

Arry Rocha de Oliveira Júnior

ESTUDO DA INTERAÇÃO DO EXTRATO DE *Salix alba*(SALGUEIRO-BRANCO) NA MARCAÇÃO DE HEMÁCIAS E PROTEÍNAS PLASMÁTICAS COM O TECNÉCIO-99M E NA BIODISTRIBUIÇÃO EM RATOS WISTAR.

Dissertação submetida ao Colegiado do Curso de Mestrado em Ciências Biológicas (área de concentração em Biofísica), do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Como requisito para obtenção do grau de Mestre.

- **RECIFE**
- **2003**

Arry Rocha de Oliveira Júnior

ESTUDO DA INTERAÇÃO DO EXTRATO DE *Salix alba*(SALGUEIRO-BRANCO) NA MARCAÇÃO DE HEMÁCIAS E PROTEÍNAS PLASMÁTICAS COM O TECNÉCIO-99M E NA BIODISTRIBUIÇÃO EM RATOS WISTAR.

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho

•

- **RECIFE**
- **2003**

Esta dissertação foi submetida a Coordenação do Curso de Mestrado em Biofísica, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biofísica, outorgada pela Universidade Federal de Pernambuco, encontrado-se à disposição dos interessados nas Bibliotecas das referidas universidades.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas de ética científica.

Arry Rocha De Oliveira Júnior

Orientadora:

Prof. Dra Maria Teresa Jansem De Almeida Catanho

Examinadores:

Mauricy Alves Motta

Paloma Lys De Medeiros

Maria do Carmo Medeiros

Universidade Federal de Pernambuco

RECIFE-PE

2003

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA E RADIOBIOLOGIA

Reitor(em exercício):

Prof. Geraldo José Marques

Vice-Reitor Substituto:

Prof. Yyonir de Sá Barreto Sampaio

Pró-Reitor para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação:

Prof. Paulo Roberto Freire Cunha

Diretor do Centro de Ciências da Biológicas:

- Profa Ana Maria dos Santos Cabral

Vice-Diretor do Centro de Ciências Biológicas:

Profa Eleonor da Costa Maia

Chefe do Departamento de Biofísica e Radiobiologia:

- Prof. Carlos Manuel Machado Carneiro

Coordenadora do Curso do Mestrado em biofísica:

Profa Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho

Vice-Coordenador:

- Prof.Milton Marcelino Filho

Nível:

- Mestrado

Nome do Aluno:

Arry Rocha de Oliveira Júnior

Departamento do Aluno:

- Departamento de Biofísica e Radiobiologia

Nome do Orientador:

Profa Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho

Departamento do Orientador:

Departamento de Biofísica e Radiobiologia

-

Data da Defesa:29/08/2003

Título da Dissertação:

Estudo da Interação do Extrato de Salix alba (Salgueiro-Branco) na Marcação de Hemácias e Proteínas Plasmáticas com o ^{99m}Tc e na Biodistribuição em Ratos Wistar.

Dedico este trabalho a Deus,a comunidade Rainha da Paz,meus pais Arry(*In memoriam*) e Maria Lima pela dedicação na árdua missão de educar e formar seus filhos ,a minha esposa Rita Célia pela dedicação e amor a família,aos meus filhos Taynah e Arry Thérusus aos meus irmãos Neusa,Kelly e Dimas pelo companheirismo

AGRADECIMENTOS

Ao Magnífico Reitor José Teodoro Soares pela valiosa e estimada contribuição.

À Professora Tereza Jansem Catanho, pela brilhante orientação durante a execução deste trabalho, pois além do apoio profissional e intelectual foi uma mãe dedicada a um filho.

À Professora Grace Mary pela disponibilidade sempre presente e apoio. Ao Estagiário Edgar pela colaboração

Ao Coordenador do curso Dr. Carlos Rolim Martiniano (*in memoriam*).

A todos os professores do Mestrado em Biofísica da UFPE, pela dedicação

Aos colegas de Mestrado pelo companheirismo

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Representando o Salix alba (Salgueiro-branco)-----	02
Tabela 1- Principais geradores de radionuclídeos -----	06
Tabela 2- Radionuclídeos mais utilizados em medicina nuclear -----	06
Figura 2- Representação dos passos para a marcação de hemácias -----	10
Figura 3- Sequência da metodologia da marcação de hemácias e proteínas plasmáticas com o ^{99m}Tc -----	19
Figura 4- Sequência da metodologia da biodistribuição-----	20
Figura 5- Determinação in vitro de diferentes concentrações (mg/ml) do extrato do salgueiro na marcação de hemácias(h) e plasma(p)com o ^{99m}Tc -----	22
Figura 6- Determinação in vitro de diferentes concentrações (mg/ml) do extrato do salgueiro na marcação das frações solúveis tanto de hemácias quanto de plasma com o ^{99m}Tc -----	23
Figura 7- Determinação in vitro de diferentes concentrações (mg/ml) do extrato do Salgueiro na marcação de frações insolúveis tanto de hemácias quanto de plasma com o ^{99m}Tc -----	24
Figura 8- Determinação in vitro de diferentes concentrações (mg/ml) do extrato do salgueiro na marcação de frações solúveis e insolúveis de plasma com o ^{99m}Tc -----	24
Figura 9- Determinação in vitro de diferentes concentrações (mg/ml) do extrato de salgueiro na marcação de frações solúveis e insolúveis das hemácias com o ^{99m}Tc -----	25
Tabela 3- Resultados obtidos na biodistribuição do ^{99m}Tc em % ATI/g -----	26
Tabela 4- Resultados obtidos na biodistribuição do ^{99m}Tc em % ATI -----	26

SUMÁRIO	Página
LISTA DE ILUSTRAÇÕES -----	viii
LISTA DE ABREVIATURAS -----	xi
RESUMO-----	xii
ABSTRACT-----	xiii
1.INTRODUÇÃO -----	01
2.CONSIDERAÇÕES GERAIS -----	02
2.1.O VEGETAL SALIX ALBA (SALGUEIRO-BRANCO)-----	02
2.2.INFLAMAÇÃO E REPARAÇÃO-----	03
2.3 INTERAÇÃO DAS PLANTAS MEDICINAIS COM OS RADIOFÁRMACOS-----	04
2.4.RADIOFÁRMACOS -----	04
2.5.RADIONUCLÍDEOS-----	05
2.6.TECNÉCIO 99M-----	06
2.7.CONSTITUINTE SANGUÍNEOS-----	07
2.8.ESTUDO DA MARCAÇÃO DE HEMÁCIAS COM ^{99m} Tc -----	08
2.9. MARCAÇÃO DAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS COM ^{99m} Tc -----	11
2.9.1. RELAÇÃO DA CASCA DO SALGUEIRO E ASPIRINA -----	12
2.9.2. EXTRATOS NATURAIS X MARCAÇÃO DE ELEMENTOS SANGUÍNEOS COM ^{99m} Tc -----	12
2.9.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE BIODISTRIBUIÇÃO -----	13
3.JUSTIFICATIVA -----	14
4.OBJETIVOS -----	15
4.1.OBJETIVO GERAL -----	15
4.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS-----	15
5.MATERIAIS-----	15
5.1.EQUIPAMENTOS -----	15
5.2.MATERIAIS DIVERSOS -----	16

5.3.REAGENTES-----	16
5.4.ANIMAIS UTILIZADOS-----	16
6.MÉTODOS-----	17
6.1.PREPARO DO EXTRATO-----	17
6.2.PREPARO DAS DOSES-----	17
6.3.PREPARO DOS TUBOS (ESTUDO <i>IN VITRO</i>)-----	17
6.4. PREPARO DO CLORETO ESTANOSO (ESTUDO <i>IN VITRO e IN VIVO</i>)-----	17
6.5.PROCESSO DE MARCAÇÃO DE HEMÁCIAS E PROTEÍNAS PLASMÁTICAS COM O ^{99m} Tc (<i>IN VITRO</i>)-----	17
6.6. BIODISTRIBUIÇÃO-----	19
6.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA-----	21
7.RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	22
7.1.VERIFICAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO EXTRATO DO SALGUEIRO NA MARCAÇÃO DE HEMÁCIAS E PROTEÍNAS COM O ^{99m} Tc(<i>IN VITRO</i>)-----	22
7.2. BIODISTRIBUIÇÃO DO PERTECNETATO-----	25
8.DISSCUSSÃO-----	27
9.CONCLUSÕES-----	29
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	30

LISTA DE ABREVIATURAS

- α** - Alfa
- β** - Beta
- Bq** - Bequerel(unidade de atividade da amostra radioativa)
- FI** - Fração insolúvel
- FIC** - Fração insolúvel da célula(hemácia)
- FIP** - Fração insolúvel do plasma
- FS** - Fração solúvel
- FSC** - Fração solúvel da célula
- FSP** - Fração solúvel do plasma
- LET** - Energia de transferência linear
- MBq** - Megabequerel
- Mn** - Manganês
- Mo** - Molibidênio
- PET** - Tomografia por emissão de pósitron
- Re** - Rênio
- SnCl₂** - Cloreto estanhoso
- SPECT** - Tomografia computadorizada por emissão de fóton único
- ^{99m}Tc** - Tecnécio-99m
- TCA** - Ácido tricloroacético
- TcO₄** - Íon pertecnetato

RESUMO

O uso de produtos naturais como plantas medicinais é muito freqüente em populações indígenas e nas camadas mais populares. O extrato do salgueiro(*Sáliz alba*) é um vegetal utilizado como analgésico, antiinflamatório e antipirético. O objetivo deste trabalho é avaliar a influência ou efeito do extrato do salgueiro em diferentes concentrações na marcação de hemácias e proteínas plasmáticas com o ^{99m}Tc . Hemácias marcadas com o ^{99m}Tc estão sendo usadas para várias avaliações em medicina nuclear.. Inicialmente o **sangue (hemácias e proteínas plasmáticas)** foi incubado com o **extrato do salgueiro** em diferentes concentrações durante **1h** e depois foram adicionados sequencialmente **cloreto estanoso (SnCl_2)** por **1h** e ^{99m}Tc por **10 min.** Posteriormente plasma e hemácias foram **separados** com o uso da **centrifuga**. Alíquotas desta também foram **precipitadas** com **TCA (ácido tricloroacético)** à **5%** e as **frações solúveis e insolúveis separadas**. **As percentagens de radioatividade (%ATI) das amostras e hemácias de plasma** foram **determinadas** ou calculadas e os **resultados** indicaram que o extrato **reduziu a marcação de hemácias e proteínas plasmáticas com o ^{99m}Tc**

O estudo in vivo mostra o efeito do extrato de salgueiro branco(*Salix alba*) e a biodistribuição dos radiofármacos em ratos Wistar fêmeas($n=6$) e foram divididos em dois grupos: tratado($n=3$) e controle($n=3$). A reação com ^{99m}Tc (3,7MBq) em presença do cloreto estanoso e do extrato de salgueiro branco(*Salix alba*) foi incubada por uma hora e depois injetada nos animais. Depois de uma hora os animais foram rapidamente sacrificados para a retirada dos órgãos e contagem em contador gama. A percentagem de radioatividade(%ATI) foi calculada em relação ao peso dos órgãos. A análise dos resultados revelam uma redução significativa no %ATI nos rins, coração, pulmões, fígado, baço, pâncreas, músculos, intestinos, cérebro, útero e tireóide e um aumento de %ATI no estômago. Conclui-se que o extrato de salgueiro branco pode inibir a passagem de cloreto estanoso pela membrana plasmática ou competir com os sítios de ligação e formar espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

The use of natural products as medicinal plants is very frequent in popular medicine. The extract of the White Willow (*Salix alba*) is a vegetable used as analgesic, antiinflammatory and antipyretic. The objective of this work is to evaluate the influence or effect of the extract of the Willow in different concentrations in the labelling of red blood cells (RBC) and plasmatic proteins with ^{99m}Tc , as well as study the effects of the White Willow on the kinetic of biodistribution of ^{99m}Tc . RBC marked with ^{99m}Tc are being used for several evaluations in nuclear medicine. Initially blood (RBC and plasmatic proteins) was incubated with the extract of the Willow in different concentrations during 1 hour and later in a sequence stannous chloride (SnCl_2) was added for 1 hour and ^{99m}Tc for 10 minutes. Later plasma and RBC were separated with the use of a centrifuge. Aliquots of this sample were also precipitated with TCA (trichloroacetic acid) 5% and soluble and insoluble fractions separated. The radioactivity percentages (%ATI) of plasma and RBC samples were determined or calculated, and the results indicated that the extract of the White Willow (*Salix alba*) reduced the demarcation of RBC and plasmatic proteins with ^{99m}Tc .

