiais, quando criados por bombardeamento de partículas ou nos reatores nucleares, ou ainda em geradores de radionuclídeos (OWUNWANNE, PATEL; SADEK, 1995; EARLY; SADEE, 1995). O radionuclídeo mais utilizado é o proveniente do gerador molibidênio-99/tecnécio-99m ($^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$) (OWUNWANNE; PATEL; SADEK 1995), um sistema que permite aos médicos obterem esse elemento a partir de um procedimento simples de cromatografia. Em uma extremidade coloca-se o frasco com uma solução salina de cloreto de sódio a 0,9%, em outra, um frasco em vácuo, também envolto em blindagem de chumbo, que recolherá o ^{99m}Tc . No frasco em vácuo, ao fim de cada eluição, o médico obterá o tecnécio, que tem meia vida de seis horas. Antes de ser expedido o tecnécio eluído é submetido a rigorosos testes de qualidade, de pH, concentração de alumina, esterilidade e apirogenicidade, além de pureza radionuclídica e radioquímica.

O uso dessas fontes está restrito aos laboratórios dos serviços de medicina nuclear, nos quais os profissionais que neles trabalham, médicos e radiofarmacêuticos possuem experiência e qualificação pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN).

Inúmeros radionuclídeos podem ser utilizados em medicina nuclear, a definição do vai depender dos procedimentos a serem executados e da necessidade, tais como: o tipo de emissão radioativa necessária que define a seleção do isótopo radioativo e a meia vida e energia da radiação emitida desejada (EARLY; SADEE, 1995; BERNARDO-FILHO, 1999; KEREIAKES, 1992).

Para efeito terapêutico, os radionuclídeos empregados em medicina nuclear deverão ser emissores de radiação beta negativa, por apresentar alto LET (energia de transferência linear). Como exemplo temos o Iodo-131, o Samário-153, o Fósforo-32, o Rênio-186 e o Ítrio-90 e o Estanho-117m, que apesar de emitir radiação gama, pode, por conversão interna levar a emissão do ECI (Elétron de Conversão Interna), esse por sua vez emite o EA (Elétron Auger). Ambos tem propriedades físicas similares às radiações beta negativas, com grande poder de interação com a matéria e alto LET (HARBERT, 1996; EARLY; SADEE, 1995; BERNARDO-FILHO, 1999; KEREIAKES, 1992).

Para fins diagnósticos, os radionuclídeos utilizados são emissores de radiação gama, que apresentam baixo LET que é facilmente detectada externamente ao corpo humano quando da administração do radiofármaco. Como exemplo temos o Tecnécio-99m, o Iodo-123, Índio-11 e Tálcio-201, amplamente utilizados na prática médica (HARBERT, 1996; SRIVASTAVA, 1996).

O Tecnécio é atualmente o radionuclídeo mais utilizado em medicina nuclear para procedimentos diagnósticos (GUTFILEN, 1993; EARLY; SADEE, 1995; SAHA,

1997) e em pesquisa básica (BERNARDO-FILHO et al., 1992; BERNARDO-FILHO et al., 1993; GUTFILEN, 1993; PLOTKOWSKI, 1993). Na década de 60, os isótopos radioativos do Iodo ainda predominavam, mas a partir dos anos 70, o Tecnécio- 99m passou a predominar nos exames de medicina (SRIVASTAVA, 1996). É largamente utilizado para investigar a tireóide e glândulas salivares, plexo coróide, estômago, secreção intestinal e cérebro. Incorporado a outras substâncias, permite obter imagens de ossos, fígado, pulmão, rins e outros órgãos.

A ampla utilização do Tecnécio- 99m deve-se a uma série de propriedades vantajosas desse radionuclídeo, como:

- Facilidade de obtenção através dos sistemas de geradores ^{99}Mo / ^{99m}Tc que são facilmente transportados, servindo como fontes em locais distantes de onde foram produzidos, ocupando pouco espaço e baixo custo;
- Meia vida de 6 horas;
- 99,999% de decaimento por transição isomérica, correspondendo à emissão gama de 140 KeV, proporcionando boa penetração e possibilitando detecção em gama, câmara para realização de imagens cintigráficas (SILVA, 1998; EARLY; SADEE, 1995; BERNARDO-FILHO, 1999; KEREIAKES, 1992; SRIVASTAVA, 1996);
- Energia corpuscular desprezível (SAHA, 1997; SRIVASTAVA, 1996; EARLY; SADEE, 1995);
- Baixa dose de radiação emitida no decaimento proporciona condições favoráveis a sua administração, por diferentes vias, em pacientes submetidos a exames;

- Baixo custo para obtenção em relação aos radionuclídeos obtidos por reações nucleares em aceleradores e reatores;
- Simplicidade no gerenciamento dos rejeitos produzidos;
- O tecnécio pode ser desprezado em lixo comum, depois de colocado em locais de decaimento apropriados e depois de determinado tempo (SILVA, 1998; BERNARDO-FILHO, 1999; SRIVASTAVA, 1996);
- Não causam alterações danosas ao meio ambiente;
- Possibilita marcação de diferentes espécies moleculares e celulares (SAHA, 1998; SRIVASTAVA, 1996; EARLY; SADEE, 1995).

Apesar das imensas vantagens, o contato do Tecnécio-99m com as células podem acarretar lesões, como alteração no ácido desoxirribonucléico (DNA). Os efeitos lesivos estão diretamente relacionados aos elétrons ECI e EA (NARRA, 1994; ASAR, 1991).

1.2 Marcação de espécies biológicas.

O elemento radioativo associado a moléculas ou espécies biológicas permite o estudo específico de diferentes órgãos do corpo humano, que tem afinidade específica por certas moléculas que fazem parte do seu metabolismo ou de sua estrutura. Muitas vezes as características físico-química das espécies marcadas irá determinar a sua melhor aplicação (BERNARDO-FILHO, 1988).

As moléculas marcadas são o ácido tiomálico (estudo renal), albumina (estudo da volemia), dextran (vias linfáticas), enxofre coloidal (fígado e baço), ácido glucoheptônico (rim e cérebro), iminodifosfato (osso e coração), iodofenil (vesícula e vias biliares), macroagregados (pulmão), microagregados de albumina (fígado). As

espécies biológicas mais utilizadas são: cercárias de *Shistosoma mansoni*, *Diplococus pneumonia*, *Duguesia tigrina*, *Escherichia coli*, hemácias, fibroblastos, leucócitos e plaquetas (BERNARDO-FILHO, 1988).

1.3 O sangue e a marcação das hemácias.

A comunicação da maioria das estruturas do organismo vivo se faz através do sangue, bem como transporte de substâncias, nutriente celular, excreção, equilíbrio ácido-base, manutenção da temperatura corporal e a defesa do organismo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1997).

A parte sólida do sangue é composta pelos glóbulos vermelhos (hemácias), glóbulos brancos (leucócitos) e pelas plaquetas. Já o plasma constitui: sua parte aquosa, viscosa, com os sais inorgânicos (0,9%), suas proteínas (7%) e seus componentes orgânicos não protéicos (10%) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1997).

As hemácias de formato bicôncavas têm diâmetro de aproximadamente 7,2mm, com membrana constituída de 42% de proteínas, 44% de lipídios e 7% de carboidratos e uma espessura de 6mm (SMITH, 1985; CORMACK, 1991). São as mais numerosas dos componentes celulares sanguíneos, apresentam técnica simples de separação dos demais elementos e fácil manipulação, resistentes a agentes físicos e químicos *in vitro*, variedade de mecanismos de transporte celular, não são tão dependentes de nutrientes, são ricas em sítios de ligação (BRAGA et al., 2000). Apresentam também grande variação de mecanismos de transporte celular e podem ser submetidas a métodos científicos *in vitro*, *in vivo* e métodos *in vitro* e *in vivo* combinados (BERNARDO-FILHO et al., 1992; CALLAHAN et al., 1982).

Devido essas características torna-se fácil sua marcação, tendo sido realizado pela primeira vez por FISCHER; WAL; LEON (1967). Inicialmente a marcação de hemácias foi utilizada para avaliação do sistema cardiovascular, volemia, hemorragias gastrointestinais e outros (CALLAHAN et al, 1982; BERNARDO-FILHO, 1988). Outra utilização conhecida ocorre no diagnóstico de trombose de veias profundas, sangramento interno, hemangiomas oculta em outras localizações, frente ao diagnóstico de hemangioendoteliomas hepáticos (BAR-SEVER, 1994), cálculo da massa de células vermelhas (SAHA, 1997), avaliação da vascularização de tumores cerebrais, delinea bem os órgãos que são bem irrigados como coração, fígado e baço e vasos sanguíneos de grosso calibre (EARLY; SADEE, 1995). É utilizado em ciências neurológicas para calcular o volume sanguíneo cerebral (VSC), podendo ainda avaliar o fluxo de má formação vascular de partes moles (SRIVASTAVA; STRAUB, 1990; BERNARDO-FILHO, 1983). Em biologia básica, a marcação das hemácias contribui para o estudo dos mecanismos de transporte de estruturas celulares e função da membrana plasmática (GUFILIN, 1996).

