

Universidade de Lisboa

FACULDADE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**DESENVOLVIMENTO DE RADIOFÁRMACO PARA
ESTUDO NÃO INVASIVO DO TRÂNSITO INTESTINAL**

Filipa Maria da Costa Coutinho de Lucena

Mestrado em Química Inorgânica Biomédica – Aplicações em Diagnóstico e Terapia

2009

Universidade de Lisboa

FACULDADE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**DESENVOLVIMENTO DE RADIOFÁRMACO PARA
ESTUDO NÃO INVASIVO DO TRÂNSITO INTESTINAL**

Filipa Maria da Costa Coutinho de Lucena

Mestrado em Química Inorgânica Biomédica – Aplicações em Diagnóstico e Terapia

Dissertação orientada pela Doutora Maria de Lurdes Gano

2009

Esta tese foi realizada no âmbito do Mestrado em Química Inorgânica Biomédica: Aplicações em Diagnóstico e Terapia, organizado pela Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, em colaboração com o Instituto Tecnológico e Nuclear. Este Mestrado foi aprovado por deliberação n.º 723/2004, publicada em Diário da República, II Série, n.º123 de Maio de 2004. O trabalho apresentado foi proposto pela Dra. Ana Isabel Santos (MD), tendo sido realizado sob a sua orientação na componente clínica, em conjunto com a Doutora Maria de Lurdes Gano, na componente de síntese dos radiofármacos e a Prof. Doutora Filomena Botelho, na componente de dosimetria interna em modelo animal.

Agradecimentos

Ao Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas do Instituto Tecnológico e Nuclear, na pessoa da Doutora Isabel Santos, pelo apoio e disponibilidade das instalações e material, sem o qual não teria sido possível a realização deste trabalho.

Ao Instituto de Biofísica e Biomatemática do IBILI, na pessoa da Prof. Doutora Filomena Botelho, por toda a disponibilidade de recursos, físicos e materiais que possibilitaram a realização dos estudos *in vivo*. Pelo acolhimento, disponibilidade e incentivo de todos os elementos. Muito obrigada!

Aos Serviços Farmacêuticos do Hospital Garcia de Orta, pela cedência da goma de alfarroba.

À Dra. Ana Isabel Santos, orientadora da dissertação, pelo acompanhamento ao longo destes anos, pela ajuda e incentivo.

À Doutora Lurdes Gano, orientadora da dissertação, um sincero agradecimento por acreditar e confiar, pelo apoio incansável e compreensão. Pela amizade.

À Margarida por toda a ajuda, esclarecimentos e apoio.

Às minhas colegas da ESTeSL, Margarida R, Margarida E, Eva, Tânia e M^a João, por todo o incentivo, por me escutarem e apoiarem nos momentos mais difíceis.

À Lina, por acreditar, encorajar e motivar. Pelo exemplo.

Ao Gonçalo, por me aturar ao longo de tantos anos, pelas discussões, ideias e esclarecimentos, pela amizade....

Aos meus pais, sogros, mana e Nuno pelo apoio, paciência e compreensão.

Ao Bruno, por todo o amor, apoio e compreensão em todos os momentos desde há tantos anos....

Ao Pedro e ao Francisco, por serem a minha alegria quando nada parecia resolver-se. Pelos beijinhos e xi-corações....

I. Resumo

No âmbito das patologias gastrointestinais, a Medicina Nuclear contribui com técnicas que permitem estudar, de um modo relativamente não invasivo, alterações da motilidade, nomeadamente o trânsito do cólon, com aplicação clínica em casos de obstipação. A ausência de um radiofármaco de referência torna esta técnica pouco implementada na prática clínica e dificulta a comparação dos resultados de diferentes centros, sendo os valores de sensibilidade e especificidade existentes limitados. A goma de alfarroba (LBG-locust bean gum) e o quitosano são polissacáridos que têm demonstrado ao longo dos anos potencial para diversas aplicações clínicas em imagem médica e, este último, especificamente na Medicina Nuclear.

Com o objectivo de desenvolver um radiofármaco de ^{99m}Tc , que apresente potencial aplicação clínica nos estudos do trânsito do cólon, foram realizados estudos *in vitro* para optimização das condições experimentais de síntese e avaliação da estabilidade radioquímica de dois complexos de ^{99m}Tc , com goma de alfarroba (LBG- ^{99m}Tc) e com quitosano (quitosano- ^{99m}Tc) e estudos em modelo animal (ratinho) para avaliação do comportamento biológico *in vivo* e determinação da respectiva dosimetria interna.

Ao longo da tese serão descritos os procedimentos experimentais realizados e que conduziram à obtenção dos seguintes resultados: após a síntese dos complexos e formulação sob a forma de kit, a avaliação da estabilidade *in vitro* apresentou resultados de pureza radioquímica superiores a 90% para a LBG- ^{99m}Tc e para o quitosano- ^{99m}Tc . Os resultados da biodistribuição e as imagens adquiridas em câmara-gama demonstram a progressão do radiofármaco no tubo digestivo ao longo das 24 horas estudadas, validando a hipótese de que os complexos de ^{99m}Tc sintetizado a partir da LBG e do quitosano se mantêm no intestino até serem eliminados por via fecal, não sendo digeridos e/ou absorvidos ao longo do seu percurso. Os órgãos com maior actividade foram o intestino grosso [LBG- ^{99m}Tc : 33,7% (24h); quitosano- ^{99m}Tc : 8,2% (12h)] e o intestino delgado [LBG- ^{99m}Tc : 8,1% (24h); quitosano- ^{99m}Tc 3,9% (24h)], com excreção renal e hepato-biliar desprezível. A estimativa da dose total efectiva é de 0,037mSv/MBq para a LBG- ^{99m}Tc e de 0,095mSv/MBq para o quitosano- ^{99m}Tc , sendo bastante favorável, em comparação com outros radiofármacos utilizados actualmente na cintigrafia do trânsito do cólon.

Os resultados sugerem que a LBG- ^{99m}Tc e o quitosano- ^{99m}Tc , quando preparados a partir de soluções congeladas e liofilizadas respectivamente, apresentam características favoráveis para possível aplicação clínica no estudo cintigráfico do trânsito do cólon.

II. Índice

I. Resumo	7
II. Índice	8
III. Índice de Tabelas	11
IV. Índice de Ilustrações	12
V. Lista de Abreviaturas e Acrónimos	15
VI. Âmbito e Objectivo do trabalho	16
VII. Introdução	18
1. <i>Obstipação</i>	18
1.1. <i>Definição</i>	18
1.2. <i>Anatomia e fisiologia do intestino grosso</i>	19
1.3. <i>Etiologia e Patofisiologia</i>	25
1.4. <i>Diagnóstico</i>	27
1.5. <i>Tratamento</i>	31
2. <i>Cintigrafia de trânsito do cólon</i>	33
2.1. <i>Radiofármacos para estudo do trânsito intestinal: Estado-da-arte</i>	34
2.2. <i>Protocolo Técnico</i>	38
2.2.1. <i>Aquisição de imagens</i>	38
2.2.2. <i>Processamento das imagens</i>	40
2.2.3. <i>Avaliação dos dados obtidos</i>	44
3. <i>Polissacáridos</i>	46
3.1. <i>Goma de alfarroba</i>	47
3.2. <i>Quitossano</i>	50
3.3. <i>Marcação de polissacáridos com radionuclídeos</i>	52
3.3.1. <i>Química do Tecnécio relevante para síntese de radiofármacos-^{99m}Tc</i>	53
4. <i>Dosimetria</i>	56
4.1. <i>Sistemas Dosimétricos</i>	59
4.1.1. <i>The International Commission on Radiological Protection</i>	59
4.1.2. <i>O método MIRD</i>	59
4.1.3. <i>RADIATION DOSE ASSESSMENT RESOURCE (RADAR)</i>	62
4.2. <i>Dosimetria em modelo animal</i>	63
VIII. Resultados e Discussão	64
1. <i>Estudo da solubilidade da LBG em solução aquosa</i>	65

2.	<i>Síntese do complexo LBG-^{99m}Tc</i>	66
2.1.	<i>Optimização da quantidade de cloreto estanoso</i>	66
2.2.	<i>Optimização do volume de ^{99m}Tc</i>	68
2.3.	<i>Efeito da variação do pH na marcação da LBG com ^{99m}Tc</i>	69
2.4.	<i>Estabilidade in vitro da LBG-^{99m}Tc após diluição</i>	70
2.5.	<i>Estabilidade da preparação após variação da temperatura</i>	71
2.6.	<i>Síntese do complexo quitosano-^{99m}Tc</i>	71
3.	<i>Formulação sob a forma de kit</i>	74
3.1.	<i>Preparação das soluções para a formulação final</i>	74
3.2.	<i>Síntese do complexo LBG-^{99m}Tc a partir de kits congelados e liofilizados</i>	75
3.3.	<i>Síntese do complexo quitosano-^{99m}Tc a partir de kits congelados e liofilizados</i>	77
3.4.	<i>Estabilidade in vitro das preparações após marcação com ^{99m}Tc</i>	78
3.4.1.	<i>Estudo do efeito da diluição</i>	78
3.4.2.	<i>Estudo da variação do pH</i>	81
3.4.3.	<i>Estudo da integridade da preparação ao longo do tempo</i>	83
4.	<i>Estudos in vivo</i>	88
4.1.	<i>Biodistribuição em Animais Saudáveis</i>	88
4.2.	<i>Imagiologia com LBG-^{99m}Tc e quitosano-^{99m}Tc</i>	94
4.3.	<i>Estudo dosimétrico em ratinho</i>	100
IX.	Conclusão	103
X.	Procedimento Experimental	105
1.	<i>Materiais</i>	105
2.	<i>Procedimentos gerais</i>	106
3.	<i>Estudo da solubilidade da LBG em solução aquosa</i>	107
4.	<i>Síntese do complexo LBG-^{99m}Tc</i>	109
4.1.	<i>Optimização da concentração de LBG na solução</i>	109
4.2.	<i>Optimização da concentração de cloreto estanoso</i>	109
4.3.	<i>Optimização do volume de ^{99m}Tc</i>	110
4.4.	<i>Efeito do pH na marcação da LBG com ^{99m}Tc</i>	110
4.5.	<i>Estabilidade in vitro da LBG-^{99m}Tc após diluição</i>	111
4.6.	<i>Estabilidade in vitro da LBG-^{99m}Tc após variação da temperatura</i>	111
5.	<i>Síntese do complexo quitosano-^{99m}Tc</i>	112
6.	<i>Formulação sob a forma de kit</i>	113
6.1.	<i>Preparação das soluções para a formulação final</i>	113

6.1.1.	<i>Preparação da solução de SnCl₂.2H₂O</i>	113
6.1.2.	<i>Preparação e fracionamento da solução-mãe de LBG</i>	113
6.1.3.	<i>Preparação e fracionamento da solução-mãe de quitosano</i>	114
6.2.	<i>Síntese dos complexos LBG-^{99m}Tc e quitosano-^{99m}Tc a partir de kits congelados</i>	114
6.3.	<i>Síntese dos complexos LBG-^{99m}Tc e quitosano-^{99m}Tc a partir de kits liofilizados</i>	114
6.4.	<i>Estabilidade in vitro das preparações após marcação com ^{99m}Tc</i>	115
6.4.1.	<i>Estudo do efeito da diluição</i>	115
6.4.2.	<i>Estudo da variação do pH</i>	115
6.4.3.	<i>Estudo da integridade da preparação ao longo do tempo</i>	116
7.	<i>Controlo da Qualidade da LBG-^{99m}Tc e do quitosano-^{99m}Tc</i>	117
8.	<i>Estudos in vivo</i>	120
8.1.	<i>Biodistribuição em Animais Saudáveis</i>	120
8.2.	<i>Imagiologia com LBG-^{99m}Tc e quitosano-^{99m}Tc</i>	121
8.3.	<i>Estudo dosimétrico em ratinho</i>	122
XI.	<i>Bibliografia</i>	124
XII.	<i>Anexos</i>	130
1.	<i>Resultados dos estudos de biodistribuição do LBG-^{99m}Tc em ratinho em percentagem da dose administrada (%DA)</i>	130
2.	<i>Resultados dos estudos de biodistribuição do quitosano-^{99m}Tc em ratinho em percentagem da dose administrada (%DA)</i>	131
3.	<i>Resultados do processamento da imagem do intestino adquiridas após administração de LBG-^{99m}Tc em ratinho (percentagem contagens médias).</i>	132
4.	<i>Resultados do processamento da imagem do intestino adquiridas após administração de quitosano-^{99m}Tc em ratinho (percentagem contagens médias).</i>	132

III. Índice de Tabelas

Tabela 1 - Critérios diagnósticos de Roma II para obstipação (adaptado de Lundin, 2005, McLean, 2006 e Thompson, 1999).....	19
Tabela 2 – Causas extracolónicas de obstipação (Adaptado de Lundin, 2005; WGO, 2006; McLean, 2006).....	27
Tabela 3 - Escala de fezes de Bristol. Sistema de classificação da forma das fezes humanas em sete grupos, com base no aspecto visual (Adaptado de Heaton e Lewis, 1997).....	29
Tabela 4 – Dados dosimétricos relativos aos vários radiofármacos utilizados na cintigrafia de trânsito do cólon.....	38
Tabela 5 - Padrões do trânsito do cólon (Adaptado de Notghi et al. 1994).....	43
Tabela 6 – Factores de ponderação da radiação (Adaptado de Stabin, 2008).....	57
Tabela 7 – Factores de ponderação Recomendados pelo ICRP para o cálculo da Dose Efectiva (E) (Adaptado de Stabin, 2008).	58
Tabela 8 – Quantidades utilizadas na optimização da concentração de LBG.....	109
Tabela 9 – Quantidades utilizadas na optimização da quantidade de SnCl ₂	110
Tabela 10 - Pureza radioquímica da LBG- ^{99m} Tc (%) em função da concentração de SnCl ₂ (mmol/ml). Valores médios e aos 60 minutos.....	67
Tabela 11 - Pureza radioquímica da LBG- ^{99m} Tc (%) em função do valor de pH a que ocorre a reacção de marcação (Média ± desvio padrão)	69
Tabela 12 - Pureza radioquímica (%) da solução-mãe de LBG com ^{99m} Tc, em função do tempo.....	74
Tabela 13 - Pureza radioquímica (%) da solução-mãe de quitosano com ^{99m} Tc em função do tempo.....	75
Tabela 14 – Excreção da LBG- ^{99m} Tc através da urina e da bÍlis em função do tempo. Valores em percentagem de dose de LBG- ^{99m} Tc administrada por grama de fluÍdo.	91
Tabela 15 – Dose absorvida total e por Órgão após administração de LBG- ^{99m} Tc. Valores de dose equivalente e dose efectiva em mSv/MBq.	100
Tabela 16 – Dose absorvida total e por Órgão após administração de quitosano- ^{99m} Tc. Valores de dose equivalente e dose efectiva em mSv/MBq.	101

