



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA NUCLEAR

**AVALIAÇÃO DA POTENCIALIDADE DO TECNÉCIO-99m-DTPA E DO
TECNÉCIO-99m-FITATO DE SÓDIO, LIVRES E ENCAPSULADOS EM
LIPOSSOMAS, NA IDENTIFICAÇÃO DE PROCESSOS
INFLAMATÓRIOS**

Doutoranda: Luciene das Graças Mota

Orientador: Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso

BELO HORIZONTE - MG

2011

Luciene das Graças Mota

**AVALIAÇÃO DA POTENCIALIDADE DO TECNÉCIO-99m-DTPA E DO
TECNÉCIO-99m-FITATO DE SÓDIO, LIVRES E ENCAPSULADOS EM
LIPOSSOMAS, NA IDENTIFICAÇÃO DE PROCESSOS
INFLAMATÓRIOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Técnicas Nucleares da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências e Técnicas Nucleares.

Área de Concentração: Ciências das Radiações

Orientador: Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso

BELO HORIZONTE - MG

2011

COLABORADORES

- Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira – Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica – Departamento de Produtos Farmacêuticos – Faculdade de Farmácia – UFMG;
- Profa. Dra. Vildete Aparecida Souza Carmo – Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica – Departamento de Produtos Farmacêuticos – Faculdade de Farmácia – UFMG;
- Doutorando André Luis Branco de Barros - Laboratório de Radioisótopos – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – Faculdade de Farmácia – UFMG.

***Dedico esta tese à Hélien,
minha amada irmã, minha melhor amiga, minha vida....***

AGRADECIMENTOS

A mente humana é capaz de transcender a simples racionalidade da lógica e, quando isso acontece, criamos, cultuamos e agradecemos a Deus.

Agradeço a minha família pelo amor incondicional e por estarmos sempre juntos nos momentos felizes e também nas adversidades. Sem vocês eu nada seria.

Ao Henrique por tornar os meus dias mais iluminados e por ter dado um novo sentido às nossas vidas.

Devo agradecer ao meu orientador, Prof. Valbert, pelos ensinamentos e incentivo, mas, principalmente, pelo exemplo de caráter, pela amizade, respeito e confiança de tantos anos. Serei eternamente grata a você!

À Profa. Mônica, que foi muito mais do que colaboradora neste trabalho. Agradeço o acolhimento, confiança, ensinamentos, dedicação e também pela amizade tão preciosa.

À Profa. Vildete pela importante contribuição, incentivo e por sua disponibilidade constante para resolver minhas dúvidas.

Ao colaborador e grande amigo André, agradeço imensamente pelas idéias brilhantes, pela generosidade, pela ajuda em todos os momentos que precisei e pela amizade de sempre.

À Profa. Simone pelo apoio e ajuda nesses anos todos de Faculdade de Farmácia.

Amigos da Faculdade de Farmácia: a vocês a minha eterna gratidão, o meu carinho, as minhas melhores lembranças, saudades e a certeza de que fazem parte da minha vida. Vocês são valiosos!

À Flaviana minha gratidão, admiração, carinho e amizade.

Aos amigos Álvaro, Elaine e José Geraldo, muito obrigada pelo carinho, atenção, amizade e incentivo.

Mário, Danilo, Valeria e Nayara, obrigada pela amizade, carinho e dedicação.

Aos amigos da vida inteira: Fabiano, Nara, Mariel, Juliano, Ana Gabriela, Fabiana, Letícia e Karine: obrigada pela amizade de tantos anos e por estarem sempre ao meu lado.

Aos meus “anjos” Marlice e Alessandra: vocês chegaram em um momento de tanta dor, mas a sua dedicação e amizade devolveram-me a alegria, esperança e a certeza de que a minha missão está apenas começando...

Agradeço aos professores e funcionários do Departamento de Engenharia Nuclear por terem me recebido tão bem e por toda a ajuda que sempre me dispensaram. Muito obrigada.

Sou muito grata à Adelaide e ao Batista, do Biotério da Faculdade de Farmácia pela disponibilidade, simpatia, cordialidade, dedicação e ajuda durante todos esses anos.

Izabela, Dra. Viviane, Dra. Sandra e Dra. Hérika: agradeço a vocês pelo carinho, amizade, colaboração no fornecimento do tecnécio-99m e por todo o apoio que sempre me dispensaram. Obrigada!

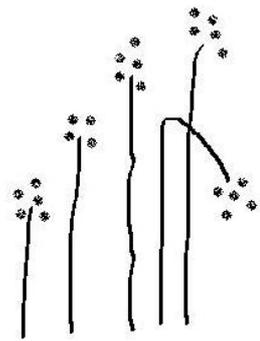
Aos colegas do Departamento de Propedêutica pelo apoio, incentivo e torcida.

Ao Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali e à doutoranda Cristina Maria de Souza pela colaboração nos estudos histológicos.

Ao Prof. Dr. Alfredo Miranda Goes e à doutoranda Juliana Lott Carvalho pela ajuda com os estudos citológicos.

Aos Profs Dr. Carlos Simal, Dr. Gilson Ramaldes e Dra. Maria Auxiliadora Fortini que participaram da minha banca de qualificação, pelas críticas e importantes sugestões.

À FAPEMIG e CNEN, pelo auxílio financeiro e concessão de bolsa de estudo.



*mas seja lá o que for
tem que ter fé e paixão*

RESUMO

As doenças inflamatórias e infecciosas são uma das causas mais comuns de mortalidade e morbidade. Este trabalho apresenta a avaliação da potencialidade dos radiofármacos ^{99m}Tc -DTPA e ^{99m}Tc -Fitato de Sódio, livres e encapsulados em lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada (SpHL) na identificação de processo inflamatório. A caracterização físico-química dos SpHL compostos por aPEG₂₀₀₀-DSPE:DOPE:CHEMS (razão molar 0,5:6,5:3,0, respectivamente), liofilizados na presença de glicose como crioprotetor na proporção crioprotetor:fosfolípide (p/p) 5:1, mostrou 80% das vesículas com diâmetro menor que 350 nm, apresentando boa homogeneidade (IP=0,29). Os SpHL na concentração lipídica de 20 mM apresentaram maior eficiência de encapsulação e potencial zeta positivo. Para os SpHL armazenados em geladeira (4°C) não foram observadas alterações significativas no diâmetro das vesículas até 180 dias de estocagem, apresentando boa estabilidade. A porcentagem de encapsulação do ^{99m}Tc -DTPA nos SpHL foi de 10,65%, sendo que 4,88% encontravam-se adsorvidos na superfície das vesículas. O diâmetro médio dos SpHL- ^{99m}Tc -DTPA foi de $207,4 \pm 8,5$ nm, apresentando boa homogeneidade. Os SpHL marcados com ^{99m}Tc -Fitato de Sódio mostraram vesículas com diâmetro médio de $293,1 \pm 10,4$ nm e o percentual de encapsulação do radiofármaco nas vesículas foi de 14,43%. Os radiofármacos ^{99m}Tc -DTPA ou ^{99m}Tc -Fitato de Sódio, livres e encapsulados em SpHL, foram administrados por via intravenosa em ratos após a indução de processo inflamatório com suspensão de Zimosan a 5% (p/v). Os estudos de biodistribuição mostraram significativa captação dos SpHL radiomarcados pelos órgãos do sistema fagocitário mononuclear (fígado e baço). O ^{99m}Tc -DTPA, livre e encapsulado em SpHL, foram capazes de reconhecer o foco inflamatório sendo a lesão visualizada nas imagens cintilográficas de 2 horas após a sua administração. A relação alvo/não alvo da radioatividade determinada nas regiões de interesse foi superior a 1,5 para todos os tempos investigados. Os dados não mostraram diferença estatisticamente significativa entre o radiofármaco livre e encapsulado. O ^{99m}Tc -Fitato de Sódio, livre e encapsulado em SpHL, também mostraram-se eficientes na identificação do processo inflamatório. A relação alvo/não alvo para o ^{99m}Tc -Fitato de Sódio livre foi superior àquela obtida com os SpHL- ^{99m}Tc -Fitato de Sódio durante todos os tempos investigados, atingindo um valor de 10,24 no tempo de 2 horas após injeção. Esses resultados sugerem que o ^{99m}Tc -Fitato de Sódio poderia ser empregado como um procedimento alternativo na identificação de regiões inflamadas.

Palavras chaves: inflamação, lipossomas pH-sensíveis, tecnécio-99m, DTPA, Fitato de Sódio.

ABSTRACT

The inflammatory and infectious diseases are one of the most common causes of mortality and morbidity. This paper presents the evaluation of the potential of the radiopharmaceuticals ^{99m}Tc -DTPA and ^{99m}Tc -Sodium Phytate, free and encapsulated into long-circulating and pH-sensitive (SpHL) to identify inflammatory process. The physicochemical characterization of freeze-dried SpHL constituted by aPEG₂₀₀₀-DSPE:DOPE:CHEMS (0.5:6.5:3.0 molar ratio, respectively) lyophilized in the presence of glucose as cryoprotectant at cryoprotectant:phospholipid ratio (w/w) 5:1, showed 80% of the vesicles with a diameter smaller than 350 nm, showing good homogeneity (PI=0.29). SpHL (lipid concentration of 20 mM) showed higher encapsulation efficiency, and positive zeta potential. SpHL stored in refrigerator (4 °C) did not show significant changes in the mean diameter up to 180 days of storage, showing good stability. The percentage of encapsulation of the ^{99m}Tc -DTPA in SpHL was 10.65% and 4.88% were adsorbed on the surface of the vesicles. The average diameter of SpHL- ^{99m}Tc -DTPA was 207.4 ± 8.5 nm, showing good homogeneity. The SpHL radiolabeled with ^{99m}Tc -Sodium Phytate showed vesicles with mean diameter of 293.1 ± 10.4 nm and the encapsulation percentage of 14.43%. Radiopharmaceuticals ^{99m}Tc -DTPA or ^{99m}Tc -Sodium Phytate, free and encapsulated into SpHL were administered intravenously in mice-bearing inflammation focus induced by Zimosan suspension at 5% (w/v) Biodistribution studies showed significant uptake of radiolabeled SpHL in the organ of the mononuclear phagocytic system (liver and spleen). The ^{99m}Tc -DTPA, free and encapsulated, were able to identify the inflammatory focus by scintigraphic images at 2 hours post-injection. The target/ non-target ratio was greater than 1.5 for all times investigated. The data did not show statistically significant difference between the free and encapsulated radiopharmaceuticals. The ^{99m}Tc -Sodium Phytate, free and encapsulated into SpHL also were effective to identify inflammatory process. The target/non-target ratio for ^{99m}Tc -Sodium Phytate free was higher than that obtained with SpHL- ^{99m}Tc -Sodium Phytate during the entire experiment, reaching a value of 10.24 at 2 hours post-injection. These results suggesting that the ^{99m}Tc -Phytate Sodium could be employed as alternative procedure to identify inflamed regions.

Keywords: inflammation, pH-sensitive liposomes, technetium-99m, DTPA, Sodium Phytate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gerador de molibdênio-99/tecnécio-99m (Fonte: IPEN).....	32
Figura 2. Representação esquemática da estrutura dos lipossomas.....	37
Figura 3. Estruturas químicas do aPEG ₂₀₀₀ -DSPE (A), mPEG ₂₀₀₀ -DSPE (B).....	39
Figura 4. Estruturas químicas do CHEMS (A) e DOPE (B).....	41
Figura 5. Representação esquemática da organização estrutural de derivados da PE na ausência e na presença de CHEMS.....	41
Figura 6. Comportamento de fases das membranas lipídicas (Adaptado de FRÉZARD <i>et al.</i> , 2005).....	43
Figura 7. Estrutura química do lisofosfolípide da DOPE (1-oleil 2-hidroxi fosfatidiletanolamina).....	46
Figura 8. Representação esquemática da interação fosfolípide-açúcar.....	48
Figura 9. Mecanismo de substituição da água durante a liofilização seguida de reidratação. (A) Liofilização sem o uso de crioprotetor; (B) Liofilização com o uso de crioprotetor. (Adaptado de CHEN <i>et al.</i> , 2010).....	49
Figura 10. Extrusor de média pressão (Fonte: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica/UFMG).....	59
Figura 11. Equipamento Zetasizer 3000 HSA (Fonte: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica/UFMG).....	60
Figura 12. Liofilizador E-C Modulyo e bomba de vácuo (Fonte: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica/UFMG).....	63
Figura 13. Fotomicrografia de SpHL obtida por microscopia eletrônica de transmissão..	65
Figura 14. Curva de calibração para o doseamento de fósforo em SpHL.....	66
Figura 15. A – Dispersão coloidal de SpHL; B – SpHL liofilizados.....	69
Figura 16. Contador de radiação gama – Wizard. (Fonte: Laboratório de Radioisótopos/UFMG).....	78
Figura 17. Gama câmara Nuclide™ TH 22, Mediso (Fonte: Laboratório de Radioisótopos/UFMG).....	81
Figura 18. Teor de encapsulação, em presença de glicose [proporção crioprotetor:fosfolípide (p/p) 5:1], do complexo ^{99m} Tc-DTPA em SpHL em diferentes concentrações lipídicas (n=3).....	85
Figura 19. Perfil de liberação do complexo ^{99m} Tc-DTPA em SpHL em diferentes tempos (n=3).....	88

Figura 20. Perfil de liberação do complexo ^{99m}Tc -Fitato de Sódio em SpHL em diferentes tempos (n=3).....	88
Figura 21. Diâmetro das vesículas para os SpHL liofilizados armazenados em geladeira (4°C) e em temperatura ambiente (TA) - (n=3). Letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05).....	90
Figura 22. Análise visual dos kits de SpHL liofilizados na presença de glicose como crioprotetor [proporção crioprotetor:fosfolípide (p/p) de 5:1]. A – kit armazenado a 4°C, 180 dias após a estocagem. B – kit armazenado em TA, 180 dias após a estocagem.....	91
Figura 23. Depuração plasmática para o complexo ^{99m}Tc -DTPA livre e encapsulado em SpHL, em animais sadios (n=3).....	92
Figura 24. Depuração plasmática para o complexo ^{99m}Tc -Fitato de Sódio livre e encapsulado em SpHL, em animais sadios (n=3).....	93
Figura 25. Inflamação do músculo da pata anterior esquerda de rato Wistar, 24 horas após a administração intramuscular de 0,2 mL de suspensão de Zimosan a 5% (p/v). A seta indica o local do foco inflamatório.....	95
Figura 26. Microfotografias de tecidos do músculo normal (A) e do músculo inflamado (B) de ratos Wistar, 24 horas da injeção intramuscular de solução estéril de NaCl 0,9% (p/v) e suspensão de Zimosan a 5% (p/v), respectivamente. As amostras foram fixadas em formalina tamponada, incluídas em parafina e cortes de 4 µm foram corados com hematoxilina-eosina (HE).....	95
Figura 27. Imagens cintilográficas de rato Wistar com inflamação no músculo da pata esquerda anterior induzida por Zimosan a 5% (p/v), em 2, 4 e 8 horas após a injeção do ^{99m}Tc -DTPA (n=3). (A) As setas brancas indicam o foco inflamatório. As setas vermelhas indicam os rins e as setas pontilhadas indicam a bexiga. (B) Imagens em preto e branco, as setas indicam o foco inflamatório.....	97
Figura 28. Relação alvo/não alvo (média ± d.p.) das imagens cintilográficas de ratos injetados com ^{99m}Tc -DTPA após injeção intramuscular de Zimosan a 5% (p/v) - (n=3)....	98
Figura 29. Captação do ^{99m}Tc -DTPA livre e encapsulado em SpHL no músculo da pata anterior esquerda (inflamado) nos tempos de 2, 4 e 8 horas após a sua administração (n=5). *Indicam uma diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos com ^{99m}Tc -DTPA e SpHL- ^{99m}Tc -DTPA (Teste de Tukey, p<0,05).....	100
Figura 30. Imagens cintilográficas de rato Wistar com inflamação no músculo da pata anterior esquerda induzida por Zimosan a 5% (p/v), 2, 4 e 8 horas após a injeção dos SpHL- ^{99m}Tc -DTPA (n=3). (A) As setas brancas indicam o foco inflamatório. As setas vermelhas indicam órgãos do SFM (fígado e baço). (B) Imagens em preto e branco, as	

setas indicam o foco inflamatório.....	101
Figura 31. Relação alvo/não alvo (média \pm d.p.) das imagens cintilográficas de ratos injetados com SpHL- ^{99m} Tc-DTPA após injeção intramuscular de Zimosan a 5% (p/v) - (n=3).....	102
Figura 32. Relação alvo/não alvo (média \pm d.p.) das imagens cintilográficas do ^{99m} Tc-DTPA livre e encapsulado em SpHL (n=3).....	102
Figura 33. Imagens cintilográficas de rato Wistar com inflamação no músculo da pata anterior esquerda, induzida por Zimosan a 5% (p/v), 2, 4 e 8 horas após a injeção do ^{99m} Tc-Fitado de Sódio (n=3). (A) As setas brancas indicam órgãos do SFM (fígado e baço). As pontas de setas vermelhas indicam o foco inflamatório. (B) Imagens em preto e branco, as pontas de setas indicam o foco inflamatório.....	106
Figura 34. Análise quantitativa das imagens cintilográficas de ratos com inflamação induzida por Zimosan a 5% (p/v) no músculo da pata anterior esquerda após injeção intravenosa de ^{99m} Tc-Fitado de Sódio (n=5).....	107
Figura 35. Imagens cintilográficas de rato Wistar com inflamação no músculo da pata anterior esquerda induzida por Zimosan a 5% (p/v), em 2, 4 e 8 horas após a injeção do SpHL- ^{99m} Tc-Fitado de Sódio (n=3). (A) As setas indicam o fígado e baço. As pontas de setas verdes indicam o foco inflamatório. (B) Imagens em preto e branco, as setas indicam o foco inflamatório.....	111
Figura 36. Análise quantitativa (média \pm d.p.) das imagens cintilográficas de ratos injetados com SpHL- ^{99m} Tc-Fitado de Sódio após injeção intramuscular de Zimosan a 5% (p/v) - (n=3).....	111
Figura 37. Relação alvo/não alvo (média \pm d.p.) das imagens cintilográficas do ^{99m} Tc-Fitado de Sódio livre e encapsulado em SpHL (n=3). Letras diferentes Indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos.(Teste de Tukey, $p \leq 0,05$).....	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da solução para contraste utilizada na microscopia eletrônica de transmissão.....	61
Tabela 2. Diâmetro médio, índice de polidispersão (IP) e potencial zeta de SpHL não liofilizados.....	64
Tabela 3. Teor recuperado de fosfolípidos de SpHL após seu preparo pelo método de hidratação do filme lipídico seguido de extrusão.....	66
Tabela 4. Influência da presença de crioprotetores sobre o diâmetro e índice de polidispersão de SpHL após processo de liofilização.....	68
Tabela 5. Diâmetro, distribuição do diâmetro das vesículas, IP, e potencial zeta dos SpHL brancos e marcados com ^{99m} Tc-Fitado de Sódio.....	84
Tabela 6. Diâmetro, IP e distribuição de diâmetros dos SpHL- ^{99m} Tc-DTPA em diferentes concentrações lipídicas, após liofilização na presença de glicose como crioprotetor [proporção crioprotetor:fosfolípide (p/p) 5:1].....	86
Tabela 7. Teor e eficiência de encapsulação do ^{99m} Tc-DTPA em SpHL em diferentes concentrações lipídicas na presença de glicose como crioprotetor, proporção crioprotetor:fosfolípide (p/p) de 5:1.....	87
Tabela 8. Biodistribuição do ^{99m} Tc-DTPA em ratos com inflamação no músculo da pata anterior esquerda induzida por Zimosan a 5% (p/v).....	96
Tabela 9. Biodistribuição dos SpHL- ^{99m} Tc-DTPA em ratos com inflamação no músculo da pata anterior esquerda induzida por Zimosan a 5% (p/v).....	99
Tabela 10. Biodistribuição do ^{99m} Tc-Fitado de Sódio em ratos com inflamação no músculo da pata anterior esquerda induzida por Zimosan a 5% (p/v).....	104
Tabela 11. Biodistribuição do SpHL- ^{99m} Tc-Fitado de Sódio em ratos com inflamação no músculo da pata anterior esquerda induzida por Zimosan a 5% (p/v).....	108
Tabela 12. Proporção de fixação da radioatividade no fígado em relação ao baço.....	109

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de variância
aPEG ₂₀₀₀ -DSPE	Aminopolietilenoglicol ₂₀₀₀ -diestearilfosfatidiletanolamina
CETEA	Comitê de Ética para Experimentação Animal
CHEMS	Hemisuccinato de coleslerila
DI	Dose injetada
DII	Doenças inflamatórias do intestino
DOPE	Dioleilfosfatidiletanolamina
d.p.	Desvio padrão
DTPA	Ácido dietilenotriaminopentacético
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
FDG	Fluordesoxiglicose
HMPAO	Hexametilpropileno amino oxima
IgG	Imunoglobulina gama
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
LUV	Large unilamellar vesicles
MLV	Multilamellar vesicles
mPEG ₂₀₀₀ -DSPE	Metoxipolietilenoglicol ₂₀₀₀ -diestearilfosfatidiletanolamina
NaTcO ₄	Pertecnetato de sódio
p/p	Relação peso por peso
p/v	Relação peso por volume
PAF	Fator ativador de plaquetas
PCR	Proteína C reativa
PE	Fosfatidiletanolamina
PEG	Polietilenoglicol
PEG-DSPE	Polietilenoglicol-diestearilfosfatidiletanolamina
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
q.s.p	Quantidade suficiente para
ROI	Região de interesse
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SFM	Sistema fagocitário mononuclear
SpHL	Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada

SpHL- ^{99m} Tc-DTPA	Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada marcados com ^{99m} Tc-DTPA
SpHL- ^{99m} Tc-Fitado de Sódio	Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada marcados com ^{99m} Tc-Fitado de Sódio
SUV	Small unilamellar vesicles
T _m	Temperatura de transição de fase gel-cristal líquido
T _H	Temperatura de transição de fase hexagonal
v/v	Relação volume por volume

SUMÁRIO

	RESUMO.....	x
	ABSTRACT.....	xi
	LISTA DE FIGURAS.....	xii
	LISTA DE TABELAS.....	xv
	LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xvi
	INTRODUÇÃO.....	21
	REVISÃO DA LITERATURA.....	23
1	INFLAMAÇÃO.....	24
2	RADIOFÁRMACOS EM MEDICINA NUCLEAR.....	25
2.1	O papel da medicina nuclear no diagnóstico de processos inflamatórios.....	27
2.2	Produção de radionuclídeos.....	28
2.3	O elemento Tecnécio.....	30
2.4	Radiofármacos convencionais utilizados para o diagnóstico de processos inflamatórios.....	32
2.4.1	Citrato de ⁶⁷ Ga.....	32
2.4.2	^{99m} Tc-Imunoglobulina humana policlonal (^{99m} Tc-IgG).....	33
2.4.3	Leucócitos radiomarcados.....	33
3	LIPOSSOMAS.....	36
3.1	Lipossomas convencionais e de circulação prolongada.....	38
3.2	Lipossomas pH-sensíveis.....	39
3.3	Propriedades físicas e físico-químicas dos lipossomas.....	42
3.3.1	Transição de fase dos lípides.....	42
3.3.2	Diâmetro das vesículas.....	43
3.3.3	Potencial zeta.....	44
3.3.4	Teor e eficiência de encapsulação.....	45
3.4	Estabilidade física e química dos lipossomas.....	45
3.5	Liofilização.....	47
3.6	Crioproteção.....	47
3.7	Lipossomas radiomarcados no diagnóstico de inflamação.....	49
4	MODELO EXPERIMENTAL DE INFLAMAÇÃO.....	52
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
	OBJETIVOS.....	55
1.1	Objetivo geral.....	56
1.2	Objetivos específicos.....	56
	CAPÍTULO 1 - Preparação e caracterização de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada como agente de identificação de processos inflamatórios.....	57
1	INTRODUÇÃO.....	58
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	59
2.1	Material.....	59
2.2	Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada (SpHL).....	59
2.2.1	Preparo dos lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada (SpHL).....	59
2.3	Caracterização de SpHL.....	60
2.3.1	Diâmetro das vesículas e índice de polidispersão.....	60
2.3.2	Caracterização de SpHL por microscopia eletrônica de transmissão.....	60
2.3.3	Potencial zeta.....	61
2.3.4	Teor de fosfolípidos.....	61

2.3.5	Avaliação da influência do uso de crioprotetores no processo de liofilização de SpHL.....	62
2.4	Produção do kit liofilizado.....	62
2.5	Análise estatística.....	63
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
3.1	Caracterização dos lipossomas.....	64
3.2	Avaliação da influência do uso de crioprotetores no processo de liofilização de SpHL.....	66
3.3	Produção do kit liofilizado de SpHL.....	68
4	CONCLUSÃO.....	69
	CAPÍTULO 2 - Estudos de biodistribuição e imagens cintilográficas dos radiofármacos ^{99m}Tc -DTPA e ^{99m}Tc -Fitato de Sódio, livres e encapsulados em lipossomas pH-sensíveis, de circulação prolongada, em modelo experimental de inflamação.....	70
1	INTRODUÇÃO.....	71
1.1	Radiofármaco ^{99m}Tc -DTPA.....	72
1.2	Radiofármaco ^{99m}Tc -Fitato de Sódio.....	72
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	73
2.1	Material.....	73
2.2	Métodos.....	74
2.2.1	Preparo dos lipossomas.....	74
2.2.2	Procedimento de marcação.....	74
2.2.2.1	Marcação do DTPA com ^{99m}Tc	74
2.2.2.2	Marcação do Fitato de Sódio com ^{99m}Tc	75
2.2.2.3	Marcação dos SpHL com ^{99m}Tc -DTPA ou ^{99m}Tc -Fitato de Sódio.....	75
2.2.3	Teor e eficiência de encapsulação.....	76
2.2.4	Perfil de liberação.....	77
2.2.5	Estudos de estabilidade do kit de SpHL liofilizados contendo glicose como crioprotetor [relação crioprotetor (p/p) 5:1].....	77
2.2.6	Depuração plasmática em animais sadios.....	77
2.2.7	Modelo animal de inflamação.....	78
2.2.8	Estudos histopatológicos.....	79
2.2.9	Estudos de biodistribuição dos radiofármacos livres (^{99m}Tc -DTPA, ^{99m}Tc -Fitato de Sódio) e dos SpHL radiomarcados (SpHL- ^{99m}Tc -DTPA, SpHL- ^{99m}Tc -Fitato de Sódio) em animais com foco inflamatório.....	79
2.2.10	Imagens cintilográficas dos radiofármacos livres (^{99m}Tc -DTPA, ^{99m}Tc -Fitato de Sódio) e dos SpHL radiomarcados (SpHL- ^{99m}Tc -DTPA, SpHL- ^{99m}Tc -Fitato de Sódio) em animais com foco inflamatório.....	80
2.3	Análise estatística.....	81
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
3.1	Caracterização dos SpHL- ^{99m}Tc -DTPA.....	82
3.2	Caracterização dos SpHL- ^{99m}Tc -Fitato de Sódio.....	83
3.3	Teor e eficiência de encapsulação.....	85
3.4	Perfil de liberação para os SpHL- ^{99m}Tc -DTPA.....	87
3.5	Perfil de liberação para os SpHL- ^{99m}Tc -Fitato de Sódio.....	88
3.6	Estudos de estabilidade do kit de SpHL liofilizados contendo glicose como crioprotetor [proporção crioprotetor:fosfolípide (p/p) de 5:1].....	89
3.7	Depuração plasmática em animais sadios.....	91
3.7.1	Depuração plasmática do ^{99m}Tc -DTPA e SpHL- ^{99m}Tc -DTPA.....	91
3.7.2	Depuração plasmática do ^{99m}Tc -Fitato de Sódio e SpHL- ^{99m}Tc -Fitato de Sódio.....	93
3.8	Estudos histopatológicos.....	94

3.9	Biodistribuição e imagens cintilográficas do complexo ^{99m}Tc -DTPA em animais com foco inflamatório.....	96
3.10	Biodistribuição e imagens cintilográficas dos SpHL- ^{99m}Tc -DTPA em animais com foco inflamatório.....	99
3.11	Biodistribuição e imagens cintilográficas do complexo ^{99m}Tc -Fitato de Sódio em animais com foco inflamatório.....	103
3.12	Biodistribuição e imagens cintilográficas dos SpHL- ^{99m}Tc -Fitato de Sódio em animais com foco inflamatório.....	108
4	CONCLUSÃO.....	113
	CONCLUSÕES INTEGRADAS E PERSPECTIVAS.....	114
1	CONCLUSÕES INTEGRADAS.....	115
2	PERSPECTIVAS.....	115
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116
	ANEXOS.....	129
	Anexo 1 – Esquema de decaimento do Molibdênio-99.....	130
	Anexo 2 – Esquema de decaimento do Gálio-67.....	131
	Anexo 3 – Esquema de decaimento do Índio-111.....	132
	Anexo 4 - Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais.....	133

INTRODUÇÃO

O diagnóstico rápido e preciso de processos inflamatórios e infecciosos pode diminuir o curso dessas doenças, reduzir a morbidade e a mortalidade, o tempo de hospitalização e o curso total do tratamento. Na perspectiva da saúde pública pode, também, reduzir o uso inadequado de antibióticos. Além disso, a localização precisa das lesões pode ser útil na orientação de procedimentos de biópsia e, ainda, alterar substancialmente o plano de tratamento (DUMAREY *et al.*, 2006). Nesse sentido, a medicina nuclear é de grande importância uma vez que essa técnica detecta alterações fisiológicas e patológicas, permitindo o diagnóstico de uma lesão inflamatória/infecciosa no estágio inicial bem como a sua localização e natureza (BOERMAN *et al.*, 2001; CORSTENS e VAN DER MEER, 1999; RENNEN *et al.*, 2001).

Atualmente, para a detecção cintilográfica de processos inflamatórios/infecciosos em pacientes, os radiofármacos mais comumente utilizados são o citrato marcado com gálio-67 (^{67}Ga -Citrato) e os leucócitos marcados com tecnécio-99m-hexametilpropileno amino oxima ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO). Entretanto, esses radiofármacos apresentam alguns inconvenientes, tais como riscos de contaminação do manipulador, tempo de preparo prolongado e trabalhoso, baixa especificidade e alta dose de exposição. Por isso, existe uma investigação contínua na busca de novos e melhores radiofármacos que possibilitem auxiliar no diagnóstico de processos inflamatórios e infecciosos com maior sensibilidade, especificidade e acurácia além de facilidade e segurança no seu manuseio (BOERMAN *et al.*, 2001; LOVE e PALESTRO, 2004; PHILLIPS, 1998; RENNEN *et al.*, 2001; VAN EERD *et al.*, 2005).

A potencialidade do uso de lipossomas para a liberação direcionada de fármacos e agentes de diagnóstico foi vislumbrada logo após sua descoberta por Bangham na década de 60 (PHILLIPS, 1999). Os lipossomas são pequenas vesículas consistindo de uma ou mais bicamadas lipídicas que envolvem um pequeno espaço aquoso e são formados espontaneamente quando fosfolípidos são suspensos em meio aquoso (ANSEL *et al.*, 2000). O desenvolvimento de lipossomas revestidos com o polímero hidrofílico polietilenoglicol (PEG), também conhecidos como lipossomas de circulação prolongada, ampliou muito a aplicação dessas preparações (CARVALHO-JÚNIOR *et al.*, 2007_a).

A utilização de lipossomas em medicina nuclear requer a sua marcação com um radionuclídeo emissor de radiação gama, preferencialmente o tecnécio-99m (^{99m}Tc). Diferentes métodos para marcar lipossomas com radioisótopos foram desenvolvidos, dentre os quais se destacam aqueles que utilizam a incorporação de quelantes na bicamada dos lipossomas ou o transporte do radioisótopo através da bicamada para o compartimento aquoso sendo, assim, encapsulado (BOERMAN *et al.*, 2000).

Estudos em diferentes modelos experimentais têm demonstrado a habilidade de lipossomas radiomarcados de se acumularem em focos inflamatórios e infecciosos, permitindo a sua identificação por meio de imagens cintilográficas (BOERMAN *et al.*, 2000, 2001; OYEN *et al.*, 1996; CARMO *et al.*, 2007, 2008_a). Os lipossomas pH-sensíveis têm sido estudados como uma estratégia para liberação intracelular de drogas em tecidos patológicos, tais como em áreas inflamadas ou infectadas, os quais apresentam menor pH em relação aos tecidos normais (SIMÕES *et al.*, 2004). Assim, esses lipossomas apresentam potencial aplicação como carreadores de agentes de imagem para diagnóstico de inflamação/infecção.

Entretanto, sabe-se que a instabilidade física e química dos lipossomas limitam a sua aplicação na rotina clínica influenciando não somente na sua performance *in vivo* como sistemas de liberação de fármacos mas também no seu acondicionamento por períodos prolongados. Diante disso, a liofilização tem sido considerada um método bastante efetivo promovendo uma maior estabilidade física e química das vesículas lipídicas (STARK *et al.*, 2010).

No presente trabalho foi realizada a preparação e caracterização físico-química de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada seguido da produção de um kit liofilizado para ser marcado com os radiofármacos tecnécio-99m-ácido dietilenotriaminopentacético (^{99m}Tc -DTPA) e tecnécio-99m-fitato de sódio (^{99m}Tc -Fitato de Sódio). Foi realizado, também, o estudo de estabilidade do kit liofilizado armazenado em diferentes temperaturas por um período de 180 dias. Posteriormente, avaliou-se a potencialidade de aplicação dos lipossomas radiomarcados e dos radiofármacos livres para a identificação de focos inflamatórios em modelos experimentais.

REVISÃO DA LITERATURA

1 INFLAMAÇÃO

É essencial para a sobrevivência do organismo a capacidade de livrar-se de tecidos danificados ou necróticos, assim como de “invasores indesejáveis”. A resposta do hospedeiro que executa esse objetivo é denominada *inflamação*. Trata-se fundamentalmente de uma resposta protetora, projetada para livrar o organismo tanto da causa inicial da lesão celular (bactérias, toxinas, etc) como também das conseqüências de tais lesões (células e tecidos necróticos) – (KUMAR *et al.*, 2010).

Na antiguidade, os gregos já definiam o processo inflamatório pelos seus sinais e sintomas típicos, considerados sinais cardinais: calor, rubor, tumor, dor e perda da função. No século XIX, Julius Cohnheim observou três alterações características na microcirculação próxima a um sítio inflamatório: (1) vasos sanguíneos dilatados, aumentando o fluxo sanguíneo no local; (2) aumento da permeabilidade vascular, resultando em extravasamento de proteínas e (3) aderência de células brancas do sangue às paredes internas dos vasos com uma conseqüente migração para o local da injúria (BOGLIOLO e PEREIRA, 1994; ROTE, 1998).

Embora tenham causas muito variadas (traumas, privação de oxigênio ou nutrientes, defeitos genéticos ou imunológicos, agentes químicos, microrganismos, temperaturas extremas, partículas estranhas ou radiação ionizante), os mecanismos de aparecimento das inflamações são comuns (ROTE, 1998; VAN DER LAKEN *et al.*, 1998). O agente inflamatório age sobre os tecidos e induz a liberação de mediadores que, ao agirem nos receptores existentes nas células da microcirculação e nos leucócitos, produzem aumento da permeabilidade vascular e exsudação de plasma e de células sanguíneas para o interstício (BOGLIOLO e PEREIRA, 1994).

A ação do agente inflamatório e/ou das células do exsudato pode produzir lesões nos tecidos, inclusive necrose. Com o fim desta ação, reduz-se a liberação dos mediadores, a microcirculação recupera o estado hemodinâmico original e o líquido e as células exsudadas voltam à circulação sanguínea geralmente pelos vasos linfáticos. Se há necrose, o tecido destruído é fagocitado e logo depois surgem os fenômenos de cicatrização ou de regeneração, tudo dependendo da extensão da lesão e do órgão acometido (BOGLIOLO e PEREIRA, 1994; COLLINS, 1999; RENNEN *et al.*, 2001).

A inflamação pode ser aguda ou crônica, dependendo da natureza do estímulo e da eficácia inicial para eliminar tal estímulo ou o tecido danificado.

A inflamação aguda é de duração relativamente curta, podendo durar de cinco minutos a cinco dias (MITCHELL e COTRAN, 2003). A sua resposta é caracterizada por aumento do fluxo sanguíneo no local da inflamação; aumento da permeabilidade vascular na área afetada; aumento da transudação de proteínas do plasma; aumento do influxo de leucócitos, sendo que o infiltrado celular predominante é de polimorfonucleares (RENNEN *et al.*, 2001).

A inflamação crônica pode ser considerada como uma inflamação de duração prolongada (semanas, meses ou anos) na qual a inflamação ativa, a injúria do tecido e a cicatrização procedem simultaneamente (MITCHELL e COTRAN, 2003). Ao contrário da inflamação aguda, caracterizada por alterações vasculares, edema e um infiltrado neutrofílico, a inflamação crônica é caracterizada por infiltrado mononuclear (macrófagos, linfócitos e células plasmáticas); destruição do tecido, largamente causada pelas células inflamatórias; reparação, envolvendo uma nova proliferação de vasos (angiogênese) e fibrose (VAN DER LAKEN *et al.*, 1998; COLLINS, 1999; RENNEN *et al.*, 2001).

A inflamação crônica pode surgir de duas maneiras: pode seguir-se à inflamação aguda, quando esta não pode ser resolvida, seja pela persistência do agente agressor ou por alguma interferência com o processo normal de cura. Pode, também, apresentar uma resposta crônica praticamente desde o início do processo. Na inflamação crônica como processo primário, normalmente, o agente agressor é de toxicidade menor quando comparado com o que ocorre na inflamação aguda (KUMAR *et al.*, 2010).

2 RADIOFÁRMACOS EM MEDICINA NUCLEAR

Na medicina nuclear a imagem do corpo é obtida através da detecção da radioatividade emitida pelo radiotraçador empregado. Os radiotraçadores são administrados, em sua maioria, por via intravenosa e o diagnóstico é baseado em alterações bioquímicas e fisiológicas do órgão em exame, sem a necessidade de alterações anatômicas, fornecendo o diagnóstico da doença de forma não invasiva e em um estágio inicial (CONTI *et al.*, 1996; THRALL e ZIESSMAN, 2001).