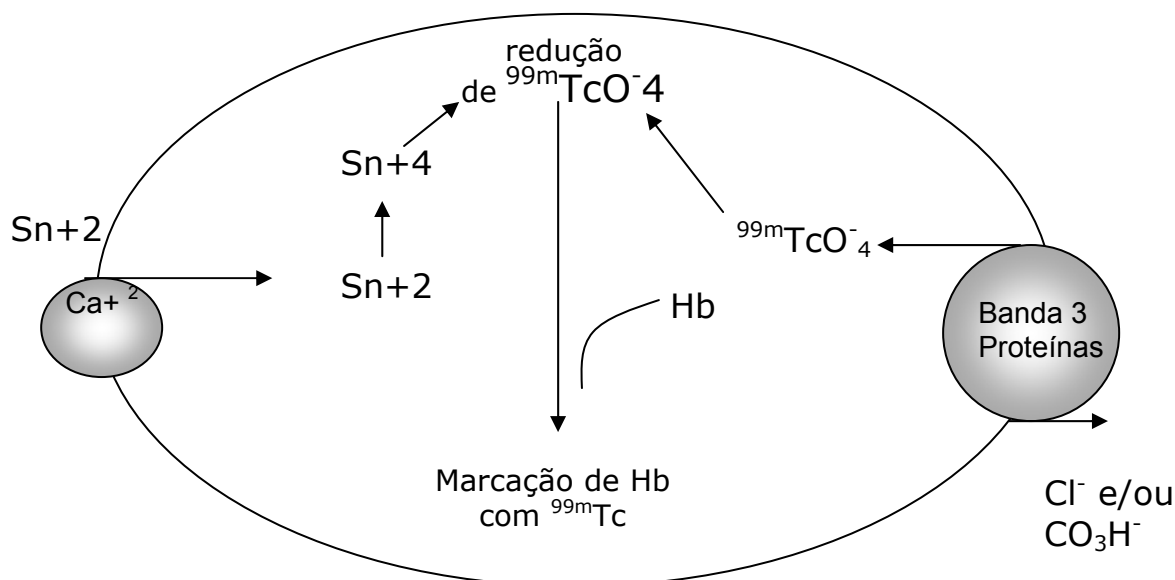
A fixação do ^{99m}Tc às hemácias tem metodologia clara e objetiva, porém variadas (OWUNWANNE; PATEL; SADEK, 1995; BERNARDO-FILHO et al., 1993), mas todas dependem de agentes redutores, sendo o cloreto estanoso o mais freqüentemente utilizado (BERNARDO-FILHO et al, 1999).

Os métodos são: *in vitro*, *in vivo* e *in vitro* e *in vivo* combinados (BERNARDO-FILHO et al., 1993). Nos experimentos que utilizaram os métodos *in vitro*, o sangue isolado é incubado com o íon estanoso e posteriormente com o íon pertecnetato, depois do tempo de incubação, é reinjetado no paciente. Esse método apresenta maior eficácia de marcação (OWUNWANNE; PATEL; SADEK, 1995).

Na marcação *in vivo*, o composto é injetado endovenosamente contendo íon estanoso e depois de 20 minutos pela mesma via é administrado TC-99m (pertechnetato) pela menor exposição do técnico ao sangue (BAUM, 1997; EARLY; SADEE, 1995) Esse método é amplamente utilizado (OWUNWANNE; PATEL; SADEK, 1995).

No método combinado, injeta-se o íon estanoso no paciente e após 20 minutos retira-se o seu sangue, adiciona-se o pertechnetato, incuba-se por 10 minutos e reinjeta no paciente (BERNARDO-FILHO et al., 1993).

A cinética da marcação de hemácias com ^{99m}Tc é uma reação entre o TC reduzido e a cadeia beta de hemoglobinas. O TcO_4^- entra na hemácia por difusão, mas na presença do estanoso (Sn-17) é reduzido no meio intracelular com a hemoglobina, ficando aproximadamente $75,8 \pm 2,3\%$ ligado à globina e $19 \pm 1,5\%$ ligada à heme (SRIVASTAVA, 1987). O transporte do íon estanoso para o interior da hemácia se dá por um sistema de transporte específico, os canais de cálcio (GUTFILEN, 1992; SAMPSON, 1996). Estudos mostram que fármacos anti hipertensivos como a nifedipina, parecem competir pelos mesmos canais de cálcio para entrar nas células (GUTFILEN, 1992). Uma vez ligado à HB o Tecnécio-99m ficará fixado dentro da hemácia (OWUNWANNE; PATEL; SADEK, 1995).



1.3.1 Marcação das proteínas plasmáticas.

A marcação das proteínas plasmáticas tem seus primeiros estudos com ^{99m}Tc com a soroalbumina e tem sido aplicada nas avaliações cardíacas, determinação do volume sangüíneo, perda protéica do trato digestivo (BERNARDO-FILHO, 1996; VIDAL, 1998), localização de placenta entre outros (BERNARDO-FILHO; MOURA; BOASQUERIVSQUE, 1983; BERNARDO-FILHO, 1988; BERNARDO-FILHO; GUTFILEN; MACIEL, 1994). Sempre que um radiofármaco é administrado a um paciente, uma fração do mesmo é encontrada ligada às proteínas plasmáticas (HARBERT et al., 1996).

As proteínas correspondem a aproximadamente 7% do volume do plasma sangüíneo e são compostas por fibrinogênio, globulina e albumina. Elas exercem força osmótica no interior do sistema circulatório, regulando a troca da solução aquosa entre o plasma e o líquido extracelular (OWUNWANNE; PATEL; SADEK, 1995).

A albumina que representa de 50 a 60% das proteínas plasmáticas (RIPOLLHAMER, 1995), é produzida pelo fígado e liga-se a metabólitos insolúveis como ácidos graxos, servindo como proteína de transporte. Seu peso molecular é de 69.000 Dalton, reage com o Tecnécio no estado de oxidação para formar o Tecnécio-99m-HSA e o agente reator é o SnCl_2 (OWUNWANNE, 1995). As globulinas incluem os anticorpos e proteínas responsáveis pelo transporte de lipídeos e íons metálicos pesados. O fibrinogênio é uma proteína solúvel que se

polimeriza para formar a proteína insolúvel fibrina durante a coagulação sangüínea (SMITH, 1985).

1.4 Estudo dos fármacos na marcação com ^{99m}Tc .

Quando um radiofármaco é administrado a um paciente, ocorre o processo de biodistribuição. A ligação dos radiofármacos aos elementos sanguíneos pode ser alterada pela presença de fármacos, da mesma forma que a biodistribuição normal de um radiofármaco pode ser modificada por uma interação medicamentosa, podendo acarretar em uma interpretação inadequada da imagem cintigráfica (SAHA, 1998).

Uma droga terapêutica pode modificar a natureza do radiofármaco, bem como o meio bioquímico no qual o radiofármaco está exposto, as estruturas que normalmente não seriam alvo para os radiofármacos e a capacidade dos radiofármacos de se ligarem aos elementos sanguíneos (HLADIK, 1987; SRIVASTAVA et al., 1987; SAMPSON, 1996). Podem interferir diretamente no processo de marcação, competindo pelo sítio de ligação do ^{99m}Tc , alterando a eficiência do agente redutor.

Nos diagnósticos com compostos farmacológicos marcados com isótopos radioativos, os resultados podem acarretar em uma má interpretação dos exames, devido a um comportamento não esperado apresentado pelo radiofármaco. Fármacos como antihipertensivos, diuréticos e antiinflamatórios esteroidais ou não esteroidais interferem com a marcação e biodistribuição dos radiofármacos (HESSLEWOOD, 1994).

1.5 Fármacos antiinflamatórios

A reação inflamatória está presente em quase todas as lesões produzidas no organismo humano. Traumas, infecções, reações imunitárias a agentes externos e processos auto-imunes acompanham-se, em maior ou menor grau de reações inflamatórias. (WANNMACHER; FERREIRA, 1998).

As manifestações clínicas do processo inflamatório, também chamadas sinais cardinais da inflamação são: hiperalgesia, eritema e edema. Em nível histopatológico, ocorrem dois quadros sucessivos: um quadro agudo e um crônico que é proliferativo da resposta inflamatória, instalada 36 a 48 horas após o estímulo, caracterizada por migração leucocitária, com predominância de monócitos, linfócitos, plasmócitos e fibroblastos, e sinais de regeneração e reconstrução de matriz conjuntiva (RANG; DALE; RITTER, 1992; INSEL, 1996).

Em nível molecular, há desnaturação protéica determinada por enzimas líticas (proteases, esterases, collagenases) liberadas pela ruptura da membrana dos lisossomas, em consequência de ação de fagócitos. A alteração protéica é o ponto de partida para a ativação de uma série de sistemas que sintetizam e liberam substâncias intermediárias de lesão, como histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos e vários fatores quimiotáticos. Essas substâncias são responsáveis por vasodilatação, aumento de permeabilidade vascular, migração leucocitária, agregação plaquetária, dentre outras manifestações do processo inflamatório agudo. (WANNMACHER; FERREIRA, 1998).

As prostaglandinas estão mais constantemente envolvidas nesse processo. São formadas a partir do ácido araquidônico, liberado dos fosfolipídeos da membrana das células lesadas, por ação catalítica da fosfolipase A2, fosfolipase C e

lipase diglicerídea. Ciclorigenases (constitutivo – COX-1 e induzível COX-2) e hidroperoxidase catalisam as etapas seqüenciais de síntese dos prostanóides (prostaglandinas clássicas e tromboxanos), enquanto as lipoxigenases transformam o ácido araquidônico em leucotrienos e outros componentes, envolvidos em diferentes ações (WANNMACHER; FERREIRA, 1998).