IV. Índice de Ilustrações

<i>Figura 1 – Representação esquemática das quatro camadas histológicas principais do tubo digestivo (Current Medicine, 2007)</i>	<i>21</i>
<i>Figura 2 – Representação esquemática da enervação do intestino (Thurnbull, 1994).....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 3 - Algoritmo diagnóstico de obstipação refractária (AGA, 2000).....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 4 – Delimitação dos sete segmentos intestinais através de ROIs, no processamento da cintigrafia de trânsito do cólon (Freedman et al., 2006).....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 5 – Delimitação das ROIs no processamento da cintigrafia de trânsito do cólon, nos casos de sobreposição dos ângulos e dos segmentos intestinais. (Freedman et al., 2006)</i>	<i>41</i>
<i>Figura 6 - Imagem paramétrica de atraso do trânsito ao nível do cólon direito. Pode ser observado o movimento lento ao longo do cólon ascendente, ângulo hepático e cólon transversal por um período de aproximadamente 100 h (Freedman et al., 2006).</i>	<i>43</i>
<i>Figura 7 - Estrutura básica da celulose, mostrando a ligação entre β-glicose (Rinaudo, 2004).....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 8 - Estrutura básica da amilopectina, mostrando a ramificação do polímero (Rinaudo, 2004).....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 9 - Estrutura Molecular da LBG (Rizzo et al., 2004)</i>	<i>48</i>
<i>Figura 10 - Estrutura molecular do quitosano (Felt et al, 1998).....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 11 - Estrutura química do glucoheptonato-^{99m}Tc proposta por De Kievet em 1981</i>	<i>55</i>
<i>Figura 12 - Pureza radioquímica da LBG-^{99m}Tc (%) ao longo do tempo em função da concentração de SnCl₂ (mmol/ml). Média e desvio padrão dos resultados obtidos para cada tempo estudado.....</i>	<i>67</i>
<i>Figura 13 - Pureza radioquímica da LBG-^{99m}Tc (%) ao longo do tempo após marcação com 0,3 ml e 0,5 ml de ^{99m}Tc</i>	<i>68</i>
<i>Figura 14 - Pureza radioquímica da ^{99m}Tc -LBG (%) com volume da solução = 1 ml e após diluição para o volume de 10 ml.....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 15 – Cromatogramas referentes à estabilidade da LBG-^{99m}Tc após variação da temperatura.</i>	<i>71</i>
<i>Figura 16 - Pureza radioquímica do quitosano-^{99m}Tc (%) ao longo do tempo em função da concentração de SnCl₂ (mmol/ml) e média dos resultados.</i>	<i>72</i>
<i>Figura 17- Pureza radioquímica (%) em função do tempo e média global, da LBG-^{99m}Tc preparada a partir da solução-mãe congelada e liofilizada.....</i>	<i>76</i>

<i>Figura 18 - Pureza radioquímica (%) em função do tempo e média global, do quitosano-^{99m}Tc preparado a partir da solução-mãe congelada e liofilizada.....</i>	<i>77</i>
<i>Figura 19 - Pureza radioquímica em função do tempo, da LBG-^{99m}Tc (%) preparada a partir da solução-mãe congelada, no volume de marcação de 1 ml e após diluição para 5 e 10 ml. ...</i>	<i>78</i>
<i>Figura 20 - Valor médio global da pureza radioquímica da LBG-^{99m}Tc (%) preparada a partir da solução-mãe congelada, no volume de marcação de 1 ml e após diluição para 5 e 10 ml. ...</i>	<i>79</i>
<i>Figura 21 - Pureza radioquímica em função do tempo, do quitosano-^{99m}Tc (%) preparado a partir da solução-mãe liofilizada, no volume de marcação de 1 ml e após diluição para 5 e 10 ml.....</i>	<i>80</i>
<i>Figura 22 - Pureza radioquímica do quitosano-^{99m}Tc (%) preparado a partir da solução-mãe congelada e liofilizada, no volume de marcação de 1 ml e após diluição para 5 e 10 ml (Média + desvio padrão).....</i>	<i>80</i>
<i>Figura 23 - Valor médio global da pureza radioquímica da LBG-^{99m}Tc (%) preparada a partir da solução-mãe congelada após variação do pH.....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 24 - Pureza radioquímica do quitosano-^{99m}Tc (%) preparado a partir da solução-mãe congelada e liofilizada, em função do pH.....</i>	<i>82</i>
<i>Figura 25 - Pureza radioquímica da LBG-^{99m}Tc (%) preparada a partir da solução-mãe, após vários dias de congelação. (Média + desvio padrão e dados ao longo do tempo).....</i>	<i>83</i>
<i>Figura 26 - Pureza radioquímica do quitosano-^{99m}Tc (%) preparado a partir da solução-mãe, vários dias após a liofilização.</i>	<i>84</i>
<i>Figura 27 - Avaliação da integridade do quitosano-^{99m}Tc preparado a partir da solução-mãe congelada (dias de armazenagem). Pureza radioquímica (%) ao longo do tempo.....</i>	<i>86</i>
<i>Figura 28 - Pureza radioquímica do quitosano-^{99m}Tc (%) preparado a partir da solução-mãe, após vários dias de congelamento.</i>	<i>86</i>
<i>Figura 29 - Biodistribuição em % dose administrada de LBG-^{99m}Tc em ratinhos Balb/c nu/nu</i>	<i>89</i>
<i>Figura 30 – Percentagem da actividade de LBG-^{99m}Tc administrada ao longo do tempo no intestino. Parede dos vários segmentos (duodeno, restante intestino delgado e intestino grosso) e respectivo conteúdo.....</i>	<i>90</i>
<i>Figura 31 – Progressão da LBG-^{99m}Tc ao longo do intestino. Percentagem da actividade administrada ao longo do tempo nos segmentos intestinais totais.</i>	<i>90</i>
<i>Figura 32 – Perfil de captação, retenção e excreção da LBG-^{99m}Tc nas principais vias de excreção: renal (esquerda) e hepato-biliar (direita). Valores em percentagem de LBG-^{99m}Tc administrada.</i>	<i>91</i>

<i>Figura 33 – Biodistribuição em % de dose de quitosano-^{99m}Tc administrada em ratinhos Balb/c nu/nu</i>	<i>92</i>
<i>Figura 34 – Percentagem da actividade de quitosano-^{99m}Tc administrado ao longo do tempo nos vários segmentos intestinais.....</i>	<i>93</i>
<i>Figura 35 – Percentagem da actividade de quitosano-^{99m}Tc administrado ao longo do tempo nos vários segmentos intestinais totais.....</i>	<i>93</i>
<i>Figura 36 – Perfil de captação, retenção e excreção do quitosano-^{99m}Tc nas principais vias de excreção: renal (esquerda) e hepato-biliar (direita). Valores em percentagem de quitosano-^{99m}Tc administrado.</i>	<i>94</i>
<i>Figura 37 – Imagens obtidas através da câmara-gama do ratinho 3, administrado com LBG-^{99m}Tc.....</i>	<i>95</i>
<i>Figura 38 – Imagens obtidas através da câmara-gama do ratinho 8, administrado com quitosano-^{99m}Tc.....</i>	<i>96</i>
<i>Figura 39 – Exemplo das imagens do intestino após administração da LBG-^{99m}Tc adquiridas e do processamento realizado.....</i>	<i>96</i>
<i>Figura 40 – Exemplo das imagens do intestino adquiridas após administração do quitosano-^{99m}Tc e do processamento realizado.....</i>	<i>97</i>
<i>Figura 41 – Gráfico paramétrico do trânsito intestinal da LBG-^{99m}Tc (% contagens médias) obtida a partir das imagens do intestino.....</i>	<i>98</i>
<i>Figura 42 – Imagem paramétrica do trânsito intestinal do quitosano-^{99m}Tc (% contagens médias) obtida a partir das imagens do intestino.....</i>	<i>98</i>

V. Lista de Abreviaturas e Acrónimos

CPM – Contagens por minuto

D – Dose absorvida

DTPA – Ácido dietilenotriamina pentaacético

E – Dose efectiva

Gy – Gray

H – Dose equivalente

IBILI –

ICRP – International Commission of Radiological Protection

ITLC/SG – Instant Thin Layer Chromatography / Sílica Gel

ITN – Instituto Tecnológico e Nuclear

LEGP – Low Energy General Purpose

LEHR – Low Energy High Resolution

MEGP – Medium Energy General Purpose

MEK - Metiletilcetona

MI – Movimentos Intestinais

Min - Minuto

MIRD – Medical Internal Radiation Dose

ml - Mililitro

OLINDA/EXM – Organ Level Internal Dose Assessment / EXponential Modeling

RADAR – Radiation Dose Assessment Resource

ROI – Region of Interest

SNC – Sistema Nervoso Central

SNM – Society of Nuclear Medicine

SV – Sievert

WR – Radiation weighting factor

WT – Tissue weighting factor

μl - Microlitro

VI. Âmbito e Objectivo do trabalho

No âmbito da investigação do tubo digestivo a Medicina Nuclear contribui com técnicas que permitem estudar alterações da motilidade gastrointestinal (Grybäck et al., 2002), avaliando o tempo de trânsito de compostos ou refeições fisiológicas que possuem na sua composição radionuclídeos (Stanghellini et al., 2000). Uma das possíveis aplicações clínicas surge nos casos de obstipação, onde a cintigrafia de trânsito do cólon auxilia o diagnóstico diferencial e permite uma avaliação da terapêutica a implementar/implementada. Os radiofármacos actualmente utilizados nesta indicação clínica apresentam algumas limitações como radiofármacos ideais, devido à possibilidade de dispersão ao longo do tubo digestivo, à dose de radiação recebida pelos órgãos alvo e à sua disponibilidade. Consequentemente, o desenvolvimento de novos complexos de ^{99m}Tc com características adequadas para a função em estudo e de fácil acesso apresenta-se como um desafio neste campo.

A goma de alfarroba (LBG-locust bean gum) é um polissacárido que tem sido utilizado no Hospital Garcia de Orta como agente de contraste oral no estudo da patologia do intestino delgado por Tomografia Computorizada. No Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas do ITN têm sido igualmente estudados derivados do quitosano, de modo a potenciar as suas propriedades selectivas e quelantes (Marques et al., 2008) na marcação deste composto com radionuclídeos. Nesta sequência surge o trabalho apresentado na presente tese, realizado no Instituto Tecnológico e Nuclear (ITN), em Sacavém e no Instituto de Biofísica e Biomatemática do IBILI - Faculdade de Medicina, Coimbra, que pretende ser uma contribuição para o desenvolvimento das aplicações clínicas da Medicina Nuclear no âmbito dos estudos gastrointestinais.

O objectivo principal do trabalho exposto nesta tese consiste na síntese, avaliação da estabilidade *in vitro*, avaliação do comportamento biológico *in vivo* e determinação da dosimetria interna de complexos de ^{99m}Tc com ligandos polissacáridos, na perspectiva de avaliar a sua potencial aplicação clínica em estudos do trânsito do cólon. Neste sentido realizou-se o trabalho que se descreve mais pormenorizadamente ao longo desta tese:

- Sintetizar novos complexos tecneciados com base em dois polissacáridos, nomeadamente a goma de alfarroba e o quitosano;

- Determinar a estabilidade radioquímica dos complexos de ^{99m}Tc e avaliar o seu comportamento biológico in vivo, designadamente a sua biodistribuição, biocinética e estabilidade em modelo animal saudável, de modo a verificar se o perfil biológico apresentado é adequado a uma possível aplicação clínica.
- Estimar, para cada complexo de ^{99m}Tc , a dose de radiação absorvida por órgão e corpo inteiro, em modelo animal saudável.

VII. Introdução

1. Obstipação

Com uma prevalência de 25 a 40%, os sintomas digestivos de alterações gastrointestinais são comuns na população em geral (Bonapace et al., 2000; Bennink et al., 1999; Malagelada et al., 2004), podendo conduzir, nas situações mais graves, a um quadro de malnutrição, desequilíbrios metabólicos e deterioração geral do organismo (Malagelada et al., 2004).

A obstipação constitui uma das queixas gastrointestinais mais comuns (Lundin, 2005; American Gastroenterological Association (AGA), 2000), sendo a sua prevalência, nos países ocidentais, entre 2% a 20% (Lundin, 2005; Bonapace et al., 2000), superior em indivíduos do sexo feminino e aumentando com a idade, na população adulta (Lundin, 2005; Richmond, 2004; AGA, 2000). Em Portugal, estima-se que mais de 170 mil pessoas sofrem de obstipação, uma vez que apenas 2% dos doentes procura ajuda médica. Este número aumenta após os 65 anos de idade para 4% nos homens e 8% nas mulheres (Bonapace et al., 2000). Nos restantes casos, o doente apenas se dirige ao médico gastroenterologista para que seja feito o diagnóstico quando os sintomas se apresentam numa fase aguda (McLean et al., 1990).

De referir ainda que a maior parte dos estudos publicados apresentam apenas valores de prevalência da obstipação, existindo uma lacuna de dados no que se refere à incidência desta disfunção (AGA, 2000).

1.1. Definição

Segundo a World Gastroenterology Organisation (WGO, 2006), a obstipação não é uma doença mas um sintoma associado a diferentes mecanismos patogénicos, sendo caracterizado por várias manifestações clínicas (sub-capítulo 1.3) (Associazione per la NeUroGastroenterologia e la Motilità Gastrointestinale (ANEMG), 2006; Lundin, 2005). Apesar de ser uma disfunção bastante comum, que atinge os vários escalões etários, a definição de obstipação não reúne acordo entre os especialistas a nível mundial (ANEMGI, 2006; AGA, 2000). Alguns autores procuram uma definição com base nos sintomas apresentados pelos doentes, enquanto outros procuram aplicar critérios fisiopatológicos baseados em alterações funcionais (ANEMGI, 2006).

Em 1992, num esforço para uniformizar a investigação clínica, um grupo internacional de especialistas (*Multinational Working Teams to Develop Diagnostic Criteria for Functional Gastrointestinal Disorders*) desenvolveu uma definição de obstipação, que foi posteriormente

revista (Maio de 2006), e parece reunir consenso (Tabela 1) (Lundin, 2005, McLean, 2006). Segundo os autores, a presença de obstipação está relacionada com dificuldade persistente em evacuar, se a evacuação obriga a grande esforço, se é necessário recorrer a procedimentos manuais para ajudar a saída das fezes, se ocorrem duas ou menos evacuações por semana, se existe sensação de evacuação incompleta, a presença de fezes duras ou a sensação de obstrução anorrectal (McLean, 2006). Para além destes critérios a existência de dor abdominal, evacuações dolorosas e náuseas são queixas comuns (Lundin, 2005; McLean, 2006), relacionadas com a sensação de mal-estar permanente e desconforto geral (ANEMGI, 2006; McLean, 2006).