The study *in vivo* shows us the effect of the extract of white willow (*Salix alba*) and the biodistribution of radiopharmaceuticals in female Wistar mouse ($n=6$) and it was divided in two groups: treated ($n=3$) and control ($n=3$). The reaction with ^{99m}Tc (3,7 MBq) in the presence of stannous chloride and the extract of the white willow (*Salix alba*) was incubated for one hour and after it was injected and the animals (mice). After one hour the animals (mice) were rapidly sacrificed to take off the organs and were counting by the gamma counter. The radioactivity percentage (%ATI) it was calculated in relationship by weight organs. The analysis of the results reveals a significant reduction of the %ATI in kidneys, heart, lungs, liver, spleen, pancreas, muscle, intestines, brain, utero and thyroid and a increase of %ATI in stomach. In conclusion that the extract of white willow can be inhibit passage to stannous chloride by the plasmatic membrane or compete with ligation places and forme the species reactivas by oxigenio.

1. INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da civilização, os homens utilizam as plantas como fonte de alimentação, material para vestiário, defesa, ataque, meios de transporte e meio restaurador da saúde. Sua importância é medida devido à intensidade de seu uso, durante toda a história da humanidade (SIMÕES et al, 2000). As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Apesar de haver um certo número de estudos nesta área, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (SOERJATO, 1996). O gênero *Salix* descrito por Linnaeus compreende mais de 200 espécies, cuja a família é das salicáceas sendo uma planta originária da Europa, Ásia e América Setentrional, tendo o seu habitat em bosques úmidos e nas margens dos rios. Em Portugal é chamada de Sinceiro e nos Estados Unidos de White Willow. Já no Brasil, na região do pantanal ocorre a espécie *Salix humboldtiana*. A espécie *Salix alba* conhecida como salgueiro- branco é usada na medicina popular como: adstringente, analgésico, anti-reumático, antiinflamatório, anti-nevrálgico, antipirético e sedativo. (BRADLEY, 1992)

A marcação das células sangüíneas é facilitada devido a abundante concentração celular, por ser um modelo *in vitro* de fácil separação, além do que a manipulação das mesmas não conduza danos químicos ou físicos. Através da avaliação da estrutura celular das hemácias é possível compreender os mecanismos de transporte e em especial os sítios de ligação da hemoglobina, além de possuir um rico sítio de ligação na hemoglobina (PEARSON;VERTRESS,1961; BERLIN,1966). Dessa forma, as células sangüíneas constituem um modelo de transporte celular e avaliação da função e estrutura da membrana (BISCHOP ; SURGENOR, 1964; WHITTAN,1964).

Vários estudos têm sido realizados para avaliar as interações que ocorrem após a utilização de radiofármacos com extratos vegetais, interferindo na marcação de células sangüíneas e proteínas plasmáticas, através de ^{99m}Tc , podendo com este mecanismo alterar o comportamento farmacocinético e farmacodinâmico, modificando a resposta farmacológica. Os extratos de *Thuya occidentalis* (OLIVEIRA et al, 1997) *Nicotiana tabacum* (VIDAL et al, 1998), *Maytenus ilicifolia* (OLIVEIRA et al, 2000), *Ginkgo biloba* (BERNARDO-FILHO et al, 2001), *Paullinia cupana* (OLIVEIRA et al, 2002) são alguns dos extratos responsáveis pela redução da captação de ^{99m}Tc pelas células sangüíneas.

Extratos como *Peumus boldus* (REINIGER et al, 1999), *Phyllanthus niruri*(SOUZA et al, 2000) e *Cauliflower*(Bernardo-filho et al, 2001) apresentam propriedades que favorecem a marcação de células sangüíneas com ^{99m}Tc .

Os agentes ativos presentes no extrato de Salix alba (salgueiro-branco) são: glicosídeos, taninos, flavonóides e salicílica. Devido ao seu teor de compostos salicílicos, considera-se ser um bom produto antipirético (febre), anti-nevrálgico (dor) e anti-reumático (inflamação) (BRADLEY, 1992).

Atualmente, o seu uso foi suplantado pelas preparações sintéticas como a aspirina, o ácido acetilsalicílico, pois a ação analgésica do Salgueiro-branco é tipicamente mostrada nos produtos que contêm aspirina (MILLLS, 1996).

2. CONSIDERAÇÕES GERAIS

2.1. O VEGETAL SALIX ALBA (SALGUEIRO-BRANCO)

O salgueiro-branco é uma planta que ocorre nas associações de planícies úmidas e de pântanos; encontra-se junto às águas, estagnadas ou correntes, da planície até a montanha. É usado desde a Antigüidade, quer pelas propriedades medicinais da casca, quer pelos ramos flexíveis, que constituem uma matéria-prima barata para o fabrico de móveis e cestos. O salgueiro pelas suas propriedades medicinais é utilizado como: antiinflamatório, analgésico e antitérmico. (BRADLEY, 1992). Árvore ou arbusto com tronco castanho-esverdeado e ramos flexíveis verde-amarelados. As folhas são lanceoladas, alternas, cinzentas e tomentosas. É uma espécie com flores dióicas; as flores masculinas e femininas estão agrupadas em amentos e os frutos são cápsulas.

Na medicina popular ou fitoterapia o Salgueiro-branco (Salix alba) pode ser utilizado como antiinflamatório, preparado na forma de infusão (MAURY, 1997)



Figura 1 – Representação do *Salix alba* (Salgueiro – branco)

2.2. INFLAMAÇÃO E REPARAÇÃO

A inflamação é caracterizada por uma seqüência de eventos que se inicia após uma agressão sofrida pelo organismo, ou seja compreende as alterações em resposta à lesão. Vale salientar que esta lesão poderá ser causada por: bactérias (microorganismos patógenos), traumatismo, agentes químicos, calor ou qualquer outro fenômeno (RANG, 1992). Logo, tem como objetivo restabelecer as condições fisiológicas e estruturais alteradas em função do desequilíbrio provocado pelos elementos agressores. Assim, está sinergicamente relacionada com a necessidade de eliminação ou estabilização do agente agressor e com a reestruturação das regiões lesadas. As substâncias mediadoras envolvidas no processo inflamatório são várias, como: histamina (vasodilatadora), bradicininas, serotoninas, eicosanóides (prostaglandinas e leucotrienos) e outras que são liberadas pelas células lesadas nos líquidos circulantes, fazendo com que haja um aumento de permeabilidade dos capilares vizinhos (facilita diapedese dos leucócitos), logo permite que grandes quantidades de líquidos, proteínas e fibrinogênio extravasem para os tecidos resultando em edema extracelular (JONES; DERBYSHIRE, 1996).

Dessa forma, surgiu a necessidade de controlar o processo inflamatório em alguns casos, resultando no aparecimento das drogas antiinflamatórias como os AINES (antiinflamatórios não esteróidais), os quais objetivam ampliar os efeitos benéficos, principalmente através da inibição da síntese de prostaglandinas, alvo da investigação do mecanismo de ação da aspirina e atenuar as reações prejudiciais conseqüentes ao processo inflamatório (VANE; FLOWER; BOTTING, 1995; BJORKMAN, 1998).

O mecanismo da inflamação atua principalmente no tecido conjuntivo vascularizado, assim como no plasma ou nas células circulantes do plasma e estruturas extravasculares do tecido conjuntivo. Dentre as células circulantes encontram-se neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e plaquetas. As células do tecido conjuntivo que participam da inflamação são os mastócitos, os macrófagos e os fibroblastos. A matriz extracelular é constituída por proteínas fibrosas, glicoproteínas e proteoglicanos.

A inflamação pode ser caracterizada em dois tipos: a inflamação aguda e a inflamação crônica. A inflamação aguda é de curta duração, caracterizada pelo extravasamento de leucócitos do sangue para o tecido extravascular, fenômeno conhecido como diapedese. Além do extravasamento leucocitário, também ocorre a passagem de líquido do sangue para os tecidos sendo esta a principal causa do edema. Na inflamação crônica há uma proliferação de vasos sangüíneos além da presença de macrófagos e linfócitos (STADNYK; GAULDIE, 1991).

2.3. INTERAÇÃO DAS PLANTAS MEDICINAIS COM OS RADIOFÁRMACOS

Estudos sobre o efeito curativo de plantas medicinais ao longo dos anos, tanto pelas observações provenientes da cultura popular quanto de avaliações científicas, evidenciam a necessidade de observação da interação medicamentosa do extrato, quando administrado paralelamente com fármacos, o extrato pode modificar a estrutura do fármaco ou alterar o órgão-alvo e pode ainda funcionar como anti oxidante, propriedade presente nos flavonóides (SALLÉ, 1996).

Fontes radioativas têm sido utilizadas nas diversas áreas de conhecimento (EARLY ;SODDEE, 1995;HLADIK;SAHA;STUDY, 1987; REINIGER et al, 1999) com a finalidade de elucidar patologias na medicina nuclear como também contribuir em pesquisas básicas na área biológica (BERNARDO-FILHO et al, 1992; GUTFILEN et al, 1993; PLOTKAWSKI et al, 1999). Desta forma há uma contribuição significativa para elucidação dos sistemas celulares e suas vias metabólicas, dos mecanismos enzimáticos e a própria resposta dos organismos vivos à ação de agentes agressores de natureza física e química (SAHA, 1998).

2.4. RADIOFÁRMACOS

O radiofármaco é um componente radioativo usado para diagnóstico e terapêutica. Em 95% dos casos o radiofármaco é utilizado na medicina nuclear com o propósito de diagnóstico, e o restante utilizado com fins terapêuticos. Vale salientar que o radiofármaco, usualmente não apresenta efeito terapêutico, devido à concentração administrada, podendo ser utilizada por qualquer via, bastando ser estéril, apirogênico e submetido ao controle de qualidade convencional (SAHA, 1998).