Prostaglandinas são vasodilatadores, exceto tromboxano A_2 que também estimula agregação plaquetária, ao contrário de prostaciclina- PGD_2 que é liberada de mastócitos ativados por estímulos alérgicos ou outros PGE_2 que inibe a ação de linfócitos e outras células que participam das respostas alérgicas ou inflamatórias. Além de promoverem vasodilatação, as prostaglandinas sensibilizam nociceptores (hiperalgia) e estimulam centros hipotalâmicos de termorregulação. Os leucotrieno aumentam a permeabilidade vascular e atraem leucócitos para o sítio de lesão. Histamina e bradicinina aumentam a permeabilidade capilar e ativam receptores nocigênicos. A estimulação das membranas dos neutrófilos produz radical livre derivado do oxigênio molecular, podendo estimular a produção de outras moléculas reativas, como peróxido de hidrogênio e radicais hidroxílicos. A interação dessas substâncias com o ácido araquidônico resulta na formação de substâncias quimiotáticas, perpetuando assim, o processo inflamatório (KOENER, 1994). Podem-se dividir os fármacos utilizados na terapêutica antiinflamatória em três classes:

I – Antiinflamatórios não hormonais ou não esteroidais

II – Antiinflamatórios hormonais (corticosteróides)

III – Outros antiinflamatórios (antiinflamatórios de longa ação como o ouro, a penicilina, a colchicina, os imunodepressores, etc), que não só combatem os sintomas, mas também evitam a progressão da doença. Sua desvantagem consiste na alta toxicidade (WANNMACHER; FERREIRA, 1998).

1.5.1 Antiinflamatórios não esteróides.

Os Antiinflamatórios (AI) não esteróides possuem propriedades analgésicas, antidérmica, antiinflamatória e antitrombótico. Sua ação antiinflamatória decorre da inibição da síntese de prostaglandinas, efetuada mediante inativação das cicloxigenases constitutiva (COX-1) e indizível (COX-2). A primeira é responsável pelos efeitos fisiológicos das prostaglandinas em sítios gástricos e renais, já a segunda surge em locais de inflamação. A inibição da COX-1 é pelo menos em parte, responsável por alguns dos efeitos adversos de antiinflamatórios não esteróides, como as toxicidades renal e gastrintestinal. Na tentativa de preservar as características antiinflamatórias, reduzindo os efeitos adversos, as pesquisas têm sido direcionadas para a busca de representantes com maior seletividade para COX-2 como meloxicam e nabumetona (INSEL, 1996; VANE; BOTTING, 1995).

O efeito dos antiinflamatórios não esteróides é sintomático, inespecífico, não interferindo na história natural dos processos inflamatórios. Todos os antiinflamatórios não esteróides tem eficácia similar, então a escolha deve se basear em outros critérios: toxicidade relativa, conveniência para o paciente, custo e experiência de emprego. Em pacientes não responsivos ao dado antiinflamatório, é preferível substituí-lo por outro de subgrupo diferente (QUARESMA; NATOUR; FERRAZ, 1997).

Os antiinflamatórios não esteróides compreendem: (1) os derivados do ácido salicílico (AAS); (2) derivados da pirazolona; (3) os derivados da paraaminofenol; (4) antiinflamatórios congêneres derivados do ácido acético, derivado do ácido

propiónico, derivados do ácido fenilalanílico, derivados do ácido enólico. (BJORRMAN, 1998).

1.5.1.1 Derivados do AAS-Ácido acetil salicílico.

Os salicilatos são antiinflamatórios eficientes e de largo uso clínico. Parte do seu efeito parece dever-se à inibição da síntese de prostaglandinas (PGS), através da inibição da cicloxigenase impedindo, desta forma, a conversão do ácido araquidônico em endoperóxido cíclico, PGG₂. Como vimos, as prostaglandinas são responsáveis por parte das alterações, observadas no processo inflamatório. A capacidade que fármacos do tipo aspirina tem de inibir algumas funções leucocitárias: produção de superóxidos por fagócitos, a resposta de células linfóides a mitógenos *in vitro*, a atividade pró-inflamatória de origem linfocitária, em reações não imunes sugere que mecanismos adicionais são necessários para explicar a atividade antiinflamatória desses fármacos. A aspirina é de uma eficácia para reduzir a dor de intensidade leve e a moderada, pois atua de forma periférica através de seus efeitos sobre a inflamação e, provavelmente também inibe os estímulos para a dor num sítio subcortical (VANE; FLOOWER; BOTTING, 1990).

A dose analgésica ou antipirética ótima de aspirina é inferior a dose oral comumente utilizada de (0,6g), que pode ser repetida a cada 4 horas e doses menores (0,3g) a cada 3 horas. A dose para crianças é de 50-75 mg/kg/dia em doses divididas (VANE; FLOOWER; BOTTING, 1990).

1.5.1.2 Derivados de pirazolona.

O grupo inclui fenilbutazona (butazolidina), a oxifenilbultazona, a dipirona, a azapropazona e alguns derivados de uso restrito atualmente: a fenazona (antipirina)

e aminopirina (piramido) que são altamente tóxicas e, se possível, devem ser evitadas, pelo menos em tratamentos prolongados. A ação antiinflamatória da fenilbutazona e oxifenilbutazona é potente e, embora ajam como antiálgicos e antipiréticos não devem ser empregados para a obtenção desses efeitos, devido à toxicidade (JONES, 1996).

1.5.1.3 Derivados do para-aminofenol

Compreendem a acetofenetidina (fenacetina) e o acetaminofeno (paracetamol). Estes fármacos têm importantes efeitos antitérmicos e antiálgico, comparáveis àqueles da aspirina, entretanto, seu efeito antiinflamatório é muito reduzido. O acetaminofeno é fraco inibidor da biossíntese de PGS, embora exista alguma evidência que permita sugerir que ela possa ser mais eficaz contra enzimas no sistema nervoso central que na periferia. Este fato poderia ser responsável pelos efeitos antiálgicos e antitérmicos, efeitos que envolvem ações no tecido neural. Estes fármacos, em doses terapêuticas não afetam o equilíbrio ácido base ou o tempo de coagulação, e não produzem irritação gástrica ou hemorragias na mucosa do trato digestivo, efeitos comuns às outras classes de substâncias. Em casos de dores moderadas como cefaléia, artralguas (especialmente na gota), dismenorréia, a dose total diária, que deve ser administrada fracionadamente, não deve ultrapassar 2g e as crianças devem receber doses menores (PARRA et al, 2003).

1.5.1.4 Derivados do ácido acético (indometacina, sulindaco e diclofenaco).

O diclofenaco é um potente inibidor da cicloxigenase, dotado de propriedades analgésicas e antipiréticas. O fármaco é rapidamente absorvido após administração

oral e tem meia vida curta. A potência do diclofenaco é maior que a do naproxeno, estando recomendado para o tratamento de condições inflamatórias crônicas, como artrite e osteoartrite. A indometacina apresenta efeitos antiinflamatórios de intensidade equivalente aos da aspirina, tem ação antitérmica comparável e não é destituída de propriedade antiálgica e tem grande emprego terapêutico, mas não é destituída de toxicidade. O sulindaco é uma pró-droga. Seu metabólito é cerca de 500 vezes mais potente como inibidor da ciclooxigenase, o que poderia explicar a algo mais baixa incidência de toxicidade gastrointestinal, uma vez que a mucosa gástrica ou intestinal não estaria exposta a altas concentrações da droga ativa durante a administração oral (AMANN; SCHULIGOI, 2000).

1.5.1.5 Derivados do ácido propiônico

O naproxeno apresenta potência comprável à da indometacina, como antiinflamatório, antitérmico e antiálgico. É potente inibidor da síntese de prostaglandinas. O ibuprofeno, em doses de cerca de 2400mg ao dia, equivale a 4g de aspirina em termos de efeito antiinflamatório. O fármaco é quase sempre prescrito em doses menores, nas quais tem ação analgésica, porém é inferior como agente antiinflamatório. O citoprofeno tem capacidade de inibir tanto a ciclooxigenase quanto a lipoxigenase. É rapidamente absorvido, porém sua meia vida é curta. A eficácia do citoprofeno equivale a da aspirina e de outros AINE no tratamento da artrite reumatóide e da osteoartrite. Apesar de seu duplo efeito sobre as PGS e os leucotrienos, não foi demonstrado ser superior a outros AINE (KIDO et al., 1998).

1.5.1.6 Derivados do ácido fenilalanílico (ácidos mefenâmico e flufenâmico).

O ácido mefenâmico é principalmente antiálgico, embora tenha propriedades antiinflamatórias e antitérmicas. O ácido flufenâmico é preferencialmente antiinflamatório. O ácido mefenâmico é absorvido lentamente no trato gastrointestinal. Tem efeitos secundários e tóxicos e não deve ser utilizado por tempo prolongado (não mais que uma semana). Entre seus efeitos, relatam-se cefaléias, tonturas, perturbações gastrointestinais, agranulocitoses e reações de hipersensibilidade (GOODMAN; GILMANS, 1985)

1.5.1.7 Derivados de ácidos enólicos

Constituem um grupo de fármacos recentemente utilizados. Tem atividades antiálgicas, antitérmicas e antiinflamatórias. A principal vantagem do piroxicam é sua meia vida longa, o que permite a administração da dose única diária. É completamente absorvido após administração oral no estômago e na parte superior do intestino delgado. Liga-se extensamente às proteínas plasmáticas (99%) e é eliminado pela urina sob a forma de conjugado glicorunídeo e, em menor grau, na forma inalterada. Observam-se sintomas gastrointestinais em 20% dos pacientes. Outras reações adversas incluem tonteira, zumbido, cefaléia e erupção cutânea. O piroxicam pode ser utilizado no tratamento da artrite reumatóide, espondilite anquilosante e osteoartrite. (SAYYAH et al., 2003; DING et al., 2003; HEEB et al., 2003).