Radiofármacos são compostos radioativos usados no diagnóstico e no tratamento de doenças. Em medicina nuclear, aproximadamente, 95% dos radiofármacos é utilizado para fins de diagnósticos. A maioria é formada por uma combinação de um componente radioativo (radionuclídeo), que emite a radiação necessária para a detecção externa do órgão em análise e, um componente químico (ligante orgânico), que é responsável pelo direcionamento no organismo. O radionuclídeo deve emitir uma radiação que seja facilmente detectável por um equipamento específico além de expor o paciente a baixas doses de radiação (SAHA, 2004; THRALL e ZIESSMAN, 2001).

Existe uma grande variedade de radionuclídeos usados em medicina nuclear como: iodo-131 (^{131}I), índio-111 (^{111}In), tálio-201 (^{201}Tl), flúor-18 (^{18}F), tecnécio-99 metaestável ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), gálio-67 (^{67}Ga), dentre outros (SAHA, 2004).

Radiofármacos, normalmente, não apresentam efeito farmacológico por serem utilizados em concentrações extremamente reduzidas (traços). Para que possam ser injetados em seres humanos, os radiofármacos devem ser estéreis, livres de pirogênio e devem seguir todos os procedimentos de controle de qualidade de uma droga convencional (SAHA, 2004; LAZARUS, 1990).

Um radiofármaco possui dois componentes: o radionuclídeo e o fármaco, de emprego dependente de suas características. O fármaco é escolhido de acordo com o alvo ou órgão a ser analisado. Em seguida, o radionuclídeo é adicionado resultando no radiofármaco. Este é administrado ao paciente e a radiação emitida, caso seja fótons gama (γ) é detectada por uma câmara de cintilação a raios gama ou gama câmara. Desta forma, a morfologia ou a fisiologia do órgão pode ser analisada (MILLAR, 1990).

Tendo em vista que os radiofármacos são administrados em humanos e que existem algumas limitações na detecção da radiação pelos equipamentos disponíveis, os radiofármacos devem possuir algumas características importantes:

- fácil disponibilidade;
- baixo custo;
- meia-vida física curta resultando em baixa dose de radiação;

- o radionuclídeo utilizado deve ser, preferencialmente, um emissor de radiação gama (γ) pois esta causa menos danos aos tecidos quando comparada com as partículas alfa (α) e beta (β);
- devem ser emissores de radiação γ com energia entre 30 e 300 keV. Acima ou abaixo deste valor, não se obtém uma colimação efetiva dos raios γ com os colimadores comumente utilizados. Entretanto, já estão disponíveis colimadores para energias de 511 keV utilizados em imagens planares ou na tomografia por emissão de pósitrons (PET) com fluordesoxiglicose (^{18}F -FDG) - (SAHA, 2004).

O radiofármaco ideal deve possuir todas as características para fornecer a máxima eficácia diagnóstica e proporcionar a menor dose efetiva de radiação ao paciente. Entretanto, estes critérios são muito restritivos e nenhum radiofármaco é ideal para todas as situações (SAHA, 2004).

2.1 O papel da medicina nuclear no diagnóstico de processos inflamatórios

A identificação e a localização precoce de focos inflamatórios são fatores importantes para o tratamento adequado de pacientes com suspeita ou portadores desse processo (VAN EERD, 2005).

O estudo de processos inflamatórios pela medicina nuclear pode ser de grande relevância para a clínica médica. Geralmente, o diagnóstico é baseado apenas na história clínica e no exame físico do paciente, entretanto, muitas vezes é difícil de ser realizado, pois o paciente encontra-se assintomático ou com sintomas não específicos. Quando o diagnóstico de processos inflamatórios é feito precocemente, torna-se possível iniciar um tratamento e evitar uma série de complicações. Entretanto, antes de iniciar o tratamento o médico deve conhecer a localização e o grau de atividade do processo inflamatório (CHIANELLI *et al.*; 1997; SIGNORE *et al.*, 2002).

Como citado anteriormente, o processo inflamatório é caracterizado por aumento no fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular e influxo de células do plasma para o tecido. O radiofármaco usado na imagem de processos inflamatórios acumula-se no local da lesão devido a estas mudanças fisiológicas que ocorrem no local da inflamação. Portanto, a imagem cintilográfica não depende de alterações morfológicas e sim de alterações físico-químicas no tecido acometido. Este fato confere ao método cintilográfico a capacidade

de detectar focos inflamatórios na sua fase inicial, quando as alterações morfológicas ainda não estão presentes. Entende-se como alterações morfológicas aquelas que são detectáveis por outros métodos de imagem como a radiografia e tomografia computadorizada. Além disso, a cintilografia é um método não invasivo que permite rastrear o corpo inteiro e determinar a extensão do processo inflamatório (BOERMAN *et al.*, 2001).

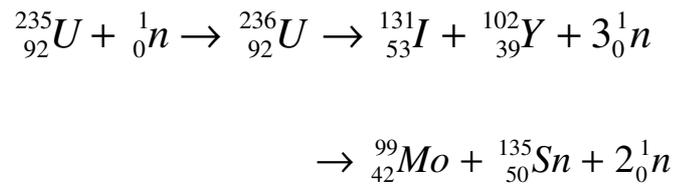
Vários radiofármacos têm sido desenvolvidos na última década, cada um com suas vantagens e limitações. No diagnóstico de inflamações, o acúmulo e a retenção do radiofármaco no sítio da inflamação podem ocorrer por mecanismos específicos ou não específicos. Os processos específicos compreendem interações entre o radiofármaco e o alvo, como peptídeos quimiotáticos ou ligações anticorpo-antígeno (antigranulócitos MoAb). Entre os radiofármacos específicos para detecção de inflamações e infecção, destacam-se os leucócitos radiomarcados com ^{111}In ou $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ceftizoxima e citocinas radiomarcadas com $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Já os radiofármacos não específicos acumulam-se no local da inflamação devido ao aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular e ao processo de transudação. Exemplos de traçadores não específicos para a detecção de inflamação baseados no aumento da permeabilidade vascular estão o ^{67}Ga , lipossomas radiomarcados e imunoglobulinas não específicas radiomarcadas (CORSTENS e VAN DER MEER, 1999; RENNEN *et al.*; 2001; CARMO *et al.*, 2008_a).

2.2 Produção de radionuclídeos

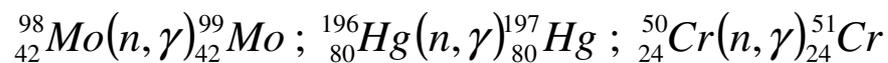
Em 1896, Becquerel descobriu a radioatividade natural no sulfato de potássio e uranila. Desde então, Pierre e Marie Curie, Ernest Rutherford e Frederick Soddy contribuíram imensamente para a descoberta de outros elementos radioativos. Os trabalhos de todos esses cientistas mostraram que todos os elementos encontrados na natureza com número atômico maior do que 83 são radioativos. A radioatividade artificial foi pioneiramente relatada por Irène Joliot Curie e Fredèrick Joliot, em 1934. Esses cientistas irradiaram o alumínio com partículas α e observaram a emissão de pósitrons (partículas β^+) a partir do alvo, mesmo após a remoção da fonte de partículas. Esta descoberta da radioatividade induzida ou artificial abriu um novo campo de extrema importância. Hoje, todos os radionuclídeos de uso clínico são produzidos no reator nuclear, em cíclotrons ou outro tipo de aceleradores (SAHA, 2004; THRALL e ZIESSMAN, 2001).

No ciclotron, partículas carregadas como os prótons, deutério e partículas α são aceleradas em trajetórias circulares, sob vácuo, por meio de um campo eletromagnético. Essas partículas aceleradas podem ter desde poucos kiloelétrons-volts (keV) até vários bilhões de elétrons-volts de energia dependendo do projeto e tipo do ciclotron. Sabendo-se que as partículas carregadas movem-se ao longo de uma trajetória circular sob o campo eletromagnético aumentando sua energia gradualmente, quanto maior o raio da trajetória da partícula maior a sua energia. Quando o alvo, composto por elementos estáveis é irradiado por partículas carregadas ocorrem as reações nucleares. A partícula incidente pode deixar o núcleo após a interação, depositando ali parte de sua energia, ou pode ser completamente absorvida por ele dependendo da energia da partícula incidente. Em ambos os casos, é formado um núcleo excitado e a energia de excitação é liberada pela emissão de nucleons (prótons e nêutrons) seguido de emissão de raios γ . Dependendo da energia depositada pela partícula incidente, um número de nucleons é emitido de forma aleatória do núcleo alvo irradiado levando à formação de uma grande variedade de núclídeos. Os radionuclídeos produzidos em ciclotrons são, normalmente, deficientes de nêutrons e, portanto, decaem por emissão de pósitrons ou por captura eletrônica. Exemplos de radionuclídeos produzidos no ciclotron são o ^{67}Ga , ^{111}In , ^{201}Tl , ^{18}F , etc (SAHA, 2004).

Outra grande variedade de radionuclídeos é produzida no reator nuclear por dois tipos de interações diferentes: a fissão nuclear e a ativação nêutônica. O reator nuclear é composto por barras de combustível que contem átomos de grande porte, como o urânio-235, urânio-238 e plutônio-239 os quais são inerentemente instáveis. Esses átomos são capazes de sofrer fissão, que é a quebra de núcleos pesados em dois fragmentos de massas aproximadamente iguais. Os produtos de fissão podem ter número atômico de 28 até, aproximadamente 65. Com a fissão, são liberados de dois a três nêutrons acompanhados de uma quantidade de, aproximadamente, 200 milhões de elétrons-volts (MeV) de energia térmica. Os nêutrons emitidos em cada fissão podem causar a fissão de outros núcleos fissionáveis da barra de combustível desde que existam condições adequadas para tal. Desta forma, inicia-se uma reação em cadeia que deverá ser controlada removendo-se os nêutrons por meio da inserção de barras de controle compostas por cádmio, que é um excelente absorvedor de nêutrons térmicos. Como exemplos de produtos de fissão do urânio-235 que possuem grande aplicação médica estão o ^{131}I e o ^{99}Mo , produzidos conforme as reações nucleares abaixo (SAHA, 2004; POWSNER e POWSNER, 2006):



Na ativação neutrônica ou reação (n, γ) o núcleo alvo captura um nêutron livre no reator e emite raios γ produzindo um isótopo deste elemento. O radioisótopo produzido, geralmente, é rico em nêutrons decaindo, portanto, por emissão de partículas β^- . Alguns exemplos de reações de ativação neutrônica são:



O ${}^{99}\text{Mo}$ tem uma grande importância dentro da medicina nuclear pois através de um sistema de separação por decaimento conhecido como gerador, dá origem ao ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$ que é muito utilizado na marcação de radiofármacos. O radioisótopo ${}^{99}\text{Mo}$ possui meia-vida física de 66 horas e decai por emissão de partículas β^- , sendo que 87,6% do seu decaimento dá origem ao ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$ e o restante (13%) ao isótopo ${}^{99}\text{Tc}$ (Anexo 1) - (SAHA, 2004; POWSNER e POWSNER, 2006; BÉ *et al.*, 2004).

2.3 O elemento Tecnécio

O Tecnécio (Tc) é um elemento químico artificial, com número atômico 43, localizado na coluna VIIB da tabela periódica que foi descoberto em 1937 por Carlo Perrier e Emilio Segrè. Ele pode existir em oito estados de oxidação, variando de -1 a +7, sendo que a estabilidade desses estados de transição depende do tipo de ligação e do ambiente químico. Os estados +7 e +4 são mais estáveis e são representados em óxidos, sulfetos, haletos e pertecnetatos (MAZZI, 2007; DEWANJEE, 1990; SAHA, 2004).

Mais de 80% dos radiofármacos utilizados em medicina nuclear são compostos marcados com o isótopo ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$. As razões para esta posição de destaque do ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$ no uso clínico são as suas características físicas e químicas altamente favoráveis. A meia-vida física de 6,01 horas do ${}^{99\text{m}}\text{Tc}$ e a pequena taxa de emissão de elétrons (aproximadamente 10% de sua transição é via conversão interna) permitem a administração de doses suficientes para que

muitos fótons estejam presentes durante a aquisição dos exames, gerando imagens bem definidas em um espaço de tempo relativamente curto. Além disso, o isótopo ^{99m}Tc decai para ^{99}Tc por transição isomérica, emitindo um único fóton γ de energia equivalente a 140 keV que pode ser facilmente colimado, gerando imagens com uma resolução espacial superior (Anexo 1). Por sua vez, o ^{99}Tc possui uma meia-vida física de $2,1 \times 10^5$ anos e decai para o rutênio-99, estável, por emissão β^- (SAHA, 2004; JONES, 1995).

Com a utilização do ^{99m}Tc , a dose de radiação absorvida pelo paciente é baixa, resultando em doses efetivas menores do que 50 mSv que apresentam risco considerado baixo (STANFORD DOSIMETRY, LCC; JONES, 1995).

O radioisótopo ^{99m}Tc pode ser obtido em uma solução estéril, livre de pirogênio e livre de carreadores a partir de um gerador de molibdênio-99-tecnécio-99m ($^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$) - (Figura 1). Este é um sistema separador constituído por uma coluna de vidro contendo material adsorvente como o óxido de alumínio (Al_2O_3) tratando-se de uma resina de troca iônica. Nesta resina, o radionuclídeo pai (^{99}Mo) e o produto do seu decaimento, o radionuclídeo filho (^{99m}Tc), encontram-se ligados como ânions ao Al^{3+} , porém, o ^{99}Mo mostra-se mais fortemente fixado à resina (SAHA, 2004; ZOLLE, 2007). Para a eluição do gerador, utiliza-se solução estéril de cloreto de sódio a 0,9% (p/v). Devido às consideráveis diferenças de afinidade pela coluna, o ânion pertecnetato (TcO_4^-) pode ser substituído pelos ânions cloreto (Cl^-) da salina fazendo a extração do ^{99m}Tc sob a forma de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$), ou seja, no seu estado de oxidação mais alto (+7), não sendo capaz de ligar-se a agentes quelantes (DEUTSCH, 1983; ZOLLE, 2007). Assim, torna-se necessário a redução do ^{99m}Tc , do estado +7 para um estado de oxidação menor. O cloreto de estanho II diidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) é o agente redutor mais comumente utilizado na preparação de compostos ligados ao ^{99m}Tc . O ^{99m}Tc reduzido é uma espécie quimicamente reativa e combina com uma grande variedade de agentes quelantes. O agente quelante geralmente é doador de elétrons e forma uma ligação covalente coordenada com o ^{99m}Tc reduzido (MAZZI, 2007; SAHA, 2004).

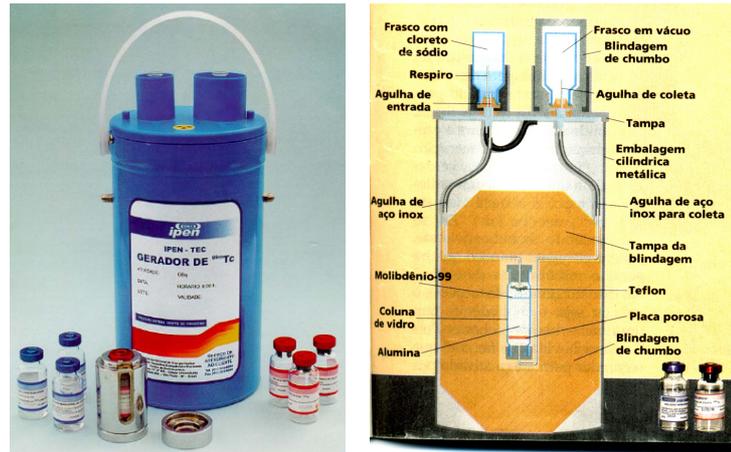


Figura 1. Gerador de molibdênio-99/tecnécio-99m (Fonte: IPEN)

2.4 Radiofármacos convencionais utilizados para o diagnóstico de processos inflamatórios

A medicina nuclear é conhecida por sua alta sensibilidade e, atualmente, dispõe de técnicas que são capazes de revelar a presença de inflamação em várias condições patológicas. Entretanto, a sensibilidade e a especificidade das diferentes técnicas variam em função da doença e seus efeitos fisiopatológicos, fazendo com que os radiofármacos apresentem diferentes acurácias de diagnóstico (CHIANELLI *et al.*, 1997).

2.4.1 Citrato de ^{67}Ga

Desde o seu uso pela primeira vez em 1969 no diagnóstico da doença de Hodgkin, o citrato de ^{67}Ga tem sido utilizado em várias condições patológicas, incluindo inflamações, infecções e algumas desordens do esqueleto. O mecanismo preciso pelo qual o ^{67}Ga acumula-se nos tecidos normais e patológicos não é completamente conhecido. Entretanto, sabe-se que o ^{67}Ga , por ser um análogo do ferro, liga-se a transferrina circulante na forma iônica e tem acesso às células por meio dos receptores de transferrina. No tecido inflamado, o ^{67}Ga é transferido à lactoferrina que é localmente excretada pelos leucócitos ou por sideróforos liberados por microrganismos (CHIANELLI *et al.*, 1997; BLEEKER-ROVERS *et al.*, 2007).

A fixação fisiológica deste radiofármaco ocorre no fígado, baço, medula óssea e intestinos. Embora a técnica que utiliza o ^{67}Ga tenha uma alta sensibilidade e baixo custo, ela

apresenta deficiências que limitam sua aplicação clínica. A especificidade da técnica é baixa devido à excreção fisiológica tanto pelo trato urinário quanto por via intestinal. As suas características físicas são desfavoráveis: apresenta uma longa meia-vida física (78,3 h), decaindo em sua totalidade por captura eletrônica para níveis excitados de alta energia (887,7 keV, 393,5 keV, 184,6 keV e 93,3 keV) e para o estado fundamental do zinco-67 (Anexo 2) - (BÉ *et al.*, 2004).

Além disso, segundo Boerman e colaboradores (2001), a obtenção de imagens de maior contraste órgão alvo/radiação de fundo requer um tempo de espera de 72 horas após a administração do radiofármaco. Todas estas características desfavoráveis aliadas ao desenvolvimento de novos radiofármacos têm resultado na substituição da cintilografia com citrato de ^{67}Ga na maioria das condições inflamatórias pela cintilografia com leucócitos radiomarcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ou ^{111}In (CORSTENS e VAN DER MEER, 1999; DATZ, 1994). Por sua vez, o uso da técnica de leucócitos radiomarcados tem valor limitado em pacientes com suspeita de osteomielite vertebral, logo, a utilização do citrato de ^{67}Ga nessa condição parece ser a melhor opção. Da mesma forma, em pacientes imunocomprometidos o ^{67}Ga é o agente de escolha para detectar infecções oportunistas do trato respiratório (BLEEKER-ROVERS *et al.*, 2007).

2.4.2 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Imunoglobulina humana policlonal ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IgG)

Estudos mostraram que a imunoglobulina G (IgG) radiomarcada acumula-se nos focos inflamatórios/infecciosos por extravasamento não específico devido a maior permeabilidade vascular no local. A IgG pode ser marcada com ^{111}In ou $^{99\text{m}}\text{Tc}$, apresentando captação fisiológica no fígado, baço e rins. A desvantagem deste método é a longa permanência no organismo, apresentando lenta depuração com altas doses de radiação ao paciente. Além disso, necessita-se de longo tempo entre a administração do material e a obtenção da imagem (RENNEN *et al.*, 2001; BOERMAN *et al.*, 2001; BLEEKER-ROVERS *et al.*, 2007).

2.4.3 Leucócitos radiomarcados

Em 1976, McAfee e Thakur descreveram seus estudos com um quelato lipofílico, a oxima, que forma um complexo lipofílico com o ^{111}In capaz de atravessar livremente a membrana celular. No interior da célula, o complexo ^{111}In -oxima dissocia-se e o ^{111}In liga-se de forma

irreversível a componentes citoplasmáticos, não sendo liberado com o tempo. As células radiomarcadas com ^{111}In mantêm suas funções fisiológicas e o marcador permanece estável por tempo suficiente para a realização de imagens cintilográficas. O ^{111}In possui meia-vida física de 67 horas, o que permite a aquisição de imagens tardias de 24 a 48 horas (CHIANELLI *et al.*, 1997). O seu decaimento dá-se em quase sua totalidade (> 99,99%) por captura eletrônica via estado excitado de energia de 416,6 keV do cádmio-111 que, por sua vez, desexcita-se emitindo fótons gama de 150 keV, 173 keV e 247 keV, atingindo o seu estado fundamental de energia (Anexo 3) – (BÉ *et al.*, 2004)

Por outro lado, o decaimento do ^{111}In implica em altas doses de radiação para a célula e para o paciente (SIGNORE *et al.*, 2002). Portanto, com o objetivo de radioproteção, deve-se empregar uma baixa atividade radioativa (3,7 a 18,5 MBq). Isto faz com que o tempo de aquisição das imagens seja longo para que se tenha uma imagem de boa qualidade (ENGRONYAT *et al.*, 2005).

Em 1986, Peters e colaboradores descreveram a marcação de leucócitos com o complexo lipofílico hexametilpropileno amino oxima marcado com tecnécio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO). O $^{99\text{m}}\text{Tc}$ possui ótimas características físicas para a obtenção de imagens cintilográficas: seu decaimento é por emissão de fóton γ de 140 keV e sua meia-vida física é de 6 horas. Portanto, o estudo com leucócitos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO envolve baixas doses de radiação e permite a aquisição de imagens cintilográficas de boa qualidade (CHIANELLI *et al.*, 1997).

Devido ao seu caráter lipofílico e a ausência de carga, o complexo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO penetra na membrana celular permanecendo no interior da célula por um determinado tempo (ENGRONYAT *et al.*, 2005). Entretanto, os leucócitos radiomarcados com HMPAO não são estáveis porque o complexo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO é liberado da célula em uma proporção de 7% por hora, sendo que o complexo liberado volta para a corrente sanguínea e é excretado através dos rins e intestino (SIGNORE *et al.*, 2002).

Em 1993, Arndt e colaboradores realizaram um estudo comparativo entre o uso de leucócitos marcados com ^{111}In e com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ para avaliação das doenças inflamatórias do intestino (DII). Eles mostraram que a imagem realizada com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO-leucócitos pode substituir a cintilografia com células marcadas com ^{111}In para a identificação da presença e localização da atividade inflamatória em pacientes com DII. O $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO-leucócitos é

superior em relação ao ^{111}In -leucócitos, por ser mais sensível na detecção da inflamação, especialmente se o intestino delgado está envolvido. Possui também outras vantagens como maior disponibilidade, menor dose de radiação para o paciente e a separação das células é mais simples sendo feita em menor tempo (ARNDT *et al.*, 1993).

Estudos mostraram que o método dos leucócitos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO apresenta uma especificidade de 100% e uma sensibilidade maior do que 95% para imagens de focos inflamatórios ou infecciosos. O mecanismo de captação dos leucócitos é por quimiotaxia e, portanto, representa um indicador específico para infiltração leucocítica, mas não para infecção. Em virtude dos excelentes resultados obtidos com o uso dos leucócitos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO, essa técnica é considerada em medicina nuclear, “padrão ouro” para imagens de inflamação e infecção (CARDOSO *et al.*, 2002; MARTIN-COMIN e PRATS, 1999).

Dentre as principais indicações dos leucócitos radiomarcados estão as DII, osteomielites, acompanhamento de pacientes com infecções vasculares ou próteses ortopédicas e infecções de tecidos moles (BLEEKER-ROVERS *et al.*, 2007).

Arndt e colaboradores, em 1997, demonstraram que a cintilografia com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO-leucócitos foi melhor do que o índice de atividade de Van Hees e do que os parâmetros laboratoriais para a avaliação da atividade inflamatória de doenças intestinais. Os estudos realizados por Mota e colaboradores (2010) mostraram que a cintilografia com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO-leucócitos representa uma importante ferramenta na avaliação da atividade inflamatória da doença de Crohn mesmo na ausência de sinais e/ou sintomas clínicos.

Os leucócitos radiomarcados oferecem uma boa acurácia diagnóstica, entretanto, a preparação desse radiofármaco é bastante laboriosa: o isolamento e a marcação das células sanguíneas depende um tempo de, aproximadamente, 3 horas. Por sua vez, a necessidade de manipular sangue potencialmente contaminado pode resultar em transmissão de patógenos veiculados pelo sangue, como vírus da hepatite e vírus da imunodeficiência adquirida, principalmente, para o manipulador (BLEEKER-ROVERS *et al.*, 2007).

As limitações desses radiofármacos convencionais têm estimulado a pesquisa de novos agentes para o diagnóstico de inflamação ou infecção visando evitar a manipulação de

sangue potencialmente infectado, usar moléculas pequenas com rápida depuração de forma a permitir uma resposta rápida, desenvolver agentes que interajam com receptores, agentes que permitem a distinção entre inflamação asséptica de infecção, agentes que permitam a distinção entre processos agudos de crônicos e, preferencialmente, utilizar agentes marcados com ^{99m}Tc . Dentre esses novos radiotraçadores não específicos para imagens de inflamação/infecção encontram-se os lipossomas radiomarcados. A sua localização no foco inflamatório resulta da maior permeabilidade vascular no local e não de uma interação específica entre o radiotraçador e um componente do foco inflamatório, como ocorre com o uso dos leucócitos, logo, os lipossomas são caracterizados como radiotraçadores não específicos (RENNEN *et al.*, 2001).

3 LIPOSSOMAS

Lipossomas são sistemas lipídicos dispersos constituídos freqüentemente por fosfolípides, os quais em meio aquoso se organizam espontaneamente em bicamadas formando vesículas esféricas. Essas bicamadas circundam uma cavidade aquosa interna e se encontram envolvidas por um meio aquoso (Figura 2). Considerando que os lipossomas são constituídos por moléculas anfifílicas, os mesmos são capazes de encapsular substâncias hidrofílicas (encapsuladas na cavidade interna), lipofílicas (acomodadas na região apolar da bicamada) e anfifílicas (ao longo de toda a extensão da vesícula). Esses sistemas lipídicos foram descritos, na década de 60, por Bangham e colaboradores (1965) como modelos de membranas biológicas. Em 1971, Gregoriadis e colaboradores, propuseram a utilização de lipossomas como carreadores de fármacos. A partir de então, diversos estudos foram feitos visando verificar as suas potencialidades terapêuticas, tais como carrear quimioterápicos, antibióticos, fungicidas, antígenos e compostos quelantes entre outros (CARVALHO-JÚNIOR *et al.*, 2007_a; FATTAL *et al.*, 1993; ADLER-MOORE e PROFFITT, 1993).

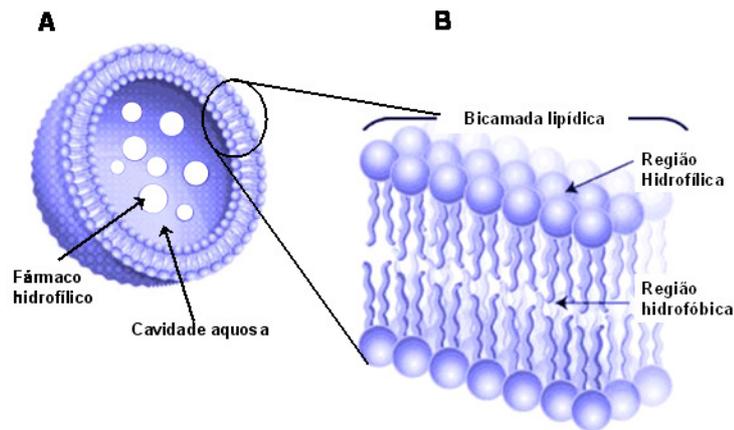


Figura 2. Representação esquemática da estrutura dos lipossomas.

A grande potencialidade terapêutica dos lipossomas deve-se a sua versatilidade estrutural em termos de tamanho, composição lipídica, carga superficial, fluidez da membrana e sua capacidade de incorporar tanto fármacos lipofílicos quanto hidrossolúveis. A membrana lipídica dos lipossomas é capaz de controlar a liberação de moléculas hidrofílicas encapsuladas na cavidade aquosa, por difusão lenta, assim como de moléculas lipofílicas, em função da ação dos líquidos corporais sobre a integridade das membranas (ANSEL *et al.*, 2000).

A administração de lipossomas pode ser realizada por diferentes vias, como a transdérmica, nasal, pulmonar, oral e, principalmente, a via intravenosa. A farmacocinética e a biodistribuição dos lipossomas são influenciadas pela via de administração e por suas características, que incluem o tamanho da vesícula, a composição, a concentração lipídica, a carga superficial e o grau de hidrofilia, e ainda, capacidade de encapsulação do fármaco (BOERMAN *et al.*, 2000; OUSSOREN *et al.*, 1997).

Os lipossomas são classificados de acordo com o diâmetro e número de bicamadas. Os lipossomas que contêm apenas uma bicamada lipídica são denominados unilamelares pequenos (SUV – Small Unilamellar Vesicles), com tamanhos geralmente menores que 100 nm. Aqueles que contêm apenas uma bicamada lipídica com vesículas de tamanho variando entre 100 a 1000 nm são classificados como lipossomas unilamelares grandes (LUV – Large Unilamellar Vesicles). Os lipossomas que possuem mais de uma bicamada lipídica são denominados multilamelares (MLV – Multilamellar Vesicles) e apresentam tamanho superior a 100 nm (NEW, 1990; SAHOO, 2003).

3.1 Lipossomas convencionais e de circulação prolongada

Os lipossomas podem ser classificados em convencionais e de circulação prolongada ou furtivos. Os lipossomas convencionais, quando administrados por via intravenosa, sofrem adsorção de proteínas séricas (opsoninas), ocasionando sua captura pelas células do sistema fagocitário mononuclear (SFM), sobretudo no fígado, baço e medula óssea (tecidos ricos em macrófagos), sendo rapidamente eliminados, limitando a utilização para outros tecidos (ALLEN e HANSEN, 1991; SENIOR e ALVING, 1987; PATEL, 1992; SZEBENI, 1998). Investigações iniciadas na década de 90 foram realizadas com o objetivo de reduzir a captação dos lipossomas convencionais pelas células do SFM e aumentar seu tempo de permanência na circulação. Foi observado que a incorporação, na membrana dos lipossomas, de lipídeos acoplados a polímeros de etilenoglicol (PEG), altera sua interação com o ambiente, sendo o efeito mais importante a redução da captura pelos macrófagos, prolongando a presença na corrente sanguínea. Esses lipossomas denominados lipossomas de circulação prolongada ou furtivos, permitem uma distribuição do fármaco para outros órgãos além daqueles do SFM (FONTES *et al.*, 2005). O metoxiPEG-diestearilfosfatidiletanolamina (mPEG-DSPE) foi o derivado de escolha para a preparação de lipossomas estericamente estabilizados, pois a presença de volumosos grupos hidrofílicos na superfície dos lipossomas parece constituir um obstáculo estérico às proteínas do plasma que podem atuar como opsoninas. Conseqüentemente, os lipossomas ficam protegidos do reconhecimento e destruição pelas células do SFM (KLIBANOV *et al.*, 1990; WOODLE e LASIC, 1992; STORM *et al.*, 1995). Entretanto, estudos demonstraram que a concentração do conjugado PEG na composição da membrana e o tamanho da cadeia do polímero afetam as características de circulação prolongada desses lipossomas (BRADLEY *et al.*, 1998; MARUYAMA *et al.*, 1992). De acordo com Ulrich (2002), concentrações de 5 a 10 % de fosfatidiletanolamina acoplado a PEG (PE-PEG) de massa molecular 1000-2000 Da conferem excelente estabilidade às formulações.

O derivado aminoPEG₂₀₀₀-diestearilfosfatidiletanolamina (aPEG₂₀₀₀-DSPE) é composto pelo PEG com um grupo amino terminal. Nesse derivado, o grupo amino é protonado em meio fisiológico e, assim, é carregado positivamente, resultando em um derivado neutro devido à carga negativa do grupo fosfato do fosfolípide. Contudo, lipossomas contendo aPEG₂₀₀₀-DSPE apresentam superfície positiva. Estudos da biodistribuição de lipossomas contendo esse derivado, realizados em ratos, mostraram que são bem tolerados *in vivo*, sem perda da circulação prolongada e sem desvios significativos na biodistribuição quando

comparados com lipossomas contendo mPEG₂₀₀₀-DSPE (ZALIPSKY *et al.*, 1994). As estruturas químicas do mPEG₂₀₀₀-DSPE e do aPEG₂₀₀₀-DSPE podem ser observadas na Figura 3.

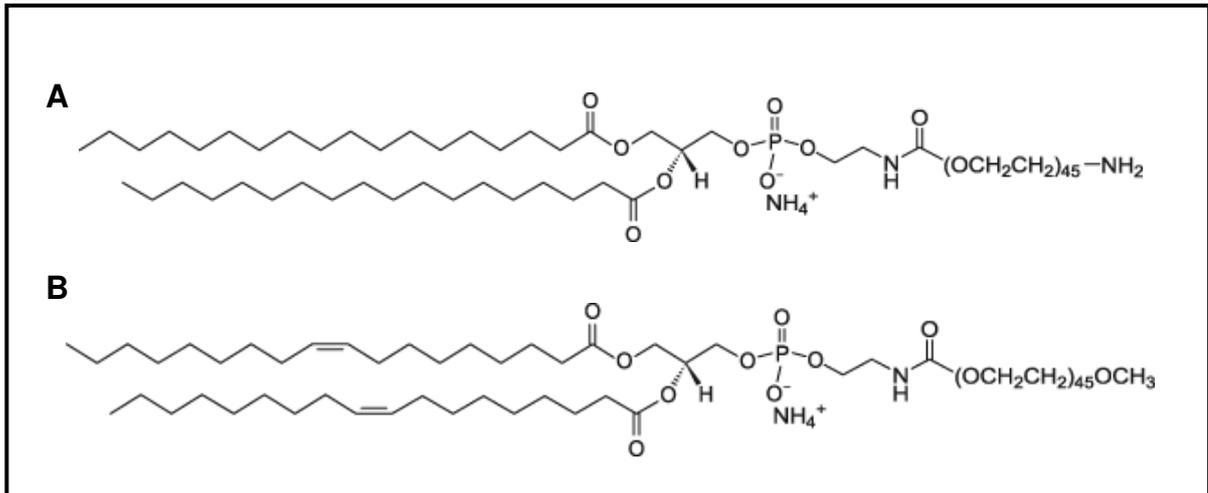


Figura 3. Estruturas químicas do aPEG₂₀₀₀-DSPE (A), mPEG₂₀₀₀-DSPE (B).

Assim, a característica dos lipossomas revestidos com PEG de permanecerem mais tempo na circulação, uma vez que são menos reconhecidos pelo SFM, faz deles um poderoso instrumento para auxiliar no diagnóstico de processos inflamatórios ou infecciosos (BOERMAN *et al.*, 1997; CORSTENS e VAN DER MEER, 1999; CARMO *et al.*, 2007, 2008_a).

3.2 Lipossomas pH-sensíveis

O uso de lipossomas pH-sensíveis como sistemas de liberação de fármacos foi sugerido a partir da observação de que tecidos patológicos (tumores, inflamações e infecções) apresentam um pH menor do que os tecidos normais (GULINO *et al.*, 1967), além do fato de que alguns tipos de vírus desenvolveram estratégias para aproveitar-se da acidificação do meio do lume endossomal para infectar células (SIMÕES *et al.*, 2004).

O princípio básico de lipossomas pH-sensíveis consiste em introduzir na composição de sua bicamada lípidos que são intrinsecamente instáveis, ou seja, que não são capazes de

formar bicamada numa determinada temperatura, conhecida como temperatura de transição de fase hexagonal (T_H). A obtenção da fase lamelar para estes lípides é conseguida pela adição de compostos que são carregados em pH neutro, mas que perdem sua carga em condições onde o pH é ácido e, portanto, a sua capacidade de estabilizar a bicamada (NEW, 1990).

Os lipossomas pH-sensíveis são constituídos por fosfolípides derivados da fosfatidiletanolamina (PE), como por exemplo, a dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE) - (Figura 4). As PE insaturadas, ao contrário da maioria dos fosfolípides, apresentam uma cabeça polar pequena e pouco hidratada, ocupando um volume menor quando comparado ao volume ocupado pelas cadeias alifáticas, dessa forma exibindo uma forma de cone (hexagonal), o que impede a formação da fase lamelar. A formação de lipossomas com estes fosfolípides requer a adição de agentes estabilizantes, normalmente lípides carboxilados, como o hemisuccinato de colesterila (CHEMS), que em pH fisiológico se encontram sob a forma ionizada (Figura 4). Esses estabilizantes são capazes de se inserirem entre as moléculas de fosfolípides, e o aparecimento de repulsões eletrostáticas entre os grupamentos carboxila, presentes no estabilizante, e os grupos fosfato dos fosfolípides favorecem a organização lamelar (Figura 5), possibilitando a formação dos lipossomas. Entretanto, em meios fracamente ácidos tais como aqueles encontrados no lume de endossomas e em alguns tecidos patológicos (tumores, áreas inflamadas ou infectadas) o CHEMS torna-se protonado, resultando na desestabilização das vesículas e a liberação do material encapsulado (DING *et al.*, 2005; DRUMOND *et al.*, 2000; SIMÕES *et al.*, 2004).