Tabela 1 - Critérios diagnósticos de Roma II para obstipação (adaptado de Lundin, 2005, McLean, 2006 e Thompson, 1999)

Presença de dois ou mais dos seguintes sintomas durante um período de 12 semanas, que podem não ser consecutivas, nos últimos 12 meses:

1. Esforço excessivo em > ¼ MI
 2. Fezes duras em > ¼ dos MI
 3. Sensação de evacuação incompleta em > ¼ dos MI
 4. Sensação de obstrução/bloqueio anorrectal em > ¼ dos MI
 5. Necessidade de procedimentos manuais para facilitar em > ¼ dos MI
 6. < 3 MI por semana.
-

MI – Movimentos Intestinais

1.2. Anatomia e fisiologia do intestino grosso

O sistema digestivo é constituído pelo tubo digestivo, o sistema hepatobiliar, o pâncreas e as glândulas salivares. O tubo digestivo inicia-se na boca e termina no ânus, incluindo ainda outros órgãos, como o esófago, o estômago, o intestino delgado e o intestino grosso, constituído pelo cólon e o recto, cujas funções se interrelacionam no processo de digestão dos alimentos e eliminação dos resíduos produzidos (Seeley et al. 1995). Apesar de não ser um órgão essencial para a sobrevivência, as funções do cólon desempenham um papel importante no bem-estar geral dos humanos (Rouvière, 1996; Malagelada et al., 2004).

Anatomicamente, o intestino grosso é o segmento terminal do tubo digestivo, seguindo-se ao íleon, do qual está separado pela válvula íleo-cecal. O seu primeiro segmento é o cego, localizado normalmente, na fossa ilíaca direita, e que apresenta um prolongamento atrofiado,

o apêndice cecal ou vermiforme. Prolonga-se através do cólon ascendente até à face inferior do fígado, onde se inflecte para dentro, constituindo o ângulo direito ou hepático do cólon, que dá origem ao cólon transversal. Este segmento dirige-se transversalmente para a esquerda até ao baço, onde se inflecte novamente, no sentido inferior, para constituir o ângulo esquerdo ou esplênico do cólon. O cólon descendente segue um trajecto quase vertical até alcançar a porção esquerda da escavação pélvica, onde constitui o cólon pélvico ou sigmóide. Ao cólon pélvico segue-se o recto, que se abre no períneo posterior através de um orifício, o ânus (Esperança Pina, 2004).

O intestino grosso tem a forma de um canal cilíndrico cujo comprimento é de 1 a 1,7 metros sendo o seu diâmetro de 7 cm na porção proximal e de 2,5 cm a 3,5 cm na porção distal (Seeley et al. 1995; Esperança Pina, 2004).

Na sua superfície externa observa-se a existência de fitas longitudinais e de sulcos transversais que condicionam a formação de bossas ou haustras. As fitas longitudinais (*Taeniae coli*) são feixes de fibras musculares, com 8 a 12 cm de largura, que constituem um reforço da camada superficial da túnica muscular. As haustras (*Haustra coli*) encontram-se em número e volume variável, sendo separadas por sulcos transversais, que estabelecem elevações na mucosa do intestino grosso. Destacam-se ainda, da porção livre do intestino grosso, pregas peritoneais em dedos de luva, formando franjas, designadas por apêndices epiplónicos (Esperança Pina, 2004).

Na superfície interior do intestino grosso, a mucosa apresenta estruturas que traduzem a projecção no lúmen intestinal dos elementos presentes na superfície exterior. As fitas longitudinais são representadas por três saliências longitudinais, lisas e finas, unidas entre si por pregas transversais em forma de crescente, as pregas falciformes (*Plicae semilunares coli*), que traduzem os sulcos da superfície exterior. Existem três pregas semilunares, dispostas ao mesmo nível, que constituem uma elevação em anel, a qual está separada da que a precede e da que lhe segue por três depressões, as ampolas, que correspondem exteriormente às haustras (Esperança Pina, 2004).

A classificação histológica do tubo digestivo inclui quatro camadas ou túnicas principais: a mucosa interna e a serosa externa; e, entre elas, a submucosa e a muscular (Esperança Pina, 2004; Seeley et al. 1995) (Figura 1):

- Mucosa

Corresponde à túnica mais interna, composta por três camadas: o epitélio mucoso, a lâmina própria e a mucosa muscular (*Muscularis mucosae*). Ao nível do intestino grosso, a sua superfície é regularmente lisa, não apresenta válvulas coniventes de Kerkring nem vilosidades intestinais, expondo apenas os folículos linfóides solitários e os orifícios das glândulas de Lieberkühn.

- Submucosa

A submucosa, que se encontra aderente à túnica mucosa, é constituída por uma camada espessa de tecido conjuntivo, onde se encontram plexos arteriais, venosos e nervosos (plexo submucoso ou plexo de Meissner) e pequenas glândulas adjacentes à mucosa.

- Muscular

A túnica muscular é constituída por músculo liso que se dispõe em duas camadas, uma interna circular, constituída por fibras circulares (*Stratum circulare*) e uma externa longitudinal, constituída por fibras longitudinais (*Stratum longitudinale*). Entre as duas camadas está localizado o plexo mientérico ou plexo de Auerbach, constituído por fibras nervosas e corpos de células parassimpáticas. O plexo submucoso e o mientérico compõem o plexo intramural cuja função é de extrema importância na regulação do movimento e da secreção.

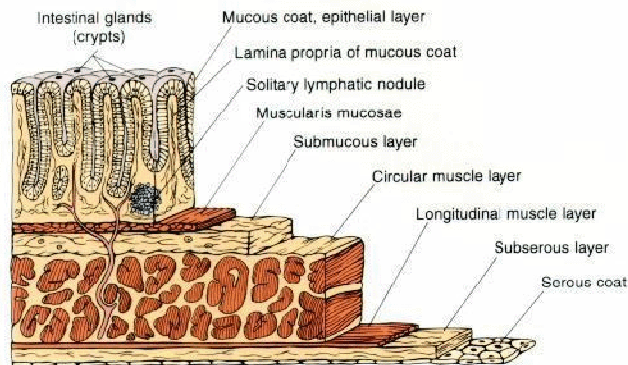


Figura 1 – Representação esquemática das quatro camadas histológicas principais do tubo digestivo (Current Medicine, 2007)

- Serosa

A quarta túnica do tubo digestivo é formada por uma fina camada de tecido conjuntivo e epitélio de descamação simples, que constitui o peritoneu visceral.

De um modo generalista, a parede do cólon é típica do tubo digestivo, sendo distinguida por algumas especificações da túnica mucosa: pregas circulares, dobras constituídas pela mucosa e submucosa, dispostas transversalmente ao eixo intestinal; células caliciformes secretoras de muco; e glândulas de Lieberkühn, glândulas tubulares encontradas entre o epitélio cilíndrico simples que reveste o intestino grosso (Rouvière e Delmas, 1996; Jacob, Francone e Lossov 1990).

O cólon é enervado por uma complexa conjugação de nervos extrínsecos (sistema nervoso autónomo) e intrínsecos (sistema nervoso entérico) (Lundin, 2005; Rouvière, 1996; Jacob, 1990). O sistema nervoso autónomo compreende dois sistemas, o simpático e o parassimpático, funcional e estruturalmente distintos já que actuam em todos os órgãos numa perspectiva antagónica. Os estímulos simpáticos actuam ao nível do cólon através dos plexos celíaco e mesentérico superior (cólon direito), dos plexos mesentérico inferior e hipogástrico superior (cólon esquerdo) e do plexo hipogástrico inferior (recto). A enervação parassimpática deriva do nervo vago (cólon direito) e dos nervos pélvicos sacrais (cólon esquerdo) (Lundin, 2005; Rouvière, 1996; Jacob, 1990). Estes últimos, provenientes de das vértebras sagradas S₂-S₄, reúnem-se para formar o plexo pélvico, penetrando em seguida na parede do cólon ao nível da junção rectosigmóide, dando origem aos nervos intramurais do cólon (Lundin, 2005). Na generalidade, os estímulos motores parassimpáticos aumentam a motilidade e secreção intestinal e relaxam o esfíncter anal interno, enquanto os estímulos simpáticos produzem o efeito contrário (Lundin, 2005; Rouvière, 1996; Jacob, 1990). Simultaneamente, os nervos aferentes simpáticos e parassimpáticos conduzem informação sensorial importante na percepção dos estímulos viscerais e na modificação da função do cólon como resposta e um estímulo central (Lundin, 2005; Rouvière, 1996) (Figura 2).

O sistema nervoso intrínseco apresenta uma organização baseada nos plexos mientérico e submucoso (Lundin, 2005; Rouvière, 1996). Os nervos que dão corpo a este sistema actuam através da modelação da motilidade (mientérico), secreção, fluxo sanguíneo e provavelmente imunidade intestinal (submucoso) (Rouvière, 1996). A sua acção é realizada através da libertação de neurotransmissores, como a acetilcolina e a substância P, que induzem um estímulo excitatório; e como o óxido nítrico e o péptido intestinal vasoactivo, que induzem um estímulo inibitório (Lundin, 2005; Rouvière, 1996; Jacob, 1990). A existência de um plexo especial na superfície submucosa da camada muscular circular, constituído por células

intersticiais de Cajal, fundamentam a existência de uma actividade contráctil espontânea do cólon, independente do sistema nervoso autónomo (Lundin, 2005).

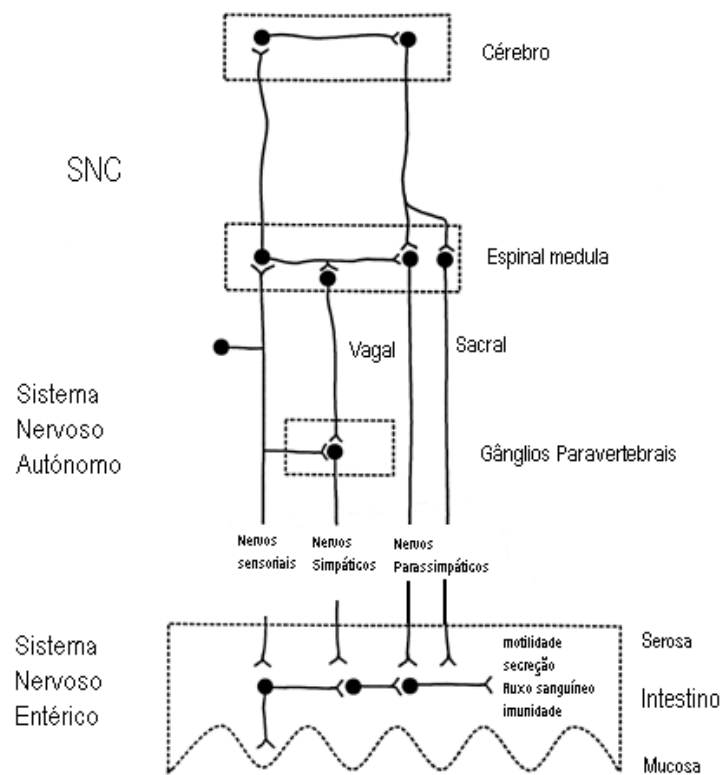


Figura 2 – Representação esquemática da enervação do intestino (Thurnbull, 1994)

Funcionalmente, o cólon divide-se em duas partes ao nível mediano da porção transversa e de acordo com a sua vascularização (Cummins, n.d.; 15, McLean, 2004). O cólon direito, porção do cólon vascularizado pela artéria mesentérica superior, é constituído pelo cego, cólon ascendente, ângulo hepático do cólon e os dois terços direitos do cólon transversa e está associado às funções de absorção de água e de electrólitos e à fermentação de açúcares não digeridos (Rouvière, 1996; Jacob, 1990). O cólon esquerdo, porção do cólon vascularizado pela artéria mesentérica inferior, é constituído pelo terço esquerdo do cólon transversa, pelo ângulo esplénico do cólon, cólon descendente e pelo cólon pélvico, ao qual estão associadas funções de armazenamento e evacuação das fezes (Rouvière, 1996; Jacob, 1990).

Actualmente é também reconhecido o seu papel na digestão de hidratos de carbono e proteínas não digeridos nos órgãos mais proximais do tubo digestivo, sendo este processo

realizado através do metabolismo anaeróbio de bactérias (mecanismos de fermentação) e acompanhado por produção de energia (Cummings, n.d).

O padrão normal de resposta do cólon na digestão dos alimentos consiste numa progressão distal do conteúdo colónico através do esvaziamento do cólon direito e preenchimento do segmento rectosigmoidal (Bouchouca, 2000). Num estudo realizado em adultos no Reino Unido verificou-se que o período médio de trânsito boca-ânus no humano foi de 60 horas (72 h para as mulheres e 55 h para os homens), das quais 4 a 6 h correspondem ao trânsito boca-cego, e cerca de 54 h para o tempo de residência colónico (Cummings, 1992). O período de trânsito ao longo das diferentes regiões do cólon também varia: 7-24 h no cego e cólon direito; 9-30 h no cólon esquerdo e 12-44 h no cólon secto-sigmoidal (Cummings, 1992).

Este padrão de motilidade intestinal é controlado por factores miogénicos, neurogénicos e químicos (Lundin, 2005; Jacob, 1990), podendo ser classificado em contracções segmentares e contracções peristálticas.

A primeira classificação apresenta duas componentes: (1) a componente fásica, cuja função é misturar o conteúdo intestinal, originando haustros entre os anéis contrácteis. Desta forma, permite a digestão e absorção de nutrientes (Lundin, 2005; Jacob, 1990), otimizada pela maximização da superfície de contacto e pelo trânsito lento do conteúdo colónico (McLean, 2004); e a componente rítmica, intermitente, que pode ocorrer em múltiplos locais ao longo do cólon. Este tipo de contracção segmentar pode ocorrer simultaneamente ou sequencialmente ao longo de uma curta distância, ou ainda, sequencialmente, ao longo de uma distância superior ao comprimento total do cólon (McLean, 2004). A sua função consiste em permitir a migração do conteúdo do cólon no sentido do recto (Lundin, 2005; Rouvière, 1996; Jacob, 1990), embora esta migração também ocorra no sentido retrógrado, auxiliando a mistura do conteúdo e a absorção dos fluidos (McLean, 2004).