1.5.2 Antiinflamatórios esteróides (corticosteróide)

Em geral, os corticosteróides com ação antiinflamatória são mais ativos nos processos inflamatórios persistentes, em vias de cronificação ou crônicos e em diversas afecções alérgicas renitentes. Eles são capazes de estabilizar as membranas lisossomiais, diminuem a resposta vascular a fatores de permeabilidade e os fenômenos proliferativos do conjuntivo. Produzem cosicopenia acentuada e, em doses maiores determinam uma diminuição dos linfócitos circulantes, também induzem a síntese da liporcotina, proteína que se encontra complexada a fosfolipase A₂ e cuja função é preservar a integridade da membrana plasmática. Os corticóides antiinflamatórios são predominantemente glicorticóides. Esses são absorvidos por via oral ou parenteral, ligam-se principalmente as globulinas plasmáticas e são metabolizadas no fígado. A excreção das formas livres ou de metabólitos se faz pela urina e pela bile (WENNEBERG, 1991).

A tabela 1 indica a potência antiinflamatória aproximada dos principais corticóides de utilização clínica, por comparação com o efeito antiinflamatório do cortisol.

Tabela 1-Potência antiinflamatória dos corticosteróides

Corticosteróides	dose diária média	Potência antiinflamatória relativa
Hidrocortisona	40-200 mg	1
Betametasona	1,2-2,4 mg	30
Dexametasona	1,5-3 mg	25
Parametasona	4-8 mg	10
Triancinolona	8-16 mg	5

Metilprednisolona	8-16 mg	5
Prednisolona	10-20 mg	4
Prednisona	10-20 mg	4
Cortisona	25-200 mg	0,8

O efeito AI dessas substancias deve ser exercido localmente, uma vez que é eficaz por aplicação tópica, ou em casos de processos articulares, por injeção intra-articular. Não se pode atribuir a um fator determinado o efeito AI decorrente do uso dessas substâncias. Referimo-nos à estabilização das membranas dos lisossomas, o que acarretaria uma menor liberação das enzimas lisossomiais. A capacidade dos vasos microcirculatórios em responder a estímulos lesivos está sensivelmente abrandada sob utilização desses fármacos. Os fenômenos proliferativos em afecções reumáticas diminuem sob a influência dos corticosteróides, o que justifica imaginar-se um efeito sobre células conjuntivas. A liberação de cicossanoides, em tecidos expostos ao agente lesivo. É bloqueada pelos glicocorticóides, através da inibição da fosfolipase A₂, enzima responsável pela liberação do ácido araquidônico a partir de fosfolipídios da membrana. A inibição da fosfolipase A₂ é mediada pela lipocortina, cuja síntese e liberação é estimulada pelos esteróides antiinflamatórios. Além disso, diminuem a migração de células para o foco inflamatório e interferem com uma variedade de funções inerentes a essas células (HUBER, 1996).

Em virtude dos efeitos metabólicos, os corticosteróides utilizados em terapêutica antiinflamatória, podem induzir hiperglicemia por estimularem a gliconeogênese e diminuir a utilização periférica de glicose. Ocorre aumento do catabolismo protéico. Esse efeito não poupa as proteínas ósseas, de modo que um

certo grau de osteoporose e perda de cálcio podem acontecer. Uma consequência grave é a retenção de sódio, cloro e água (atividade mineralocorticóide), com distúrbios hidroeletrolíticos e formação de edema. Esse efeito é mais evidente com os glicocorticóides naturais do que com a maioria dos sintéticos (prednisolona, triacindona, betametasona, dexametasona) e obviamente menos intenso que a retenção promovida pelo mineralcorticóide aldosterona. (KOPP, 1991).

As repercussões para o lado das células sanguíneas incluem eosinopenia e neutrofilia. Há depressão de tecidos linfóides e diminuição do número de linfócitos circulantes. A capacidade fagocitária dos granulócitos polimorfonucleares apresenta-se reduzida. A involução dos tecidos linfáticos, com diminuição de anticorpos circulantes, caracteriza a atividade imunossupressora desses agentes. Em casos de processos infecciosos, os microorganismos podem continuar a proliferar, com abrandamento da resposta inflamatória, o que é deletério. Por outro lado, infecções apostas podem ser mascaradas. Irritação gástrica, formação de úlceras, distúrbios mentais, supressão da função tireoideana podem ocorrer em casos de tratamento prolongado. Finalmente a suspensão do tratamento não deve ser abrupta. A retirada da droga se faz de modo gradativo, a fim de evitar insuficiência adrenal aguda, uma vez que a administração exógena do hormônio natural ou derivado sintético conduz a um período de atividade reduzida do córtex adrenal (KOPP, 1991).

1.5.2.1 Dexametasona

Atua de forma específica nos processos antiinflamatórios diminuindo a permeabilidade capilar e aumentando a estabilidade das membranas dos

lisossomos. Dentre os corticóides, a Dexametasona é a que apresenta a maior potencia antiinflamatória e praticamente não produz retenção de sódio.

É indicada em neurites, polineurites, nevralgia intercostal, nevralgia ciática, nevralgia de outros nervos periféricos, paralisia facial, poliradiculoneurite, hérnia de disco intervertebral, lombalgia e neuropatias diabéticas. É indicada também em crises agudas de processos reumáticos, como artrite reumatóide, bursite, capsulite, espondilite e reumatismo poliarticular agudo. É costumeiramente usado em contusões agudas com comprometimento osteoarticular ou osteomuscular, bem como nos espasmos musculares agudos (GUZZO; LAZARUS; WERTH, 1996).

Quando utilizada por longos períodos, o paciente fica susceptível a afecções como ulcera péptica, osteoporose com fraturas patológicas, fraqueza e atrofia muscular.

Algumas formulações comerciais apresentam esse corticóide associado a vitaminas do complexo B: Cianocobalamina (Vitamina B₁₂), precursora da coenzima B₁₂, participa da conversão da homocisteína em metionina que por sua vez vai ser utilizada na produção de mielina. Sendo um importante auxiliar na eficácia terapêutica, pois existem inúmeros processos degenerativos inflamatórios cujo mecanismo básico de origem é a desmielinização; Tiamina (Vitamina B₁), atuando como coenzima na descarboxilação oxidativa dos alfacetoácidos. É uma vitamina que deve estar presente em grandes quantidades nos músculos esqueléticos e nos axônios das células nervosas, principalmente nos processos de regeneração das terminações nervosas e de restauração das forças musculares. A deficiência de tiamina produz quadros de neurites com diminuição dos reflexos tendinosos profundos acompanhado de dores musculares; Piridoxina (vitamina B₆), atua no

metabolismo dos aminoácidos e na excitabilidade neuronal, a sua deficiência produz fraqueza muscular (YOKORO et al., 2003).

2. JUSTIFICATIVA

O estudo da interação medicamentosa em medicina nuclear é relevante, pois diminui a incidência de exames com falsos resultados, bem como de repetições desnecessárias dos exames com consequente exposição excessiva do paciente a radiação.

A ação dos antiinflamatórios hormonais e não hormonais no sentido de verificar efeitos e modificações da marcação das hemácias e da fragilidade osmótica, comprometendo possivelmente os trabalhos de cintilografia na medicina nuclear.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Estudar as ações dos fármacos como atividade antiinflamatória hormonais e não hormonais sobre a fragilidade osmótica de hemácias e proteínas plasmáticas com o ^{99m}Tc , em ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência da dexametasona e complexo vitamínico sobre a fragilidade osmótica de hemácias;
- Promover a marcação de hemácias e proteínas plasmáticas com ^{99m}Tc na presença de dexametasona, complexo de vitamina B e piroxicam;

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos em questão foram realizados no Laboratório de Pesquisas do Departamento de Biofísica e Radiobiologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

4.1 Equipamentos

- Agitador magnético, Fisatom, Brasil.
- Balança de precisão, Hr-200, Mettler, Suíça.
- Balança simples-Triple Beam Balance.
- Contador de cintilação gama DPC Gambyt CR
- Centrífuga varifuge K, Heraeus Christ, Alemanha.

4.2 Reagentes

- Ácido Tricloroacético (TCA 5%), Vetec, Brasil.
- Cloreto estanoso bi-hidratado, Reagen S.A., Brasil.

- EDTA Dissódico, Reagen S.A., Brasil.
- DEXADOR (4mg) com complexo B, Ativus farmacêutica, Brasil
- INFLAX (40mg), Ativus farmacêutica, Brasil
- ^{99m}Tc (TcO_4Na) do gerador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, IPEN/CNEN, Brasil. Obtido a partir do gerador de Mo^{99} (IPEN- Instituto de Pesquisa de Energia Nuclear, Comissão Nacional de Energia Nuclear, cedido pelo Departamento de Medicina Nuclear do Hospital das Clínicas- UFPE)

4.3 OUTROS

- Tubos de ensaios
- Seringas hipodérmicas (descartáveis)
- Pipetas graduadas e simples
- Papel alumínio

4.4 Animais

Para os experimentos foram utilizados ratos da linhagem Wistar, jovens adultos com idade de 90 dias, pesando de 200-250g, provenientes do Biotério do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da Universidade Federal de Pernambuco. A manutenção desses ratos em laboratório teve as seguintes características: alimentação do tipo ração comercial para roedores, água “ad

libidum”, iluminação artificial, ciclo claro e escuro de 12/12 horas e temperatura ambiente variando entre 26°C-30°C.

