

BR 92 30277

INIS - BR - - 3021

EDSON M. BRASQUEVISQUE

MARCAÇÃO DE ERITRÓCITOS "IN VITRO"

COM Tc-99m: APLICAÇÕES CLÍNICAS

Monografia apresentada ao Centro Biomédico da UERJ, para a obtenção do título de mestre.

ORIENTADOR: Prof. Angelo B. Faillace de Oliveira e

COORIENTADOR: Prof. José Luiz Carvalho.

Rio de Janeiro

1983

AGRADECIMENTOS

Temo ser traído pela memória, ao tentar relacionar todos os que contribuíram para a realização deste trabalho, porém, sem correr este risco, não chegarei a eles.

Quero agradecer:

A todos os pacientes que se prontificaram em servir ao nosso estudo, pois este, é por eles.

Ao Dr. MÁXIMO MEDEIROS FILHO[†], amigo e mestre que nos deu início na especialidade.

Ao pessoal do Serviço de Medicina Nuclear do HC-UERJ, a quem esta realização se deve: D. BENEDITA, D. DJALDINA, Sr. EGÍDIO, D. ELENICE, SRTA. FÁTINA, Dra. IACI, Dra. JANE, Sr. JOÃO, Dr. MÁRIO, Dra. MÁRCIA, Dra. ROSA LÚCIA, Srta. SANDRA. Ao MÁRIO, MÁRCIA e ROSA, em especial, pela participação mais próxima.

À D. IRENE FRANÇA E SILVA DA COSTA, pelo carinho com que fez o trabalho datilográfico.

Aos amigos do IBRAN, Drs. BERNARDO, LAURO, PAULO e SANSON, ã FÁTINA, LURDES e ADAURI, sem cujo apoio seria difícil concluir nosso trabalho.

À MARTA CÉLIA M. DA SILVA, pela ajuda na correção do texto.

Ao MARCO, FRANCISCO e Dr. MANDARIN, pela ajuda inestimável na parte fotográfica.

Ao Prof. ANTÔNIO A. QUADRA, pela atenção que nos dispensou em todos os momentos.

Ao Prof. ROBERTO ALCANTARA GOMES, amigo com quem partilhamos nossas dúvidas.

Aos Profs. CLYDE WILLIAMS e JAMES D. BALL, a quem somos imen-
samente gratos, pois deles resultou grande parte do nosso conhecimento .

E, finalmente, aos nossos Orientador Prof. ANGELO B. FAIL-
LACE DE OLIVEIRA e Coorientador Prof. JOSÉ LUIZ CARVALHO, que incansavel-
mente nos deram seu tempo.

† Em memória

Ao Sr. JOSÉ VINCIPROVA, Dr. DANTI e
S .. ELIAS, uma especial dedicatória,
por quanto este trabalho representa
o fruto da incomensurável ajuda,
sem a qual seria impossível ter che-
gado aonde estamos.

À ELIANA, GUSTAVO e CAMILA,
razão do nosso esforço.

MINHA MÃE e IRMÃOS.

"In memoriam" de ANTÔNIO
BOASQUEVISQUE, inesquecível
pai, que há de ser em outro
mundo, pelas graças DIVINAS.

"O homem que luta pelos seus ideais
é o homem que está vivo".

CERVANTES.

ABREVIACÕES E SIGLAS

ACD	-	ácido cítrico, citrato e Dextrose
ATP	-	trifosfato de adenosina
Ca ⁺⁺	-	íon cálcio
CaCl ₂	-	cloreto de cálcio
Cpm	-	contagens por minuto
DTAP	-	ácido dietilenopentacético
EDTA	-	etilenodiamino tetracetato
FAI	-	fração ácido insolúvel
FAS	-	fração ácido solúvel
KeV	-	kilo eletron volt
MA	-	miliampere
µCi	-	micro Curie
µg	-	micrograma
µl	-	microlitro
µm	-	micrômetro
Mo	-	molibdênio
NaCl ₂	-	cloreto de sódio
NaI	-	iodeto de sódio
PPi	-	pirofosfato
RR	-	radiação residual
Sn ⁺⁺	-	íon estanho
SnCl ₂	-	cloreto estanho
SFM	-	sistema fagocitário mononuclear
Tc	-	tecnécio
Tc-99m	-	tecnécio 99 metaestável
TCA	-	ácido tricloroacético
TcO ₂₋₁	-	dióxido de tecnécio
TcO ₄	-	pertecnetato
Tl	-	talio
VST	-	volume sanguíneo total

PREFÁCIO	9
I - INTRODUÇÃO	10
II - ESTUDOS in vitro	25
1- Materiais e Métodos	25
2- Resultados	38
3- Discussão	76
III - ESTUDOS in vivo	89
1- Materiais e Métodos	89
2- Resultados	96
3- Discussão	109
IV - CONCLUSÕES	113
V - RESUMO	115
VI - SUMMARY	116
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

P R E F Á C I O

PREFÁCIO

Desde 1977, quando Pavel et alii (94) publicaram os primeiros resultados de marcação dos eritrócitos "in vivo", usando cloreto estanhoso e Tc-99m, pouco se evoluiu neste sentido.

Com o trabalho de Armas et alii (5), em 1979, utilizando a técnica de Pavel, modificada, surgiu um novo método, mais fácil e rápido para investigação esplênica usando Tc-99m.

As vantagens desta técnica foram logo evidenciadas visto o número de contribuições que surgiram na literatura, nos anos seguintes (6,23,24,78,128). Nós mesmos, entusiasmados com a simplicidade e reprodutibilidade da técnica, passamos a testá-la em nosso serviço (17). Porém, como mostra o trabalho de Ancrì et alii (4), o estanho administrado "in vivo", é capaz de redirecionar o pertecnetato, provocando uma redistribuição do mesmo, com aumento da atividade retida pela tireóide, glândulas salivares e plexo coróide, além de reduzir a sua concentração nas lesões expansivas cerebrais. Tais efeitos podem conduzir a falsos resultados em exames subsequentes, dos pacientes submetidos a este tipo de investigação. A partir destes dados, resolvemos reavaliar a validade do uso, em todos os casos, da técnica de marcação "in vivo", e decidimos por iniciar um estudo no sentido de se obter eritrócitos marcados "in vitro", para os estudos "in vivo".

I - INTRODUÇÃO

Em 1884, Welcker, estudando animais por sangria e subsequente lavagem dos vasos sanguíneos, concluiu que o volume de sangue total (VST), em mamíferos, constitui 7,7% do seu peso corporal. Estes valores foram confirmados mais tarde, para o homem, por Bischoff (142).

Em 1911, Todd e White (12) introduziram a técnica de aglutinação diferencial para avaliação do VST, trabalhando com animais. Oito anos mais tarde, Ashby a desenvolveu para o estudo da volemia e sobrevida dos eritrócitos no homem. Este método requer transfusão de hemácias compatíveis, imunologicamente indetectáveis, com posterior coleta de amostras de sangue do receptor para enumeração das células do doador, através de anticorpo apropriado (10).

Devido às dificuldades técnicas e ao fato de que, com este método não se pode estudar o paciente com suas próprias células, a procura de outros métodos se fez necessária.

Com o desenvolvimento tecnológico, a aplicação dos radionuclídeos como traçadores em Biologia e Medicina deu origem aos métodos de marcação das células sanguíneas. Estes podem ser divididos em dois grupos: os que marcam uma população homogênea de células durante sua formação, e os de marcação randômica.

Dentre os primeiros, estão os que utilizam o ^{59}Fe , a metionina - ^{75}Se e a glicina marcada com ^{14}C ou ^3H . Estes isótopos são incorporados à molécula de hemoglobina no momento de sua síntese e permanecem na célula durante seu período de vida (12, 13).

Os métodos de marcação randômica utilizam amostras de sangue cujas células, de idades variáveis, incorporam o traça -

dor em sítios específicos (53, 98).

Ao contrário daqueles, estes são de execução mais fácil e menos demorada.

Entre os compostos mais amplamente usados para marcação das células sanguíneas "in vitro", estão o cromo-51 hexavalente ($^{51}\text{CrO}_4\text{Na}_2$) (12).

Com o trabalho de Gray e Sterling (53) demonstrando que o cromato de sódio penetra e se torna fixo no interior dos eritrócitos, surgiu uma nova técnica para marcação das células sanguíneas.

Em vista de sua simplicidade, o método substituiu o clássico de Ashby, permitindo resultado do próprio receptor por autotransfusão. Embora tenha sido proposto, inicialmente, para determinação da volemia globular (54), vários outros autores investigaram seu emprego no estudo da sobrevida de hemácias (34, 35).

Gray e Sterling (53) mostraram também que a membrana eritrocitária é permeável somente à forma aniônica do cromo (CrO_4^{-2}). Uma vez dentro da célula, ele é convertido em Cr^{+3} , por processo de oxirredução, possivelmente com a participação do glutathion (1) e nesta forma, incorporado à hemoglobina.

A inibição da glutathion redutase (1, 74) e da via glicolítica (107) pelo cromo hexavalente, podem explicar seu efeito tóxico para as hemácias, sendo, por isso, recomendado o uso de radiocromatos de alta atividade específica na marcação dos eritrócitos (concentração menor que 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de células) (107).

Pearson e Vertrees (98), Pearson et alii (99) e ... Pearson (95), estudando a ligação do Cr-51 à hemoglobina, de

monstraram que tal ocorre com a molécula A predominantemente na cadeia β , e com a hemoglobina F, na cadeia γ .

Vários autores mostraram que o Cr-51 elui dos elementos vermelhos sanguíneos, "in vivo", de forma exponencial (34, 86, 88), aproximadamente, na taxa de 1% ao dia.

Pearson (96), estudando "in vivo" a eluição do Cr-51 ligado às hemoglobinas CC, CS e F, relatou ser o índice de perda maior para a CS do que para as demais.

A bidualistribuição do radiocromo foi estudada por vários autores (52, 98, 107); contudo, em sua maioria, dispensaram pouca atenção ao papel da membrana, como elemento ativo na dinâmica de trocas do Cr^{+6} e Cr^{+3} , possivelmente porque sua capacidade de ligação ao Cr^{+3} seja bastante inferior à da hemoglobina (130). Um modelo de compartimentalização global do Cr-51 "in vivo", foi proposto por Medeiros et alii (84), onde os autores avaliam a distribuição do radiotraçador acoplado às hemácias e sua dinâmica de ligação à fração estromal.

Até recentemente, grande parte das técnicas de marcação das células vermelhas usava o Cr-51 (53, 89, 95, 141), porém, devido à baixa abundância (9%) e à alta energia (320 KeV) dos fótons emitidos por este radionuclídeo, tornou-se impróprio o seu uso nos estudos "in vivo", com câmara de cintilação. Além disso, sua meia-vida de 27,8 dias excede, em muito, o período necessário à realização de vários estudos e concorre para o aumento da dose de radiação absorvida pelo paciente (69, 75).

O Tc-99m, um dos radionuclídeos mais usados atualmente, foi introduzido na medicina por Harper et alii, em 1964 (57). Suas características físicas ($T_{1/2} = 6$ horas e $E_\gamma = 140$ KeV, com abundância de 99,33%) tornaram-no o elemento de escolha para os

procedimentos diagnósticos em medicina nuclear, principalmente usando-se câmara de cintilação (58).

Do ponto de vista químico, o tecnécio comporta-se de forma semelhante ao Rênio (Re), existindo nas valências +7 a -1. Em solução aquosa, as formas mais estáveis são, a +7 (TcO_4^-) em pH ácido ou neutro e a +4 (TcO_2), em pH alcalino (60, 127). Quando administrado sob a forma de TcO_4^- , parece ser transportado na circulação, pela albumina, ligado mais firmemente do que o iodo (61).

Com o objetivo de se aproveitar as vantagens oferecidas pelo Tc-99m, grande esforço foi empenhado no sentido de se conseguir marcar eritrócitos com este isótopo, uma vez que para estudos dinâmicos, tais como avaliação de perfusão e função ventricular, o pertecnetato ou a albumina marcada não preenchem, totalmente, os requisitos exigidos, pois estes radiofármacos difundem facilmente para o espaço extravascular (123).

O primeiro trabalho neste sentido surgiu em 1967, quando Fischer et alii (45) propuseram um método para marcação e utilização das hemácias em cintigrafia esplênica, usando ... Tc-99m. Estes autores não usaram agente redutor no seu processo de marcação, incubando as células com Tc-99m por 20 minutos, aquecendo posteriormente a $49,5^{\circ}C$ por outros 20 e, em seguida, injetando-as nos pacientes.

Apesar de não terem relatado a eficiência de marcação conseguida, imagens esplênicas foram apresentadas. Com este procedimento, Haubold et alii (60) também conseguiram marcar hemácias, porém, com baixa eficiência (10%). E então, passaram a testar, sistematicamente, os vários parâmetros envolvidos na reação, para determinar os fatores que controlavam a e

ficiência de marcação no método de Fischer. Após eliminar alguns destes, como vidraria, equipamentos, composição do sangue dos pacientes e origem do radionuclídeo, restou averiguar o real estado do Tc-99m e do sangue, no momento da marcação. Empiricamente, eles descobriram que o Tc-99m devia ser eluído 30 minutos antes do seu uso, para produzir marcações estáveis. Os autores acreditam que somente o pertecnetato puro possa ser usado para marcação e que o eluato, inicialmente, possui quantidades variáveis de tecnécio reduzido, o qual não é capaz de penetrar nas hemácias. Além disso, o sangue era deixado em repouso por 30 minutos, aparentemente para haver deoxigenação das células antes da adição do pertecnetato. Todas estas mudanças técnicas resultaram no aumento da marcação para 80 a 90%. Outros investigadores tentaram reproduzir estes resultados, porém, sem sucesso (91).

Burdine e Legeay (22) procuraram aumentar a marcação, adicionando ácido ascórbico, peróxido, inibidores sulfidrílicos (permanganato e MHP), heparina e por aquecimento do sistema durante 30 a 50 minutos a 50°C. Das células incubadas apenas com Tc-99m, a atividade era lavada facilmente, reduzindo-se a menos de 10% após a 5a. lavagem. A adição de inibidores sulfidrílicos e o tratamento térmico resultaram em eficiência de aproximadamente 20%, mas com eluição "in vivo", evidenciada pela atividade em estômago e colons.

Anghileri (3), usando o método de Fischer, obteve apenas 0,2% de marcação. Quando empregou cromato como carreador para impedir a absorção do Tc-99, sem a adição de redutores, conseguiu 10% de eficiência de marcação.

Há muito tempo que substâncias redutoras vêm sendo

usadas nos processos de marcação de agentes quelantes e de partículas com Tc-99m (40, 41, 42). Como o íon estanhoso é um dos mais fortes redutores do pertecnetato, sendo capaz de levá-lo aos estados reativos em pH neutro, sua escolha para os métodos de marcação dos eritrócitos tornou-se óbvia. Estes podem ser divididos em dois grupos, de acordo com a seqüência utilizada para reação:

- 1- Adição de Sn^{++} às células antes do Tc-99m (pré-tratamento).
- 2- Adição de Tc-99m às células antes do Sn^{++} .

As técnicas de pré-tratamento das células com Sn^{++} foram estudadas por Berger e Johannsen (14), Nouel e Brunelle (90), Schwartz e Krüger (115), Bardy et alii (11), Ducassou e Arnaud (33), Smith e Richards (122), Billinghamurst et alii (16) e Jones e Mollison (71).

Berger e Johannsen estudaram a eficiência de marcação em função da concentração de Sn^{++} e obtiveram máximo rendimento com 0,2 a 0,5 μg de Sn^{++} para 4 ml de sangue.

Schwartz e Krüger confirmaram estes resultados e mostraram que a adição de Tc-99m ao íon estanhoso, antes da sua incubação prévia com as células, impedia a marcação (115). Mais tarde, vários outros autores, estudando a marcação de hemácias com Tc-99m, relataram a influência de outros fatores, como por exemplo o anticoagulante usado, sobre a concentração de Sn^{++} no meio de reação (16, 71). Por outro lado, Nouel e Brunelle usaram grandes quantidades de citrato estanhoso (53 μg de Sn^{++}), removendo o Sn^{++} excedente com EDTA, após o período de incubação. Ambos os procedimentos parecem resultar em rendimentos de

marcações semelhantes.

No segundo grupo, onde o Tc-99m é adicionado às células antes do estanho, a eficiência de marcação é, geralmente, inferior (50-70%) à encontrada quando o Sn⁺⁺ é misturado previamente às células (2, 38, 44). Embora ainda não esteja claro o exato mecanismo de redução intracelular do Tc-99m, este fato parece incontestável, uma vez que as células marcadas na ausência de agente redutor (exemplo Sn⁺⁺) liberam o Tc-99m facilmente durante lavagens sucessivas com solução salina fisiológica (22) e a análise do hemolisado, de células marcadas na presença de Sn⁺⁺, demonstrou sua ligação, predominantemente com a hemoglobina (31, 38, 110, 130).

Além dos eritrócitos, leucócitos polimorfonucleares e linfócitos, fibroblastos, neuroblastos e células tumorais de várias linhagens já foram marcadas com Tc-99 (40, 50, 132).

Em estudo "in vitro", Hays e Green (61) observaram que o tecido hepático concentra o pertecnetato em maior proporção que os demais, embora seu comportamento "in vivo" seja exatamente o oposto.

Várias substâncias são capazes de modificar a biodistribuição do pertecnetato (4, 27, 61, 72, 83). McRae et alii. (83) observaram que a administração intravenosa de cloreto estanhoso seguida pela injeção de de $^{99m}\text{TcO}_4^-$, produzia a marcação "in vivo" dos eritrócitos. Ancrì et alii (4) confirmaram estes resultados e mostraram que além disso havia aumento da concentração do radionuclídeo na tireóide e glândulas salivares. Porém, quando estudo semelhante foi realizado, usando hemácias marcadas "in vitro", estes efeitos deixaram de aparecer.

Pavel et alii (3-), introduziram o método de marcação dos eritrócitos "in vivo". Estes autores, administrando pirofosfato-cloreto estanhoso por via venosa e posterior injeção de ^{99m}Tc -pertecnato, obtiveram alta eficiência de marcação das células. Resultados semelhantes foram observados por Patel et alii (93), administrando cloreto estanhoso por via oral. Usando a técnica de Pavel, Armas et alii (5) desenvolveram um método simplificado para marcação e subsequente uso das células em cintigrafia esplênica.

Até o presente, os métodos de marcação "in vitro" parecem produzir melhores resultados (55, 71, 78, 123, 128) .

A principal aplicação clínica das hemácias marcadas com Tc-^{99m} tem sido em cintigrafia esplênica (6, 22, 39, 45, 51, 56, 62, 75, 109, 121), porém, com o advento das técnicas de investigação cardiovascular com radiotraçadores, os eritrócitos marcados passaram a ser amplamente empregados, principalmente nos estudos de função ventricular (8, 15, 63, 76, 80, 131, 133) e de perviabilidade dos vasos sanguíneos arteriais e venosos (79, 122, 140).

AVALIAÇÃO ESPLÊNICA

A marcação das hemácias com radionuclídeos, possibilitou a investigação esplênica de forma atraumática (16, 135, 137, 141).

Quando estas células são alteradas por processos físicos, químicos ou imunológicos (7, 56, 70, 73, 116, 136, 143), passam a ser retidas pelo baço, permitindo sua avaliação morfo-funcional (9, 20, 21, 101, 102, 103, 104).

Estrutura e funções esplênicas (

No homem adulto, o baço encontra-se encapsulado por uma camada de tecido conectivo, de alguns milímetros de espessura. Da parte interior, partem inúmeras trabéculas, que dividem o órgão em múltiplos compartimentos intercomunicáveis. O seu parênquima está dividido, de forma genérica, em duas partes, a polpa branca e a vermelha. A artéria esplênica divide-se no hilo originando as artérias trabeculares, das quais partem as artérias centrais que penetram na polpa esplênica. Estes vasos, após várias divisões, ou vão terminar nos seios marginais da polpa branca ou entram na zona marginal da polpa vermelha através das arteríolas penicilares.

As vias de comunicação entre as arteríolas terminais da polpa vermelha e os seios esplênicos podem se fazer ou diretamente (sistema fechado) ou indiretamente (sistema aberto), no qual o sangue flui através os cordões esplênicos (de Billroth) retornando ao espaço intravascular por penetração pelas fenestrações do endotélio sinusoidal.

A figura 1 mostra um diagrama da arquitetura vascular esplênica.

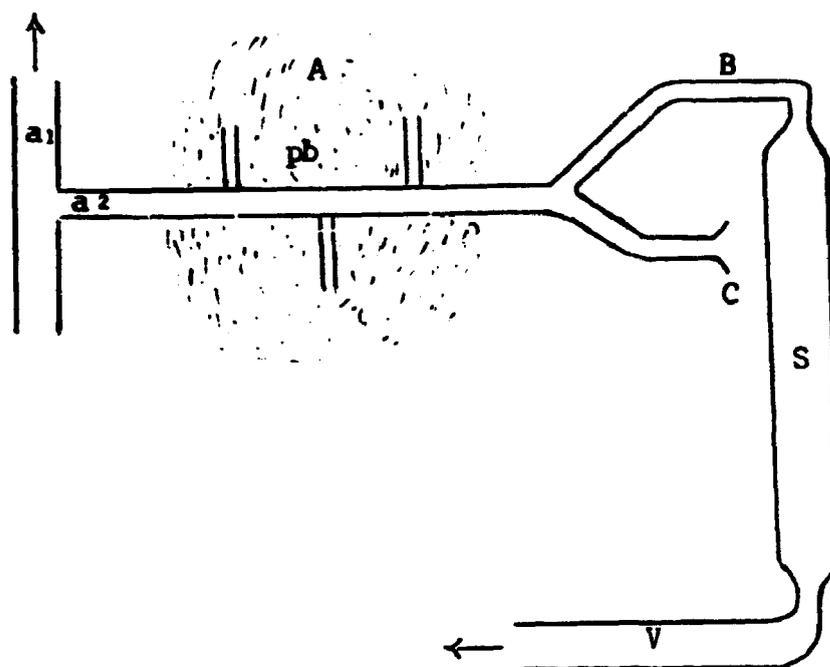


Fig. 1 - Diagrama da vascularização esplênica

a₁ - artéria trabecular

a₂ - artéria central

A - polpa esplênica

pb - polpa branca

S - seio esplênico, em sistema fechado (B)

C - sistema aberto

V - vênula esplênica

(Adaptação de Bowdler, A.J.;19)

Dentre as funções esplênicas, a principal parece ser sua capacidade de servir como filtro, impedindo o retorno de partículas "estranhas" à circulação sistêmica. Estas, podem variar desde hemácias alteradas a microrganismos, partículas coloidais e monômeros de fibrina (19, 126). O mecanismo de extração destes elementos está na dependência das características físico-químicas do material que os constitui (19). No quadro I estão apresentadas as principais funções.

O índice de captação esplênica parece estar relacionado ao tamanho das partículas (126), pois a taxa de extração esplênica, de colóide marcado (diâmetro médio das partículas de 0,4 μm) é de aproximadamente 8 a 16 vezes menor do que a taxa de extração de hemácias marcadas e desnaturadas (diâmetro... $\approx 7 \mu\text{m}$) (9, 82, 126).

Em se tratando de hemácias, existe uma estreita relação entre o índice de captação esplênica e a flexibilidade das células, o calibre do vaso a ser percorrido e seu tempo de permanência neste. As células mais rígidas e mais lentas têm maior probabilidade de sofrerem danos e serem apanhadas pelo sistema de fagócitos mononucleares (SFM) (19). Estas observações estão de acordo com os dados sobre destruição dos eritrócitos normais, onde 80 a 90% parecem ser fagocitados pelo SFM.(142)

A forma e a deformabilidade das hemácias parecem estar na dependência da quantidade de ATP e cálcio na célula. Tais condições ocorrem nos processos de senescência das hemácias "in vivo", e de produção deficiente de ATP pelas células (como na deficiência da piruvato quinase), na esferocitose hereditária, anemia falciforme, hipofosfatemia e hipomagnesemia crônicas e após estocagem do sangue por período prolongado

QUADRO I
FUNÇÕES ESPLÊNICAS

FUNÇÕES	COMENTÁRIOS
Filtração de material circulante	Envolve partículas microscópicas e submicroscópicas
Fagocitose	A maior concentração de macrófagos encontra-se no baço. Fagocitose das hemácias pode ser completa, parcial ou limitada e inclusões intracelulares
Destruição das células sanguíneas	Provavelmente envolvendo células envelhecidas e plaquetas
Hematopoiese	Apenas em condições patológicas na vida adulta
Linfopoiese	Produção de linfócitos, sob estímulo antigênico
Produção de Anticorpos	Frente estímulo antigênico, especialmente antígenos circulantes

Adaptado de Bowdler, A.J., Clinics in Haematology, 4:231, 1975.

(92, 126).

Vários autores (70,126,135, 137) estudaram funcionalmente o baço, utilizando eritrócitos marcados e desnaturados. Peters et alii (102) propuseram um modelo composto de 3 compartimentos (fig.2) para explicar os resultados da extração das células marcadas do sangue. De acordo com os autores, as hemácias desnaturadas, ao penetrarem no baço, podem ter seu tempo de trânsito intraesplênico prolongado, mas retornando à circulação sistêmica (sequestração reversível) ou serem sequestradas irreversivelmente.

Pelo modelo proposto, é possível avaliar a função esplênica global, o fluxo sanguíneo esplênico e a captação irreversível das hemácias.

No quadro II estão as principais indicações para cintigrafia esplênica (82, 105, 117, 118, 125).

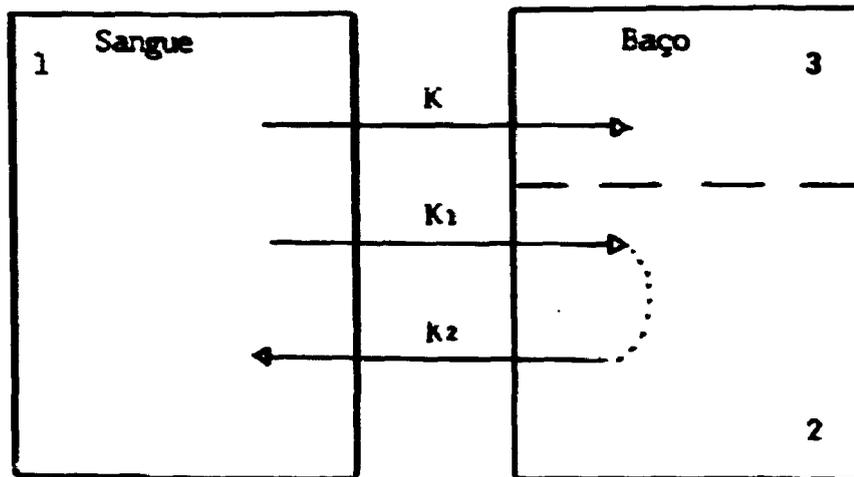


Figura 2 - Função esplênica.

Modelo tricompartmental.

K representa a constante de sequestração irreversível, das células desnaturadas.

K_1 - constante de sequestração reversível.

K_2 - constante de entrada na circulação, das células que foram sequestradas reversivelmente.

(Adaptado de Peters, A.M. et alii, 102)

QUADRO II*

INDICAÇÕES PARA CINTIGRAFIA ESPLÊNICA

- 1 - AVALIAÇÃO DE MASSA NO HIPOCÔNDRIO ESQUERDO
- 2 - LOCALIZAÇÃO DE LESÕES ESPLÊNICAS, EXPANSIVAS
(abcessos, neoplasias, hematomas)
- 3 - INVESTIGAÇÃO DE BAÇO ACESSÓRIO
- 4 - INVESTIGAÇÃO DO VOLUME ESPLÊNICO
- 5 - INVESTIGAÇÃO DA POSIÇÃO (SITUS INVERSUS, AESPLENIA)
- 6 - INVESTIGAÇÃO DA FUNÇÃO ESPLÊNICA

* Maynard (82)

CAPÍTULO II

MARCAÇÃO DE ERITRÓCITOS HUMANOS COM TECNÉCIO -99 me- \bar{a} estável1 - MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 - Obtenção das células: O sangue era colhido de doadores sãos, por punção da veia cubital ou basílica de um dos braços, em um frasco a vácuo, estéril, contendo ACD* (na proporção de 4 ml de sangue para 1 ml de ACD). (87).