As contracções peristálticas, mais fortes que as primeiras, ocorrem com menos frequência, uma a duas vezes por dia em humanos (McLean, 2004). Consistem no movimento de massa e pode ocorrer durante ou após a ingestão de uma refeição como reflexo gastrocólico, apresentando intervalos de várias horas (Lundin, 2005; Rouvière, 1996; 13). A distância de migração do conteúdo colónico durante este tipo de contracções é de cerca de 10 cm,

podendo originar distensão rectal e, conseqüentemente, reflexo de defecação (Hassan et al. 2006).

1.3. Etiologia e Patofisiologia

Nas causas etiológicas primárias e de acordo com a patologia subjacente, a obstipação é classificada como funcional ou orgânica (estrutural), sendo os critérios utilizados na sua distinção baseados nos sinais e sintomas apresentados pelo doente e no resultado de técnicas diagnósticas (Isselbacher, Podolsky, 1998; Malagelada et al., 2004).

A obstipação funcional está associada a duas principais patologias da motilidade colorectal, ou eventualmente à sua coexistência no mesmo doente (AGA, 2000; Lundin, 2005).

A primeira, a obstipação de trânsito lento, está relacionada com o movimento lento do conteúdo colónico desde o cólon proximal até ao cólon distal ou ao recto. A sua origem poderá estar, em alguns doentes, nos hábitos dietéticos ou relacionada com questões culturais; noutros doentes a alteração da motilidade do cólon deve-se, provavelmente, a uma alteração verdadeiramente patofisiológica (AGA, 2000). De acordo com o mecanismo subjacente, a obstipação de trânsito lento pode ser classificada em dois subtipos: (1) inércia do cólon, caracterizada por hipomotilidade do intestino grosso e conseqüente diminuição do número de contracções de propagação de elevada amplitude. Este fenómeno traduz-se num prolongamento do período de retenção do conteúdo ao nível do cólon direito; (2) hiperomotilidade não coordenada da actividade motora do cólon distal, criando uma barreira funcional que oferece resistência à progressão das fezes no cólon ascendente (Bouchoucha et al., 2006; AGA, 2000).

A disfunção do pavimento pélvico constitui a segunda patologia da motilidade colorectal e caracteriza-se pela incapacidade de realizar uma adequada evacuação do conteúdo rectal. Manifesta-se através do armazenamento prolongado do conteúdo ao nível do recto, embora se observe trânsito normal ou ligeiramente lento ao longo do cólon (AGA, 2000). Têm sido atribuídas diversas designações a este defeito funcional (defecação obstrutiva, obstrução de *outlet*, disquesia, anismus, dissinergia do pavimento pélvico) que demonstram a natureza heterogénea deste síndrome e a falta de definições concretas no que se refere à sua

patofisiologia (AGA, 2000). A American Gastroenterological Association (2000) sugere a classificação de acordo com duas síndromas multifactoriais: (1) hipertonicidade muscular, que reflecte a incapacidade de relaxamento ou a contracção paradoxal do pavimento pélvico e dos esfíncteres anais externos; (2) hipotonicidade muscular, na qual se verifica ausência de contracção da parede rectal e em alguns casos ocorre em simultâneo com megarecto e prolapso acentuado do pavimento pélvico.

Devido à necessidade de diferentes abordagens terapêuticas, é de extrema importância o diagnóstico diferencial entre obstipação de trânsito lento e disfunção do pavimento pélvico (AGA, 2000). De acordo com os critérios diagnósticos apresentados na Tabela 1, Lundin (2005) destaca aqueles que estão mais associados a cada uma das classificações: evacuações pouco frequentes e que obriguem a esforço são normalmente atribuídas a obstipação de trânsito lento, enquanto a sensação de obstrução durante a passagem das fezes, de esvaziamento incompleto e a necessidade de recorrer a procedimentos digitais para facilitar o esvaziamento são considerados sintomas de disfunção do pavimento pélvico.

As causas da obstipação podem estar igualmente relacionadas com factores intrínsecos ao cólon, como patologias estruturais. Incluem situações de neoplasia, isquémia, divertículos, megacólon, inflamação, rectocelo e fissuras (Lundin, 2005; WGO, 2006). A obstipação pode ainda surgir devido a causas secundárias ou relacionadas com factores extrínsecos ao cólon, que incluem patologias metabólicas, endócrinas, neurológicas e psiquiátricas e a administração de alguns fármacos, os quais apresentam este sintoma como um efeito secundário (Lundin, 2005; WGO, 2006) (Tabela 2).

Contudo, a causa mais comum para a obstipação é a ingestão inadequada de fibras alimentares, que decorre das profundas alterações que ocorreram nos últimos anos ao nível dos hábitos sociais e alimentares – adopção de uma dieta rica em gorduras saturadas e sal e pobre em fibras e vitaminas, acompanhada de hábitos sedentários (WGO, 2006).

Tabela 2 – Causas extracolônicas de obstipação (Adaptado de Lundin, 2005; WGO, 2006; McLean, 2006)

Hábitos alimentares e sociais	Doença Sistêmica
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Consumo inadequado de fibras ▪ Imobilização / Falta de exercício ▪ Ignorar urgência de evacuação ▪ Desidratação ▪ Gravidez ▪ Idade 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Endócrina ou metabólica <ul style="list-style-type: none"> – Diabetes mellitus, Hiperparatireoidismo, Hipotireoidismo, Hipertireoidismo, Hipercalcemia ▪ Miopatias – Escleroderma e Amiloidose ▪ Patologia Psiquiátrica <ul style="list-style-type: none"> – Depressão, Psicose, Anorexia nervosa, Abusos sexuais ▪ Neuropatias <ul style="list-style-type: none"> – SNC: patologia cerebrovascular, doença de Parkinson, esclerose múltipla, trauma, isquemia, tumor – Lesões dos nervos sagrados: trauma, tumor; ▪ Outras patologias <ul style="list-style-type: none"> – Depressão – Doença articular degenerativa – Doença cardíaca
<p>Farmacológicas</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Analgésicos: Opiáceos, anti-inflamatórios não-esteróides ▪ Anticolinérgicos: Antidepressivos, neuroléticos, antipsicóticos, anti-parkinsonianos ▪ Bloqueadores dos canais de cálcio ▪ Simpaticomiméticos ▪ Anti-histamínicos ▪ Iões metálicos: suplemento de ferro ▪ Diuréticos ▪ Anti-hipertensivos ▪ Agentes quimioterapêuticos ▪ Resinas: colestiramina, poliestireno 	

SNC – Sistema Nervoso Central

1.4. Diagnóstico

Apesar de existir um grande número de diferentes causas para a obstipação, alguns doentes não apresentam uma causa claramente identificável, tornando o diagnóstico ainda mais difícil e moroso. Por outro lado, a falta de uma técnica de referência torna a sintomatologia relatada pelo doente essencial, mas com baixa fiabilidade para que o diagnóstico seja apenas baseado nela (WGO, 2006).

A directriz apresentada pela WGO (2006) sublinha a importância da sistematização do diagnóstico e apresenta um diagrama clínico, traduzido no algoritmo apresentado pela AGA (2000) (Figura 3), que conduz ao diagnóstico diferencial da obstipação, e que inclui: anamnese, exames físicos e técnicas de diagnóstico (Smart et al., 1991). A história clínica do doente deve basear-se num questionário específico, no qual sejam retratados os hábitos intestinais, a frequência dos sintomas e o recurso a medicação específica. Uma vez que a obstipação surge

como um efeito secundário em vários fármacos (Tabela 2), torna-se essencial realizar o levantamento de toda a medicação que o doente está a realizar (AGA, 2000). Os exames físicos com pertinência directa são confinados à região perineal / rectal e incluem a observação, o exame digital e a simulação de defecação. Permitem realizar o diagnóstico de patologias estruturais (síndrome espásmico puborectal, rectocelo, prolapso da mucosa anorectal) e a avaliação de diferentes parâmetros, como o reflexo anal e a avaliação da tonicidade do esfíncter anal externo em repouso e em contracção (AGA, 2000). Deve ainda considerar-se a exclusão de patologias orgânicas com recurso a testes diagnósticos. De acordo com a WGO (2006), estas causas devem ser excluídas recorrendo a análises do sangue (contagem de células sanguíneas, análise da função tiroideia e determinação de níveis de cálcio), para exclusão de causas metabólicas; e à avaliação estrutural do cólon (sigmoidoscopia, clister opaco ou colonoscopia) para excluir causas estruturais (AGA, 2000; WGO, 2006). Contudo, nenhuma das técnicas, quando utilizada isoladamente, permite obter informação completa acerca das alterações patofisiológicas, sendo adequado a utilização de diferentes técnicas para uma compreensão global dos resultados (McLean, 2004).

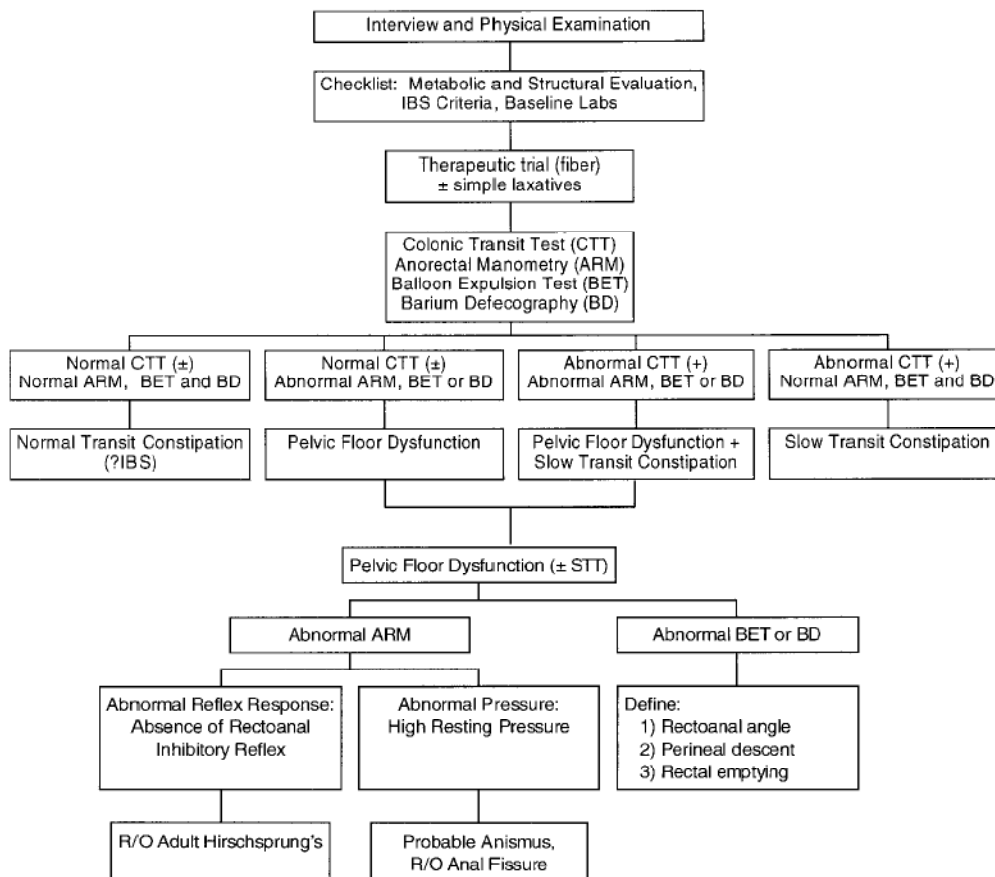


Figura 3 - Algoritmo diagnóstico de obstipação refractária (AGA, 2000)

Serão, seguidamente, abordadas as técnicas diagnósticas incluídas no algoritmo e que correspondem a um consenso entre especialistas. Contudo, é fundamental realçar a importância da colaboração do doente para a obtenção de resultados fiáveis, já que algumas técnicas que permitem a medição de componentes voluntárias da função anorectal pressupõem a garantia de privacidade do doente durante a realização do exame. Apesar de serem simples e de aplicação comum, nenhuma das técnicas foi submetida a avaliação da especificidade e sensibilidade, dada a ausência de um método padrão, não existindo quaisquer dados sobre este assunto (AGA, 2000).

- Teste de expulsão do balão

Este procedimento diagnóstico permite a quantificação da capacidade do doente evacuar um balão cheio com cerca de 50 ml de água. Nos casos da evacuação espontânea não ser possível, em conjunto com a manometria anorectal é possível determinar a magnitude da força passiva aplicada. Este é um teste relativamente simples, útil em alterações *major* da evacuação (AGA, 2000).








- Defecografia

A função defecatória pode ser avaliada por técnicas cintigráficas ou por técnicas radiológicas. Ambas as técnicas permitem avaliar a abertura do ângulo rectal e o grau de declinação do pavimento pélvico durante a defecação. A técnica cintigráfica apresenta-se como a técnica mais simples, em que a exposição à radiação ionizante por parte do doente é menor. Contudo, a baixa resolução anatómica desta técnica é ultrapassada pela defecografia radiológica com bário, que permite a avaliação anatomo-funcional da defecação (AGA, 2000).

- Trânsito do cólon

O trânsito do cólon é definido como a velocidade a que o resíduo fecal se desloca ao longo do cólon, estando correlacionada com a forma das fezes (AGA, 2000), que podem ser classificadas de líquidas, semisólidas a sólidas (Tabela 3).

Tabela 3 - Escala de fezes de Bristol. Sistema de classificação da forma das fezes humanas em sete grupos, com base no aspecto visual (Adaptado de Heaton e Lewis, 1997)

	Tipo 1 – Fezes duras, separadas, como nozes (dificuldade de passagem)
	Tipo 2: Fezes em forma de salsicha, compostas por fragmentos
	Tipo 3: Fezes em forma de salsicha, com fendas na superfície
	Tipo 4: Fezes em forma de salsicha ou cobra, lisas e suaves
	Tipo 5: Fezes em forma de bolbos suaves, com bordos definidos (passam com facilidade)
	Tipo 6: Fragmentos suaves com bordos irregulares e consistência pastosa
	Tipo 7: fezes aquosas, sem porções sólidas, totalmente líquidas

Um dos métodos disponíveis corresponde à técnica radiológica com recurso a marcadores radiopacos (AGA, 2000). Este método foi introduzido inicialmente por Hinton et. al, em 1969, tendo sido aperfeiçoado ao longo dos anos (Henkin et al., 2006). É uma técnica simples, reprodutível, que pode ser realizado a qualquer doente que apresente como sintoma *major* a obstipação. Apresenta, porém, a desvantagem de os marcadores não serem fisiológicos, diferindo, em consistência, do quimo intestinal, o que influencia o seu tempo de trânsito. Foi igualmente demonstrado por Henkin et al. (2006) que o tamanho dos marcadores radiopacos influencia o tempo de trânsito do cólon. No seu estudo, observou que marcadores com 6 mm de diâmetro apresentam trânsito mais rápido que partículas com 1 mm de diâmetro e em ambos os casos o trânsito é mais rápido do que líquidos com radionuclídeos. Por outro lado, a localização dos marcadores radiopacos revela-se difícil, devido à sobreposição das várias regiões do cólon (Henkin et al., 2006).