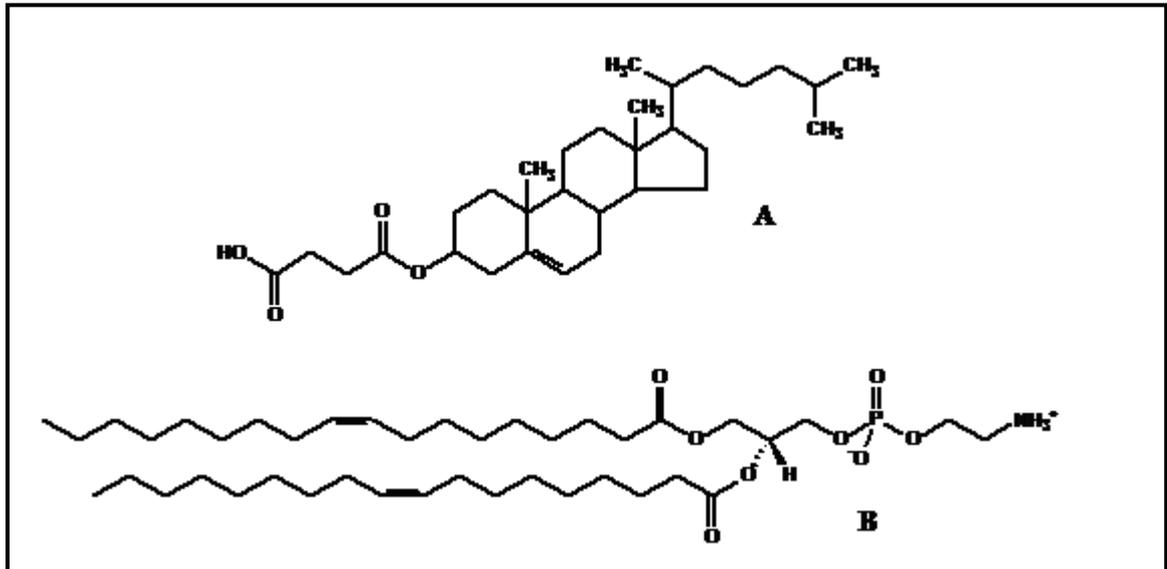


Figura 4. Estruturas químicas do CHEMS (A) e DOPE (B).

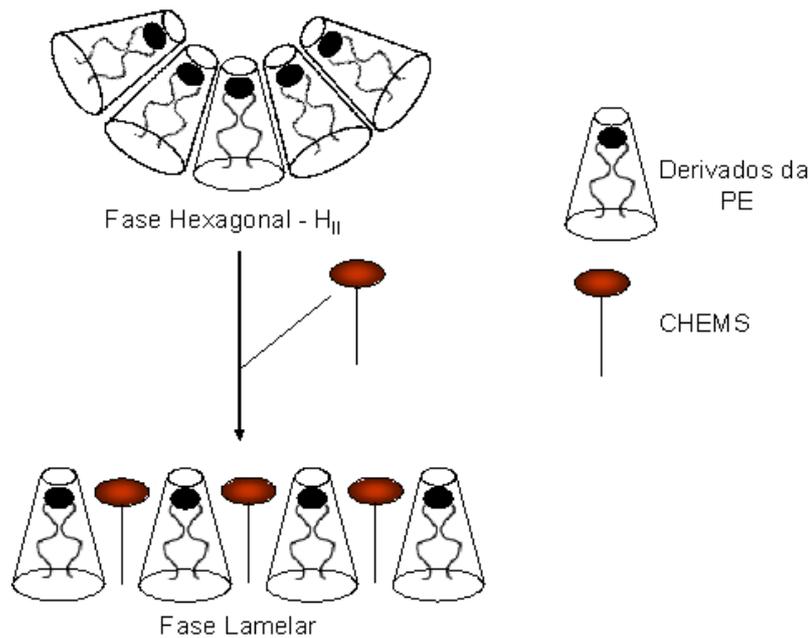


Figura 5. Representação esquemática da organização estrutural de derivados da PE na ausência e na presença de CHEMS.

Embora tenha sido demonstrado que os lipossomas pH-sensíveis compostos de PE são eficientes em liberar diversas moléculas no citoplasma, sua aplicação *in vivo* é limitada devido a sua moderada estabilidade e/ou rápida remoção pelo SFM após administração

intravenosa. Entretanto, estudos têm demonstrado que a inclusão de conjugados lipídicos, como o polietilenoglicol acoplado ao diestearilfosfatidiletanolamina (PEG-DSPE), aumenta a estabilidade *in vivo* de lipossomas pH-sensíveis, proporcionando maior tempo de circulação e, ainda, mantendo suas propriedades de pH-sensibilidade até atingir o tecido alvo (FATTAL *et al.*, 2004; ROUX *et al.*, 2004; SIMÕES *et al.*, 2004; SLEPUSHKIN *et al.*, 1997).

3.3 Propriedades físicas e físico-químicas dos lipossomas

A estabilidade físico-química dos lipossomas é diretamente afetada pelas alterações envolvendo a distribuição populacional das partículas, a lamelaridade, a permeabilidade, a estrutura bilamelar e o volume interno (OLIVEIRA, 1998). Logo, as propriedades e aplicações dos lipossomas dependem das características físicas e físico-químicas de suas membranas.

3.3.1 Transição de fase dos lípides

A fluidez da bicamada, quando constituída de um único tipo de lípide, depende da temperatura de transição de fase (T_m) do estado gel (sólido) para o estado líquido-cristalino (fluido) - (Figura 6). Quando a temperatura do meio é igual a T_m , as cadeias carbônicas dos lípides passam do estado ordenado (sólido) para o estado fluido no qual estas cadeias encontram-se desordenadas e têm grande liberdade de movimento. Portanto, de acordo com a T_m , as membranas lipossomais de diferentes composições podem exibir diferentes níveis de fluidez sob as mesmas condições de temperatura. A permeabilidade da bicamada depende da fluidez da membrana e da natureza do soluto encapsulado. A taxa de permeabilidade mais elevada ocorre na T_m e é menor no estado “gel” em comparação com o estado fluido (FRÉZARD *et al.*, 1999).

Um componente lipídico importante, muito utilizado na composição dos lipossomas, é o colesterol. Por ser uma molécula anfifílica, o colesterol insere-se na membrana com seu grupo hidroxila orientado em direção à superfície aquosa e a cadeia alifática alinhada paralelamente às cadeias dos ácidos graxos, no centro da bicamada. Com isto, pode reduzir ou aumentar a fluidez dos fosfolípidos que compõem a bicamada lipídica. No caso dos fosfolípidos de baixa temperatura de transição de fase gel/fluida, o colesterol reduz a fluidez

da membrana. Já para os fosfolípides de elevada temperatura de transição de fase, na qual não há um livre movimento de moléculas individuais, o colesterol aumenta a fluidez da membrana (RAFFY e TEISSIÉ, 1999; FERREIRA, 2011).

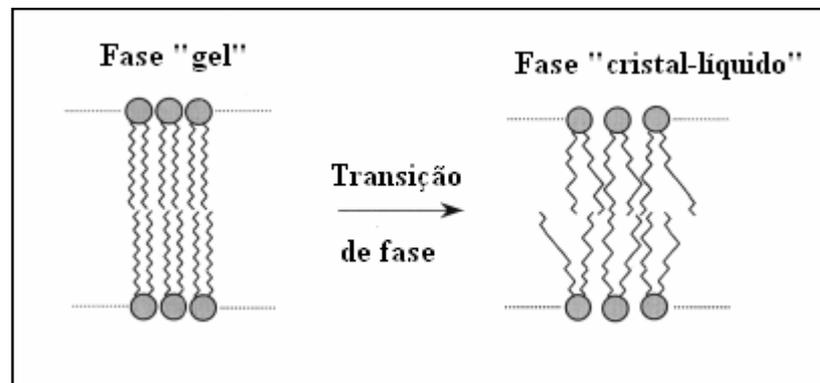


Figura 6. Comportamento de fases das membranas lipídicas (Adaptado de FRÉZARD *et al.*, 2005).

3.3.2 Diâmetro das vesículas

A obtenção de lipossomas com diâmetro reduzido e distribuição homogênea das vesículas é um importante fator para garantia da estabilidade dessa forma farmacêutica. Muitos estudos utilizam lipossomas unilamelares homogêneos com diâmetro compreendido entre 50 e 150 nm. Essa faixa é um meio termo entre a eficiência de encapsulação (aumenta de acordo com o aumento do diâmetro), a estabilidade do lipossoma (diminui com o aumento do diâmetro acima da faixa ótima de 80-200 nm) e capacidade de extravasamento (diminui com o aumento do diâmetro). Estudos realizados por Yuan e colaboradores (1995) mostraram que o diâmetro máximo de lipossomas capazes de extravasarem do lume capilar para o tecido tumoral está entre 400 e 600 nm, pois os lipossomas de 400 nm de diâmetro foram capazes de penetrar no espaço intersticial do tumor enquanto que os de 600 nm permaneceram retidos no espaço extravascular. Logo, tais autores estipularam um diâmetro máximo de 500 nm para que as vesículas sejam capazes de sair da corrente sanguínea e acumularem-se em tecidos patológicos.

São utilizadas diferentes técnicas para análise do diâmetro e distribuição dos lipossomas. Dentre estas estão compreendidas técnicas de espalhamento da luz (BERGER *et al.*, 2001; CASALS *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2006) e microscopia, como microscopia de criofratura (BERGER *et al.*, 2001) e microscopia de força atômica (RUOZI *et al.*, 2005;

RAMACHANDRAN *et al.*, 2006). Neste trabalho foi empregada a técnica denominada espectroscopia de autocorrelação de fótons ou espalhamento dinâmico da luz (*Quasielastic Light Scattering*) na análise do diâmetro das vesículas lipossomais.

A técnica de espectroscopia de autocorrelação de fótons consiste em atravessar determinada amostra com um feixe de laser, de modo que as partículas presentes espalhem a luz. O espalhamento da luz está relacionado ao movimento browniano das partículas de modo que a intensidade da luz espalhada por estas forme um padrão de movimento. Por meio da dispersão da luz, torna-se possível determinar o diâmetro médio das partículas. Partículas menores são capazes de movimentarem mais rapidamente e causam rápidas modificações no espalhamento da luz. Por outro lado, partículas de maior diâmetro, as quais possuem menores coeficientes de difusão, resultam em menores flutuações na intensidade do espalhamento da luz (HASKELL *et al.*, 1998). Esta técnica permite a medida de partículas cujos diâmetros estejam compreendidos na faixa de 1 a 5000 nm (MALVERN INSTRUMENTS, 1996_a).

3.3.3 Potencial zeta

A medida do potencial zeta é uma ferramenta muito útil na detecção da magnitude de interações repulsivas entre as partículas coloidais e é comumente utilizada para avaliar a estabilidade dos colóides (CASALS *et al.*, 2003).

O potencial zeta pode ser definido como a carga existente na fronteira entre a superfície de uma partícula individual e seus íons associados. A carga não pode ser medida diretamente, mas pode-se determinar a grandeza da carga elétrica pelas medidas da mobilidade eletroforética das partículas submetidas à aplicação de um determinado campo elétrico (FLORENCE e ATTWOOD, 2003).

Para a determinação do potencial zeta dos lipossomas foi utilizado um método que consiste na incidência de um feixe de luz e aplicação de um campo elétrico de força conhecida através da amostra. Neste método, as partículas carregadas se deslocam com velocidades distintas induzindo deslocamentos da frequência do feixe de luz incidente, gerando um espectro de frequências. As frequências são então utilizadas para os cálculos das velocidades, as quais são convertidas para valores de mobilidades eletroforéticas e em

seguida os dados são transformados em valores de potencial zeta. (MALVERN INSTRUMENTS, 1996_b).

3.3.4 Teor e eficiência de encapsulação

O teor e a eficiência de encapsulação de uma substância em lipossomas são dois parâmetros importantes que devem ser considerados na escolha do método de preparação. Esses parâmetros podem ser otimizados através da escolha do método de encapsulação e da manipulação da composição lipídica da membrana. É importante a obtenção de altas taxas de encapsulação, particularmente quando o fármaco possui doses elevadas ou quando não é possível o reaproveitamento do fármaco não encapsulado. A relação fármaco/lípide também deverá ser maximizada, visto que determina a quantidade de lípide a ser administrada ao paciente. Assim, quanto menor for a quantidade de lípide veiculada, menores serão os riscos de efeitos colaterais associados aos mesmos (SWARBRICK e BOYLAN, 1994; FRÉZARD *et al.*, 2005).

3.4 Estabilidade física e química dos lipossomas

Para funcionar efetivamente como um vetor de fármacos é importante que os lipossomas mantenham-se suficientemente estáveis por um período de tempo razoável. Esses podem sofrer mudanças tanto físicas quanto químicas durante a estocagem. As mudanças físicas podem ocorrer nas vesículas fosfolípídicas, incluindo agregação e fusão. Já as mudanças químicas incluem hidrólise das ligações éster dos fosfolípides em dispersões aquosas de lipossomas e oxidação dos fosfolípides que contêm ácidos graxos insaturados, bem como a oxidação do colesterol. Todas essas transformações podem causar a perda do material encapsulado (CHOW *et al.*, 1995).

Um dos aspectos mais importantes relacionados à estabilidade física dos lipossomas é a mudança do diâmetro das partículas e de sua distribuição. A agregação e a fusão das vesículas são as principais fontes desta instabilidade. Agregação de lipossomas neutros é causada por interações de Van der Waals e, tende a ser mais pronunciada em vesículas grandes. Embora fatores como resíduos de solventes e traços de elementos possam potencializar esse processo, a formação de agregados de lipossomas é um fenômeno

natural e inevitável para membranas sem carga. A maneira mais simples de contornar essa situação é utilizar lípides carregados na formulação (NEW, 1990). Casals e colaboradores (2003) afirmam que a presença de 25% de lípides carregados confere uma suficiente estabilidade eletrostática que evita a agregação e fusão de vesículas por um período de 3 meses, a 4°C. Outra forma de aumentar a estabilidade dos lipossomas é revesti-los com polímeros hidrofílicos não iônicos, como PEG, o que leva ao aparecimento da repulsão de hidratação caracterizada pela presença de uma barreira estérica que impede a aproximação das vesículas (ULRICH, 2002).

Muitas dispersões de fosfolípides contêm lípides insaturados (cadeias acila) como parte de sua cadeia molecular. Os lípides insaturados sofrem degradação oxidativa ou peroxidação lipídica. Essas reações podem ocorrer durante a preparação, o armazenamento ou no momento do uso. A peroxidação é um processo complexo envolvendo reações radiculares que resultam na formação de peróxidos cíclicos e hidroperóxidos. Essa degradação oxidativa acontece rapidamente se os lípides insaturados não forem protegidos durante a preparação e o armazenamento. Devem ser protegidos pela manutenção em atmosfera de gás inerte, como nitrogênio ou argônio; pela remoção de metais pesados (adição de EDTA) ou pela adição de antioxidantes, como alfa-tocoferol ou butilhidroxitolueno.

A hidrólise dos lípides leva a formação de lisofosfolípides (Figura 7) e ácidos graxos livres. Os lisofosfolípides podem ser posteriormente hidrolisados em glicerofosfocompostos e ácidos graxos. Esses produtos de reação não são capazes de formar lipossomas (NEW, 1990; VEMURI *et al.*, 1995).

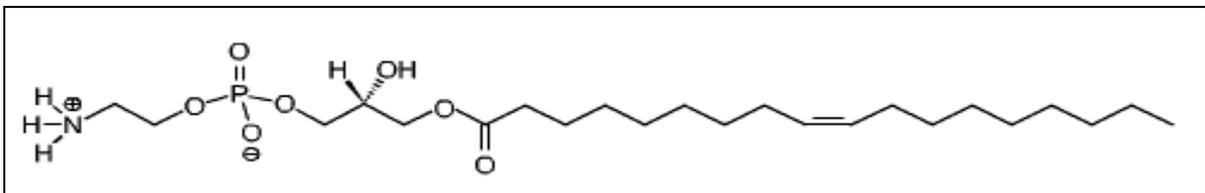


Figura 7. Estrutura química do lisofosfolípide da DOPE (1-oleil 2-hidroxi fosfatidiletanolamina).

3.5 Liofilização

Com o objetivo de aumentar a estabilidade física e química dos lipossomas, o processo de liofilização tem sido utilizado, aumentando dessa forma a vida de prateleira das formulações lipossomais (YANG *et al.*, 2006). Em relação à estabilidade desta forma farmacêutica, a utilização de uma suspensão aquosa como um produto comercial é questionável. Em contraste, uma preparação “seca” para ser hidratada imediatamente antes da sua utilização pode evitar muitos problemas associados com as dispersões aquosas de lipossomas. O processo pode ser aplicado sobre os lípidos ou sobre os lipossomas propriamente ditos (PAYNE *et al.*, 1986).

Liofilização é o processo empregado na desidratação de substâncias extremamente sensíveis ao calor. Nesse processo, a solução ou suspensão líquida é inicialmente congelada; em seguida, a pressão sobre a matéria congelada é reduzida e, por fim, a água é removida por sublimação (AULTON, 2005). O processo de liofilização envolve 3 estágios: (i) congelamento da suspensão lipossomal; (ii) secagem primária (perda de água por sublimação até 0,5 %) e (iii) secagem secundária (remoção da água residual e obtenção de pó seco poroso) (MOHAMMED *et al.*, 2006; AULTON, 2005).

3.6 Crioproteção

Como dito anteriormente, a liofilização é bastante utilizada para prolongar a vida de prateleira dos lipossomas. Entretanto, tanto o congelamento quanto a secagem podem induzir a danos, resultando no aparecimento de fenômenos relacionados à agregação e/ou fusão das vesículas. Os lipossomas podem ter seu diâmetro alterado durante a liofilização e/ou durante a subsequente reidratação se estabilizantes apropriados não forem empregados (MOHAMMED *et al.*, 2006). Assim sendo, para promover estabilidade física durante o processo de liofilização, agentes crioprotetores como açúcares (por exemplo: sacarose, trealose e glicose) e seus derivados são utilizados. Aminoácidos também têm sido estudados quanto a sua capacidade crioprotetora (MOHAMMED *et al.*, 2007).

A partir da observação da capacidade de muitos organismos sobreviverem à completa desidratação, em estado de anidrobiose, os pesquisadores descobriram que essa sobrevivência é possibilitada pela presença de grande quantidade de dissacarídeos

sintetizados durante o processo de perda de água. O mecanismo preciso sobre o qual os açúcares agem estabilizando os sistemas biológicos, durante a liofilização, permanece como assunto de debate. Entretanto, duas hipóteses têm sido propostas, uma delas é o modelo de substituição da água e a outra o modelo de vitrificação.

A hipótese de substituição da água foi proposta por Crowe e colaboradores (1988, 1996_a) no qual os açúcares inserem-se entre as porções polares do fosfolípide no estado seco, levando à formação de ligações de hidrogênio (Figura 8). Na ausência de crioprotetor, após o congelamento seguido de liofilização, a camada de água deixa de existir tornando a bicamada mais compacta, porém, com possíveis defeitos devido à ausência do crioprotetor. Conseqüentemente, após a reidratação, os defeitos da bicamada podem causar, por exemplo, a liberação do material encapsulado ou a formação de vesículas com maior diâmetro (Figura 9A). Por outro lado, na presença de crioprotetor, as moléculas de água são gradualmente substituídas pelo crioprotetor e a interação entre o açúcar e os fosfolípides mantém o espaçamento das cabeças polares dos fosfolípides reduzindo as interações de Van der Waals entre as porções polar e apolar dos fosfolípides, no estado seco. As interações levam a uma redução da T_m e, finalmente, o liofilizado pode ser reconstituído por reidratação (Figura 9B). São formadas múltiplas pontes de hidrogênio entre os açúcares e a porção polar dos fosfolípides na superfície da bicamada podendo os açúcares interagir com até 3 tipos diferentes de lipídeos, simultaneamente. (CHEN *et al.*, 2010). Essas interações entre os açúcares e os fosfolípides permitem a manutenção do estado físico das membranas no estado seco de forma similar à existente no estado hidratado (VAN WINDEN *et al.*, 1997).

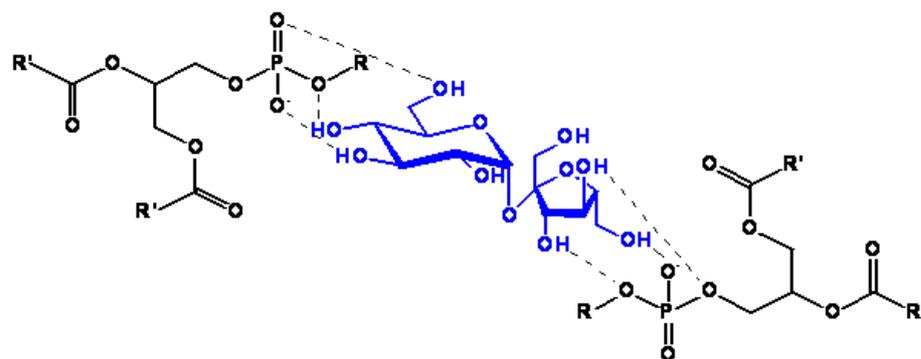


Figura 8. Representação esquemática da interação fosfolípide-açúcar.

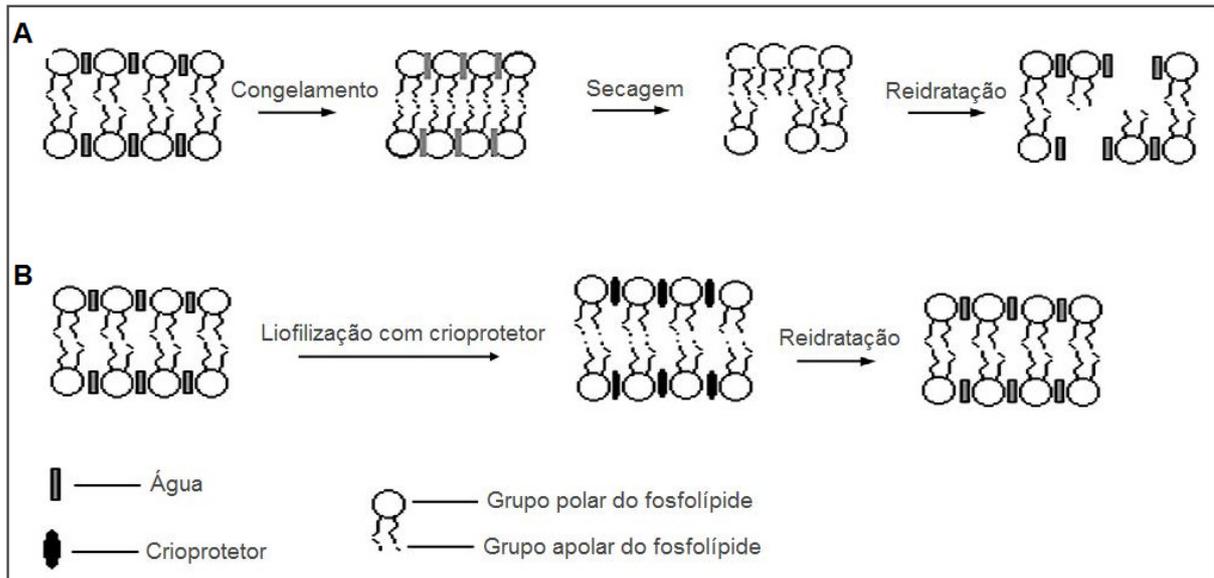


Figura 9. Mecanismo de substituição da água durante a liofilização seguida de reidratação. (A) Liofilização sem o uso de crioprotetor; (B) Liofilização com o uso de crioprotetor. (Adaptado de CHEN *et al.*, 2010).

Koster e colaboradores (1994) propuseram a outra hipótese de crioproteção, o modelo de vitrificação. Esta é baseada no efeito repulsivo causado pelas moléculas de água que hidratam as membranas fosfolipídicas. Durante a secagem, quando ocorre uma redução das forças de repulsão, gera-se um aumento do estresse compressivo entre as membranas. A adição de açúcares (crioprotetores) causa um aumento da pressão osmótica do meio e, portanto, uma reduzida remoção das moléculas de água da interface das membranas. Sendo assim, observa-se uma redução do estresse de compressão entre as últimas. Uma redução mais efetiva desse estresse é observada quando os açúcares não se cristalizam, ou seja, permanecem no estado vítreo durante a secagem. Sugere-se que a resistência mecânica oferecida pelo açúcar no estado vítreo dificulte a redução da distância espacial entre as membranas sob condições de estresse compressivo, evitando, portanto, a fusão das mesmas (KOSTER *et al.*, 2000). Crowe e colaboradores (1996_b) provaram que os dois mecanismos acima não são mutuamente exclusivos e ambos são necessários durante o processo de liofilização.

3.7 Lipossomas radiomarcados no diagnóstico de inflamação

A marcação radioativa dos lipossomas pode acontecer pela simples adição do radionuclídeo de escolha no meio aquoso que é usado para hidratar os lípidos. Entretanto, uma pequena

fração do radiomarcador é incorporada na fase aquosa interna, levando a uma baixa eficiência de marcação (menor que 10%). Trata-se de um método considerado laborioso, pois requer a preparação de novos lipossomas em todos os experimentos (TORCHILIN e TRUBETSKOY, 1995).

Diante disso, novas estratégias para marcar lipossomas pré-formados com mais eficiência foram desenvolvidas ao longo do tempo. Em geral, os métodos de marcação consistem em acoplar o radiomarcador na bicamada lipídica, diretamente na superfície ou através de um agente quelante. Outra maneira é o transporte do radionuclídeo através da bicamada lipídica, consistindo na encapsulação do mesmo na fase aquosa dos lipossomas. O primeiro método foi realizado pioneiramente por Morgan e colaboradores (1981), por meio da redução do NaTcO_4 com cloreto estanoso e seu acoplamento na superfície da bicamada. Porém, em estudos com animais, essas preparações lipossomais radiomarcadas apresentaram alta captação nos rins e bexiga, o que sugere uma extensa liberação *in vivo* do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ dos lipossomas. Outros pesquisadores confirmaram tal instabilidade dos lipossomas radiomarcados por esse método (AHKONG e TILCOCK, 1992; LOVE *et al.*, 1989).

O outro método de marcação de lipossomas consiste em encapsular o radionuclídeo no espaço interno aquoso de lipossomas pré-formados, sendo que, o radionuclídeo deve estar na forma lipofílica conseguindo, assim, permear através da bicamada lipídica. Em 1992, Phillips e colaboradores desenvolveram outra técnica para marcar lipossomas com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ utilizando o quelante lipofílico HMPAO, formando o complexo $^{99\text{m}}\text{Tc-HMPAO}$ capaz de atravessar a bicamada dos lipossomas pré-formados. Estes possuíam glutatona na sua cavidade aquosa, substância que é capaz de reduzir o $^{99\text{m}}\text{Tc-HMPAO}$ para a sua forma hidrofílica fazendo com que o complexo fique retido no interior das vesículas lipídicas. Esse método mostrou-se reprodutível e com alta eficiência de marcação, em torno de 85%.

Os estudos utilizando lipossomas como veículos para imagem de inflamação e/ou infecção iniciaram há mais de 20 anos. As primeiras investigações foram realizadas por Morgan e colaboradores (1981) em ratos infectados com *S. aureus*, utilizando lipossomas convencionais unilamelares aniônicos, catiônicos e neutros marcados pelo método do cloreto estanoso. Eles observaram uma significativa captação dos lipossomas aniônicos na área infectada quando comparada com a área não afetada, enquanto os lipossomas catiônicos e neutros não apresentaram a mesma captação.

Bakker-Woudenberg e colaboradores (1992) estudaram a biodistribuição de lipossomas, com diferentes composições lipídicas, em modelos de ratos com pneumonia unilateral causada por *Klebsiella pneumoniae*. Os experimentos proporcionaram a compreensão das características lipossomais que facilitam a sua captação pelos tecidos infectados. Os lipossomas de circulação prolongada apresentaram uma captação 10 vezes maior do que os lipossomas convencionais. Tem sido sugerido que esses lipossomas apresentam amplo extravasamento em focos infecciosos e inflamatórios devido ao aumento da permeabilidade vascular nessas regiões. Uma possível explicação para o fato dos lipossomas ficarem retidos nesses sítios pode ser a de que as vesículas lipídicas sejam fagocitadas pelos leucócitos presentes na área afetada, mantendo-os no local (ERDOGAN *et al.*, 2000; GOINS *et al.*, 1993).

Para que um sítio inflamado ou infeccioso possa ser diagnosticado pela cintilografia é necessário que nestas regiões haja uma quantidade de radioatividade acima da atividade da radiação de fundo dos tecidos normais. Em geral, deve-se ter uma relação alvo/não alvo de, pelo menos, 1,5 para permitir a identificação de uma lesão por imagem cintilográfica. Lipossomas com vida média plasmática em torno de 4 horas têm sido sugeridos como carreadores de agentes de imagem para focos de inflamação. Esse tempo seria suficiente para que os lipossomas se acumulassem no sítio inflamatório e para que ocorresse a depuração sanguínea, resultando em imagens mais nítidas das lesões (PHILLIPS, 1999).

Boerman e colaboradores (1997) estudaram o efeito do diâmetro e do tempo de circulação dos lipossomas furtivos marcados com ^{99m}Tc para imagens de focos inflamatórios utilizando vesículas de diferentes diâmetros (90, 120, 150 e 180 nm) injetados em ratos infectados na pata com *S. aureus*. As imagens obtidas com as diferentes preparações mostraram que os lipossomas de circulação prolongada de menor diâmetro apresentaram uma ótima captação no sítio infeccioso.

Carmo e colaboradores realizaram estudos para a identificação de focos inflamatórios (2008_a) e infecciosos (2007) utilizando lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada (SpHL), pré-formados, marcados com ^{99m}Tc -HMPAO. Os resultados mostraram uma relação alvo/não alvo maior que 5 no sítio inflamatório, 2 horas após a injeção dos lipossomas, atingindo um valor máximo de 10,4 no tempo de 8 horas após a injeção. Para o processo infeccioso, provocado por injeção de *S. aureus* no músculo da pata de camundongos, os lipossomas radiomarcados permaneceram significativamente retidos no

local do abscesso quando comparados com o respectivo controle. O abscesso foi visualizado muito precocemente, no tempo de 30 minutos após a injeção dos lipossomas marcados com ^{99m}Tc -HMPAO, tornando-se mais proeminente com o tempo.

Kirby e Gregoriadis (1984) desenvolveram um método capaz de encapsular uma grande variedade de materiais em lipossomas com composição lipídica variável, com alta eficiência e utilizando condições relativamente simples. O procedimento, baseado no uso de desidratação e reidratação das vesículas (DRV) para induzir a fusão de lipossomas pré-formados é simples de ser feito podendo ser realizado em grande escala. Esse método consiste em liofilizar os lipossomas SUV (desidratação) e, posteriormente, reidratá-los com uma solução do material a ser encapsulado. O mecanismo que define os eventos durante o processo de desidratação/reidratação foi proposto por Deamer e Barchfield (1982): as vesículas tornam-se mais concentradas durante a desidratação, achatam-se e fundem-se umas às outras, formando uma camada multilamelar. Com a hidratação, vesículas maiores são formadas e 95% das vesículas alcançam diâmetros menores que 1 μm após a reidratação. Porém, o tamanho das vesículas na escala de micrômetros inviabiliza o método, pois como citado anteriormente, vesículas menores são requeridas para estudos *in vivo*. Zadi e Gregoriadis (2000) propuseram uma modificação nesse método, onde a desidratação é realizada na presença de açúcares (glicose ou sacarose) seguida de reidratação controlada com o material a ser encapsulado. Os resultados obtidos mostraram uma redução drástica no diâmetro das vesículas (90 a 200 nm) e o percentual de encapsulação permaneceu elevado (> 87%).

No presente trabalho, o método de DRV com as modificações sugeridas por Zadi e Gregoriadis foi empregado para o procedimento de encapsulação dos radiofármacos nos SpHL.

4 MODELO EXPERIMENTAL DE INFLAMAÇÃO

A indução de processos inflamatórios no músculo da coxa constitui um modelo experimental de inflamação/infecção amplamente utilizado devido a sua reprodutibilidade, fácil e rápida execução além de ser aplicável a diferentes espécies de animais como camundongos, ratos e coelhos (OYEN *et al.*, 2001).

O modelo de inflamação asséptica, frequentemente utilizado, é o induzido pela carragenina na pata de diferentes espécies de animais como camundongos, ratos e coelhos. Esse modelo foi originalmente proposto por Winter e colaboradores (1962) para a indução de edema de patas de ratos. A carragenina, um polissacarídeo sulfatado presente em várias espécies de algas vermelhas do gênero *Rhodophyceae* é pouco absorvida após administração subcutânea e induz resposta inflamatória local, cuja extensão apresenta várias fases no desenvolvimento do edema, com diversos mediadores envolvidos em cada fase. À medida que a resposta se desenvolve, várias substâncias são produzidas e liberadas no sítio inflamatório (DI ROSA, 1972; VINEGAR *et al.*, 1987). Leucócitos polimorfonucleares é o tipo de célula predominante no infiltrado dentro das primeiras 12 horas após a injeção da carragenina. Posteriormente, essas células desaparecem e são substituídas por células mononucleares, as quais se diferenciam em macrófagos que predominam até 48 horas após a indução. Tais células inflamatórias sintetizam e liberam vários mediadores de inflamação, dentre os quais estão o sistema de calicreína-cinina e as prostaglandinas, que são responsáveis pelo controle da migração de neutrófilos para o sítio inflamatório (TAKESHITA *et al.*, 2004).

Já o Zimosan, um polissacarídeo insolúvel componente da parede celular do *Saccharomyces cerevisiae*, é também comumente utilizado para a indução de focos inflamatórios. Como a carragenina, o Zimosan também promove a migração de células fagocitárias, sendo que os neutrófilos são predominantes 12 horas após a injeção, com predomínio dos macrófagos em estágios mais tardios. Apesar da similaridade quanto ao tipo de leucócitos presentes no sítio inflamatório, o mecanismo que promove a neutrofilia é diferente entre o Zimosan e a carragenina. Em resposta ao Zimosan, a histamina, o fator ativador de plaquetas (PAF), o sistema de complemento e os leucotrienos são os principais mediadores responsáveis pelo influxo celular no foco inflamatório, excluindo as prostaglandinas. Os estudos realizados por Takeshita e colaboradores (2004) evidenciaram que a injeção de Zimosan levou a um aumento de duas vezes na contagem de neutrófilos na corrente sanguínea, 2 horas após a injeção do agente pró-inflamatório. Paralelamente, o número de neutrófilos na medula óssea diminuiu, identificando-a como, potencialmente, a maior fonte de neutrófilos para o modelo de Zimosan. Por outro lado, o número de neutrófilos não sofreu mudanças significativas na circulação ou na medula óssea após a injeção de carragenina.

Portanto, a fundamental diferença entre o Zimosan e a carragenina na indução de processo inflamatório é que o primeiro promove um recrutamento de neutrófilos a partir da medula óssea o que pode explicar o aumento de 2 a 3 vezes no número de neutrófilos presentes no foco inflamatório quando comparado à carragenina. Além do mais, os vários mediadores liberados no processo induzido pelo Zimosan simulam uma condição mais fisiológica do que aquela observada com a carragenina, onde os principais mediadores são as prostaglandinas e o sistema calicreína-cinina (TAKESHITA *et al.*, 2004).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O diagnóstico preciso da inflamação é um desafio cotidiano na prática médica. O diagnóstico precoce e preciso é importante, pois permite um tratamento precoce e específico, o que minimiza a morbidade e a mortalidade da inflamação. São numerosos os métodos que se tem aplicado em busca desse objetivo: as provas laboratoriais são sensíveis, mas não específicas. A velocidade de hemossedimentação e a dosagem de proteína C reativa (PCR) são utilizadas não somente para inflamação/infecção, mas também para muitas outras enfermidades. Com relação às técnicas de imagem, a radiografia convencional, a ecografia, a tomografia computadorizada e a ressonância magnética nuclear permitem o diagnóstico de inflamação/infecção quando já existem alterações estruturais, mas não são capazes de diagnosticá-las em estágios iniciais. Dentro da medicina nuclear, alguns radiofármacos que se encontram disponíveis para tal mostram-se pouco específicos como é o caso do ^{67}Ga , outros como os leucócitos radiomarcados com ^{111}In ou $^{99\text{m}}\text{Tc}$ acarretam riscos ao manipulador e ao paciente. Ao longo da década de 90, vários estudos foram realizados com a proposta de avaliar a habilidade de lipossomas marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ para identificar processos inflamatórios ou infecciosos por meio da cintilografia. No meio científico, há uma busca constante por novas formulações de lipossomas capazes de serem marcadas com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e com potencial uso na detecção cintilográfica de focos inflamatórios. Além disso, o desenvolvimento de novos radiofármacos para este fim poderia representar um grande avanço na área de diagnóstico de inflamação, uma vez que se trata de um método rápido e de fácil execução, não necessitando o manuseio de sangue e, ainda, contribuindo para reduzir a taxa de dose de exposição do paciente à radiação ionizante. Nesse contexto, o desenvolvimento de pesquisas com esses objetivos constituem uma valiosa contribuição à área de diagnóstico de processos inflamatórios.

OBJETIVOS

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Desenvolver radiofármacos marcados com ^{99m}Tc capazes de identificar foco inflamatório em modelo experimental de ratos.

1.2 Objetivos Específicos

- Preparar lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada e realizar a caracterização físico-química com relação ao diâmetro, potencial zeta, índice de polidispersão e teor de fosfolípides;
- Avaliar o uso de crioprotetores no processo de liofilização dos lipossomas;
- Encapsular os complexos ^{99m}Tc -DTPA e ^{99m}Tc -Fitato de Sódio nos lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada e determinar a eficiência de encapsulação;
- Desenvolver modelo experimental de inflamação em ratos machos Wistar;
- Investigar a biodistribuição dos complexos ^{99m}Tc -DTPA e ^{99m}Tc -Fitato de Sódio livres e encapsulados em lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada nos animais com foco inflamatório;
- Obter imagens cintilográficas de qualidade utilizando os radiofármacos livres e encapsulados no modelo experimental de inflamação.

CAPÍTULO 1

Preparação e caracterização de lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada como agente de identificação de processos inflamatórios

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Vesículas fosfolipídicas, conhecidas como lipossomas, têm sido usadas para a vetorização e liberação controlada de várias drogas bem como de agentes de diagnóstico (ALLEN *et al.*, 1991). Muitos estudos têm avaliado o uso de SpHL como sistemas de liberação de drogas para o tratamento de tecidos patológicos, tais como tumores, áreas inflamadas e infectadas, os quais apresentam um pH extracelular menor que aquele do tecido normal (CARVALHO JÚNIOR *et al.*, 2007_a; CARMO *et al.*, 2007, 2008_a; SIMÕES *et al.*, 2004). Além disto, os SpHL são capazes de extravasar em regiões de maior permeabilidade vascular. Desta forma, o sítio inflamatório torna-se um alvo viável para a utilização destes sistemas, pois apresenta ambas as características citadas acima (CARMO *et al.*, 2007, 2008_a).