1.2 - Drogas não radioativas1.2.1 - Cloreto estanhoso:1.2.1.1 - Pirofosfato de Sódio contendo Cloreto estanhoso (PPI - SnCl₂)

Este material foi fornecido por ... Mallinckrodt Inc. (USA), sob a forma de preparado liofilizado, contendo 12 mg de Pirofosfato de Sódio e 3,4 mg de cloreto estanhoso.

Esta fonte de cloreto estanhoso foi usualmente empregada nos estudos realizados.

Nas experiências em que se utilizou outra fonte, encontram-se indicadas as alterações.

Para cada experimento, o frasco contendo a preparação de PPI-SnCl_2 era diluído em 5 ml de Solução estéril e apirogênica (injetável) de NaCl 0,9%. Desta solução eram feitas diluições sucessivas em salina fisiológica para concentrações finais de 0,068; 0,68; 3,4; 6,8; 68; 340 e 680 $\mu\text{g/ml}$. Para todas as diluições eram utilizados frascos a vácuo e estéreis, para se evitar a oxidação do íon estanho e a contaminação do sangue a ser marcado.

* ACD - Ácido cítrico (0,48g), citrato (1,32g), glicose (1,47g) e água destilada para 100 ml de solução. Produzida por Laboratório Don Baxter S.A., Indústrias Químicas.

1.2.1.2 - Cloreto estanhoso "Cristais"

Este material foi obtido de J. T. Baker sob a forma de sal bihidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Soluções nas concentrações usadas do PPI- SnCl_2 eram feitas em Salina fisiológica estéril e apirogênica, preparadas imediatamente antes do uso (solução fresca).

1.2.2 - Ácido Dietileno pentacético (DTPA):

Material fornecido por Charles e Frost (Canadá) sob a forma de preparado liofilizado, contendo 25 mg de DTPA e 2,7 mg de cloreto estanhoso.

Dilua-se o conteúdo do frasco em solução de NaCl 0,9%, para uma concentração final de 2,5 mg/ml de DTPA e 0,27 mg/ml de cloreto estanhoso, momentos antes do uso.

1.2.3 - Substâncias anticoagulantes:

- a. Citrato de Sódio P.A., produzida por Merck S.A., Indústrias Químicas.
- b. Oxalato de Potássio, fornecido por Carlo Erba S.A.
- c. Etilenodimetiltetracetato de Sódio (EDTA), do Laboratório Reagen, Indústrias Químicas Ltda.

- d. Solução anticoagulante ACD, do Laboratório Baxter S.A.
- e. Heparina sódica, fornecida por Laboratório Roche S.A., em frascos de 5 ml contendo 5.000 UI/ml, (50 mg/ml).

1.2.4 - Ácido Ascórbico, Merck S.A.

1.2.5 - Cloreto de Cálcio P.A., do Laboratório Merck S.A., Indústrias Químicas.

1.2.6 - Hemoglobina, do Laboratório Merck S.A., Indústrias Químicas.

1.2.7 - Acetona, Reagen, Indústrias Químicas Ltda.

1.3 - Drogas Radioativas

1.3.1 - Tecnécio - 99 meta estável (99m-Tc):

O 99m-Tc era obtido sob a forma de pertecnetato de Sódio (99m-TcO₄Na) por eluição em Solução de NaCl 0,9%, de geradores de 99Mo → 99m-Tc, fornecidos por Mallinckrodt, Inc. (USA).

1.3.2 - Cromato de Sódio (Cr-51)

O Cr-51 (CrO₄Na₂) foi fornecido pelo IPEN - São Paulo.

1.4 - Outros

1.4.1 - Membranas de diálise, de Sigma Chemical Company, referência nº 250.

1.4.2 - Filtros millipore 0,22 μm , diâmetro médio.

1.5 - Equipamentos

1.5.1 - Cintilômetro

A radiometria gama das amostras era feita em um sistema de contador de poço com cristal de iodeto de sódio (ativado com Tl), acoplado a amplificador e escalímetro (Espectro Scaler II - Picker).

1.5.2 - Agitador de amostras (Micronal)

1.5.3 - Centrífuga Lufenco (modelo 40308)

1.5.4 - Aparelho para Eletroforese com fonte de 100 mA e densitômetro Cellomatic 2 (Strumenti Scientifici S.p.A., Itália).

1.5.5 - Banho-Maria Fename

1.5.6 - Tubos para Contagem medindo 47 mm de altura x 11 mm de diâmetro, e 1 mm de espessura das paredes, providos de tampa com rosca.

2.6 - Técnica experimental:

2.6.1 - Marcação dos Eritrócitos

Do sangue colhido em solução ACD eram retiradas alíquotas de 3 ml e transferidas para frascos a vácuo, estéreis. A seguir, adicionava-se 1 ml de solução de $\text{PPI} - \text{SnCl}_2$ nas concentrações indicadas. A mistura era incubada a 37°C em banho-maria por 60 minutos e os frascos agitados suavemente por 10 segundos, a intervalos de 10 minutos. Como controle eram incubados 3 ml de sangue com 1 ml de salina fisiológica.

Ao final dos 60 minutos, eram adicionados 1,5 ml da solução de pertecnetato de sódio contendo 100 μCi de 99m-Tc . A incubação era mantida nas condições acima descritas por mais 10 minutos.

A mistura era, então, centrifugada a $600 \times g$. Retirava-se alíquotas de 25 μl da fração plasmática e celular, que eram colocadas em tubos de contagem contendo 1 ml de água destilada. A contagem das amostras foi feita em cintilador de poço com cristal de NaI (Tl) , ajustado para energia de 140 keV, com janela de 20 keV. O tempo de contagem para cada amostra foi escolhido de forma a se obter um coeficiente de variação percentual (% Cv) de 1%.

A eficiência da marcação dos eritrócitos foi calculada de acordo com a fórmula (78):

$$\% \text{ E M} = \frac{(\text{cpm Hemácias} - \text{cpm RR})}{(\text{cpm Hemácias} - \text{cpm RR}) + (\text{cpm plasma} - \text{cpm RR})}$$

Modificações técnicas, quando realizadas, encontram-se indicadas na experiência.

RR - Radiação residual.

Todos os recipientes contendo material radioativo eram mantidos em protetores de chumbo, de acordo com as especificações das normas de Proteção Radiológica da CNEN.

1.6.2 - Lavagem das hemácias marcadas

Após a marcação, as células eram submetidas a 4 lavagens sucessivas, com solução de cloreto de sódio 0,9%. Para isto, depois da primeira centrifugação a 600 x g, o plasma era retirado e o hematócrito reconstituído com solução de NaCl 0,9%. Repetia-se a centrifugação nas condições acima descritas e do sobrenadante e sedimento retiravam-se alíquotas de 2 µl que eram transferidas para tubos de contagem contendo 1 ml de água destilada, os quais eram contados no cintilômetro.

1.5.3 - Cinética de Incorporação do ^{99m}Tc

Para a medida da incorporação do ^{99m}Tc pe los eritrócitos, as células eram incubadas com PFI-SrCl_2 , por tempos diferentes (5 e 60 minutos). Amostras de 0,5 ml de sangue eram retiradas nos tem pos de 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 e 10 minutos após a adição de ^{99m}Tc e transferidas para tubos a vácuo, contendo 1 ml de solução de DTPA, mantidos a 4°C . Amostras-controle foram colhidas nos mes mos tem pos e condições, substituindo-se o DTPA por 1 ml de solução de NaCl 0,9%.

Imediatamente após a coleta, os tubos eram centrifugados a 600 x g, transferindo-se, ent ão, alí quotas de 25 μl do sobrenadante e do sedimento para tubos de contagem, contendo 1 ml de água destilada, sendo em seguida, contados de acordo com as con di ções descritas no item 1.6.1.

1.5.4 - Análise da Fração Celular

Do sangue com anticoagulante (ACD) eram re tirados 3 ml e o restante centrifugado a 600 x g. Separava-se o plasma e, às células, adicionava-se salina fisiológica, reconstituindo o hematócrito i nicial. Após centrifugação nas condições acima des critas, desprezava-se o sobrenadante e repetia-se a operação por mais duas vezes.

Ao final, 1 ml do sedimento celular era se

parado e o volume restante hemolisado em igual volume de água destilada, por agitação vigorosa durante 5 minutos. Do hemolisado, 3 ml eram retirados e os demais, passados em filtro millipore 0,22 μ m.

O sangue total, a fração hemolisada e a filtrada eram incubadas com PPI-SnCl₂ de acordo com a técnica descrita no item 1.6.1.

Ao final do período de marcação com ^{99m}Tc, as frações, hemolisada e filtrada, eram diluídas 10 vezes em água destilada e alíquotas de 25 μ l separadas e acrescidas com 1 ml de TCA 10%, a frio. Depois de agitadas e centrifugadas a 800 x g, separava-se o sobrenadante e o sedimento era ressuspenso em igual volume de solução de NaCl 0,9%, por agitação mecânica. Amostras de 25 μ l eram, então, retiradas de ambas frações para medida da radioatividade.

Solução de hemoglobina na concentração de 4,8 g/100 ml (diluição em solução de NaCl 0,9%) e submetida ao mesmo processo de marcação com ... ^{99m}Tc. Após precipitação com TCA a 10%, a frio, as amostras eram centrifugadas nas condições já descritas, e alíquotas do sobrenadante e precipitado contadas em cintilador de poço.

Das hemácias lavadas, submetia-se 0,5 ml a hemólise por adição de 1 ml de água destilada e 0,5 ml de Tolueno. Depois de agitada vigorosamente e centrifugada a 800 x g, separava-se a fração su

perior (hemoglobina) para análise por eletroforese em acetato de celulose (81), e o estroma era res-suspensão em 1 ml de solução de NaCl 0,9%.

A medida da radioatividade na fração de membrana e na do hemolisado era feita em alíquotas de 100 μ l e corrigida para o volume inicial.

Eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose:

A - Reagentes:(81)

A.1 - Tampão Tris-Glicina.

A.2 - Solução corante de Ponceau-S.

A.3 - Ácido Acético 5%.

B - Equipamentos:

B.1 - Cuba para eletroforese.

B.2 - Fonte para 100 mA.

B.3 - Densitômetro.

B.4 - Suporte - Fitas de acetato de celulose

C - Técnica:

Alíquota de 1,5 μ l do hemolisado era aplicada na fita de acetato de celulose. Depois de montada sobre os suportes da cuba com as extremidades imersas na solução tampão, ligava-se a fonte estabelecendo uma corrente de 10 mA entre as suas extremidades. A corrida eletroforética durava 45 minutos. Ao seu término, as fitas eram colocadas

C 3/1

para corar em solução corante de Ponceau-S, por 10 minutos, para clareamento. A leitura de concentração era feita em densitômetro e a radiometria das bandas coradas, em cintilador de poço.

1.6.5 - Análise da fração plasmática:

Depois de centrifugar a 600 x g, separava-se a fração plasmática de cada amostra de sangue tratado com diferentes concentrações de PPI-SnCl₂, as quais eram submetidas a diálise, cromatografia e tratamento com ácido tricloroacético.

1.6.5.1 - Diálise

Do plasma separado, amostras de 0,5 ml era dialisadas em becher com 100 ml de água destilada por 270 minutos. O banho de diálise era trocada periodicamente e, nesse momento, o saco de diálise era colocado em tubo de ensaio e contado em cintilador de poço.

1.6.5.2 - Cromatografia

Aplicavam-se alíquotas de 1 µl da fração plasmática em papel Wathman nº 1 (fitas com 10 cm de comprimento por 2 cm de largura), que eram colocadas na câmara de cromatografia contendo acetona como sol

vente. Ao final da corrida cromatográfica, as fitas eram deixadas a secar e cortadas em fragmentos de 1 cm de comprimento. Como controle, usava-se amostras de pertecneta to com atividade semelhante à do plasma.

A radiometria dos segmentos da fita era feita em cintilador de poço.

1.6.5.3 - Precipitação com Ácido Tricloro Acético (TCA)

Em tubo de ensaio com 1 ml do plasma adicionava-se igual volume de TCA 10% a frio. O tubo era agitado manualmente e centrifugado a 800 x g.

Removia-se o sobrenadante, fração ácido solúvel (FAS) e o precipitado, fração ácido insolúvel (FAI), era ressuspenso em água destilada, com o auxílio do agitador mecânico. Amostras de ambas frações eram submetidas à radiometria gama.

1.7 - Anticoagulantes:

Para esta etapa do trabalho, colhia-se o sangue, em seringa contendo o anticoagulante, que, em seguida, era dividido em alíquotas de 3 ml para posterior incubação com concentrações crescentes da droga usada.

Q U A D R O I				
<u>ANTICOAGULANTES USADOS</u>				
Anticoagulante	Concentração sanguínea experimental (mg/ml)			
CITRATO DE SÓDIO	9,0	30,0	51,0	94,0
OXALATO	2,2	12,2	35,5	102,0
EDTA	6,0	12,4	36,0	102,0
HEPARINA SÓDICA	0,3	12,5	62,5	125,0

1.8 - Marcação com Cr⁵¹O₂:

A marcação dos eritrócitos com Cr-51 foi realizada conforme a técnica recomendada pelo ICSH, 1980 (67).

2 - RESULTADOS

2.1 - Concentração de Cloreto estanhoso:

A figura 1 mostra os resultados obtidos usando várias concentrações de PPI-SnCl_2 . É interessante notar que a eficiência de incorporação de Tc-99m pelas hemácias cresce com o aumento da concentração de PPI-SnCl_2 , até certo limite, quando há uma espécie de saturação, decrescendo posteriormente a níveis inferiores aos iniciais. Na mesma figura estão representados os resultados obtidos com cloreto estanhoso, em solução recém-preparada.

Podemos observar semelhança entre as curvas, indicando que apenas o cloreto estanhoso do PPI-SnCl_2 parece tomar parte na reação.

A análise estatística por comparação das médias (25), pela distribuição t de Student, não demonstrou diferença significativa, para $\alpha = 0,05$, entre os resultados obtidos com as concentrações de 3,4 e 6,8 $\mu\text{g/ml}$ de PPI-SnCl_2 e 3,4; 1,7 e 0,68 $\mu\text{g/ml}$ de SnCl_2 .

A incubação com solução de NaCl 0,9% no lugar de PPI-SnCl_2 , resultou em eficiência de marcação em torno de 50%.

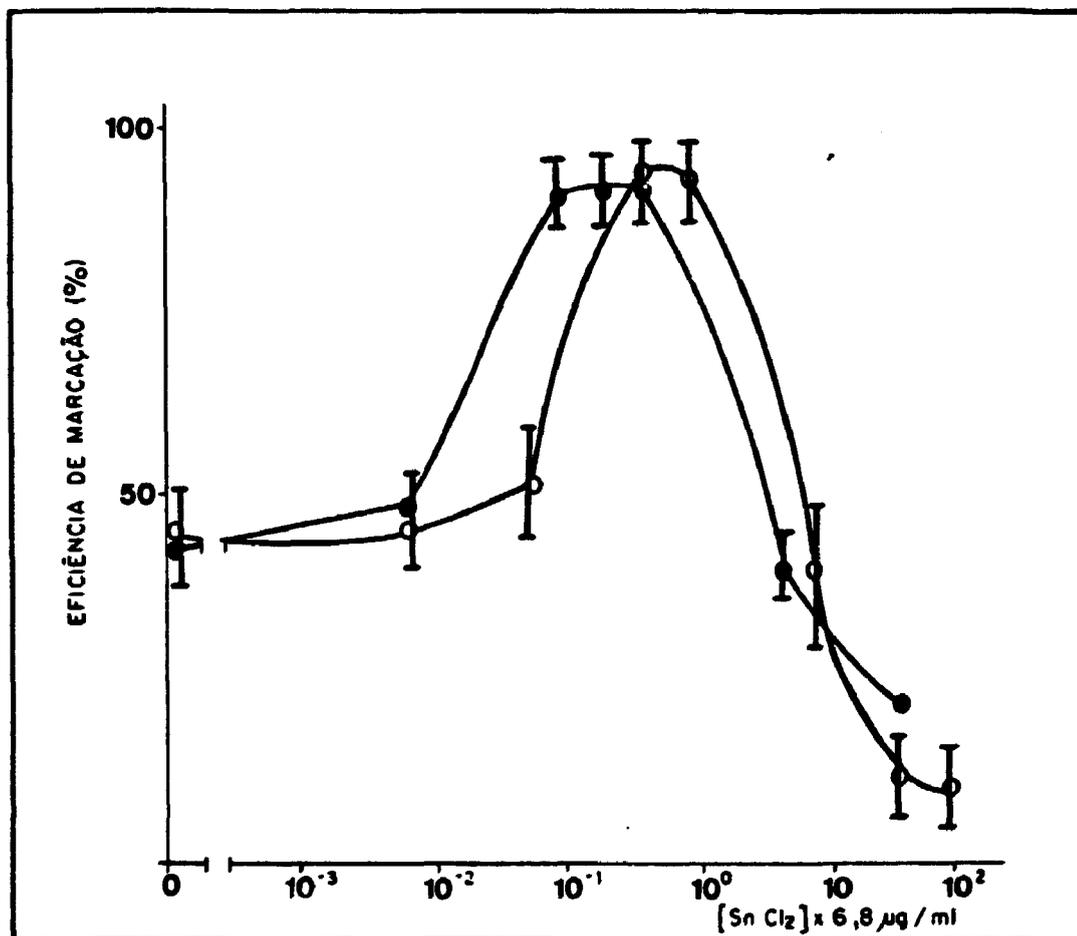


Fig. 1 - Incorporação do Tc-99m pelos eritrócitos tratados com PPI-SnCl₂.

Efeito da concentração do PPI-SnCl₂.

Condições experimentais descritas no item 1.7.

PPI-SnCl₂ (○), SnCl₂ (●), ($\bar{X} \pm 1S$, com $n = 7$).

Concentrações de PPI-SnCl₂ usadas (µg/ml):

0,068; 0,68; 3,4; 6,8; 34; 68; 680.

Para o SnCl₂, foi testada a concentração de 1,7 µg/ml, além das demais e deixada de testar a de 680 µg/ml.

2.2 - Lavagem das células marcadas:

Sendo a eficiência de marcação representativa da ligação do Tc-99m às células, lavagens sucessivas com soluçãõ de NaCl 0,9% não deveriam alterar o resultado inicial.

A figura 2 mostra, entretanto, que, com as concentrações testadas, superiores e inferiores a 6,8 µg/ml de ... PPI-SnCl₂, múltiplas lavagens das células marcadas provocaram redução progressiva dos níveis de radioatividade celular, indicando que o Tc-99m encontrava-se ligado fracamente às células ou fazendo parte do meio extracelular.

Com relação aos controles, a atividade era reduzida exponencialmente com o número de lavagens, atingindo valores inferiores a 10% após a 5a. lavagem.

2.2 - Tempo de Incubação com cloreto estanhoso:

Se a penetração do estanho (Sn⁺⁺) nas hemácias ocorresse instantaneamente, a eficiência de marcação com Tc-99m não deveria se modificar com o tempo de incubação das células com PPI-SnCl₂. Contudo, a curva de incorporação (Figura 3), com tempos crescentes de tratamento das células com PPI-SnCl₂, mostra que a incorporação do Tc-99m aumenta em função do tempo de incubação, com uma constante de reação (k₁) igual a 0.03 min⁻¹, até os 60 minutos, quando então, o sistema encontra-se praticamente em equilíbrio.

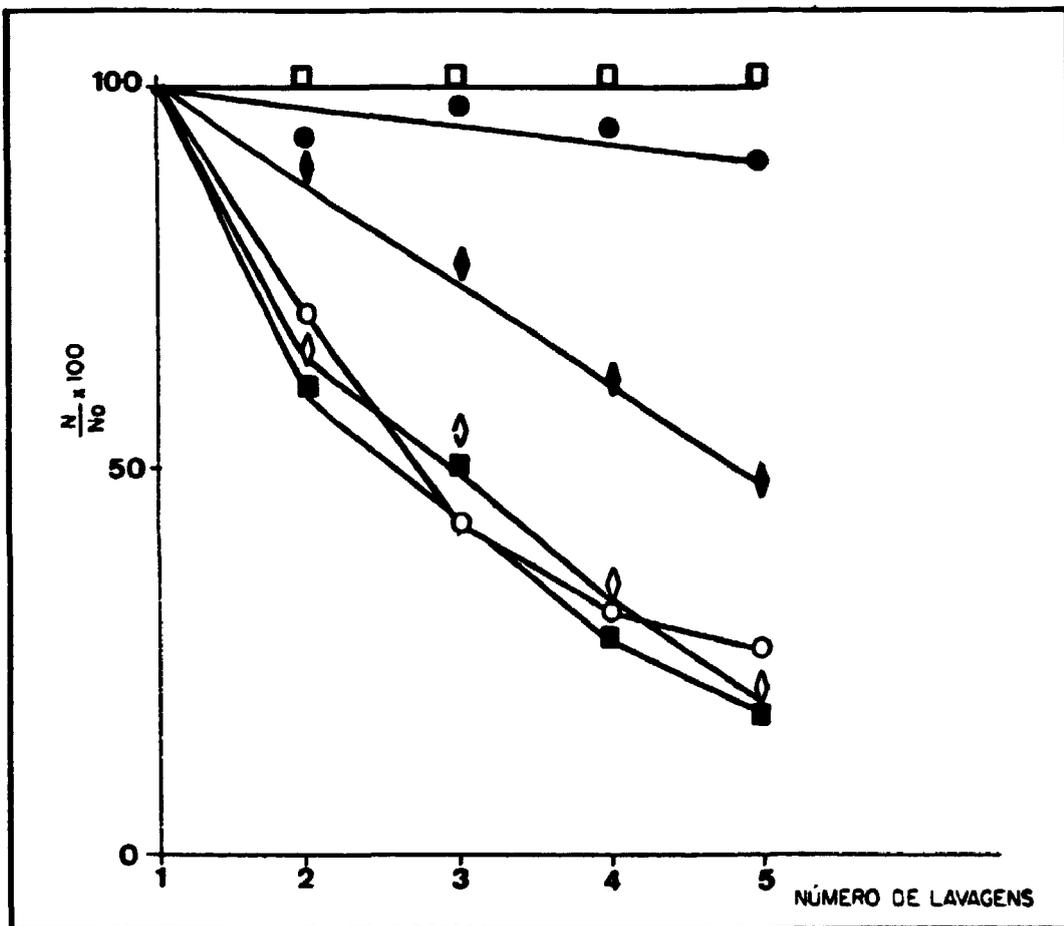


Fig. 2 - Eritrócitos marcados com Tc-99m.

Efeito do número de lavagens com solução de NaCl 0,9%.

Condições experimentais descritas no item 1.7.

Células tratadas com PPI-SnCl₂ nas concentrações de (µg/ml): 680 (◇); 68 (●); 6,8 (□); 0,68 (◇) ; 0,068 (○); e com solução de NaCl 0,9% (■).

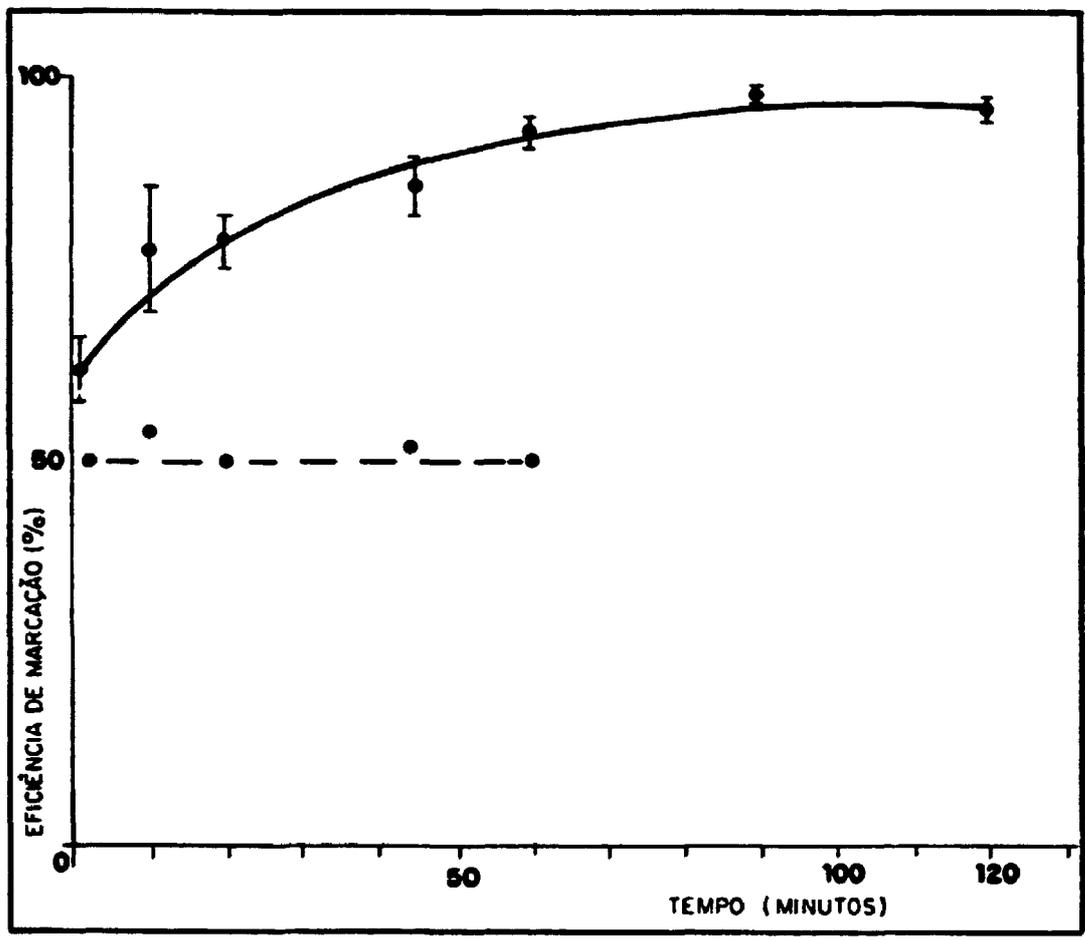


Fig. 3 - Incorporação do Tc-99m pelos eritrócitos tratados com PPI-SnCl₂.
Efeito do tempo de incubação , ($\bar{X} \pm 1S$, com n = 4).
Condições experimentais descritas em 1.7.
PPI-SnCl₂ (○) e NaCl (●).

2.4 - Temperatura de incubação:

C 8/A

Um dos fatores mais importantes na viabilidade dos eritrócitos marcados é a temperatura de incubação das células.

A figura 4 mostra a variação da marcação com a temperatura. A incorporação aumenta com a temperatura de incubação até um limite máximo de 50°C. Em temperaturas superiores, as modificações moleculares são tais que se inicia um processo de hemólise "in vitro".

Na figura 5 são mostradas as alterações morfológicas observadas ao M.O., em distensões de sangue com ACD e ... SnCl₂ (6,8 µg/ml), mantidas à temperatura ambiente, a 37°C por 60 minutos e a 45°C por 30 minutos, depois de incubadas previamente a 37°C por 60 minutos (Coloração pelo método de Wright) (142).

À temperatura ambiente por 120 minutos, não houve modificação em grau apreciável da forma das células. Incubação a 37°C por 60 minutos foi capaz de produzir discreta anisocitose com poicilocitose.