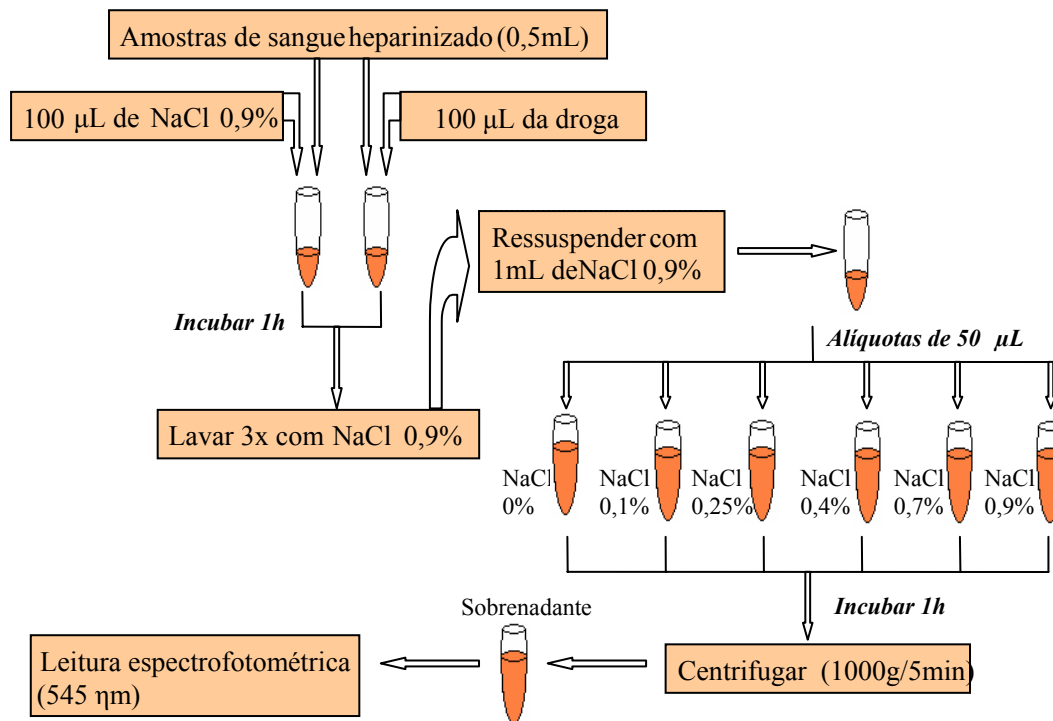
4.5 Determinação da fragilidade osmótica de hemácias

Os reagentes usados para o preparo das soluções para avaliar a fragilidade osmótica de hemácias de ratos foram a dexametasona (solução) em diferentes concentrações (100,200 e 400 µg/mL), complexo de vitaminas B (6,37µg); dexametasona associado ao complexo nas mesmas concentrações.

Amostras de 0,5 mL de sangue heparinizado foram incubadas com 100µL do fármaco nas referidas concentrações por 1 hora em temperatura ambiente. O controle foi incubado com 100µL de NaCl 0,9%. Após incubação de 1 hora, as amostras foram lavadas três vezes com NaCl 0,9% para remover o excesso do fármaco.

As células sanguíneas foram ressuspensas em 1mL de NaCl 0,9%. Alíquotas de 50 µL dessas células, tratadas com o fármaco e controle, foram colocadas em tubos com 5mL de solução salinas de NaCl em diferentes concentrações (0; 0,1; 0,25; 0,4; 0,7; 0,9 %). Após 1 hora em temperatura ambiente esses tubos foram centrifugados em Centrífuga Varifuge K, (Heraeus Christ, Alemanha) (1000g) durante 5 minutos e os sobrenadantes foram isolados e foram determinadas as densidades ópticas (OD) no Espectrofotômetro (545nm).

A densidade óptica dos sobrenadantes foi comparada com os correspondentes a 100% de lises (0,1% NaCl). O sobrenadante dos tubos contendo 0,9% de NaCl foram considerados reações brancas. Após a medição da fragilidade osmótica, foram traçadas curvas de fragilidade dos percentuais de hemólises (%L).



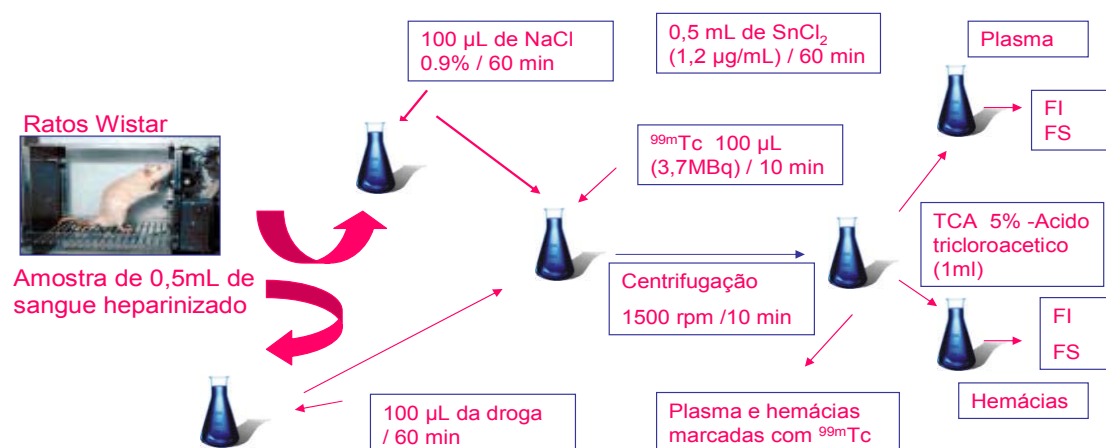
4.6 Marcação de hemácias e proteínas plasmáticas com o ^{99m}Tc *in vitro*.

O estudo de marcação de hemácias foi realizado utilizando diferentes concentrações de fármacos em solução como a dexametasona (10, 100 e 1000 µg/mL), complexo de vitaminas B (15 mg/mL); dexametasona associado ao complexo nas mesmas concentrações e piroxicam na concentração de 50, 500 e 5000 µg/mL.

Os procedimentos experimentais descritos foram realizados em tubos de ensaio tipo vacutainer, onde foi feito vácuo com seringas hipodérmicas antes de colocar o cloreto estanoso, pois pode ocorrer oxidação do cloreto estanoso em presença do oxigênio atmosférico, que poderia acarretar a diminuição da capacidade redutora desta solução.

Para preparar a solução de cloreto estanoso foi utilizado como veículo salina 0,9%. A concentração do cloreto estanoso foi a de 1,2µg/mL, escolhida de acordo com a eficiência de marcação obtida através de diversos estudos realizados por BERNARDO FILHO (1988).

O procedimento experimental foi realizado com amostras de 0,5 mL de sangue de ratos Wistar (n=3) com anticoagulante EDTA, os quais foram incubadas por um período de 60 min à temperatura ambiente na presença dos fármacos dexametasona, complexo de vitaminas e piroxicam, o grupo controle (0), na ausência de fármacos, recebeu o mesmo tratamento. A seguir foi acrescentado o cloreto estanoso (1,2µg/mL-500µL) e incubado por 60 minutos. O ^{99m}Tc foi adicionado na dosagem de 0,1mL (3.7 MBq) na forma de ($^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$), mantendo as mesmas condições por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas (1000g, por 10 minutos) e posteriormente separadas as alíquotas de plasma (P) e células sangüíneas (C), sendo calculada a radioatividade em CPM. Para avaliar o efeito dos fármacos na ligação do ^{99m}Tc às proteínas plasmáticas e células sangüíneas, as alíquotas de P e C (20µL) foram precipitadas com 1mL do ácido tricloroacético (5%), como também a mesma quantidade P e C (20µL) para 1mL de solução salina. Sendo, então, centrifugadas e isoladas as frações solúveis (FS) e insolúvel (FI), obtidas a partir do plasma e das células sangüíneas. A metodologia está descrita no desenho esquemático abaixo ilustrado.



Procedeu-se à contagem em contador gama (DPC Gambyt Cr) e os resultados obtidos, a partir das frações, foram calculados usando as fórmulas abaixo, segundo (BERNARDO-FILHO, 1990; SANTOS et al., 1995).

No Plasma	Nas Células	FIP ou FIC / FSP ou FSC	
FP	FC	FI	FS
$\frac{FP}{FP + FC}$	$\frac{FC}{FP + FC}$	$\frac{FI}{FS + FI}$	Ou $\frac{FS}{FS + FI}$

4.7 Análise estatística

O teste ANOVA foi utilizado para analisar os resultados nos experimentos e posteriormente o teste de Newman Keuls, sendo a variância de $p > 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudos da influência de fármacos antiinflamatórios hormonais na fragilidade osmótica de hemácias.

A determinação da fragilidade osmótica de hemácias foi avaliada comparando-se os efeitos das diferentes concentrações de dexametasona (100, 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$), complexo de vitaminas B (3,2; 6,4; 13mg/mL) e dexametasona (400 $\mu\text{g/mL}$) associado ao complexo de vitaminas B (13 mg/ML) nas mesmas concentrações. O controle recebeu solução salina 0,9% como veículo.

A Figura 1a mostra uma curva de fragilidade osmótica obtida de hemácias de ratos tratados com diferentes concentrações de Dexametasona, complexo B e associação de dexametasona com complexo B. A análise dos resultados indicam que ocorre uma redução significativa na taxa de 80.3% de hemólise no meio

hipotônico das células tratadas com 400 μ g/mL de dexametasona. De maneira que, quando o NaCl esta em baixa concentração, e com a adição de uma alta concentração de Vitamina.B promove 100 % de hemólise nas concentrações de NaCl de 0,1 a 0,4 % e pode ser induzido pelo aumento da osmolaridade do meio.