A utilização destes lipossomas é muitas vezes dificultada pela baixa estabilidade em meio aquoso, uma vez que reações de hidrólise assim como fenômenos de agregação e/ou fusão das vesículas podem ocorrer de acordo com as características físico-químicas das mesmas, fato este que impede seu armazenamento por longos períodos. Como alternativa para a referida instabilidade pode-se preparar lipossomas sob a forma liofilizada, e desta maneira aumentar o tempo de estocagem destas formulações (CHOW *et al.*, 1995; VEMURI *et al.*, 1995; MOHAMMED *et al.*, 2006).

Neste capítulo estão relatadas a preparação e caracterização de SpHL para fins de investigação de seu potencial como agente de identificação de processos inflamatórios.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE) foi adquirido da Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha). Aminopoli(etilenoglicol)₂₀₀₀-diesteroilfosfatidiletanolamina (aPEG₂₀₀₀-DSPE) foi comprado da Avanti Polar Lipids (Alabaster, EUA). Hemisuccinato de colesterila (CHEMS) foi comprado da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2 Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada (SpHL)

2.2.1 Preparo dos lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada (SpHL)

Foram preparados lipossomas contendo aPEG₂₀₀₀-DSPE: DOPE: CHEMS em diferentes concentrações lipídicas (20, 40 e 60 mM), empregando-se a metodologia de hidratação do filme lipídico seguido de extrusão (OLSON *et al.*, 1979). Inicialmente, alíquotas das soluções de aPEG₂₀₀₀-DSPE, DOPE e CHEMS em clorofórmio (razão molar 0,5:6,5:3,0, respectivamente) foram transferidas para um balão de fundo redondo para a formação do filme lipídico pela evaporação do clorofórmio em evaporador rotatório sob pressão reduzida. O filme lipídico foi hidratado com solução aquosa de NaOH (6 mM). As vesículas multilamelares resultantes foram submetidas à extrusão através de membranas de policarbonato de 0,4 µm; 0,2 µm e 0,1 µm utilizando um extrusor de média pressão (Figura 10). A formulação foi submetida a 5 ciclos de extrusão em cada membrana utilizada.



Figura 10. Extrusor de média pressão (Fonte: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica/UFMG)

2.3 Caracterização de SpHL

2.3.1 Diâmetro das vesículas e índice de polidispersão

O diâmetro médio e a distribuição do tamanho das partículas foram determinados por espectroscopia de autocorrelação de fótons, utilizando um contador de partículas equipado com raio laser monocromático (Zetasizer 3000 HSA – Malvern, Worcestershire, Inglaterra) - (Figura 11). A análise foi realizada em meio líquido e mediu o raio hidrodinâmico das partículas atribuindo-se teoricamente a elas um formato esférico.

Para a determinação do diâmetro das vesículas foram utilizados aproximadamente 100 μ L de lipossomas diluídos em 3 mL de água deionizada até que se obtivesse a contagem adequada de partículas. Os resultados são expressos como média de 10 medidas. O índice de polidispersão das vesículas (IP) foi avaliado pela análise monomodal. Este índice avalia a distribuição da população de partículas em torno de um diâmetro médio das partículas. As medidas foram efetuadas em temperatura de 25°C e em ângulo de 90°.



Figura 11. Equipamento Zetasizer 3000 HSA (Fonte: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica/UFMG).

2.3.2 Caracterização de SpHL por microscopia eletrônica de transmissão

A análise morfológica de SpHL foi conduzida utilizando um microscópio eletrônico (Philips CM 120, 80 Kv). Uma amostra de 100 μ L de SpHL (concentração lipídica total igual a 20 mM) foi

misturada com igual volume de uma solução corante, cuja composição está descrita na Tabela 1. Uma gota desta mistura foi colocada sobre o suporte (formvar/carbono 200 mesh), o excesso de amostra foi removido com auxílio de papel absorvente, e foi mantida em repouso até secagem.

Tabela 1. Composição da solução para contraste utilizada na microscopia eletrônica de transmissão.

Ácido fosfotúngstico (PTA).....	2,0 g
Fenol.....	0,2 mL
Sacarose.....	0,5 g
Albumina	0,5 g
Solução de NaOH 0,1 N.....	qs 7,0-7,2
Água destilada qsp.....	100 mL

2.3.3 Potencial zeta

O potencial zeta foi determinado por espalhamento dinâmico da luz e análise da mobilidade eletroforética das vesículas. As medidas foram feitas em triplicata em alíquotas diluídas 250 vezes, empregando-se o equipamento Zetasizer 3000 HSA (Malvern, Worcestershire, Inglaterra), em temperatura de 25 °C e em ângulo de 90°.

2.3.4 Teor de fosfolípidos

Para a determinação do teor de fosfolípidos foi utilizado o método de dosagem de fósforo mineral sugerido por Bartlett (1959), com algumas alterações.

Foram adicionados em tubos pyrex 250 µL da solução contendo o padrão de fósforo em diferentes dosagens (1, 2, 3, 4 e 5 µg). Em seguida, foram adicionados 400 µL de uma solução de ácido sulfúrico 10 N e os tubos foram aquecidos à temperatura de 180-195°C, em *dry-block*, durante 30 minutos. Após resfriamento adicionou-se 500 µL de uma solução aquosa, recentemente preparada, de água oxigenada 10% (v/v). Os tubos foram aquecidos novamente a 180-195°C por 30 minutos. Após resfriamento, 4,6 mL da solução de molibdato

de amônio (2,2 g de molibdato de amônio; 7 mL de H₂SO₄; água q.s.p. 1L) e 0,5 mL de solução aquosa, recém preparada, de ácido ascórbico 10% (p/v) foram adicionados aos tubos. Os frascos foram agitados vigorosamente em vórtex e aquecidos à temperatura de 90°C por 20 minutos. Em seguida, as soluções foram lidas em espectrofotômetro utilizando 800 nm como comprimento de onda.

O limite de doseamento do método proposto está compreendido entre 1 e 5 µg de fósforo, desta forma as amostras analisadas foram diluídas em água destilada para que a quantidade de fósforo estivesse dentro dos limites da curva de calibração.

As medidas das amostras e dos padrões foram realizadas em duplicata e uma nova curva de calibração foi traçada a cada dosagem. As curvas de calibração com coeficiente de correlação (r) inferior a 0,99 foram rejeitadas.

2.3.5 Avaliação da influência do uso de crioprotetores no processo de liofilização de SpHL.

No processo de liofilização foi avaliada a influência no diâmetro das vesículas exercida pelos crioprotetores trealose, sacarose, glicose, manitol e lactose nas proporções crioprotetor: fosfolípide (p/p) iguais a 1:1 e 2:1. A concentração lipídica total de SpHL empregada foi igual a 20 mM. De acordo com os resultados obtidos para o diâmetro dos lipossomas, foram selecionados os dois crioprotetores que forneceram as menores vesículas e, a partir daí, testado as proporções crioprotetor:fosfolípide (p/p) iguais a 3:1, 4:1 e 5:1. Os carboidratos foram adicionados a 1 mL de SpHL recém formados e após agitação em vórtex, por 1 minuto, foram congelados em nitrogênio líquido por 5 minutos. Em seguida, os frascos contendo os SpHL congelados foram liofilizados por 24 horas. Após este período, os lipossomas foram reconstituídos com solução de NaCl 0,9% (p/v) em quantidade suficiente para obter o volume inicial e determinou-se o diâmetro e o índice de polidispersão das vesículas.

2.4 Produção do kit liofilizado

Amostras de 1 mL de SpHL juntamente com glicose na proporção crioprotetor:fosfolípide de 5:1 (p/p) foram adicionadas em frascos de vidro, congeladas em nitrogênio líquido por 5

minutos e colocadas na câmara do liofilizador. O ciclo de liofilização teve duração de 24 horas. Após este período, os frascos foram vedados a vácuo e os SpHL liofilizados foram armazenados em geladeira (4°C). A liofilização foi realizada em liofilizador E-C Modulyo, acoplado a uma bomba Edwards, modelo E2M18FF (Thermo, Waltham, EUA) – (Figura 12).



Figura 12. Liofilizador E-C Modulyo e bomba de vácuo.
(Fonte: Laboratório de Tecnologia Farmacêutica/UFMG)

2.5 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram apresentados como média \pm d.p. Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA one-way e corrigidos pelo teste de comparação múltipla de Tukey usando o programa GraphPad Prism 5.0. Para todas as análises adotou-se o intervalo de confiança de 95%, sendo que as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização dos lipossomas

Os valores obtidos para o diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta dos SpHL estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Diâmetro médio, índice de polidispersão (IP) e potencial zeta de SpHL não liofilizados.

Concentração lipídica (mM)	Diâmetro (nm)	IP	Potencial zeta (mV)
20	135,7 ± 2,4	0,16 ± 0,03	13,63 ± 0,89
40	140,5 ± 3,2	0,09 ± 0,01	6,25 ± 1,81
60	128,3 ± 2,8	0,12 ± 0,01	11,61 ± 1,51

Valores expressos pela média ± d.p. (n = 3)

O índice de polidispersão (IP) reporta a distribuição do diâmetro das vesículas dentro da dispersão e varia de 0,0 a 1,0 para sistemas totalmente monodispersos e completamente polidispersos, respectivamente. Logo, as preparações apresentaram uma boa homogeneidade na distribuição do diâmetro das partículas, como indicado pelo IP.

A microscopia eletrônica de transmissão mostrou que as vesículas de SpHL são, na sua maioria, esféricas e oligolamelares (Figura 13). Os valores de diâmetro de SpHL obtidos por esta técnica é da ordem de 100 nm. Estes valores são menores do que aqueles observados a partir do emprego da técnica de espectroscopia de autocorrelação de fótons. Estes resultados podem ser explicados em virtude do fato de que com o emprego do método de espectroscopia de autocorrelação de fótons as partículas maiores são mais detectadas devido à sua capacidade de provocar maior espalhamento da luz. Outro ponto a ser considerado é que com o emprego desta técnica, o raio hidrodinâmico é determinado considerando uma morfologia esférica das partículas, e, no entanto, partículas com aspecto morfológico distinto podem estar presentes (WESSMAN *et al.*, 2009).

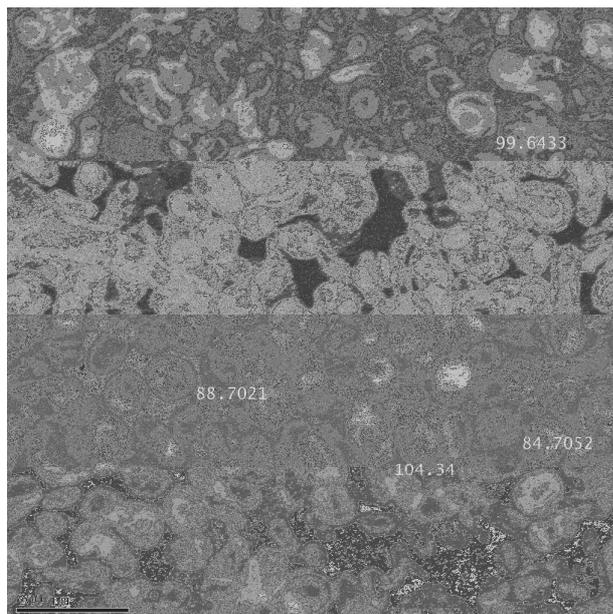


Figura 13. Fotomicrografia de SpHL obtida por microscopia eletrônica de transmissão.

Os lipossomas estericamente estabilizados com aPEG₂₀₀₀-DSPE apresentaram valores de potencial positivos, valores estes semelhante àqueles observados por Zalipsky e colaboradores (1994) e Carmo e colaboradores (2008_b). Segundo Zalipsky e colaboradores (1994), lipossomas preparados com aPEG₂₀₀₀-DSPE, um fosfolípide neutro e zwitteriônico, apresentam carga superficial positiva devido ao grupo amino que se encontra na porção terminal do polímero e, portanto, no exterior das vesículas. Em pH neutro este grupo amino terminal é protonado e, assim, é carregado positivamente. Portanto, apesar da carga global neutra da molécula de aPEG₂₀₀₀-DSPE, devido à carga negativa advinda do grupo fosfato e positiva do grupo amino, a separação relativamente grande entre estes grupos proporcionada pela cadeia do PEG, resulta em uma superfície positiva como demonstrada pelo potencial zeta.

Em relação ao doseamento do fósforo, a linearidade do método de quantificação do fósforo foi demonstrada pelo índice de correlação igual a $0,9969 \pm 0,0016$. A Figura 14 apresenta uma das curvas utilizadas. Os valores de teor de fosfolípide de SpHL obtidos estão apresentados na Tabela 3. De acordo com os resultados obtidos, pode-se verificar que durante o processo de preparação de SpHL houve uma perda de fosfolípidos de, aproximadamente, 20% em relação ao valor teórico.

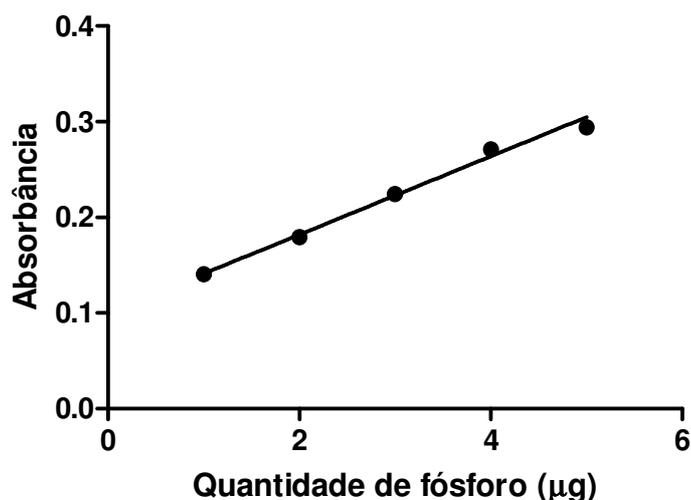


Figura 14. Curva de calibração para o doseamento de fósforo em SpHL.

Tabela 3. Teor recuperado de fosfolípidos de SpHL após seu preparo pelo método de hidratação do filme lipídico seguido de extrusão.

<i>Concentração lipídica total (mM)</i>	<i>Concentração teórica (mM)</i>	<i>Concentração experimental (mM)</i>	<i>Teor recuperado (%)</i>
20	14	11,9 ± 1,2	84,3 ± 7,4
40	28	22,4 ± 1,5	80,1 ± 5,4
60	42	36,3 ± 2,9	85,7 ± 6,9

Valores são expressos pela média ± d.p. (n = 3)

3.2 Avaliação da influência do uso de crioprotetores no processo de liofilização de SpHL

A fim de se obter uma preparação de SpHL na forma liofilizada foi avaliada a influência da presença de crioprotetores sobre o diâmetro das vesículas, após a reconstituição do pó, para administração intravenosa. Os crioprotetores trealose, sacarose, glicose, manitol e lactose foram selecionados para os ensaios de determinação de sua eficiência frente ao processo de liofilização (Tabela 4).

Na ausência de crioprotetor, os SpHL apresentaram um diâmetro médio igual a 726,8 nm após a reconstituição, com uma distribuição de diâmetro das vesículas heterodispersa (IP = 0,78). Considerando que o objetivo é preparar SpHL para administração intravenosa,

sabe-se que quanto menor o diâmetro das vesículas, maior é o seu raio de curvatura e, conseqüentemente, menor é a opsonização (LASIC, 1998). Avaliando-se a população de vesículas de diâmetro inferior a 200 nm, pode-se observar que a mesma, na ausência de crioprotetor, representa somente 16,7%.

Com o uso dos crioprotetores, os dados sugerem que a glicose, sacarose e manitol, na proporção crioprotetor:fosfolípide (p/p) 2:1, forneceram vesículas de menor diâmetro quando comparadas com os outros crioprotetores utilizados. Portanto, os açúcares glicose e sacarose foram selecionados para os testes com as proporções crioprotetor:fosfolípide (p/p) iguais a 3:1; 4:1 e 5:1.

Com base nos dados obtidos, verifica-se que na presença de glicose como crioprotetor, na proporção crioprotetor:fosfolípide (p/p) de 5:1, obteve-se, aproximadamente, 80% das vesículas com diâmetro menor que 350 nm e um sistema monodisperso de acordo o valor de IP obtido ($0,29 \pm 0,01$). O diâmetro médio das vesículas pode influenciar nos estudos de biodistribuição, pois se sabe que nas regiões de inflamação e/ou infecção o diâmetro dos poros dos capilares pode se estender de 100 a 800 nm (SAPRA e ALLEN, 2003). Conseqüentemente, é importante que os lipossomas sejam pequenos o suficiente para extravasar do sangue para o espaço intersticial do foco inflamatório passando através dos capilares. O uso da glicose, na proporção crioprotetor:fosfolípide (p/p) de 5:1 permitiu um maior controle do diâmetro das vesículas de SpHL após a liofilização/reidratação como indicado na Tabela 4. Apesar do aumento significativo, da ordem de 1,6 vezes, do diâmetro médio das vesículas em relação à dispersão lipossomal ($135,7 \pm 2,4$ nm), o mesmo é menor do que o observado na presença de sacarose (2,7 vezes) na mesma proporção 5:1. Com o uso da sacarose, obteve-se um menor percentual de vesículas com diâmetro igual ou inferior a 350 nm (55,5%) quando comparado com a glicose na mesma proporção crioprotetor:fosfolípide (p/p) 5:1. Portanto, a glicose, na proporção crioprotetor:fosfolípide (p/p) 5:1, apresentou melhores características de crioproteção para ser utilizada na preparação de kits liofilizados contendo SpHL (SAPRA e ALLEN, 2003; BATISTA *et al.*, 2007).

Tabela 4. Influência da presença de crioprotetores sobre o diâmetro e índice de polidispersão de SpHL após processo de liofilização.

Crioprotetor	Razão	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão (IP)	Distribuição do diâmetro das vesículas (%)		
				≤ 200 nm	≤ 350 nm	≤ 500 nm
Ausente	-	726,8 ± 71,5	0,78 ± 0,04	16,7 ± 6,4	27,7 ± 7,4	41,4 ± 8,1
	1:1	606,2 ± 4,2	0,77 ± 0,06	16,6 ± 0,1	31,4 ± 5,2	45,1 ± 5,2
	2:1	718,9 ± 43,9	0,68 ± 0,17	5,4 ± 5,2	18,2 ± 3,4	34,3 ± 9,6
	3:1	544,7 ± 6,1	0,60 ± 0,01	16,3 ± 0,1	27,2 ± 0,1	48,4 ± 9,5
	4:1	363,9 ± 9,7	0,44 ± 0,04	27,6 ± 0,1	40,9 ± 0,3	57,3 ± 0,1
Glicose	5:1	212,1 ± 1,8	0,29 ± 0,01	55,2 ± 0,1	81,1 ± 0,1	94,7 ± 0,1
	1:1	563,1 ± 17,7	0,25 ± 0,04	5,3 ± 5,3	21,6 ± 8,5	40,6 ± 1,1
	2:1	965,3 ± 50,1	0,46 ± 0,09	8,9 ± 0,1	22,1 ± 7,9	41,3 ± 0,1
	1:1	539,4 ± 30,2	0,50 ± 0,03	8,7 ± 0,1	27,2 ± 0,1	48,3 ± 9,5
	2:1	1002,6 ± 53,9	0,22 ± 0,01	0,0 ± 0,0	1,1 ± 0,7	6,1 ± 3,1
Trealose	1:1	565,6 ± 3,6	0,67 ± 0,07	8,8 ± 0,2	27,4 ± 0,3	41,1 ± 0,3
	2:1	909,8 ± 101,9	0,35 ± 0,02	0,6 ± 0,1	7,9 ± 0,8	19,4 ± 9,5
	3:1	470,3 ± 36,2	0,74 ± 0,12	22,1 ± 8,1	34,3 ± 9,1	56,1 ± 0,3
	4:1	403,8 ± 1,06	0,75 ± 0,03	27,6 ± 0,1	41,3 ± 0,1	56,2 ± 0,1
	5:1	369,1 ± 8,71	0,41 ± 0,01	16,2 ± 0,1	55,5 ± 0,3	69,8 ± 0,1
Sacarose	1:1	663,0 ± 28,1	0,78 ± 0,03	8,9 ± 0,1	22,2 ± 7,8	41,3 ± 0,1
	2:1	960,4 ± 24,9	0,23 ± 0,06	0,9 ± 1,2	4,6 ± 5,8	10,2 ± 8,9

Valores são expressos pela média ± d.p. (n = 3)

3.3 Produção do kit liofilizado de SpHL

O processo de liofilização utilizado foi capaz de fornecer um produto liofilizado compacto como pode ser visto na Figura 15.

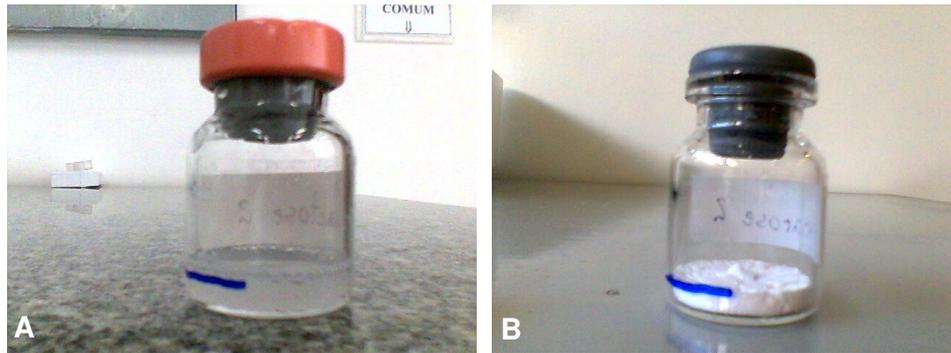


Figura 15. **A** – Dispersão coloidal de SpHL; **B** – SpHL liofilizados

O emprego de crioprotetor, em especial a glicose, foi de extrema importância para o controle do diâmetro das vesículas após o processo de liofilização/reidratação. Apesar de uma considerável proporção das vesículas de SpHL (81%) apresentar diâmetro inferior a 350 nm com o uso da glicose na proporção crioprotetor:fosfolípide (p/p) 5:1, convém avaliar a estabilidade de SpHL sob a forma liofilizada em diferentes temperaturas de armazenamento, levando-se em consideração as alterações que podem ocorrer no seu diâmetro e no teor de encapsulação do material desejado. Esta avaliação de estabilidade foi realizada e será abordado no capítulo 2.

4 CONCLUSÃO

A partir dos estudos realizados, pode-se concluir que os SpHL liofilizados preparados com o emprego de glicose como crioprotetor [razão crioprotetor:fosfolípide (p/p) igual a 5:1] apresentam diâmetro médio adequado para os estudos subsequentes em animais.

CAPÍTULO 2

Estudos de biodistribuição e imagens cintilográficas dos radiofármacos ^{99m}Tc -DTPA e ^{99m}Tc -Fitato de Sódio, livres e encapsulados em lipossomas pH-sensíveis, de circulação prolongada, em modelo experimental de inflamação

CAPÍTULO 2

1 INTRODUÇÃO

A medicina nuclear por meio da cintilografia permite a identificação de processos inflamatórios em várias partes do corpo mediante a administração intravenosa de substâncias radiomarcadas e pela detecção da radioatividade emitida usando uma câmara de cintilação a raios gama (gama câmara). Em geral, a sensibilidade dessa técnica permite a detecção de processos fisiopatológicos no estágio inicial, antes do desenvolvimento de alterações anatômicas que são identificadas por técnicas radiográficas convencionais, e antes dos sintomas clínicos da doença (SIGNORE *et al.*, 2002).

Nas duas últimas décadas, alguns radiofármacos foram desenvolvidos para aplicação no diagnóstico por cintilografia de inflamação e infecção, sendo o citrato de ^{67}Ga e os leucócitos autólogos marcados com ^{111}In ou $^{99\text{m}}\text{Tc}$ os agentes de imagem mais usuais na clínica médica. O ^{67}Ga tem sido usado para identificar processos inflamatórios e infecciosos por mais de três décadas, mas apresenta uma baixa especificidade e expõe o paciente a doses mais elevadas de radiação. Além disso, as imagens são obtidas com 18 a 72 horas após sua administração (CHIANELLI *et al.*, 1997; LOVE e PALESTRO, 2004). O uso dos leucócitos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$, mesmo sendo considerado a técnica de escolha na medicina nuclear para imagem de inflamação e infecção, envolve um longo período de preparação do radiofármaco além de manusear sangue potencialmente contaminado o que limita seu uso (CORSTEN e VAN DER MEER, 1999; LOVE e PALESTRO, 2004; RENNEN *et al.*, 2005). Assim, existe uma constante busca por novos radiofármacos que possibilitem a identificação de focos inflamatórios de forma rápida com alta sensibilidade e especificidade, não apresentando as desvantagens dos radiofármacos comumente usados (LAVERMAN *et al.*, 1999; LOVE e PALESTRO, 2004; VAN EERD *et al.*, 2005).

SpHL marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO, compostos de DOPE, CHEMS e um polímero hidrofílico ligado a uma molécula de fosfolípide (mPEG₂₀₀₀-DSPE) foram investigados como agentes de imagem para identificação de processos inflamatórios e infecciosos (CARMO *et al.*, 2008_a, 2007). Os lipossomas pH-sensíveis são planejados para promover uma eficiente liberação do agente encapsulado em resposta ao baixo pH de um tecido patológico, tais como áreas inflamadas e infectadas (SIMÕES *et al.*, 2004). Dessa forma, eles são potenciais candidatos para preparação de radiofármacos para auxiliar no diagnóstico de processos inflamatórios e

infecciosos. Os estudos realizados por Carmo e colaboradores (2007, 2008_a) evidenciaram que os SpHL marcados com ^{99m}Tc -HMPAO representam uma importante ferramenta na identificação de focos inflamatórios e infecciosos, sendo capazes de localizar as lesões em tempos curtos e de forma eficiente. Porém, o HMPAO encontra-se indisponível em todo o país. Logo, torna-se necessário a busca de novos marcadores e, também, o desenvolvimento de uma formulação liofilizada, mais estável, que possa ser facilmente marcada com o ^{99m}Tc .

1.1 Radiofármaco ^{99m}Tc -DTPA

O ácido dietilenotriaminopentacético marcado com tecnécio-99m (^{99m}Tc -DTPA) é um radiofármaco hidrofílico capaz de ser eliminado rapidamente do organismo na sua forma livre. É mais comumente utilizado em estudos de função renal por ser quase totalmente filtrado pelos glomérulos renais quando injetado por via intravenosa (THRALL e ZIESSMAN, 2001). O seu clearance plasmático é rápido (70 min para humanos), apresentando meia-vida biológica de aproximadamente 2 horas. Liga-se às proteínas plasmáticas de 5% a 10% em 1 hora e 90% da quantidade injetada é excretada dentro de 24 horas (SAHA, 2004; KÖRNYEI e ZOLLE, 2007). Segundo Abdel Dayem e colaboradores (1988) o ^{99m}Tc -DTPA pode acumular-se em lesões inflamatórias do trato intestinal e poderia ser utilizado para localizar focos de sangramento. Um aumento da captação do radiotraçador pode ser visto nos segmentos afetados do intestino imediatamente após a injeção em “bolus”, persistindo por horas. Porém, atualmente, sabe-se que para a localização de sangramentos o radiofármaco de escolha são as hemácias marcadas com ^{99m}Tc e, para lesões inflamatórias do intestino os leucócitos marcados com ^{99m}Tc -HMPAO são considerados “padrão ouro” para tal diagnóstico (ABDEL DAYEM *et al.*, 1988; THRALL e ZIESSMAN, 2001; MOTA *et al.*, 2010; CARDOSO *et al.*, 2002).

1.2 Radiofármaco ^{99m}Tc -Fitato de Sódio

O Fitato de Sódio foi introduzido por Subramanian em 1973 para estudos da atividade fagocitária do fígado e medula óssea. O agente preparado com a adição de pertecnetato de sódio em um kit liofilizado contendo ácido fítico e cloreto estanso forma uma solução límpida e não coloidal de Fitato de Sódio marcado com ^{99m}Tc (^{99m}Tc -Fitato de Sódio). Esse radiofármaco ao ser injetado livre na corrente sanguínea age como uma micropartícula

circulante (colóide), insolúvel, pela interação com o cálcio e metais pesados catiônicos do sangue, sendo rapidamente removido da circulação pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM) – (ABBAS *et al.*, 1978; SEOK *et al.*, 2010). O cátion é lentamente conjugado e secretado na vesícula biliar. Em pacientes normais, 85% da dose administrada é captada pelo fígado, enquanto que no baço e na medula óssea acumulam 7% e 5%, respectivamente. O mecanismo regido é o sequestro pelas células de Kupffer do fígado e pelos macrófagos do baço e medula óssea (ZOLLE, 2007).

Assim, neste trabalho, desenvolveu-se novos radiofármacos tendo como base SpHL, liofilizados na presença de glicose como crioprotetor [proporção açúcar:fosfolípide (p/p) 5:1] e marcados com ^{99m}Tc -DTPA ou ^{99m}Tc -Fitato de Sódio. A capacidade desses radiofármacos de identificar, por meio de imagens cintilográficas, focos inflamatórios foi avaliada em modelo experimental empregando as formas livre e encapsulada em SpHL.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

DOPE foi adquirido pela Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Alemanha) enquanto que o aPEG₂₀₀₀-DSPE foi comprado da Avanti Polar Lipids (Alabaster, EUA). CHEMS e Zimosan foram comprados da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

O ^{99m}Tc foi obtido de um gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (IPEN, São Paulo, Brasil). O DTPA foi adquirido do Laboratório de Farmácia Nuclear da Faculdade de Farmácia da UFMG enquanto que o Fitato de Sódio foi comprado do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). Todos os outros reagentes foram de grau analítico.

Os ratos Wistar, machos, foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG e mantidos no Laboratório de Radioisótopos da mesma faculdade durante o período dos experimentos, sem restrição de água e ração.

Todos os experimentos realizados em animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA), nº protocolo: 280/2008 (Anexo 4).

2.2 Métodos

2.2.1 Preparo dos lipossomas

Inicialmente, alíquotas das soluções de aPEG₂₀₀₀-DSPE, DOPE e CHEMS em clorofórmio (concentração lipídica de 20 mM; razão molar 0,5:6,5:3,0, respectivamente) foram transferidas para um balão de fundo redondo e um filme lipídico foi formado pela evaporação do clorofórmio em um rotavapor (Buchi Labortechnik AG CH-9233, modelo R-210, acoplado a uma bomba de vácuo de mesma marca, modelo V-700; Flawil, Suíça) sob pressão reduzida. O filme lipídico obtido foi hidratado com solução aquosa de NaOH (6 mM), obtendo-se os lipossomas brancos. As vesículas multilamelares resultantes foram submetidas à extrusão em membranas de policarbonato de 0,4 µm, 0,2 µm e 0,1 µm (cinco ciclos para cada membrana) utilizando um extrusor de média pressão (Lipex Biomembranes Inc., Vancouver, Canadá).

O diâmetro médio e a distribuição do tamanho dos SpHL brancos foram determinados pela análise monomodal por espectroscopia de correlação de fótons, a 25 °C a um ângulo de 90°. A medida do diâmetro foi realizada em triplicata usando o equipamento Zetasizer (Zetasizer 3000 HSA – Malvern, Inglaterra). As amostras foram diluídas usando salina a 0,9% (p/v).

Os SpHL foram liofilizados na presença de glicose como crioprotetor [relação crioprotetor:fosfolípide (p/p) 5:1] por um período de 24 horas e, em seguida, lacrados e acondicionados em geladeira (4 °C).

2.2.2 Procedimento de marcação

2.2.2.1 Marcação do DTPA com ^{99m}Tc

Um frasco contendo 1,25 mg de DTPA e 0,085 mg de SnCl₂.2H₂O foi marcado com Na^{99m}TcO₄ de acordo com as instruções do fabricante. A pureza radioquímica foi determinada por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando-se sílica gel 60 como suporte, acetona e NaCl 0,9% (p/v) como solventes (SAHA, 2004).

2.2.2.2 Marcação do Fitato de Sódio com ^{99m}Tc

Um frasco contendo 20 mg de Fitato de Sódio e 1 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foi marcado com $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ de acordo com as instruções do fabricante. A pureza radioquímica foi determinada por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando-se sílica gel 60 como suporte, acetona e NaCl 0,9% (p/v) como solventes.

O coeficiente de partição do ^{99m}Tc -Fitato de Sódio foi avaliado em uma mistura de octanol/água na razão de 1:1 (v/v). Uma alíquota de 0,1 mL da solução contendo 0,37 MBq do complexo ^{99m}Tc -Fitato de Sódio foi colocada em um tubo de ensaio contendo 2 mL da mistura octanol/água, em seguida, o tubo foi agitado em vórtex por 3 minutos e deixado em repouso até a completa separação das fases. Recolheram-se alíquotas de 0,5 mL de cada fase (octanol e água) e determinou-se a atividade presente na fase orgânica e na fase aquosa. O coeficiente de partição foi determinado pela seguinte fórmula:

$$\text{Coeficiente de partição} = \log \frac{\text{cpm}(\text{fase orgânica})}{\text{cpm}(\text{fase aquosa})}$$

onde: cpm = contagens por minuto

2.2.2.3 Marcação dos SpHL com ^{99m}Tc -DTPA ou ^{99m}Tc -Fitato de Sódio

Os lipossomas marcados foram obtidos utilizando-se o método de desidratação/reidratação de lipossomas (DRV) descrito por Kirby e Gregoriadis (1984) com as modificações sugeridas por Zadi e Gregoriadis (2000). Os SpHL liofilizados contendo glicose como crioprotetor [relação crioprotetor:fosfolípide (p/p) 5:1] foram reconstituídos com uma solução de NaCl 0,9% contendo o ^{99m}Tc -DTPA ou ^{99m}Tc -Fitato de Sódio em quantidade suficiente para a recuperação do volume inicial. Em seguida, a dispersão coloidal de SpHL foi submetida à agitação em vórtex por 3 minutos. Imediatamente após a ressuspensão, os SpHL radiomarcados foram submetidos à ultracentrifugação (150000 g, por 90 minutos a 4°C). A porcentagem de encapsulação de cada radiofármaco foi determinada pela quantificação da atividade presente no sobrenadante e no pellet de SpHL formado após a ultracentrifugação segundo a fórmula abaixo:

$$\% \text{ encapsulação} = \frac{cpm(\text{pellet})}{cpm(\text{pellet}) + cpm(\text{sobrenadante})} \times 100$$

Após a marcação dos SpHL com ^{99m}Tc -DTPA (SpHL- ^{99m}Tc -DTPA) ou ^{99m}Tc -Fitato de Sódio (SpHL- ^{99m}Tc -Fitato de Sódio) o potencial zeta das vesículas foi medido seguindo o mesmo procedimento citado no item 2.3.3 do capítulo 1.

Utilizando SpHL na concentração lipídica de 20 mM, avaliou-se a quantidade do radiofármaco adsorvido na membrana das vesículas. Os SpHL liofilizados foram reconstituídos com 0,8 mL de solução de NaCl 0,9 % (p/v) e a dispersão foi agitada em vórtex por 3 minutos. Em seguida, adicionou-se a solução contendo o complexo ^{99m}Tc -DTPA ou ^{99m}Tc -Fitato de Sódio em quantidade suficiente para a recuperação do volume inicial e, em seguida, os SpHL foram submetidos à ultracentrifugação (150000 g, 90 minutos, 4°C). A radioatividade presente no pellet formado após a centrifugação foi considerada como o percentual de fármaco adsorvido a superfície da membrana.

O valor real de encapsulação para ambos os radiofármacos (^{99m}Tc -DTPA e ^{99m}Tc -Fitato de Sódio) foi determinado pela diferença entre o percentual obtido na encapsulação total menos o valor obtido quando o radiofármaco estava adsorvido a membrana.

2.2.3 Teor e eficiência de encapsulação

Para a determinação do teor e eficiência de encapsulação foram testados SpHL com concentrações lipídicas de 20, 40 e 60 mM. A metodologia utilizada foi a mesma para todas as concentrações lipídicas avaliadas.

Os SpHL foram preparados como descrito no item 2.2.1 e, em seguida, foi realizada a dosagem de fosfolípidos para cada concentração lipídica determinada utilizando o método descrito por Bartlett (1959). Em seguida, as vesículas foram marcadas com ^{99m}Tc -DTPA, como descrito no item 2.2.2.3 e calculado o teor de encapsulação do radiofármaco.

2.2.4 Perfil de liberação

Alíquotas de 41 µL de SpHL-^{99m}Tc-DTPA ou SpHL-^{99m}Tc-Fitado de Sódio, purificados em ultracentrífuga, foram diluídas em 3 mL de plasma de rato e incubadas a 37°C sob agitação constante. Após os tempos de 2, 4 e 8 horas alíquotas de 400 µL foram retiradas e adicionadas em filtros AMICON® (10 kDa). Os filtros foram acoplados a eppendorfs e centrifugados (14000 g) por 30 minutos. Determinou-se a quantidade de atividade presente no líquido filtrado e no filtro. A atividade radioativa retida no filtro foi considerada como sendo os SpHL radiomarcados e considerou-se como radiofármaco liberado a atividade presente no filtrado. O percentual (%) de liberação foi determinado pela seguinte equação:

$$\% \text{ liberado} = \frac{\text{cpm} (\text{filtrado})}{\text{cpm} (\text{filtro}) + \text{cpm} (\text{filtrado})} \times 100$$

2.2.5 Estudos de estabilidade do kit de SpHL liofilizados contendo glicose como crioprotetor [relação crioprotetor (p/p) 5:1]

Foram produzidos três lotes de SpHL, sendo que, 50% dos frascos de cada um dos lotes foram armazenados em geladeira a 4°C e o restante a temperatura ambiente (TA). Após os tempos de 0, 30, 60, 90, 120 e 180 dias o liofilizado foi reconstituído com uma solução contendo o complexo ^{99m}Tc-DTPA ou ^{99m}Tc-Fitado de Sódio. Os SpHL radiomarcados foram ultracentrifugados e o percentual de encapsulação foi calculado com descrito no item 2.2.2.3. Foram determinados também o diâmetro médio e índice de polidispersão das vesículas, como descrito, respectivamente, no item 2.3.1 do capítulo 1. As análises foram realizadas em triplicata tanto para as amostras armazenadas a 4°C como em TA para cada radiofármaco testado.