2.5 - Volume de Reação:

A relação entre a concentração de íon estanhoso e o número de células no sistema de marcação com 99m-Tc foi estudada por alguns autores (16, 123). Ducassou & Arnaud (33) usando Pirofosfato com cloreto estanhoso, verificaram que esta relação deve ser da ordem de 0,15 µg de Sn⁺⁺/ml de sangue, a fim de se obter um rendimento de marcação acima de

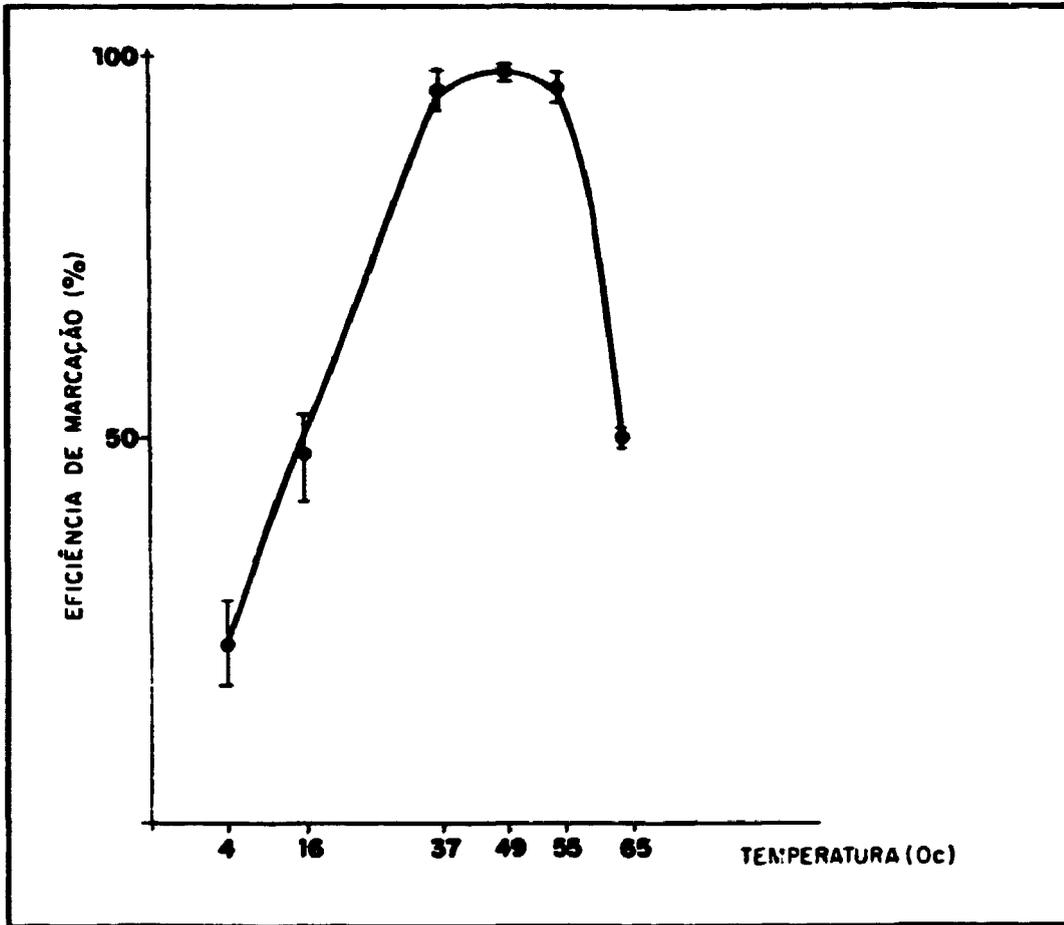


Fig. 4 - Incorporação do Tc-99m pelos eritrócitos.

Efeito da temperatura de incubação.

Condições experimentais descritas em 1.7.

(Cada ponto representa a média \pm 1S, com $n = 4$).

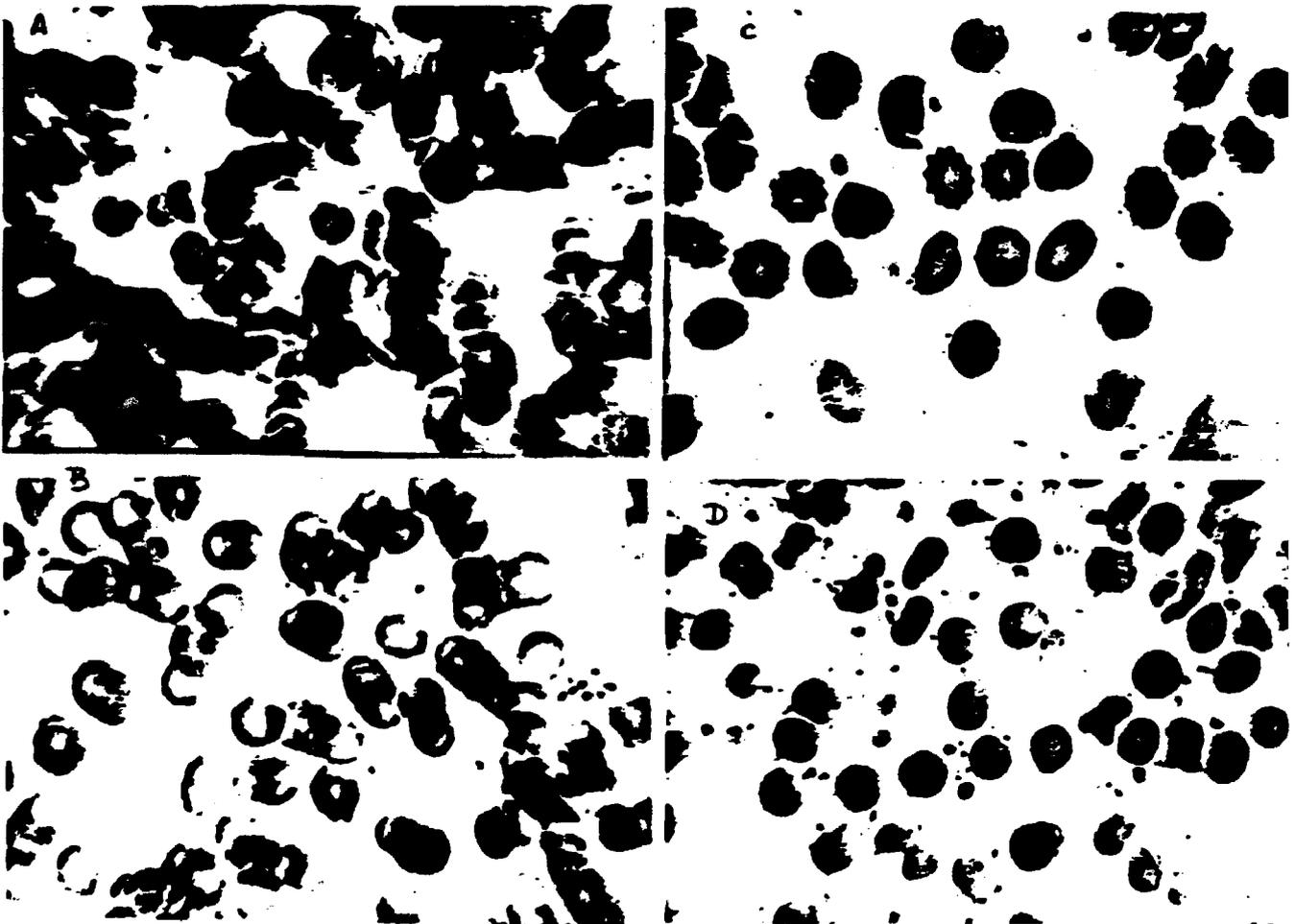


Fig. 5 - Estudo morfológico ao microscópio óptico.

Efeito da temperatura de incubação.

Após incubação com PPI-SnCl_2 ($6,8 \mu\text{g/ml}$) à temperatura ambiente por 60 min. (A), após incubação a 37°C durante 60 min. (B) e depois de incubadas a 45°C , após 60 min. a 37°C (C).

Incubação a 45°C por 60 min. (D).

**TABELA 1 INFLUÊNCIA DO VOLUME DE REAÇÃO * SOBRE
A EFICIÊNCIA DE MARCAÇÃO DOS ERITRÓCITOS
TRATADOS COM 1ml de PPI-Sn Cl₂ (6,8 μ g/ml)**

VOLUME DE REAÇÃO (ml)	EFICIÊNCIA DE MARCAÇÃO (%)
2,0	64
2,5	71
3,5	84
4,5	95

* O VOLUME DE PPI-Sn Cl₂ (1ml) e ^{99m}Tc (0,5 ml)
FORAM MANTIDOS CONSTANTES.

95,5%.

Com o objetivo de determinar a relação entre os volumes de sangue, de PPI-SnCl₂ (6,8 µg/ml) e de pertecnetato, procuramos medir a eficiência de marcação, variando o volume de sangue e mantendo constante os demais.

A tabela 1 mostra que a eficiência de marcação aumenta com o volume de reação (1 ml de PPI-SnCl₂, 0,5 ml de pertecnetato e volume variável de sangue), atingindo cifras superiores a 90%, com 3 ml de sangue. Estes resultados confirmam os encontrados na figura 1.

2.6 - Cinética de incorporação do 99m-Tc pelos eritrócitos humanos:

Utilizando a técnica descrita por Calahan e Cols. (23), procuramos estudar a capacidade de incorporação de 99m-Tc por eritrócitos tratados "in vitro" com PPI-SnCl₂, em diferentes tempos.

A figura 6a mostra a incorporação de 99mTc pelas células em solução de NaCl 0,9% e de DTPA 2,5 mg/ml.

Com NaCl, solução 0,9% a eficiência de marcação atinge valores acima de 90% dentro do primeiro minuto, permanecendo constante até 10 minutos após. Entretanto, a incorporação em meio contendo DTPA não é tão rápida, elevando-se de 82% aos 0,5 minutos a 96% aos 5 minutos, evoluindo relativamente estável a partir deste ponto.

A incubação das células com PPI-SnCl₂, por 5 e 60 minutos, resultou em diferentes índices de incorporação do

Tc-99m, ao observarmos a primeira fase das curvas (Fig.6b).

Tal processo ocorre como uma reação de primeira ordem (138), a qual pode ser descrita matematicamente como se segue:

$$\frac{dx}{dt} = k_1 (a-x)$$

$$\frac{dx}{(a-x)} = k_1 dt$$

$$\int \frac{dx}{(a-x)} = k_1 \int dt$$

$$\ln \frac{a}{a-x} = k_1 t$$

ou

$$k_1 t = \underline{\underline{2,303 \times \log \frac{a}{a-x}}} \quad \text{ou} \quad k_1 = \frac{2,303}{t} \log \frac{a}{a-x}$$

Onde a representa a concentração inicial do pertecnetato (Tc-99m), x, a concentração do produto formado, ou seja,... Tc-99m-ligado aos eritrócitos e k, a constante de reação.

Como podemos ver na figura 6b, o valor para k duplicou entre 5 e 60 minutos, indicando o aumento da eficiência do sistema em incorporar Tc-99m.

a - é a concentração inicial do substrato, representado, no nesso caso, pela concentração de $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$.

b - é a quantidade do produto formado, ou seja, a concentração de ^{99m}Tc ligada aos eritrócitos.

k_1 - é a constante de reação.

Entretanto, na prática, as medidas foram feitas a intervalos de tempo a partir de 0,5 minutos.

Neste caso,

$$K_1 = \frac{2,3}{t_2 - t_1} \log_{10} \frac{C_1}{C_2}$$

Onde C_1 é a concentração do substrato no tempo t_1 e C_2 a concentração do substrato no tempo t_2 .

A constante de reação é duplicada entre os tempos de 5 e 60 minutos, indicando a ativação do sistema neste intervalo de tempo.

2.7 - Atividade de $^{99m}\text{TcO}_4$:

Um dos fatores de grande importância no emprego de eritrócitos marcados, é o nível de radioatividade que são capazes de carrear.

Para a medida do volume globular circulante ou da fração de ejeção ventricular, a atividade de ^{99m}Tc usualmente empregada, difere de um fator da ordem de 10^3 .

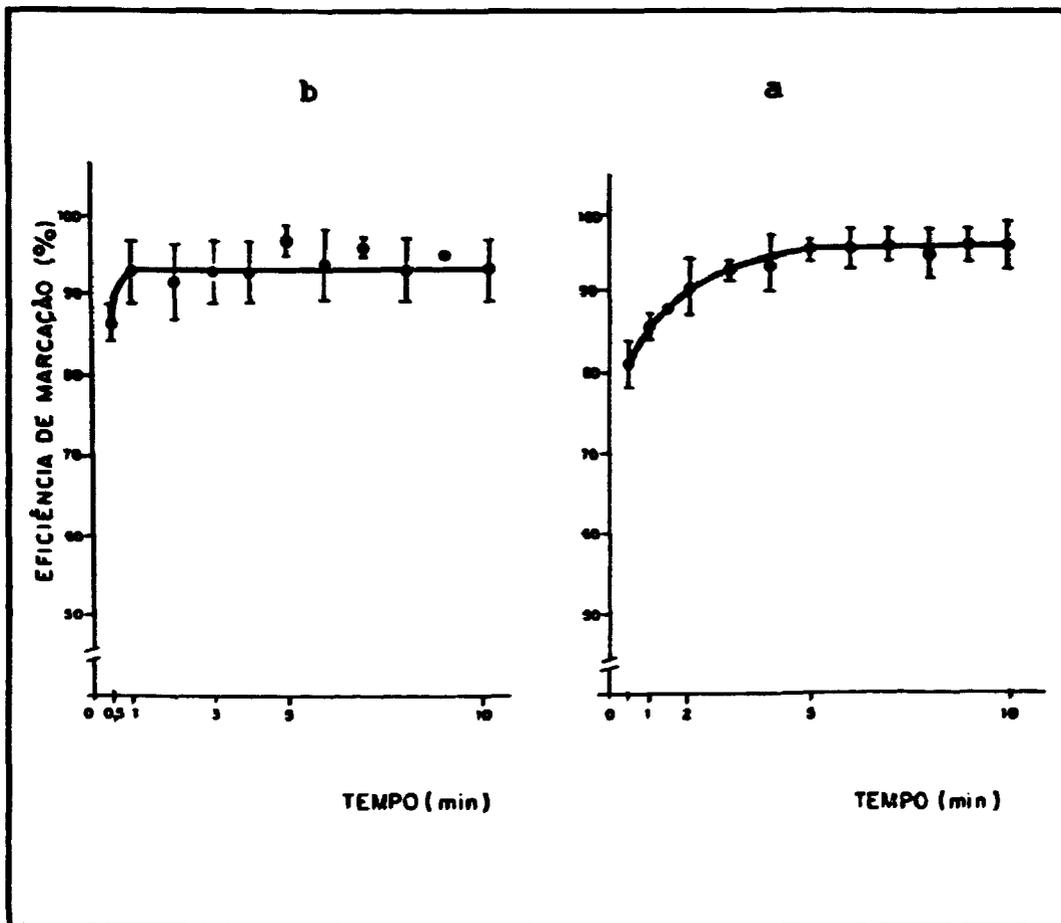


Fig. 6a - Cinética de incorporação do Tc-99m pelos eritrócitos.
 Efeito do tempo de incubação com Tc-99m.
 Condições experimentais, semelhantes às descritas no
 item 1.7.
 Após a adição do Tc-99m, amostras do sangue foram co-
 lhidas em colução de DTPA, 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (a) e em solução
 de NaCl 0,9% (b). ($\bar{X} \pm 1S$, com $n = 6$).

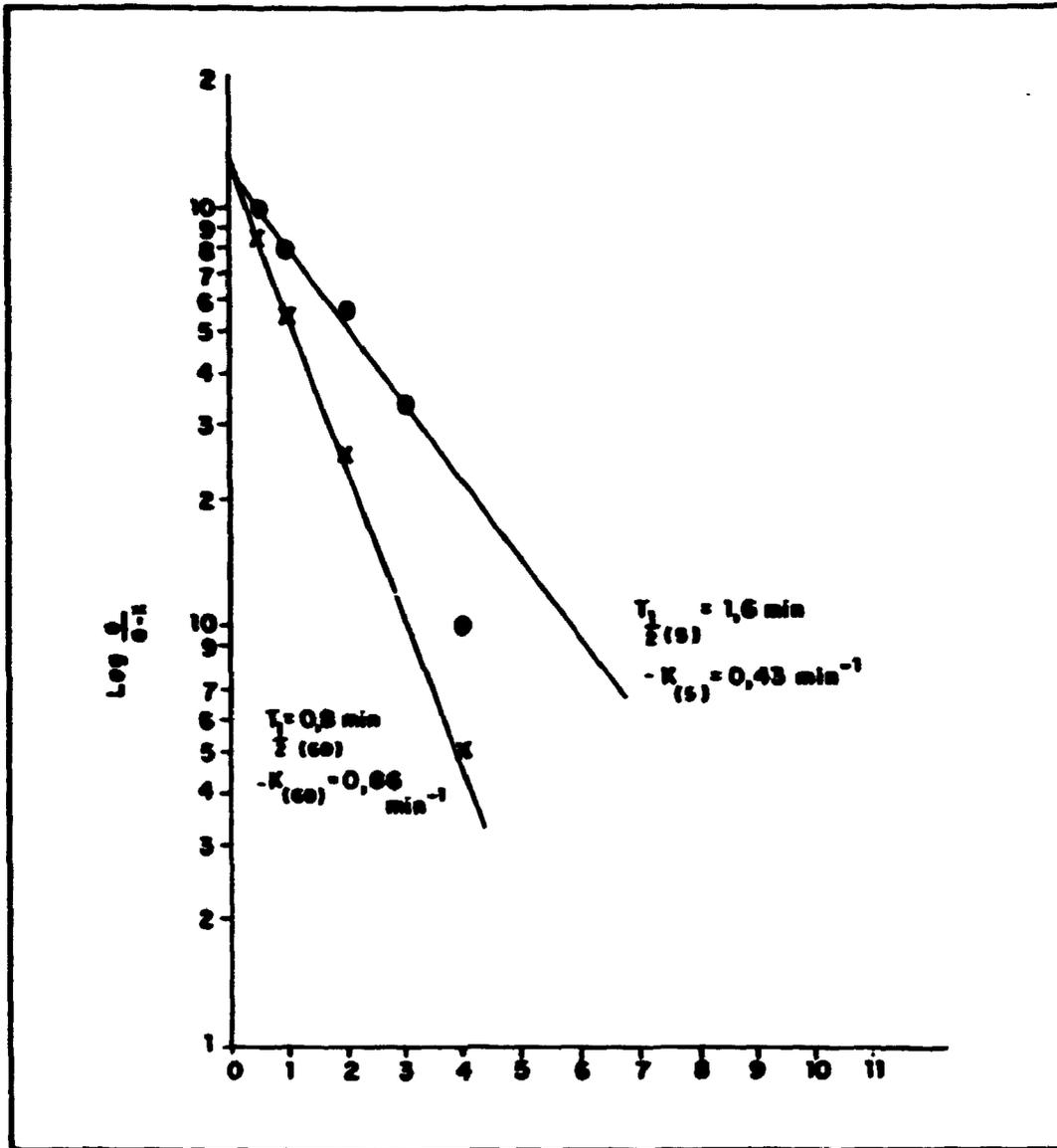


Fig. 6b - Cinética de incorporação do Tc-99m pelos eritrócitos tratados com PPI-SnCl₂ durante 5 (x) e 60 (•) min., a 37°C.

Para 5 min. de incubação, $T_{1/2} = 1,5 \text{ min.}$ e $k = 0,43 \text{ min.}^{-1}$ e $T_{1/2} = 0,8 \text{ min.}$, $k = 0,8 \text{ min.}^{-1}$ para 60 min.

Cada ponto representa a média de 3 medidas experimentais.

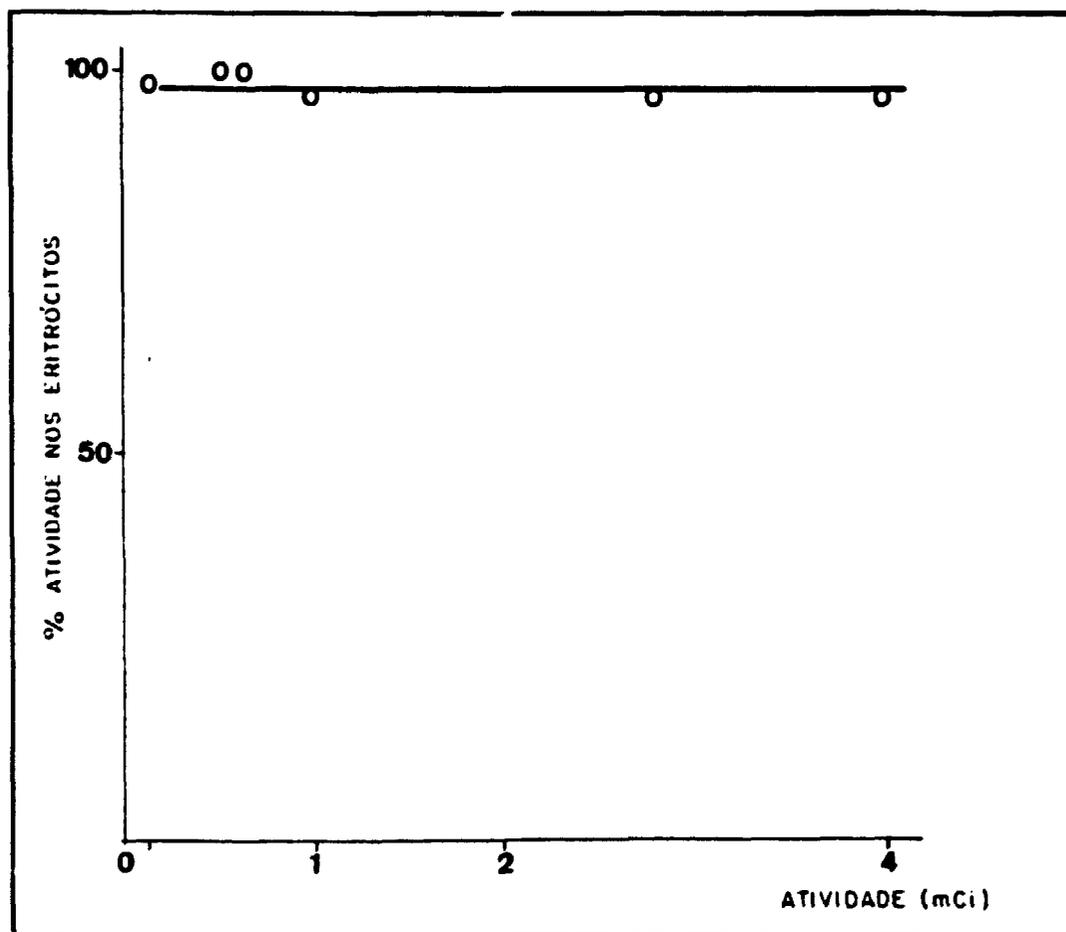


Fig. 7 - Incorporação de Tc-99m pelos eritrócitos.

Efeito da atividade de Tc-99m.

Condições experimentais descritas em 1.7.

Cada ponto representa a média de 3 medidas experimentais.

Considerando que o número de células marcadas empregadas nos vários estudos praticamente não se modifica (8, 15, 49, 63, 71, 109), a determinação da atividade de ^{99m}Tc possível de ser usada no sistema em estudo passou a ser relevante.

Para testar a influência da atividade de ^{99m}Tc sobre sua incorporação pelos eritrócitos, utilizamos ^{99m}Tc de todo o período útil do gerador. Exceto a atividade de $^{99m}\text{TcO}_4$, os demais parâmetros da reação foram mantidos constantes.

A figura 7 mostra a eficiência de marcação com diferentes atividades de $^{99m}\text{TcO}_4$. A variação da atividade de ^{99m}Tc de 0,1 a 4 mCi não provocam modificações na eficiência de marcação.

Estes resultados estão de acordo com os achados por Smith & Richards (123) e Ducassou & Arnaud (33).

2.8 - Eluição do ^{99m}Tc "in vitro":

Estudos sobre volume globular circulante, perda oculta de sangue, fração de ejeção ventricular e investigação placentária com radiofármacos, têm como premissa a ligação estável entre o radionuclídeo e o seu transportador (60, 71).

Para avaliar o grau de estabilidade "in vitro" da ligação do ^{99m}Tc aos eritrócitos, procuramos manter as células marcadas a 37°C por 24 horas consecutivas. Neste período, retiravam-se alíquotas para medidas radiométricas.

A figura 8 mostra a estabilidade da marcação no período estudado. Estes resultados estão de acordo com os achados por Ducassou & Arnaud (33).

A estabilidade da marcação por 24 horas é suficientemente longo, haja vista o tempo de realização dos estudos "in vivo" (6, 22, 45, 56, 75).

2.9 - Hematócrito:

A influência do hematócrito sobre a eficiência de marcação foi descrita por Calaham et alii (24). Estes autores relataram o aumento da eficiência de marcação dos eritrócitos com a elevação do hematócrito.

Para verificar se o mesmo ocorria no sistema "in vitro" procuramos reproduzir hematócritos crescentes a partir de plasma e hemácias do mesmo doador, lavadas por 3 vezes com solução de NaCl 0,9%.

A figura 9 mostra que, para hematócritos abaixo de 50%, a eficiência de marcação praticamente não se altera, ao contrário do que ocorre com o aumento do hematócrito acima de 50%.

Como a maior parte dos pacientes submetidos à estudo pela técnica descrita possui hematócrito abaixo de 50% (exceto os policitêmicos), admitimos que o hematócrito exercerá pouca influência no resultado final da marcação, pelo menos na maioria dos estudos.

2.10 - Concentração plasmática:

A grande parte dos estudos de marcação de eritró-

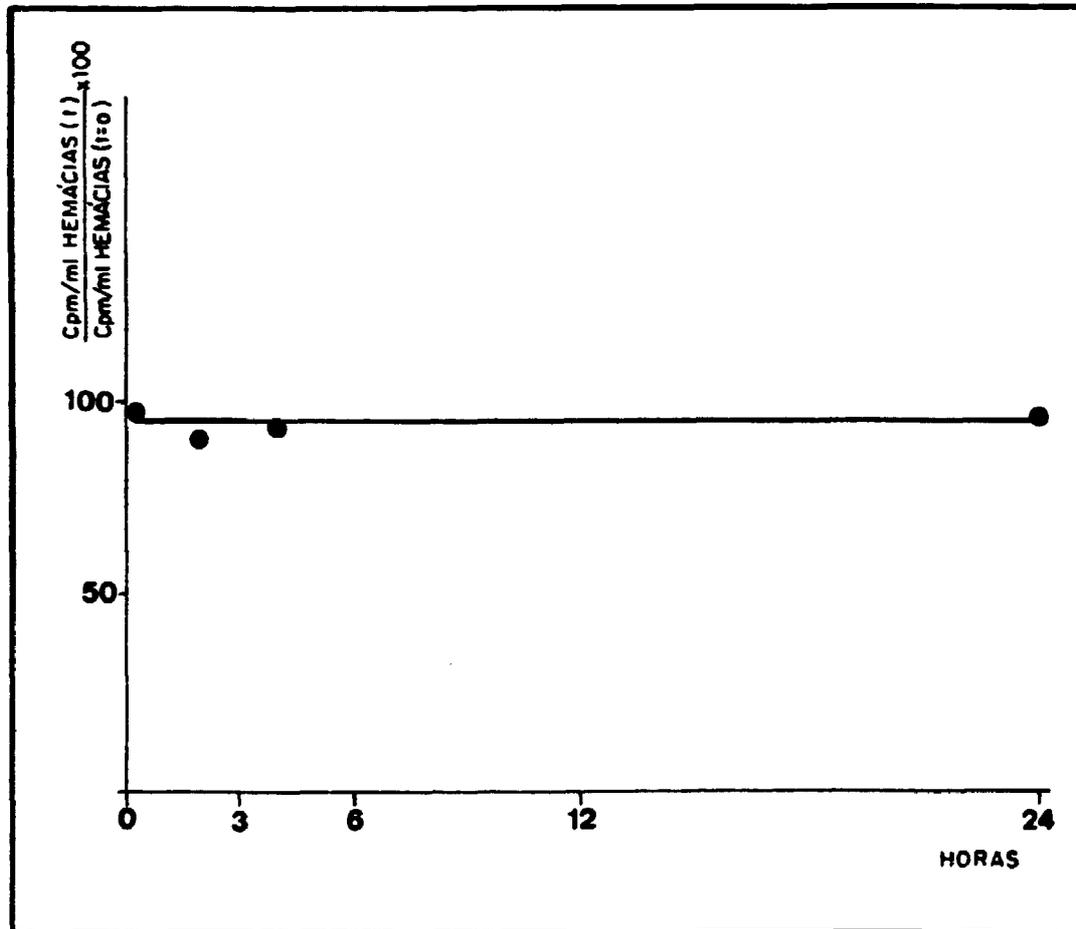


Fig. 8 - Estabilidade da marcação "in vitro".