O segundo método disponível corresponde à técnica cintigráfica que, embora não esteja tão disponível como a técnica radiológica, vem colmatar algumas lacunas apresentadas por esta última. Permite a avaliação quantitativa de diferentes componentes de uma refeição (sólidos, líquidos, digestíveis ou não-digestíveis), uma vez que recorre a radiofármacos com carácter fisiológico (Stanghellini et al., 2000), é uma técnica simples, reprodutível e pouco dependente do operador (McLean et al., 1990) e permite a correcção do problema da sobreposição de estruturas ao recorrer a curvas de preenchimento/esvaziamento do estômago, intestino

delgado e cólon (Stanghellini et al., 2000). Uma vez que esta técnica corresponde ao objecto em estudo, será abordada de forma mais profunda no sub-capítulo 2.

Outras técnicas de avaliação da actividade do cólon disponíveis correspondem ao estudo da actividade contráctil das paredes do cólon. Apesar de não incluídas no algoritmo, apresentam um padrão de correlação com os métodos apresentados (Bouchoucha et al., 1998).

- **Manometria anorectal**

Esta técnica permite avaliar a presença do reflexo inibitório recto-anal, excluindo da doença de Hirschsprung, e a obtenção de dados clínicos e fisiológicos que favorecem a evidência de alterações do pavimento pélvico. Devido à ausência de uma metodologia padronizada, aceite pela comunidade de especialistas, são várias as metodologias utilizadas na aplicação desta técnica, variando conforme os serviços. Deste modo não é possível a generalização dos dados obtidos em cada centro, sendo necessária a determinação dos valores de normalidade para a metodologia utilizada (AGA, 2000).

1.5. Tratamento

Uma vez que, de acordo com a patologia subjacente, a abordagem terapêutica é significativamente distinta, é necessário realizar um diagnóstico o mais preciso possível. Porém, devido à etiologia diversa que a obstipação apresenta, muitas vezes inicia-se uma terapêutica pouco agressiva, realizando avaliações e exames periódicos que vão fundamentando o diagnóstico.

A abordagem terapêutica inicial baseia-se no aumento gradual da ingestão de fibras, incorporadas na dieta ou sob a forma de suplemento alimentar, acompanhado pelo aumento do consumo de fluidos. O aumento da ingestão de fibras irá aumentar o volume das fezes, diminuindo o tempo de trânsito do cólon e aumentando a motilidade gastrointestinal. Todavia, a resposta a esta terapêutica não é imediata, devendo ser realizado um programa com a duração de várias semanas, ajustado após um período inicial de 7 a 10 dias (AGA, 2000).

No caso de não se verificar resposta positiva, a abordagem seguinte inclui o recurso a laxantes, como o leite de magnésio, que favorecem a retenção osmótica dos fluidos ao nível do lúmen intestinal, diminuindo o tempo de trânsito do cólon e favorecendo a motilidade gastrointestinal. Alguns estimulantes mais agressivos (Dulcolax[®], lactose ou polietileno glicol)

conduzem, simultaneamente, à estimulação do plexo mesentérico, aumentando a motilidade do cólon. A ingestão de laxantes deve ser acompanhada pelo aumento do consumo de fluidos, uma vez que a desidratação é apontada como um dos efeitos secundários associados. A resposta a esta abordagem terapêutica é bastante mais rápida que na abordagem inicial, com recurso a fibras, tendo início cerca de 1 a 12 horas após a sua ingestão (AGA, 2000).

Nos casos de disfunção do pavimento pélvico, a abordagem seguinte deve considerar técnicas de “*biofeedback*” e treino de relaxamento. Estas técnicas de reaprendizagem permitem que a coordenação normal entre o relaxamento dos músculos do pavimento pélvico e o esforço exercido na defecação sejam restabelecidos. Apresentam uma taxa de sucesso elevada e ausência de morbilidade, conduzindo à redução dos sintomas e aumento da frequência dos movimentos intestinais (Emmanuel and Kamm, 2001). As desvantagens estão associadas à regularidade com que o treino é realizado e o empenhamento que o doente e o terapeuta incutem na técnica (AGA, 2000).

Os doentes que apresentam obstipação de trânsito lento por inércia do cólon, apresentam uma resposta fraca ou ausente ao aumento do consumo de fibras, estando muitas vezes dependentes de laxantes ou clisteres (Lundin, 2004). Nos casos em que o recurso agressivo e prolongado a fibras e laxantes não resulta, deve considerar-se o tratamento cirúrgico, através de colectomia total com anastomose ileo-rectal (AGA, 2000). Apesar de apresentar uma taxa de sucesso considerável (50 – 90%) após três anos de seguimento clínico, os efeitos secundários no período pós-operatório e no seguimento clínico não são negligenciáveis (Lundin, 2004). Diarreia pós-operatória e incontinência fecal foram observadas em 30% e 15% dos doentes, respectivamente (Kamm et al., 1988; Redmond et al., 1995; Lubowski et al., 1996). Também a morbilidade conferida num período de seguimento clínico de 11 anos, numa série apresentada por Nylund et al., em 2001, através de obstrução do intestino delgado, conduziu a abordagem cirúrgica em 25% dos doentes. Alguns autores têm sugerido que o recurso a uma remoção parcial do cólon poderia evitar os efeitos colaterais verificados na colectomia total (Kamm et al., 1991; de Graaf et al., 1996; Lundin, 2004).

2. Cintigrafia de trânsito do cólon

O estudo cintigráfico do cólon apresenta vantagens em relação às restantes técnicas, embora seja realizado apenas em centros especializados de Medicina Nuclear e submeta os doentes a uma exposição a radiação ionizante, permitindo a avaliação quantitativa do trânsito gastrointestinal (Stanghellini et al., 2000).

É uma técnica relativamente simples, que tem sido alvo de diversos estudos (Bonapace et al., 2000; Burton et al., 1997; McLean et al., 1990; Smart et al., 1991; McLean et al., 1992; Eising e von der Ohe, 1998; Lundin et al., 2004; McLean et al., 1995; McLean et al., 1999). O seu valor constitui um dado importante na avaliação de doentes com suspeita de alterações da motilidade do cólon (Burton et al., 1997), especificamente na suspeita de obstipação (McLean et al., 1990; Smart et al., 1991; Eising e von der Ohe, 1998; Lundin et al., 2004; McLean et al., 1999; McLean et al., 1995; Cummings, n.d.).

Pouco dependente do operador, pode ser utilizada em estudos seriados como por exemplo, pré e pós terapêutica. À exceção de grávidas, pode ser aplicada a qualquer doente. O estudo do período de trânsito intestinal pode ser realizado na sequência de um estudo do esvaziamento gástrico. Deste modo permite a avaliação segmentar do trânsito, corrigindo o problema da sobreposição de estruturas ao recorrer a curvas de preenchimento/esvaziamento do estômago, intestino delgado e cólon (Stanghellini et al., 2000).

Uma revisão atenta da literatura sobre a cintigrafia de trânsito do cólon publicada nos últimos anos, facilmente nos conduz à percepção de ausência de um procedimento de referência, quer em termos do radiofármaco utilizado, quer no que se refere às condições de realização do exame. Transversalmente, emergem as características ideais a ter em consideração quando se elabora um protocolo de cintigrafia de trânsito do cólon: ser uma técnica simples, facilmente compreendida pelo doente; aquisição de imagens por um período curto de tempo e ajustável ao horário laboral do doente, uma vez que o exame pode prolongar-se por vários dias; utilizar um radiofármaco que traduza o percurso dos alimentos ao longo do tracto intestinal.

2.1. Radiofármacos para estudo do trânsito intestinal: Estado-da-arte

Um dos maiores problemas técnicos deste exame relaciona-se com a possibilidade de dispersão do radiofármaco ao longo do tubo digestivo, pela acção dos diferentes processos de digestão. Têm, então, surgido várias hipóteses que procuram contornar este problema. Uma delas recorre à administração do radiofármaco através de um tubo oro-colónico ou introduzido ao nível do cego durante a realização de colonoscopia (Krevsky et al. 1986; Stanghellini et al., 2000). Todavia estas técnicas invasivas tendem a ter pouca aceitação por parte dos doentes. (Stanghellini et al., 2000).

Outra técnica utilizada recorre à administração de cápsulas sólidas gastroresistentes contendo radiofármacos. Estas cápsulas estão associadas a um mecanismo de libertação retardado devido ao seu revestimento com metacrilato, um polímero sensível ao pH, que mantém a sua integridade ao pH do ácido gástrico e que se dissolve em meio com pH mais elevado, ao nível do íleon terminal / cego (Stanghellini et al., 2000; Eising e von der Ohe, 1998; Proano et al., 1990). Desta forma reduz-se a hipótese de o radiofármaco ser digerido e/ou absorvido nos órgãos mais proximais do tubo digestivo, diminuindo também a dose de radiação a que estão expostos. O recurso a esta técnica é relevante em doentes que apresentem alterações da motilidade gástrica ou do intestino delgado (Cheng et al., 2003). Tal como as partículas rádio-opacas, utilizadas na técnica radiológica, estas cápsulas têm a vantagem de não serem absorvidas, resultando numa dose de exposição à radiação menor e a desvantagem de não serem fisiológicas (Henkin et al., 2006).

Apesar das cápsulas apresentarem maior aceitação por parte do doente, são preferíveis as soluções fisiológicas, já que permitem uma eficiente mistura com o quimo. Existe sempre, contudo, o risco das soluções serem absorvidas ao nível intestinal (Stanghellini et al., 2000). Assim sendo, foram exploradas outras alternativas. Neste sentido surge a utilização de celulose marcada com Iodo-131 (McLean et al., 1990), validada para os estudos do trânsito do cólon, podendo, também, ser utilizada na avaliação do esvaziamento gástrico e trânsito do intestino delgado em simultâneo (Henkin et al., 2006). Apesar de actualmente se saber que esta fibra alimentar também sofre digestão, através da fermentação colónica (Cummings, n.d.), testes *in vivo* demonstraram que a celulose-¹³¹I não sofre absorção ao nível do cólon, devido à ausência de detecção hepática nas imagens adquiridas (Smart et al., 1991). Porém, a utilização deste radiofármaco requer uma preparação morosa e está associada a uma pequena

percentagem de dissociação do iodo (3%), sendo necessário proceder ao bloqueio da tiróide de modo a diminuir a dose de radiação a que esta glândula é exposta. Devido à emissão β^- que este radionuclídeo apresenta, a dose de radiação conferida ao cólon em doentes com obstipação é considerável (ver tabela XXX), sendo igualmente desvantajosa em termos de radioprotecção para os profissionais de saúde. Por outro lado, as suas características físicas (período de semi-desintegração de 8,02 dias; emissão de fotões γ de 364 keV e de partículas β^- de 0,61 MeV) afectam a qualidade da imagem obtida (Henkin et al., 2006).

Devido às desvantagens relacionadas com a utilização do ^{131}I surgiram ao longo dos anos vários estudos comparativos que demonstraram a possibilidade da substituição deste radionuclídeo por outros mais favoráveis no que se refere à radioprotecção (consultar Tabela 4) e à qualidade da imagem obtida, como o Índio-111 (Madsen e Jensen, 1989; Stubbs et al., 1991; Smart et al., 1991; McLean et al., 1992; Roberts et al., 1993; McLean et al., 1995; Burton et al., 1997; Eising e von der Ohe, 1998; Bonapace et al., 2000), o Gálio-67 (Bellen et al., 1992; Bartholomeusz et al., 1999; Cheng et al., 2003; Asli et al., 2005) e o Tecnécio-99m (Madsen e Jensen, 1989; Caner et al., 1991; Burton et al., 1997).

O ^{111}In é produzido em ciclotrão através do bombardeamento de ^{112}Cd [$^{111}\text{Cd}(p,2n)^{111}\text{In}$]. Decai por captura electrónica, emitindo dois fotões γ de 171 e 245 keV, com uma abundância superior a 90% em cada energia, acompanhados pela emissão de electrões Auger (Weiner e Thakur, 2003). Apresenta um período de semi-desintegração física de 67 horas sendo adequado para o estudo do trânsito do cólon. Contudo, é um radionuclídeo com disponibilidade limitada e um custo associado elevado (Bellen et al., 1995).

Smart et al. (1991), num estudo comparativo, demonstraram a possibilidade de substituição da celulose- ^{131}I por ácido dietilenotriaminapentaacético- ^{111}In (DTPA- ^{111}In), uma vez que os resultados obtidos são sobreponíveis: padrão cintigráfico idêntico, retenção colónica total e segmentar equivalente (variação inferior a 3% até às 48h), percentagem de dissociação do radionuclídeo relativamente baixa [$3,1\% \pm 0,8$ (^{131}I); $0,1\% \pm 0,01$ (^{111}In), dados do 3º dia] e $T_{1/2}$ de excreção idêntico (variação inferior a 1,6%). Acresce ainda a vantagem da utilização de um radionuclídeo diferente que permite a obtenção de uma imagem com maior densidade de contagens, melhor resolução e menor dose de radiação para o doente.

O cloreto-¹¹¹In é, igualmente, utilizado na radiomarcagem de resinas (partículas de Amberlite e poliestireno). Em 1989, Camilleri et al. compararam resina-¹¹¹In com celulose-¹³¹I no estudo do trânsito intestinal, concluindo que o resina-¹¹¹In oferece resultados equivalentes. Ambas as marcações apresentaram elevada estabilidade *in vitro* às 3 horas, em condições que mimetizam o conteúdo entérico e permaneceram predominantemente ligadas (90.5% ±2.1 no ¹³¹I; 87.4% ±1.4 para o ¹¹¹In) durante cinco dias à fase sólida composta por fezes humanas. Os períodos de esvaziamento gástrico, de trânsito do intestino delgado e de trânsito do cólon não apresentaram diferenças significativas. As resinas-¹¹¹In podem ser administradas oralmente de forma dispersa (Hardy et al., 1986; Bonapace et al., 2000; Freedman et al., 2006) ou confinadas em cápsulas sólidas cobertas com metacrilato (von der Ohe e Camilleri, 1992; Burton et al., 1997; Eising e von der Ohe, 1998).