2.2.6 Depuração plasmática em animais sadios

Alíquotas de 0,1 mL dos radiofármacos livres (^{99m}Tc-DTPA ou ^{99m}Tc-Fitado de Sódio) e dos SpHL radiomarcados (SpHL-^{99m}Tc-DTPA ou SpHL-^{99m}Tc-Fitado de Sódio) foram injetadas na veia caudal de ratos machos Wistar. Foi realizada uma incisão na cauda dos animais e o sangue foi coletado, em tubos previamente pesados, nos tempos de 1, 3, 5, 10, 15, 30, 45,

60, 90 e 120 minutos após a administração dos radiofármacos. Os tubos foram pesados e levados ao contador gama (PerkinElmer Wallac Wizard 1470-020 Gamma Counter, PerkinElmer Inc., Waltham, EUA) – (Figura 16) para determinação da radioatividade. Uma atividade padrão contendo a mesma quantidade de radioatividade injetada nos animais foi contada simultaneamente em um tubo separado, para corrigir os cálculos pelo decaimento físico do ^{99m}Tc . Os resultados foram expressos em percentual da dose injetada por grama de sangue (%DI/g).



Figura 16. Contador de radiação gama – Wizard.
(Fonte: Laboratório de Radioisótopos/UFMG)

2.2.7 Modelo animal de inflamação

O foco inflamatório estéril foi induzido no músculo da pata anterior esquerda de ratos machos Wistar, pesando entre 180 e 220 g (Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil), por injeção intramuscular de 0,2 mL de suspensão de Zimosan a 5% (p/v). No músculo da pata anterior direita, foram injetados 0,2 mL de solução estéril de NaCl a 0,9% (p/v) (BARRETO *et al.*, 2005). Transcorridas 24 horas da injeção da suspensão de Zimosan, quando o intumescimento do músculo era aparente, os radiofármacos ^{99m}Tc -DTPA, SpHL- ^{99m}Tc -DTPA, ^{99m}Tc -Fitato de Sódio e SpHL- ^{99m}Tc -Fitato de Sódio foram injetados na veia caudal dos animais.

Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (Anexo 4) e estão de acordo com o guia para o cuidado e uso de animais de laboratório recomendado pelo *Institute of Laboratory Animal Resources*.

2.2.8 Estudos histopatológicos

Amostras de tecido do músculo inflamado e do músculo contralateral normal foram retiradas 24 horas após a indução do foco inflamatório para exames histopatológicos. O material foi fixado em formalina tamponada* durante 24 horas e, posteriormente, processado para inclusão em parafina e emblocado. Secções histológicas de 4 µm foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) para avaliação morfológica.

* Formalina tamponada: aldeído fórmico (37-40%) 100ml; fosfato monossódico 4g; fosfato bisódico 4,5g; água destilada 900ml.

2.2.9 Estudos de biodistribuição dos radiofármacos livres (^{99m}Tc -DTPA, ^{99m}Tc -Fitato de Sódio) e dos SpHL radiomarcados (SpHL- ^{99m}Tc -DTPA, SpHL- ^{99m}Tc -Fitato de Sódio) em animais com foco inflamatório

Após 24 horas da indução do foco inflamatório 3,7 MBq de ^{99m}Tc -DTPA, SpHL- ^{99m}Tc -DTPA, ^{99m}Tc -Fitato de Sódio e SpHL- ^{99m}Tc -Fitato de Sódio foram injetados na veia caudal dos ratos, sendo 5 animais para cada grupo. Em tempos pré-estabelecidos (2, 4 e 8 h) após a administração dos radiofármacos, os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina (8 mg/kg) e cetamina (60 mg/kg) e depois sacrificados. Foram retirados uma alíquota do sangue, o fígado, o baço, os rins, o músculo inflamado (esquerdo) e o músculo controle (direito), lavados com água destilada, secos em papel de filtro e pesados. Em seguida, a quantidade de radioatividade de cada órgão e dos músculos foi medida em um contador de radiação gama programado para detectar fótons γ com energia de 140 keV \pm 10%, referente ao ^{99m}Tc . Uma amostra padrão contendo a mesma quantidade de radioatividade injetada nos animais foi contada simultaneamente em um tubo separado, para corrigir os cálculos pelo decaimento físico do ^{99m}Tc e para calcular a captação do radiofármaco em cada órgão. Os

resultados foram expressos como porcentagem da dose injetada por grama de tecido (% DI/g), calculados pela seguinte equação:

$$\% DI/g = \frac{cpm/g \text{ de tecido}}{cpm/g \text{ da atividade padrão}} \times 100$$

2.2.10 Imagens cintilográficas dos radiofármacos livres ($^{99m}\text{Tc-DTPA}$, $^{99m}\text{Tc-Fitado de Sódio}$) e dos SpHL radiomarcados (SpHL- $^{99m}\text{Tc-DTPA}$, SpHL- $^{99m}\text{Tc-Fitado de Sódio}$) em animais com foco inflamatório

O $^{99m}\text{Tc-DTPA}$, SpHL- $^{99m}\text{Tc-DTPA}$, $^{99m}\text{Tc-Fitado de Sódio}$ e SpHL- $^{99m}\text{Tc-Fitado de Sódio}$ foram injetados na veia caudal de ratos machos Wistar (n=3) os quais apresentavam sítio de inflamação asséptica [Zimosan a 5%(p/v)] no músculo da pata anterior esquerda e injeção de NaCl a 0,9% (p/v) no músculo da pata anterior direita, utilizada como músculo controle. Nos tempos de 2, 4 e 8 horas após a injeção dos radiofármacos, os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina (8 mg/kg) e cetamina (60 mg/kg), colocados em decúbito dorsal sob uma gama câmara (Nuclide™ TH 22, Mediso, Hungria) – (Figura 17) equipada com um colimador de baixa energia e alta resolução. Utilizou-se uma janela de $\pm 10\%$ centrada em 140 keV e as imagens foram obtidas (300.000 contagens) e, armazenadas, em uma matriz de 256 x 256 pixels. As análises quantitativas das imagens foram realizadas conforme descrito por Diniz e colaboradores (2008). As imagens foram analisadas determinando-se a radioatividade nas regiões de interesse (ROIs) pelo delineamento ao redor da área alvo (músculo inflamado) e da área não alvo (músculo contralateral), obtendo-se desta forma, a relação alvo/não alvo.



Figura 17. Gama câmara Nuclide™ TH 22, Mediso
(Fonte: Laboratório de Radioisótopos/UFMG)

2.3 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram apresentados como média \pm desvio padrão (d.p.) Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste t e/ou por análise de variância (ANOVA) one-way, corrigidos pelo teste de comparação múltipla de Tukey usando o programa GraphPad Prism 5. Para todas as análises adotou-se o intervalo de confiança de 95%, sendo que as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização dos SpHL-^{99m}Tc-DTPA

A pureza radioquímica do ^{99m}Tc-DTPA encontrada foi maior que 96% em todas as marcações efetuadas, ou seja, no mínimo 96% dos átomos de ^{99m}Tc se ligaram às moléculas de DTPA. Segundo Saha (2004) no radiofármaco ^{99m}Tc -DTPA o estado de oxidação do ^{99m}Tc é +4 e a pureza radioquímica obtida é, geralmente, maior que 95%. Portanto, a eficiência de marcação do radiofármaco está dentro dos parâmetros determinados na literatura.

O diâmetro médio e o índice de polidispersão dos SpHL brancos obtidos pelo método de hidratação do filme lipídico seguido de extrusão foram, respectivamente, $122,7 \pm 5,6$ nm e $0,09 \pm 0,02$ (n=5). Após a liofilização na presença de glicose como crioprotetor [proporção crioprotetor:fosfolípide (p/p) 5:1] e a reconstituição do pó seco com ^{99m}Tc-DTPA obtendo-se os SpHL radiomarcados, o diâmetro médio e o índice de polidispersão das vesículas lipossomais, foi de $207,4 \pm 8,5$ nm e $0,29 \pm 0,01$ (n=5), respectivamente, mostrando uma boa homogeneidade do sistema. Diante desses resultados, nota-se que a glicose foi capaz de manter as vesículas com tamanho adequado para o uso na identificação de focos inflamatórios. O diâmetro pequeno (≤ 500 nm) dos lipossomas é importante para o seu extravasamento da corrente sanguínea numa região caracterizada por um maior fluxo sanguíneo e um aumento da permeabilidade vascular, como ocorre na região inflamada (LASIC, 1998; YUAN *et al.*, 1995; CROMMELIN *et al.*, 1999; ERDOGAN *et al.*, 2000). Ao contrário, lipossomas grandes não se acumulam em sítios inflamatórios uma vez que são rapidamente retirados da circulação pelos órgãos do SFM (OYEN *et al.*, 1996).

A porcentagem de encapsulação do ^{99m}Tc-DTPA nos SpHL foi de $10,65 \pm 2,15\%$ (n=5), utilizando o método de desidratação/reidratação. Para os SpHL de 20 mM foi realizada a quantificação do complexo adsorvido na membrana das vesículas. Os resultados mostraram um teor de adsorção de $4,88 \pm 0,56\%$. Desta forma, foi possível determinar que o valor real de encapsulação do complexo ^{99m}Tc-DTPA nos SpHL foi igual a 5,77%.

Segundo Kirby e Gregoriadis (1984) o método de desidratação/reidratação é capaz de fornecer teores de encapsulação em torno de 40 a 50%. Porém, Phan e colaboradores (2005) encontraram um percentual de encapsulação do ^{99m}Tc-DTPA em lipossomas de, aproximadamente, 7%. Portanto, a porcentagem de encapsulação obtida nesse trabalho,

mostrou-se próxima aos valores encontrados na literatura. Vale ressaltar que a cintilografia é um exame baseado no rastreamento da radioatividade injetada, logo, a quantidade de ^{99m}Tc -DTPA presente nos SpHL foi suficiente para a visualização do foco inflamatório, permitindo a sua localização e extensão conforme pode ser observado na Figura 30.

O potencial zeta dos SpHL- ^{99m}Tc -DTPA apresentou um valor de $13,60 \pm 0,43$ mV (n=3), não apresentando diferença estatisticamente significativa quando comparado com o potencial zeta dos SpHL brancos ($13,63 \pm 0,89$ mV), conforme dados da Tabela 2, item 3.1 do capítulo 1. Esses dados indicam que a encapsulação do ^{99m}Tc -DTPA nos SpHL contendo aPEG₂₀₀₀-DSPE/DOPE/CHEMS não afetou a sua carga superficial, mantendo-a em um valor positivo, conforme relatado por Zalipsky e colaboradores (1994).

3.2 Caracterização dos SpHL- ^{99m}Tc -Fitato de Sódio

O radiofármaco ^{99m}Tc -Fitato de Sódio apresentou uma pureza radioquímica média de 92% para todas as marcações realizadas. Segundo dados de marcação desse produto pelo IPEN, a pureza radioquímica obtida é em torno de 90%. Portanto, a eficiência de marcação do radiofármaco está dentro dos parâmetros determinados pelos fabricantes.

O teor de encapsulação do ^{99m}Tc -Fitato de Sódio nos SpHL foi de $14,43 \pm 3,08\%$ (n=5), utilizando o método de desidratação/reidratação. Para os lipossomas de 20 mM foi realizada a quantificação do complexo adsorvido na membrana das vesículas. Os resultados mostraram um teor de adsorção de $6,25 \pm 0,66\%$. Desta forma, foi possível determinar que o valor médio de encapsulação do complexo ^{99m}Tc -Fitato de Sódio nos SpHL foi igual a 8,18%.

O coeficiente de partição foi determinado em triplicata, utilizando os solventes octanol e água, e o complexo ^{99m}Tc -Fitato de Sódio apresentou valores inferiores a zero (-2.82 ± 0.32) sugerindo caráter hidrofílico para o composto formado. Portanto, a encapsulação na cavidade aquosa dos SpHL é viável utilizando-se o método de desidratação/reidratação. Não foi encontrado na literatura estudos que utilizam SpHL marcados com ^{99m}Tc -Fitato de Sódio, no entanto, pode-se considerar o teor de encapsulação (8,18%) como satisfatório para os estudos de biodistribuição e para a obtenção de imagens cintilográficas em animais com foco inflamatório.

O diâmetro médio, o índice de polidispersão e o potencial zeta dos lipossomas brancos obtidos pelo método de hidratação do filme lipídico seguido de extrusão e dos SpHL liofilizados na presença de glicose como crioprotetor [proporção crioprotetor:fosfolípide (p/v) 5:1] e marcados com ^{99m}Tc -Fitato de Sódio, podem ser vistos na Tabela 5.

Tabela 5. Diâmetro, distribuição do diâmetro das vesículas, IP, e potencial zeta dos SpHL brancos e marcados com ^{99m}Tc -Fitato de Sódio.

Parâmetros analisados	SpHL-brancos	SpHL- ^{99m}Tc -Fitato de Sódio
Diâmetro (nm)	121,1 ± 3,5*	293,1 ± 10,4*
Distribuição do diâmetro das vesículas (%)	≤ 200 nm	99,7 ± 3,2
	≤ 350 nm	99,3 ± 0,2
	≤ 500 nm	99,9 ± 0,1
Índice de polidispersão (IP)	0,09 ± 0,03	0,39 ± 0,01
Potencial zeta (mV)	13,63 ± 0,89	14,56 ± 0,28

Valores são expressos pela média ± d.p. (n = 3). *Indica uma diferença estatisticamente significativa entre as duas formulações (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

Após a liofilização na presença de glicose como crioprotetor [proporção crioprotetor:fosfolípide (p/p) de 5:1] e a reconstituição do pó seco com ^{99m}Tc -Fitato de Sódio obtendo-se os SpHL radiomarcados, o diâmetro médio e o índice de polidispersão das vesículas lipossomais foram de 293,1 ± 10,4 nm e 0,39 ± 0,01 (n=3), respectivamente. O sistema não pode ser considerado monodisperso de acordo com o valor de IP encontrado. Estudos têm demonstrado que os lipossomas de circulação prolongada podem ser passivamente direcionados para vários tumores e sítios inflamatórios e/ou infecciosos, pelo fato de circularem por maior tempo e extravasar nos tecidos com permeabilidade vascular elevada (CARVALHO-JÚNIOR *et al.* 2007_a; LAVERMAN *et al.*, 2001; ERDOGAN *et al.*, 2000; BOERMAN *et al.*, 1995; BOERMAN *et al.*, 1997; OYEN *et al.*, 1996; GOINS *et al.*, 1993; BAKKER-WOUDENBERG *et al.*, 1993). Regiões de infecção e inflamação têm capilares com permeabilidade aumentada e o diâmetro dos poros desses capilares pode se estender de 100 a 800 nm (BATISTA *et al.*, 2007). Estudos realizados por Lasic (1998), Yuan e colaboradores (1995) mostraram que nanopartículas com diâmetros menores ou iguais a 500 nm podem extravasar-se e serem acumuladas em regiões com aumento da permeabilidade vascular. Portanto, os resultados obtidos evidenciaram uma porcentagem considerável de SpHL- ^{99m}Tc -Fitato de Sódio com diâmetros menores que 350 nm (80%), permitindo o seu extravasamento pelos poros capilares. Essa porcentagem de vesículas radiomarcadas pode

ser considerada suficiente para que o acúmulo no sítio inflamatório seja visualizado nas imagens cintilográficas.

O potencial zeta dos SpHL-^{99m}Tc-Fitado de Sódio encontrado ($14,56 \pm 0,28$ mV) não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos SpHL brancos ($13,63 \pm 0,89$ mV), mostrando que a encapsulação do ^{99m}Tc-Fitado de Sódio nas vesículas contendo o lípide aPEG₂₀₀₀-DSPE mantém a carga superficial positiva, conforme estudos realizados por Carmo e colaboradores (2008_b).

3.3 Teor e eficiência de encapsulação

Os testes realizados para avaliar o teor de encapsulação mostraram que a quantidade de ^{99m}Tc-DTPA encapsulado em SpHL aumentou ligeiramente com o aumento da concentração lipídica de 20 para 40 mM e diminuiu discretamente na concentração de 60 mM. Porém, essas alterações não foram estatisticamente significativas, mostrando que o teor de encapsulação para este radiofármaco, provavelmente, tenderá a atingir um limite máximo, em aproximadamente 12%, conforme observado na Figura 18.

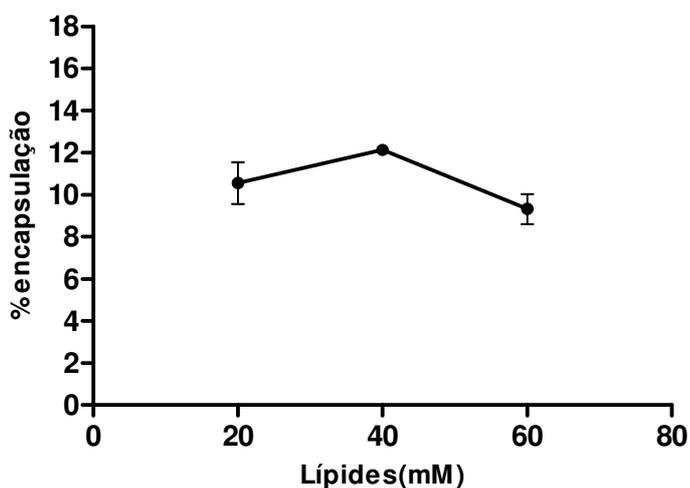


Figura 18. Teor de encapsulação, em presença de glicose [proporção crioprotetor:fosfolípide (p/p) 5:1], do complexo ^{99m}Tc-DTPA em SpHL em diferentes concentrações lipídicas (n=3).

Os resultados da Tabela 6 mostram que houve diferença estatisticamente significativa no diâmetro das vesículas em todas as concentrações lipídicas testadas, sendo que as vesículas de 60 mM apresentaram menor tamanho e um sistema mais homogêneo segundo o valor de

IP. Além disso, nessa concentração, a porcentagem de vesículas menores do que 200 nm foi maior (80,5%) quando comparada com as concentrações de 20 mM e 40 mM (45,3% e 54,5%, respectivamente). Porém, o teor de encapsulação não foi diferente para as três concentrações lipídicas testadas, conforme os resultados da Figura 18, ficando em torno de 12%. Uma explicação para este fato seria que, aumentando a concentração de lípidos, aumenta-se o número de vesículas de menor tamanho fazendo com que uma quantidade menor de moléculas de ^{99m}Tc -DTPA sejam encapsuladas, ou seja, tem-se vesículas de 60 mM sem o radiofármaco encapsulado. O fato de que o teor de encapsulação não se altera de 20 mM para 60 mM corrobora esta explicação.

O cálculo da eficiência de encapsulação mostrou que os SpHL na concentração lipídica de 20 mM apresentaram maior eficiência quando comparado com as demais concentrações testadas em presença de glicose como crioprotetor [proporção crioprotetor:fosfolípide (p/p) de 5:1] - (Tabela 7). Portanto, essa concentração lipídica foi a de escolha para os testes *in vivo*, devido à utilização de menor quantidade de lípidos quando comparado com as outras concentrações, resultando em um menor custo para a obtenção de SpHL.

Tabela 6. Diâmetro, IP e distribuição de diâmetros dos SpHL- ^{99m}Tc -DTPA em diferentes concentrações lipídicas, após liofilização na presença de glicose como crioprotetor [proporção crioprotetor:fosfolípide (p/p) 5:1].

[Lípides]	Diâmetro (nm)	IP	Distribuição do diâmetro das vesículas (%)		
			≤ 200 nm	≤ 350 nm	≤ 500 nm
20 mM					
*(135 nm; IP 0,163)	214,7 [#] ± 12,1	0,29 ± 0,02	45,3 ± 8,5	83,8 ± 4,9	94,7 ± 0,1
40 mM					
*(140,5 nm; IP 0,087)	180,7 [#] ± 3,4	0,18 ± 0,02	54,5 ± 0,1	94,5 ± 0,1	98,9 ± 0,1
60 mM					
*(128,3 nm; IP 0,122)	140,1 [#] ± 3,1	0,18 ± 0,02	80,5 ± 0,1	98,5 ± 0,7	99,7 ± 0,1

*Diâmetro e IP das vesículas antes da liofilização. [#]Indicam diferença estatisticamente significativa entre as concentrações lipídicas. Os resultados foram expressos como média ± d.p. (n=3).

Tabela 7. Teor e eficiência de encapsulação do ^{99m}Tc -DTPA em SpHL em diferentes concentrações lipídicas na presença de glicose como crioprotetor, proporção crioprotetor:fosfolípide (p/p) de 5:1.

Concentração lipídica	Teor de encapsulação (%)	Dosagem de Fosfolípides (mmol)	Eficiência de encapsulação (% encapsulação/mol de fosfolípides)
20 mM	10,54 ± 1,73	11,87 ± 1,16	0,89 ± 0,07
40 mM	12,12 ± 0,27	22,42 ± 1,50	0,54 ± 0,04
60 mM	9,31 ± 1,22	36,03 ± 2,88	0,26 ± 0,01

Valores são expressos pela média ± d.p. (n = 3).

3.4 Perfil de liberação para os SpHL- ^{99m}Tc -DTPA

A Figura 19 apresenta o perfil de liberação do complexo ^{99m}Tc -DTPA em SpHL. Os resultados mostraram uma grande liberação do radiofármaco já nas primeiras 2 horas de incubação (71%) não havendo alterações significativas até o tempo de 8 horas. Isto pode ser explicado pelo fato de que, aproximadamente, 50% do radiofármaco supostamente “encapsulado” encontravam-se adsorvidos na superfície das vesículas permanecendo o restante na cavidade aquosa, como mostra o resultado obtido no item 3.1. Segundo Környei e Zolle (2007) o DTPA forma um complexo com carga negativa ao se ligar ao ^{99m}Tc reduzido, em solução neutra ou fracamente acidificada. Portanto, especula-se que a carga negativa do DTPA associa-se com a carga positiva da superfície dos lipossomas contendo aPEG₂₀₀₀-DSPE/DOPE/CHEMS, fazendo com que uma grande quantidade de moléculas de ^{99m}Tc -DTPA permaneça adsorvida na superfície dos lipossomas, sendo liberadas na corrente sanguínea com o passar do tempo. Provavelmente, o plasma age como uma força motriz que promove a liberação do material encapsulado adsorvido na superfície de nanoestruturas (PEREIRA *et al.*, 2008).

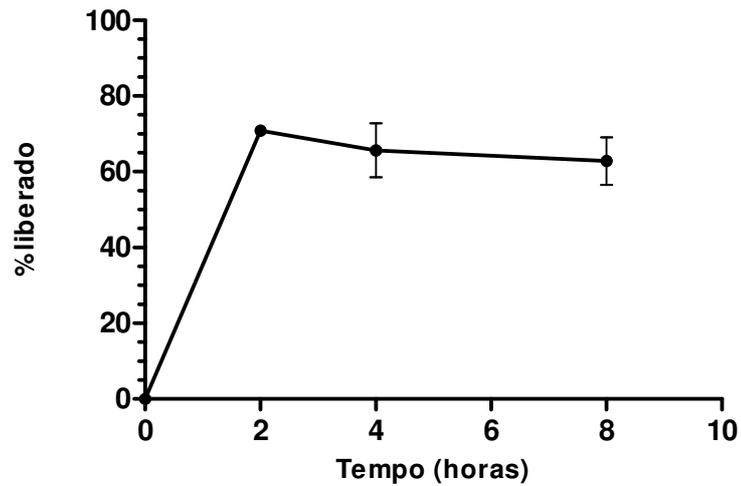


Figura 19. Perfil de liberação do complexo ^{99m}Tc -DTPA em SpHL em diferentes tempos (n=3).

3.5 Perfil de liberação para os SpHL- ^{99m}Tc -Fitato de Sódio

A Figura 20 apresenta o perfil de liberação do complexo ^{99m}Tc -Fitato de Sódio em SpHL. Os resultados demonstraram uma liberação de 9,7% do radiofármaco após 2 horas de incubação em plasma de rato.

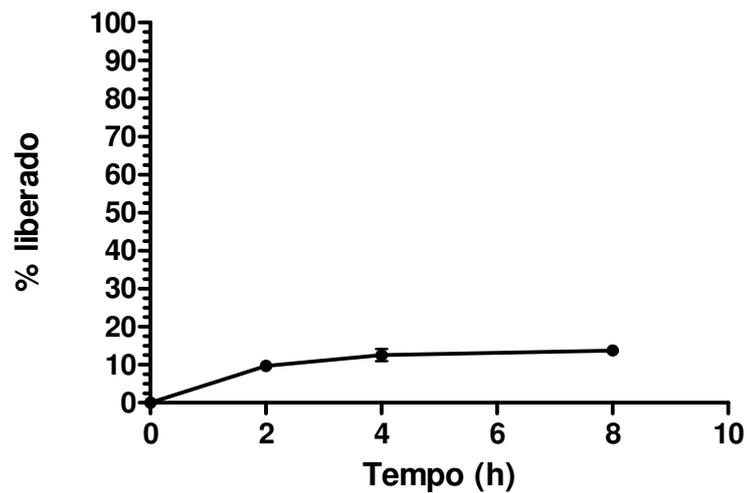


Figura 20. Perfil de liberação do complexo ^{99m}Tc -Fitato de Sódio em SpHL em diferentes tempos (n=3).

Em estudos realizados com nanocápsulas, alguns autores têm atribuído essa porcentagem de liberação inicial à droga adsorvida na superfície das nanoestruturas (MOSQUEIRA *et al.*, 2001, 2006; PEREIRA *et al.*, 2008). Logo, parte considerável da liberação do ^{99m}Tc -Fitato de Sódio dos SpHL (9,7%) nas 2 primeiras horas pode ser devido à quantidade do radiofármaco adsorvida na superfície dos lipossomas, conforme descrito no item 3.2 desse capítulo (6,25%). Após este tempo, observa-se uma liberação de aproximadamente 13% que se mantém constante até o tempo de 8 horas. Portanto, considerando o intervalo de tempo compreendido entre 2 e 8 horas observa-se uma liberação adicional de 4,1%. Conclui-se que, a liberação total foi da ordem de 13%, ou seja, mostrando que aproximadamente 87% da radioatividade permaneceram no interior das vesículas. Os resultados obtidos por De Oliveira (1999) mostraram que 25% de oligonucleotídeos encapsulados em SpHL foram liberados das vesículas durante os primeiros 15 minutos de incubação em plasma de camundongos, não sofrendo alterações até o tempo de 1 hora pós incubação. Estudos de liberação de cisplatina encapsulada em SpHL previamente conduzidos por Carvalho-Júnior e colaboradores (2007_b) relataram que 70% do fármaco permaneceram no interior dos SpHL após 30 minutos de incubação a 37°C em plasma de camundongos. Portanto, no presente trabalho, a liberação de, aproximadamente, 13% de ^{99m}Tc -Fitato de Sódio dos SpHL em um intervalo de 8 horas após a incubação a 37°C em plasma de ratos encontra-se próxima aos valores encontrados na literatura.

3.6 Estudos de estabilidade do kit de SpHL liofilizados contendo glicose como crioprotetor [proporção crioprotetor:fosfolípide (p/p) de 5:1]

Nos estudos de estabilidade dos kits armazenados em geladeira (4°C) não foi observado um aumento significativo no diâmetro das vesículas lipídicas ($p > 0,05$) até 180 dias de estocagem (Figura 21). Em todos os tempos avaliados o diâmetro médio das vesículas foi inferior a 300 nm, o que é relevante para garantir a segurança na administração intravenosa e para o extravasamento na região inflamatória (AWASTHI *et al.*, 2003; ERDOGAN *et al.*, 2000). O teor de encapsulação tanto para o ^{99m}Tc -DTPA como para o ^{99m}Tc -Fitato de Sódio, foram similares em todos os tempos estudados (em torno de 10% e 14%, respectivamente), não apresentando diferenças estatisticamente significativas entre os tempos avaliados.

Por outro lado, os lipossomas armazenados a TA apresentaram um aumento gradativo do diâmetro das vesículas, chegando a medir 428 nm, 180 dias após a estocagem. A partir de 90

dias, o aumento de tamanho já apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao tamanho inicial dos SpHL e também em relação ao tamanho das vesículas acondicionadas a 4°C. O teor de encapsulação, para ambos os radiofármacos avaliados, aumentou de acordo com o aumento do diâmetro das vesículas lipídicas, chegando a 17% 180 dias após a estocagem.

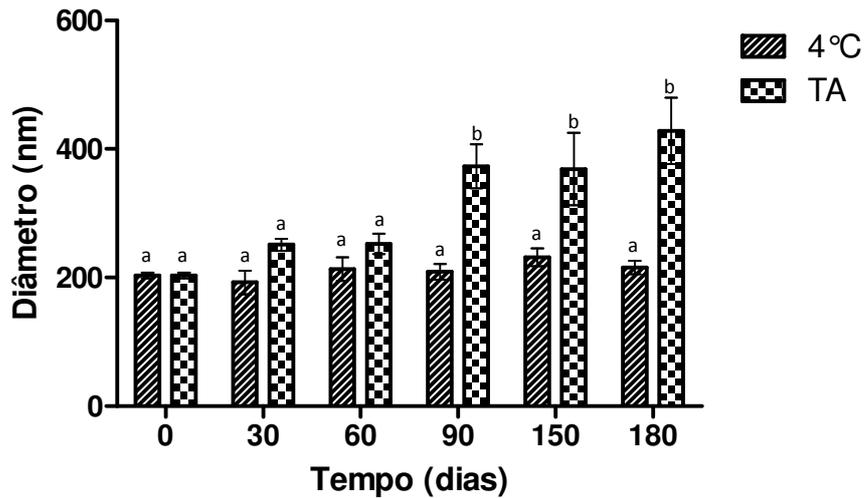


Figura 21. Diâmetro das vesículas para os SpHL liofilizados armazenados em geladeira (4°C) e em temperatura ambiente (TA) - (n=3). Letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

A análise visual dos kits liofilizados pode ser observada na Figura 22. O pellet permaneceu íntegro naqueles kits que foram armazenados a 4°C durante todo o tempo de investigação. Porém, nos kits acondicionados em TA, o pellet sofreu um colapso, apresentando várias rachaduras e adquirindo uma coloração amarelada atípica. Vale ressaltar que os SpHL liofilizados foram envasados a vácuo.

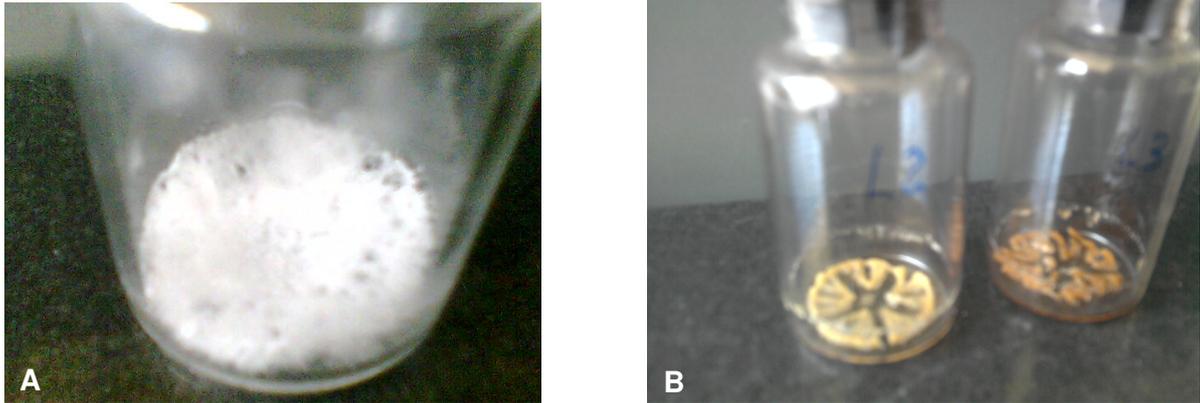


Figura 22. Análise visual dos kits de SpHL liofilizados na presença de glicose como crioprotetor [proporção crioprotetor:fosfolípide (p/p) de 5:1]. **A** – kit armazenado a 4°C, 180 dias após a estocagem. **B** – kit armazenado em TA, 180 dias após a estocagem.

Segundo Koster e colaboradores (2000) o efeito de crioproteção dos açúcares depende da temperatura de transição vítrea (T_g) dos mesmos. Esses solutos, quando no estado vítreo, promovem um aumento da resistência mecânica oferecida pelo açúcar dificultando a redução do espaçamento entre as membranas sob condições de estresse compressivo, evitando, portanto, a fusão das mesmas. Sabe-se que a T_g da glicose é de 30°C, portanto, em temperatura ambiente (26°C), esse açúcar pode encontrar-se no seu estado cristalino e assim, não exercer o seu papel de crioproteção de forma eficiente. Esse fato poderia explicar o aumento do diâmetro das vesículas armazenadas em TA. A cor amarelada do pellet de SpHL armazenados nessa temperatura pode ser devida à reação de Maillard, que ocorre entre açúcares e compostos contendo grupo amino (aPEG₂₀₀₀-DSPE), levando à alteração da cor (ROWE *et al.*, 2006).

3.7 Depuração plasmática em animais sadios

3.7.1 Depuração plasmática do ^{99m}Tc-DTPA e SpHL-^{99m}Tc-DTPA

O ^{99m}Tc-DTPA quando administrado em ratos machos Wistar, sadios, apresentou rápida depuração sanguínea. O tempo de meia-vida plasmático ($T_{1/2}$) determinado foi de 9,2 minutos e a área sob a curva (ASC) igual a 21,8. Foi feito um gráfico de %DI/g X tempo para os pontos de 30 e 90 minutos com o objetivo de linearizar o processo de decaimento. Foi calculada a inclinação da reta através do gráfico, utilizando-se logaritmo na base 10 para os

valores de %DI/g e, com esse valor, encontrou-se um tempo de meia-vida plasmático de 28,99 minutos provando o comportamento bifásico do ^{99m}Tc -DTPA no sangue.

Quando o perfil de depuração sanguínea dos SpHL- ^{99m}Tc -DTPA foi avaliado também em animais saudáveis, observou-se uma depuração mais lenta em relação à droga livre. O tempo de meia-vida plasmático ($T_{1/2}$) determinado foi de 15,1 minutos e a área sob a curva (ASC) foi igual a 138,7. A curva de depuração do ^{99m}Tc -DTPA livre e encapsulado em SpHL é demonstrada na Figura 23.

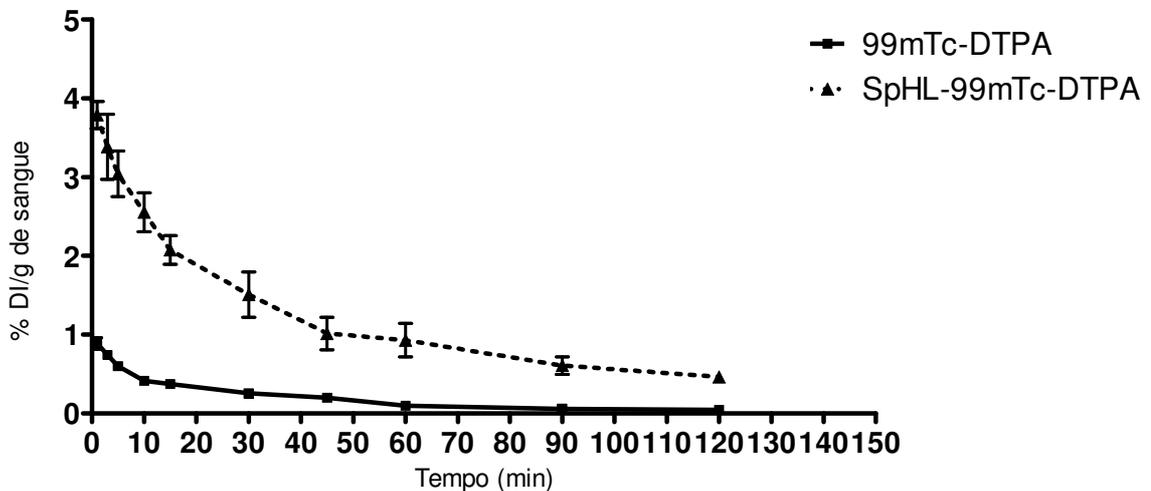


Figura 23. Depuração plasmática para o complexo ^{99m}Tc -DTPA livre e encapsulado em SpHL, em animais saudáveis ($n=3$).

A análise da área sob a curva (ASC) para os SpHL- ^{99m}Tc -DTPA, relatado na Figura 23, mostrou um valor 6,4 vezes maior do que aquele obtido para o ^{99m}Tc -DTPA livre, sugerindo que a formulação foi capaz de aumentar o tempo de circulação do radiotraçador podendo, desta forma, contribuir para a obtenção de imagens cintilográficas. Sabe-se que, este tipo de lipossoma pode ser passivamente direcionado para o sítio de inflamação, pelo fato desse local apresentar capilares com permeabilidade aumentada, facilitando o extravasamento das vesículas (BATISTA *et al.*, 2007)

3.7.2 Depuração plasmática do ^{99m}Tc -Fitato de Sódio e SpHL- ^{99m}Tc -Fitato de Sódio

A curva de depuração do ^{99m}Tc -Fitato livre e encapsulado em SpHL é demonstrada na Figura 24.

O ^{99m}Tc -Fitato de Sódio quando administrado em ratos machos Wistar, sadios, apresentou uma depuração sanguínea relativamente rápida. O tempo de meia-vida plasmático ($T_{1/2}$) determinado foi de 2,7 minutos e a área sob a curva (ASC) de 34,2. Segundo Abdel-Dayem e colaboradores (1988), os sistemas coloidais possuem meia-vida plasmática de 2 a 6 minutos, sendo rapidamente depurados da corrente sanguínea. Portanto, os resultados obtidos encontram-se dentro dos valores relatados pela literatura.