Condições experimentais semelhantes às descritas em 1.7.

As células foram mantidas à temperatura de 37°C , pelo período de 24 horas. Cada ponto representa a média de 4 medidas experimentais.

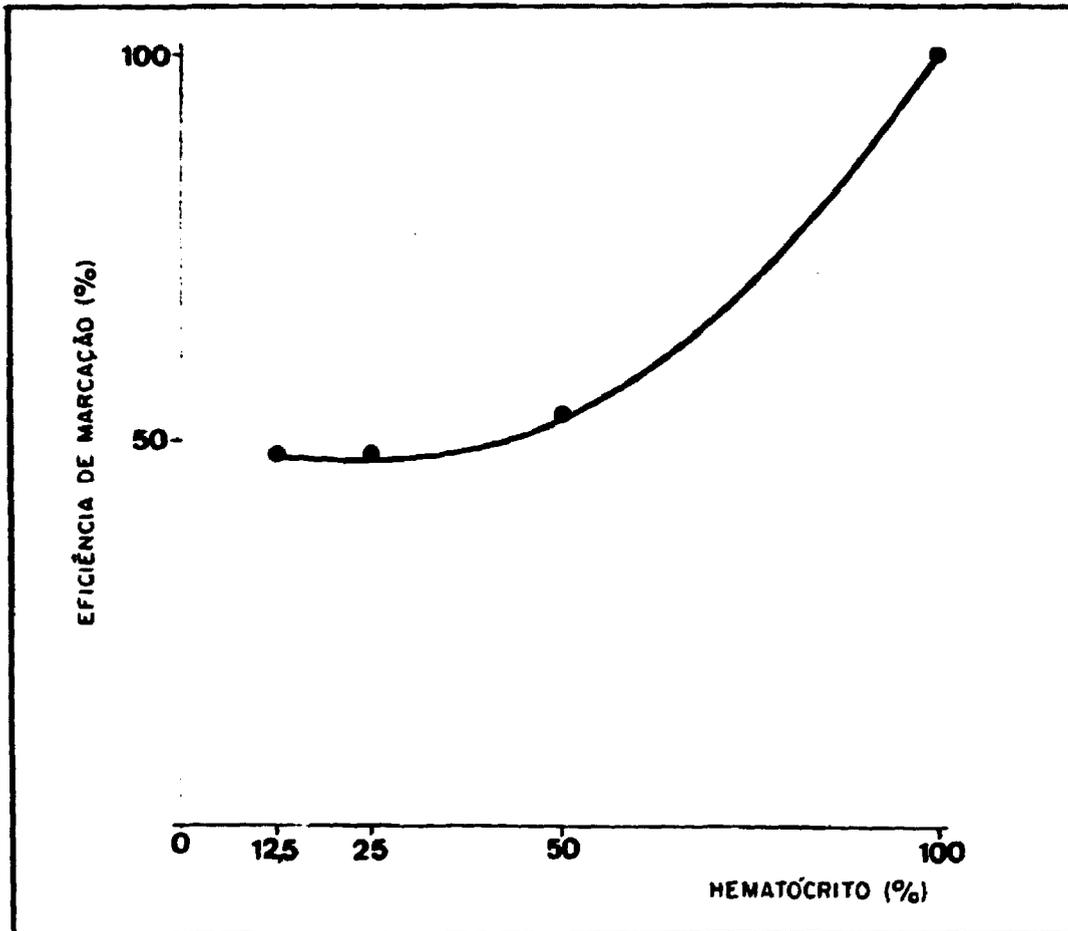


Fig. 9 - Incorporação do Tc-99m pelos eritrócitos.

Efeito do hematócrito.

Condições experimentais descritas em 1.7.

Cada ponto representa a média de 3 medidas experimentais.

citas "in vitro", utilizando células previamente tratadas com cloreto estanhoso, relata como rendimento máximo de marcação, valores entre 90 e 97% (5, 16, 11, 33, 51, 59, 71, 90, 123).

Como o hematócrito usualmente encontrado (40-45%) não parece influir de forma a explicar a dificuldade em se atingir 100% da eficiência de marcação, procuramos estudar a influência do plasma neste processo, uma vez que vários autores, para aumentar a atividade específica, procuraram lavar as hemácias depois de marcadas (71) ou diluir todo o sistema com solução isotônica (123) ou lavar as células com quelantes de íons como o EDTA, após a incubação com o Sn^{++} (7, 90).

Para isto, procuramos manter o hematócrito constante e abaixo de 50%, modificando a concentração plasmática com solução de NaCl 0,9%. A figura 10a mostra que a marcação varia inversamente à concentração plasmática, indicando que, nestas condições, a concentração do plasma exerce maior influência sobre a incorporação do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ pelos eritrócitos do que o hematócrito.

Quando a diluição do sangue é feita em solução ACD, tendo como controle o sangue diluído em solução de ... NaCl 0,9%, verifica-se que o rendimento da reação é superior em meio contendo salina, com um nível de significância de 10%, comparando os valores encontrados para diluições com 2,5 ml. (Fig. 10b).

2.11 - Fração Celular:

O tecnécio- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ao ser incorporado pelos eritrócitos se liga predominantemente à molécula de hemoglobina, na

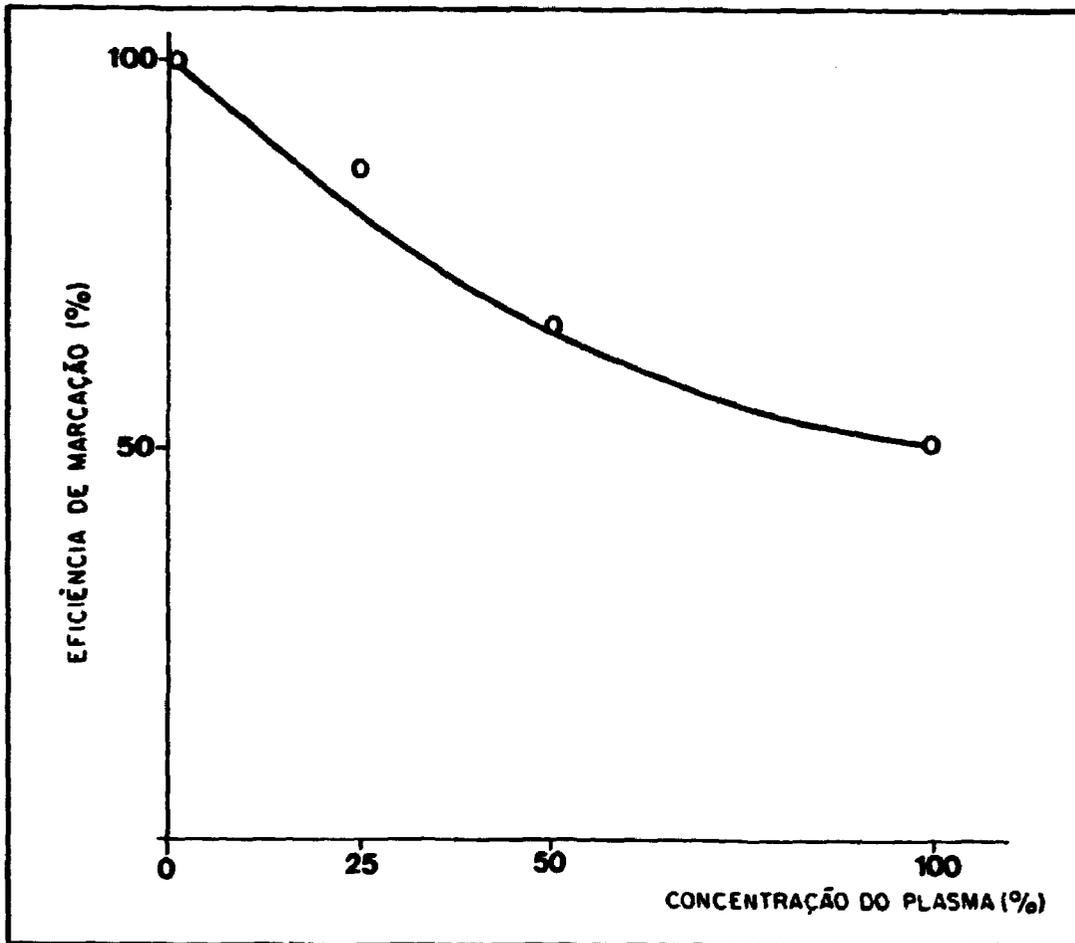


Fig. 10a - Incorporação do Tc-99m pelos eritrócitos.

Efeito da concentração plasmática.

Condições experimentais semelhantes às descritas em 1.7.

Cada ponto representa a média de 3 medidas experimentais.

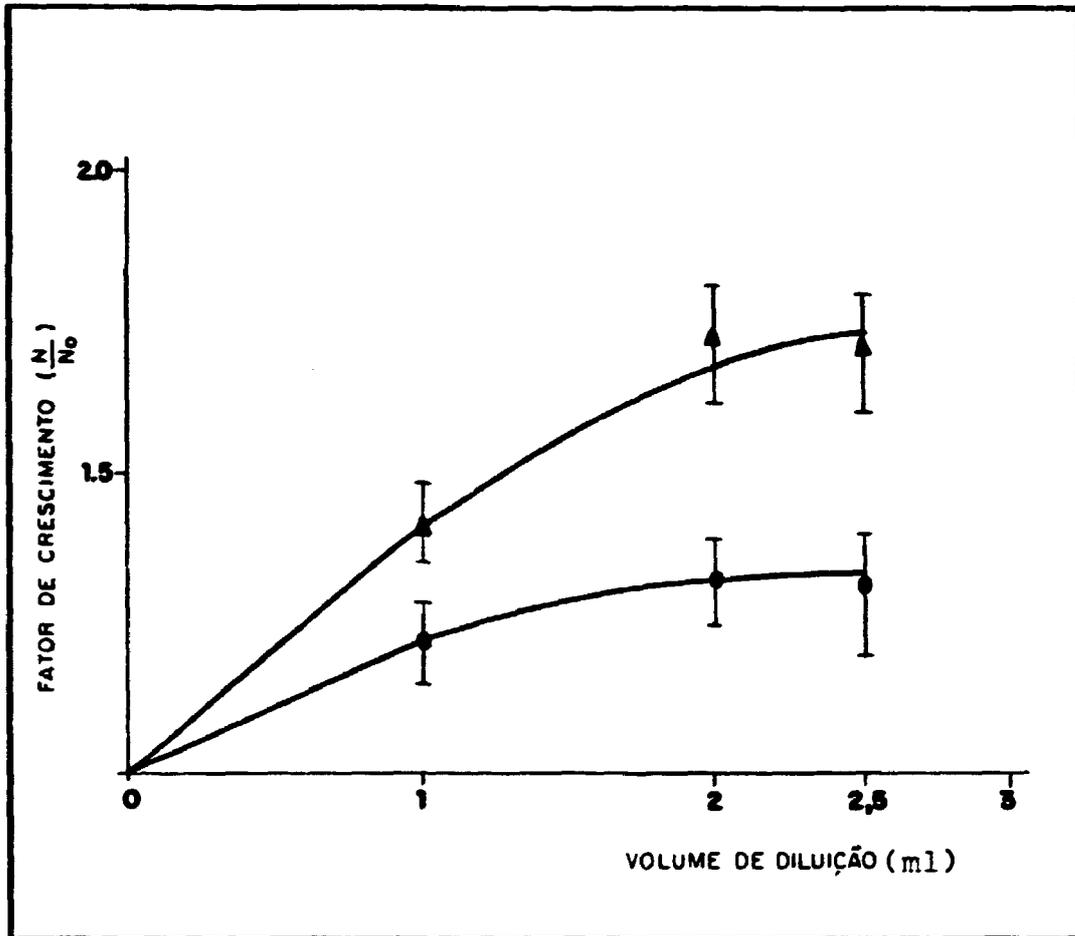


Fig. 10b - Incorporação do Tc-99m pelos eritrócitos.

Efeito da diluição do sangue com solução ACD (●) e com solução de NaCl 0,9% (▲). ($\bar{X} \pm 1S$, com $n = 4$).

Condições experimentais descritas em 1.7.

razão de 28:1 nas cadeias β : α .

Na figura 11a está representada a distribuição do ^{99m}Tc presente no material submetido a eletroforese em acetato de celulose.

O retardo na migração de parte do material aplicado à fita e a possível dissociação de pequena fração do ^{99m}Tc durante a corrida eletroforética, podem ser os responsáveis pela presença de ^{99m}Tc fora da banda de hemoglobina A.

Na tabela 2 estão os resultados da marcação de células íntegras, fração hemolisada, fração filtrada e hemoglobina padrão.

A figura 11b mostra a distribuição relativa do ^{99m}Tc em eritrócitos marcados conforme técnica aqui descrita.

O predomínio da atividade ligada à hemoglobina está de acordo com os resultados encontrados por Dewanjee et alii e Rehane et alii (31,110).

2.12 - Fração Plasmática:

2.12.1 - Díálise:

O Tecnécio- 99m sob a forma de Pertecnetato de Sódio ou ligado a pequenas moléculas, difunde-se facilmente através de membranas dialisadoras (2, 129), tendendo à condição de equilíbrio entre o compartimento interno e externo. Mantendo-se a concentração externa inferior à interna, a radioatividade

TABELA 2 MARCAÇÃO DE ERITRÓCITOS, FRAÇÃO HEMOLISADA, FILTRADA E HEMOGLOBINA PADRÃO.

	SANGUE TOTAL	FRAÇÃO HEMOLISADA	FRAÇÃO FILTRADA	HEMOGLOBINA PADRÃO (4,8g/100ml) (COM Sn ⁺⁺)(SEM Sn ⁺⁺)	
FRAÇÃO Ac SOLÚVEL (Cpm / ml)		32 600	41 800	47 200	88 500
FRAÇÃO Ac INSOLÚVEL (Cpm / ml)		92 400	88 000	51 900	7 800
EFICIÊNCIA DE MARCAÇÃO	92%	74%	68%	52%	8%

CADA VALOR REPRESENTA
A MÉDIA DE 2 EXPERIÊNCIAS

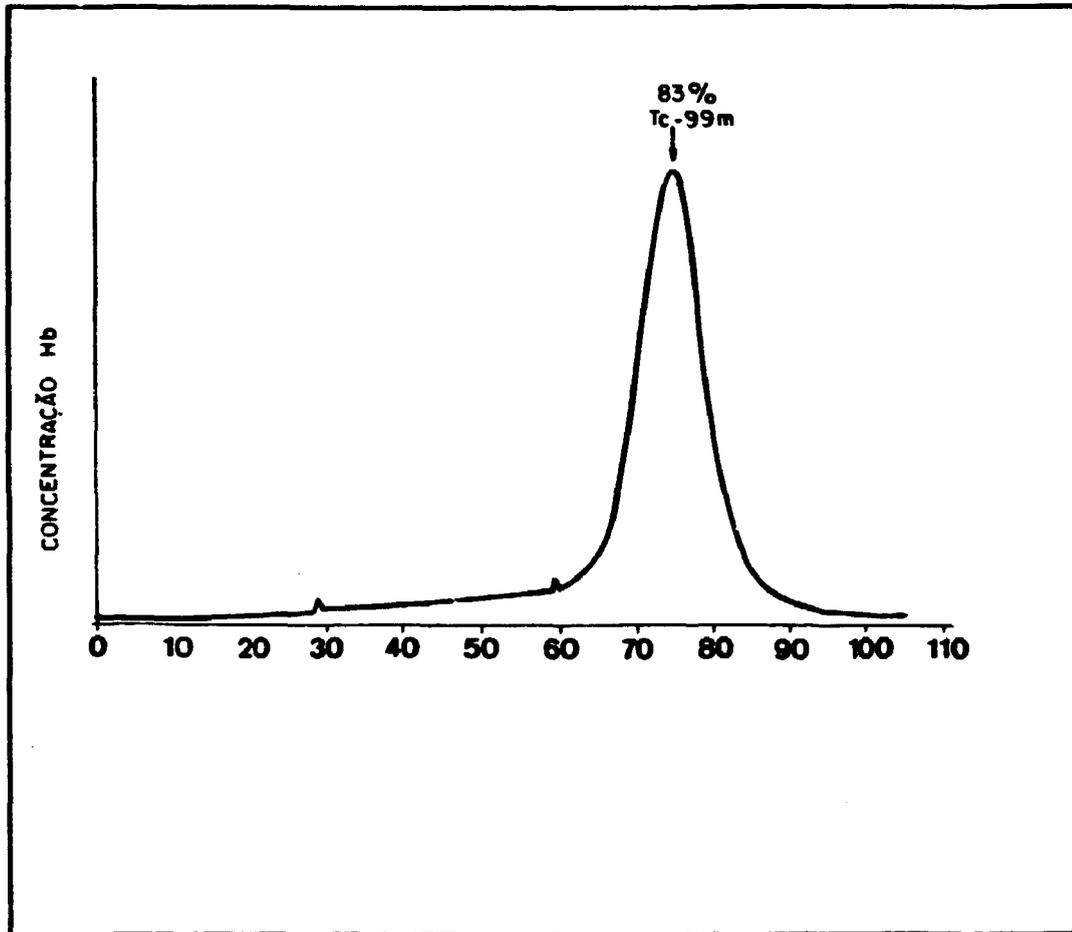


Fig. 11a - Eletroforese em acetato de celulose, da hemoglobina dos eritrócitos tratados com PPi-SnCl_2 e marcadas com Tc-99m.

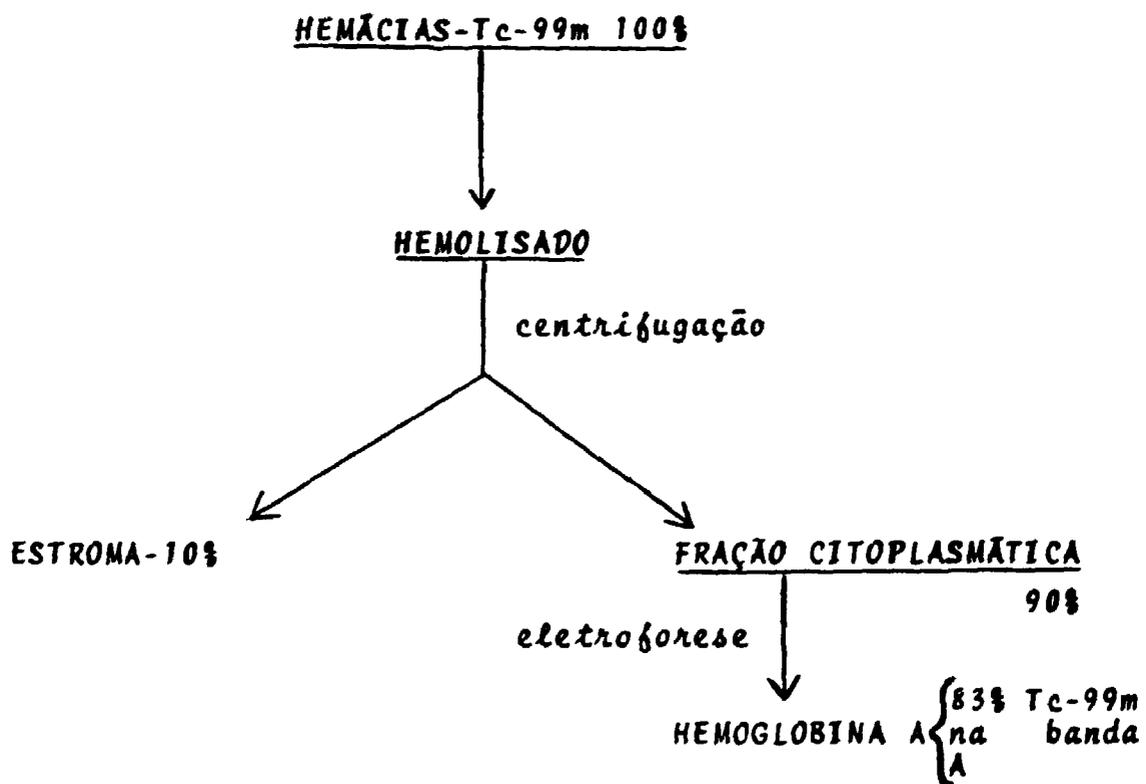


Fig. 11b - Distribuição relativa do Tc-99m nos eritrócitos tratados com PPI-SnCl₂ (6,8 µg/ml).

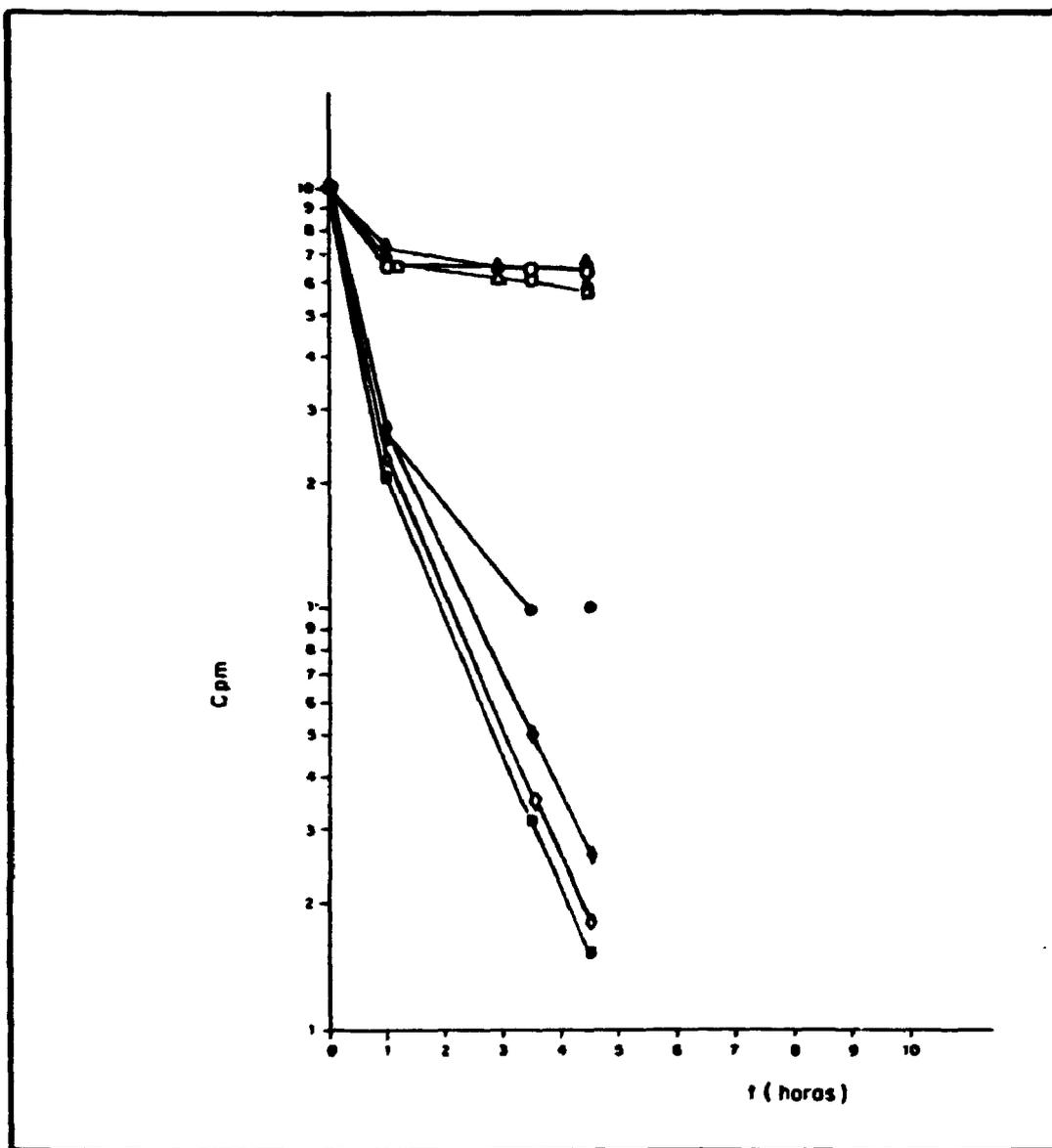


Fig. 12 - Diálise da fração plasmática.

Sangue tratado com PPI-SnCl₂, nas concentrações de (µg/ml):

680 (o); 34 (□); 6,8 (●); 0,68 (◆); 0,068 (◇);

Na Cl 0,9% (■).

SnCl₂ - Solução recém-preparada (µg/ml): 340 (▲);

34 (△).

do conteúdo de diálise diminui continuamente.

A capacidade de difusão do ^{99m}Tc , presente no meio interno, através da membrana de diálise, pode ser vista pela inclinação das curvas. Ela varia inversamente ao grau de ligação e com o tamanho da molécula \pm que se encontra ligado o Tc-^{99m} .

A baixa capacidade de difusão do Tc-^{99m} observado com concentração de PPI-SnCl_2 acima de $6,8 \mu\text{g/ml}$, indica a marcação relativamente estável, de moléculas presentes no plasma, não difusíveis pela membrana utilizada.

As curvas de diálise do material tratado com SnCl_2 exibem o mesmo comportamento, demonstrando que o papel do pirofosfato é praticamente irrelevante neste processo.

2.12.2 - Cromatografia:

O pertecretato e outras formas livres do tecnécio migram juntamente com o solvente acetona ($R_f = 1$), enquanto os complexos ^{99m}Tc -Pirofosfato, ^{99m}Tc -Albumina e outros permanecem na origem da aplicação ($R_f = 0$) (85).

A figura 13 mostra que praticamente 100% do ^{99m}Tc encontra-se no ponto de aplicação ($R_f=0$) quando se usa PPI-SnCl_2 nas concentrações de 34, 68 e $680 \mu\text{g/ml}$. Enquanto que, com concentrações inferiores a $6,8 \mu\text{g/ml}$ ocorre o oposto, com quase a totalidade do ^{99m}Tc migrando com o solvente ($R_f=1$).

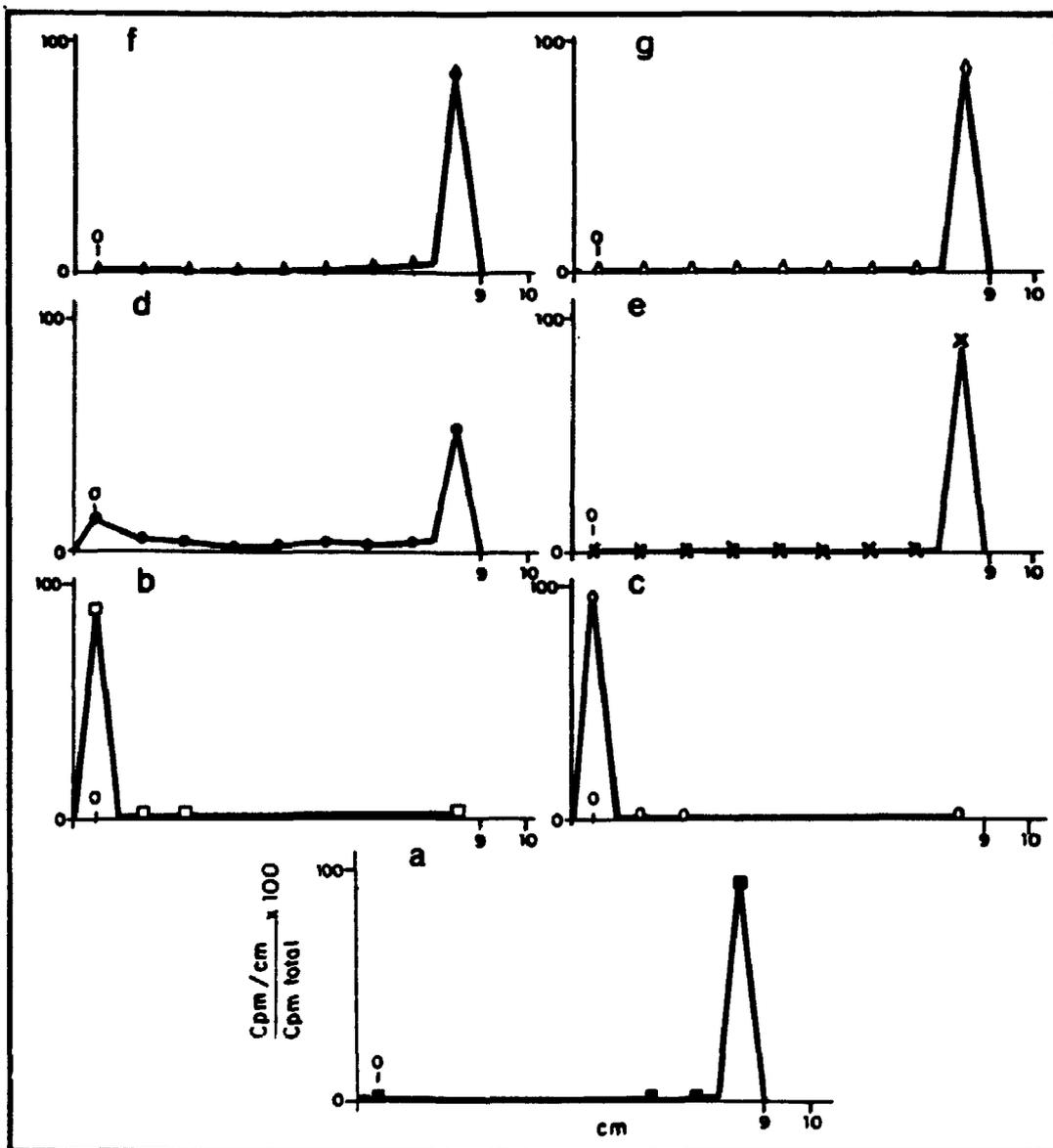


Fig. 13 - Cromatografia da fração plasmática em papel Wathman nº 1.