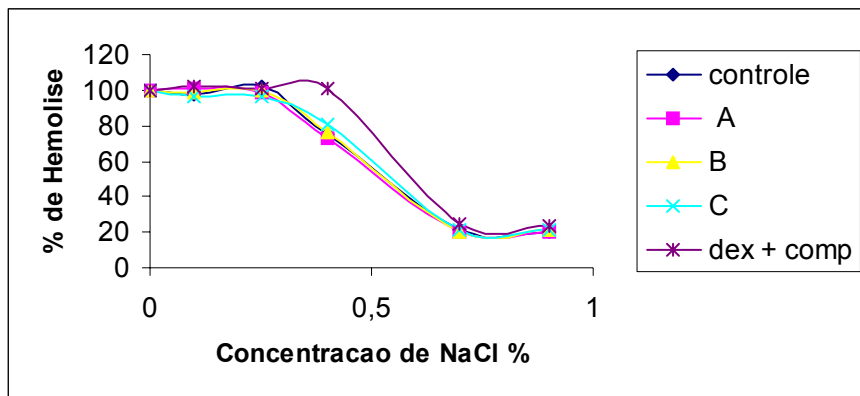


Figura 1a: representa a curva de fragilidade osmótica em ratos após tratamento com Dexametasona, Dexametasona associada ao complexo de Vitamina B e controle. Os valores são médias e desvio padrão de três experimentos similares.

A Figura 1b mostra, na curva de fragilidade osmótica, a diferença de comportamento entre a associação de dexametasona com o complexo B, em relação ao grupo controle e a concentração C (400 μ g/mL) de dexametasona, que tem comportamentos análogos.

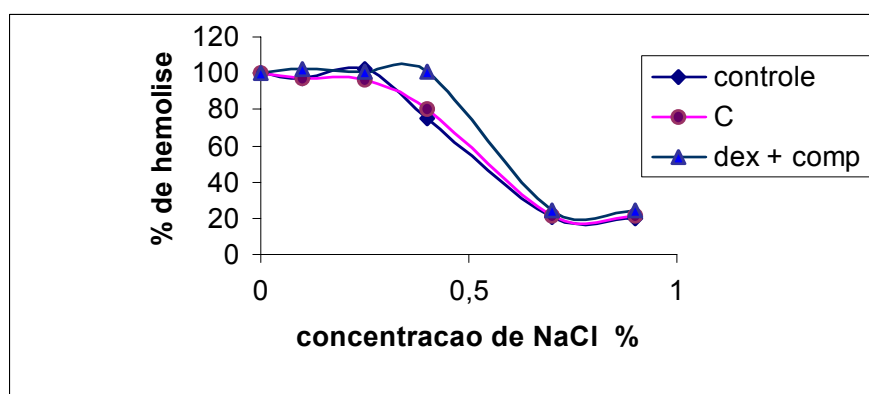


Figura 1b: representa a curva de fragilidade osmótica em ratos após tratamento com dexametasona 400 μ g/ml (C), Dexametasona associado ao complexo de Vitamina B (400 μ g e 13 mg/mL) e controle. Os valores são medias e desvio padrão de três experimentos similares.

Pode-se observar que na Figura 2a, um % de hemólise mais acentuado na presença de complexo de vitamina B, permanecendo em torno de 100% de hemólise para as concentrações de NaCl de 0,1 a 0,4%. De maneira que o complexo B desloca a curva mais para a direita, como é demonstrado na Figura 2b.

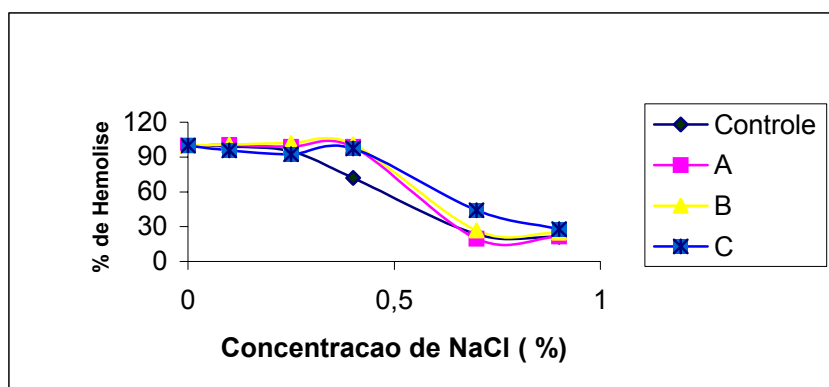


Figura 2a: representa a curva de fragilidade osmótica em ratos após tratamento com o complexo de Vitamina B (A - 3,2; B- 6,4; C - 13mg/mL) e Controle. Os valores são medias e desvio padrão *de três experimentos similares*.

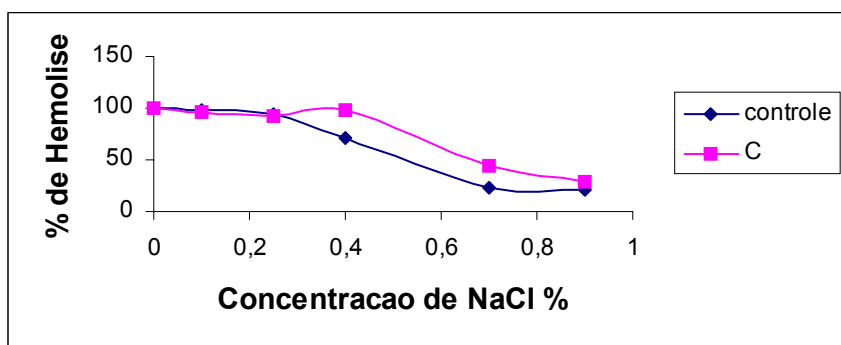


Figura 2b: representa a curva de fragilidade osmótica em ratos após tratamento com o complexo de Vitamina B (C- 13mg/mL) e Controle. Os valores são medias e desvio padrão *de três experimentos similares*.

5.2 Influência da Dexametasona e Piroxican na marcação de hemácias e proteínas plasmáticas com tecnécio.

Vários trabalhos foram realizados utilizando fármacos que afetam a marcação de hemácias ou células e/ou a distribuição (HLADIK et al, 1987; SAMPSON, 1996; OLIVEIRA JR, 2003). Este trabalho foi realizado com medicamentos com atividades antiinflamatórias, como a Dexametasona (de natureza estrogênica) e o Piroxicam (de natureza não estrogênica), como também a vitamina B; no intuito de verificar suas ações sobre a marcação de células sanguíneas (hemácias e proteínas plasmáticas).

A marcação de células sanguíneas pode ser alterada pela interação com substâncias naturais ou fármacos medicamentosos, que ao serem administradas aos constituintes do sangue, poderão atuar como agentes oxidantes ou antioxidantes; competindo, portanto com o cloreto estanoso ou com o tecnécio-99m. Dessa forma podendo alterar a permeabilidade da membrana celular pela ocupação do sítio de ligação do tecnécio-99m ou do cloreto estanoso.

É possível verificar também que a Dexametasona, o Piroxicam e o complexo de vitamina B são substâncias capazes de modificar a marcação de hemácias, conforme figuras apresentadas a seguir. Observa-se ainda, que os antiinflamatórios hormonais e não hormonais promovem redução na captação do tecnécio, levando a oxidação do íon estanoso e impedindo a entrada do pertecnetato na molécula de hemoglobina; desta forma, a eficiência de marcação de hemácias é diminuída (SANTOS et al, 1995).

Pode-se verificar que o Piroxicam altera a capacidade de ligação do tecnécio na concentração de 0,05 mg/mL. Esta redução na marcação das hemácias se deve possivelmente a redução das hemoglobinas, uma vez que o ^{99m}Tc após atravessar as membranas, atua nos sítios de ligação com a hemoglobina, segundo a Figura 3a. No entanto, observa-se na Figura 3b que a fração insolúvel das hemácias reduz a marcação em 25% quando comparado ao controle (91%), na concentração de 0,05mg/mL de Piroxican, permanecendo praticamente inalterado nas demais concentrações.

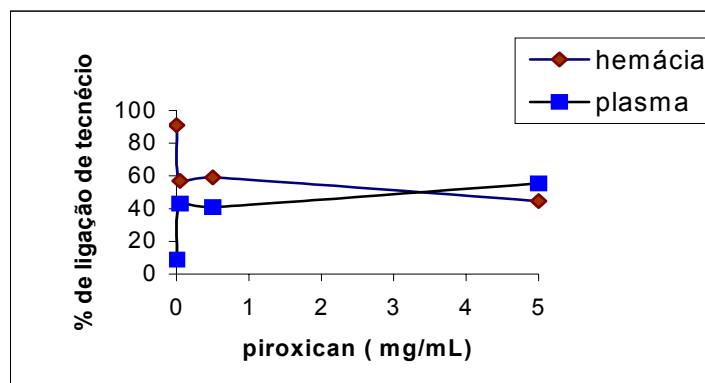


Figura 3a: representa o percentual de ligação do tecnécio em ratos após tratamento com o Piroxican na fração de hemácias e plasma. Os valores são medias e desvio padrão *de três experimentos similares*.