No sentido de ultrapassar as limitações inerentes à utilização do ¹¹¹In, surgiram alguns estudos comparativos entre DTPA-¹¹¹In e citrato-⁶⁷Ga (Bellen et al., 1995; McLean et al., 1999; Asli et al., 2005) que demonstram que este último radiofármaco é igualmente adequado para utilização na cintigrafia de trânsito do cólon (Bellen et al., 1995; Asli et al., 2005).

O ⁶⁷Ga é um radionuclídeo produzido em ciclotrão, através do bombardeamento de Zinco-68 enriquecido [⁶⁸Zn(p, 2n)⁶⁷Ga], apresentando elevada eficiência de separação e simplicidade no processo de preparação dos diferentes radiofármacos. Acresce ainda o facto de este radionuclídeo ter um período de semi-desintegração relativamente longo (T_{1/2}= 78h), permitindo o seu transporte para locais distantes do local de produção e permitir a realização de imagens durante vários dias, o que se revela favorável na realização da cintigrafia de trânsito intestinal. Todos estes factores contribuem para que o ⁶⁷Ga seja um radionuclídeo bastante disponível e consideravelmente mais económico, quando comparado com o ¹¹¹In (Cheng et al., 2003; Weiner e Thakur, 2003). Decai por captura electrónica para ⁶⁷Zn, acompanhado da emissão de fotões γ de várias energias, sendo as mais relevantes em Medicina Nuclear de 93, 184 e 300 keV. Porém, apresenta uma baixa eficiência na produção de fotões por desintegração (<40% por energia), o que se traduz numa qualidade de imagem inferior quando comparado com outros radionuclídeos e na necessidade de administração de actividades superiores (Weiner e Thakur, 2003).

Bellen et al. (1995) compararam a utilização destes dois radiofármacos no estudo do trânsito intestinal em modelo animal (rato), tendo observado resultados sobreponíveis nos dois

radiofármacos (excreção total do radiofármaco via intestinal, após 3 dias, com eliminação via renal e retenção na carcaça negligenciáveis). Todavia, foi necessário administrar uma actividade superior de citrato-⁶⁷Ga (7 MBq) em relação à actividade de DTPA-¹¹¹In (4 MBq), devido à inferior qualidade de imagem obtida com o primeiro radiofármaco. Este factor, associado ao período de semi-desintegração mais longo, resulta numa dosimetria relativamente desfavorável para o citrato-⁶⁷Ga [Dose Equivalente H = 1,30mSv (⁶⁷Ga) e 1,20 (¹¹¹In); Dose Efectiva E_{cólon} = 11,4 mSv (⁶⁷Ga) e 6,4 (¹¹¹In) (ratos saudáveis); Dose Efectiva E_{cólon} = 20,7 mSv (⁶⁷Ga) e 11,6 (¹¹¹In) (ratos com obstipação)] (Bellen et al., 1995) (Tabela 4).

Outros autores testaram a marcação de carvão activado com ^{99m}Tc, radionuclídeo de eleição em Medicina Nuclear convencional, dadas as suas características físicas e químicas mais favoráveis (Burton et al., 1997) e com citrato-⁶⁷Ga (Cheng et al., 2003), permitindo a sua utilização no estudo do trânsito intestinal. O carvão activado é uma forma de carbono puro de grande porosidade, obtido através da destruição controlada de matéria orgânica. Não apresenta odor ou sabor, está disponível sob a forma de pó ou partículas e actua como agente adsorvente, não sendo absorvido ou metabolizado ao longo do tracto gastrointestinal (Cheng et al., 2003). A utilização do carvão activado apresenta ainda vantagens relativamente a outras moléculas marcadas, uma vez que este manifesta um elevado poder de adsorção aos resíduos vegetais, atravessando o cólon incorporado de forma homogénea nas fezes e não sendo absorvido (Cheng et al., 2003; Burton et al., 1997). O método de marcação é relativamente simples, sendo apenas necessária a adição directa do radionuclídeo e posterior evaporação, uma vez que o radiofármaco resultante é administrado sob a forma de cápsula sólida, com mecanismo de libertação retardado ao nível do cego. Estudos *in vivo* demonstram que ambos os radionuclídeos apresentam elevado período de retenção no carvão activado. (Burton et al., 1997; Cheng et al., 2003). Burton et al. (1997) realizaram ainda estudos dosimétricos para uma dose de 148 MBq de carvão-^{99m}Tc activado, estando os resultados resumidos na Tabela 4. Comparativamente aos outros compostos marcados as doses equivalente e efectiva por unidade de actividade são consideravelmente inferiores (H=0,021 mSv/MBq e E_{cólon}=0,075 mSv/MBq). O facto de se recorrer a um radiofármaco-^{99m}Tc, emissor gama único e com uma energia relativamente baixa, leva a que o efeito produzido pela radiação, mesmo em órgãos mais radiosensíveis, não conduza a um risco tão elevado de desenvolvimento de efeitos estocásticos. Neste sentido as actividades administradas podem ser superiores, comparativamente aos radiofármacos-⁶⁷Ga ou radiofármacos-¹¹¹In, e originar doses absorvidas

inferiores. Neste sentido, o objectivo do presente trabalho consiste no desenvolvimento de radiofármacos marcados com ^{99m}Tc .

Tabela 4 – Dados dosimétricos relativos aos vários radiofármacos utilizados na cintigrafia de trânsito do cólon.

Radiofármaco	Actividade Administrada (MBq)	Dose Equivalente mSv (mSv/MBq)		Dose Efectiva mSv (mSv/MBq)			
		Saudável	Obstipado	Órgão crítico (cólon)		Ovários	
				Saudável	Obstipado	Saudável	Obstipado
^{131}I ^a	4	3,4 (0,85)	11,0 (2,75)	28 (7)	80 (20)	1,2 (0,3)	3,8 (0,95)
$^{111}\text{In-DTPA}$ ^a	4	1,2 (0,3)	2,8 (0,7)	6,4 (1,6)	11,6 (2,9)	1,2 (0,3)	2,8 (0,7)
$^{111}\text{In-resina}$ ^b	3,7	0,30 (0,08)	---	7,5 (2,0)	---	1,5 (0,4)	---
$^{67}\text{Ga-citrato}$ ^c	7 - 8	1,3 (0,18)	---	11,4 (1,6)	20,7 (2,9)	---	---
$^{99m}\text{Tc-carvão activado}$ ^d	148	3,2 (0,021)	---	11,2 (0,075)	---	3,36 (0,02)	---
$^{99m}\text{Tc-resina}$ ^b	37	0,20 (0,005)	---	2,8 (0,075)	---	0,8 (0,02)	---

^aAdaptado de Smart et al., 1991; ^bAdaptado de O'Connor (1996); ^cAdaptado de McLean, 2004; ^dAdaptado de Burton et al., 1997;

2.2. Protocolo Técnico

2.2.1. Aquisição de imagens

A ausência de um consenso no radionuclídeo a utilizar para a realização deste estudo, que se traduz na variabilidade observada, reflecte-se obrigatoriamente nos protocolos de aquisição a que recorrem os diferentes Serviços de Medicina Nuclear. Apenas a preparação que o doente deve realizar para este exame reúne o acordo entre os vários especialistas. Inclui a interrupção da medicação que possa interferir com o trânsito do cólon, três dias antes da ingestão do radiofármaco e prolongada durante o período de aquisição de imagens; o doente não deverá realizar o exame nas quatro semanas seguintes à realização de uma colonoscopia, devido à preparação terapêutica necessária (McLean, 2004); implica a realização de jejum durante a noite que antecede a administração do radiofármaco; e prevê que não seja introduzida qualquer alteração da dieta alimentar realizada pelo doente durante os dias em que se realiza o exame (Urbain e Malmud, 2007). No caso de se recorrer a um radiofármaco radioiodado, é necessário proceder ao bloqueio da tiróide de acordo com o protocolo habitual no serviço (Smart et al., 1991).

O recurso a radiofármacos administrados por via oral requer, normalmente, períodos de aquisição de imagem mais longos, em comparação com a administração através de técnicas invasivas. Em indivíduos saudáveis, a aquisição de imagens durante as primeiras 24 h após a administração do radiofármaco é suficiente para se observar a sua excreção. Pelo contrário, em doentes com obstipação, o período de aquisição engloba um conjunto de várias imagens precoces (até às 24 h) seguido de imagens diárias até ao terceiro ou quarto dia (McLean, 2004). No caso de o protocolo envolver a utilização de agentes tecneciados, as imagens devem ser adquiridas às 0, 2, 4, 6, 8, 24, 28 e 32 h (Burton et al., 1997) enquanto para os restantes radionuclídeos são desprezadas as imagens iniciais, sendo adquiridas imagens tardias às 6, 24, 48, 72 e 96 h após a administração oral do radiofármaco (Urbain e Malmud, 2007).

Em cada um dos tempos referidos devem ser obtidas imagens estáticas em projecção anterior e posterior do abdómen, durante 2 a 10 minutos, recorrendo a um colimador adequado ao radionuclídeo – de baixa energia uso geral (LEGP do acrónimo em inglês *Low Energy General Purpose*) ou baixa energia alta resolução (LEHR do acrónimo em inglês *Low Energy High Resolution*) para agentes tecneciados, de média energia uso geral (MEGP do acrónimo em inglês *Medium Energy General Purpose*) para radiofármacos marcados com ^{111}In ou ^{67}Ga e de alta energia uso geral (HEGP do acrónimo em inglês *High Energy General Purpose*) para o ^{131}I (McLean, 2004). A matriz de aquisição é igualmente adaptada ao radionuclídeo – 64×64 pixéis ou 128×128 pixéis para agentes não tecneciados (McLean et al., 1992;) e 256×256 pixéis para os radiofármacos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Freedman et al., 2006). O pico energético da aquisição deve estar adequado à emissão do radionuclídeo, sendo aplicada uma janela de 20% (Charles et al., 1995; Asli et al., 2005; Freedman et al., 2006). O doente deve ser posicionado em decúbito dorsal, podendo facilitar-se a análise das imagens através da colocação de marcas externas de cobalto nas cristas ilíacas (Bonapace et al., 2000; Asli et al., 2005; Freedman et al., 2006).

A administração oral do radiofármaco deve ser realizada em jejum, estando o doente em posição erecta (Charles et al., 1995). Duas horas mais tarde, ou assim que se verificar a saída do radiofármaco do estômago, o doente poderá ingerir uma refeição ligeira correspondente ao pequeno-almoço e quatro horas depois poderá almoçar (McLean, 2004). Alguns estudos clínicos reflectem a importância da quantidade de calorias ingeridas nestas duas primeiras refeições, apresentando os valores aproximados de 320 kcal e 500 kcal, respectivamente, como standard (Charles et al., 1995).

2.2.2. Processamento das imagens

Apesar de existirem diversos estudos publicados que recorrem aos métodos cintigráficos para avaliação do trânsito do cólon, cada investigador utiliza um método diferente no processamento e avaliação dos dados, não sendo evidente o método mais eficiente e fiável (Freedman et al., 2006).

O método mais simples consiste em calcular o tempo necessário para eliminar 50% da radioactividade inicial e determinar a percentagem de retenção do radiofármaco ao longo do tempo em cada segmento do cólon (Madsen e Jensen, 1989). Para tal, são delimitados entre 5 (Charles et al., 1995) a 7 (Freedman et al., 2006) segmentos, através de regiões de interesse (ROI) (Figura 4) e calculando-se, seguidamente, as médias geométricas¹ correspondentes a cada segmento, com base nas contagens obtidas através das imagens anteriores e posteriores, em cada tempo de aquisição. Os dados obtidos serão apenas válidos após a correcção do decaimento, realizada em relação à imagem abdominal adquirida às 6 h e considerada como imagem inicial (Freedman et al., 2006).

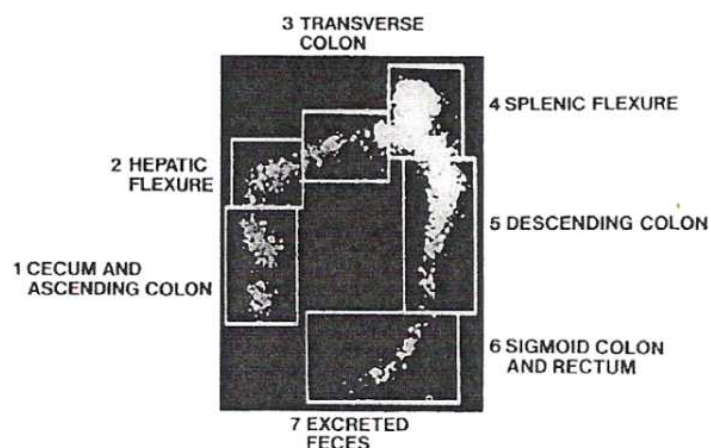


Figura 4 – Delimitação dos sete segmentos intestinais através de ROIs, no processamento da cintigrafia de trânsito do cólon (Freedman et al., 2006)

A delimitação das ROIS é realizada com base nos seguintes critérios:

- A cada região corresponde um segmento do intestino grosso, nomeadamente o cego e cólon ascendente (1), ângulo hepático (2), cólon transverso (3), ângulo esplénico (4), cólon

¹ Raiz quadrada do produto das contagens obtidas na imagem adquirida em projecção anterior e em projecção posterior (Burton et al., 1997)

descendente (5), cólon rectosigmoidal (6), actividade excretada (7) (Figura 4) (Freedman et al., 2006).

- No caso de se verificar sobreposição entre parte dos segmentos e os ângulos intestinais, a ROI correspondente ao ângulo intestinal deve ser alargada de modo a incluir parte do segmento, como se observa na Figura 5 (Freedman et al., 2006).

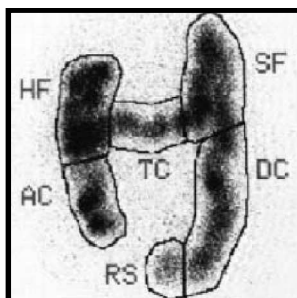


Figura 5 – Delimitação das ROIs no processamento da cintigrafia de trânsito do cólon, nos casos de sobreposição dos ângulos e dos segmentos intestinais. (Freedman et al., 2006)

- A ROI relativa ao cólon rectosigmoidal corresponde ao segmento identificado abaixo da marca externa colocada na crista ilíaca esquerda (Charles et al., 1995).
- Quando são delimitadas apenas cinco regiões os ângulos hepático e esplênico são incluídos nas ROIs do cólon ascendente e descendente, respectivamente (Charles et al., 1995).
- A determinação das contagens relativas à sétima ROI (actividade excretada) pode ser realizada através da obtenção directa das contagens das fezes eliminadas (Charles et al., 1995; Burton et al., 1997) ou através de um método indirecto, que recorre à diferença entre as contagens abdominais iniciais (6 h) e as contagens abdominais em cada um dos tempos de aquisição (McLean et al., 1990; Freedman et al., 2006). Sempre que ocorre uma variação > 10%, após a correcção do decaimento, é considerada perda fecal (Bonapace et al., 2000; Freedman et al., 2006).