Sangue tratado com PPI-SnCl₂, nas concentrações de (µg/ml): 680 (b); 68 (c); 6,8 (d); 0,68 (e); 0,068 (f); solução de NaCl 0,9% (g). Cromatografia do ^{99m}TcO₄⁻ (a).

Estes resultados vêm corroborar os achados de diálise, indicando que, concentrações superiores a 6,8 µg/ml determinam a marcação dos componentes plasmáticos em quantidade significativamente maior do que o encontrado com concentrações abaixo de... 6,8 µg/ml de cloreto estanhoso.

2.12.3 - Precipitação com Ácido Tricloro Acético
(TCA, 10% a frio)

O tratamento de soluções proteicas com de terminados ácidos (Exemplo: Tricloro Acético e ... Túngstico) leva à formação de sais proteicos insolúveis com as formas catiônicas das moléculas proteicas (64).

Proteínas desnaturadas por este processo se precipitam produzindo duas frações distintas, a ácido-solúvel (FAS) e a fração ácido-insolúvel (FAI). A tabela 3 mostra a distribuição do 99m-Tc presente na FAS e FAI de plasma tratado com TCA-10%, a frio.

A concentração de 99m-Tc na FAI aumenta com a concentração de PPI-SnCl₂, indicando que o 99m-Tc encontra-se ligado a moléculas proteicas, diretamente ou por intermédio de moléculas menores, como o pirofosfato (129). Em qualquer uma destas formas, ele estaria impedido de penetrar na célula.

2.13 - Anticoagulantes:

As drogas anticoagulantes empregadas na obtenção de

**TABELA 3 PERCENTAGEM DA ATIVIDADE PLASMÁTICA
PRESENTE NAS FRAÇÕES Ác. SOLÚVEL E
INSOLÚVEL.**

	CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g}/\text{ml}$) DE CLORETO ESTANHOSO USADO					
	0,068	0,68	6,8	68	680	0
	%					
FRAÇÃO ÁCIDO SOLÚVEL	78,2	78,2	78,2	21,4	27,2	79,6
FRAÇÃO ÁCIDO INSOLÚVEL	21,8	21,8	21,8	78,6	72,8	20,4

* PRECIPITAÇÃO COM TCA 10% A FRIO.

amostras de sangue podem ser divididas em dois grupos, com forme o mecanismo de ação: os quelantes de cálcio iônico, que impedem a coagulação por depleção deste íon no plasma, e a heparina, que age na via extrínseca da coagulação. Esta, impede a coagulação por evitar a formação de trombo-plastina (142).

A marcação de eritrócitos com ^{99m}Tc tem sido feita com o emprego de diferentes anticoagulantes (28, 65, 71, 123).

Vyth e Cols (134) obtiveram resultados semelhantes trabalhando com ACD, heparina sódica 95% e heparina sob a forma de sal de lítio.

Para esta parte do trabalho usamos os seguintes anticoagulantes: Citrato de sódio, Oxalato de potássio, EDTA sódico e heparina sódica.

A figura 14 mostra os resultados obtidos com as drogas mencionadas, em diversas concentrações.

Os anticoagulantes nas concentrações testadas não modificam o rendimento da reação de marcação, exceto o EDTA sódico. Na presença desta substância a eficiência de marcação aumenta com a concentração: de início rapidamente, para a seguir, crescer lentamente a partir de 35 $\mu\text{g/ml}$ até a concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$ (concentração máxima testada). A máxima eficiência observada com esta droga foi de 72%, enquanto que, com as demais substâncias, a eficiência de marcação foi praticamente constante, acima de 95%.

Na tabela 4 encontram-se os resultados da marcação de eritrócitos com Cromo-51, sob a forma de $^{51}\text{Cr O}_2 \text{Na}_2$ e

**TABELA 4 MARCAÇÃO DE ERITRÓCITOS COM ^{99m}Tc e ^{51}Cr
NA PRESENÇA DE ACD, OXALATO E EDTA.**

	EFICIÊNCIA DE MARCAÇÃO (%)	
	$^{99m}\text{Tc O}_4^-$	$^{51}\text{Cr O}_4^-$
ACD (25 %)*	96 (95) †	99 (99) †
OXALATO (2,2 mg/ml)	94 (93)	70 (70)
EDTA (2,4 mg/ml)	39,5 (37)	95 (92)

* CONCENTRAÇÃO NO SANGUE

† MARCAÇÃO APÓS 1ª LAVAGEM COM SALINA.

$^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$, e a atividade remanescente após a 1ª lavagem das células com salina fisiológica. Utilizando-se ACD, a marcação é igualmente eficiente com ambos os radionuclídeos. Na presença de Oxalato, entretanto, a incorporação do ^{99m}Tc é superior à do ^{51}Cr Cromo. O oposto ocorre com o EDTA.

Depois de uma lavagem com solução de NaCl 0,9%, a atividade presente nas células praticamente não se modifica, mostrando que, apesar de baixa, a marcação com EDTA é razoavelmente estável.

2.14 - Vida útil do PPI-SnCl₂:

A instabilidade do íon estanhoso em presença de oxigênio é um dos fatores limitantes ao uso deste agente redutor, quando as soluções não são liofilizadas (41).

Para testar a estabilidade do PPI-SnCl₂ após sua diluição, procuramos manter alíquotas de 2 ml em frascos a vácuo, à temperatura de 15°C negativos, durante o período de uso.

A tabela 5 mostra a eficiência de marcação obtida com amostras de PPI-SnCl₂ mantidas nas condições descritas, durante 22 dias.

A estabilidade do PPI-SnCl₂ nas condições estudadas, permite o seu uso por período relativamente longo.

2.15 - Concentração de Ca⁺⁺:

Apesar de baixa (16 µmoles/litros de células), a concentração de Ca⁺⁺ eritrocitário é um dos fatores mais rele-

**TABELA 5 VIDA ÚTIL DO CLORETO ESTANHOSO
(PPI-SnCl₂) 6,8 µg/ml* EM SOLUÇÃO DE
NaCl 0,9%, MANTIDO A TEMPERATURA
DE 15° C NEGATIVOS.**

DIAS APÓS A DILUIÇÃO	EFICIÊNCIA DE MARCAÇÃO (%)
0	95,0
2	91,0
7	95,5
17	97,0
22	93,0

* ALÍQUOTAS DE 2 ml MANTIDAS EM FRASCOS A VÁCUO.

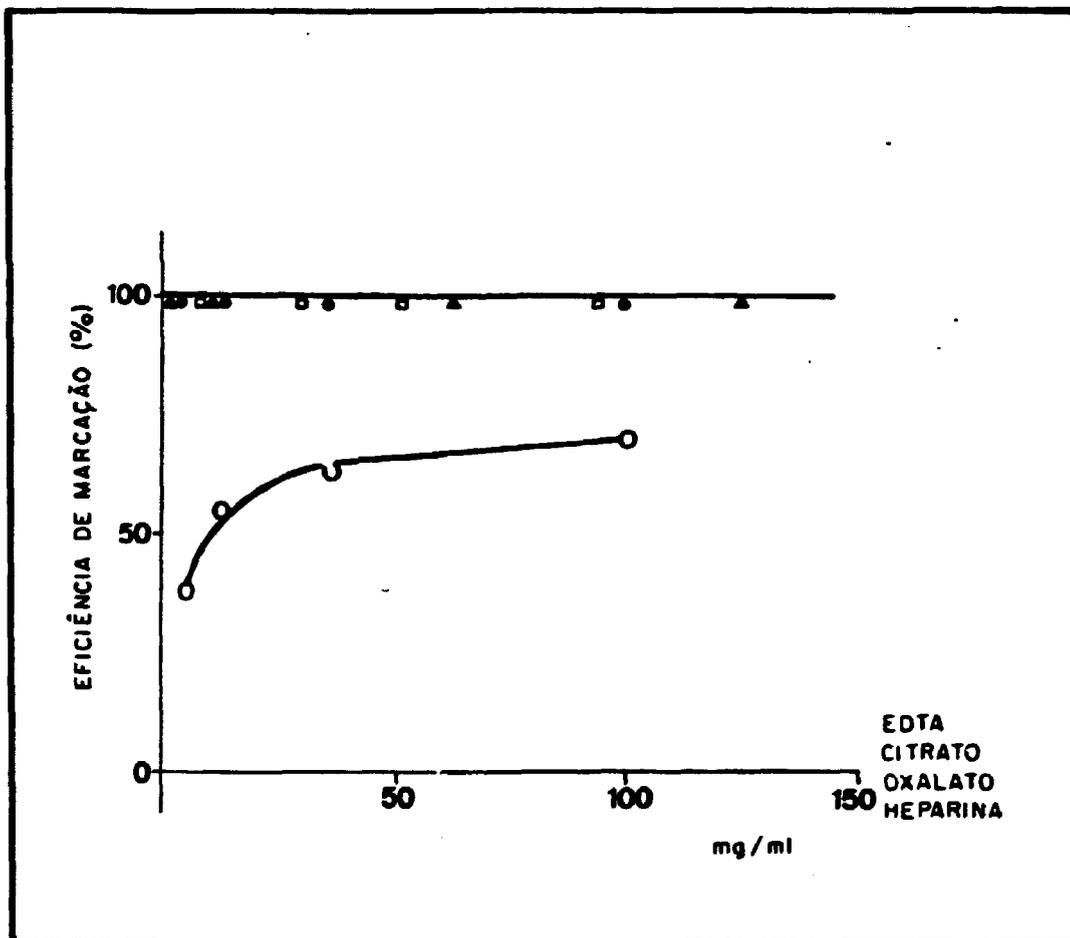


Fig. 14 - Incorporação do Tc-99m pelos eritrócitos.

Efeito do anticoagulante usado, e suas concentrações.

Condições experimentais descritas em 1.7.

Citrato (□); Oxalato (●); Heparina (▲) e EDTA (o).

vantes na determinação da forma das hemácias normais em re
pouso, além de imprescindível a determinadas funções celu-
lares, como a atividade ATPase de membrana das mesmas (92).

Além disso, a observação de que eritrócitos de fal
cêmicos (hemoglobina SS), os quais apresentam elevada con
centração de cálcio, incorporam ^{99m}Tc com menos eficiên-
cia do que os normais (111), levaram-nos a testar a influ
ência da concentração deste íon sobre a eficiência de mar
cação de hemácias normais. Para isto, procuramos incubar ce
lulas de doadores sãos, colhidas em ACD (proporção 4:1), com
concentrações crescentes (0, 10, 30, 80, 200 mg/ml), de
 CaCl_2 , no meio de reação. Após 10 minutos, o processo de
marcação era iniciado conforme técnica descrita no item...
1.7.

Os resultados obtidos são apresentados na tabela 6.

A eficiência de marcação não se modifica com a con
centração de cálcio e além disso, acima de 200 $\mu\text{g/ml}$, ob-
serva-se o surgimento de hemólise, demonstrada pela colora
ção de plasma.

**TABELA 6 EFICIÊNCIA DE MARCAÇÃO DE ERITRÓCITOS,
INCUBADOS COM CONCENTRAÇÃO CRESCENTE
DE CLORETO DE CÁLCIO. †**

CONCENTRAÇÃO DE CaCl_2 (mg/ml)	EFICIÊNCIA DE MARCAÇÃO (%)
0	98
3	97
10	97
30	98
70	60*

* PRESENÇA DE HEMÓLISE

† O CÁLCIO ENDÓGENO FOI CONSIDERADO ZERO.

3 - DISCUSSÃO

3.1 - Concentração de cloreto estanhoso:

O uso de cloreto estanhoso em altas concentrações no processo de marcação dos eritrócitos, modifica sua bio distribuição (4, 38, 94), possivelmente por provocar modificações estruturais celulares.

Como é visto na figura 1, as concentrações PPI-SnCl₂ de 3,4 a 6,8 µg/ml, produzem máxima eficiência de marcação. Observadas ao microscópio óptico, as preparações de células marcadas, nestas condições, não exibiam modificações estruturais apreciáveis indicando que, em tais concentrações, a distribuição fisiológica destas células não deve ser alterada.

A eficiência de marcação decresce com concentrações superiores a 6,8 µg/ml e inferiores a 3,4 µg/ml de PPI-SnCl₂.

A concentração de íon estanhoso (Sn⁺⁺), requerida para máxima eficiência de incorporação do Tc-99m pelos eritrócitos, foi determinada por Billingham et alii (16), Smith e Richards (123), Ducassou & Arnaud (33), Bardy et alii (11) e Jones & Mollison (71), os quais encontraram resultados bastante variados.

A explicação para tal fato parece ter sido o uso de diferentes anticoagulantes pelos diversos autores (71).

Nas condições experimentais deste estudo, a concentração ótima de Sn⁺⁺ (0,7 - 1,4 µg/ml sangue) encontra-se

um pouco acima dos resultados obtidos por Smith e Richards (0,5 - 1,0 $\mu\text{g/ml}$ sangue) (123). Uma possível explicação para o ocorrido pode ser dada pela concentração real de Sn^{++} na solução de PPI-SnCl_2 . Sendo ela inferior à calculada... (16, 123), seus valores podem ser incluídos dentro dos limites encontrados por aqueles autores. Outra hipótese, seria o uso de ACD no sistema. Com este anticoagulante, a concentração ótima de Sn^{++} é superior à usada com heparina (71).

Felo fato de as concentrações de PPI-SnCl_2 , de 3,4 - 6,5 $\mu\text{g/ml}$ terem produzido de forma constante máxima eficiência de marcação, com o uso de ACD, acreditamos que ambos os fatores devam ter concorrido para os resultados encontrados.

Em altas concentrações de PPI-SnCl_2 , parte do ... Tc-99m encontra-se ligado a componentes plasmáticos (16, 37, 38, 123, 124).

A limitada capacidade dos eritrócitos em captar o Sn^{++} , leva ao acúmulo deste no meio extracelular, o qual, reduzindo o Tc-99m , diminui a eficiência de marcação, uma vez que o tecnécio reduzido parece não transpor a membrana celular eritrocitária.

Em baixas concentrações, o cloreto estanhoso parece insuficiente no processo de redução do Tc-99m adicionado ao meio de reação, permitindo que parte deste fique livre, possivelmente sob a forma de pertecnetato (3, 16).

3.2 - Lavagem das células:

Os estudos "in vivo" empregando células marcadas com

radionuclídeos emissores de radiação γ e X (7, 33, 40, 60) , baseiam-se na estabilidade da ligação entre estes e as células.

Após várias lavagens com solução de NaCl 0,9%, as células marcadas com ^{99m}Tc , na presença de PPI-SnCl_2 (... 6,8 $\mu\text{g/ml}$, não apresentaram modificação do seu nível de radioatividade celular. Ao contrário, com as demais concentrações de PPI-SnCl_2 testadas, a atividade de Tc-^{99m} nas células diminuiu, de forma exponencial, com o número de lavagens.

Uma explicação para este fato é que o uso de concentrações elevadas de PPI-SnCl_2 (34 e 680 $\mu\text{g/ml}$) possa ter levado o ^{99m}Tc a se ligar ao próprio pirofosfato, já que a concentração deste variou nas mesmas proporções que o cloreto estanhoso.

A outra hipótese é que, devido à alta concentração plasmática de proteínas (da ordem de 10^4 vezes superior à do pirofosfato), a competição estabelecida pelo ^{99m}Tc extracelular é extremamente desigual e, possivelmente, a quase totalidade deste se ligue às moléculas proteicas (7,16, 90, 123).

Nas concentrações de cloreto estanhoso muito inferiores a 6,8 $\mu\text{g/ml}$, a oferta de Sn^{++} às células parece ser insuficiente para o rendimento máximo da reação de marcação, permitindo que o ^{99m}Tc , não reduzido no meio intracelular, deixe a célula à medida que o gradiente de concentração favoreça sua saída (11, 22, 114).

3.3 - Tempo de incubação com PPI-SnCl₂:

A capacidade de captação do estanho (Sn⁺⁺) pelos eritrócitos, apesar de limitada, como foi mostrado na figura 1 (11, 123), poderia, ainda assim, ocorrer de forma instantânea. Como mostra a figura 3, porém, tal processo ocorre conforme uma reação de 1.ª ordem, com uma constante de reação, k₁, igual a 0,03 min⁻¹ até o 60^o minuto de reação.

O ^{99m}TcO₄ parece penetrar nas células em função do seu gradiente de concentração (22, 36, 60), visto que na ausência do cloreto estanhoso a atividade celular permanece em torno de 50%, diminuindo progressivamente com o número de lavagens das células, como mostra a figura 2.

Admitindo que a quantidade de Tc-99m incorporada pelos eritrócitos tratados com SnCl₂ seja diretamente dependente da concentração celular de Sn⁺⁺ (11, 123) é possível que os dados da figura 3 possam ser interpretados como representativos da função de captação do Sn⁺⁺ pelas hemácias.

A escolha do tempo de 60 minutos para incubação das células, nas demais experiências, se devem à inexistência de diferença estatística ($\alpha = 0,05$), entre os resultados obtidos nos tempos de 60, 90 e 120 minutos.

3.4 - Temperatura de incubação:

A figura 4 mostra que a eficiência de marcação aumenta com a temperatura de incubação, em proporção direta até o limite de 37°C. A eficiência máxima foi alcançada em torno de 49°C, mas em nossas experiências, padronizamos a de

37°C para a marcação porque, em temperaturas mais altas, houve alterações estruturais das células, com aparecimento de hemólise a partir de 55°C.

Com o Tc-99m parece penetrar livremente nas hemácias, o efeito do aumento da temperatura poderia refletir o aumento da permeabilidade da membrana celular ao Sn^{++} .

Outra hipótese para explicar estes resultados seria o efeito da temperatura sobre a hemoglobina, ou outro componente celular necessário à incorporação do Tc-99m às hemácias, ou sobre ambos, modificando seus estados funcionais.

Hughes-Jones (66) mostrou que o aumento da temperatura de incubação das hemácias reduz a sua sobrevivência.

Wagner et alii (136) demonstraram que eritrócitos incubados em alta temperatura (50°C por 60 minutos) apresentam queda dos níveis da glicose-6-fosfato desidrogenase.

Riordan et alii relataram que modificações estruturais da molécula de hemoglobina leva à redução na sua capacidade de incorporar o tecnécio (111).

As modificações estruturais celulares observadas com o aumento da temperatura de incubação estão de acordo com os resultados encontrados por outros autores (47, 70, 73, 135).

Kimber e Lander (73) demonstraram que a incubação dos eritrócitos a 50°C por 10 minutos provoca alterações celulares tais que, além da transformação desta em esferócitos, ocorre o aumento da sua resistência osmótica. Contudo, períodos de incubação mais longos levaram à redução da mesma, com aparecimento de fragmentos celulares, além dos

esferócitos.

3.5 - Volume de reação:

Como mostra a tabela 4, a eficiência de marcação aumentou com o volume de reação, atingindo 95% quando foram usados 3 ml de sangue para 1 ml da solução de PPI-SnCl₂ (3,4 µg/ml).

A quantidade de Sn⁺⁺ por ml de hemácias é fator determinante da eficiência de marcação (71, 123).

A variação de volume empregado pelos diversos autores (7, 33, 51, 71, 94, 123) parece ser devida ao uso de diferentes compostos e diferentes concentrações do Sn⁺⁺.

A escolha da quantidade de 3 ml de sangue recaiu sobre a necessidade de se usar pequenos volumes de preparações marcadas com Tc-88, para os estudos em pediatria e para os estudos dinâmicos, onde a injeção rápida dos radiofármacos é imperiosa para a obtenção de imagens seqüenciadas (8, 30, 43, 78, 80).

3.6 - Cinética de incorporação do Tc-99m:

De acordo com os resultados apresentados na figura 6, pode-se concluir que, após o tratamento dos eritrócitos com concentração adequada de PPI-SnCl₂, a incorporação do ... Tc-99m, por estas células ocorre quase instantaneamente. Os resultados de incubação das amostras de sangue com DTPA mostraram que dentro de 0,5 minutos o sistema foi capaz de incorporar 81% do Tc-99m disponível. Estes resultados, apesar

de na fase inicial da curva serem superiores aos apresentados por Callahan et alii (23), não diferem em comportamento ao longo da experiência.

Como mostra a figura 7, a cinética de incorporação do Tc-99m pelos eritrócitos, tratados com PPI-SnCl₂, traduz uma reação de primeira ordem até o tempo de 4 minutos. A constante de reação é duplicada entre 5 e 60 minutos de incubação. Tal fato pode se dever ao aumento da concentração deste último nas células durante este período, ou representar a ativação de um sistema celular responsável pela incorporação do Tc-99m.

3.7 - Atividade de Tc-99m:

A atividade de Tc-99m usada não modificou a eficiência de marcação, independentemente do período de utilização dos geradores ou do volume de eluato que originou as amostras de Tc-99m para marcação das hemácias.

Tc-99m proveniente de geradores (Techni-Kow e Ipentec) produzidos por dois fabricantes diferentes, levou a resultados semelhantes.

3.8 - Eluição "in vitro"

A figura 9 mostra que a estabilidade da marcação foi máxima no período de 24 horas de incubação a 37°C.

A manutenção do grau de marcação é uma das condições necessárias para o emprego destas preparações "in vivo", tais como placentografia (60, 120) e determinação do volume glo

bular circulante (37, 44, 75).

Ducassou e Arnaud (33) demonstraram que a eluição "in vitro" do Tc-99m ligado aos eritrócitos é de 1,5% nas 3 horas iniciais após a marcação, e que, dentro dos primeiros 20 minutos depois da administração venosa das células marcadas, o volume de distribuição do 99m-Tc-Eritrócitos permaneceu constante, comparável às medidas feitas com hemácias marcadas com Cr-51.

Jones e Mollison (71) verificaram forte correlação ($r = 0,96$) entre os valores da volemia globular, determinados com eritrócitos marcados com Tc-99m e Cr-51.

Apesar do uso de nossas preparações para o estudo de estruturas vasculares em dois pacientes, com resultados satisfatórios, investigação mais extensa está sendo realizada no sentido de determinar os parâmetros de estabilidade da marcação "in vivo".

3.9 - Hematócrito:

A figura 10 mostra que a eficiência de marcação sofreu grandes variações apenas quando o hematócrito se tornou superior a 50%.

Estes resultados parecem indicar que o número de células ou a concentração de hemoglobina, para os hematócritos testados, achava-se em quantidade excedente à necessária para incorporar o número de átomos de Tc-99m oferecidos (111). O aumento da eficiência de marcação observado com o hematócrito acima de 50% também pode significar a redução da capacidade de ligação dos componentes plasmáticos ao Tc-99m,

por diminuição das suas concentrações, ou, então, com a expansão do volume globular, produzir aumento da captação celular de Sn^{++} , diminuindo a capacidade plasmática em fixar o Tc-99m (elevando, assim, a eficiência de marcação), ou, finalmente, o que é mais provável, a composição de todos estes fatores para produzir os resultados encontrados.

3.10 - Concentração plasmática:

Como mostra a figura 11a, a eficiência de marcação diminuiu inversamente a concentração do plasma.

Isto faz supor que, para hematócritos inferiores a 50%, a concentração dos componentes plasmáticos capazes de se ligar ao Tc-99m , exerça papel importante no processo de marcação das células (37, 61), justificando o procedimento de vários autores ao utilizar apenas a fração celular sanguínea, para marcação (3, 7, 33, 38, 44, 51, 59, 71, 75, 113).

É possível que a adição de solução de NaCl 0,9% ao volume de hemácias resultantes da primeira centrifugação possa melhorar, ainda mais, a eficiência de marcação, uma vez que diluiria o volume plasmático remanescente (113).

A solução ACD como diluente do sangue para marcação das células demonstrou ser significativamente inferior... ($\approx 0,1$) à solução de NaCl 0,9%, para volumes de 2,5 ml de diluente com 3 ml de sangue. (figura 11b).

3.11 - Fração celular:

Como é mostrado na figura 11b, o Tc-99m nos eritrócitos, se liga predominantemente na hemoglobina.

Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Linderkamp et alii (78) e Rehani e Sharma (110).

Os estudos de Thompson et alii (130) indicam que a maior ligação do Tc-99m com a hemoglobina não parece ser devida à maior afinidade entre ambos, mas por causa da grande massa proteica que esta representa nas hemácias. Há evidências de que a ligação do Tc-99m aos polipeptídeos ocorra por intermédio de radicais sulfidrílicos presentes em aminoácidos, como a cisteína (68, 130).

3.12 - Fração plasmática:

Como mostra a figura 13, a ligação de Tc-99m aos componentes plasmáticos é mais resistente com concentrações superiores a 6,8 µg/ml do que com concentrações inferiores.

Conforme os resultados da cromatografia e do tratamento com TCA, a frio, da fração plasmática, este comportamento do Tc-99m se deve à sua maior ligação à fração proteica. A possibilidade de o pirofosfato estar presente como intermediário desta ligação é pouco provável, haja vista os resultados de diálise do plasma tratado com solução de SnCl₂, a 34 e 340 µg/ml, onde o grau de ligação do Tc-99m à fração plasmática é semelhante ao encontrado com iguais concentrações de PPI-SnCl₂.

Estes resultados estão de acordo com os achados de

Hays e Green (61), os quais mostram que 80% do $^{99m}\text{Tc}^{0}$, incubados com plasma a 37°C , encontram-se ligados à fração proteica, predominantemente à albumina.

Outros autores já haviam observado a necessidade de remover o plasma antes do processo de marcação, com o objetivo de elevar a eficiência de incorporação do Tc-99m pelos eritrócitos (38, 71, 115).

3.13 - Anticagulantes:

Os resultados apresentados na figura 5 indicam que, à exceção do EDTA, os demais anticoagulantes usados (citrato, oxalato, heparina e ACD) permitem a obtenção de alta eficiência de marcação, mesmo em grandes concentrações destas drogas.

Estes resultados estão de acordo com os encontrados por vários outros autores, trabalhando com ACD, heparina e citrato (16, 71, 123, 134).

O EDTA, entretanto, exibiu um comportamento aparentemente paradoxal, resultando no crescimento da eficiência de marcação com o aumento da concentração da droga. Estes resultados estão em desacordo com o que foi sugerido previamente por Billingham et alii (16).

O EDTA é capaz de fixar fortemente íons bi e trivalentes (29), e, possivelmente, quelar o Sn^{++} extracelular... (51, 52). Este argumento, contudo, não justifica o aumento da eficiência de marcação com o crescimento da concentração do anticoagulante. É possível que agindo sobre a membrana

eritrocitária (92) o EDTA produza modificações responsáveis por estes resultados.