O radiofármaco é constituído de radionuclídeo e fármaco, sendo detectado pelas características dos componentes. Inicialmente a escolha do fármaco para a elaboração de radiofármaco deve se basear na localização do órgão, ou ainda na fisiologia do órgão. Após administrado, o radiofármaco pode ser detectado por um detector de radiação, realizando, portanto, a avaliação da função de um determinado órgão, e detalhando sua estrutura morfológica.(SAHA, 1998)

A escolha do fármaco deve ser não tóxico, e o radionuclídeo, facilmente detectado à exposição mínima ao paciente. Desta forma, o radiofármaco padrão deve possuir as seguintes condições: ser produzido com baixo custo, fácil produção, emitir radiação gama; apresentar uma meia-vida efetiva relativamente pequena, garantir um diminuto tempo de exposição ao paciente e

ao operador, além do que de acordo com a elaboração do radiofármaco poderá atuar na avaliação da função ou estrutura de órgãos (BAUM, 1987; BERNARDO-FILHO, 1988; SAHA, 1998).

2.5. RADIONUCLÍDEOS

Os radionuclídeos foram utilizados, progressivamente na medicina, à medida que se comparava a sua eficácia devido aos possíveis efeitos deletérios provocados nos sistemas biológicos, resultantes de sua meia-vida. A forma de seleção de um radionuclídeo está condicionado a fatores físicos como: meia-vida física, meia-vida efetiva, energia de radiação emitida e tipo de decaimento (KNOLL, 1989).

Os radionuclídeos podem ser obtidos a partir de um subproduto de fissão nuclear (reator), através do uso de aceleradores de partículas (ciclotron), por intermédio do bombardeamento de núcleos com nêutrons, ou ainda por meio de geradores. Os geradores de radionuclídeos apresentam várias vantagens sob a forma primária de sua produção, devido a praticidade, facilitando o seu manuseio, podendo ser transportados para locais mais diversos, instalados em locais mais longínquos, e em clínicas e hospitais. (OWUNWANNE; PATEL; SADEK, 1995; SAHA, 1998).

Os geradores de radionuclídeos são obtidos a partir de um nuclídeo de meia-vida longa sofrendo uma série de decaimentos e originando um nuclídeo de meia-vida curta, que difere quimicamente do nuclídeo que lhe deu origem (SAHA, 1998).

Os primeiros sistemas geradores descrito por Richards surgiram na década 60 do Brookhaven National Laboratory, desde então inúmeros geradores têm sido desenvolvidos, porém poucos passaram a ser empregados nos sistemas biológicos, proporcionando excelentes resultados em radiodiagnósticos, devido a baixa exposição aos pacientes (EARLY; SODDE, 1995; SAHA, 1998).

O gerador ^{99}Mo , obtido num reator por fissão nuclear do ^{235}U , gerador do $^{99\text{m}}\text{Tc}$, foi um dos primeiro geradores produzidos pelo Brookhaven National Laboratory sendo desenvolvido em estruturas de alumina (Al_2O_3) e acondicionado em colunas de vidro ou plástico. O ^{99}Mo é adsorvido na alumina na forma de MoO_4^{2-} , o sistema é lavado com solução salina isotônica, visando retirar quantidades indesejáveis de atividade. A quantidade de alumina empregada no sistema depende da atividade do radionuclídeo (^{99}Mo), a coluna é totalmente protegida por chumbo (HLADIKIII; SAHA; STUDY, 1987; SAHA, 1998). A Tabela 1 apresenta os principais geradores de radionuclídeos e suas características. Já os radionuclídeos mais utilizados na medicina nuclear estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 1 – Principais geradores de Radionuclídeos

Geradores	Meia-vida do Radionuclídeo Filho	Observação
Mo99/Tc99m	6 horas	Tc99m radionuclídeo mais utilizado em medicina nuclear
Sn113/In113m	100 minutos	Radionuclídeo-pai tem meia vida longa(118 dias)
Rb81/Kr81m	0,22 minutos	Radionuclídeo-pai tem meia vida curta(4,7 horas)
Sr82/Rb82	1,33 minutos	Utilização em centro PET
Ge68/Ga68	68 minutos	Radionuclídeo-pai tem meia vida longa(275dias).Utilizando PET

Tabela 2 – Radionuclídeos mais utilizados em medicina nuclear

Radionuclídeo	Meia-vida	Tipo de radiação	Energia(KeV)
Tecnécio-99m	6 horas	γ	140
Cobalto-60	5,2 anos	β, γ	313
Fósforo-32	14,3 dias	$\beta -$	1170
Iodo-123	13 horas	$\beta-, \gamma$	159
Iodo-131	8dias	$\beta-, \gamma$	365

Dos radionuclídeos disponíveis atualmente, destacamos o ^{99m}Tc , gerado a partir do ^{99m}Mo , amplamente utilizado nos procedimentos em medicina nuclear, e nas pesquisas básicas (EARLY; SODEE, 1995; GUTFILEN; BERNANDO-FILHO, 1996; SAHA, 1998).

2.6. TECNÉCIO – ^{99m}Tc

O tecnécio é um metal de transição, pertencente ao grupo VIIB (Mn, Tc, Re) da tabela periódica e possui 7 elétrons na última camada. Quando os elétrons se perdem, o tecnécio passa para o estado oxidado +7, resultando no íon pertecnetato (TcO^{4-}).

O ^{99m}Tc sobressai-se devido às suas características físico-químicas, econômicas e ambientais. É obtido a partir de gerador ^{99m}Mo com meia-vida de 6 horas emitindo radiação gama

de energia de 140 Kev, com rendimento de 90%, condição ideal para medicina nuclear, diminuindo o tempo de exposição dos pacientes quando comparados com outros radionuclídeos. Os rejeitos bioativos são reduzidos, promovendo poucos danos ambientais, e possibilitando a marcação de uma infinidade de moléculas e células, permitindo assim que participem como radiofármaco em diversas formas químicas (HLADIK III; SAHA; STUDY, 1987; EARLY, 1995; SAHA, 1998; BRITO et al, 1998).

O pertecnetato de sódio, quando administrado por via endovenosa para o compartimento vascular, liga-se 70-80% às proteínas plasmáticas, podendo essa ligação ser revertida. A sua eliminação ocorre entre 2 a 3 minutos, refletindo em um equilíbrio entre o compartimento vascular e o fluido intersticial, em pequeno intervalo de tempo. A meia-vida de eliminação do plasma é de 30 minutos, corresponde cerca de 30% da dose administrada, sendo eliminada nas primeiras 24 horas (HLADIK III; SAHA; STUDY, 1987) A dose administrada varia de acordo com o órgão alvo, como também depende da patologia a ser estudada.

O tecnécio na forma quimicamente ativa de pertecnetato de sódio ($^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$) não se liga diretamente a nenhuma estrutura celular ou molecular através de ligação direta. O radiofármaco ^{99m}Tc na forma +7 necessita sofrer pequena redução por um agente redutor (SRIVASTAVA, 1987; BERNARDO-FILHO et al, 1992; SAHA, 1998).

Algumas drogas testadas com as células sangüíneas apresentam eficiência diminuída. Em estudos empregando-se o íon estanoso como agente redutor verificou-se que ocorre um aumento na sua eficiência (GLEUE; SPICER; PRESTON, 1995).

A concentração do íon estanoso pode alterar a eficiência da marcação *in vitro* das células sangüíneas, pois há uma faixa ideal de concentração que varia entre 0,03-0,15 μg íon por milímetro de sangue, sendo constatado no potencial redox do íon estanoso (ZIMMER; SPIES; MAJEWSKI, 1981).

O cloreto estanoso (SnCl_2) atuando como agente redutor nos sistemas biológicos, tem sido referido em algumas investigações por apresentar efeitos nocivos (BERNARDO-FILHO et al, 1996).

2.7 - CONSTITUINTES SANGÜÍNEOS:

O sangue é um fluido que mantém uma comunicação entre as várias estruturas que compõe o organismo vivo desempenhando diversas funções, como transporte de gases e substâncias, nutrição celular, excreção, manutenção do equilíbrio ácido-básico, regulação da temperatura corporal e defesa contra infecções (CARVALHO, 1994). Ele é composto por uma parte líquida

(plasma) e por uma sólida (elementos celulares ou glóbulos sangüíneos). A parte líquida constitui-se de: água, sais minerais e moléculas protéicas (albuminas, globulinas e fibrinogênio) e os elementos celulares são: hemácias (eritrócitos ou glóbulos vermelhos), leucócitos (glóbulos brancos) e plaquetas (BEUTLER, 1994).

Os glóbulos sangüíneos (hemácias e leucócitos) são produzidos pelos tecidos hematopoiéticos e as plaquetas, são fragmentos citoplasmáticos de megacariócitos da medula óssea vermelha. Em termos numéricos por milímetro cúbico de sangue: as hemácias são em número de 5.000.000; leucócitos cerca de 4.000 a 9.000 e as plaquetas em torno de 200.000 a 500.000 por mm³ de sangue (BEUTLER, 1994).

O plasma é basicamente uma solução aquosa, translúcida, amarelada e viscosa, contendo muitas substâncias em suspensão. Os sais inorgânicos (0,9%), as proteínas (7%) e diversos compostos orgânicos não protéicos constituem 10% do volume plasmático.

O líquido extracelular é composto por: plasma e líquido intersticial. Esses compostos orgânicos, são: aminoácidos, vitaminas, hormônios, lipoproteínas e glicose. Logo, desempenha varias funções, tais como; manutenção da pressão osmótica do sangue, defesas orgânicas, coagulação sangüínea e transporte de substâncias como os lipídios (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

2.8. ESTUDO DA MARCAÇÃO DE HEMÁCIAS COM ^{99m}Tc

As hemácias têm a forma de discos bicôncavos flexíveis que transportam oxigênio para os tecidos do corpo. As hemácias se originam das células tronco da medula óssea durante o processo de maturação, e perdem seus núcleos antes de entrarem na circulação. A membrana que reveste a hemácia é formada por 49% de proteínas, 44% de lipídios e 7% de carboidratos apresentando uma espessura de 6nm. A membrana é semipermeável, permitindo a passagem de água e eletrólitos (SMITH, 1985; COMARCK, 1991). Quando postas em solução hipertônica as hemácias perdem água, encolhendo-se. Em solução hipotônica, as hemácias absorvem água (intumescem e tornam-se esféricas), até que ocorra o equilíbrio osmótico ou hemólise. Após a hemólise basicamente todos os componentes da hemácia se difundem para o meio, deixando um "fantasma" insolúvel que representa a membrana original e as proteínas fixadas (SMITH, 1985; CORMACK, 1991). O formato bicôncavo das hemácias faz com que a superfície das mesmas em relação ao volume seja grande o suficiente para facilitar a troca de gases. As hemácias passam facilmente pelas bifurcações dos capilares, mesmo aqueles de menores diâmetros, sem se romperem (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999)

A marcação de células sangüíneas com o ^{99m}Tc , foi inicialmente usada na medicina nuclear (FISCHER *et al*, 1967) para a determinação de diversos sistemas sendo marcado ^{99m}Tc , pertecnetato de sódio, podendo ser utilizado como técnica ‘*in vivo*’ (CALLAHAN *et al*, 1982; BERNARDO-FILHO; MOURA; BOASQUEVISQUE, 1983), inicialmente é administrado por via endovenosa o cloreto estanoso e após 20 minutos é injetado o pertecnetato de sódio; ‘*in vitro*’ (SRIVASTAVA, 1987; EARLY; SODEE, 1995; SAHA, 1998). Neste método, o sangue é retirado do paciente sofre uma pré incubação com estanho, sendo em seguida incubado com o pertecnetato; no método *in vitro e in vivo*, o paciente recebe por via endovenosa cloreto estanoso, após um período de 20 minutos, coleta-se o sangue que então incubado com o pertecnetato, por 10 minutos, reinjeta por via endovenosa ao paciente (BAUM, 1987; OWUNWANNE; PATEL; SADEK, 1995).