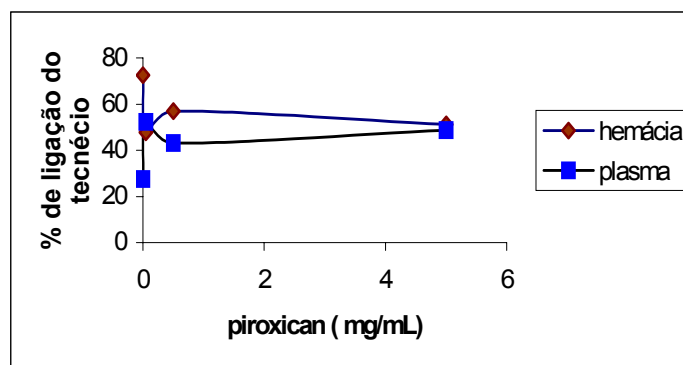


Figura 3b: representa o percentual de ligação do tecnécio em ratos após tratamento com o Piroxican nas frações insolúveis de hemácias e plasma. Os valores são medias e desvio padrão *de três experimentos similares*.

No caso dos
antiinflamatórios

hormonais e não hormonais vários fatores podem influenciar a fragilidade celular e a interação com o tecnécio na presença do íon estanoso. Na busca de encontrar modificações não introduzidas especificamente por substâncias ativas ou fármacos sobre a marcação, mas em função das características do meio onde se processam as reações químicas, permitam identificar os testes em estudos.

O estudo da osmolaridade no mecanismo de ação de diferentes concentrações de antiinflamatórios hormonais, tomando-se como variáveis a hemólise das hemácias nas diferentes concentrações de NaCl, na presença de cloreto estanoso, é importante porque possui características atômicas semelhantes ao cálcio. Assim, a quantificação da fragilidade osmótica representa os mecanismos ativos e passivos de intrusão e extrusão de cálcio.

A possibilidade de fármacos medicamentosos interferirem com a marcação de hemácias tem sido bastante demonstrada. Gutfilen, Marinho e Bernardo Filho (1993), estudando a marcação de hemácias com o ^{99m}Tc *in vitro* e avaliando o efeito de bloqueadores de canais de cálcio mostraram que estas substâncias são capazes de bloquear reversivelmente a fixação do ^{99m}Tc nas hemácias.

Oliveira Jr (2003), demonstrou que o extrato de *Salix alba*, um produto natural, é capaz de reduzir a captação de ^{99m}Tc pelas hemácias e também de radioatividade na fração insolúvel do plasma.

Este modelo é proposto por Gutfilen, Marinho e Bernardo Filho (1993) e Bernardo Filho (1988) que sugerem a presença do íon estanoso é um fator crítico para a marcação. Embora estudos clínicos sejam necessários, deve-se ficar atento a possíveis interferências em exames com hemácias e proteínas marcadas com ^{99m}Tc em pacientes que fazem uso regular da Dexametasona, associada ao fator crítico na marcação e dependente da mesma. A fixação do ^{99m}Tc nas hemácias fica

comprometida levando a marcação de elemento ao meio extracelular (proteínas plasmáticas). Isto porque existe um mecanismo ativo que possibilita a incorporação do íon estanoso, pela hemácia, a semelhança do que ocorre com a captação do ^{99m}Tc (BERNARDO FILHO, 1988). Este estudo possibilita avaliar os fármacos como Dexametasona, Complexo B e Piroxicam que quando incubado com o estanho, como agente redutor, interferem na marcação de hemácias com o ^{99m}Tc .

A distribuição da radioatividade do ^{99m}Tc foi analisada pela marcação das hemácias e plasma, bem como nas frações insolúveis do mesmo sobre influência da Dexametasona, complexo B, dexametasona associada ao complexo B e piroxicam em diferentes concentrações.

A análise dos resultados relata que na Figura 4a observa-se a marcação de hemácias e plasma na presença de dexametasona. Na concentração de $100\mu\text{g}$, ocorre uma redução de 40% em relação ao % controle (O) e diminui ainda na concentração de 100 e $1000\mu\text{g}$ em torno de 50%.

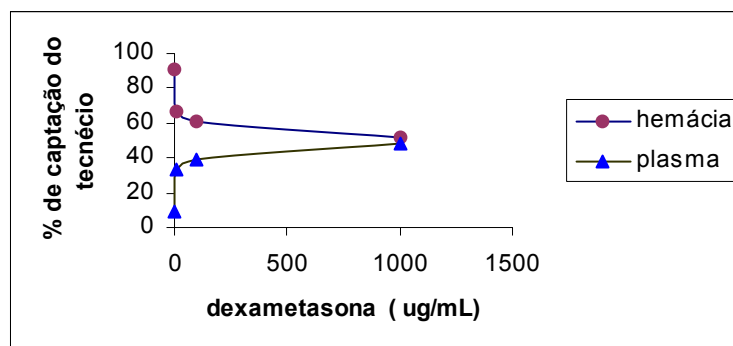


Figura 4a: representa o percentual de ligação do tecnécio em ratos após tratamento com a Dexametasona na fração de hemácias e plasma. Os valores são medias e desvio padrão de três experimentos similares. A marcação no controle, para as hemácias, é de 90% e nas pequenas concentrações e decaindo na concentração de $1000\mu\text{g/mL}$ em torno de 17%, de maneira significativa.

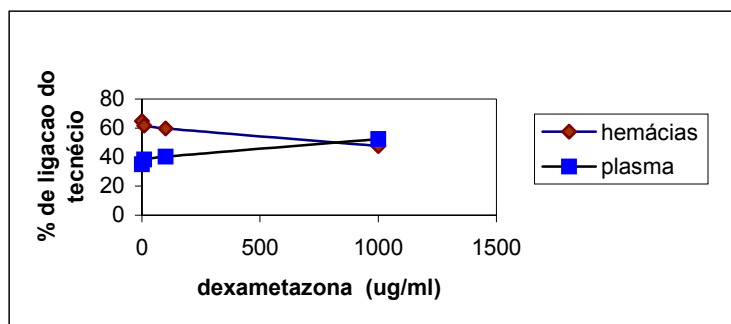


Figura 4b: representa o percentual de ligação do tecnécio em ratos após tratamento com a Dexametazona na fração insolúvel. Os valores são medias e desvio padrão de três experimentos similares.

A capacidade de fixação do ^{99m}Tc nas hemácias do grupo controle (O) é de 91%. Conforme a Figura 3, pode-se verificar que as hemácias tratadas com Dexametazona em diferentes concentrações e aquelas tratadas com o complexo de vitamina B associado a Dexametazona apresentaram uma redução na captação do ^{99m}Tc , em relação ao grupo controle.

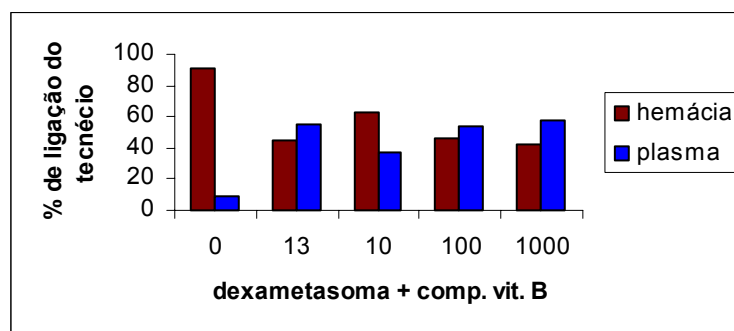


Figura 5: representa o percentual de ligação do tecnécio em ratos após tratamento com a Dexametazona na presença e ausência o complexo B e controle. Os valores são medias e desvio padrão de três experimentos similares

- Em concentrações baixas, a dexametazona e o complexo de vitaminas B promovem a fragilidade osmótica das hemácias.
- As substâncias antiinflamatórias diminuem a eficiência de marcação de hemácias e proteínas plasmáticas *in vitro*.

- Dexametasona e Complexo de vitaminas B, quando associado promovem alterações na marcação de hemácias, como a competição pelo sitio de ligação do ^{99m}Tc .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANN, R.; SCHULIGOI, R. Inhibition of carrageenan-induced edema by indomethacin or sodium salicylate does not prevent the increase of nerve growth factor in the rat hind paw. **Neurosci Lett**, v. 278, n. 3, p. 173-6, 14 jan. 2000.

ASAD, N.R.; LEITÃO, A.C. Effects of metal ion chelators on DNA strand breaks and inactivation produced by hydrogen peroxide in Escherichia coli: detection of iron-independent lesions. **J Bacteriol**, v.173, p.2568-8, 1991.

BAUM, S. **Current practice in nuclear medicine**. Appleton & Lange. 1987.

BERNARDO FILHO, M.; GUTFILEN B.; MACIEL, O. S. Effects of different anticoagulants on the labeling of red blood cells and plasma proteins with Tc-99m **Nucl Med Comm**, v. 15, p. 730-4, 1994.

BERNARDO FILHO, M. **Marcação de estruturas biológicas com tecnécio – 99m** [Tese de Doutorado]. Rio de Janeiro, RJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1988.

BERNARDO FILHO, M. **Parâmetros físicos, químicos e biológicos associados à marcação de radiotraçadores com tecnécio – 99m** [Tese, concurso professor titular]. Rio de Janeiro, RJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1999.

BERNARDO FILHO, M.; MOURA, I.N.S.; BOASQUERIVSQUE, E.M. 99m – technetium – labeled red blood cells "in vitro". **Arq Biol Tecnol**, v.26, p.455-61, 1983.

BERNARDO FILHO, M. et al. Studies on the incorporation of 99m – technetium to the platyhelminth *Dugesia Titina*. **Rev. Pansital**, v.44, p.7-11, 1993.