Outros autores recorrem a curvas actividade-tempo que envolvem segmentos individuais do cólon. São definidas três regiões correspondentes ao cólon direito (cego, cólon ascendente, ângulo hepático e porção direita do cólon transversal), cólon esquerdo (porção esquerda do cólon transversal, ângulo esplênico e cólon descendente) e cólon rectosigmóide (McLean et al., 1990). Após efectuar a correcção do decaimento são calculadas as percentagens de retenção total e segmentar, para cada tempo de aquisição, utilizando os valores das 6h como 100% e, com os dados obtidos, é elaborado um gráfico de actividade-tempo que contempla as três

regiões definidas e a actividade total. Considera-se a entrada do radiofármaco numa região quando a actividade dessa região corresponde a um valor superior a 10% da actividade total; do mesmo modo considera-se que a actividade foi eliminada quando o seu valor diminui abaixo dos 10% da actividade total (Freedman et al., 2006).

Uma medida global do trânsito é a determinação do centro geométrico médio (CGM). Este parâmetro utilizado por vários autores (Charles et al., 1995; Burton et al., 1997; Eising e von der Ohe, 1998; Bonapace et al., 2000) indica a posição média do traçador no cólon, uma vez que cada região é ponderada de acordo com a quantidade de actividade no local (McLean, 2004):

$$\text{CGM} = \frac{\text{ROI1}\times 1 + \text{ROI2}\times 2 + \text{ROI3}\times 3 + \text{ROI4}\times 4 + \text{ROI5}\times 5 + \text{ROI6}\times 6 + \text{ROI7}\times 7}{100\%} \quad (2.1)$$

Os resultados entre 1 e 2 indicam retenção do radiofármaco ao nível do cólon proximal. Contrariamente, os valores de 5 a 7 estão associados à progressão do radiofármaco para o cólon esquerdo (Krevsky et al., 1986). Os valores de normalidade para este método foram estabelecidos inicialmente por Krevsky et al., em 1986 e mais tarde por Charles et al., em 1995, em voluntários assintomáticos e incluem CGM $\leq 1,4$ às 4 h, $\approx 4,6$ às 24 h, $\approx 6,1$ às 48 h e $\approx 6,6$ às 72 h. Valores inferiores aos apresentados para as 48 h são indicativos de obstipação de trânsito lento, não sendo necessária a aquisição de imagens suplementares (Krevsky et al., 1986).

Os métodos mais recentes de processamento e análise de imagem recorrem à construção de imagens paramétricas (McLean, 2004; Freedman et al., 2006). Com base nos resultados das médias geométricas obtidas para cada região e para cada tempo de aquisição, expressos em percentagem relativamente às contagens totais obtidas em t=0 (imagens das 6 h), é possível obter imagens ou gráficos que traduzam a distribuição da actividade ao longo dos segmentos e ao longo do tempo (Figura 6). Uma escala de cinzas ou de cores é utilizada para expressar visualmente a percentagem de actividade em cada segmento ao longo do tempo.

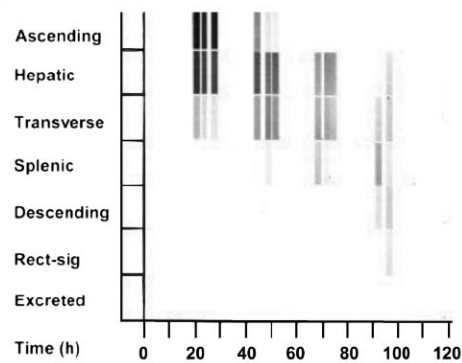


Figura 6 - Imagem paramétrica de atraso do trânsito ao nível do cólon direito. Pode ser observado o movimento lento ao longo do cólon ascendente, ângulo hepático e cólon transversal por um período de aproximadamente 100 h (Freedman et al., 2006).

Simultaneamente a todos os métodos apresentados (McLean, 2004), ou utilizado como método independente, deve ser realizada a análise visual das imagens por médicos especialistas em Medicina Nuclear (Freedman et al., 2006). Existem vários critérios de classificação da análise visual, variando o grau de detalhe apresentado. Notghi et al. (1994) identificaram cinco padrões de trânsito do cólon, num estudo realizado em 114 doentes, originando o critério de classificação presente na Tabela 5 e utilizado por Freedman et al. (2006) num estudo comparativo entre os vários métodos.

Tabela 5 - Padrões do trânsito do cólon (Adaptado de Notghi et al. 1994)

<i>Trânsito rápido</i>	A actividade encontra-se distribuída ao longo do cólon 12 h após a administração do radiofármaco e grande parte é excretada nas primeiras 24 h.
<i>Trânsito Intermédio</i>	A maior parte da actividade encontra-se acumulada ao nível do cego nas primeiras 12 h. A actividade é excretada no período de 27 a 48 h.
<i>Atraso generalizado</i>	Não existe excreção nos primeiros 3 dias. A actividade encontra-se distribuída ao longo do cólon, sem existir um local de armazenamento preciso.
<i>Atraso – cólon direito</i>	Não existe excreção nos primeiros 3 dias. A maior parte da actividade permanece no cólon ascendente e transversal nesse período.
<i>Atraso – cólon esquerdo</i>	A actividade atinge o cólon descendente e recto no período entre as 27 e 34 h e permanece no cólon rectosigmóide, sem qualquer excreção, durante 3 dias.

No seu estudo Freedman et al. (2006) concluíram que a melhor opção para a avaliação do trânsito do cólon por métodos cintigráficos passa pela combinação da análise visual das imagens e um dos métodos quantitativos, uma vez que não se verifica o acordo completo entre os métodos estudados, não sendo recomendada a utilização isolada de um único método.

A análise visual das imagens permite obter informação geral sobre o trânsito do cólon, mas está associada a elevada variabilidade e apresenta um elevado grau de desacordo entre observadores (75%), que poderia colocar em questão a precisão do método visual (Freedman et al., 2006).

O método do CGM está, igualmente, relacionado com alguma falta de precisão: a sua determinação indica a região onde se localiza a actividade média e, conseqüentemente, a velocidade do trânsito do cólon. Porém, o seu valor não demonstra a dispersão do radiofármaco ao longo do cólon ou os movimentos retrógrados e antrógrados realizados pelo radiofármaco (Freedman et al., 2006).

O método das imagens paramétricas foi aquele que apresentou maior concordância com os restantes métodos (75 – 94%). Revela-se um método simples e conciso de demonstrar o movimento segmentar de um composto ou refeição radioactiva ao longo do cólon por um período de vários dias, sendo facilmente evidenciados os períodos de trânsito, de intervalo (momentos de não aquisição de imagens) e de movimentos retrógrados. Apresenta, ainda, a vantagem de ser mais fácil de interpretar relativamente à observação de múltiplas imagens. (Freedman et al., 2006).

A maior limitação no processamento das imagens relaciona-se com a identificação dos diferentes segmentos do cólon e a delimitação das ROIs correspondentes. A sobreposição observada entre os ângulos do cólon e os segmentos adjacentes origina um aumento artificial das contagens obtidas nas ROIs dos ângulos e, conseqüentemente, variação dos valores obtidos através dos métodos quantitativos (Freedman et al., 2006).

2.2.3. Avaliação dos dados obtidos

A realização da cintigrafia de trânsito do cólon permite, através de análise visual, a localização da obstrução/retenção (McLean et al., 1990) e conseqüentemente o diagnóstico diferencial entre obstipação de trânsito lento idiopática e defecação obstrutiva (Smart et al., 1991). Por outro lado, através da determinação da percentagem de radiofármaco retido ao longo do cólon, permite a confirmação do diagnóstico de obstrução, bem como a avaliação do grau de severidade (McLean et al., 1990). Foram realizados estudos com o objectivo de definir valores de normalidade em populações saudáveis (McLean et al., 1992) e perceber a importância da

cintigrafia de trânsito do cólon no seguimento de doentes com obstipação (Lundin et al., 2004, McLean et al., 1999; McLean et al., 1995). A cintigrafia de trânsito do cólon com DTPA-¹¹¹In apresenta uma sensibilidade de 83% e uma especificidade de 66% no diagnóstico de obstipação de trânsito lento (McLean et al., 1995), alterando em cerca de 50% dos casos o diagnóstico inicial e aumentando noutros casos a certeza diagnóstica (Bonapace et al., 2000; McLean et al., 1999). Demonstra ainda ser um bom instrumento na selecção de doentes para hemicolectomia direita ou esquerda nos casos de trânsito lento do cólon, diminuindo as complicações secundárias inerentes a uma cirurgia radical (Lundin et al., 2004). Mais recentemente tem sido demonstrada a sua importância na avaliação da eficácia da medicação utilizada na terapêutica da obstipação (Asli et al., 2005).

Em indivíduos saudáveis, o perfil cintigráfico do cólon ascendente apresenta um esvaziamento linear, após um período inicial de estase, que suporta a função de armazenamento desta região do cólon. Podem ser observados períodos de esvaziamento que intercalam com períodos de ausência de esvaziamento. O recurso ao centro geométrico médio demonstra ainda uma progressão linear ao longo do cólon.

Em doentes com obstipação ideopática o cálculo do centro geométrico médio permite o diagnóstico diferencial entre inércia do cólon (ou obstipação de trânsito lento) e obstrução do trânsito colónico (Urbain e Malmud, 2007). Num estudo realizado em doentes pré-seleccionados, observou-se que às 24 h após a administração do radiofármaco os doentes com diagnóstico inicial de obstipação de trânsito lento do cólon apresentavam um padrão caracterizado por um atraso do radiofármaco ao nível proximal do cólon. Por outro lado, nos doentes com diagnóstico inicial de defecação obstrutiva, o padrão caracterizava-se por um atraso distal (Eising e von der Ohe, 1998). Apesar de se observarem diferenças no padrão imagiológico às 24h, de acordo com a patologia subjacente, recomenda que, em doentes sem pré-selecção, devem ser adquiridas imagens até às 72 horas (Eising e von der Ohe, 1998). A administração de laxantes após o término das imagens é recomendada como medida para redução da exposição do órgão crítico – o cólon – à radiação (Asli et al., 2005).

3. Polissacáridos

Considerando o objectivo proposto inicialmente, que visa a síntese de novos radiofármacos para o estudo do trânsito intestinal com base em dois polissacáridos, nomeadamente a goma de alfarroba e o quitosano, far-se-á uma breve referência às características físico-químicas destas biomoléculas. Do mesmo modo serão abordados os dois compostos, bem como os aspectos relevantes da sua marcação com Tecnécio-99m.

Os polissacáridos são os hidratos de carbono mais importantes e abundantes na natureza. São polímeros constituídos por numerosas unidades de monossacáridos, unidos por ligações glicosídicas e podem desempenhar funções de reserva, tendo como função fornecer energia, ou estrutural. Os polissacáridos podem ser classificados em homopoliósidos ou hidratos de carbono simples, no caso de o polímero ser composto apenas por um tipo de unidades monossacarídicas (e.g. celulose, composta apenas por glucose), ou por heteropoliósidos ou hidratos de carbono complexos, quando contêm mais do que um tipo de monossacáridos na sua constituição, por exemplo os galactomananos, compostos por unidades de galactose e manose. São insolúveis em água, hidrolisáveis e não possuem propriedades redutoras (Varki et al., 2008). São ainda classificados com base nas características químicas da sua principal componente monossacárida – sequências e ligações que apresenta, configuração anomérica das ligações, tamanho do anel, configuração absoluta (D- ou L-) e presença de substituintes. Algumas características estruturais, como a conformação da cadeia ou as associações intermoleculares, influenciam as propriedades físico-químicas dos polissacáridos e conseqüentemente a sua função. Quando dispostos de um modo regular, estas moléculas assumem um número restrito de conformações, limitado pelas restrições estereoquímicas na liberdade de rotação dos açúcares, devido às ligações glicosídicas existentes. Por exemplo, os polissacáridos estruturais *non-starch*, como a celulose, apresentam orientações preferenciais que automaticamente suportam conformações lineares extensas (Figura 7). Por outro lado, os polissacáridos que intervêm no armazenamento, como as cadeias nas amilopectinas (Figura 2), tendem a adoptar conformações helicoidais. O grau de rigidez, hidrofília e uniformidade das cadeias polissacáridas interfere ainda na taxa e extensão da sua fermentação ao nível intestinal. Os polissacáridos são ainda ricos em grupos –OH, permitindo a formação de interacções inter- ou intramoleculares através de pontes de hidrogénio. Esta organização controla a solubilidade dos polímeros, as suas propriedades reológicas e a estabilidade da conformação helicoidal (Rinaudo, 2004).

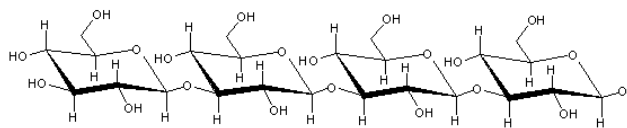


Figura 7 - Estrutura básica da celulose, mostrando a ligação entre β -glicose (Rinaudo, 2004)

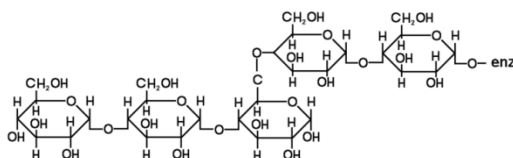


Figura 8 - Estrutura básica da amilopectina, mostrando a ramificação do polímero (Rinaudo, 2004)

Como consequência das diferentes estruturas moleculares e propriedades físicas apresentadas pelos polissacáridos, verifica-se a sua aplicação em diferentes áreas, como a cosmética, a indústria alimentar, tintas, etc. Entre os polissacáridos solúveis em água, alguns apresentam propriedades espessantes, aumentando a viscosidade dos solventes (galactomananos, metilcelulose); outros apresentam propriedades gelificantes, dependendo das características termodinâmicas do meio (alginatos, agarose); outros apresentam características estabilizantes ou de suspensão de sólidos dispersos ou emulsões (galactomananos, alginato) (Rinaudo, 2004).