O tecnécio, na forma de pertecnetato de sódio, se move livremente dentre as células sangüíneas, mas não se liga a nenhuma estrutura química. Este método de marcação requer a utilização de um agente redutor, sendo largamente empregado o íon estanoso sob a forma de cloreto (SRIVASTAVA, 1987).

A marcação de células sangüíneas envolve um pré-tratamento do tecnécio (pertecnetato de sódio), com íon estanoso, o qual é reduzido e se liga à célula intracelularmente, na cadeia beta da hemoglobina. A redução do pertecnetato de sódio, pelo íon estanoso, quando ocorre de forma antecipada fora da célula, prejudica o rendimento resultando em baixa ligação (SRIVASTAVA, 1987).

Porter *et al* (1983), observou que ocorreu uma alteração na marcação na presença de anticoagulantes, sendo evidenciado um melhor aproveitamento com citrato de sódio e dextrose. DEWANJEE (1974) verificou que na marcação “*in vitro*” a ordem de incubação de Sn^{+2} e o radionuclídeo não interfere na reação.

A marcação de hemácias é favorecida por vários fatores: por constituírem os elementos sangüíneos em maior quantidade; são estruturas que podem ser facilmente manipuladas, tanto química quanto fisicamente sem sofrerem alterações consideráveis; não dependem como outros elementos celulares, de complementos nutricionais ‘*in vitro*’; além de serem mais numerosas; se sobrepõem às outras células na marcação com radionuclídeos, em virtude de intermediarem mecanismos de transporte celulares e pela hemoglobina ser o constituinte principal, com sítio ativo de ligações metálicas (BRAGA *et al*, 2000).

A ligação das hemácias com ^{99m}Tc depende da ação do agente redutor (BERNARDO-FILHO; MOURA; BOASQUEVISQUE, 1983; PORTER, 1983; SRIVASTAVA, 1987; STRAUB, 1992). A presença de anticoagulantes permite melhor marcação, no entanto, dependendo da concentração do cloreto estanoso, no modelo sugerido por (BERNARDO-FILHO *et al*, 1996), para

marcação das hemácias com ^{99m}Tc , compromete a marcação de elementos do meio extracelular para as proteínas plasmáticas. Para que ocorra a incorporação do íon estano às hemácias, é necessário que haja um mecanismo ativo, de forma tal como ocorre com ^{99m}Tc (BERNARDO-FILHO, 1988). Neste processo, também está envolvido um sistema de difusão sem gasto de energia. O transporte através da membrana que envolve ^{99m}Tc e Sn^{2+} ocorre com alta ativação energética, sendo inibido sob baixas temperaturas. (CALLAHAN; RABITO, 1990; BERNARDO-FILHO et al, 1996). A constatação da marcação em altas temperaturas permitiu a criação do modelo para realização de cintilografia esplênica seletiva e produção de jogos reativos de baixo custo (BERNARDO-FILHO; GUTIFILEN; MACIEL, 1994).

A marcação de células sanguíneas têm contribuído para o estudo da cinética destas células, dos mecanismos de transporte celular e de função da membrana plasmática (HLADIK III; SAHA; STUDY, 1987; GUTIFILEN; BERNARDO-FILHO, 1996).

O íon pertecnetato no compartimento interno da hemácia, é reduzido pelo cloreto estano, ao se ligar a hemoglobina, necessitando para realizar este transporte através da membrana de utilizar o sistema de troca de ânions que é executado pela banda-3 proteína integral, abundante na membrana das hemácias, e é constituída por dupla cadeia polipeptídica, com domínio extracelular, intracelular e transmembrana. Responsável pela difusão de íon cloreto, que é realizado durante o sistema de troca entre O_2 e CO_2 , respondendo também pela fixação da proteína ao citoesqueleto à membrana. O transporte do íon estano, essencial para marcação do ^{99m}Tc dentro da molécula de hemoglobina, utiliza os canais de cálcio ou semelhantes a estes (CALLAHAN; RABITO, 1990; SAMPSON, 1996).

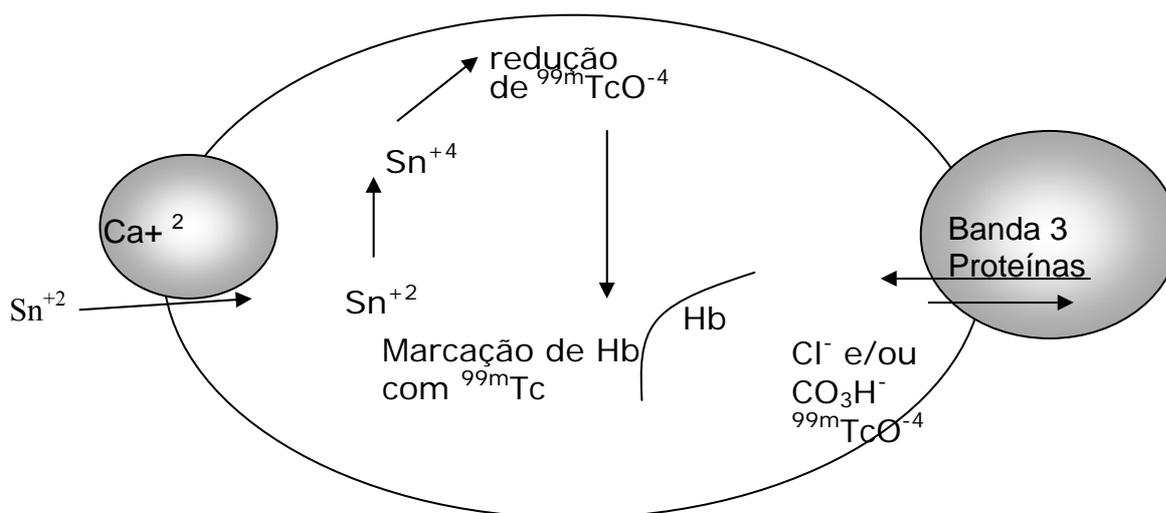


Figura 2 – Representação dos passos para a marcação de hemácias

REHANI; SHARMA (1980) observaram que na marcação de células sangüíneas, o processo se desenvolve no compartimento interno das hemácias, especificamente na hemoglobina na fração beta por ser 28 vezes mais ativa do que a fração alfa..

GUTFILEN; BOASQUEVISQUE; BERNARDO-FILHO, 1992 observaram que drogas bloqueadoras dos canais de cálcio, como a nifenidipina, para analisar a marcação de células com pertecnetato, exercem influência na passagem do cloreto estanoso para o interior da célula, promovendo efeito inibitório, demonstrando que o íon estanoso percorre o mesmo caminho para penetrar na hemácia, através de canais de cálcio (GUTFILEN; BOASQUEVISQUE; BERNARDO-FILHO, 1992; SAMPSON, 1996).

2.9. MARCAÇÃO DAS PROTEÍNAS PLÁSMATICAS COM ^{99m}Tc

Ao se administrar um radiofármaco parte deste se liga às proteínas plasmáticas, compostas por principalmente, fibrinogênio, globulinas e albumina, o que representa 50 - 60% das proteínas. A ligação que ocorre entre o radiofármaco e as proteínas plasmáticas poderá influenciar na distribuição no organismo, na taxa de difusão para o compartimento vascular e, conseqüentemente, na taxa de eliminação da substância. Desta maneira, diferentes percentuais de ligação entre as proteínas podem ser relatados, estabelecendo diferentes perfis farmacocinéticos (RIPOLL; HAMER, 1995). Os primeiros experimentos realizando marcação de proteínas com ^{99m}Tc utilizaram soroalbumina. Foram usados para avaliação da volemia sangüínea, avaliação cardiológica, além de perda protéica pelo trato digestivo (EARLY; SODEE, 1995; BERNARDO-FILHO et al, 1996; VIDAL et al, 1998) e avaliação pulmonar e localização placentária (GUTFILEN; BERNARDO-FILHO, 1996).

Apesar de haver sido constatada, a marcação das células sangüíneas e proteínas plasmáticas com ^{99m}Tc, depende da presença de um agente redutor, tendo em vista que as ligações com o radionuclídeo devem ter características para cada espécie molecular, conforme demonstrado através da utilização do agente precipitante. Fato que pode explicar a variação dos sítios de ligação das proteínas plasmáticas que diferem daquelas encontradas nas moléculas de hemoglobina (BRAGA et al, 2000).

Para que se possa quantificar as células sangüíneas e as proteínas plasmáticas, deve se estabelecer o mesmo tratamento com o agente precipitante, escolhendo uma concentração padrão para observação das frações, em virtude do agente precipitante ser responsável pela separação das frações sendo o melhor ácido tricloroacético (BERNARDO FILHO; FREITAS, 2000). A eficiência de marcação das hemácias com ^{99m}Tc pode ser alterada devido a utilização de diferentes

anticoagulantes (BERNARDO-FILHO; FREITAS; GUTIFILEN; MACIEL, 1994; SAMPSON, 1996).

A ligação de radiofármacos as células sangüíneas, pode ser alterada pela presença de drogas naturais ou sintéticas (EARLY; SODEE, 1995; HESSEWOOD; LEUNG, 1994; SANTOS et al, 1995), levando a uma alteração do radiofármaco sobre o órgão alvo.

Estudos realizados *in vitro* com extrato de *Thuya occidentalis* observaram que a marcação de hemácias com ^{99m}Tc , foi capaz de reduzir a captação do elemento radioativo (OLIVEIRA et al, 1997). O extrato de fumo é capaz de reduzir a marcação de hemácias com ^{99m}Tc e da fração insolúvel do plasma (VIDAL et al, 1998).

2.9.1. RELAÇÃO DA CASCA DO SALGUEIRO E ASPIRINA

Desde os primórdios da humanidade, antes de Hipócrates em 400 A.c., sabia-se que a febre podia ser baixada mastigando-se a casca do salgueiro. O agente ativo da casca do salgueiro foi identificado em 1827 como sendo o composto aromático salicilina o qual podia ser convertido por reação com água (hidrólise) em álcool salicílico e que era oxidado para formar o ácido salicílico. O ácido era mais efetivo do que a salicilina na redução de febres, dores e inflamações. Logo depois descobriu-se que ele é muito corrosivo para as paredes do estômago e não pode ser usado diariamente. A conversão do grupo fenol (OH) em um éster acetato, no entanto, dá o ácido acetil-salicílico, que é tão potente quanto o ácido salicílico, porém menos corrosivo para o estômago.