Quanto ao perfil de depuração sanguínea dos SpHL- ^{99m}Tc -Fitato de Sódio observou-se uma depuração mais lenta em relação à droga livre. O tempo de meia-vida plasmático ($T_{1/2}$) determinado foi de 5,7 minutos e a área sob a curva (ASC) foi igual a 119,7. A análise da área sob a curva (ASC) para os SpHL- ^{99m}Tc -Fitato de Sódio, relatado na Figura 24, mostrou um valor 3,5 vezes maior do que aquele obtido para o ^{99m}Tc -Fitato de Sódio livre, sugerindo que a formulação promoveu um aumento no tempo de circulação do radiotraçador podendo, desta forma, biodisponibilizar por mais tempo o radiofármaco na corrente sanguínea.

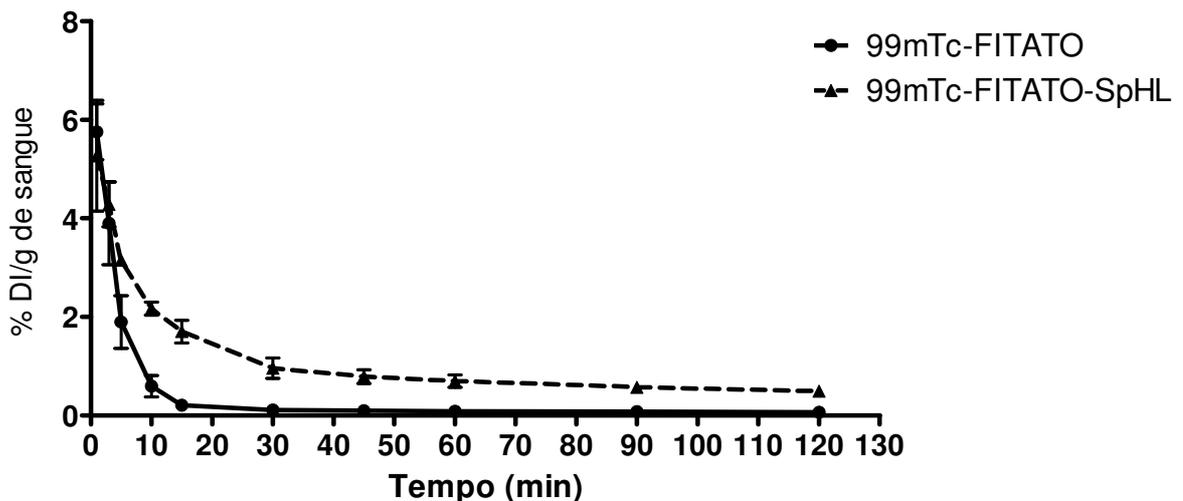


Figura 24. Depuração plasmática para o complexo ^{99m}Tc -Fitato de Sódio livre e encapsulado em SpHL, em animais sadios (n=3).

Comparando-se o tempo de meia-vida plasmática dos radiofármacos livres nota-se que o ^{99m}Tc -Fitato de Sódio é retirado mais rapidamente da corrente sanguínea (meia-vida plasmática de 2,7 minutos) do que o ^{99m}Tc -DTPA (meia-vida plasmática de 9,2 minutos). Sabe-se que o ^{99m}Tc -DTPA é um radiofármaco comumente utilizado para estudos da função renal. Após a administração intravenosa, a fração de filtração na primeira passagem é de 10% a 20% nos pacientes com função renal normal, sendo que o restante recircula pelo organismo. Logo, trata-se de um radiofármaco que permanece por um certo tempo circulando pelo organismo, difundindo-se bastante pelos tecidos. Por outro lado, após a administração intravenosa, as partículas coloidais do ^{99m}Tc -Fitato de Sódio são extraídas do sangue circulante pelas células do SFM, com uma eficiência de extração na primeira passagem de 95% (THRALL e ZIESSMAN, 2001). Portanto, estes fatos explicam o menor tempo de meia-vida plasmática do ^{99m}Tc -Fitato de Sódio.

3.8 Estudos histopatológicos

Após 24 horas da injeção intramuscular de 0,2 mL de uma suspensão de Zimosan a 5% (p/v) foi possível notar um processo inflamatório significativo, observado através da inspeção visual e palpação, apresentando um edema considerável no músculo da pata anterior esquerda quando comparado com o músculo contralateral (Figura 25). Não foi observada a presença de secreção purulenta.

O exame histológico dos músculos das patas anteriores, controle e inflamado, mostrou diferenças significativas entre os tecidos. Sob microscopia óptica, o tecido inflamado apresentou características típicas de inflamação crônica com um intenso infiltrado mononuclear, afrouxamento do tecido conjuntivo e espaços claros devido ao extravasamento vascular de fluidos (Figura 26).



Figura 25. Inflamação do músculo da pata anterior esquerda de rato Wistar, 24 horas após a administração intramuscular de 0,2 mL de suspensão de Zimosan a 5% (p/v). A seta indica o local do foco inflamatório.

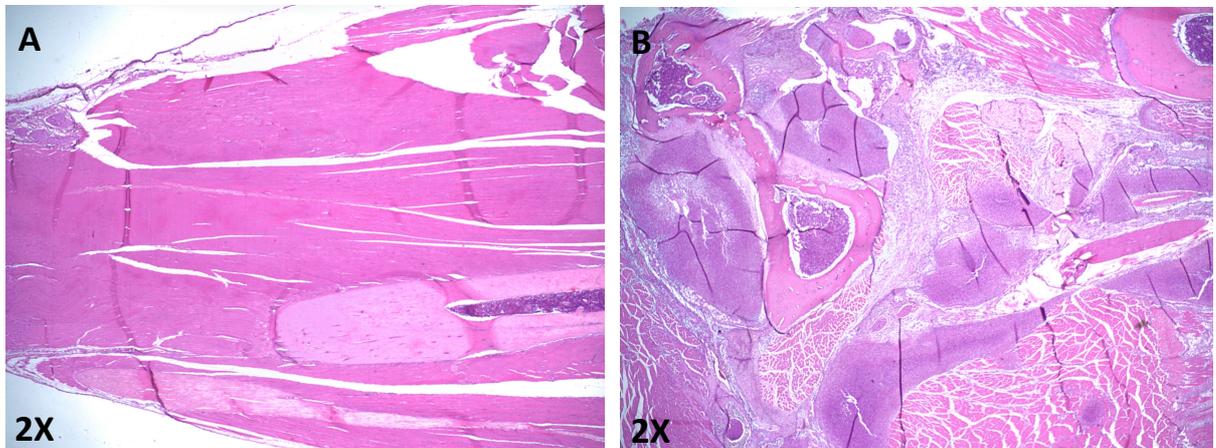


Figura 26. Microfotografias de tecidos do músculo normal (A) e do músculo inflamado (B) de ratos Wistar, 24 horas da injeção intramuscular de solução estéril de NaCl 0,9% (p/v) e suspensão de Zimosan a 5% (p/v), respectivamente. As amostras foram fixadas em formalina tamponada, incluídas em parafina e cortes de 4 μ m foram corados com hematoxilina-eosina (HE).

3.9 Biodistribuição e imagens cintilográficas do complexo ^{99m}Tc -DTPA em animais com foco inflamatório

O perfil de biodistribuição do ^{99m}Tc -DTPA administrado, por via intravenosa, em ratos Wistar com foco inflamatório no músculo da pata anterior esquerda está relacionado na Tabela 8.

Tabela 8. Biodistribuição do ^{99m}Tc -DTPA em ratos com inflamação no músculo da pata anterior esquerda induzida por Zimosan a 5% (p/v).

Órgão	% DI/g de tecido (média \pm d.p.)		
	2h	4h	8h
Fígado	0,051 \pm 0,003 ^a	0,015 \pm 0,004 ^b	0,016 \pm 0,005 ^b
Baço	0,043 \pm 0,005 ^a	0,005 \pm 0,001 ^b	0,006 \pm 0,001 ^b
Rins	0,534 \pm 0,026 ^a	0,270 \pm 0,048 ^b	0,322 \pm 0,057 ^b
Sangue	0,059 \pm 0,007 ^a	0,006 \pm 0,001 ^b	0,007 \pm 0,001 ^b
Músculo controle (pata anterior direita)	0,024 \pm 0,003 ^{*a}	0,006 \pm 0,001 ^{*b}	0,003 \pm 0,001 ^{*b}
Músculo inflamado (pata anterior esquerda)	0,043 \pm 0,005 ^{*a}	0,009 \pm 0,001 ^{*b}	0,008 \pm 0,002 ^{*b}
Relação foco inflamatório/sangue	0,732 \pm 0,069	1,675 \pm 0,398	1,130 \pm 0,309

*Indica uma diferença estatisticamente significativa entre o músculo controle e o músculo inflamado (Teste t, $p \leq 0,05$). ^(a,b)Indicam uma diferença estatisticamente significativa para o mesmo órgão entre os tempos investigados (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$) – (n=5).

O ^{99m}Tc -DTPA acumulou-se principalmente nos rins, atingindo o pico máximo 2 horas após a sua administração por via intravenosa. Esse radiofármaco possui uma meia-vida biológica em torno de 2 horas (THRALL e ZIESSMAN, 2001; KÖRNYEI e ZOLLE, 2007). Isto justifica a baixa fixação do ^{99m}Tc -DTPA em todos os órgãos investigados. Observa-se uma redução significativa da concentração de ^{99m}Tc -DTPA no fígado, baço, rins e sangue entre 2 e 4 horas. Por outro lado, os níveis de radioatividade mantêm-se constante no período de 4 a 8 horas.

No músculo da pata anterior esquerda (inflamado) e no músculo da pata anterior direita (controle) observa-se uma redução significativa da fixação do ^{99m}Tc -DTPA de 2 para 4 horas, mantendo-se constante até 8 horas após a injeção. Porém, 2 horas após a administração do radiofármaco o nível de radioatividade no músculo inflamado (esquerdo) foi 1,8 vezes maior do que no músculo controle (direito) e essa diferença aumenta para 2,6 vezes no tempo de 8

horas. A análise da relação foco inflamatório/sangue revela que no tempo de 2 horas existe ainda radiofármaco circulante, pois a relação apresentou um valor menor que a unidade ($0,732 \pm 0,069$). Por outro lado, nos tempos de 4 e 8 horas essa relação apresentou valores de 1,675 e 1,130, respectivamente, o que significa que o $^{99m}\text{Tc-DTPA}$ está presente em maior quantidade no foco inflamatório, principalmente no tempo de 4 horas, em relação à corrente sanguínea.

O tropismo do $^{99m}\text{Tc-DTPA}$ para sítios inflamatórios foi confirmado por meio das imagens cintilográficas. As imagens obtidas 2, 4 e 8 horas após a administração intravenosa do radiofármaco, em ratos Wistar, mostraram acúmulo de radioatividade na região inflamada (Figura 27). A quantidade de radioatividade nessa região tornou-se mais proeminente em 4 horas, corroborando os resultados obtidos nos estudos de biodistribuição.

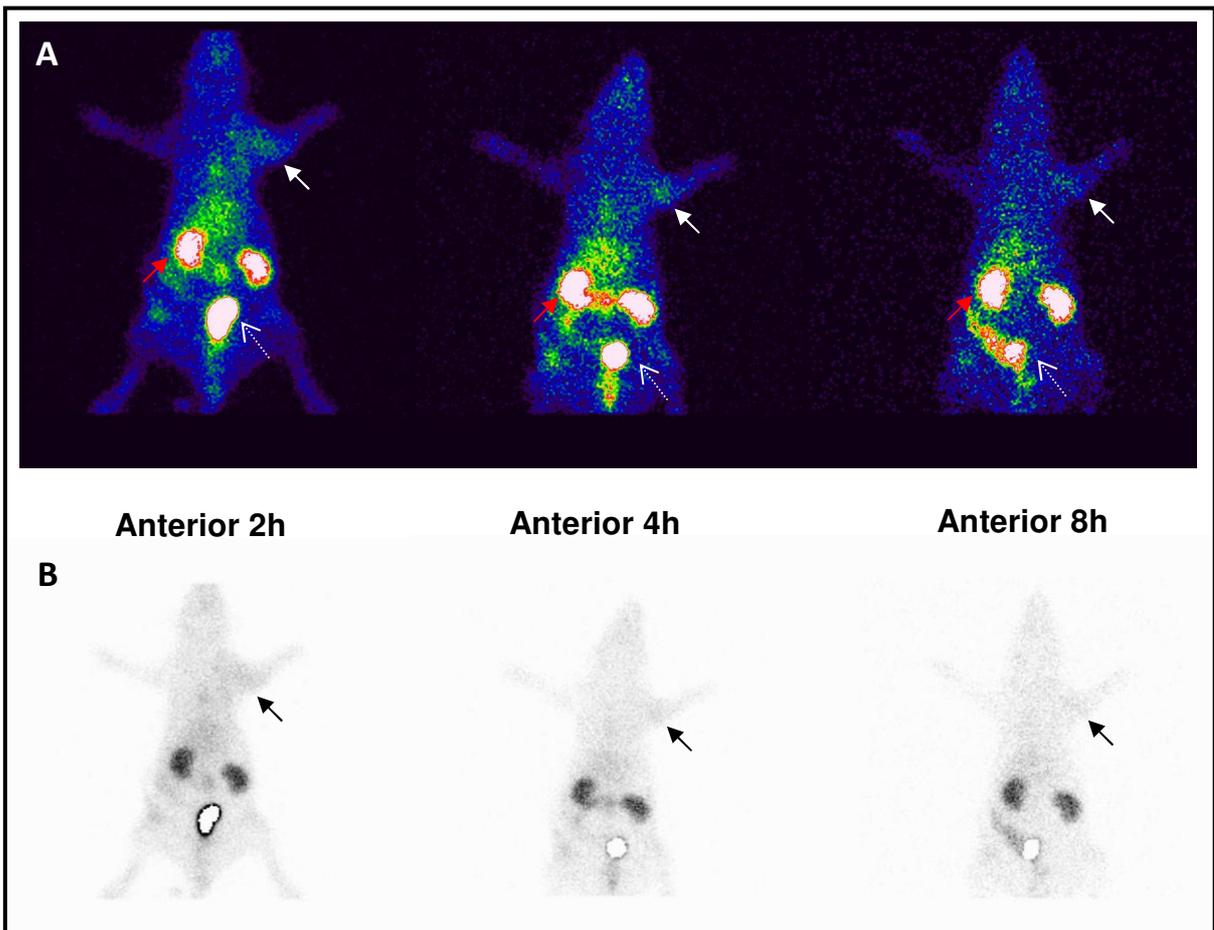


Figura 27. Imagens cintilográficas de rato Wistar com inflamação no músculo da pata esquerda anterior induzida por Zimosan a 5% (p/v), em 2, 4 e 8 horas após a injeção do $^{99m}\text{Tc-DTPA}$ ($n=3$). (A) As setas brancas indicam o foco inflamatório. As setas vermelhas indicam os rins e as setas pontilhadas indicam a bexiga. (B) Imagens em preto e branco, as setas indicam o foco inflamatório.

O radiofármaco também acumulou-se nos rins (seta vermelha) sendo excretado pela bexiga (seta pontilhada) como pode ser observado nas imagens cintilográficas (Figura 27A). A relação alvo/não alvo foi determinada para cada intervalo de tempo (Figura 28) alcançando um valor máximo de $2,66 \pm 0,18$ em 2 horas e apresentando um leve declínio no decorrer do tempo ($2,26 \pm 0,14$ em 8 horas), porém sem diferença estatisticamente significativa entre os tempos investigados. Um radiotraçador adequado para diagnóstico deve apresentar nível suficiente de radioatividade no tecido alvo, ou seja, acima da radiação de fundo do tecido normal. Para identificação de uma região inflamada, a relação alvo/não alvo deve ser de pelo menos, 1,5, o que significa um acúmulo mínimo de 50% a mais do radiofármaco no sítio inflamatório, quando comparado com uma área normal. Desta forma, é possível a aquisição de imagens de melhor qualidade (ERDOGAN *et al.*, 2000; PHILLIPS, 1999). A maior relação alvo/não alvo encontrada (2,66) foi no tempo de 2 horas, fato este que contribui para a identificação do processo inflamatório em um curto espaço de tempo.

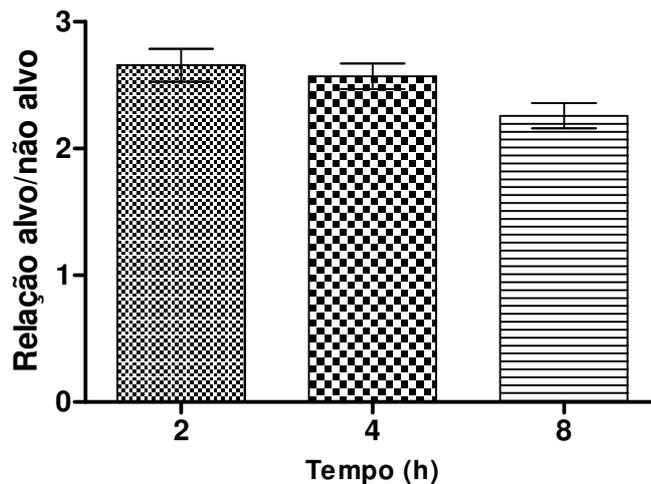


Figura 28. Relação alvo/não alvo (média \pm d.p.) das imagens cintilográficas de ratos injetados com ^{99m}Tc -DTPA após injeção intramuscular de Zimosan a 5% (p/v) - (n=3).

Assim, os resultados obtidos para o ^{99m}Tc -DTPA indicam que este radiofármaco pode acumular-se rapidamente no foco inflamatório, além de ser depurado de forma rápida da circulação sanguínea, permitindo a visualização da lesão. Porém, a alta captação do ^{99m}Tc -DTPA nos rins e bexiga, limita a utilização desse radiofármaco no diagnóstico de processos inflamatórios localizados na região do abdômen (ABDEL-DAYEM *et al.*, 1988).

3.10 Biodistribuição e imagens cintilográficas dos SpHL-^{99m}Tc-DTPA em animais com foco inflamatório

Os resultados obtidos nos estudos de biodistribuição para os SpHL-^{99m}Tc-DTPA, demonstraram acúmulo importante em órgãos do SFM como fígado e baço, conforme descrito na Tabela 9.

Os lipossomas foram fixados principalmente pelo baço, atingindo o pico máximo em 8 horas após a sua administração. Esse acúmulo no baço manteve-se constante até 4 horas após a injeção e sofreu um aumento significativo no tempo de 8 horas. Para o grupo tratado com o ^{99m}Tc-DTPA, o pico de radioatividade também foi atingido as 2 horas após a administração. Entretanto, a quantidade fixada de ^{99m}Tc-DTPA no baço foi 15,6 vezes menor do que a observada para os SpHL-^{99m}Tc-DTPA ($p < 0,0001$). A partir de 4 horas, foi observada uma redução significativa da concentração de ^{99m}Tc-DTPA no baço, como pode ser visto na Tabela 8 do item 3.9. No fígado, a radioatividade após a injeção de SpHL-^{99m}Tc-DTPA aumentou até o tempo de 4 horas mantendo-se praticamente constante a partir de então.

Tabela 9. Biodistribuição dos SpHL-^{99m}Tc-DTPA em ratos com inflamação no músculo da pata anterior esquerda induzida por Zimosan a 5% (p/v).

Órgão	% DI/g de tecido (média ± d.p.)		
	2h	4h	8h
Fígado	0,283 ± 0,040 ^a	0,513 ± 0,027 ^b	0,551 ± 0,083 ^b
Baço	0,673 ± 0,019 ^a	0,716 ± 0,092 ^a	0,901 ± 0,044 ^b
Rins	0,478 ± 0,025 ^a	0,594 ± 0,058 ^a	0,729 ± 0,112 ^b
Sangue	0,099 ± 0,012 ^a	0,015 ± 0,005 ^b	0,028 ± 0,007 ^b
Músculo controle (pata anterior direita)	0,012 ± 0,001 ^{*a}	0,011 ± 0,001 ^{*a}	0,007 ± 0,001 ^{*b}
Músculo inflamado (pata anterior esquerda)	0,026 ± 0,004 ^{*a}	0,018 ± 0,003 ^{*b}	0,013 ± 0,001 ^{*c}
Relação foco inflamatório/sangue	0,269 ± 0,039	1,359 ± 0,406	0,466 ± 0,181

*Indica uma diferença estatisticamente significativa entre o músculo controle e o músculo inflamado (Teste t, $p \leq 0,05$). ^(a,b,c)Indicam uma diferença estatisticamente significativa para o mesmo órgão entre os tempos investigados (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$) – (n=5).

Esses resultados eram esperados considerando que o baço e fígado são os órgãos do SFM responsáveis pela depuração sanguínea de partículas. Resultados semelhantes foram encontrados por Carmo e colaboradores (2007, 2008_a), Carvalho-Júnior e colaboradores (2007_a), Araújo e colaboradores (2011). Nos rins observa-se um acúmulo considerável de radioatividade já no tempo de 2 horas. Isso pode ser explicado pela liberação das vesículas de, aproximadamente, 70% do ^{99m}Tc -DTPA encapsulado dentro de um período de 2 horas. Ainda nos rins, a fixação dos SpHL radiomarcados mostrou um aumento significativo entre 4 e 8 horas, onde atingiu o pico máximo após a sua administração. Por outro lado, o radiofármaco livre apresentou uma queda no acúmulo durante o período de tempo investigado. Esse aumento do acúmulo da radioatividade nos rins pode ser resultado da degradação dos lipossomas no fígado e no baço, resultando na liberação do ^{99m}Tc -DTPA para eliminação renal (PHILLIPS *et al.*, 1992).

No tempo de 2 horas a fixação dos SpHL- ^{99m}Tc -DTPA no músculo inflamado foi 2,16 vezes maior do que no músculo controle, diferença esta maior do que aquela obtida para a droga livre no mesmo tempo investigado (1,8 vezes maior). Nos tempos subseqüentes, 4 e 8 horas, o músculo inflamado mantém uma maior fixação dos SpHL- ^{99m}Tc -DTPA em relação ao controle. Observa-se também que, a redução do acúmulo dos SpHL radiomarcados no músculo inflamado (esquerdo) foi menos pronunciada em relação ao radiofármaco livre, o que comprova mais uma vez que os lipossomas permanecem mais tempo na circulação e, conseqüentemente, mais tempo no foco inflamatório conforme mostra a Figura 29.

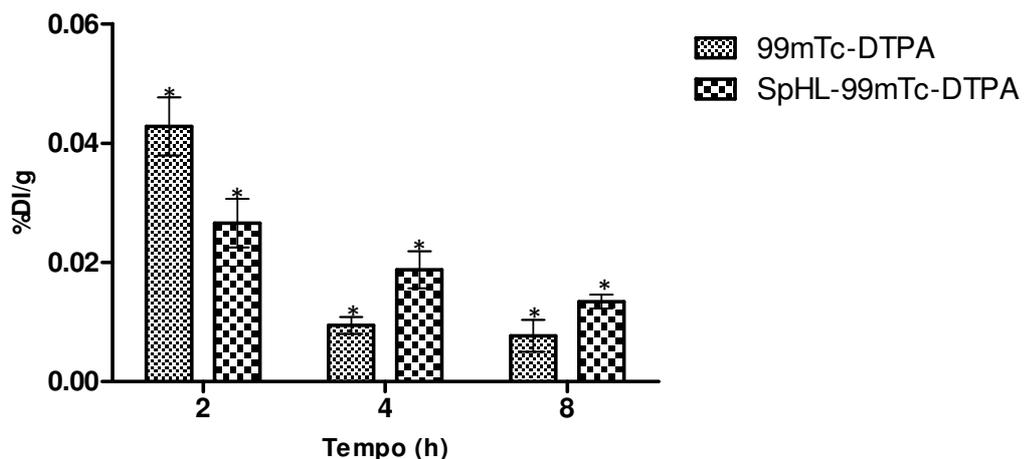


Figura 29. Captação do ^{99m}Tc -DTPA livre e encapsulado em SpHL no músculo da pata anterior esquerda (inflamado) nos tempos de 2, 4 e 8 horas após a sua administração (n=5). *Indicam uma diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos com ^{99m}Tc -DTPA e SpHL- ^{99m}Tc -DTPA (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

As imagens cintilográficas obtidas com os SpHL-^{99m}Tc-DTPA evidenciaram o acúmulo desse radiofármaco no foco inflamatório. A quantidade de radioatividade no músculo da pata anterior esquerda (inflamado) foi significativamente maior em relação ao músculo controle (direito) em todos os tempos investigados (Figura 30). Os SpHL-^{99m}Tc-DTPA foram, também, removidos pelos órgãos do SFM, tais como fígado e baço como pode ser visto nas imagens cintilográficas (seta vermelha).

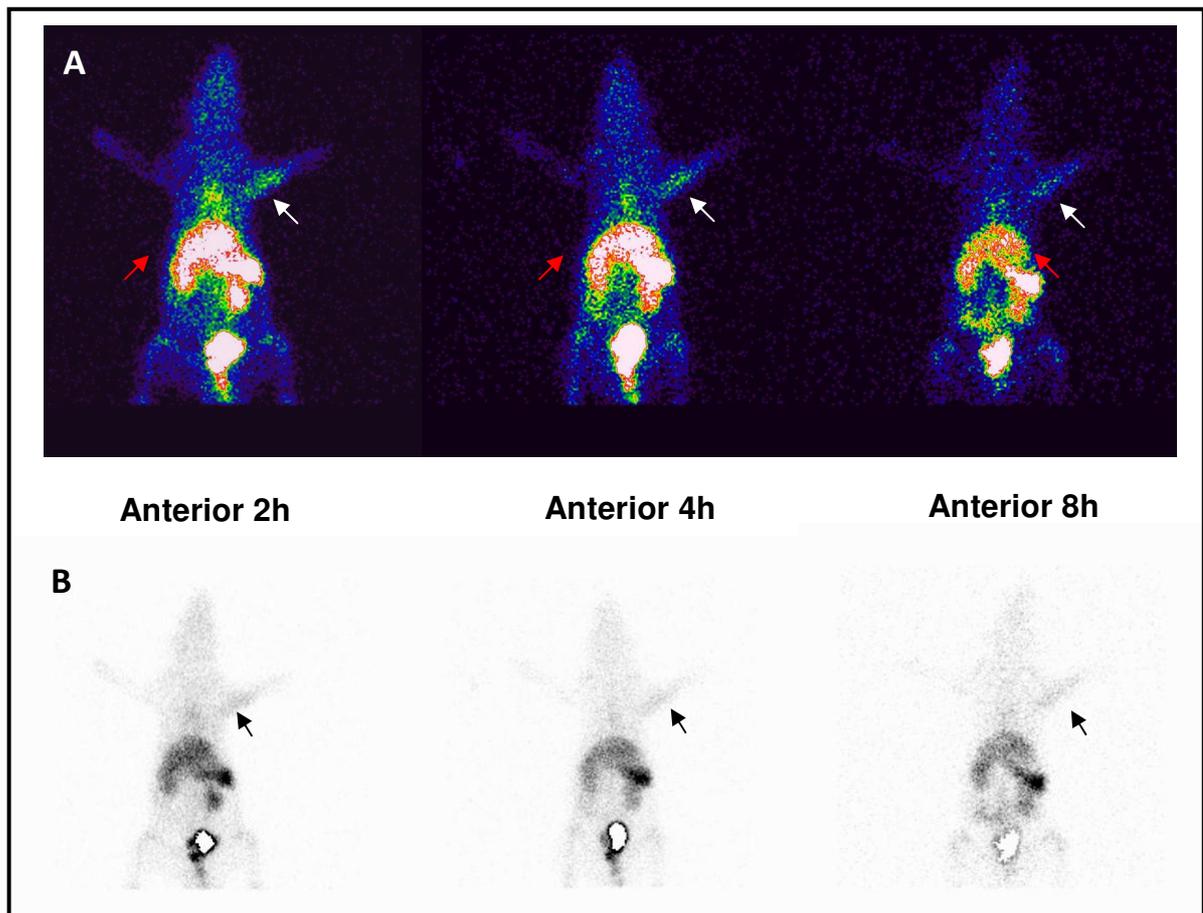


Figura 30. Imagens cintilográficas de rato Wistar com inflamação no músculo da pata anterior esquerda induzida por Zimosan a 5% (p/v), 2, 4 e 8 horas após a injeção dos SpHL-^{99m}Tc-DTPA (n=3). (A) As setas brancas indicam o foco inflamatório. As setas vermelhas indicam órgãos do SFM (fígado e baço). (B) Imagens em preto e branco, as setas indicam o foco inflamatório.

O valor da relação alvo/não alvo foi de $2,91 \pm 0,79$ em 2 horas, não havendo alterações significativas até o tempo de 8 horas após a injeção dos SpHL-^{99m}Tc-DTPA (Figura 31).

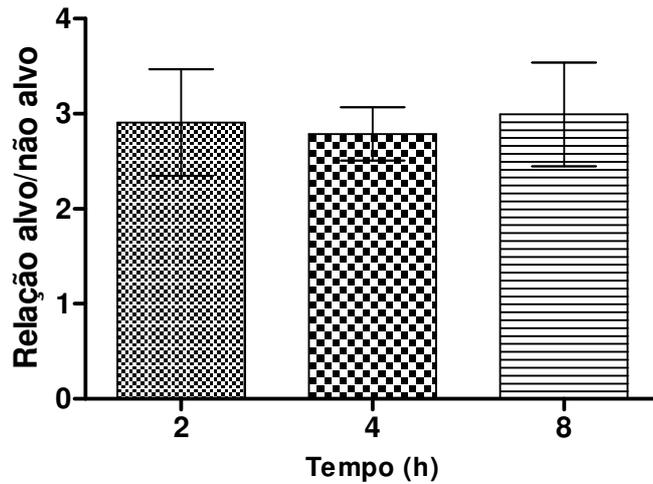


Figura 31. Relação alvo/não alvo (média \pm d.p.) das imagens cintilográficas de ratos injetados com SpHL- ^{99m}Tc -DTPA após injeção intramuscular de Zimosan a 5% (p/v) - (n=3).

Vale ressaltar que a relação alvo/não alvo dos SpHL- ^{99m}Tc -DTPA foi ligeiramente maior do que aquela obtida para o ^{99m}Tc -DTPA em todos os tempos investigados, porém, sem diferença estatisticamente significativa entre os radiofármacos (Figura 32).

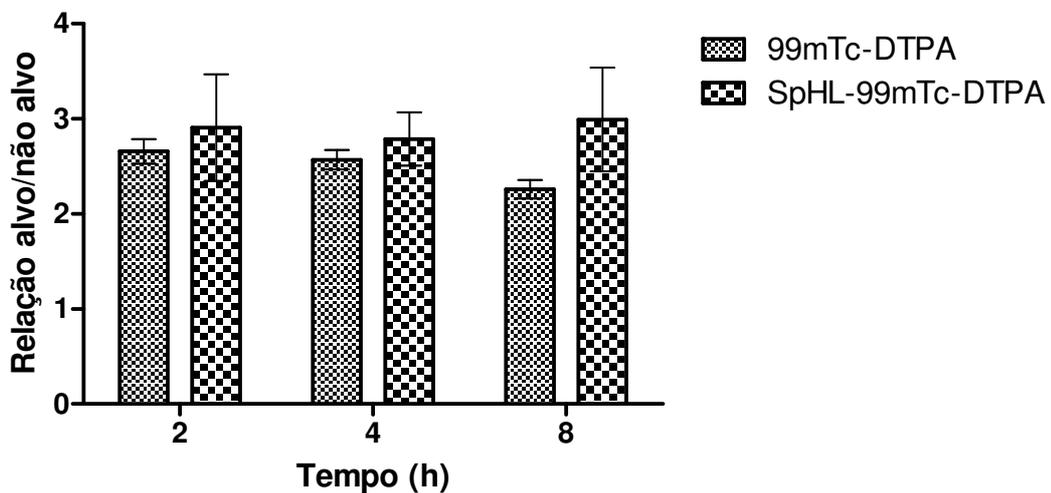


Figura 32. Relação alvo/não alvo (média \pm d.p.) das imagens cintilográficas do ^{99m}Tc -DTPA livre e encapsulado em SpHL (n=3).

Os SpHL são, por si só, uma estratégia para a identificação de sítios inflamatórios como consequência de sua habilidade para liberar, preferencialmente, o radiotraçador nessa região

devido ao seu pH mais baixo quando comparado ao tecido normal (ERDOGAN *et al*, 2000). Os resultados obtidos por Carmo e colaboradores (2007), utilizando SpHL radiomarcados em modelo experimental de inflamação, mostraram relações alvo/não alvo elevadas que apresentaram um constante aumento entre os intervalos de tempo investigados (5,5 em 2 horas; 8,7 em 4 horas e 10,4 em 8 horas). Já os resultados obtidos neste trabalho não mostraram uma relação alvo/não alvo tão elevada, porém, foi suficiente para a identificação da inflamação. Tal diferença pode ser explicada pelo alto teor de encapsulação do radiofármaco ^{99m}Tc -HMPAO nos SpHL obtido por aqueles autores (85%). O radiofármaco ^{99m}Tc -HMPAO possui características lipofílicas, permitindo uma efetiva encapsulação em SpHL pré-formados contendo glutathiona, dispensando, inclusive, a purificação das vesículas por ultracentrifugação. O fato do ^{99m}Tc -DTPA sofrer uma rápida excreção renal pelo organismo seria um ponto favorável para a sua utilização na marcação das vesículas lipídicas, entretanto, o baixo teor de encapsulação e expressiva adsorção do ^{99m}Tc -DTPA na superfície dos SpHL, revelaram que o tipo de SpHL empregados neste trabalho não apresentam as características adequadas para serem marcados com o ^{99m}Tc -DTPA.

3.11 Biodistribuição e imagens cintilográficas do complexo ^{99m}Tc -Fitato de Sódio em animais com foco inflamatório

Os dados de biodistribuição obtidos da contagem de radioatividade nos tecidos dissecados de ratos Wistar apresentando inflamação induzida por Zimosan a 5% (p/v) no músculo da pata anterior esquerda após administração intravenosa de ^{99m}Tc -Fitato de Sódio são mostrados na Tabela 10.

As análises das amostras de sangue indicaram que a quantidade de radioatividade reduziu significativamente de 2 para 4 horas, sofrendo um aumento 8 horas após a injeção. A relação foco inflamatório/sangue mostrou valores maiores do que um durante todos os tempos investigados, sendo observado o maior valor dessa relação no tempo de 8 horas ($3,099 \pm 0,788$). Isso mostra que a quantidade do radiofármaco está três vezes maior no músculo inflamado em relação ao sangue circulante após 8 horas da injeção, ressaltando o tropismo do radiofármaco por esse local.

Tabela 10. Biodistribuição do ^{99m}Tc -Fitato de Sódio em ratos com inflamação no músculo da pata anterior esquerda induzida por Zimosan a 5% (p/v).

Órgão	% DI/g de tecido (média \pm d.p.)		
	2h	4h	8h
Fígado	7,621 \pm 1,085 ^a	8,968 \pm 1,181 ^a	7,061 \pm 1,490 ^a
Baço	1,211 \pm 0,322 ^a	0,781 \pm 0,130 ^a	1,494 \pm 0,436 ^b
Rins	0,101 \pm 0,025 ^a	0,207 \pm 0,019 ^b	0,364 \pm 0,067 ^c
Sangue	0,013 \pm 0,001 ^a	0,008 \pm 0,001 ^b	0,012 \pm 0,002 ^a
Músculo controle (pata anterior direita)	0,006 \pm 0,001 ^{*a}	0,012 \pm 0,002 ^{*b}	0,022 \pm 0,004 ^{*c}
Músculo inflamado (pata anterior esquerda)	0,019 \pm 0,004 ^{*a}	0,031 \pm 0,006 ^{*a}	0,037 \pm 0,011 ^{*b}
Relação foco inflamatório/sangue	1,718 \pm 0,271	1,675 \pm 0,343	3,099 \pm 0,788

*Indica uma diferença estatisticamente significativa entre o músculo controle e o músculo inflamado (Teste t, $p \leq 0,05$). ^(a,b,c)Indicam uma diferença estatisticamente significativa para o mesmo órgão entre os tempos investigados (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$) – (n=5).

Os resultados mostram que o radiofármaco acumulou-se principalmente no fígado e baço, atingindo o pico máximo em 4 horas e 8 horas, respectivamente. No fígado, a %DI/g do ^{99m}Tc -Fitato de Sódio manteve-se constante até 8 horas ($p > 0,05$) após injeção. Para o baço, a quantidade de radioatividade foi constante até 4 horas ($p > 0,05$) e após esse tempo observou-se um aumento da concentração do radiofármaco. Após administração intravenosa, o ^{99m}Tc -Fitato de Sódio age como uma micropartícula (colóide) circulante e é rapidamente removido da corrente sanguínea pelo SFM. O mecanismo que rege este processo é o sequestro pelos macrófagos que estão presentes nesse sistema. O tamanho das partículas coloidais tem considerável influência na biodistribuição das mesmas. Segundo o fabricante do kit utilizado o ^{99m}Tc -Fitato de Sódio possui 90% das partículas com tamanhos entre 1 e 30 μm . Ainda de acordo com o fabricante 80 a 90% da radioatividade é captada pelo fígado, enquanto que no baço e na medula óssea acumulam 7% e 5%, respectivamente. O radiofármaco é eliminado dos macrófagos contidos no fígado e baço em, aproximadamente, 71 e 37 horas, respectivamente (ZOLLE, 2007). Portanto, o aumento da captação observada no baço com uma conseqüente redução na captação do fígado no tempo de 8 horas, pode ser devido à saturação das células de Kupffer fazendo com que os macrófagos esplênicos passem a fagocitar o radiofármaco em maior quantidade.

A fixação do radiofármaco nos rins apresentou um aumento significativo durante todos os tempos investigados. Segundo Zolle (2007), após a administração de radiocolóides por via intravenosa pode-se observar ocasionalmente uma captação renal. Os estudos realizados por Abass e colaboradores (1978) visualizaram os rins e bexiga em tempos bem precoces após a injeção do ^{99m}Tc -Fitato de Sódio e a atividade presente nesses órgãos foi mais intensa quando o radiofármaco era injetado na veia caudal do animal. Amostras de urina examinadas por cromatografia relevaram um padrão diferente daquele observado com soluções de ^{99m}Tc -Fitato de Sódio ou NaTcO_4 (ABASS *et al.*; 1978).