A tabela 4 mostra que a eficiência de marcação das hemácias com Tc-99m e com Cr-51 difere de acordo com o anticoagulante usado, exceto quando utilizou-se a solução ACD. Estes resultados estão de acordo com a hipótese de que o EDTA, pelo menos em baixas concentrações (2,4 µg/ml) fixa o Sn^{++} , diminuindo a eficiência de marcação com Tc-99m.

Com o Cr-51 isto não ocorre, uma vez que o cromatograma não depende da presença de Sn^{++} para sua fixação à hemoglobina (1, 53, 130).

3.4. - Concentração de cálcio:

Pelos resultados apresentados na tabela 6, pode-se concluir que a eficiência de marcação dos eritrócitos com Tc-99m não se modifica com o aumento da concentração de calcio no meio de reação. A queda da marcação observada com a concentração de 70 µg/ml devida ao aparecimento de hemólise.

O motivo que nos levou a testar a eficiência de marcação em eritrócitos normais, na presença de altas concentrações de cálcio, foi a observação de que eritrócitos de falcêmicos apresentam menor capacidade de incorporar Tc-99m do que os normais. Como na anemia falciforme várias alterações celulares estão presentes (aumento da concentração de cálcio, alteração estrutural da cadeia de hemoglobina (92, 142), resolvemos iniciar nossos estudos pela parte menos laboriosa, ou seja, a concentração de cálcio.

s.15 - Estabilidade da Solução de PPI-SnCl₂:

Com os resultados apresentados na tabela 5, podemos observar que a solução de PPI-SnCl₂, mantida sob baixa temperatura (15°C negativos), conserva sua concentração de Sn⁺⁺ em nível suficientemente alto para reproduzir a eficiência de marcação inicial durante, pelo menos, 22 dias consecutivos.

A manutenção da estabilidade do PPI-SnCl₂ na concentração de 6,8 µg/ml por longos períodos, permite que a preparação original, contendo 12 mg de pirofosfato e 3,4 mg de cloreto estanhoso, possa ser usada com maior proveito pelos serviços de medicina nuclear com menor demanda deste material.

CAPÍTULO III

C B / A

ESTUDOS "IN VIVO"1 - MATERIAIS E MÉTODOS1.1 - Equipamentos1.1.1 - Câmara de Cintilação

Para alguns casos estudados, utilizamos câmara de cintilação com cristal de NaI (ativado com Tl), medindo 27,5 cm de diâmetro e 1,3 cm de espessura, com 37 tubos fotomultiplicadores (Dynamax UF-Elcint), colimador de canais paralelos para baixa energia, média resolução e sensibilidade.

Para o processamento das imagens era usado um sistema de processamento de dados acoplado à câmara (Dycomette, Elcint).

1.1.2 - Mapeador Retilíneo

Parte dos pacientes foi examinada com mapeador retilíneo com cristal de NaI (ativado com Tl) medindo 12,5 cm de diâmetro e 7,5 cm de espessura (scintimat-2, Siemens).

Colimador convergente, para baixa energia (modelo T-ID).

Sistema de registro de imagem em cores em papel e filme radiográfico de 35 cm x 42,5 cm.

1.1.3 - Sonda de Cintilação

Estudos foram realizados, em alguns pacientes, fazendo-se contagens "in vivo", sobre o precórdio, após a injeção do material marcado. Para isto, era usada uma sonda de cintilação com Cristal de NaI (ativado com Tl), medindo 7,5 cm x 7,5 cm acoplada a um colimador cilíndrico de 15 cm de diâmetro e 26 cm de altura, e ligada a um espectrômetro de radiação gama com escalímetro. (Baird Atomic, modelo 530).

1.2 - Pacientes

Foram estudados 38 pacientes, 5 controles e 33 portadores de doenças diversas. A idade variou de 6 a 69 anos.

Nos quadros I, II, III e IV estão os dados referentes a cada paciente (idade, sexo, cor e patologia básica) dos grupos estudados.

1.3 - Exames realizados

A maioria dos pacientes (nº 19) foi submetida a cintigrafia esplênica. Em dois foi realizado estudo dinâmico para investigação de aneurisma da aorta abdominal.

Para a realização dos estudos dinâmicos, o sangue do paciente era colhido, marcado conforme técnica descrita no capítulo II, item 1.7 e em seguida reinjetado por via venosa.

Imagens eram obtidas (24 imagens/min) em câmara de cintilação, imediatamente depois da injeção.

Para cintigrafia esplênica, depois de marcadas, as hemácias eram desnaturadas com calor, por incubação em banho-maria a $49,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos. Depois de 5 minutos à temperatura ambiente, o sangue era reinfundido por via venosa. Imagens do baço eram obtidas de 30 a 60 minutos mais tarde, nas posições anterior (A), posterior (P) e lateral esquerda (LE).

Com gama câmara, eram acumuladas 3×10^5 contagens por incidência. No mapeador retilíneo, era usada subtração da radiação residual (background) de 5%, e densidade de informação (DI) de 900 a 1300 contagens/cm².

QUADRO I
PACIENTES "NORMAIS"

Nº	Idade Anos	Sexo	Cor	Quadro Patológico	Achados da Cintigra- fia Esplênica
1	7	M	B	Traumatismo Abdominal	Normal
2	44	M	B	Neoplasia	Normal
3	57	M	B	Neoplasia Cerebral	Normal
4	27	F	B	Anemia	Normal
5	40	M	B	Glomerulo- nefrite	Normal

OBS.: 2 pacientes submeti-
dos a exame dinâmico
com idades de 53 e 55 anos,
brancos e masculinos

QUADRO II
PACIENTES ESPLENECTOMISADOS

Nº	Idade Anos	Sexo	Cor	Quadro Patológico	Achados da Cintigrafia Esplênica
1	25	F	B	PTI Operada há 2 anos	Ausência do baço Captação hepática
2	50	F	B	Anemia Hemolítica Autoimune	Presença do baço acessório
3	12	M	B	Anemia Hemolítica Autoimune	Ausência do baço Captação hepática
4	23	F	B	PT Autoimune	Ausência do baço Captação hepática
5	53	F	B	PTI	Ausência do baço

QUADRO III
ESPLENOMEGALIA A ESCLARECER

Ordem	Idade Anos	Sexo	Cor	Quadro Patológico	Achados da Cintigrafia Esplênica
1	69	M	B	Leucemia Mielóide Crônica	Baço normal
2	58	M	B	Policitemia Vera	Baço normal
3	8	M	B	Microesferocitose	Aumento do volume do Baço
4	20	M	B	PTI (pré-operatório)	Baço normal
5	18	M	P	Poliglobulia	Aumento do volume do Baço
6	10	M	B	Anemia	Aumento do volume do Baço
7	40	M	B	Nefropatia crônica	Baço normal

QUADRO IV
PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

Nº	Idade Anos	Sexo	Cor	Achados Clínicos e Laboratoriais	Achados da Cintigrafia Esplênica
1	13	M	P		A F B
2	17	M	P		A F B
3	13	M	P		A F B
4	6	M	P		A F B
5	24	M	P		A F B
6	17	M	P		A F B
7	18	M	P	Icterícia com Hepato-Megalia	A F B
8	9	M	P		A F B
9	10	M	P		A F B
10	12	M	P		A F B
11	12	M	P		A F B
12	8	M	P		A F B
13	17	M	P		A F B
14	19	M	B		A F B
15	23	F	B		A F B
16	45	F	P		A F B
17	27	F	P		A F B
18	22	F	P		A F B
19	16	F	P	Htc-31%, Reticulócitos 8,8% Micrócitos e Hemácias em alvo plaquetas aparentemente normais Eletroforese H6 - AS	Baço aumentado de volume com captação homogênea

AFB: Ausência Funcional do Baço

2 - RESULTADOS

2.1 - Tempo de desaparecimento sanguíneo das células marcadas (TDC):

As contagens precordiais realizadas com sonda de cristal plano, pelo período de 10 minutos, permitiu a construção das curvas de desaparecimento das células marcadas, após sua administração venosa (figura 1). Estas curvas podem ser analisadas por decomposição, em duas exponenciais. Uma componente rápida, com $T_{1/2}$ de 1,4 minutos e a componente lenta, com $T_{1/2} = 15,4$ minutos.

2.2 - Cintigrafias:

2.2.1 - Pacientes do grupo-controle

Foram estudados 5 pacientes, os quais receberam de 1 a 5 mCi de Tc-99m, marcando hemácias autólogas, desnaturadas pelo calor ($49,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$). A dose para criança foi calculada em função do peso corporal (69).

A figura 2 mostra um estudo com seqüência de imagens, as quais, nos primeiros 2 a 3 minutos, ainda mostram as câmaras cardíacas, fígado e rins, além do baço.

Aos 20, 90 e 120 minutos, as imagens dos demais órgãos desaparecem e apenas o baço pode ser visto.

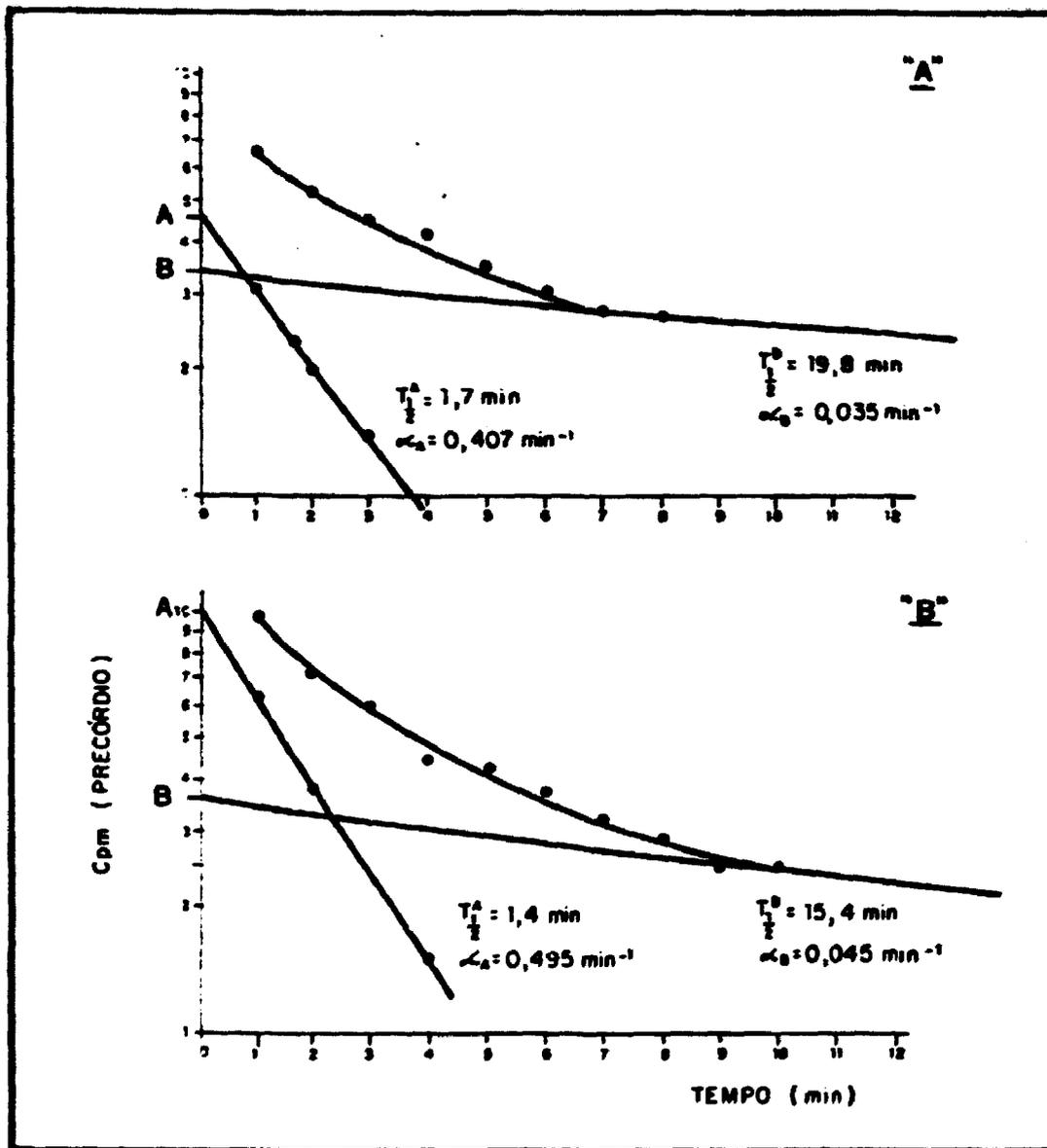


Fig. 1 - Curva de desaparecimento sanguíneo dos eritrócitos marcados com Tc-99m e desnaturados pelo calor. Contagens obtidas sobre o precórdio. "A" e "B", pacientes do grupo-controle.

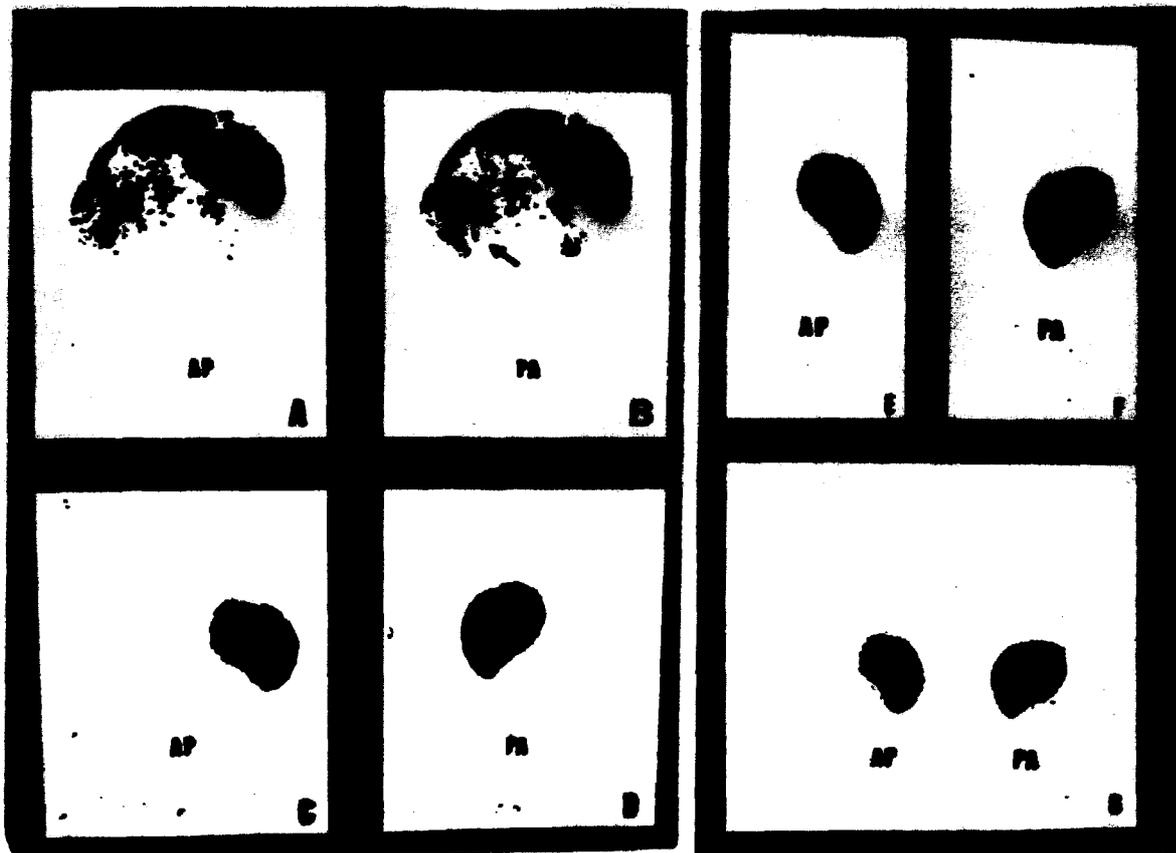


Fig. 2 - Cintigrafia esplênica, com Eritrócitos-T-99m desnatu-
 turados. Normal.

Imagens obtidas com câmara de cintilação, aos 2 min.,
 na projeção anterior (A). Aos 3 min., anterior (B), i
 magem hepática (\uparrow). Aos 20 min., anterior (C), poste-
 rior (D).

Aos 90 min., anterior (E), posterior (F). Aos 120 min.
 (G), anterior e posterior.

99.

As figuras 3a e 3b são exemplos de estudos normais, realizados com mapeador retilíneo, nos tempos de 30 e 60 minutos após a administração venosa do sangue marcado, respectivamente. Na figura 3a o baço exibe sua forma lentiforme quando visto na incidência anterior.

2.2.2 - Pesquisa de baço acessório

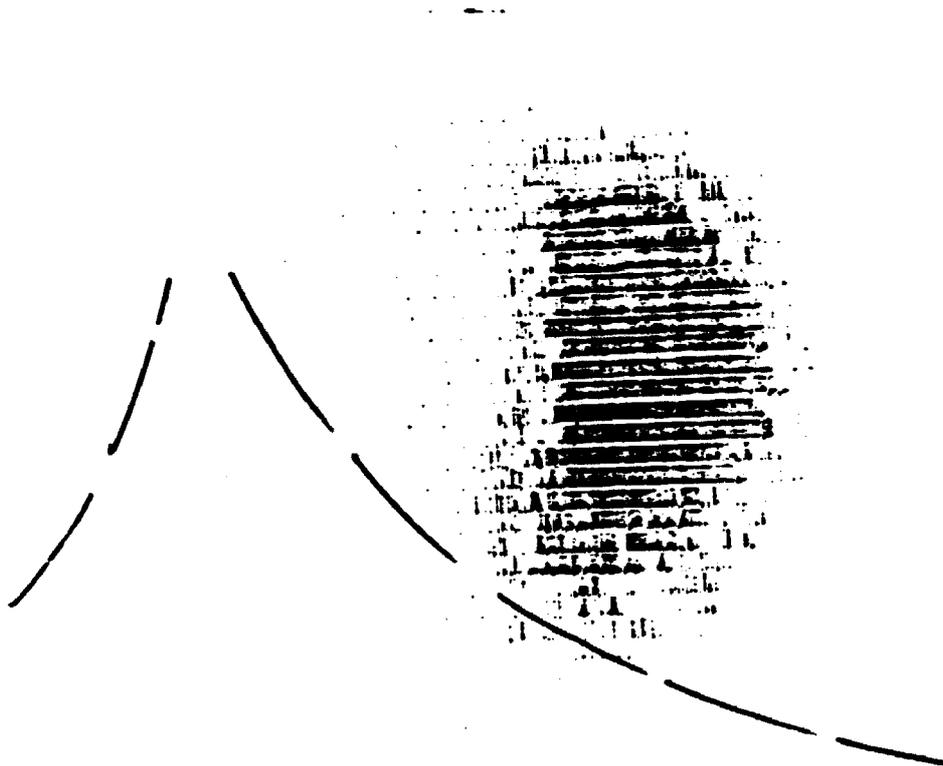
Um grupo de 5 pacientes esplenectomizados foi submetido a exame cintigráfico para pesquisa de baço acessório. O material marcado permaneceu na circulação por um período mais longo do que no grupo-controle. Além disso, a captação hepática foi acentuada, ao contrário do que se observou com pacientes "normais". A figura 4 mostra um dos casos estudados, no qual houve o aparecimento de acúmulo localizado do material marcado no flanco esquerdo.

2.2.3 - Esplenomegalia

Os 7 pacientes que compuseram este grupo foram estudados devido à não confirmação do aumento do baço, ao exame físico.

Em 3 deles a cintigrafia demonstrou aumento do órgão. Na figura 5 encontramos, como exemplo, um dos casos estudados, o qual, de acordo com Larson et alii (77), apresenta aumento de volume esplênico, visualizado, apenas, nas projeções P e LE.

Na incidência anterior, o órgão não mostra to



**Fig. 3a - Cintigrafia esplênica com Tc-99m-Eritrócitos mar-
cados e desnaturados. Normal.**

Imagem obtida com mapeador retilíneo, aos 30 min.
após a administração do radiotraçador, na proje-
ção anterior.

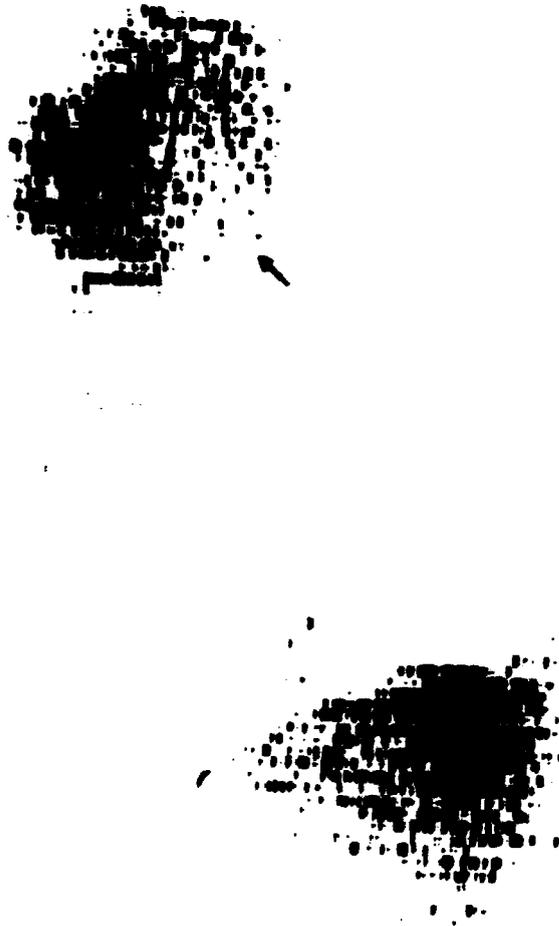


Fig. 3b - Cintigrafia esplênica com Tc-99m-Eritrócitos desnaturados. Normal.

Imagens obtidas com mapeador retilíneo, aos 60 min. após a administração do radiotraçador.

Projeção posterior (A) e lateral esquerda (B). Área hipocaptante na face anterior do baço, correspondendo ao hilo esplênico (↘).

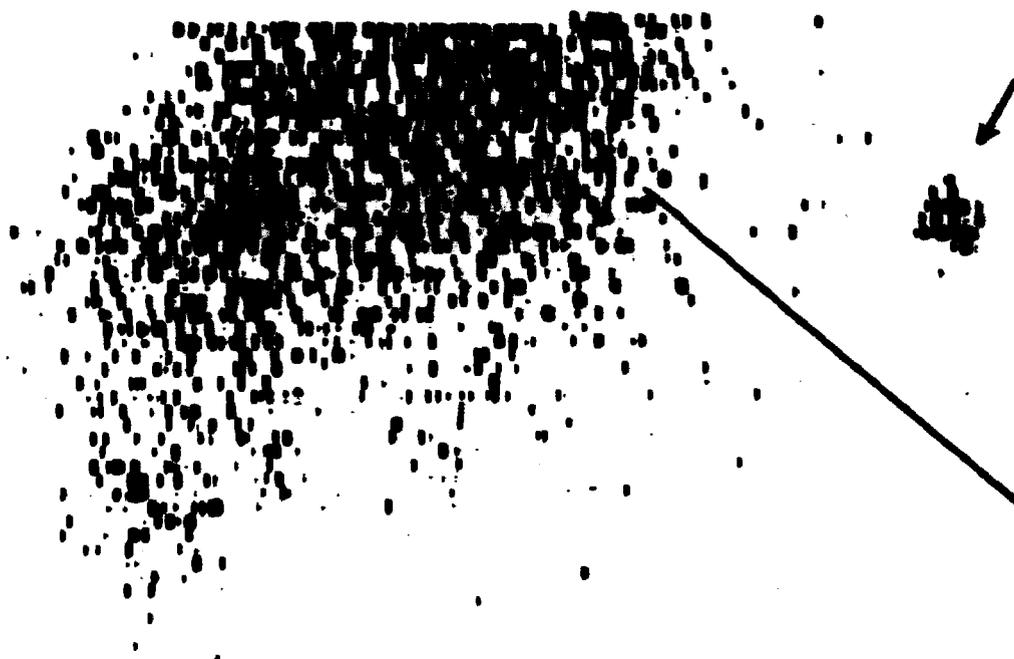


Fig. 4 - Cintigrafia esplênica com Tc-99m-Eritrócitos desnaturados.

Exame realizado aos 120 min. após a administração do radiotraçador.

Paciente f., 50 anos, portadora de anemia hemolítica autoimune. Espectomia há 5 anos.

Projeção anterior - acúmulo de células marcadas no fígado e na projeção do baço (↙).

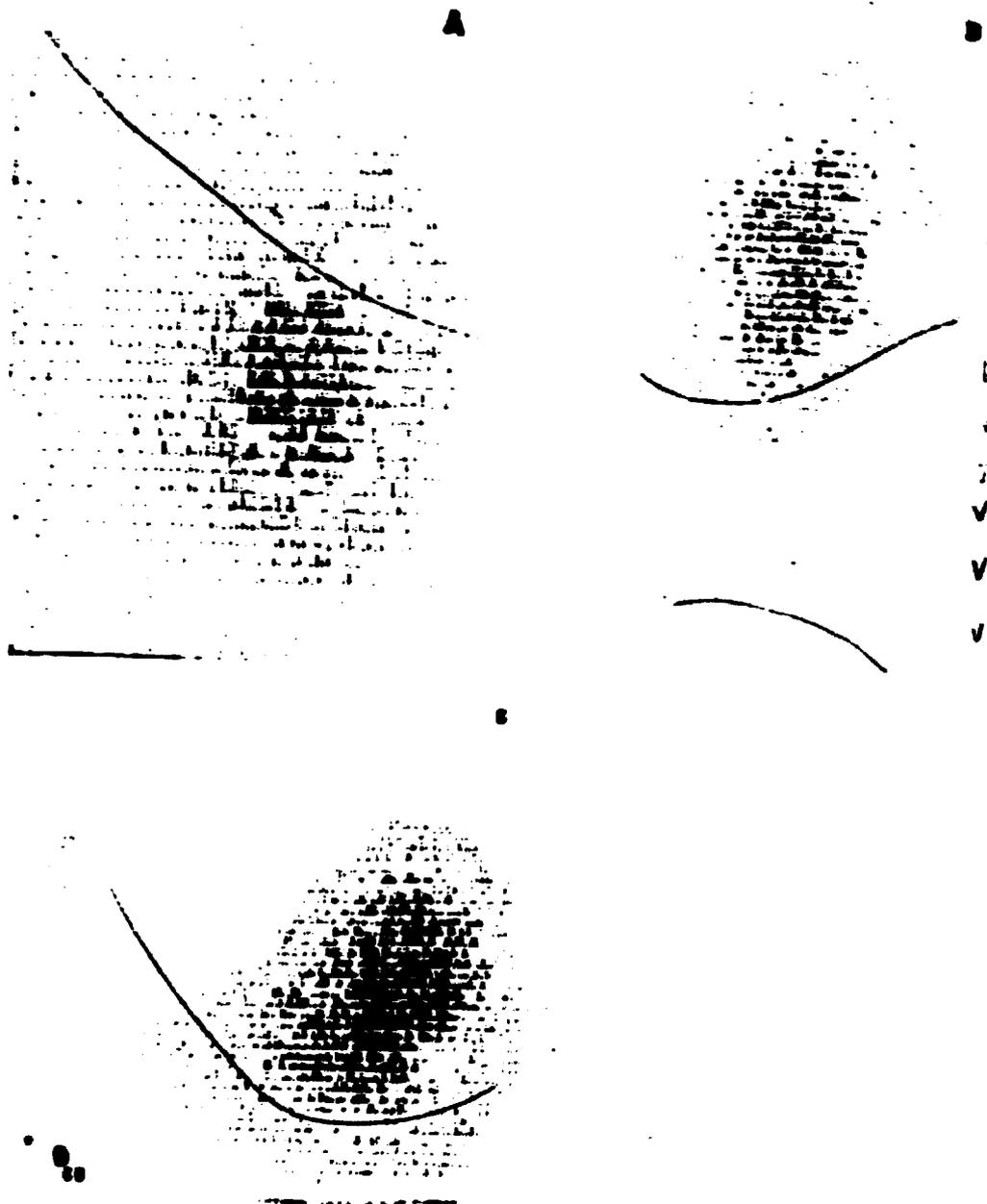


Fig. 5 - Cintigrafia esplênica com Tc-99m-Eritrôcitos desnatu-
 turados. Exame realizado aos 30 min. após a admi-
 nistração do radiotraçador.