2.9.2. EXTRATOS NATURAIS X MARCAÇÃO DE ELEMENTOS SANGÜÍNEOS COM ^{99m}Tc

Estudos realizados *in vitro* e *in vivo* com extratos naturais de plantas provocam alteração na marcação de hemácias e proteínas plasmáticas com o ^{99m}Tc . Os extratos naturais os quais diminuem a captação ^{99m}Tc nas células sangüíneas são: *Ginkgo biloba* (BERNARDO-FILHO et al, 2001), *Maytenus ilicifolia* (OLIVEIRA et al, 2000), *Thuya Occidentalis* (OLIVEIRA et al, 1997), Chayotte (BERNARDO-FILHO et al, 2001) e *Tobacco* (VIDAL, 1998). Eles são capazes de interferir na marcação, embora o mecanismo exato do efeito desses extratos ainda não foi esclarecido, mas sugere-se que seja por: inibição direta, pela quelação do cloreto estano e pertecnetato, por danos na membrana plasmática ou por competição desses íons pelos sítios (BERNARDO-FILHO et al, 2001).

Há também extratos de plantas em que se verifica a não interferência ou não diminuição da marcação, tais como: *Peumus boldus* (REINIGER, 1999), o mesmo por conter flavonóides age como anti-oxidante favorecendo assim a não interferência na marcação de hemácias e proteínas plasmáticas com o ^{99m}Tc e o *Cauliflower* (BERNARDO-FILHO et al, 2001), pois o mesmo possui propriedades redox tendo assim um efeito protetor contra o agente redutor (SnCl_2), ou seja, o efeito tóxico do SnCl_2 é eliminado pela presença do extrato de *Cauliflower* (BERNARDO-FILHO, 2001).

2.9.3. CONSIDERAÇÕES SOBRE BIODISTRIBUIÇÃO

Quando um radiofármaco é administrado a um paciente, ocorre o que denomina-se de biodistribuição que consiste das seguintes etapas : absorção, distribuição, metabolismo e excreção da substância. a biodistribuição.

A ligação dos radiofármacos aos elementos sangüíneos pode ser alterada pela presença de drogas. Desta forma , a biodistribuição normal de um fármaco pode ser modificada devido ao processo de interação medicamentosa, que caso desconhecido, poderá acarretar uma interpretação inadequada da imagem cintilográfica, com graves conseqüências para o paciente (SAHA, 1998).

Aspectos teóricos e práticos de interação de drogas terapêuticas com radiofármacos têm sido estudados e têm gerado resultados conflitantes na literatura. Isto deve-se ao fato de que uma droga terapêutica pode modificar a natureza do fármaco, o meio bioquímico no qual o radiofármaco está exposto, as estruturas que normalmente não seriam alvo para radiofármacos, a capacidade do radiofármaco de se ligar aos elementos sangüíneos e mesmo os alvos preferenciais de ligação dos radiofármacos (HLADIK III; SAHA; STUDY, 1987; SRIVASTAVA, 1987; SAMPSON, 1996). Assim, a biodistribuição de um radiofármaco pode ser alterada em um organismo submetido a um tratamento com uma droga .Por isso, mais atenção aos diagnósticos com compostos farmacológicos marcados com isótopos radioativos, de modo que os resultados obtidos não sejam inadequados, o que acarretaria uma má interpretação dos exames, devido a um comportamento não esperado, apresentado pelo radiofármaco (CARLSSON, 1995).

Da mesma forma, a biodistribuição do ^{99m}Tc -DPTA, é modificada devido à ação da vincristina (BRITO et al, 1998), como também promove alteração na biodistribuição do ^{99m}Tc -PHY (MATTOS, 1994).

3.JUSTIFICATIVA

Estudos mostram que algumas substâncias de origem natural ou sintética podem interferir na marcação de hemácias e proteínas plasmáticas com o ^{99m}Tc . O estudo da interação medicamentosa em medicina nuclear é relevante, pois contribui na minimização de falsos resultados ou exames de má-qualidade, bem como repetições desnecessárias dos exames e conseqüentemente da exposição do paciente a radiação.

4.OBJETIVOS

4.1.OBJETIVO GERAL

Estudar a marcação de hemácias e proteínas plasmáticas com o ^{99m}Tc e a biodistribuição na presença do extrato de Salix alba (Salgueiro-branco).

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

*Analisar o efeito de diferentes concentrações de Salix alba (salgueiro-branco) na marcação de hemácias e proteínas plasmáticas com ^{99m}Tc *in vitro*;

*Estabelecer um modelo experimental sobre a interação de Salix alba (salgueiro-branco) e a biodistribuição *in vivo*

5. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos em questão foram realizados no laboratório de Biofísica Celular e Molecular do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

5.1. EQUIPAMENTOS

*Agitador magnético, Fisatom, Brasil.

*Balança de precisão, Hr-200, Mettler, Suíça.

*Balança simples-Triple Beam Balance.

*Contador de cintilação gama DPC Gamby CR

*Centrífuga varifuge K, Heraeus Christ, Alemanha.

5.2. MATERIAIS DIVERSOS:

*Tubos de ensaio

*Seringas hipodérmicas (descartáveis)

*Pipetas automáticas graduadas e simples

*Papel alumínio

5.3. REAGENTES

*Ácido Tricloroacético (TCA 5%), Vetec, Brasil.

*Cloreto estano bi-hidratado, Reagen s/a., Brasil.

*EDTA dissódico, Reagen S/A., Brasil.

* ^{99m}Tc ($^{99m}\text{Tc O}_4\text{Na}$) eluído 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)

5.4 ANIMAIS UTILIZADOS

Para os experimentos foram utilizados 18 ratos da linhagem Wistar, machos 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 com ração comercial (Labina-purina do Brasil S/A), água “ad libidum”, temperatura ambiente variando entre (28 ± 2) °C e iluminação artificial (ciclo claro/escuro de 12-12 horas) e mantidos em gaiolas individuais.

6. MÉTODOS

6.1. PREPARO DO EXTRATO

O extrato macerado de Salix alba (salgueiro-branco) foi adquirido através do laboratório paulista Ambrosifarma. O extrato liofilizado foi solubilizado utilizando-se como veículo solução salina a 0,9%.

6.2. PREPARO DAS DOSES

O extrato liofilizado foi diluído em salina 0,9%, as doses foram calculadas por peso corpóreo e foi injetado 125mg/mL por via intraperitoneal (IP).

6.3. PREPARO DOS TUBOS (ESTUDO *IN VITRO*)

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.

6.4. PREPARO DO CLORETO ESTANOSO (ESTUDO *IN VITRO* e *IN VIVO*)

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 (BERNARDO-FILHO, 1988).

6.5 PROCESSO DE MARCAÇÃO DE HEMÁCIAS E PROTEÍNAS PLASMÁTICAS COM O Tc-99m (*IN VITRO*)

Amostras de 0,5 mL de sangue ratos Wistar (n=3) com anticoagulante EDTA foram incubadas à temperatura ambiente com o extrato de Salgueiro branco em diferentes concentrações em mg/mL (1,875; 3,75; 7,5; 15; 30mg/mL) por 60 minutos à temperatura ambiente, o grupo controle recebeu o mesmo tratamento. A seguir foi acrescentado o SnCl₂ 1,2µg/mL (500µL) e

incubado por 60 minutos. O ^{99m}Tc foi adicionado no volume de 0.1mL (3.7 MBq) na forma de ($^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$) 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), mantendo as mesmas condições por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas (1000g, por 10 minutos), separadas as alíquotas de plasma (P) e células sangüíneas (C), e calculada a radioatividade em CPM. Para avaliar o efeito dos extratos na ligação do ^{99m}Tc às proteínas plasmáticas e células sangüíneas, alíquotas de P e C (20 μL) foram precipitadas com 1mL do ácido tricloroacético (5%), como também a mesma quantidade P e C (20 μL) para 1mL de solução salina. Sendo, então, centrifugadas e isoladas as frações solúvel (FS) e fração insolúvel (FI), obtidas a partir do plasma e das células sangüíneas. Procedeu-se à contagem em contador gama (DPC Gambyr Cr) e os resultados obtidos, a partir das frações, foram calculados segundo (BERNARDO-FILHO et al, 1990; SANTOS et al, 1995)

% ATI NO PLASMA:

FP

FP + FC

NAS HEMÁCIAS:

FC

FP + FC

FRAÇÃO SOLÚVEL (PLASMA/HEMÁCIAS):

FS

FS + FI

FRAÇÃO INSOLÚVEL (PLASMA/HEMÁCIAS):

FI

FS + FI

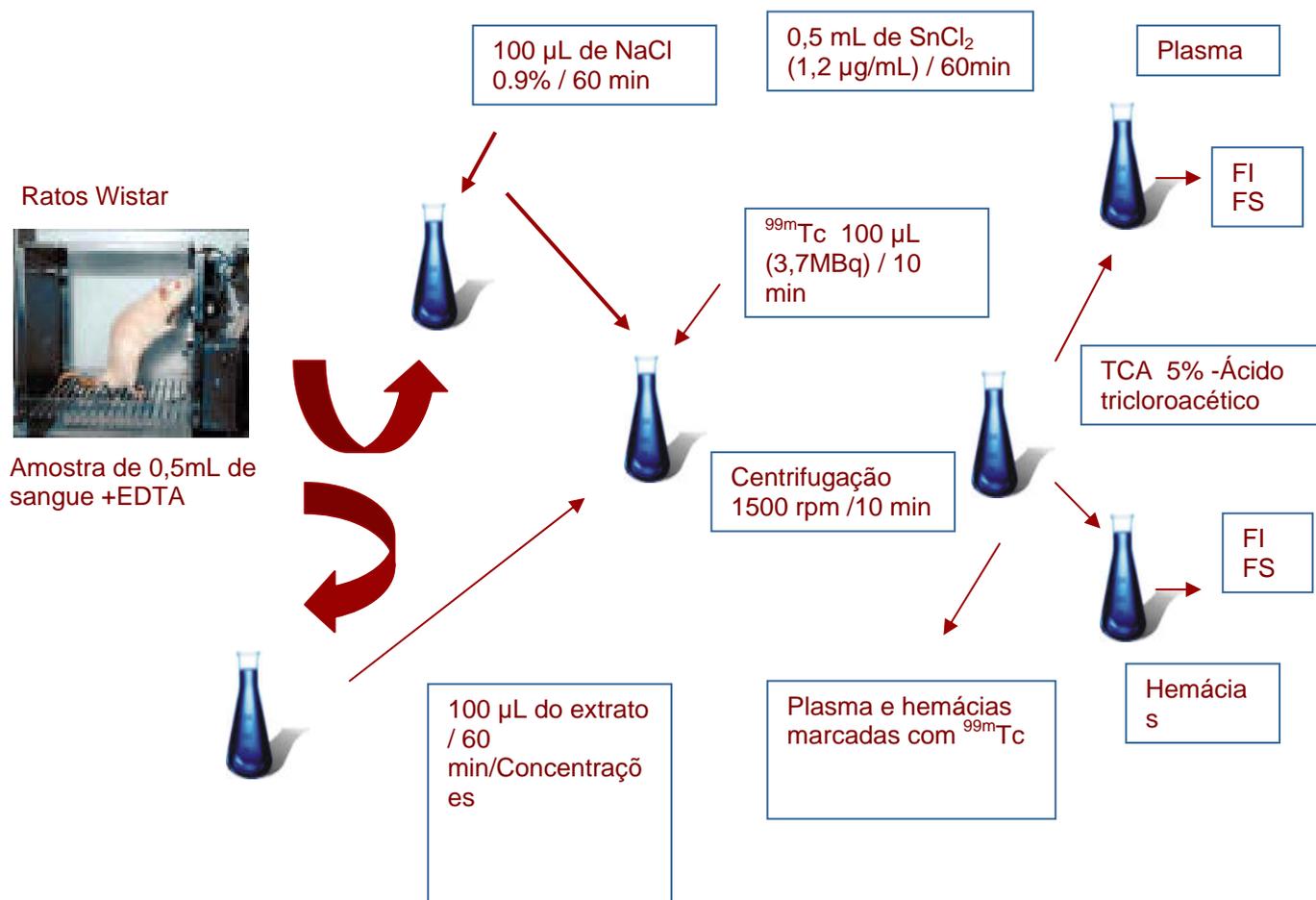


Figura 3 – Seqüência da metodologia da marcação de hemácias e proteínas plasmáticas com o ^{99m}Tc.