No músculo da pata anterior esquerda (inflamada) foi observado um ligeiro aumento da %DI/g entre os tempos de 2 e 4 horas após a injeção e no tempo de 8 horas essa porcentagem sofreu um aumento significativo em relação aos outros tempos investigados, atingindo um pico de $0,037 \pm 0,011$ de % DI/g de tecido. Por outro lado, no músculo da pata anterior direita (controle) foi observada um menor acúmulo do ^{99m}Tc -Fitato de Sódio em todos os tempos investigados quando comparado com o músculo da pata esquerda (inflamado) - ($p \leq 0,05$). Os estudos histológicos do músculo inflamado mostraram que após 24 horas da indução da inflamação por Zimosan houve um infiltrado predominantemente de células mononucleares (monócitos, macrófagos e linfócitos). Portanto, uma possível explicação para o aumento da fixação do ^{99m}Tc -Fitato de Sódio no foco inflamatório pode ser a de que o radiofármaco seja fagocitado pelos macrófagos presentes na área afetada, mantendo-o no local (ERDOGAN *et al.*, 2000; GOINS *et al.*, 1993). Esses resultados indicam retenção preferencial do ^{99m}Tc -Fitato de Sódio no foco inflamatório, quando comparado ao músculo contralateral não inflamado.

A Figura 33 mostra as imagens cintilográficas obtidas em diferentes tempos após a administração, por via intravenosa, do ^{99m}Tc -Fitato de Sódio em ratos machos Wistar. As imagens mostraram uma maior fixação do radiofármaco no músculo da pata anterior esquerda (inflamada) em relação ao músculo da pata anterior direita (controle), com a visualização do foco inflamatório. Observa-se também um alto nível de radioatividade no fígado e baço, sugerindo o acúmulo do radiofármaco nos órgãos do SFM.

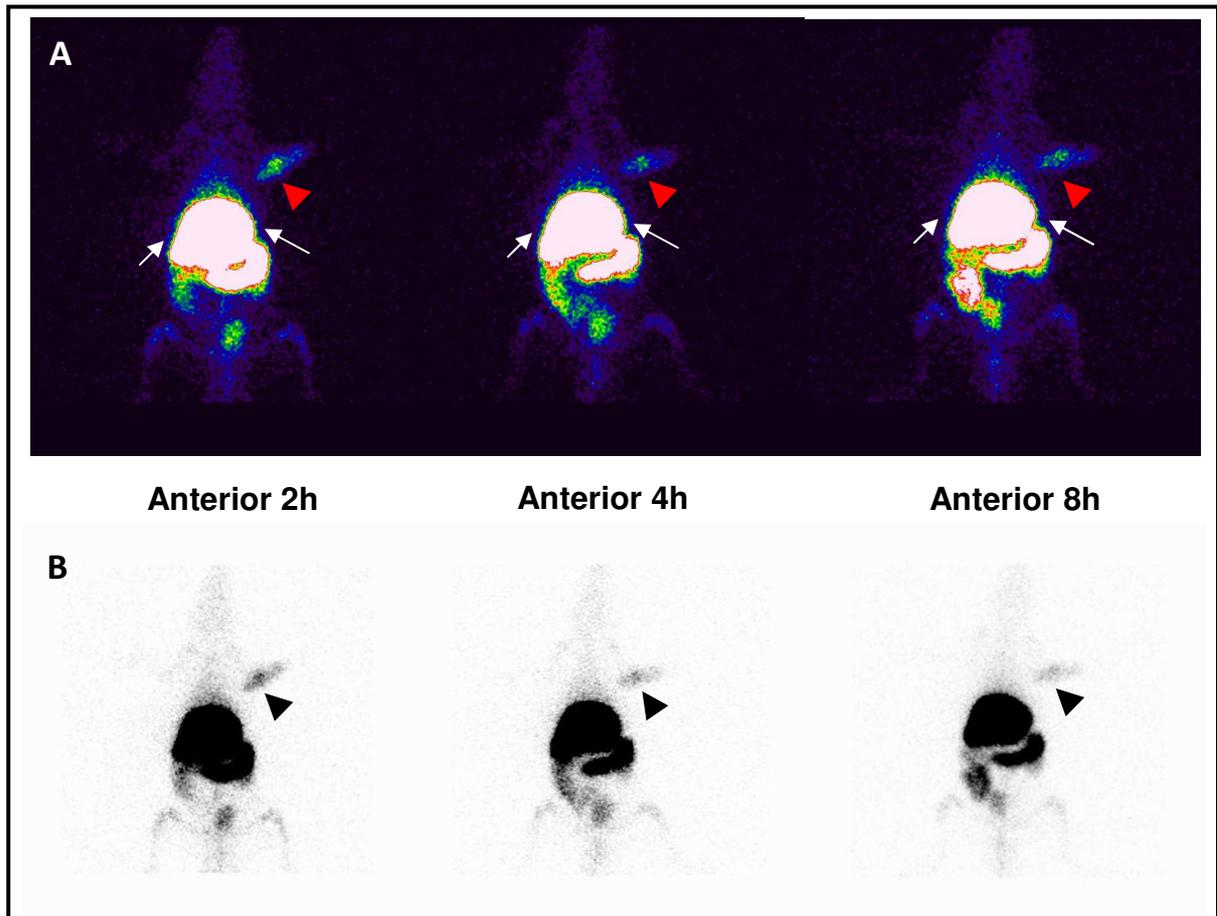


Figura 33. Imagens cintilográficas de rato Wistar com inflamação no músculo da pata anterior esquerda, induzida por Zimosan a 5% (p/v), 2, 4 e 8 horas após a injeção do ^{99m}Tc -Fitato de Sódio ($n=3$). (A) As setas brancas indicam órgãos do SFM (fígado e baço). As pontas de setas vermelhas indicam o foco inflamatório. (B) Imagens em preto e branco, as pontas de setas indicam o foco inflamatório.

O radiotraçador para gerar imagens de processos inflamatórios deve acumular-se específica e rapidamente no foco, bem como ser rapidamente depurado dos tecidos normais para permitir a visualização do mesmo em curto período de tempo após a administração (CORSTEN e VAN DER MEER, 1999; RENNEN *et al.*, 2001). Os estudos de biodistribuição e de imagem mostraram tropismo do ^{99m}Tc -Fitato de Sódio para focos inflamatórios. O acúmulo no músculo inflamado foi significativamente maior do que no músculo controle.

A análise quantitativa das imagens é mostrada na Figura 34. A relação entre o foco inflamatório e o músculo controle foi de $10,24 \pm 3,49$ em 2 horas, não havendo aumento significativo nos tempos de 4 e 8 horas, onde as relações alvo/não alvo encontradas foram de $9,15 \pm 2,06$ e $8,32 \pm 2,42$, respectivamente.

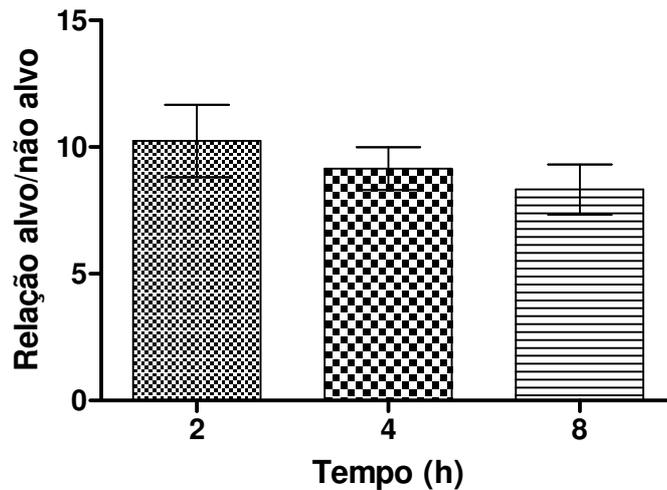


Figura 34. Análise quantitativa das imagens cintilográficas de ratos com inflamação induzida por Zimosan a 5% (p/v) no músculo da pata anterior esquerda após injeção intravenosa de ^{99m}Tc -Fitato de Sódio ($n=5$).

Segundo, Phillips (1999), para imagem de lesões inflamatórias ou infecciosas a relação entre o foco inflamatório e o controle deve ser de, pelo menos, 1,5 para permitir a aquisição de imagens cintilográficas de melhor qualidade. Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram que a relação alvo/não alvo manteve-se elevada até o tempo de 8 horas após a administração do ^{99m}Tc -Fitato de Sódio, indicando que esse radiofármaco fixou-se no sítio da inflamação. Quando se compara estes resultados com aqueles obtidos pelo DTPA, verifica-se que o ^{99m}Tc -Fitato de Sódio mostrou ser muito mais eficaz na identificação de focos inflamatórios.

Outra possível aplicação deste radiofármaco seria na diferenciação entre processos inflamatórios assépticos e sépticos em próteses ortopédicas. Sabe-se pela literatura que tanto nos Estados Unidos da América quanto na comunidade Européia o emprego de leucócitos radiomarcados e de nanocolóides, conjuntamente, permite essa diferenciação (PALESTRO *et al.*, 1990; BRULLES *et al.*, 2005). Entretanto, os nanocolóides não estão disponíveis no Brasil, assim poder-se-ia pensar na possível utilização do ^{99m}Tc -Fitato de Sódio para este fim, o que poderia se constituir em uma nova aplicação desse radiofármaco.

3.12 Biodistribuição e imagens cintilográficas dos SpHL-^{99m}Tc-Fitado de Sódio em animais com foco inflamatório

O perfil de biodistribuição dos SpHL-^{99m}Tc-Fitado de Sódio administrados, por via intravenosa, em ratos Wistar com foco inflamatório está na Tabela 11.

Tabela 11. Biodistribuição do SpHL-^{99m}Tc-Fitado de Sódio em ratos com inflamação no músculo da pata anterior esquerda induzida por Zimosan a 5% (p/v).

Órgão	% DI/g de tecido (média ± d.p.)		
	2h	4h	8h
Fígado	2,576 ± 0,218 ^a	3,082 ± 0,276 ^b	2,549 ± 0,288 ^a
Baço	2,174 ± 0,218 ^a	2,385 ± 0,205 ^a	2,105 ± 0,217 ^a
Rins	1,106 ± 0,206 ^a	1,189 ± 0,083 ^a	2,929 ± 0,363 ^b
Sangue	0,359 ± 0,067 ^a	0,245 ± 0,024 ^b	0,129 ± 0,010 ^c
Músculo controle (pata direita)	0,033 ± 0,005 ^{*a}	0,030 ± 0,003 ^{*a}	0,125 ± 0,014 ^{*b}
Músculo inflamado (pata esquerda)	0,101 ± 0,011 ^{*a}	0,102 ± 0,011 ^{*a}	0,150 ± 0,032 ^{*b}
Relação foco inflamatório/sangue	0,282 ± 0,031	0,465 ± 0,071	1,341 ± 0,176

*Indica uma diferença estatisticamente significativa entre o músculo controle e o músculo inflamado (Teste t, $p \leq 0,05$). ^(a,b,c)Indicam uma diferença estatisticamente significativa para o mesmo órgão entre os tempos investigados (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$) – (n=5).

A análise da presença dos SpHL-^{99m}Tc-Fitado de Sódio no sangue evidencia claramente a capacidade de circulação prolongada dessas vesículas. No tempo de 2 horas, os SpHL radiomarcados encontram-se 27,6 vezes em maior quantidade no sangue, quando comparado com o radiofármaco livre. Essa diferença atinge 30,6 vezes no tempo de 4 horas e passa a ser 10,7 vezes maior, 8 horas após a sua injeção por via intravenosa. Foi observado que nos lipossomas de circulação prolongada, a incorporação na membrana de lipídeos acoplados a polímeros de etilenoglicol (PEG) altera sua interação com o ambiente, sendo o efeito mais importante a redução da captura pelos macrófagos, prolongando sua presença na corrente sanguínea. Esses lipossomas, denominados também de lipossomas furtivos, permitem uma distribuição do fármaco para outros órgãos além daqueles do SFM (FONTES *et al.*, 2005).

Os SpHL radiomarcados acumularam-se principalmente no fígado e baço, atingindo o pico máximo no fígado em 4 horas após a sua administração ($3,082 \pm 0,276$ %DI/g). Embora a maior fixação dos SpHL tenha sido no fígado, esse acúmulo 2 horas após a administração foi 2,9 vezes menor do que o acúmulo hepático do ^{99m}Tc -Fitato de Sódio, sendo esta diferença mantida até 8 horas após a sua administração. A fixação dos SpHL- ^{99m}Tc -Fitato de Sódio no baço manteve-se constante durante todos os tempos investigados. Vale ressaltar que, a proporção da fixação de radioatividade no fígado em relação ao baço foi maior para o radiofármaco livre, quando comparado com os SpHL radiomarcados durante todo o experimento (Tabela 12).

Tabela 12. Proporção de fixação da radioatividade no fígado em relação ao baço.

	<i>^{99m}Tc-Fitato de Sódio</i>	<i>SpHL-^{99m}Tc-Fitato de Sódio</i>
2 horas	86,3%	54,2%
4 horas	91,9%	56,4%
8 horas	82,5%	54,8%

Segundo Harbert (1996) o sulfeto coloidal marcado com ^{99m}Tc distribui-se entre fígado, baço e medula óssea na proporção 85:10:5, respectivamente. Já o ^{99m}Tc -Fitato de Sódio apresenta maior acúmulo no fígado e menor deposição em baço e medula óssea (ARZOUMANIAN *et al.*, 1977). Sabe-se também que o fígado apresenta maior população de macrófagos fixos quando comparado ao baço, logo, todos esses fatos corroboram os resultados encontrados neste trabalho para o ^{99m}Tc -Fitato de Sódio livre. Quanto ao perfil de captação dos SpHL- ^{99m}Tc -Fitato de Sódio pelo fígado e baço, uma hipótese para explicar tal achado é a de que 2 horas após a administração desse radiofármaco, as vesículas lipídicas já foram fagocitadas pelos macrófagos do fígado sendo degradadas e liberando, em seguida, o ^{99m}Tc -Fitato de Sódio na corrente sanguínea. Vale lembrar que o ^{99m}Tc -Fitato de Sódio encapsulado nos SpHL não constitui um sistema coloidal, o mesmo vem a tornar-se um colóide quando interage com os íons cálcio presentes no sangue. Portanto, ao ser liberado das vesículas o radiofármaco livre torna-se um colóide que, desta forma, será fagocitado pelo baço visto que o fígado encontra-se saturado pelos lipossomas. Assim, o fígado e baço acumulam de forma equilibrada os SpHL- ^{99m}Tc -Fitato de Sódio após a sua administração por via intravenosa.

Nos rins observa-se uma fixação constante dos SpHL-^{99m}Tc-Fitado de Sódio nas 4 primeiras horas após a injeção. Porém, no tempo de 8 horas, essa fixação aumenta consideravelmente em relação aos tempos anteriores ($p \leq 0,05$). Esse aumento do acúmulo dos SpHL radiomarcados nos rins pode ser resultado da degradação dos lipossomas no fígado e no baço, liberando o radiofármaco livre para eliminação renal, como citado na literatura (PHILLIPS *et al.*, 1992; ABASS *et al.*, 1978; SEOK *et al.*, 2010).

Após a injeção dos SpHL-^{99m}Tc-Fitado de Sódio o nível de radioatividade no músculo inflamado (esquerdo) foi significativamente maior do que no músculo controle (direito) durante todos os tempos investigados ($p \leq 0,05$). A retenção de SpHL-^{99m}Tc-Fitado de Sódio no sítio inflamatório foi mantida constante até 4 horas apresentando um aumento significativo no tempo de 8 horas (Tabela 11).

As imagens cintilográficas evidenciaram um maior acúmulo dos lipossomas radiomarcados na região da inflamação (Figura 35). A quantidade de radioatividade nessa região tornou-se evidente desde o primeiro tempo investigado (2 horas) sendo possível a sua visualização até o tempo de 8 horas. Observa-se também alta fixação de radioatividade na região do abdome. Outro fato curioso que pode ser observado nas imagens é que a medula óssea foi melhor visualizada com os SpHL-^{99m}Tc-Fitado de Sódio quando comparado com o radiofármaco livre. Esse fato poderia ser explicado pelo tamanho das partículas injetadas, pois os lipossomas radiomarcados apresentaram diâmetro da ordem de nanômetros e as partículas coloidais do ^{99m}Tc-Fitado de Sódio utilizadas possuíam diâmetro na escala de micrômetros, segundo o fabricante. Segundo Saba (1970) partículas menores do que 100 nm são concentradas em maior extensão na medula óssea quando comparado com o fígado e baço. Partículas com diâmetros entre 300 e 1000 nm localizam-se preferencialmente no fígado enquanto que partículas com 1 a 5 μm depositam-se principalmente no baço.

A relação alvo/não alvo determinada nas imagens cintilográficas para cada intervalo de tempo pode ser vista na Figura 36. O valor da relação alvo/não alvo foi de $3,94 \pm 0,80$ em 2 horas, $5,14 \pm 2,11$ no tempo de 4 horas e $3,48 \pm 0,89$ 8 horas após a injeção dos SpHL radiomarcados. Esses resultados indicam uma localização preferencial dos SpHL-^{99m}Tc-Fitado de Sódio no sítio de inflamação em relação ao músculo contralateral não inflamado.

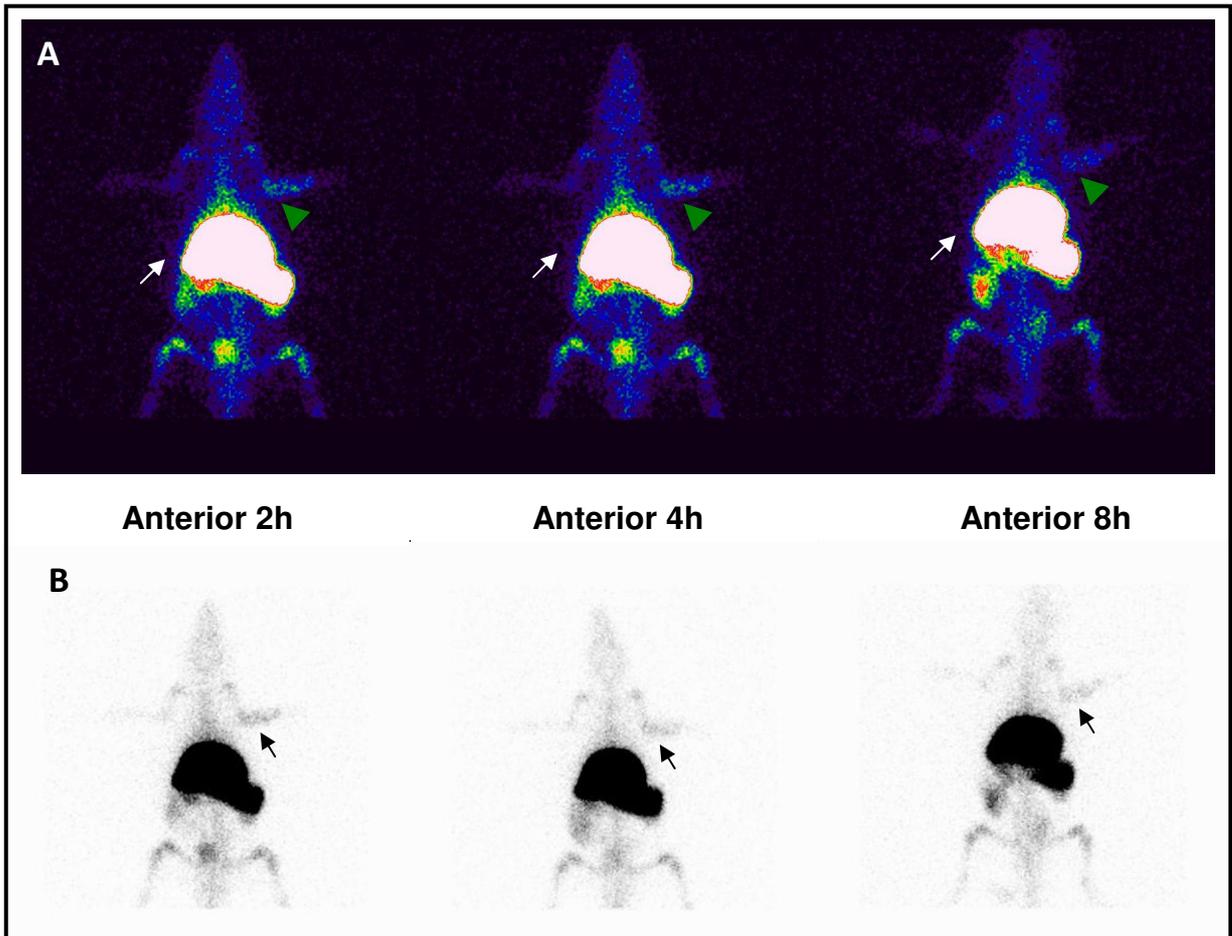


Figura 35. Imagens cintilográficas de rato Wistar com inflamação no músculo da pata anterior esquerda induzida por Zimosan a 5% (p/v), em 2, 4 e 8 horas após a injeção do SpHL-^{99m}Tc-Fitado de Sódio (n=3). (A) As setas indicam o fígado e baço. As pontas de setas verdes indicam o foco inflamatório. (B) Imagens em preto e branco, as setas indicam o foco inflamatório.

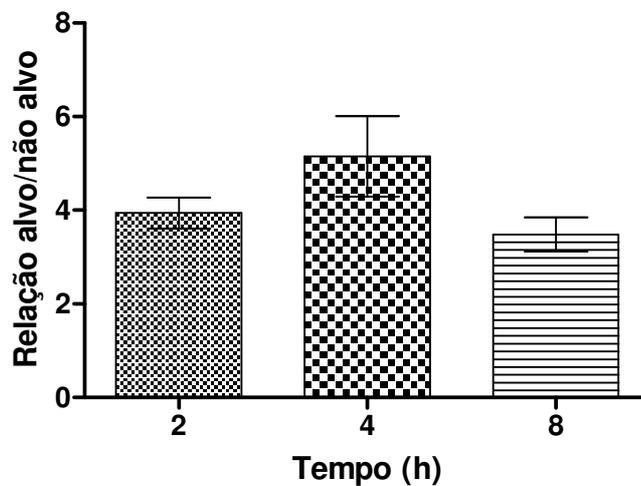


Figura 36. Análise quantitativa (média \pm d.p.) das imagens cintilográficas de ratos injetados com SpHL-^{99m}Tc-Fitado de Sódio após injeção intramuscular de Zimosan a 5% (p/v) - (n=3).

Entretanto, não pode deixar de ser ressaltado que o ^{99m}Tc -Fitato de Sódio mostrou relação alvo/não alvo superior àquela obtida com os SpHL- ^{99m}Tc -Fitato de Sódio durante todos os tempos investigados (Figura 37).

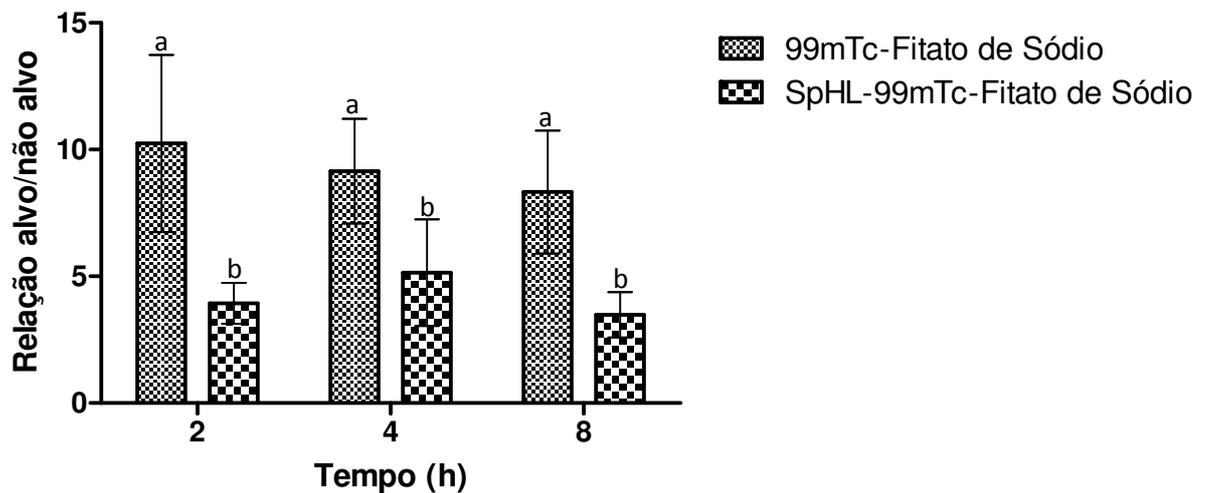


Figura 37. Relação alvo/não alvo (média \pm d.p.) das imagens cintilográficas do ^{99m}Tc -Fitato de Sódio livre e encapsulado em SpHL (n=3). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos. (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

Portanto, os resultados sugerem que o radiofármaco livre acumula-se mais eficientemente no foco inflamatório, quando comparado com os SpHL- ^{99m}Tc -Fitato de Sódio. Além disso, o custo elevado na produção dos lipossomas faz do ^{99m}Tc -Fitato de Sódio livre uma melhor opção para a identificação de processos inflamatórios.

4 CONCLUSÃO

Os SpHL liofilizados apresentaram estabilidade quando armazenados em geladeira, sugerindo que estes compostos podem ser estocados, em condições adequadas, por até 180 dias.

O ^{99m}Tc -DTPA, livre e encapsulado em SpHL, mostraram-se eficientes na identificação de sítios inflamatórios em modelo experimental de inflamação no músculo de ratos. O baixo teor de encapsulação e a adsorção de grande parte do ^{99m}Tc -DTPA na superfície dos SpHL reforçam a necessidade de buscar novas formulações lipossomais nas quais a adsorção das moléculas de ^{99m}Tc -DTPA na superfície das vesículas seja eliminada ou reduzida.

O ^{99m}Tc -Fitato de Sódio, livre e encapsulado em SpHL foram capazes de identificar o foco inflamatório induzido por suspensão de Zimosan a 5% (p/v) na pata anterior esquerda de ratos wistar. Entretanto, os resultados sugerem que o ^{99m}Tc -Fitato de Sódio livre acumula-se de forma mais efetiva neste local.

CONCLUSÕES INTEGRADAS E PERSPECTIVAS

CONCLUSÕES INTEGRADAS E PERSPECTIVAS

1 CONCLUSÕES INTEGRADAS

A formulação lipossomal composta por aPEG₂₀₀₀-DSPE:DOPE:CHEMS contendo glicose como crioprotetor [proporção crioprotetor:fosfolípide (p/p) 5:1] mostrou-se eficiente para a marcação com os radiofármacos ^{99m}Tc-DTPA e ^{99m}Tc-Fitado de Sódio, apresentando relações alvo/não alvo superiores a 1,5 e indicando tropismo para o tecido alvo (inflamação). Porém, a maior relação alvo/não alvo obtida foi para o ^{99m}Tc-Fitado de Sódio livre (10,24 no tempo de 2 horas após injeção), sugerindo, de maneira inovadora, que esse radiofármaco poderia ser utilizado na identificação de processos inflamatórios localizados fora de áreas de grande concentração de células do SFM.

2 PERSPECTIVAS

Diante das investigações realizadas nesse trabalho, pode-se propor como perspectivas o emprego de uma formulação de SpHL composta por mPEG₂₀₀₀-DSPE:DOPE:CHEMS afim de diminuir ou evitar a adsorção do ^{99m}Tc-DTPA na superfície das vesículas lipídicas. Avaliar esta formulação marcada, também, com o ^{99m}Tc-Fitado de Sódio visando à melhoria do rendimento de marcação dos SpHL.

Faz-se também necessário o estudo *in vivo* do ^{99m}Tc-Fitado de Sódio, livre e encapsulado em SpHL, em modelo experimental para a identificação de focos infecciosos.

Caso o HMPAO volte a ser comercializado no país, poder-se-ia comparar o método de leucócitos radiomarcados com ^{99m}Tc e os radiofármacos ^{99m}Tc-Fitado de Sódio, livre e encapsulado em SpHL, na identificação e diferenciação de processos inflamatórios e infecciosos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABASS, A.; STAUM, M.M; SHESOL, B.F.; BLOCH, P.H. Technetium-99m stannous phytate as na imaging agent for lymph nodes. **The Journal of Nuclear Medicine**, v. 19, p. 422-426, 1978.

ABDEL-DAYEM, H.; MAHAJAN, K.; OWUWANNE, A.; ERICSSON, S.; NAWAZ, K.; KOURIS, K.; ITIGAZY, E.; AWDEH, M. The use of 99mTc-DTPA for detection and localization of site of acute gastrointestinal bleeding. **European Journal of Nuclear Medicine**, v. 14, p. 98-104, 1988.

ADLER-MOORE, J.P.; PROFFITT, T. Development, characterization, efficacy and mode of action of Ambisome, a unilamellar liposomal formulation of amphotericin B. **Journal of Liposome Research**, v. 3, p. 429-450, 1993.

AHKONG, Q.F.; TILCOCK, C. Attachment of 99mTc to lipid vesicles containing the lipophilic chelate dipalmitoylphosphatidylethanolamina-DTTA. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 19, p. 831-840, 1992.

ALLEN, T.M.; HANSEN, C. Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes effect of dose. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1068, p. 133-141, 1991.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, L.V.J. Sólidos perorais, cápsulas, comprimidos e sistemas de liberação controlada. In: OPPIDO, T.; OLIVEIRA, E.G.; BENEDETTI, I.C. (Trad.). **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 6 ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000. Cap. 5, p. 175-250.

ARAÚJO, J.G.C.; MOTA, L.G.; LEITE, E.A.; MARONI, L.C.; WAINSTEIN, A.J.A.; COELHO, L.G.V.; SAVASSI-ROCHA, P.R.; PEREIRA, M.T.; CARVALHO, A.T.; CARDOSO, V.N.; De OLIVEIRA, M.C. Biodistribution and antitumoral effect of long-circulating and pH-sensitive liposomal cisplatin administered in Ehrlich tumor-bearing mice. **Experimental Biology and Medicine**, v. 236, p. 808-815, 2011.

ARNDT, J.W.; VAN DER SLUYS VEER A.; BLOK, D.; GRIFFIOEN, G.; VERSPAGET, H.W.; LAMERS, C.B.H.W.; PAUWELS, E.K.J. Prospective comparative study of Technetium-99m-WBCs and Indium-111-granulocytes for the examination of patients with inflammatory bowel disease. **The Journal of Nuclear Medicine**, v. 34, p. 1052-1057, 1993.

ARNDT, J.W.; GROOTSCHOLTEN, M.I.; VAN-HOGEZAND, R.A.; GRIFFIOEN, G.; LAMERS, C.B.; PAUWELS, E.K. Inflammatory bowel disease activity assessment using technetium - 99m – HMPAO - leukocytes. **Digestive Disease Science**, v. 42, Suppl 2, p. 387-393, 1997.

ARZOUMANIAN, A.; ROSENTHALL, L.; SATO, H. Clinical comparison of 99mTc-labeled preformed phytate colloid and sulfur colloid: concise communication. **The Journal of Nuclear Medicine**, v. 18, p. 118-120, 1977.

AULTON, M. E. Secagem. In: **Delimitação de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. Cap. 26, p. 384-401.

AWASTHI, V.D.; GOINS, G.B.A.; PHILLIPS, W.T. Circulation and biodistribution profiles of long-circulating PEG-liposomes of various sizes in rabbits. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 253, p. 121-132, 2003.

BAKKER-WOUDENBERG, I.A.; LOKERSE, A.F.; TEN KATE, M.T.; STORM, G. Enhanced localization of liposomes with prolonged blood circulation time in infected lung tissue. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1138, p. 318-326, 1992.

BANGHAM, A.D.; STANDISH, M.M.; WATKINS, J.C. Diffusion of univalent ions the lamellae os swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, v. 13, p. 238-252, 1965.

BARRETO, V.G.; RABILLER, G.; IGLESIAS, F.; SOROA, V.; TUBAU, F.; ROCA, M.; MARTIN-COMIN, J. Gammagrafia con ^{99m}Tc-ceftizoxima en ratas normales y en ratas con absceso inducido. *Revista Española de Medicina Nuclear*, v. 24, n. 5, p. 312-318, 2005.

BARTLETT, G.R. Phosphorus assay in column chromatography. *Journal of Molecular Biology*, v. 13, p. 238-252, 1959.

BATISTA, C.M.; CARVALHO, C.M.B.; MAGALHÃES, N.S.S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.

BÉ, M.M.; CHISTÉ, V.; DULIEU, C.; BROWNE, E.; CHECHEV, V.; KUZMENKO, N.; HELMER, R.; NICHOLS, A.; SCHÖNFELD, E.; DERSCH, R. *Table of Radionuclides – Monographie BIPM-5*. France: BIPM, 2004. v. 1, 311 p.

BERGER, N.; SACHSE, A.; BENDER, J.; SCHUBERT, R.; BRANDL, M.; Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, n. 223, p. 175-186, 2001.

BLEEKER-ROVERS, C.P.; VOS, F.J.; CORSTENS, F.H.M. Scintigraphic detection of infection and inflammation. In: BIRSACK, H.J.; FREEMAN, L.M. (Ed.). *Clinical Nuclear Medicine*. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007. Cap. 17, p. 347-359.

BOERMAN, O.C.; STORM, G.; OYEN, W.J.; VAN BLOOIS, L.; VAN DER MEER, J.W.; CLAESSENS, R.A.M.J.; CROMMELIN, D.J.A.; CORSTENS, F.H.M. Sterically stabilized liposomes labeled with indium-111 to image focal infection in rats. *The Journal of Nuclear Medicine*, v. 36, p. 1639-1644, 1995.

BOERMAN, O.C.; OYEN, W.J.; VAN BLOOIS, L.; KOENDERS, E.B.; VAN DER MEER, J.W.; CORSTENS, F.H.; STORM, G. Optimization of technetium-99m-labeled PEG liposomes to image focal infection: effects of particle size and circulation time. *The Journal of Nuclear Medicine*, v. 38, p. 489-493, 1997.

BOERMAN, O.C.; LAVERMAN, P.; OYEN, W.J.; CORSTENS, F.H.; STORM, G. Radiolabeled liposomes for scintigraphic imaging. *Progress in Lipid Research*, v. 39, p. 461-475, 2000.

BOERMAN, O.C.; RENNEN, H.; OYEN, W.J.; CORSTENS, F.H. Radiopharmaceuticals to image infection and inflammation. *Seminars in Nuclear Medicine*, v. 31, p. 286-295, 2001.

BOGLIOLO, L.; PEREIRA, F.E.L. Inflamações. In: FILHO, G.B.; PITTELLA, J.E.H.; PEREIRA, F.E.L.; BAMBIRRA, E.A.; BARBOSA, A.J.A. **Bogliolo Patologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. Cap. 7, p.111-143.

BRADLEY, A.J.; DEVINE, D.V.; ANSELL, S.M.; JANZEN, J.; BROOKS, D.E. Inhibition of liposome-induced complement activation by incorporated poly(ethylene glycol)-lipids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 357, p. 185-194, 1998.

BRULLES, Y.R.; SEGURA, A.B.; MARTIN-COMIN, J.; SALVADÓ, J.M.; LÁZARO, M.T.B.; ENGRONYAT, M.R.; AÑÉ, R.P. Prótesis articular de cadera y de rodilla. Diagnóstico diferencial entre infección/aflojamiento aséptico. In: MARTINCOMIN, J. (Ed.). **Diagnóstico de la inflamación y de la infección en medicina nuclear**. [s.l.: s.n.], 2005. Cap.. 6, p. 117-130.

CARDOSO, V.N.; PLAZA, P.J.L.; ROCA, M.; ARMERO, F.; MARTIN-COMIN, J. Assessment of inflammatory bowel disease by using two different ^{99m}Tc leucocyte labelling methods. **Nuclear Medicine Communications**, v. 23, p. 715-720, 2002.

CARMO, V.A.S.; De OLIVEIRA, M.C.; MOTA, L.G.; FREIRE, L.P.; FERREIRA, R.L.B.; CARDOSO, V.N. Technetium-99m-labeled stealth pH-sensitive liposomes: A new strategy to identify infection in experimental model. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 199-207, 2007.

CARMO, V.A.S.; FERRARI, C.S.; REIS, E.C.O.; RAMALDES, G.A.; PEREIRA, M.A.; De OLIVEIRA, M.C.; CARDOSO, V.N. Biodistribution study and identification of inflammation sites using ^{99m}Tc-labelled stealth pH-sensitive liposomes. **Nuclear Medicine Communications**, v. 29, n. 1, p. 33-38, 2008_a.

CARMO, V.A.S.; De OLIVEIRA, M.C.; REIS, E.C.O.; GUIMARÃES, T.M.P.D.; VILELA, J.M.C.; ANDRADE, M.S.; MICHALICK, M.S.M.; CARDOSO, V.N. Physicochemical characterization and study of in vitro interactions of pH-sensitive liposomes with the complement system. **Journal of Liposome Research**, v. 18, p. 59–70, 2008_b.

CARVALHO-JÚNIOR, A.D.; MOTA, L.G.; NUMAN, E.A.; WAINSTEIN, A.J.A.; WAINSTEIN, A.P.D.L.; LEAL, A.S.; CARDOSO, V.N.; OLIVEIRA, M.C. Tissue distribution evaluation of stealth pH-sensitive liposomal cisplatin versus free cisplatin in ehrlich tumor-bearing mice. **Life Science**, v. 80, p. 659-664, 2007_a.

CARVALHO-JÚNIOR, A.D.; VIEIRA, F.P.; De MELO, V.J.; LOPES, M.T.P.; SILVEIRA, J.N.; RAMALDES, G.A.; GARNIER-SUILLEROT, A.; PEREIRA MAIA, E.C.; De OLIVEIRA, M.C. Preparation and cytotoxicity of cisplatin-containing liposomes. **Brazilian Journal of Medical and biological Research**, v. 40, n. 8, p. 1149-1157, 2007_b.

CASALS, E.; GALÁN, A.M.; ESCOLAR, G.; GALLARDO, M.; ESTELRICH, J. Physical stability of liposomes bearing hemostatic activity. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 125, p. 139-146, 2003.

CHEN, C.; HAN, D.; CAI, C.; TANG, X. An overview of liposome lyophilization and its future potencial. **Journal of Controlled Release**, v. 142, n. 3, p. 299-311, 2010.