Paciente m., 18 anos, com poliglobulia.

Projeção anterior (A), posterior (B) e lateral es-
 querda (C). Aumento do volume esplênico, bem evi-
 denciado nas projeções posterior e lateral.

de seu tamanho, apesar de se projetar abaixo do reborço do costal esquerdo.

2.2.4 - Anemia falciforme

Para os pacientes estudados neste grupo, a idade variou de 2 a 45 anos. Em apenas 1 houve aparecimento do baço. Nos demais, o TDC foi mais longo do que os normais e os órgãos que captaram o material foram rins, pulmões e fígado. Não houve aparecimento de tireóide, glândulas salivares ou mucosa gástrica, indicando que o Tc-99m não se encontrava livre.

A figura 6 mostra a distribuição do material injetado, evidenciando as câmaras cardíacas. A figura 7 apresenta a concentração das células marcadas no rim, pulmão e fígado. O aparecimento dos vasos do pescoço com ausência de captação pela tireóide confirma a hipótese de que o Tc-99m não se encontrava livre (4).

É extremamente rara a presença de baço funcional na idade adulta em pacientes portadores de anemia falciforme (135). A figura 8 mostra o exame de uma das pacientes estudadas neste grupo. A cintigrafia demonstrou esplenomegalia com captação homogênea das células, conforme o critério de medida descrito por Larson et alii (77) e Sigel et alii (119).

2.2.5 - Estudos dinâmicos

Dos 38 pacientes estudados, 2 foram submetidos a investigação de aneurisma de aorta abdominal.

Em um o exame foi normal e no outro houve o aparecimento de imagem precoce, hiperativa, imediatamente acima da projeção dos rins. Este resultado foi confirmado por exame ecográfico, como aneurisma aórtico.

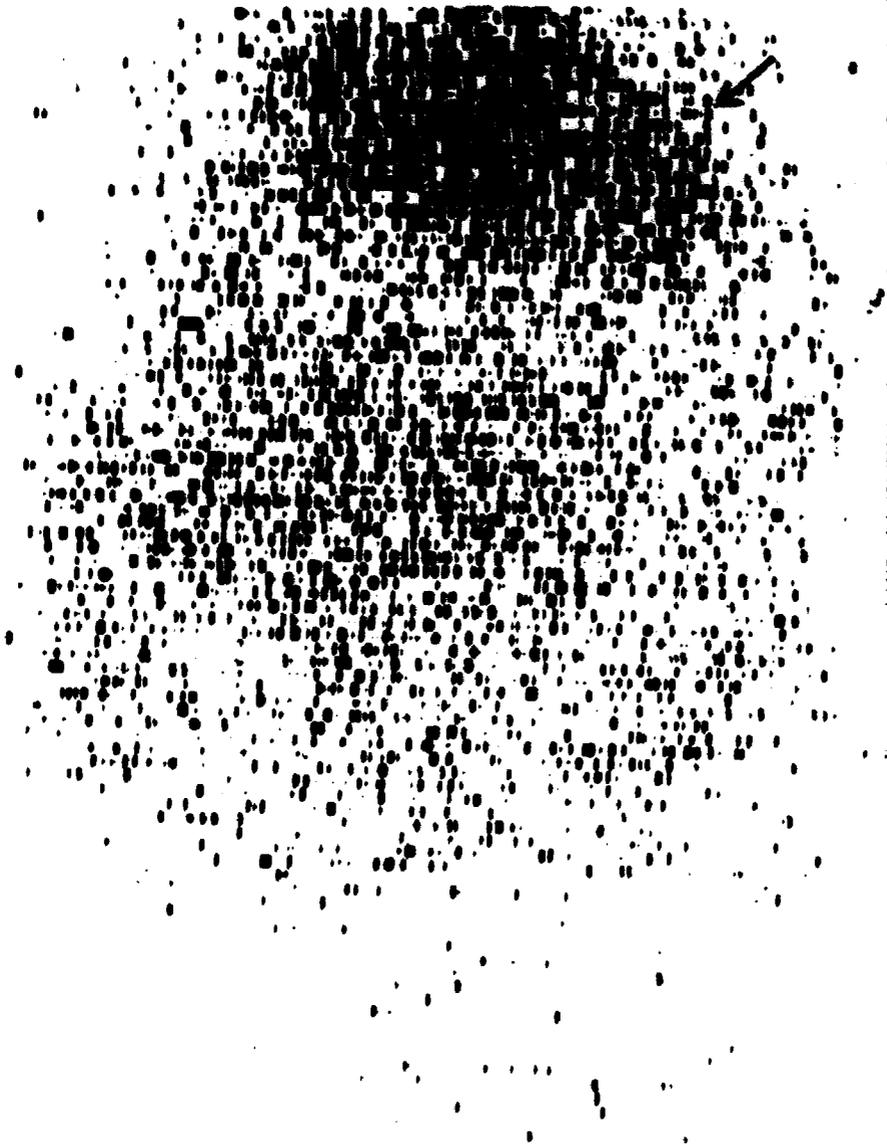


Fig. 6 - Cintigrafia com Tc-99m-Eritrócitos desnaturados.
Imagens obtidas aos 60 min. após a administração
do radiotraçador.
Paciente m., 18 anos, portador de anemia falcí -
forme (Hb SS).
Projeção anterior, mostrando as câmaras cardí -
cas e atividade na circulação abdominal.

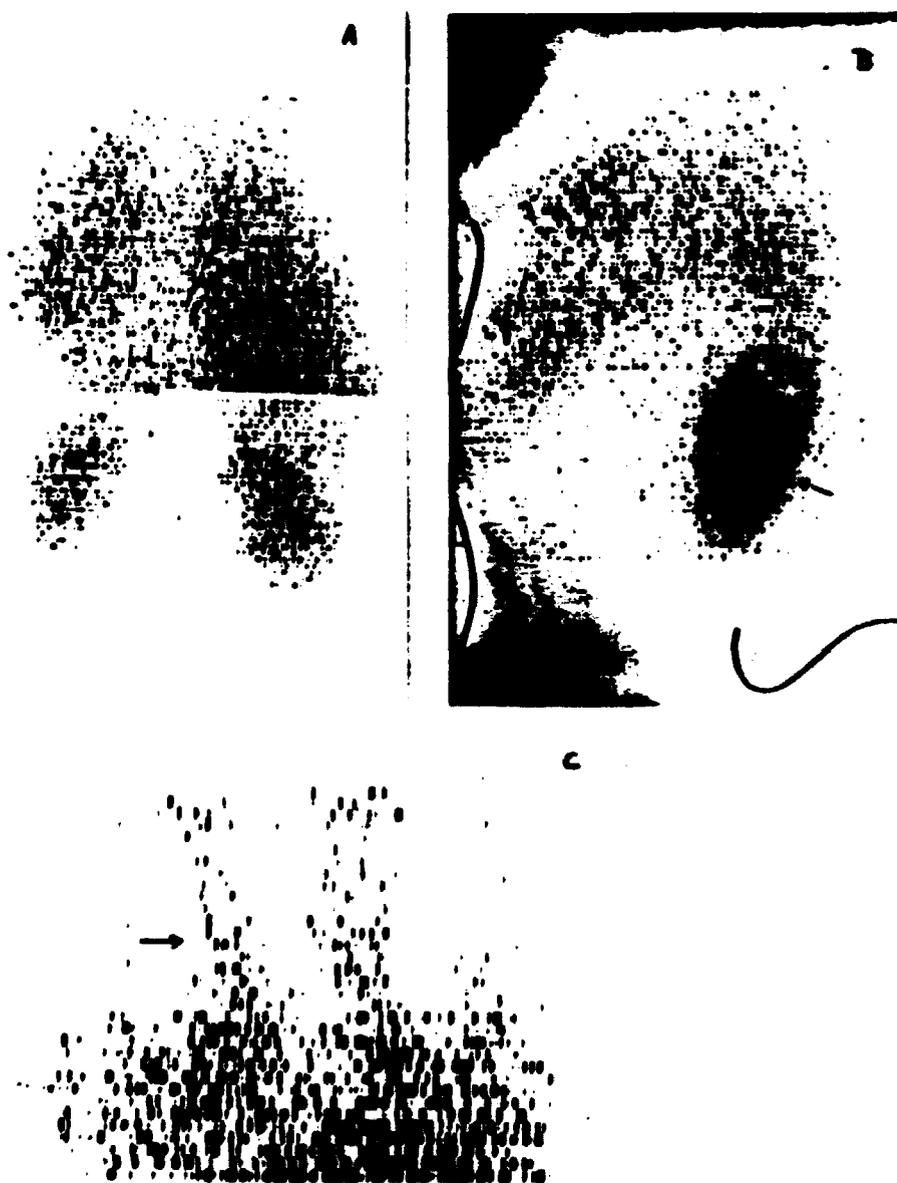


Fig. 7 - Cintígrafia com Tc-99m-Eritrócitos desnaturados.

Exame realizado aos 60 min. após a administração do radio traçador.

Paciente f., 22 anos, portadora de anemia falciforme (Hb SS). Projeção posterior (A), lateral esquerda (B), imagens renal (+) e anterior do pescoço (C), mostrando a atividade na circulação (+).

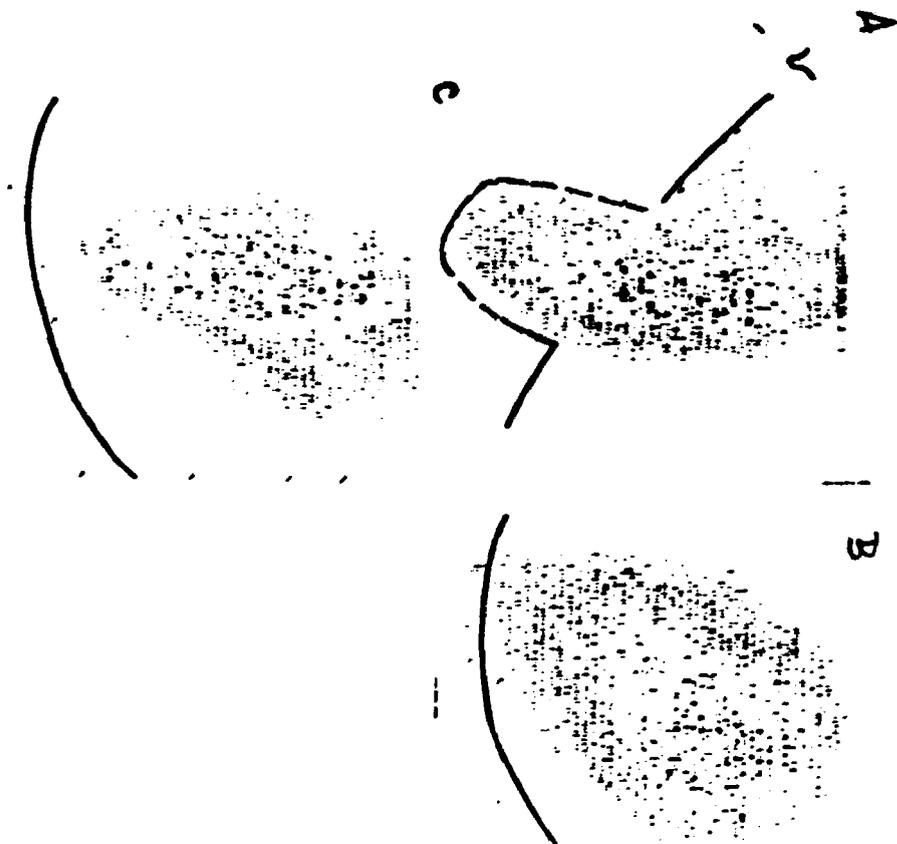


Fig. 8 - Cintigrafia esplênica, com Tc-99m-Eritrócitos deg naturados.

Exame realizado aos 30 min. após a administração do material marcado.

Paciente f., 16 anos, portadora de anemia falciforme (Hb SS).

Projeção anterior. Baço apresentando-se aumentado, ultrapassando o rebordo costal esquerdo.(A).

Lateral esquerda (B), Posterior (C).

3 - DISCUSSÃO

3.1 - Tempo de desaparecimento sanguíneo das células desnaturadas (TDC):

As curvas de desaparecimento sanguíneo células marcadas e desnaturadas pelo calor (49,5°C mostram que a atividade administrada se reduz à metade dentro dos cinco minutos iniciais e que, aos dez minutos, encontra-se em 25%.

Estes resultados permitem concluir que o tempo necessário para o início da realização da cintigrafia esplênica não precisa ser maior do que 30 minutos, em pacientes não portadores de doenças do sistema hematopoiético. Tais achados confirmam os de Smith (121) e Fischer et alii (45).

3.2 - Cintigrafia e estudos dinâmicos:

3.2.1 - Pacientes do grupo-controle

A seqüência de imagens obtidas após a administração de eritrócitos marcados com 5 mCi de Tc-99m (figura 2), mostra que, nos tempos iniciais (2-3 minutos), parte da atividade encontrada no baço representa o volume de perfusão deste órgão, uma vez que juntamente com ele aparecem as imagens das câmaras cardíacas, fígado e rins. A permanência da imagem esplênica sem a visualização das demais estruturas, no período de 20 a 120 minutos seguintes, permite concluir que a estabilidade, "in vivo", do material marcado é suficientemente alta, não ocorrendo a eluição do Tc-99m das he-

mácias, ou a fragmentação destas. Isto levaria ao aparecimento de atividade circulante e da imagem hepática (73, 136). Além disso, demonstra que o tempo de realização do exame pode se estender até 120 minutos após a administração das células marcadas, sem perda de resolução das imagens.

Usando-se mapeador retilíneo, estes resultados podem ser obtidos com menores atividades de ... Tc-99m marcando hemácias, como mostram as figuras 3a e 3b.

3.2.2 - Pesquisa de baço acessório

Dos pacientes estudados para este fim, a figura 4 mostra um deles, no qual, a cintigrafia demonstrou acúmulo do material radioativo na topografia esplênica. Este achado pode representar tecido esplênico acessório; uma vez que este paciente, já esplenectomizado há 2 anos, como medida terapêutica para anemia hemolítica autoimune, voltou a apresentar quadro clínico semelhante ao estado pré-cirúrgico.

A loja esplênica é o local de maior incidência de baço acessório (69) e a frequência de aparecimento deste pós-esplenectomia foi estudada por Fischer e Wolf (46), os quais encontraram 3 casos positivos em 12 pacientes, por Bonnet-Gajdos et alii (18), que encontraram 2 em 21 casos estudados e Pearson et alii (97) que obtiveram 13 casos positivos em 22 pacientes.

3.2.3 - Esplenomegalia:

Dos 7 pacientes examinados, 3 apresentavam aumento do volume do baço, de acordo com o critério de Larson et alii (77) e Sigel et alii (119).

A figura 5 mostra um caso, no qual a esplenomegalia é notada apenas em 2 das 3 incidências realizadas. Na imagem anterior, o baço, apesar de situado abaixo do rebordo costal esquerdo, possivelmente por variação topográfica (69, 109), tem suas dimensões dentro dos limites da normalidade (47, 77).

Em 3.366 casos estudados, Fischer e Wolf (47) mostram que aproximadamente 70% dos baços com aumento apreciável do tamanho não são detectados pela palpação ao exame físico. Wagner et alii (135) relatam esta mesma tendência ao examinarem 109 pacientes.

3.2.4 - Anemia falciforme

Dos 19 pacientes estudados, apenas 1 apresentou concentração no baço das hemácias marcadas (figura 8). Nos demais, o material injetado permaneceu na circulação por período mais longo que nos normais e foi captado, em ordem crescente de concentração, pelos rins, pulmões e fígado (figuras 6 e 7).

A observação de que, nos primeiros anos de vida, na anemia falciforme, o baço sofre congestão, hemorragia, enfartos e, por final, fibrose (32), nos

permite interpretar estes achados como asplenia funcional.

Resultados semelhantes foram encontrados por Pearson et alii (100), Casper et alii (26) e Wagner et alii (135, 136). Estes últimos autores, usando hemácias marcadas com Cr-51, observaram que os falcêmicos apresentavam um tempo 5 vezes maior do que os normais para retirar da circulação metade das hemácias marcadas ($T_{1/2}$ = 42 minutos, $T_{1/2}$ 219 minutos).

normais	falciformes
---------	-------------

Uma possível explicação para este fato foi apresentada por Pearson et alii (100), os quais admitem que devido à alta viscosidade do sangue sinusoidal contendo um grande número de células drepanizadas, poderia ocorrer obstrução ao fluxo sanguíneo. Isto levaria ao desvio da circulação por "shunts" intraesplênicos, sem que o sangue passasse pelos elementos do sistema fagocitário mononuclear.

3.2.5 - Estudos dinâmicos

Os dois últimos pacientes foram submetidos a estudo dinâmico para avaliação da aorta abdominal. Em um deles, o exame foi positivo para dilatação aneurismática (confirmação por ultrassonografia) e no outro, normal. Em ambos os casos, a atividade permaneceu no espaço vascular durante o período de exame (20 minutos), produzindo imagens com boa resolução.

IV - CONCLUSÕES

A marcação com Tc-99m de eritrócitos tratados com solução de pirofosfato estanhoso é um processo eficiente, rápido e de fácil reprodução, podendo ser realizado em qualquer laboratório de medicina nuclear.

A alta eficiência de marcação obtida com o método aqui apresentado, parece preencher os requisitos do ICHS - 1980.

A necessidade de reagentes preparados no momento da marcação, bem como a aquisição de produtos especiais para o tratamento das células, certamente serão obstáculos ao emprego de vários métodos. Por outro lado, devido ao seu amplo uso em medicina nuclear (106, 129), o pirofosfato estanhoso é normalmente encontrado nestes serviços, o que justifica a sua escolha. Além do mais, a estabilidade do PPI-SnCl_2 , mantida sob baixa temperatura, permite sua preparação prévia e uso durante um longo período (pelo menos, 22 dias), facilitando a execução dos ensaios e reduzindo seu custo.

Devido ao fato de pequena fração de Tc-99m (5%) ficar ligada a proteínas plasmáticas, quando a marcação é feita em sangue total, parece razoável a realização da lavagem das células antes de administradas, quando a preparação se destinar ao estudo de volume globular circulante.

Para os demais objetivos, este tipo de manipulação pode ser dispersado, em vista da alta eficiência de marcação.

A cinética de captação do íon estanhoso pelos eritrócitos ocorre com duas componentes distintas, rapidamente até os 20 minutos de incubação, tornando-se lenta até o equilíbrio aos 90 minutos.

Como foi demonstrado pelo estudo da cinética de incorporação do Tc-99m pelos eritrócitos, o período de incubação

desta razão pode ser reduzido de 10 para 6 minutos, sem haver, com isto, prejuízo no rendimento da marcação.

Quanto à atividade de Tc-99m usada, o sistema é capaz de captar um número relativamente alto de átomos, o que inclui as atividades normalmente empregadas nos procedimentos diagnósticos em medicina nuclear.

Os anticoagulantes, exceto o EDTA, não parecem interferir no processo de incorporação do Tc-99m pelos eritrócitos, contudo, para uso "in vivo", o sangue deverá ser colhido em solução ACD, citrato de sódio ou heparina.

A temperatura ideal para marcação das células parece estar em torno de 37°C, uma vez que a eficiência de marcação e a preservação da estrutura celular parecem encontrar aí um ponto de equilíbrio.

Quanto à desnaturação das células, a temperatura e o tempo de incubação parecem ser fatores críticos, pois o aquecimento prolongado (tempo maior que 30 minutos) levaria à fragmentação das hemácias.

A cintigrafia esplênica pode ser realizada 20 minutos após a administração das células marcadas, sem que isto leve à perda de informações nas imagens, exceto quando se tratar de hipofunção esplênica.

Os estudos esplênicos devem incluir, de rotina, pelo menos, as imagens em posição ântero-posterior, pósterio-anterior e o perfil esquerdo, uma vez que a avaliação tridimensional do órgão parece ser de maior importância do que sua medida longitudinal.

V - S U M Á R I O

Estudo da marcação "in vitro" de eritrócitos humanos foi realizado pelo processo de pré-tratamento das células com cloreto estanhoso-pirofosfato de sódio. Foram investigados alguns fatores que influenciam a eficiência de marcação, tais como a concentração de cloreto estanhoso, temperatura e tempo de incubação, concentração plasmática e hematócrito. Observou-se que a captação do íon estanhoso pelas células, ocorre de forma exponencial, atingindo o equilíbrio por volta dos 90 minutos de reação. A ligação do Tc-99m no plasma ocorre na fração ácido insolúvel, em quantidades crescentes com o aumento da concentração de cloreto estanhoso. O emprego de diferentes anticoagulantes em diversas concentrações não alterou a eficiência de marcação, exceto o do EDTA, que parece bloquear a incorporação de Tc-99m pelas hemácias.

Os eritrócitos marcados e desnaturados pelo calor, foram usados para investigação "in vivo" de : esplenomegalia, baço acessório e função esplênica na hemoglobinopatia S. Foi observada ausência funcional do baço e aumento do tempo de circulação das hemácias marcadas na anemia falciforme em comparação com os pacientes "normais" e esplenectomizados. Nestes casos a captação foi maior no rim do que no pulmão e fígado.

V - RESUMO

VI - S U M M A R Y

The human beings' erythrocytes were studied "in vitro" by the pretinning method, using the pyrophosphate - Stannous Chloride kit. Investigation of factors that can alter the labeling efficiency includes tin concentration, temperature and incubation period, besides of plasma concentration and hematocrit. It was seen that tin uptake by the red blood cells (RBC) was in an exponential fashion, with a reaction constant, $K = 0,03 \text{ min}^{-1}$. The reaction approaches the equilibrium about the 90 minutes. The binding of Tc-99m in the Acidic insoluble fraction occurs in greater amounts with more concentrated tin solutions. The labeled and heated RBC were used "in vivo" to scintigraphic investigation. "Normal" subjects, splenomegaly, accessory spleen and splenic function in sickle-cell disease were studied. Circulation time of labeled RBC appears to be greater in sickle-cell anemia than in controls or splenectomized patients. Uptake was greater in kidney than lungs and liver.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) AASETH, J.; ALEXANDER, J. e NORSETH, T.:
Uptake of Cr-51 - Chromate by human erythrocytes - A role of glutation. *ACTA PHARMACOL. TOXICOL.*, 50: 310-315, 1982.
- 2) ABBUD, M.F.:
Reaproveitamento de dialisadores descartáveis tipo "COIL".
Tese apresentada ao Centro Biomédico da UERJ, 1980.
- 3) ANGHILERI, L.J.; LEE, J.I. e MILLER, E.S.:
The Tc-99m labeling of erythrocytes. *J.NUCL.MED.*, 11: 530-533, 1970.
- 4) ANCRI, D.; LONCHAMPT, M.F. e BASSET, J.Y.:
The effect of tin on the tissue distribution of ^{99m}Tc-sodium pertechnetate. *RADIOLOGY*, 124: 445-450, 1977.
- 5) ARMAS, R.R.; THAKUR, M.L. e GOTTSCHALK, A.:
A simple method of spleen imaging with Tc-labeled erythrocytes: work in progress. *RADIOLOGY*, 132: 215-216, 1979.
- 6) ARMAS, R.R.; THAKUR, M.L. e GOTTSCHALK, A.:
A simplified method of selective spleen scintigraphy with Tc-99m-labeled erythrocytes: clinical applications. Concise communication. *J.NUCL.MED.*, 21: 413-416, 1980.
- 7) ATKINS, H.L.; ECHELMAN, W.C.; HAUSER, W.; KLOPPER, F.; e RICHARDS, P.:
Splenic sequestration of Tc-99m-labeled red blood cells. *J.NUCL.MED.*, 13: 811-814, 1972.
- 8) ATKINS, H.L.; ECKELMAN, W.C.; KLOPPER, J.F.; e RICHARDS, P.:
Vascular imaging with Tc-99m red blood cells. *RADIOLOGY*, 106: 357-363, 1973.

9) ATKINS, H.L.; GOLDMAN, A.G.; FAIRCHILD, R.G.; OSTER, T. H.; SOM, P.; RICHARDS, F.; MEINKEN, G.E.; e SRIVASTAVA, S.C.:
 Splenic sequestration of Tc-99m-labeled Heat Treated red blood cells. *PROC.SYMP.RAD.SOC.N.AMER., ATLANTA, Georgia, Nov., 1979.*

10) ASHBY, W.:
 Span of life of red blood cell. *BLOOD, 3: 486-500, 1948.*

11) BARDY, A.; FONYE, H.; GOBIN, R.; BEYDON, J.; TOVAR, G.; PANNECIÈRE, C.; e HÉGÉSIPPE, M.:
 Technetium - 99m labeling by means of stannous ... pyrophosphate: application to bleomycin and red blood cells. *J.NUCL.MED., 16: 435-437, 1975.*

12) BENTLEY, S.A.:
 Red cell survival studies reinterpreted. *CLIN.HEMATOLOGY, 6: 601-623, 1977.*

13) BERLIN, N.I.; WALDMAN, T.A.; E WEISMAN, S.M.:
 Life span of red blood cell. *PHYS. REV., 39: 577-616, 1979.*

14) BERGER, R. e JOHANSEN, B.:
 Markierung von erythrozyten mit technetium-99m. *Wiss Zeit Math - NATURWISS LEIPZIG UNIV., 18: 635-638, 1969.*

15) BESWICK, W.; CHMIEL, R.; VELLAR, I.; GILFORD, E.; e CHESTERMAN, C.N.:
 Detection of deep venous thrombosis by scanning of Tc-99m labeled red cell venous pool. *BRIT.MED.JOURNAL, 1: 82-84, 1979.*

16) BILLINGHURST, M.W.; IETTE, D.; e GREENBERG, D.:
 Determination of the optimal concentrations of stannous pyrophosphate for in vivo red blood cell labeling with technetium - 99m. *INT.J.APPL.RAD.ISOT., 31: 499-504, 1980 .*

- 17) BOASQUEVISQUE, E.N.; MOURA, I.N.S.; CANINÉ, M.S.; BERNARDO, M.F. e FERREIRA, F.L.S.:

Cintigrafia esplênica com eritrócitos marcados com Tc-99m: Aplicação clínica. *CIENC. CULT.*, 33: 70, 198.

- 18) BONNET-GAJDOS, M.; BERGER, J.P.; GEROTA, I. VERGOZ, D. : FERRER, M.; GRUNER, M.; e LASFARGUES, G.:

A asplenia. Estudo de 21 pacientes esplenectomizados na infância, devido a traumatismo. *NOUVELE PRESSE MED.*, (ED. BRAS.), 2: 131-134, 1982.

- 19) BOWDLER, A.J.:

The spleen and Haemolytic disorders. *CLIN. HAEMAT.*, 4: 231-246, 1975.

- 20) BOWRING, C.S.; GLASS, H.I. e LEWIS, S.M.:

Rate of clearance by the spleen of heat-damaged erythrocytes. *J. CLIN. PATH.*, 29: 852-854, 1976.

- 21) BOWRING, C.S.:

Quantitative radioisotope scanning and its use in haematology. *CLIN. HAEMAT.*, 6: 625-637, 1977.

- 22) BURDINE, J.A. e LESEAY, R.:

Spleen scans with Tc-99m labeled heated erythrocytes. *RADIOLOGY*, 91: 162-164, 1968.

- 23) CALAHAN, R.J.; FROELICH, J.W.; MCKUSICK, K.A.; LEPPA, J. e STRAUSS, H.W.:

A modified method for the in vivo labeling of red blood cells with Tc-99m: Concise communication. *J.NUCL. MED.*, 23: 315-318, 1982.

- 24) CALAHAN, R.J., FROELICH, J.W.; MCKUSICK, K.A.; LEPPA, J. e STRAUSS, H.W.:

Factor Affecting the rate and extent of incorporation

of Tc-99m into pre-tinned red blood cells. *J.NUCL.MED.*,
23: P109, 1982.