6.6. BIODISTRIBUIÇÃO

O extrato de Salix alba (salgueiro-branco) foi administrado em ratos Wistar (180-200g), divididos em 2 grupos com (n=3) cada, um grupo controle e grupo tratado. O grupo controle com 9 animais recebeu solução salina 0,9% e o grupo tratado com 9 animais com o extrato de Salix alba (salgueiro-branco) 125 mg/mL por via intraperitoneal 1 hora antes do estudo de biodistribuição sem tratamento prévio.

Solução preparada com Tc-99m (3,7MBq), na forma de pertecnetato de sódio (^{99m}TcO₄Na) e cloreto estano 1,2µg/mL, incubados por 10 minutos, à temperatura ambiente. Desta solução foi injetado no animal 0,3mL. Após 1 hora, os animais foram sacrificados e retirados os seguintes órgãos: coração, pulmões, pâncreas, baço, fígado, estômago, intestino, músculo, cérebro, tireóide, fêmur.

Os órgãos tiveram suas massas determinadas e contadas por um contador de cintilação gama DPC. Uma das amostras da solução de pertecnetato de sódio que foram administradas ao animal também foi contada. A percentagem de captação em cada órgão (%ATI) foi calculada dividindo-se a contagem em cada órgão pela contagem da amostra de pertecnetato de sódio. A percentagem de radioatividade por grama (%ATI/g) foi calculada dividindo-se a %ATI pela massa do órgão.



Figura 4 – Seqüência da metodologia de biodistribuição

6.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os experimentos para verificação do efeito do extrato de *Salix alba* (salgueiro-branco) na marcação de hemácias e proteínas plasmáticas com o ^{99m}Tc foram realizados com 3 repetições (em triplicatas) o número de 3 determinações ($n = 3$). Assim os mesmos foram calculados e expressos pela média aritmética dos valores e pelo desvio – padrão ($\pm DP$). Os resultados dos experimentos realizados com administração dos extratos *in vitro*, foram comparados com o teste ANOVA (análise de variância) e posteriormente o teste de Newman Keuls. Sendo a variância foi de ($p < 0,05$). Os resultados dos experimentos *in vivo* foram comparados empregando-se o teste t de Student considerando-se $p < 0,05$.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. VERIFICAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO EXTRATO DE SALIX ALBA (SALGUEIRO-BRANCO) NA MARCAÇÃO DE HEMÁCIAS E PROTEÍNAS PLASMÁTICAS COM O ^{99m}Tc *in vitro*

A distribuição da radioatividade do ^{99m}Tc foi analisada pela marcação de hemácias e plasma de ratos wistar bem como das frações solúveis e insolúveis desses elementos sob influência do extrato aquoso de Salix alba (salgueiro-branco) nas diferentes concentrações à partir de (1,875; 3,75; 7,5; 15; 30 mg/mL) com seus respectivos controle.

Os resultados revelam que a marcação da fração celular (hemácias) e da fração plasmática (plasma), indicam um percentual de ligação do ^{99m}Tc no início do processo de captação de 91% e 8,98% respectivamente. (Figura 2). Observa-se que com o aumento da concentração do extrato de Salix alba (salgueiro-branco) até 3,75 mg/mL ocorre uma redução da ligação de ^{99m}Tc da fração celular (hemácias) (44,03%) posteriormente aumentando até a concentração de 7,5 mg/ml (56,15%) e que torna-se estável na concentração de 30 mg/ml. Por outro lado um aumento da ligação de ^{99m}Tc da fração plasmática (plasma) é observado até a concentração de 3,75 mg/mL do extrato de Salix alba (salgueiro-branco) (55,96%). Nota-se na concentração de 7,5 mg/ml (47,03%) uma diminuição da captação de ^{99m}Tc e posteriormente uma estabilização com a concentração de 30 mg/mL extrato de Salix alba (salgueiro-branco).

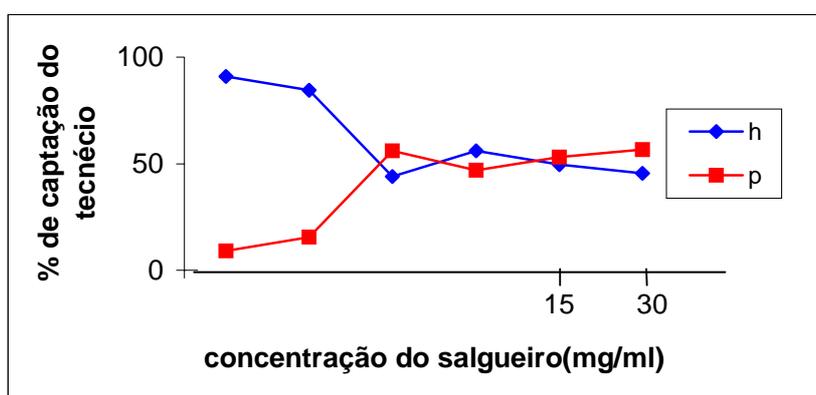


Figura 5 - Determinação *in vitro* de diferentes concentrações (mg/ml) do extrato do salgueiro na marcação de hemácias (h) e plasma (p) com o ^{99m}Tc , ($p < 0,05$) $n = 3$.

Os resultados mostram que a marcação das frações solúveis tanto celular quanto plasmática, indicam que o percentual de captação do ^{99m}Tc no grupo controle (zero) da fração

celular (hemácias) e fração plasmática (plasma) é de 76,73 % e 23,25% respectivamente. (Figura 3).

Pode-se observar que há uma tendência de redução no percentual de captação do ^{99m}Tc em relação a fração celular (hemácias) e no caso da fração plasmática (plasma) um aumento desse percentual de captação, a medida que a concentração do extrato de *Salix alba* (salgueiro-branco) aumenta.

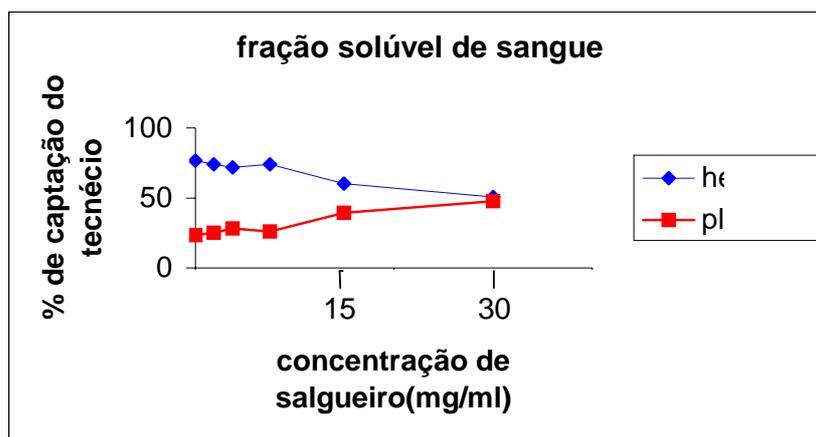


Figura 6- Determinação *in vitro* de diferentes concentrações (mg/mL) do extrato do salgueiro na marcação das frações solúveis (FS) tanto de hemácias (h) quanto de plasma (p) com o ^{99m}Tc , ($p < 0,05$) $n = 3$.

A Figura 4 mostra que a marcação das frações insolúveis tanto celular quanto plasmática indicam um percentual de captação inicial de 64,89% e 35,1% respectivamente.

Pode-se constatar que o percentual de captação do ^{99m}Tc com relação a fração celular (hemácias) diminui até a concentração de 15 mg/mL e depois ocorre um discreto aumento estabilizando-se. Em relação a fração plasmática (plasma) ocorre o contrário ou seja, até a concentração de 15 mg/mL o percentual de captação do ^{99m}Tc aumenta e depois tende a uma ligeira diminuição e estabilização. Vale salientar que na concentração de 15 mg/ml o percentual de captação do ^{99m}Tc é igual em ambas as frações.

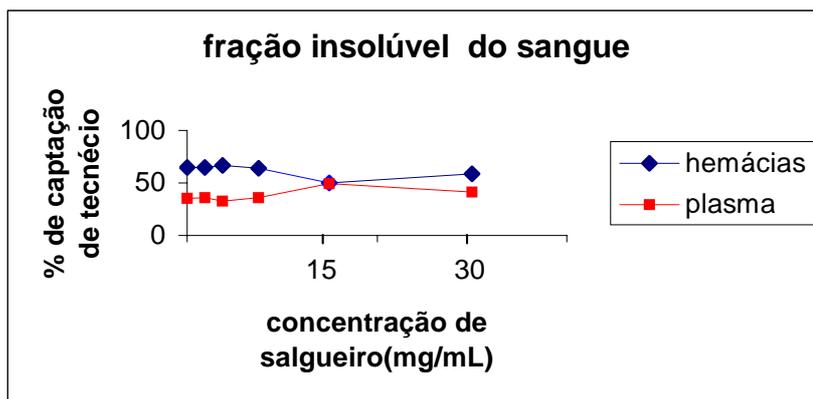


Figura 7 - Determinação *In Vitro* de Diferentes concentrações (mg/ml) do extrato do salgueiro na marcação de frações insolúveis (FI) tanto de hemácias (h) quanto de plasma (p) com o ^{99m}Tc , ($p < 0,05$) $n = 3$.

A Figura 5 mostra que a marcação das frações solúveis e insolúveis de plasma em relação ao percentual de captação do ^{99m}Tc no grupo controle (zero) é de 23,25% e 35,1% respectivamente.

A fração insolúvel do plasma aumenta o seu percentual de fixação do ^{99m}Tc até a concentração de 15 mg/ml do salgueiro e depois reduz.. Em relação a fração solúvel do plasma o percentual de ligação do tecnécio-99m aumenta vertiginosamente até a concentração de 30 mg/mL (47,71%) em relação ao controle 35,1%.