CHIANELLI, M.; MATHER, S.J.; MARTIN-COMIN, J.; SIGNORE, A. Radiopharmaceuticals for the study of inflammatory processes: a review. ***Nuclear Medicine. Communications.***, v. 18, p. 437-458, 1997.

CHOW, C.; HEATH, T.D. Rapid diffusion of the lipid phosphorus of phosphatidylglycerol liposomes through polycarbonate membranes is caused by the oxidation of the unsaturated fatty acid. ***Biochimica et Biophysica Acta***, v. 1239, p. 168-176, 1995.

COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. In: COTRAN, R.; KUMAR, V.; COLLINS, T. ***Robbins pathologic basis of disease***. 6 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1999. Cap. 3, p. 50-88.

CONTI, P.S.; LILIEN, D.L.; HAWLEY, K.; KEPPLER, J.; GRAFTON, S.T.; BADING, J.R. PET and [¹⁸F]-FDG in oncology: A clinical uptake. ***Nuclear Medicine and Biology***, v. 23, p. 717-735, 1996.

CORSTENS, F.H.M.; VAN DER MEER, J.W.M. Nuclear Medicine's role in infection and inflammation. ***Lancet***, v. 354, p. 765-770, 1999.

CROMMELIN, D.J.A.; VAN RENSSSEN, A.J.M.L.; WAUBEN, M.H.M.; STORM, G. Liposomes in autoimmune diseases: selected applications in immunotherapy and inflammation detection. ***Journal of Controlled Release***, v. 62, Issues 1-2, p. 245-251, 1999.

CROWE, L.M.; CROWE, J.H.; Trehalose and dry dipalmitoylphosphatidylcholine revisited. ***Biochimica et Biophysica Acta***, v. 946, p. 193-201, 1988.

CROWE, J.H.; HOEKSTRA, F.A.; NGUYEN, K.H.; CROWE, L.M. Is vitrification involved in depression of the phase transition temperature in dry phospholipids? ***Biochimica et Biophysica Acta***, v. 1280, p. 187-196, 1996_a.

CROWE, L.M.; REID, D.S.; CROWE, J.H. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? ***Biophysical Journal***, v. 71, p. 2087-2093, 1996_b.

DATZ, F.L. Indium-111-labelled leukocytes for the detection of infection: current status. ***Seminars in Nuclear Medicine***, v. 24, p. 92-109, 1994.

De OLIVEIRA, M.C. ***Conception de liposomes pH sensibles pour l'administration des oligonucléotides antisens : aspects physico-chimiques et biopharmaceutiques***. 1999. 151 f. Tese (Doutorado em Farmacotécnica e Biofarmácia) – Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry, Université Paris XI, Paris, 1999.

DEAMER, D.W.; BARCHFIELD, G.L. Encapsulation of macromolecules by lipid vesicles under simulated prebiotic conditions. ***Journal of Molecular Evolution***, v. 18, p. 203-206, 1982.

DEUTSCH, E. Technetium chemistry and technetium radiopharmaceutical. In: LIPPAR, S.J. (Ed.). ***Progress in Inorganic Chemistry***. New York: J Wiley & Sons Inc., 1983. v. 30, p. 75-139.

DEWANJEE, M.K. The chemistry of ^{99m}Tc-labeled radiopharmaceuticals. ***Seminars in Nuclear Medicine***, v. 20, n. 1, p. 5-27, 1990.

- DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 24, p. 89-102, 1972.
- DING, W.X.; QI, X.R.; LI, P.; MAITANI, Y.; NAGAI, T. Cholesteryl hemisuccinate as a membrane stabilizer in dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes containing saikosaponin-d. *International Journal of Pharmaceuticals*, v. 300, p. 38-47, 2005.
- DINIZ, S.O.F.; REZENDE, C.M.; SERAKIDEDS, R.; FERREIRA, R.L.; RIBEIRO, T.G.; MARTIN-COMIN, J.; CARDOSO, V.N. Scintigraphic imaging using technetium-99m-labeled ceftizoxime in a experimental model of acute osteomyelitis in rats. *Nuclear Medicine Communications*, v. 29, p. 830-836, 2008.
- DRUMOND, D.C.; ZIGNANI, M.; LEROUX, J.C. Current status of pH-sensitive liposomes en drug delivery. *Progress in Lipid Research*, v. 39, p. 409-460, 2000.
- DUMAREY, N.; EGRISE, D.; BLOCKLET, D.; STALLENBERG, B.; REMMELINK, M.; DEL MARMOL, V.; VAN SIMAEYS, G.; JACOBS, F.; GOLDMAN, S. Imaging infection with ¹⁸F-FDG-labeled leukocyte PET/CT: initial experience in 21 patients. *The Journal of Nuclear Medicine*, v. 47, p. 625-632, 2006.
- ENGRONYAT, M.R.; MARTIN-COMIN, J.; BRULLES, Y.R.; SALVADÓ, J.M.; LÁZARO, M.T.B.; AÑÉ, R.P. In: MARTIN-COMIN, J. (Ed.) *Diagnóstico de la Inflamación y de la Infección en Medicina Nuclear*. [S.l.: s.n.], 2005. Cap. 4, p. 77-92.
- ERDOGAN, S.; OZER, A.Y.; ERCAN, M.T.; HINCALL, A.A. Scintigraphic imaging of infections with ^{99m}Tc-labelled glutathione liposomes. *Journal of Microencapsulation*, v.17, p. 459-465, 2000.
- FATTAL, E. Colloidal drug carriers of antibiotics as an alternative approach for the treatment of intracellular infections. In: RAOULT, D. (Ed.). *Antimicrobial agents and intracellular pathogens*. Boca Raton, Florida, CRC press, p. 63-72, 1993.
- FATTAL, E.; COUVREUR, P.; DUBERNET, C. "Smart" delivery of antisense oligonucleotides by anionic pH-sensitive liposomes. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 931-946, 2004.
- FERREIRA, D.S. *Emprego de lipossomas recobertos com alendronato contendo ceftizoxima radiomarcada na identificação de foco infeccioso em osso em modelo experimental*. 2011. 139 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, 2011.
- FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. Emulsões, suspensões e dispersões. In: *Princípios físico-químicos em farmácia*. 3 ed. São Paulo: Editora Universidade de São Paulo, 2003. Cap. 7, p. 345-411.
- FONTES, A.P.S.; CESAR, E.T.; BERALDO, H. A química Inorgânica na terapia do câncer. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, n. 6, p. 13-18, 2005.
- FREZARD, F. Liposomes: from biophysics to the design of peptides vaccines. *Brazilian Journal of Biological Research*, n. 32, p. 181-189, 1999.

FREZARD, F.; SCHETTINI, D.A.; ROCHA, O.G.F.; DEDMICHELI, C. Lipossomas: Propriedade físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia “a base de antimônio. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.

GOINS, B.; KLIPPER, R.; RUDOLPH, A.S.; CLIFF, R.O.; BLUMHARDT, R.; PHILLIPS, W.T. Biodistribution and imaging studies of technetium-99m-labeled liposomes in rats with focal infection. **The Journal of Nuclear Medicine**, v. 34, p. 2160-2168, 1993.

GREGORIADIS, G.; LEATHWOOD, P.D.; RYMAN, B.E. Enzyme entrapment in liposomes. **FEBS Letters**, v. 14, p. 95-99, 1971.

GULINO, P.M.; GRANTHAM, F.H.; SMITH, S.H.; HAGGERTY, A.C. Modification of the acid-basic status of the internal milieu of tumors. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 34, p. 857-869, 1967.

HARBERT, J.C. The Liver. In: HARBERT, J.C.; ECKELMAN, W.C.; NEUMANN, R.D. (Ed.) **Nuclear Medicine diagnosis and Therapy**. Thieme Medical Publishers, New York, 1996. Cap. 27, p. 651-682.

HASKELL, R.J.; SHIFFLETT, J.R.; ELZINGA, P.A. Particle size technologies for submicron emulsion. In: Benita, S. **Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery**. [s. 1.]: Harwood academic publishers, p. 8-19, 1998.

JONES, A.G. Technetium in nuclear medicine. **Radiochimica Acta**, v. 70/71, p. 289-297, 1995.

KIRBY, C.; GREGORIADIS, G. Dehydration-rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. **Nature Biotechnology**, v. 2, p. 979-984, 1984.

KLIBANOV, A.L. MARUYAMA, K.; TORCHILIN, V.P.; HUANG, L. Amphipathic polyethyleneglycol effectively prolong the circulation time of liposomes. **FEBS Letters**, v. 268, p. 235-237, 1990.

KÖRNYEI, J.; ZOLLE, I. 99mTc-DTPA (Diethylenetriaminepentaacetate). In: ZOLLE, I. (Ed.). **Technetium-99m Pharmaceuticals**. New York: Springer Berlin Heidelberg, 2007. Cap. 12, p. 297-303.

KOSTER, K.L.; WEBB, M.S.; BRYANT, G.; LYNCH, D.V. Interactions between soluble sugars and POPC (1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine) during dehydration: vitrification of sugars alters the phase behavior of the phospholipid. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 193, n. 1, p. 143-150, 1994.

KOSTER, K.L.; LEI, Y.P.; ANDERSON, M.; MARTIN, S.; BRYANT, G. Effects of vitrified and nonvitrified sugars on phosphatidylcholine fluid-to-gel phase transitions. **Biophysical Journal**, v. 78, p. 1932-1946, 2000.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ASTER, J. **Robbins and Cotran Pathologic Basis Of Disease**. 8 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2010. Cap. 2, p. 43-79.

LASIC, D.D. Novel application of lipossomes. **Trends en Biotechnology**, v. 16, p. 307-321, 1998.

LAVERMAN, P.; DAMS, E.T.M.; OYEN, W.J.G.; STORM, G.; KOENDERS, E.B.; PREVOST, R.; VAN DER MEER, J.W.M.; CORSTENS, F.H.M.; BOERMAN, O.C. A novel method to label liposomes with ^{99m}Tc by the hydrazine nicotinyl derivate. ***The Journal of Nuclear Medicine***, v. 40, p. 192-197, 1999.

LAVERMAN, P.; DAMS, E.T.M.; STORM, G.; HAFMANS, T.G.; CROES, H.J.; OYEN, W.J.G.; CORSTENS, F.H.M.; BOERMAN, O.C. Microscopic localization of PEG-liposomes in a rat model of focal infection. ***Journal of Controlled Release***, v. 75, Issue 6, p. 347-355, 2001.

LAZARUS, C.R. Techniques for Dispensing of Radiopharmaceutical. In: SAMPSON, C.B. (Ed.). ***Textbook of Radiopharmacy, Theory and Practice***. New York: Gordon and Breach Science Publishers, 1990. v.3, cap. 5, p. 85-99.

LOVE, W.G.; AMOS, N.; WILLIAMS, B.D.; KELLAWAY, IW. Effect of liposome surface charge on the stability of technetium (^{99m}Tc) radiolabelled liposomes. ***Journal of Microencapsulation***, v. 6, p. 105-113, 1989.

LOVE, C.; PALESTRO, C.J. Radionuclide imaging of infection. ***Journal of Nuclear Medicine Technology***, v. 32, p. 47-57, 2004.

MALVERN INSTRUMENTS. PCS theory. In: ***Zetasizer theory manual***. Inglaterra, 1996_a, p. 1.1-1.10.

MALVERN INSTRUMENTS. Zeta potential: Theory of operation. In: ***Zetasizer theory manual***. Inglaterra, 1996_b, p. 2.1-2.6.

MARTIN-COMIN, J.; PRATS, E. Clinical applications of radiolabeled blood elements in inflammatory bowel disease. ***The Quarterly Journal of Nuclear Medicine***, v. 43, Suppl 1, p. 74-82, 1999.

MARUYAMA, K.; YUDA, T.; OKAMOTO, A.; KOJIMA, S.; SUGINAKA, A.; IWATSURU, M. Prolonged circulation time in vivo of large unilamellar liposomes composed of distearoylcholine phosphatidylcholine and cholesterol containing amphipathic poly(ethylene glycol). ***Biochimica et Biophysica Acta***, v. 1128, p. 44-49, 1992.

MAZZI, U. Technetium in Medicine. In: ZOLLE, I. (Ed.). ***Technetium-99m Pharmaceuticals***. New York: Springer Berlin Heidelberg, 2007. Cap. 2, p. 7-58.

McAFEE, J.G.; THAKUR, M.L. Suvey of radioactive agents for in vitro labeling of phagocytic leukocytes. I. Soluble agents. ***The Journal of Nuclear Medicine***, v. 17, p. 480-487, 1976.

MILLAR, A.M. Documentation. Labelling, Packaging and Transportation. In: SAMPSON, C.B. (Ed.). ***Textbook of Radiopharmacy, Theory and Practice***. New York: Gordon and Breach Science Publishers, 1990. v. 3, cap. 8, p. 149-162.

MITCHELL, R.N.; COTRAN, R.S. Acute and Chronic Inflammation. In: KUMAR, V.; COTRAN, R.S.; ROBBINS, S.L. ***Robbins Basic Pathology***. 7 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2003. Cap. 2, p. 33-59.

MOHAMMED, A.R.; BRAMWELL, V.W.; COOBES, A.G.A.; PERRIE, Y. Lyophilisation and sterilization of liposomal vaccines to produce stable and sterile products. *Methods*, n. 40, p. 30-38, 2006.

MOHAMMED, A. R.; COOMBES, A.G.A.; PERRIE, Y. Amino acids as cryoprotectants for liposomal delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, n. 30, p. 406-413, 2007.

MORGAN, J.R.; WILLIAMS, K.E.; DAVIES, R.L.; LEACH, K.; THOMSON, M.; WILLIAMS, L.A. Localisation of experimental staphylococcal abscesses by ^{99m}Tc-technetium-labelled liposomes. *Journal of Medical Microbiology*, v. 14, n. 2, p. 213-217, 1981.

MOSQUEIRA, V.C.F.; LEGRAND, P.; MORGAT, J.P.; VERT, M.; MYSIAKINE, E.; GREF, R.; DEVISSAGUET, J.; BARRATT, G. Biodistribution of long-circulating PEG-grafted nanocapsules in mice: effects of PEG chain length and density. *Pharmaceutical Research*, v. 18, n. 10, p. 1411–1419, 2001.

MOSQUEIRA, V.C.F.; LEGRAND, P.; BARRATT, G. Surface-modified and conventional nanocapsules as novel formulation for parenteral delivery of halofantrine. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 9, n. 10, p. 3193–3202, 2006.

MOTA, L.G.; COELHO, L.G.V.; SIMAL, C.J.R.; FERRARI, M.L.A.; MARTIN-COMIN, J.; DINIZ, S.O.F.; CARDOSO, V.N. Leukocyte-technetium-99m uptake in Crohn's disease: does it show subclinical disease? *World Journal of Gastroenterology*, v. 16, n. 3, p. 365-371, 2010.

NEW, R.R.C. (Ed.) *Liposomes: a practical approach*. New York: IRL Press, 1990. 301 p.

OLIVEIRA, A.C.P. *Formulação e caracterização físico-química de carreadores coloidais de penicilina G benzatina e estudo comparativo da cinética de liberação in vitro*. 1998. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1998.

OLSON, F.; HUNT, T.; SZOKA, F.C.; VAIL, W.J.; PAPAHDJOPOULOS, D. preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 557, n. 1, p. 9-23, 1979.

OUSSOREN, C.; ZUIDEMA, J.; CROMMELIN, D.J.; STORM, G. Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection II: influence of liposomal size, lipid composition and lipid dose. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1328, n. 2, p. 261-272, 1997.

OYEN, W.J.G.; BOERMAN, O.C.; STORM, G.; VAN BLOOIS, L.; KOENDERS, E.B.; CIAESSENS, R.A.M.J.; PERENBOOM, R.M.; CROMMELIN, D.J.A.; VAN DER MEER, J.W.M.; CORSTENS, F.H.M. Detecting Infection and Inflammation with Technetium-99m-Labeled Stealth Liposomes. *The Journal of Nuclear Medicine*, v. 37, n. 8, p. 1392-1397, 1996.

OYEN, W.J.G.; BOERMAN, O.C.; CORSTENS, F.H.M. Animal models of infection and inflammation and their role in experimental nuclear medicine. *Journal of Microbiological Methods*, v. 47, n. 2, p. 151-157, 2001.

PALESTRO, C.J.; KIM, C.K.; SWYER, A.J.; CAPOZZI, J.D.; SOLOMON, R.W.; GOLD SMITH, S.J. Periprothesic indium-111-labelled leukocytes activity and complementary Technetium-99m sulfur colloid imaging in suspected infection. **The Journal of Nuclear Medicine**, v. 31, p. 1950-1957, 1990.

PATEL, H.M. Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. **Critical reviews in therapeutic drug carrier systems**, v. 9., p. 39-90, 1992.

PAYNE, N.I.; TIMMINS, P.; AMBROSE, C.V.; WARD, M.D.; RIDGWAY, F. Proliposomes: a novel solution to an old problem. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, n. 4, p. 325-329, 1986.

PEREIRA, M.A.; MOSQUEIRA, V.C.F.; VILELA, J.M.C.; ANDRADE, M.S.; RAMALDES, G.A.; CARDOSO, V.N. PLA-PEG nanocapsules radiolabeled with 99mTechnetium-HMPAO: Release properties and physicochemical characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 33, p. 42-51, 2008.

PETERS, A.M.; DANPURE, H.J.; OSMAN, S.; HAWKER, R.J.; HENDERSON, B.L.; HODGSON, H.J.; KELLY, J.D.; NEIRINCKX, R.D. Preliminary clinical experience with 99mTc-Hexamethylpropylene-amineoxine for labelling leucocytes and imaging infection. **Lancet**, v. 2, p. 945-949, 1986.

PHAN, G. ; HERBET, A. ; CHOLET, S. ; BENECH, H. ; DEVERRE, J.R. ; FATTAL, E. Pharmacokinetics of DTPA entrapped in conventional and long-circulating liposomes of different size for plutonium decorporation. **Journal of Controlled Release**, v. 110, p. 177-188, 2005.

PHILLIPS, W.T. ; RUDOLPH, A.S. ; GOINS, B. ; TIMMONS, J.H. ; KLIPPER, R. ; BLUMHARDT, R. A simple method for producing a technetium-99m-labeled liposome which is stable in vivo. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 19, p. 539-547, 1992.

PHILLIPS, W.T. Use of radiolabeled liposomes for PEG-liposome-based drug targeting and diagnostic imaging applications. In: GREGORIADIS, G.; McCORMACK, B. (Ed). Targeting of drugs 6: strategies for stealth therapeutic systems. New York: Plenum Press, 1998. p. 109-120.

PHILLIPS, W.T. Delivery of gamma-imaging agents by liposomes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 37,p. 13-32, 1999.

POWSNER, R.A.; POWSNER, E.R. **Essential Nuclear Medicine Physics**. 2 ed. Blackwell Publishing, 2006. Cap 3, p. 29-36.

RAFFY, S.; TEISSIÉ, J. Control of Lipid Membrane Stability by Cholesterol Content. **Biophysical Journal**, v. 76, p. 2072-2080, 1999.

RAMACHANDRAN, S.; QIST, A.P.; KUMAR, S.; LAL, R. Cisplatin nanoliposomes for cancer therapy: AFM and fluorescence imaging of cisplatin encapsulation, stability, cellular uptake and toxicity. **Langmuir**, n. 22, p. 8156-8162, 2006.

RENNEN, H.J.J.M. ; BOERMAN, O.C.; OYEN, W.J.G.O.; CORSTENS, F.H.M. Imaging infection/inflammation in the new millennium. *European Journal of Nuclear Medicine*, v. 28, n. 2, p. 241-252, 2001.

RENNEN, H.J.J.M.; BOERMAN, O.C.; OYEN, W.J.G. Radiomarcadores para el diagnóstico de infecciones e inflamaciones. In: MARTINCOMIN, J. (Ed.). *Diagnóstico de la inflamación y de la infección en medicina nuclear*. [s.l.: s.n.], 2005. Cap 3, p. 53-75.

ROTE, N. Inflammation. In: McCANCE, K.L.; HUETHER, S.E. (Ed.). *Pathophysiology: the biologic basis for disease in adults and children*. 3 ed. St Louis: Mosby, 1998. Cap. 7, p. 205-236.

ROUX, E.; PASSIRANI, C.; SCHEFFOLD, S.; BENOIT, J.P.; LEROUX, J.C. Serum-stable and long-circulating, PEGylated, pH-sensitive liposomes. *Journal of Controlled Release*, v. 94, p. 447-451, 2004.

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; OWEN, S.C. (Ed.). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 5 ed. Chicago: Pharmaceutical Press, 2006. 918 p.

RUOZI, B.; TOSI, G.; FORNI, F.; FRESTA, M.; VANDELLI, M.A. Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: two techniques for rapid characterization of liposomes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, n. 25, p. 81-89, 2005.

SABA, T.M. Physiology and physiopathology of the reticuloendothelial system. *Archives of Internal Medicine*, v. 126, p. 1031-1052, 1970.

SAHA, G.B. *Fundamental of Nuclear Pharmacy*. 5 ed. New York: Springer-Verlag, 2004. 383 p.

SAHOO, S. K.; LABHASETWAR, V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discovery Today*, v. 8, n. 24, p. 1112-1120, 2003.

SENIOR, J.; ALVING, C.R. Fate and behaviour of liposomes in vivo. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, v. 3., p. 123-193, 1987.

SAPRA, P.; ALLEN, T.M. Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Progress in Lipid Research*, v. 42, p. 439-462, 2003.

SEOK, J.W.; CHOI Y.S.; CHONG, S.; KWON, G.Y.; CHUNG, Y.J.; KIM, B.G.; PARK, S.J. Sentinel lymph node identification with radiopharmaceuticals in patients with breast cancer: a comparison of ^{99m}Tc-tin colloid and ^{99m}Tc-phytate efficiency. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 122, p. 453-457, 2010.

SIGNORE, A.; ANNOVAZZI, A.; CORSETTI, F.; CAPRIOTTI, G.; CHIANELLI, M.; De WINTER, F.; SCOPINARO, F. Biological imaging for the diagnosis of inflammatory conditions. *Biodrugs*, v. 16, N. 4, p. 241-259, 2002.

SIMÕES, S.; MOREIRA, J.N.; FONSECA, C.; DÜZGÜNES, N.; LIMA, M.C.P. On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 947-965, 2004.

SLEPUSHKIN, V.A.; SIMÕES, S.; DAZIN, P.; NEWMAN, M.S.; GUO, L.S.; PEDROSO DE LIMA, M.C.; DÜZQUNES, N. Serum-stable and long-circulating, PEGylated, pH-sensitive liposomes. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p. 2382-2388, 1997.

STANFORD DOSIMETRY, LLC. Radar Medical Procedure Radiation Dose Calculator and Consent Language Generator. Disponível em: <<http://www.doseinfo-radar.com/RADARDoseRiskCalc.html>>. Acesso em: 15 ago. 2011.

STARK, B.; PABST, G.; PRASSL, R. Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: Effects of cryoprotectants on structure. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 41, p. 546-555, 2010.

STORM, G.; BELLLOT, S.O.; DAEMEN, T.; LASIC, D.D. Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 17, p. 31-48, 1995.

SWARBRICK, J.; BOYLAN, J.C. Liposome as pharmaceutical dosage forms. In: DEKKER, M. *Encyclopedia of pharmaceutical Technology*. v. 9. New York, 1994. Cap. 1, p. 1-39.

SZEBENI, J. The interaction of liposomes with the complement system. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, v. 15., p. 57-88, 1998.

TAKESHITA, K.; BACON, K.B.; GANTNER, F. Critical Role of L-Selectin and Histamine H4 Receptor in Zimosan-Induced Neutrophil Recruitment from the Bone Marrow: Comparison with Carrageenan. *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, v. 310, n. 1, p. 272-280, 2004.

THRALL, J.H.; ZIESSMAN, H.A. *Medicina Nuclear*. 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2001. 408 p.

TORCHILIN, V.P.; TRUBETSKOY, V.S. In vivo visualizing of organs and tissues with liposomes. *Journal of Liposome Research*, v. 5, p. 795-812, 1995.

ULRICH, A.S. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Bioscience Reports*, v. 22, n. 2, p. 129-150, 2002.

VAN DER LAKEN, C.J.; BOERMAN, O.C.; OYEN, W.J.G.; VAN DE VEN, M.T.P.; VAN DER MEER, J.W.M.; CORSTENS, F.H.M. Scintigraphic detection of infection and inflammation: new development with special emphasis on receptor interaction. *European Journal of Nuclear Medicine*, v. 25, p. 535-546, 1998.

VAN EERD, J.E.M.; BROEKEMA, M.; HARRIS, T.D.; EDWARDS, D.S.; OYEN, W.J.G.; CORSTENS, F.H.M.; BOERMAN, O.C. *Imaging of infection and inflammation with an improved 99mTc-labeled LTB4 antagonist*. *The Journal of Nuclear Medicine*, v. 46, p. 1546-1551, 2005.

VAN WINDEN, E.C.A.; ZHANG, W.; CROMMELIN, D.J.A. Effect of freezing rate on the stability of liposomes during freeze-drying and rehydration. *Pharmaceutical Research*, v. 14, n. 9, p. 1151-1160, 1997.

VEMURI, S.; RHODES, C.T. Development and characterization of liposomes as therapeutic delivery system: a review. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, n. 70, p. 95-111, 1995.

VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L.; JOHNSTON, P.R.; VENABLE, A.L.; MCKENZIE, K.K. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. **Federation Proceedings**, v. 46, n. 1, p. 118-126, 1987.

WESSMAN, P.; EDWARDS, K.; MAHLIN, D. Structural effects caused by spray and freeze-drying of liposomes and bilayer disks. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 4, p. 2032-2048, 2010.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenan induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544-547, 1962.

WOODLE, M.C.; LASIC, D.D. Sterically stabilized liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 113, n. 2, p. 171-199, 1992.

YANG, D.; ZHU, J.; ZHENG, Y.; GE, L. Preparation, characterization, pharmacokinetics of sterically stabilized nimodipine-containing liposomes. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 32, p. 219-227, 2006.

YUAN, F.; DELLIAN, M.; FUKUMURA, D.; LEUNIG, M.; BERK, D.A.; TORCHILIN, V.P.; JAIN, R.K. Vascular permeability in a Human Tumor Xenograft: Molecular size dependence and cutoff size. **Cancer research**, v. 55, p. 3752-3756, 1995.

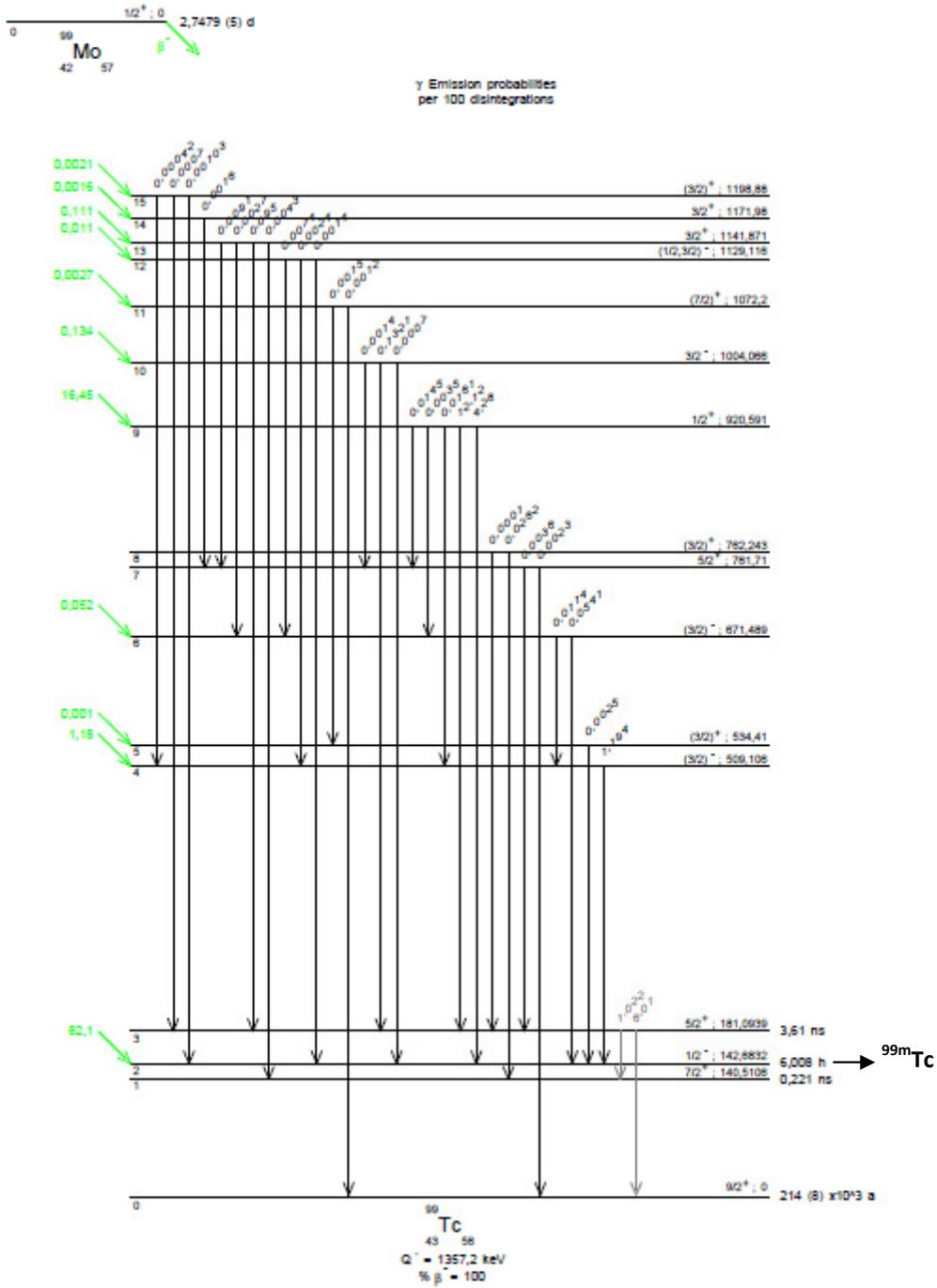
ZADI, B.; GREGORIADIS, G. A novel method for high-yield entrapment of solutes into small liposomes. **Journal of Liposome Research**, v. 10, n.1, p. 73-80, 2000.

ZALIPSKY, S. BRANDEIS, E.; NEWMAN, M.S.; WOODLE, M.C. Long circulating, c: liposomes containing amino-PEG-phosphatidylethanolamine. **FEBS Letters**, v. 353, 74, 1994.

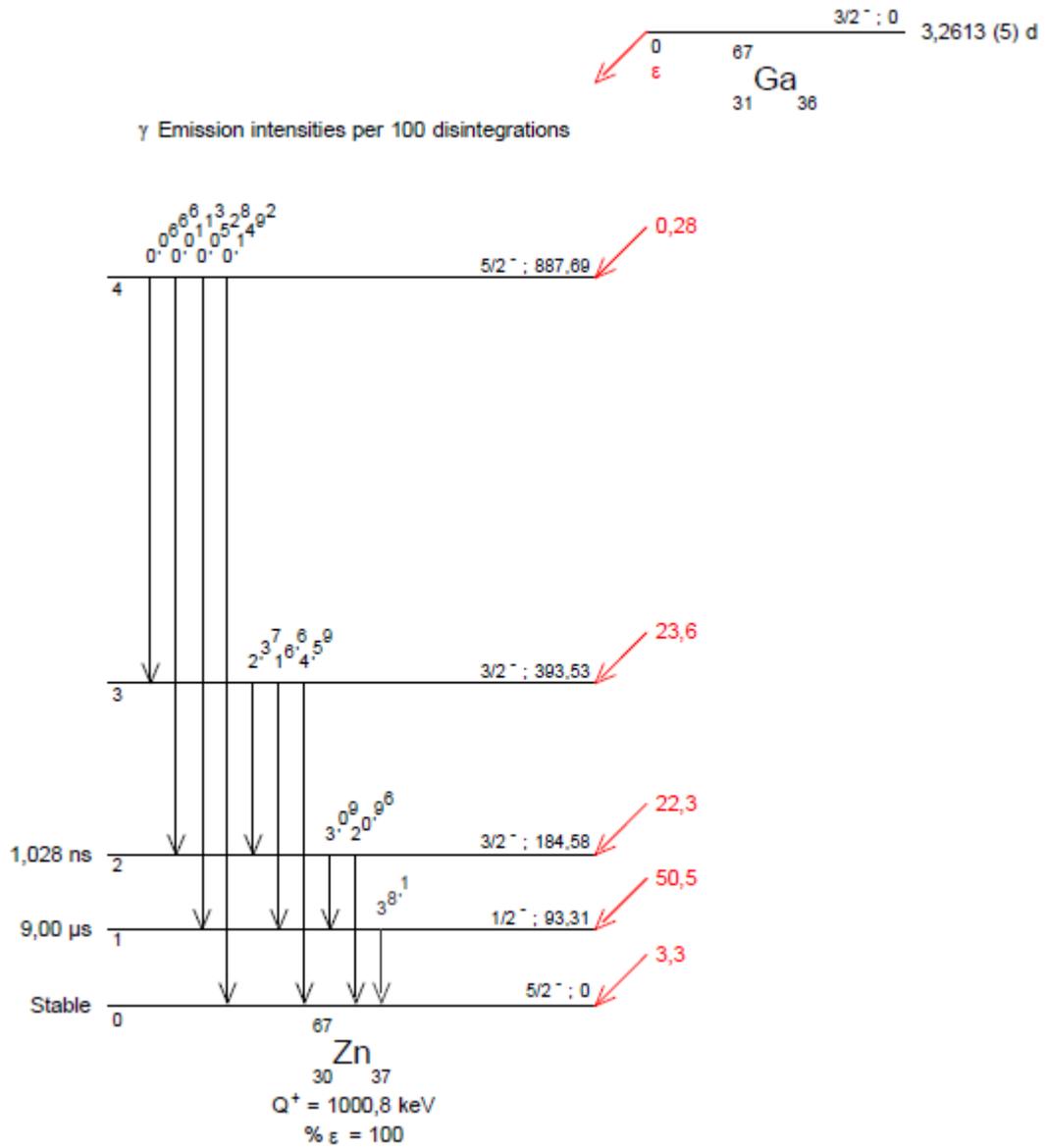
ZOLLE, I. (Ed.). **Technetium-99m Pharmaceuticals**. New York: Springer Berlin Heidelberg, 2007. 345 p.

ANEXOS

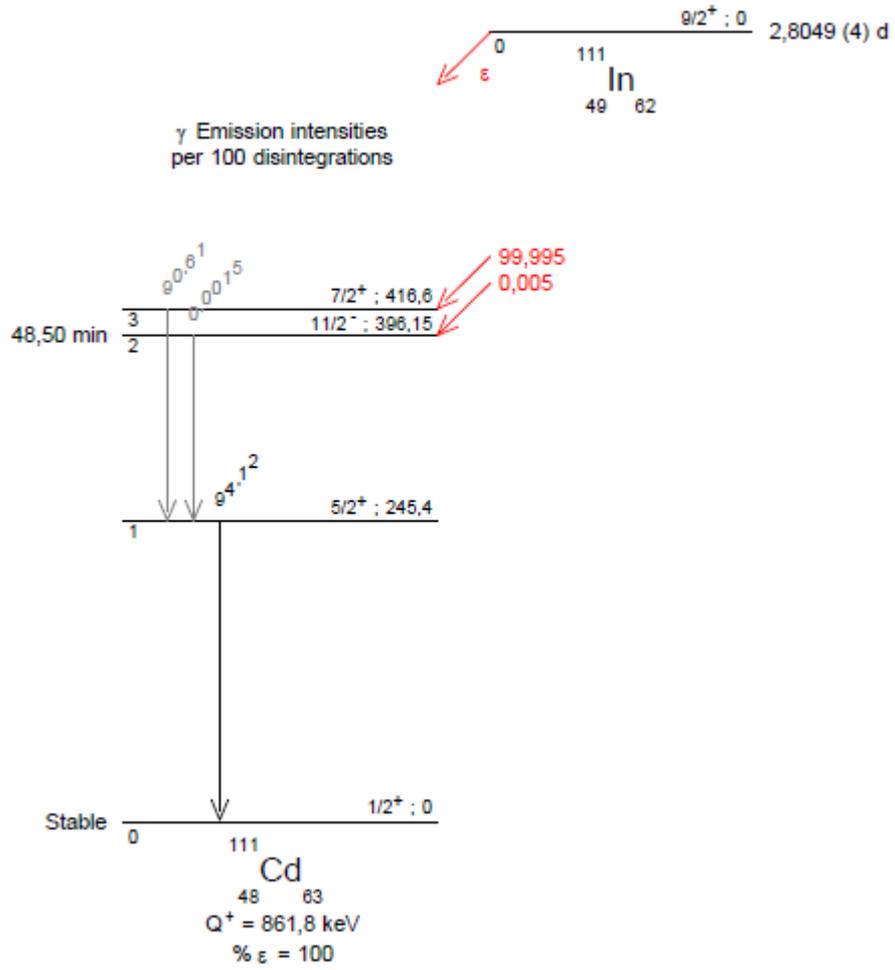
Anexo 1 – Esquema de decaimento do Molibdênio-99



Anexo 2 – Esquema de decaimento do Gálio-67



Anexo 3 – Esquema de decaimento do Índio-111



Anexo 4 - Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -**

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 280/2008**, relativo ao projeto intitulado "**Lipossomas aPEG-DSPE, pH-sensíveis, marcados com 99mTc-Disida: avaliação cintilográfica de inflamação/infecção**", que tem como responsável(is) **Valbert Nascimento Cardoso**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **18/ 03/2009**.

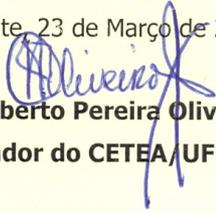
Este certificado expira-se em **18/ 03/ 2014**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 280/2008**, related to the project entitled "**Liposomes aPEG-DSPE, stealth pH-sensitive, labelled with 99mTc-Disida: scintigraphic evaluation of inflammation/infeccion**", under the supervisors of **Valbert Nascimento Cardoso**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **March 18, 2009**.

This certificate expires in **March 18, 2014**.

Belo Horizonte, 23 de Março de 2009.


Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br