25) CARVAJAL, S.S.R.:

ELEMENTOS DE ESTATÍSTICA. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Matemática, 1979, 207 págs.

26) CASPER, I.T.; KOETHE, S.; RODEY, G.E. e THATHER, L.G.:

A new method for studying splenic reticuloendothelial in sickle cell disease patients and its clinical application: a brief report. *BLOOD*, 47: 183-188, 1976.

27) CHERVU, L.R.; HUQ, S.S.; JOSEPH, J.A.; CHUN, S.B. e BLAUFIX, M.D.;

Medication induced changes in biodistribution of radiopharmaceuticals. *J.NUCL.MED.*, 22: P72, 1981.

28) COLLOMBETTI, L.G.:

A simple technique for "in vivo" labeling of erythrocytes. *INT.CONG.OF SOC.NUCL.MED.*, 1977.

29) CURTIS, D.K.:

Heavy metals and heavy-metals antagonists, págs. 1616 - 1659. IN: *THE PHARMACOLOGICAL BASE OF THERAPEUTICS*. GILMAN, A. G.; GOODMAN, L.S. e GILMAN, A.; (ED.), 6a. edição McMillian publ Co. Inc., N. York, 1980.

30) CIAPLICKI, S.; DZIUK, E.; KONIECZNY, W. e BALTRUKIEWCZ, Z. :

Cardiac studies using red blood cells labeled with Tc-99m in vivo with single intravenous injections - First pass technique, gating and blood pool scanning. *EUR. J. NUCL. MED.*, 5: 85-88, 1980.

31) DEWANJEE, M.K.:

Binding of ^{99m}Tc ion to hemoglobin. *J.NUCL.MED.*, 15: 703-706, 1974.

32) DIGGS, L.W.:

Siderofibrosis of the spleen in sickle cell anemia. *JAMA*,
104: 538-541, 1935.

33) DUCASSOU, D. e ARIAUD, D.:

A new stannous agent for labeling red blood cells with
99mTc and its clinical application. *BRIT. J. RADIOLOG.*, 49:
344-347, 1976.

34) EADIE, G.S.; BROWN, I.W.; CURTIS, W.G.:

The potential life span and ultimate survival of fresh
red blood cells in normal healthy recipients as studied
by simultaneous Cr-51 tagging and Differential Hemolysis.
J.CLIN.INVEST., 34: 629, 1955.

35) EBAUGH, Jr., F.G.; EMERSON, C.P. e ROSS, J.F.:

The use of radioactive chromium 51 as an erythrocyte
tagging agent for the determination of red cell survival
in vivo. *J.CLIN.INVEST.*, 32: 1260, 1953.

36) ECKELMAN, W.:

Technical considerations in labeling of blood elements.
SEMINARS NUCL.MED., 5: 3-10, 1975.

37) ECKELMAN, W.; REBA, R.C. e ALBERT, S.N.:

A rapid simple improved method for the preparation of
Tc-99m red blood cells for the determination of red cell
volume. *AM.J.ROENTGENCL.RADIUM.THER.NUCL.MED.*, 118: 861-864,
1973.

38) ECKELMAN, W.; RICHARDS, P.; HAUSER, W. e ATKINS, H.:

Technetium - labeled red blood cells. *J.NUCL.MED.*, 12: 22-
24, 1971.

39) ECKELMAN, W.; RICHARDS, P.; ATKINS, H.L.; HAUSER, W. e...

KLOPPER, J.F.:

Visualization of the human spleen with ^{99m}Tc -labeled red blood cells. *J.NUCL.MED.*, 12: 310-311, 1971.

40) ECKELMAN, W.C.; SMITH, T.D. e RICHARDS, P.:

Labeling of blood cells with Tc-99m. *INT.SYMP. ON RADIOPH.*, Atlanta, 1974.

41) ECKELMAN, W.C.; SMITH, T.D. e RICHARDS, P.:

Labeling blood cells with Tc-99m. *IN, RADIOPHARMACEUTICALS, SUBRAMANIAN, G., RHODES, B.A.; COOPER, J.F.; SODD, V.J.; (ED.) , SOCIETY OF NUCLEAR MEDICINE, N. York (EUA), 1975, págs.49-54*

42) ECKELMAN, W. e RICHARDS, P.:

Instant ^{99m}Tc -DTPA. *J.NUCL.MED.*, 11L 761, 1970.

43) ERLICH, C.P.; PAPANICOLAOU, N.; e TREVES, S.:

Tc-99m Heat denatured RBC for splenic scintigraphy in children. *J.NUCL.MED.*, 22: P 37, 1981.

44) FERRANT, A.; LEWIS, S.M. e SZUR, L.:

The elution of ^{99m}Tc from red cells and its effect on red-cell volume measurement. *J.CLIN.PATH.*, 27: 983-985, 1974.

45) FISCHER, J.; WOLF, R. e LEON, A.:

Technetium-99m as a label for erythrocytes. *J.NUCL. MED.*, 8: 229-232, 1967.

46) FISCHER, J. e WOLF, R.:

Resultats de l'application clinique de la scintigraphie de la rate dans 500 cas: possibilités et limites. *IAEA - PROC.SYMP.MED.RADIOISOTOPE SCANNING. Athens, 1964.*

47) FISCHER, J. e WOLF, R.:

MEDICINA NUCLEAR EN LA HEMATOLOGIA. Hoechst, 1a. edição, 1968.

137 págs.

- 48) FRANK, M.M.; HAMBURGER, M.I.; LAWLEY, T.J.; KIMBERLY, R.P.
e PLOTZ, P.H.:
Defective reticulo-endothelial system Fc-receptor function
in lupus erythematosus. *N.ENGL.J.MED.*, 300: 518-523, 1979.
- 49) FRONT, D. e ISRAEL, O.:
Tc-99m-labeled red blood cells in the evaluation of vascular
abnormalities. *J.NUCL.MED.*, 22: 149-151, 1981.
- 50) GILLESPIE, G.Y.; BARTH, R.F. e GOBUTY, A.:
Labeling of mammalian nucleated cell with ^{99m}Tc. *J.NUCL.
MED.*, 14: 706-708, 1973.
- 51) GUTKOSKI, R.F. e DWORKIN, H.J.:
Kit-produced Tc-99m labeled red blood cells for spleen
imaging. *J.NUCL.MED.*, 15: 1187-1190, 1974.
- 52) GUTKOWSKI, F.F.; DWORKIN, H.J.; PORTER, W.C.; e ROHWER, H.:
Radiolabeling of red blood cells. *J.NUCL.MED.*, 17: 1113,
1974.
- 53) GRAY, S.J. e STERLING, K.:
The tagging of red cells and plasma proteins with
radioactive chromium. *J.CLIN.INVEST.*, 29: 1604-1613, 1950.
- 54) GRAY, S.T. e STERLING, K.:
Determination of circulating red cell volume with radioactive
chromium. *SCIENCE*, 112: 179, 1950.
- 55) HAMILTON, R.G. e ALDERSON, P.O.:
A comparative evaluation of techniques for rapid and
efficient in vivo labeling of red cells with (^{99m}Tc)...
pertechnetate. *J.NUCL.MED.*, 18: 1008-1011, 1977.
- 56) HAMILTON, R.G.; ALDERSON, P.O.; HARWIG, J.F. e STEGEL, B.A.:

Splenic imaging with ^{99m}Tc -labeled erythrocytes: a comparative study of cell-damaging methods. *J.NUCL.MED.*, 17: 1038-1043, 1976.

57) HARPER, P.V.; LATHROP, R.J.; Mc CARDLE, R.J. e ANDROS, G.;
The use of technetium- 99m as a clinical scanning agent for thyroid, liver, and brain. IAEA, SYMP.MEDICAL RADIOISOTOPE SCINTIGRAPHY, ATHENS, 1964.

58) HARPER, P.V.:

Factors which influence the choice of an Isotope. IN: DIAGNOSTIC NUCLEAR MEDICINE, Gottschalk, A., e Potchen, E.J. (Ed.), The William and Wilkins Company - 1a. edição, Baltimore, 1976. Págs. 22-25.

59) HARWIG, J.F.; ALDERSON, P.O.; PRIMEAU, J.L.; BOONVISUT, S. e WELCH, M.I.:

Development and evaluation of a rapid and efficient electrolytic preparation of ^{99m}Tc -labeled red blood cells. IN I.APPL.RADIAT.ISOT., 28: 113-121, 1977.

50) HAUBOLD, U.; PABST, H.W. e HOR, G.:

Scintigraphy of the placenta with Tc-^{99m} erythrocytes. IAEA SYMP. MEDICAL RADIOISOTOPES SCINTIGRAPHY, SALZBURG, 1968. SM 108/40 pág. 665-672.

51) HAYS, M.T. e GREEN, F.A.:

In vitro studies of ^{99m}Tc -pertechnetate binding by human serum and tissues. *J.NUCL.MED.*, 14: 149-158, 1973.

52) HEGDE, U.M.; WILLIAMS, E.D., LEWIS, S.M.; SZUR, L.; GLASS, H.I. e PETTIT, J.E.:

Measurement of splenic red cell volume and visualization of the spleen with ^{99m}Tc . *J.NUCL.MED.*, 14: 769-771, 1973.

- 63) HEGGE, F.N.; HAMILTON, G.W.; LARSON, S.M.; RITCHIE, J.L. e RICHARDS, P.:
Cardiac chamber imaging: A comparison of red blood cells labeled with Tc-99m in vitro an in vivo. *J.NUCL.MED.*, 19: 129-134, 1978.
- 64) HENRY, R.J.:
QUÍMICA CLÍNICA, BASES Y PRINCIPIOS. V-1. Jimes, 2a.edição, Barcelona, 1969, 179 págs.
- 65) HUBERTY, J.P. e HATTNER, R.S.:
A modified method for the in vivo labeling red blood cells with Tc-99m. *J.NUCL.MED.*, 23: 945-946, 1982.
- 66) HUGHES-JONES, N.C.:
Storage of red cells at temperatures between +10°C and -20°C. *BRIT.I.HAEMAT.*, 4: 249-255, 1958.
- 67) I.C.S.H. - Recommended methods for measurement of red cell and plasma volume. *J.NUCL.MED.*, 21: 793-800, 1980.
- 68) JOHANSEN, B.; SYHRE, R.; SPIES, H. e MUNZE, R.:
Chemical and biological characterization of different Tc complexes of cysteine and cisteine derivatives *J.NUCL. MED.*, 19: 816-824, 1978.
- 69) JOHNSON, P.M. e SPENCER, R.P.:
The spleen. *IN. CLINICAL SCINTILLATION IMAGING*, Freeman, L.M.; Johnson, P.M. (Ed.), Grune & Stratton, 2a. edição, N.York, 1975, págs. 39-670.
- 70) JOHNSON, P.M.; WOOD, E.H. e MOORING, S.L.:
Splenic scintillation scanning. *AMER.J.ROENTGEN.*, 86: 757 - 767, 1961.

71) JONES, J. e MOLLISON, P.L.:

A simple and efficient method of labeling red cells with Tc-99m for determination of red blood cell volume. BRIT.J. HAEMAT., 38: 141, 1978.

72) KHENTIGAN, A.; GARRET, M.; LUM, D. e WINCHELL, H.S.:

Effects of prior administration of Sn (II) complexes on in vivo distribution of 99m-Tc-pertechnetate. J.NUCL.MED., 17: 330-384, 1976.

73) KIMEER, R.J. e LANDER, H.:

The effect of heat on human red cell morphology, fragility, and subsequent survival in vivo. J.LAB. AND CLIN.MED., 64 : 922-933, 1964.

74) KINTRAS, G.A.; HAFFORI, A.M.; SCHNEIDER, A.S.; EBAUGH, F. G. e VALENTIRE, W.N.:

Studies on chromated erythrocytes. Effect of sodium chromate on erythrocytes glutathione reductase. J.CLIN. INVEST., 43: 323-331, 1964.

75) KORUBIN, V.; MAISEY, M.N. e Mc INTIRE, P.A.:

Evaluation of technetium-labeled red cells for determination of red cell volume in man. J.NUCL.MED., 13: 760-762, 1978.

76) LARSON, S.M.; HAMILTON, G.W.; RICHARDS, P. e RITCHIE, J.L. :

Kit-labeled technetium-99m red blood cells (Tc-99m-RBC's) for clinical cardiac chamber imaging. EUR.J.NUCL.MED., 3 : 227-231, 1978.

77) LARSON, S.M.; TUELL, S.H.; MOORES, K.D. e NELP, W.B.:

Dimensions of the normal adult spleen scan and prediction of spleen weight. J.NUCL.MED., 12: 123, 1971.

- 78) LINDERKAMP, O.; BETNE, K.; FENDEL, H.; KLENN, I.; LORENZEN, K. e RIEGEL, K.P.:

Tc-99m-labeled red blood cells for the measurement of red cell mass in new born infants: concise communication. *J.NUCL.MED.*, 21: 637-640, 1980.

- 79) LISBONA, R.; LEGER, J.; STERN, J.; DERBEKYAN, V. e SKINNER, B.:

Observations on Tc-99m erythrocyte venography in normal subjects and in patients with deep vein thrombosis. *CLIN.NUCL.MED.*, 6: 305-309, 1981.

- 80) MADDAHI, J.; BERMAN, D.S.; MATSUOKA, D.T.; WAXMAN, A.D. ; STANKUS, K.E.; FORRESTER, J.S.; e SWAN, H.J.C.:

A new technique for assessing right ventricular ejection fraction using rapid multiple-gated equilibrium cardiac blood pool scintigraphy. *CIRCULATION*, 60: 581-589, 1979.

- 81) MARINHO, H.M.:

HEMOGLOBINOPATIA S. Publicações técnicas do Centro de Estudos, Treinamento e Aperfeiçoamento da Secretaria de Saúde da Guanabara, 1970, 93 págs.

- 82) MAYNARD, C.D.:

CLINICAL NUCLEAR MEDICINE, Lea & Febiger, 1a. edição, Filadelfia, 1971, 280 págs.

- 83) Mc RAE, J.; SUGAR, R.M.; SHIPLEY, B. e HOOK, G.R.:

Alterations in tissue distribution of 99mTc-pertechnetate in rats given stannous tin. *J.NUCL.MED.*, 15: 151 - 155, 1974.

- 84) MEDEIROS, M.F.; PELLEGRINI, P.M.; SILVA, A.; BARBOSA, D.; FERREIRA, R.P. e LEITE, A.P.:

Distribuição do Cr-51 após administração de hemácias mar

cadaver com $^{51}\text{Cr}-(+6)$ e plasma $^{51}\text{Cr}(+3)$. RELATÓRIO APRESENTADO À CNEN, 1974.

- 85) MITA, A.E.A.; NOTO, L.M. e SUAREZ, L.A.H.F.:
 MANUAL DE CONTROLES RADIOFARMACÊUTICOS, Alasbin, 2a. edição,
 Buenos Aires, 1981, 89 págs.
- 86) MOLLISON, P.L.:
 Farther observations on the survival curve of Cr-51
 labeled red cells. CLIN.SCIENCE, 21: 21, 1961.
- 87) MOLLISON, P.L.:
 BLOOD TRANSFUSION IN CLINICAL MEDICINE. Blackwells Scient.
 Publ. 5a. edição, Filadelfia, 1972, 830 págs.
- 88) MOLLISON, P.L. e VEALL, N.:
 The use of isotopic chromium-51 as a label for red cells.
 BRIT. J. HAEMAT., 1: 62, 1955.
- 89) NAEJAN, Y. e CACCHIONE, R.:
 Blood volume in health and disease. CLIN. HEMATOLOGY, 6:
 543-566, 1977.
- 90) NOUËL, J.P. e BRUNELLE, P.:
 Le marquage des Hématies par le Technétium 99m. Son
 intérêt en clinique. PRESSE MED, 78: 73-74, 1970.
- 91) OTTO, R.:
 Discussion of Scintigraphy of the placenta with Tc-99m-
 labeled erythrocytes. IAEA SYMP.MEDICAL RADIOISOTOPE
 SCINTIGRAPHY, SALZBURG, 1958. SM/40 pág. 672-673.
- 92) PALEK, J. e LIN, S.C.:
 Dependence of spectrin organization in red blood cells
 membranes of cell metabolism: Implications for controle
 of red cell shape, deformability, and surface area.

SEMINARS IN HEMATOLOGY, 16: 75-93, 1979.

- 93) PATEL, M.C.; PARAB, P.B.; SAMUEL, A.M. e GANATRA, R.D.:
Labeling of red blood cells with Tc-99m after oral administration of SnCl₂: concise communication. *J.NUCL. MED.*, 20: 87-881, 1979.
- 94) PAVEL, D.G.; SIMMER, A.M. e PATTERSON, V.N.:
In vivo labeling of red blood cells with ^{99m}Tc: A new approach of blood pool visualization. *J.NUCL.MED.*, 18: 305-308, 1977.
- 95) PEARSON, H.A.:
The binding of Cr⁵¹ to hemoglobin I. In vitro studies. *BLOOD*, 22: 218-230, 1963.
- 96) PEARSON, H.A.:
The binding of Cr-51 to hemoglobins. In vivo elution rates of Cr-51 from Hb CC, HbCS, and placental red cells. *BLOOD*, 28: 563-568, 1966.
- 97) PEARSON, H.A.; JOHNSON, D.; SMITH, K.A. e TOULOUKIAN, R.J.:
The born again spleen, return of splenic function after splenectomy for trauma. *N.ENG.J.MED.*, 298: 1389-1392, 1978.
- 98) PEARSON, H.A. e VERTREES, K.M.:
Site of binding of chromium-51 to haemoglobin. *NATURE*, 189: 1019-1020, 1961.
- 99) PEARSON, H.A.; VAN METRE, M.T. e VERTREES, K.M.:
Gross structure of maemoglobin A₃ and the nature of its binding to chromium-51. *NATURE*, 197: 472-473, 1963.
- 100) PEARSON, H.A.; SPENCER, R.P. e CORNELIUS, E.A.C.:
Functional asplenia in sickle-cell anemia. *N.ENGL.J.MED.*, 261: 923-926, 1969.

- 101) PETERS, A.M.; RYAN, P.F.I.; KLONIZAKIS, I.; ELKON, K.B.;
LEWIS, S.M. e HUGHES, G.R.V.:
Measurement of splenic function in humans using heat
damaged autologous red blood cells. *SCAND. J.HAEMATOL.*,
27: 374-380, 1981.
- 102) PETERS, A.M.; RYAN, P.F.J.; KLONIZAKIS, I.; ELKON, B.B.;
LEWIS, S.M. e HUGHES, G.R.V.:
Analysis of heat-damaged erythrocytes clearance curves.
BRIT. J. HAEMAT., 49: 581-586, 1981.
- 103) PETERS, A.M.; RYAN, P.F.J.; KLONIZAKIS, I.; ELKON, K.B.;
LEWIS, S.M.; HUGHES, G.R.V e LAVANDER, J.P.:
Kinetics of heat damaged autologous red blood cells :
mechanism of clearance from blood. *SCAND.J.HAEMATOL.*, 28:
5-14, 1982.
- 104) PETTIT, J.E.:
Spleen function. *CLIN.HAEMAT.*, 6: 639-656, 1977.
- 105) PIEPZ, A.; VIART, P.; SZYMUSICK, B. e JECHERS, O.:
A real clinical indication for selective spleen
scintigraphy with ^{99m}Tc -labeled red blood cells.
RADIOLOGY, 123: 307-308, 1977.
- 106) PILBROW, W.J.:
The urinary tract image obtained during ^{99m}Tc bone
scanning. *CLIN.RADIOL.*, 30: 71-77, 1979.
- 107) POLLYCOVE, M. e TONO, M.:
Studies of the Erythron. *SEMIN. NUCL. MED.*, 5: 11-61, 1975.
- 108) PORTER, W.C.; DWORKIN, H.J. e GUTKOWSKI, R.F.:
The effect of carrier technetium in preparation of
 ^{99m}Tc -human serum albumin. *J.NUCL.MED.*, 17: 704-706, 1976.

- 109) RAMCHANDRAN, T.; MARGOULEFF, F. e ATKINS, H.:
Spleen scanning in humans with Tc-99m-labeled erythrocytes:
concise communication. *J.NUCL.MED.*, 21: 13, 1968.
- 110) REHANI, K.M. e SHARMA, S.K.:
Site of Tc-99m binding to the red blood cell: concise
communication. *J.NUCL.MED.*, 21: 676-678, 1980.
- 111) RIORDAN, F. e NELP, W.B.:
Binding capacity of normal and sickle cell hemoglobin
for Tc atoms. *J.NUCL.MED.*, 23: P 91, 1982.
- 112) RYO, U.Y.; LEE, J.I.; ZARNOW, H.; SCHWARTZ, M.P. e PINSKY,
S.:
Radionuclide angiography with ^{99m}Tc-labeled red blood
cells for the detection of aortic aneurysm. *J.NUCL.MED.*,
15:1014-1017, 1974.
- 113) RYO, U.Y.; MOHAMMADZADEH, A.A.; SIDDIQUI, A.; COLLOMBETTI,
L.G. e PINSKY, S.M.:
Evaluation of labeling procedures an in vivo stability
of Tc-99m red blood cells. *J.NUCL.MED.*, 17: 133, 1976 .
- 114) SCHMIDT, P.; LOHRMANN, H.P. e HEIMPEL, H.:
Sodium pertechnetate as a red cell label: In vitro and
in vivo studies. *BRIT.J.HAEMAT.*, 32: 411-420, 1976.
- 115) SCHWARTZ, K.D. e KRÜGER, M.:
Improvement in labeling erythrocytes with Tc-99m -
pertechnetate. *J.NUCL.MED.*, 12: 333-334, 1971.
- 116) SHARMA, S.M.; PATEL, M.C.; RAMANATHAN, P.; GANATRA, R.D. e
BLAU, M.:
A new technique to denature red cells for spleen scanning
J.NUCL.MED., 11: 228-232, 1970.

- 117) SHIRKHODA, A.; Mc CARTNEY, W.H.; STAAB, E.V.; e MITTELSTAEDT, C.A.:
Imaging of the spleen: A proposed algorithm. *AM.J.RAD10L.*, 135: 195-198, 1980.
- 118) SIEMSEN, J.K.:
Scintigraphic diagnosis of splenic injuries. *THE ENST.J. MED.*, 123: 390-391, 1975.
- 119) SIGEL, R.M.; BECKER, D.V. e HURLEY, J.R.:
Evaluation of spleen size during routine liver imaging with Tc-99m and the scintillation camera. *J.NUCL.MED.*, 11: 689, 1970.
- 120) SINGH, P.M.; REHANI, M.M. e DEVI, P.K.:
Placental localization with Tc-99m labeled red blood cells. *NUCL.MED.*, 19: (1): 19-21, 1980.
- 121) SMITH, P.H.S.:
Tc-99m labeled erythrocytes for spleen scanning. *INT.J. APPL. RAD. ISOT.*, 25: 137-138, 1974.
- 122) SMITH, R.W. e SELBY, J.B.:
Scintiangiographic diagnosis of acute mesenteric venous thrombosis. *AMER.ROENT.RAY.SOC.*, 132: 67-69, 1979.
- 123) SMITH, T.D. e RICHARDS, P.:
A simple kit for the preparation of Tc-99m labeled red blood cells. *J.NUCL.MED.* 17: 126-132, 1976.
- 124) SMITH, T.D.; STEIMERS, J.R. e RICHARDS, P.:
Chemical effect of Tc-99m labeled radiopharmaceuticals. *J.NUCL.MED.*, 16: 570-571, 1975.
- 125) SPENCER, R.P.:
The small spleen: a study of etiology and pathogenesis. *J.NUCL.MED.*, 14: 571, 1975.

126) SPENCER, P.P.:

Role of radiolabeled erythrocytes in evaluation of splenic function. *J.NUCL.MED.*, 21: 489-491, 1980.

127) STEIGMAN, J. e RICHARDS, P.:

Chemistry of Technetium 99m. *SEMINARS NUCL.MED.*, 4: 269-273, 1974.

128) SUBRAMANIAN, G. e McAFEE, H.G.:

New developments in radiopharmaceuticals for imaging. *PROC.INT.SYMP.MED.RAD.IMAG.*, 1: 329-451, 1980. IAEA-SM-247/205. Heidelberg, Germany.

129) SUBRAMANIA, G.; McAFEE, J.G.; BLAIR, R.J. e THOMAS, F.D.:

An evaluation of Tc-99m labeled phosphate compounds as bone imaging agents. In: *RADIOPHARMACEUTICALS*. Subramania, G.; Rhodes, B.A.; Cooper, J.F.; Sodd, V.J., (Ed.), ... Society of Nuclear Medicine, N. York (EUA), 1975, págs. 319 a 342.

130) THOMPSON, S.; NEWMAN, P. e MADDY, A.H.:

An examination of the labeling of intact human erythrocytes with ^{99m}Tc . *BRIT.J.HAEMAT.*, 49: 575-580, 1981.

131) TRFALL, J.H.; FREITAS, J.E.; SWANSON, D.; ROGERS, W.L. ; CLARE, J.M.; BROWN, M.L. e PITT, B.:

Clinical comparison of cardiac blood pool visualization with technetium-99m red blood cells labeled in vivo and with technetium-99m human serum albumin. *J.NUCL.MED.*, 19 : 796-803, 1978.

132) UCHIDA, T.; NEMOTO, T.; YUI, T.; MATSUDA, S. e KARIONE, S.:

Use of technetium-99m as a radioactive label to study migratory patterns of leukocytes. *J.NUCL.MED.*, 20: 1197-1200, 1979.

- 133) UPTON, M.T.; RERYCH, S.K.; NEWMAN, G.E.; BOYNOUS, E.P.; e
JONES, R.H.:
The reproducibility of radionuclide angiographic measurement
of left ventricular function in normal subjects at rest
and during exercise. *CIRCULATION*, 62: 126-132, 1980.
- 134) VYTE, A. e RAAM, C.F.M.:
Labeling of red blood cells with Tc-99m-pertechnetate.
PHARMACEUTISCH WEEKBLAD, 113: 1119-1122, 1978.
- 135) WAGNER, H.N.; McAFEE, J.G. e WINKELMAN, J.W.:
Splenic disease diagnosis by radioisotope scanning.
ARCH. INTERN. MED., 109: 673-684, 1962.
- 136) WAGNER, H.N.; RAZZAK, M.A.; GAERTNER, R.A.; CAINE, W.P. e
FEARIN, O.T.:
Removal of erythrocytes from the circulation. *ARCH. INT.
MED.*, 110: 128-135, 1962.
- 137) WANG, Y.; WESTERMAN, M.P. e HEINLE, E.W.:
Spleen-function study with 1-Mercury-2-hydroxypropane
labeled with mercury 197. *JAMA*, 194: 1254-1256, 1965 .
- 138) WELCH, T.J.C.; POTCHEN, E.J. e WELCH, M.J.L.:
FUNDAMENTALS OF THE TRACER METHOD. W.B. Saunders Company ,
2a. edição, Filadelfia, 1972, 187 págs.
- 139) WILLIAMS, B.D.; RUSSEL, B.A.; LOCKWOOD, C.M. et alii:
Defective reticulo endothelial system function in
rheumatoid arthritis. *LANCET*, 1: 1311-1314, 1979.
- 140) WILSON, M.A. e KAHN, D.R.:
Scintigraphic Assessment of heterotopic cardiac
transplants. *AMER. J. ROENTGEN.*, 137: 689-693, 1981.

- 141) WINKELMAN, J.W.; WAGNER, H.N.; McAFEE, J. e MOZLEY, J.M.:
Visualization of the spleen in man by radioisotope
scanning. *RADIOLOGY*, 75: 465-466, 1960.
- 142) WINTROBE, M.M.; LEE, G.R.; BOGGS, D.R.; BITHELL, T.C.;
ATHENS, J.W. e FERSTER, J.:
CLINICAL HEMATOLOGY, Lea & Febiger, 7a. edição, Filadel-
fia, 1974, 1896 págs.
- 143) ZEISS, R.; DIELMAN, R. e HUBER, S.:
Alteration of Tc-99m red blood cells. *J.NUCL.MED.*, 13:
399-400, 1972.
-