BERNARDO FILHO, M. et al. Condition for labeling of *Schistosoma mansoni* cercaria with technetium – 99m. **J Nucl Biol Med**, v.36, p. 56-9, 1992.

BJORRKMANN, D.J. The effect of aspirin and non steroidal anti-inflammatory drugs on prostaglandins. **The American Journal of Medicine**, v.105(1b), p.125, 1998.

BRAGA, A.C.S. et al. The effect of drugs on the labeling of blood elements with technetium – 99m. **Curr Pharm Des**, v.6, p.1179-91, 2000.

CALLAHAN, R.J. et al. A modified method for the in vitro labeling of red blood cells with Tc –99mP: Concise Communication. **J Nucl Med**, v.23, p. 315-8, 1982.

COMARCK, D.H. **Histologia**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1991.

DING, H. et al. Piroxicam selectively inhibits the growth of premalignant and malignant human oral cell lines by limiting their progression through the S phase and reducing the levels of cyclins and AP-1. **Int J Cancer**, v.107, p.830-6, 10 dez. 2003.

EARLY, P.J.; SADEE, D.B. **Principles and practice of nucleus medicine**. 2. ed. Toronto: Masby – Yen Book, Inc. 1995. 877p.

FISHER J.; WAL, R.; LEON, A. Technetium – 99m as a label for erythrocytes. **J Nucl Med**, v.8, p.229-32, 1967.

GOODMAN, L.S.; GILMAN'S, A. **The pharmacological basis of therapeutics**. 7.ed. New York: MacMillan, 1985.

GUTFILEN B.; BOASQUEVISQUE, E.M.; BERNARDO FILHO, M. Calcium channel blockers: interference on red blood cells and plasma proteins labeling with ^{99m}Tc. **Rev. Esp. Med. Nuclear**, v.11, p.195-9, 1992.

GUTFILEN, B. et al. 99m TC – labeled leukocytes obtained with suitable technique: the biodistribution study in rabbits. **Acta Med Biol**, v.41, p.193-6, 1993.

GUTFILEN B. et al. Labeling of thymidine with technetium – 99m: suggestion of a chemical model. **Arq Bial Tecnol**, v.39, p.69-74, 1996.

GUZZO, C.A.; LAZARUS, G.S.; WERTH, V.P. **Dermatological pharmacology**. In:

HARBERT, J.C. Atomic and nuclear structure. In: HARBERT, J.C. et al. Single dose pharmacokinetics of piroxicam in cats. **J Vet Pharmacol Ther**, v.26, n.4, p.259-63, ago. 2003.

HARDMAN, J.G. et al. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 9.ed. New York: McGraw-Hill, 1996. p. 1593-616.

HESSLEWOOD, S.; LEUNG, E. Drug interactions with radiopharmaceuticals. **Eur. J. Nucl. Med.**, v. 21, p. 348-56, 1994.

HLADIK III, W.B.; SAHA, G.B.; STUDY, K.T. **Essentials of nuclear medicine science**. Baltimore-Lomdon: Williams and Wilkings, 1987.

INSEL, P.A. **Analgesic-antipyretic and anti-inflammatory agents and grugs employed in the treatment of gout**. In: HARDMAN, J.G. et al. Cerebral mechanisms operating in the presence and absence of inflammatory pain. **Ann. Rheumat. Dis.**, v.55, p.411-20, 1996.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9.ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1999. 193p.

KEREIAKES, J.G. **Biophysical aspects**: medical use of Technetium-99m. New York: American Institute of Physics, 1992, p. 60-109.

KIDO, H. et al. Anti-inflammatory, analgesic and anti-pyretic effects of d-2-[4-(3-methyl-2-thienyl) phenylpropionic acid (M-5011), a new non-steroidal anti-inflammatory drug, in rats and guinea pigs. **Jpn J Pharmacol**, v.76, n.1, p.75-86, jan.1998.

KOENER, K.R.; TAYLOR, S.E. Pharmacologic considerations in the management of oral surgery patients in general dental pratice. **Dent Clin North Amer**, v.38, p. 237-54, 1994.

MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A.G. (ed.). Goodman and Gilman`s the pharmacological basis of therapeutics. 9.ed. New York: McGraw-Hill, 1996, p. 617-58.

NARRA, V.R. et al. Relative biological effectiveness of 99mTc radiopharmaceuticals. **Med Phys**, v.21, p. 1921-6, 1994.

NEUMANN .R.D. (ed.) **Nuclear Medicine**: diagnosis and therapy. New York: Thieme Medical Publishers, Inc., 1996, p.3-20.

OWUNWANNE, A., PATEL, M., SADEK, S. (ed.) **The handbook of radiopharmaceuticals**. London: Chapman & Hall, 1995. 236p.

PARRA, A. et al. Is it possible to achieve bacterial eradication in otitis media with effusion by empirical antibiotic high doses and concomitant administration of acetaminophen? A microbiological and pharmacological study in the gerbil model. **Int J Antimicrob Agents**, v.22, n.5, p.508-15, nov. 2003.

PLOTKAWSKI, M.C. et al. *Pseudomonas aeruginosa* binds to soluble cellular fibronectin. **Curr. Microbiol.**, v.26, p. 91-5, 1999.

QUARESMA, M.R.; NATO UR, J.; FERRAZM.B. Antiinflamatórios não-hormonais (AINHs): para fármacos de efeitos benéficos e colaterais similares, é justificável um custo adicional para o paciente? **Rev Bras Reumatol**, v.3, p.125-8, 1997.

RANG, H.P; DALE, M.M; RITTER, J.M. **Farmacologia**, 3.ed. Rio de janeiro: Guanabara Kogan, 1992. 374p.

RIPOLLHAMER, E. et al. In vitro effect of cyclophosphamide on the binding of (99mTcO₄ and 99mTc-MDP) to blood elements. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.28, p.256-60, 1995.

ROBBINS, S.L.; KUMAR, V.; COTRAN, R.S. **Inflammation and Repair**. In: Pathology Basis of Disease. 5 ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1994. p. 51-92.

SAHA, G. B. **Fundamentals of nuclear pharmacy**. 4.ed. New York: Springer – Verlag, 1998. 331p.

SAMPSON C. B. Complications and difficulties in radiolabeling blood cells: A review
Nucl Med Comum, v.17, p. 648-58, 1996.

SANTOS, J. S. et al. Effect of Cyclophosphamide on the Binding of $^{99m}\text{Tc-O}_4$ and $^{99m}\text{Tc-MDP}$ to blood cells and plasma proteins. **Braz J. Med Biol Res**, v.28, p.131-5, 1995.

SAYYAH M. et al. Analgesic and anti-inflammatory activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* Linn. **Phytother Res**, v.17, n.7, p.733-6, ago. 2003.

SHITH, E.L. **Bioquímica dos mamíferos**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1985.

SILVA, C.R. et al. Evaluation of Technetium-99m decay on *Escherichia coli* inactivation: effects of physical or chemical agents. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v.71, p.7-14, 1998.

SPICER, J. A.; HLADIK-III W. B.; LULBERRY, W. E. The effects of selected antineoplastic agents on the labeling of erythrocytes with technetium-99m using the Ultrateg RBC Kit. **J Nucl Med tecnol**, v.27, p. 132-5, 1999.

SRIVASTAVA, S. C. Is there life technetium: What is the potential for developing new branched-bases radionuclides? **Semin Nucl Med**, v.26, n.2, p.119-31, 1996.

SRIVASTAVA, S. State of the art (and science) blood cell labeling. **Brookhaven Lecture Series**, v.232, p.1-14, 1987.

SRIVASTAVA, S.C.; CHEIVU, L.R. Radionuclide labeled red blood cells: current status and future prospects. **Semin Nucl Med**, v.14, p.68-82, 1984.

SRIVASTAVA, S.C.; STRAUB, R.F. Blood cell labeling with ^{99m}Tc : progress and perspectives. **Semin. Nucl. Med**, v.20, p.41-51, 1990.

STADNYK, A.W.; GAULDIE, J. The acute phase protein response during parasitic infection. **Parasitology Today**, v. 7, p. A7-A12, 1991.

VANE, J.R.; FLOOWER, R.J; BOTTING.R.M. History of aspirin and its mechanism of action. **Stroke**, v.21, p. IV12-IV23, 1990.

VANE, J.R.; BOTTING, R.M. New insights in the mode of action of anti-inflammatory drugs. **Inflam res**, v.44, p.1-10, 1995.

VIDAL, M.V. et al. Effect of the tobacco on the labeling of red blood cells and plasma proteins with ^{99m}Tc . **J. Exp. Clin. Cancer Res.**, v.17, p.1-6, 1998.

WANNMACHER, L.; FERREIRA, M.B.C. Antiinflamatórios não-esteróides. In: FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L. (ed.). **Farmacologia clínica: Fundamentos da terapêutica racional**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p.187-93.

WANNMACHER, L.; FERREIRA, M.B.C. Antiinflamatórios esteróides. In: Fuchs FD, Wannmacher L (eds.). **Farmacologia clínica**. Fundamentos da terapêutica racional. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 194-202.

WEINSTEM, M.B.; SMAAK, W.M. Technical difficulties in the $\text{Tc} = 99\text{m}$ labeling of erythrocytes. **J Nucl Med.**, v.11, p.41-6, 1970.

YOKORO, C.M. et al. Role of endogenous glucocorticoids in hyperalgesia and edema in old arthritic rats. **Braz J Med Biol Res**, v.36, n.1, p. 77-83, jan. 2003. Epub 19 dez. 2002.