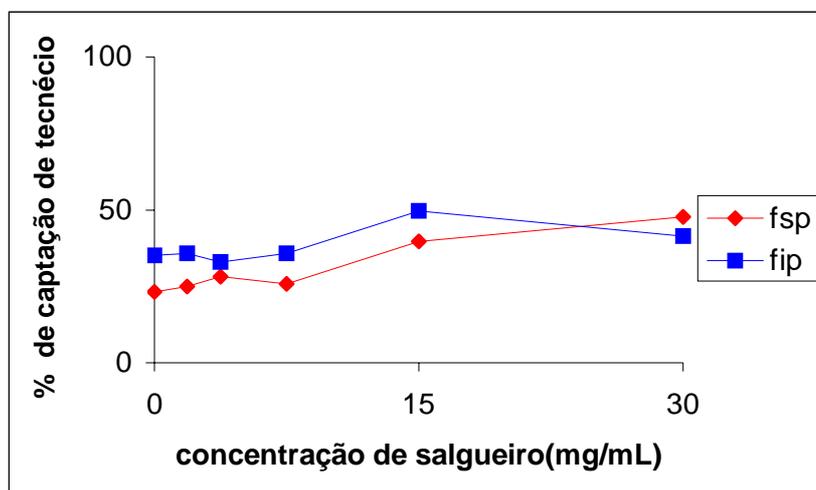


Figura 8 – Determinação *in vitro* de diferentes concentrações (mg/ml) do extrato de salgueiro na marcação de frações solúveis do plasma (FSP) e insolúveis de plasma (FIP) com o ^{99m}Tc , ($p < 0,05$) $n = 3$.

Os resultados indicaram na Figura 6 que a marcação das frações solúveis e insolúveis das hemácias mostrou um percentual de fixação do ^{99m}Tc de 76,73% e 64,89% no grupo controle (zero) da fração solúvel celular (hemácia) e fração insolúvel celular (hemácia), respectivamente.

Pode-se verificar que há uma diminuição do percentual de ligação do tecnécio até a concentração de salgueiro de 15mg/mL tanto da fração solúvel e insolúvel celular (hemácia); com o aumento da concentração de salgueiro há um aumento do percentual de ligação na fração insolúvel celular (hemácias) e uma diminuição na fração solúvel celular (hemácia) até a concentração de 30mg/mL (50,84%) em relação ao grupo controle (76,73%).

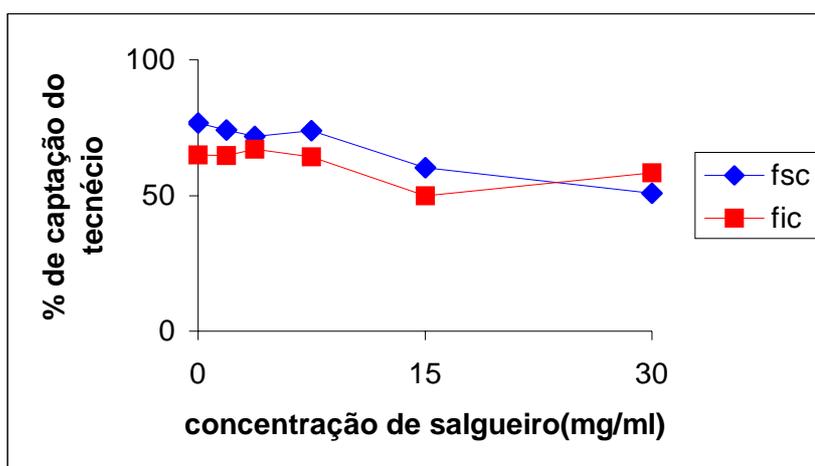


Figura 9 - Determinação *in vitro* de diferentes concentrações em mg/ml de extrato de salgueiro na marcação de frações solúveis (FSC) e insolúveis (FIC) das hemácias com o ^{99m}Tc , ($p < 0,05$) $n = 3$.

7.2. BIODISTRIBUIÇÃO DO PERTECNETATO

O experimento mostra, Tabelas 3 e 4, que o extrato de salgueiro quando administrado em ratos por um período de 60 minutos, com posterior administração do pertecnetato na presença do estanho, provoca uma redução na captação do ^{99m}Tc nos diversos órgãos estudados, com exceção para o estômago.

É sabido que o íon estanoso na presença do ^{99m}Tc é capaz de promover ligações com as células da mucosa gástrica, devido a presença de íons. Já que o extrato de salgueiro contém salicilato, possivelmente altera o teor de ácido clorídrico e assim facilita a captação do tecnécio. A redução de captação observada nos demais órgãos está provavelmente relacionada ao grau de acidez.

Tabela 3 – Resultados obtidos na biodistribuição do ^{99m}Tc em % ATI/g

ORGÃO	Controle		Experimental		TesteT
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
CORAÇÃO	10,39	6,73	2,22	0,75	0,22
TIREÓIDE	32,52	5,38	2,81	0,90	0,10
INTESTINO DELGADO	30,25	6,89	5,16	3,01	0,01
FÍGADO	19,47	5,96	2,45	1,08	0,05
ESTÔMAGO	24	3,42	45,99	3,72	0,06
CÉREBRO	1,28	0,23	0,46	0,03	0,03
FÊMUR	6,38	2,05	2,10	0,82	0,08
MÚSCULO	30,93	10,99	1,74	1,28	0,06
PULMÃO-D	7,53	1,95	3,96	1,72	0,14
PULMÃO-E	32,52	2,05	4,51	0,96	0,02
RIM-D	38,11	15,34	3,87	1,90	0,26
RIM-E	124,91	43,54	3,77	2,36	0,05
ÚTERO	46,93	7,40	2,51	0,06	0,01
PÂNCREAS	40,15	18,96	2,76	1,06	0,10
BAÇO	19,86	9,35	3,32	1,40	0,32
INTESTINO GROSSO	21,31	3,24	2,28	0,66	0,09

Tabela 4 – Resultados obtidos na biodistribuição do ^{99m}Tc em % ATI

ORGÃO	Controle		Experimental		TesteT
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
CORAÇÃO	4,68	3,15	2,13	1,82	0,16
TIREÓIDE	6,40	5,36	0,52	0,33	0,10
INTESTINO DELGADO	2,05	2,53	0,45	0,21	0,18
FÍGADO	0,26	0,09	0,09	0,02	0,02
ESTÔMAGO	0,40	0,86	0,31	0,27	0,45
CÉREBRO	5,63	3,17	0,44	0,38	0,06
FÊMUR	8,34	2,49	0,31	0,25	0,03
MÚSCULO	4,93	2,45	1,15	0,89	0,02
PULMÃO-D	16,73	13,80	0,67	0,62	0,19
PULMÃO-E	4,68	2,11	5,19	4,69	0,30
RIM-D	4,77	2,55	3,41	2,97	0,28
RIM-E	1,42	0,58	0,50	0,58	0,14
ÚTERO	3,89	2,88	0,43	0,47	0,31
PÂNCREAS	15,65	13,15	0,36	0,76	0,18
BAÇO	1,09	1,91	0,47	0,23	0,22
INTESTINO GROSSO	3,44	1,81	1,63	1,15	0,07

8. DISCUSSÃO

No experimento foi utilizado diferentes concentrações do extrato aquoso de *Salix alba* (Salgueiro-branco) com a finalidade de avaliar o efeito desse extrato na ligação ou marcação do ^{99m}Tc nas frações celulares (hemácias), frações plasmáticas (plasma) e frações solúveis e insolúveis tanto de hemácias quanto de plasma.

Os resultados sugerem que para elucidar o exato mecanismo do efeito do extrato do salgueiro ou seja o não favorecimento na captação do ^{99m}Tc aos elementos sanguíneos, é necessário considerar condições, tais como: a ação do extrato dificultando a passagem tanto de pertecnetato quanto de estanho pelos canais banda-3 e canais de cálcio da membrana plasmática, respectivamente; o extrato pode estar competindo com o ^{99m}Tc pelos mesmos sítios de ligação; pode haver ligação de componentes do extrato com o cloreto estanoso e pertecnetato, promovendo assim a quelação de ambos (BRAGA et al, 2000).

O mecanismo de favorecimento da marcação de elementos sanguíneos com o ^{99m}Tc é explicado pela ação antioxidante de compostos bioativos como flavonóides encontrados nos extratos de *Pneumus boldus* e *Phyllanthus niruri*. Esses componentes estariam protegendo o íon estanho contra o processo de oxidação, logo fazendo com que haja um aumento da redução do íon pertecnetato e conseqüentemente um aumento do percentual de ligação das hemácias na cadeia beta da hemoglobina (BRAGA et al, 2000; SOUZA, 2001)

Há evidências bastantes consideráveis de que a biodistribuição dos radiofármacos pode ser alterada por uma variedade de drogas, estados patológicos e procedimentos cirúrgicos (SAMPSON, 1993). Pesquisas realizadas na medicina nuclear relatam que determinadas drogas podem alterar a marcação ou biodistribuição de hemácias e proteínas plasmáticas em testes *in vitro*, dessas drogas com células marcadas (hemácias e proteínas plasmáticas) (HLADIK III; SAHA; STUDY, 1987; SRIVASTAVA, 1987; SAMPSON, 1996). A distribuição, captação e eliminação dos radiofármacos dependem de vários fatores, os quais são: fluxo sanguíneo local (como por exemplo: o fluxo sanguíneo renal que é de 1100ml/min.), metabolismo tecidual e marcação dos elementos sanguíneos (hemácias e proteínas plasmáticas) (RIPOLL; HAMER, 1995). No entanto, a interação das drogas interfere nos radiofármacos e a biodistribuição deles é alterada (SANTOS et al, 1995). Desta forma pode-se perceber que algumas drogas facilitam a localização do radiofármaco no órgão-alvo enquanto que outras dificultam. (SAMPSON, 1996). Desta forma a alteração da biodistribuição do radiofármaco deve-se ao efeito da droga nos tecidos específicos (dos vários

órgãos). O estudo da interação de drogas com radiofármacos leva ao desenvolvimento de um modelo animal para avaliar a ação de vários compostos (BERNARDO et al, 2002).

O principal agente ativo da casca do salgueiro é a salicilina a qual é bastante ácida e corrosiva. O uso do salgueiro em ratos fez com que o mesmo interagisse com o pertecnetato diminuindo o percentual de radioatividade (%ATI) em quase todos os órgãos (pulmões, tireóide...). Provavelmente essa diminuição ocorre devido a ação corrosiva e ácida da salicilina (principal agente ativo do salgueiro) que pode dificultar a passagem tanto de pertecnetato quanto de estanho respectivamente pelos canais banda-3 e canais de cálcio da membrana plasmática; pode competir com ^{99m}Tc pelos mesmos sítios de ligação; pode haver ligação de componentes do extrato com o cloreto estanoso e pertecnetato, promovendo assim quelação de ambos. (BRAGA et al, 2000). E ainda poderá haver hemólise, pois nas maiores concentrações do extrato verificou-se através dos tubos de ensaio tal ocorrência. A única exceção onde houve aumento do percentual de radioatividade (%ATI) foi no estômago, pois se sugere que a salicilina aumente mais ainda o pH ácido do estômago aumentando assim a concentração de HCL, logo em decorrência disto a captação de ^{99m}Tc aumenta pelos canais banda-3.

9. CONCLUSÕES

*O extrato aquoso do de Salix alba (salgueiro-branco) reduz a captação do ^{99m}Tc nas hemácias.

*Altera a captação do ^{99m}Tc no processo de biodistribuição na maioria dos órgãos estudados mostra-se alterada, com exceção do estômago.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BERLIN, N.I. Radioactive pharmaceuticals. **Proc. Symp. Oak. Ridge Inst. Nucl. Studies**, p.447-454, 1966.

BERNARDO-FILHO, M.; MOURA, I.N.S.; BOASQUEVISQUE, E.M. ^{99m}Tc-labeled red blood cells “*in vitro*”. **Arq. Biol. Technol.**, v.26, p.455-461, 1983.

BERNARDO-FILHO, M. **Marcação de estruturas biológicas com ^{99m}Tc**. Tese(Doutorado), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1988.

BERNARDO-FILHO, M.; SILVA, J.R.M.; REIS, R.J.N.; BOASQUEVISQUE, E.M.; HASSÓN-VOLOCH, A. Conditions for labeling of *Schistosoma mansoni* Cercaria with ^{99m}Tc. **J. Nucl. Biol. Med.**, v.36, p.56-59, 1992.

BERNARDO-FILHO, M.; GUTIFILEN, B.; MACIEL, O.S. Effect of different anticoagulants on the labeling of red blood cells and plasma proteins with ^{99m}Tc. **Nucl. Med. Comm.**, v.15, p.730-734, 1994.

BERNARDO-FILHO, M.; FREITAS, R.S.; GUTIFILEN, B.; FONSECA, L.M.B da. Evaluation of ^{99m}Tc-radiopharmaceutical binding to blood elements using different trichloroacetic acid concentrations. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v.69, n.6, p.483-488, 1996.

BERNARDO ET AL. Effect of ginkgo biloba on the *in vitro* labeling of red blood cells and plasma proteins with technetium-99m. **J. Labelled Cpd Radiopharm.** 44, Suppl, 2001.

BEUTLER, E. Composition of erythrocyte. In Beutler E, Lichtmans Ma, Collier Bs (Editors). 5ed. Williams hematology. Williams & Wilkins, Baltimore, 267-368, 1994

BISCHOP, C.; SURGENOR, D.M. The red blood cells, Academic Press: New York, 1964.

BJORRMAN, D.J. The effect of aspirin and nonsteroidal antiinflammatory drugs on prostaglandins. **The American Journal of Medicine**. v.105(1b)p.125, 1998.

BRADLEY, P.R. British Herbal Compendium, vol. 1. Bourmencuth, Dorset, UK; British Herbal Medicine Association, 1992, 224-6.

BRAGA, A.C.S.; OLIVEIRA, M.B.N.; FELICIANO, G.D.; REINIGER, I.W.; OLIVEIRA, J.F.; SILVA, C.R. The effect of drugs on the labeling of blood elements with ^{99m}Tc. **Current Pharmaceutical Design**, v.6, p.1179-1191, 2000.

BRITTO, D.M.M.; GOMES, M.L.; FREITAS, R.S.; BERNARDO-FILHO, M. Effect of chemotherapeutic drug on the biodistribution of ^{99m}Tc –DPTA in balb/c female mice. **J. Exp. Clin. Res.**, v.17, p.313-316, 1998.

CALLAHAN, R.J.; FROELICH, J.W.; MCKUSIK, K.A.; LEPPA, J.; STRAUSS, H.W. A modified method for the *in vivo* labeling of red blood cells with ^{99m}Tc: concise communication. **J. Nucl. Med.**, v.23, p.315-318, 1982.

CALLAHAN, R. J.; RABITO, C.A. Radiolabeling of erythrocytes with ^{99m}Tc: role of band-3 protein in the transport of pertechnetate across the cell membrane. **Journal of Nuclear Medicine**, v.31, n.12, p.2004-2010, 1990.

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

CARVALHO, W.F. **Técnicas Médicas de Hematologia e Imuno-Hematologia**, 6ed., Coopmed Editora, Belo Horizonte, p.59-62, 1994.

DEWANJEE, M. Binding of ^{99m}Tc ion to hemoglobin. **J. Nucl. Med.**, v.15, p.703-706, 1974.

EARLY, P.J.; SODEE, D.B. **Principles and Practice of Nuclear Medicine**. 2a ed. New York: Springer-erlag, 1988.

EARLY, P.J.; SODEE, D.B. **Principles and practice of nuclear medicine**, Mosby Year Book: New York, p.877, 1995.

FISHER, J.; WOLF, R.; LEON, A. Technetium-99m as a label for erythrocytes. **J.Nucl. Med.**, v.8, p.229-232, 1967.

FREITAS, R.S.; GUTIFILEN, B.; FONSECA, L.B.M AND BERNARDO-FILHO. Evaluation of ^{99m}Tc-technetium – radiopharmaceutical binding to blood elements using different acid concentrations. **Yale J.Biol.Med.** n.69, p.483-488, 2000

GLEUE, A .D.; SPICER, J.A.; PRESTON, D.F. The effect of cyclosporine on technetium-99m red blood cell labeling using the tag RBC *in vitro* **J. Nucl. Med. Technol.**, v.23, p.22, 1995

GUTIFILEN, 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. Nucl.**, v.6, p.195-199, 1992.

GUTIFILEN, B.; MARINHO, J.C.A.; ROZEMBLUM, S.; BERNARDO-FILHO, M. ^{99m}Tc-labeled leukocytes obtained with suitable technique: the biodistribution study in rabbits. **Acta Med. Biol.N**, v.41, p. 193-196, 1993.

GUTIFILEN, B.; BERNARDO-FILHO, M. The labeling of red blood cells, leukocytes and plasma proteins with ^{99m}Tc: our practice and retrospective aspects. **Rev. Bras. Pesq. Desenvolv.**, v.3, p.93-98, 1996.

HESSEWOOD, S.; LEUNG E. Drug interactions with radiopharmaceuticals. **Eur. J. Nucl. Med.**, v.21, p.348-356, 1994.

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

JONES, K.P.; DERBYSHIRE, S.W.G. Cerebral mechanisms operating in the presence and absence of inflammatory pain. **Ann. Rheumat. Dis.**, vol. 55, p. 411-420, 1996.

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

KNOLL, G.F. **Radiation detection and measurements**. John Wiley & Sons, Inc, USA, 1989

MATOS, F.J.A. Introdução à fitoquímica experimental. *Ciência coleção*, EUFC, p.8, 1994

MAURY, E.A. *A cura pelas plantas medicinais saúde e beleza*. 1ª ed, Editora Riddel Ltda, São Paulo, 1997. 164p.

MILLS, S.Y.; JACOBY, R.K.; CHACSFIELD, M.; WILLOUGBY, M. Effects of a proprietary herbal medicine on the relief of chronic arthritic pain: A double-blind study. *Br. J. Rheum.*, 1996, 874-8.

OLIVEIRA, J.F.; BRAGA, A.C.S.; AVILA, A.S.R.; GUTIFILLEN, B.; BERNARDO-FILHO, M. Effect of *Thuya occidentalis* on the labeling of red blood cells and plasma proteins with ^{99m}Tc. **Yale J. Biol. Med.**, v.69, p.489-494, 1997.

OLIVEIRA, J.F.; BRAGA, A.C.S.; AVILA, A.S.R.; ARAUJO, A.C.; CARDOSO, V.N.; BEZERRA, R.J.A.C.; BERNARDO-FILHO, M. Assessment of the effect of *Maytenus ilicifolia* (espinheira santa) extract on the labeling of red blood cells and plasma proteins with ^{99m}Tc. **J. Ethnopharmacol.**, v.72, p.179-184, 2000.

OLIVEIRA, J.F.; AVILA, A.A.S.; BRAGA, A.C.S.; OLIVEIRA, M.B.N.; BOASQUEVISQUE, E.M.; JALES, R.L.; CARDOSO, V.N.; BERNARDO-FILHO, M. Effect of extract of medicinal plants on the labeling of blood elements with Technetium-99m and morphology of red blood cells: A study with *Paullinia cupana*. *Fitoterapia*, v.73, p.305-312.

OWUNWANNE, A; PATEL, M; SADEK, S. *The handbook of radiopharmaceuticals*. **Chapman and Hall Medical**, 1995

PEARSON, H.A.; VERTRESS, K.M. Site of binding of chromium 51 to hemoglobin. **Nature**, v.189, p.1019, 1961.

PLOTKAWSKI, M.C.; BERNARDO-FILHO, M.; MEIRELLES, M.N.; TOURNIER, J.M.; PUCHELLE, E. *Pseudomonas aeruginosa* binds to soluble cellular fibronectin. **Curr. Microbiol.**, v.26, p. 91-95, 1999.

PORTER, W.C.; DEES, S.M.; FREITAS, J.E.; DWORKIN, H.D. Acid-citrate-dextrose compared with heparin in the preparation *in vivo/in vitro* ^{99m}Tc red blood cells. **J. Nucl. Med.**, v.24, p. 383-387, 1983.

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

REINIGER, I.W.; OLIVEIRA, J.F.; CALDEIRA, A.A. de; BERNARDO-FILHO, M. Effect of *Peumus boldus* on the labeling of red blood cells and plasma proteins with ^{99m}Tc. **Appl. Rad. Isto.**, v.51, p.145-149, 1999.

REHANI, M.; SHARMA, S.K. Site of ^{99m}Tc binding to the red blood cell: concise communication. **J. Nucl. Med.**, v.21, p.676-678, 1980.

RIPOLLHAMER, E.; FREITAS, L.C.; PAULA, E.F.; FONSECA, L.M.; GUTFLIN, B.; BERNARDO-FILHO, M. *In vitro* effect of cyclophosphamide on the binding of (^{99m}TcTcO₄ and ^{99m}Tc-MDP) TO BLOOD Elements. **Brazilian Journal Medicine Biological Res**, v.28, p.256-260, 1995.

SAHA, G.B. Fundamentals of nuclear pharmacy. New York, Springer-Verlag, 1998.

SALLÉ, J.L. O totum em Fitoterapia, Robe Editorial, São Paulo, p.237, 1996.

SAMPSON, C.B. Complications and difficulties in radiolabeling blood cells: a review. **Nucl. Med. Commun.**, v.17, p.648-658, 1996.

SANTOS, J.S.; PAULA, E.F.; CORREA, T.G.; FREITAS, L.C.; FONSECA, L.M.; GUTIFIEN, B.; BERNARDO-FILHO, M. TÍTULO. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.28, p.131, 1995.

SIMÕES ET AL. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. Farmacognósia da planta ao medicamento, 2^a ed., Rio Grande do Sul: ed. Universitaria; cap. 15, p.292, 2000.

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

SOERJATO, D.D.-Biodiversity Prospecting and benefit Sharing: Perspectives from the field. **J. Ethnopharmacol**, v.51, p.1-15, 1996

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

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

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

VIDAL, M.V.; GUTIFILEN, B.; FONSECA, L.M.B.; BERNADO-FILHO, M. 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.

WHITTAN, R. **Transport and diffusion in red blood cells**. Edward Arnold, London, 1964

ZIMMER, A.M; SPIES, M; MAJEWSKI, W. Effects of drugs on “*in vivo*” RBC labeling: a proposed mechanism of inhibition. In: **Proceedings of the Second International Symposium of Radiopharmacy**, Chicago, II, 1981