3.1. Goma de alfarroba

A goma de alfarroba ou farinha de sementes de alfarroba (LBG do acrónimo em inglês *locust bean gum*) é o endosperma moído de sementes de variedades naturais da alfarrobeira *Ceratonia siliqua* (L.) (DL38-2000) e favorece a retenção de água e reserva alimentar na semente em condições extremas. A LBG consiste essencialmente num polissacárido hidrocoloidal neutro de elevada massa molecular – $3,10 \times 10^5$ (Lazaridou et al., 2000) (50 000 – 3 000 000 Da) – constituído por unidades de galactopirranose e de manopirranose combinadas entre si por ligações glicosídicas (constituindo um galactomanano neutro) (DL38-2000). O polímero é formado pelo encadeamento de β -D-manoses unidas em (1 \rightarrow 4) com ramificações laterais de uma unidade de α -D-galactose em uniões α -(1 \rightarrow 6) (0). Existe uma razão de cerca de 3,5 (2,8 – 4,9) resíduos de manose / galactose [Bruneton, 2001; Bennink et al., 1999],

verificando-se uma alternância entre os segmentos ramificados e não ramificados do polímero (Bruneton, 2001; Bennink et al., 1999).

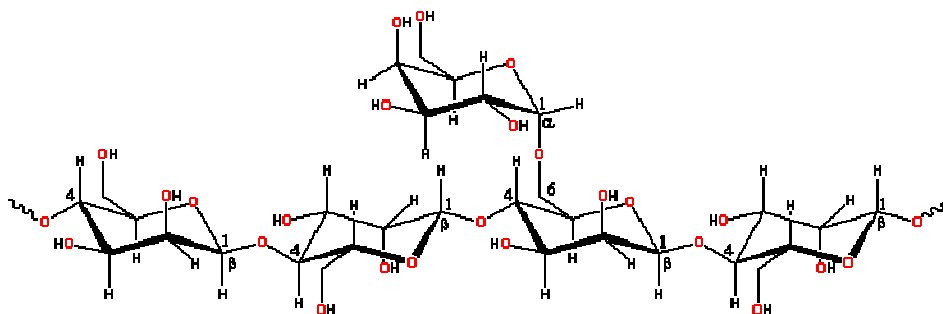


Figura 9 - Estrutura Molecular da LBG (Rizzo et al., 2004)

A distribuição da galactose na cadeia linear de manose controla as propriedades reológicas da LBG, em particular, uma elevada razão manose/galactose traduz-se numa elevada capacidade espessante, influenciando a sua solubilidade, temperatura e mecanismo de gelificação (Rizzo et al., 2004). A difícil solubilização dos galactomananos exige elevada temperatura, que varia conforme a razão manose/galactose (2,56 – 25°C; 3,57 – 80°C) e agitação constante de modo a assegurar a completa dissolução em água (Rizzo et al., 2004). O estudo das suas propriedades reológicas demonstrou que a sua viscosidade é máxima a pH=5 (20°C), comportamento que pode ser justificado pela presença de impurezas com carga (proteínas), que conseguem modificar a força iónica das soluções dependendo do pH, já que os galactomananos são polissacáridos neutros (Rizzo et al., 2004). Após a formação de gel e posterior arrefecimento, Rizzo (2004) verificou que o aumento da temperatura diminui a viscosidade da LBG, a pH=5.

Devido à crescente utilização da LBG na indústria alimentar na década de 70, o Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives avaliou a sua ingestão diária aceitável, com base em estudos toxicológicos e bioquímicos realizados por vários autores, tendo obtido os resultados apresentados seguidamente.

Estudos de digestibilidade em animais demonstraram que a LBG não é uma fonte de calorias biodisponíveis (Robaislek, 1974), 85-100% da manose presente na LBG a 1% é excretada pelas fezes 30 horas após a administração oral, tendo sido colocada a hipótese de ocorrer uma diminuição do tamanho da cadeia longa pela acção da microflora, uma vez que os mamíferos não possuem manosidase (Tsay & Whistler, 1975).

Semena (1975) demonstrou que a incubação de LBG em solução ou suspensão com suco gástrico humano, suco duodenal + biliar, suco pancreático e suco entérico, com e sem adição de enzimas da membrana duodenal, não produz evidência de hidrólise. Contudo, Towle & Schranz (1975) concluíram num estudo *in vitro* que a incubação de LBG com microflora do cólon de rato provoca hidrólise parcial da molécula.

Ensaio *in vitro* e em modelo animal demonstraram que a LBG não possui actividade mutagénica (Litton Bionetics, 1975; Maxwell & Newell, 1972), carcinogénica (Domanski et al., 1980) ou teratogénica (Morgareidge, 1972). Foi também demonstrada a ausência de reacção alérgica ou alteração de motilidade e GI quer em adultos (Holbrook, 1951) quer em crianças até cinco meses, quando administrada em simultâneo com uma refeição líquida (leite) (Rivier, 1952).

Actualmente e devido à sua alta viscosidade, a LBG é utilizada como espessante em diversos produtos alimentares, e.g. gelados (Barata et al., 2006), onde adquire a designação E410 (DL38-2000). A composição típica da LBG comercializada é composta por polissacáridos (80-91%), proteínas (5-6%), celulose (1-4%) e resíduos (1%) (Lazaridou et al., 2000). A utilização da LBG em imagem médica foi iniciada por Lauenstein et al. (2003), como agente de contraste oral no estudo da patologia do intestino delgado por Ressonância Magnética Nuclear, tendo sido posteriormente utilizada, com o mesmo objectivo, em Tomografia Computorizada (Barata et al., 2006). Neste último estudo o método utilizado incluiu a administração de 3 g de LBG, em 1500ml de água destilada. Os autores avaliaram a tolerância, distensibilidade intestinal e acuidade diagnóstica do método, tendo concluído que esta é uma técnica simples, bem tolerada e útil no estudo do intestino delgado.

Na sequência dos resultados obtidos nestes trabalhos, e não existindo um consenso relativamente ao radiofármaco a utilizar no estudo cintigráfico do trânsito do cólon, foi proposto sintetizar-se um novo radiofármaco marcado com ^{99m}Tc com base na LBG e que possa ter aplicação clínica neste âmbito.

3.2. Quitosano

O quitosano é um polímero composto por 2-deoxi-2-amino-D-glucose obtido por *N*-desacetilação da quitina (Figura 10). É um hidrato de carbono natural modificado, que deriva da quitina, presente no exosqueleto de animais do filo Artropoda (Peniston & Johnson, 1980), nomeadamente de camarões, lagosta e caranguejo, podendo ser igualmente obtido a partir do esqueleto de lulas. No primeiro caso, o quitosano é obtido a partir da α -quitina, enquanto no segundo é obtido a partir da β -quitina, encontrando-se o grupo amina alinhado com os grupos hidroxilo e $-CH_2OH$ (Shepherd et al, 1997; Felt et al, 1998). A sua estrutura química é caracterizada pelo grau de acetilação, que determina a sua capacidade de quelatar iões metálicos (Marques et al., 2008). É igualmente necessário que o grau de desacetilação seja superior a 85% para obtenção de um produto solúvel. O polímero obtido apresenta solubilidade em água e em solventes orgânicos dependendo do valor de pH. Em soluções com pH inferior a 4,0 encontra-se na forma líquida (Peniston & Johnson, 1980; LeHoux & Grondin, 1993; Sigma-Aldrich, 1999), contudo, após administração endovenosa e em contacto com os fluidos corporais neutros, torna-se gelatinoso à medida que o valor de pH aumenta (Huh e tal., 2005). O peso molecular e a viscosidade do quitosano variam de acordo com o grau de desacetilação da quitina podendo variar entre 150.000 e 600.000 Da e 20 a 2 000 cpm (Brookfield, solução a 1% em 1% de ácido acético), respectivamente (Sigma-Aldrich, 1999).

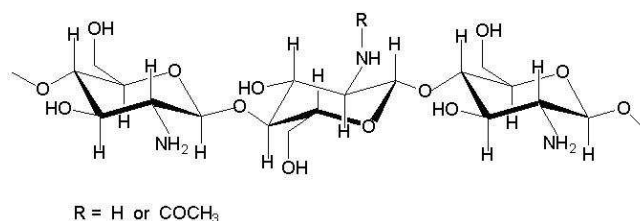


Figura 10 - Estrutura molecular do quitosano (Felt et al, 1998)

A produção de quitosano é efectuada actualmente por métodos químicos. Após a desproteinação do exosqueleto de caranguejos e camarões, com uma solução aquosa de 3 a 5 % de NaOH, o produto resultante é neutralizado e descalcificado pelo tratamento com uma solução de 3 a 5% de HCl, a temperatura ambiente. A *N*-acetilação da quitina é realizada pela adição de solução aquosa de NaOH a 40-45%, sendo o precipitado obtido lavado com água e posteriormente dissolvido numa solução aquosa de ácido acético a 2%. Após a remoção do material insolúvel, o sobrenadante é neutralizado com solução aquosa de NaOH, promovendo a formação de um precipitado purificado de quitosano (Hirano, 1996).

Actualmente, os estudos epidemiológicos em humanos ou estudos em animais não registam evidência de possível actividade cancerígena. Dois estudos de toxicidade aguda em animais demonstram que a LD₅₀ na administração oral em rato é de 16g/kg (Hirano, 1996) e na administração intraperitoneal é de 208mg/kg (NLM, 1999). Alguns estudos demonstram ainda a actividade anti-genotóxica (Ohe, 1996) e anti-carcinogénica (Torzas et al., 1996) em ensaios laboratoriais e em ratinho, respectivamente. A sua ingestão na dieta diária está ainda associada à perda de peso (Razdan et al., 1997) e diminuição dos níveis de colesterol (Fukada et al., 1991; Razdan et al., 1997; Ormrod et al., 1998), o que fundamenta a sua utilização em doentes obesos. Contudo, a sua aplicação durante um longo período de tempo deve ser cuidadosa. Tanaka et al (1997), após administração intraperitoneal de 5 mg de quitosano a ratos observaram uma diminuição do peso do animal, acompanhada de diminuição da actividade física após cinco semanas e o aparecimento de macrófagos hiperplásicos ao nível do mesentério. Estas alterações celulares não foram observadas pelos autores após a administração subcutânea ou oral da mesma dose de quitosano. Após a administração oral, para além da perda de peso, foi ainda verificada a diminuição do número de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* na flora intestinal normal (Deuchi et al., 1995).

No que se refere ao metabolismo, o quitosano é um polímero não hidrolisável pelas enzimas digestivas humanas, não sendo absorvido ao nível do tracto gastrointestinal superior. Todavia, é provável que apresente susceptibilidade à hidrólise glicosídica por acção das enzimas microbianas existentes ao nível do cólon, uma vez que apresenta ligações glicosídicas semelhantes às de outros polissacáridos despolimerizados por acção enzimática (Chourasia e Jain, 2004).

Apresenta propriedades biológicas favoráveis como ausência de toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade para administração *in vivo*. Apresenta ainda a vantagem de ser aprovado como um ingrediente alimentar o que sugere a sua eventual aplicação como fármaco para administração oral (Chourasia e Jain, 2004).

Tem sido utilizado como suplemento alimentar, bem como em outras aplicações na área da indústria farmacêutica, agricultura e cosmética, o que pode resultar num consumo diário elevado deste composto (Hirano, 1996).

Devido às características físico-químicas adequadas, a marcação deste composto com radionuclídeos tem sido estudada, nomeadamente com emissores β^- (holmio-166 e samário-153), para aplicação em terapia com radiofármacos de patologias localizadas (Shin et al., 2001). Têm sido igualmente estudados derivados do quitosano, de modo a potenciar as suas propriedades selectivas e quelantes (Marques et al., 2008), com resultados pré-clínicos promissores.

Neste sentido, optou-se por estudar a síntese deste composto com ^{99m}Tc e a sua caracterização radioquímica e biológica comparativamente à LBG- ^{99m}Tc . Para o efeito sintetizaram-se os dois compostos radioactivos e estudou-se a sua biodistribuição em modelo animal e a dosimetria interna associada, tendo em vista eventual aplicação clínica no diagnóstico diferencial de obstipação, através de cintigrafia do trânsito do cólon.

3.3. Marcação de polissacáridos com radionuclídeos

Têm sido desenvolvidos vários radiofármacos que se baseiam na marcação de polissacáridos com radionuclídeos, aproveitando as características da biodistribuição do polissacárido ou utilizando-o como um precursor para a marcação de uma outra biomolécula. As principais aplicações clínicas encontram-se ao nível da oncologia, tanto ao nível da terapia como do diagnóstico. Como exemplo: a marcação do quitosano com holmium-166 na terapia do carcinoma hepatocelular (Kim et al., 2006), do carcinoma da próstata (DW-166HC) (Kwak et al., 2005) ou de tumores cerebrais (Huh et al., 2005); o complexo quitosano- ^{153}Sm para a terapia da artrite reumatóide pelo método da radio-sinoviotese (Shin et al., 2000); e a marcação de vários polissacáridos com ^3H , ^{35}S e ^{131}I (Prigent-Richard et al., 1998). No âmbito da aplicação em linfocintigrafia outros autores descreveram procedimentos de marcação do dextrano com ^{99m}Tc e ^{125}I (Ercan et al., 1982; Karayalcin et al., 1988; Wingardh and Strand, 1989), tendo sido ainda optimizada a técnica para utilização do dextrano- ^{99m}Tc como num conjugado de somatostatina (Holmberg et al., 1994, Matsunaga et al., 2005).

3.3.1. Química do Tecnécio relevante para síntese de radiofármacos-^{99m}Tc

O tecnécio é um metal de transição d, do grupo VIIB, com número atómico 43, descoberto em 1937 por Perrier e Segrè. Actualmente, encontram-se identificados 25 isótopos e 10 isómeros deste elemento, sendo o mais comum destes nuclídeos o ⁹⁹Tc (β^- , E = 293 keV; $t_{1/2} = 2,13 \times 10^5$ anos). Contudo, aquele que apresenta maior aplicação é o ^{99m}Tc (γ , E = 140,5 keV; $t_{1/2} = 6,01$ horas), um estado metastável descoberto por Segrè e Seaborg em 1937. O ^{99m}Tc é o radionuclídeo mais utilizado em imagem de Medicina Nuclear, sendo esta utilização justificada por vários factores físicos e químicos – decaimento gama monoenergético (140 keV) abundante, eficientemente detectado pelos cristais de NaI(Tl) presentes na câmara-gama, e conduzindo a uma imagem de elevada resolução; o seu período de semi-desintegração é de 6,01 horas, sendo a emissão gama acompanhada de electrões de conversão (radiação não-penetrante de baixo nível), características favoráveis em termos dosimétricos para o doente; o período de semi-desintegração e a química versátil, com capacidade de formar complexos estáveis com grande diversidade de ligandos, permitem a manipulação subjacente à preparação de radiofármacos (Mahmood e Jones, 2003).

O ^{99m}Tc é obtido através de um sistema de gerador ⁹⁹Mo/^{99m}Tc, pelo decaimento do radionuclídeo-pai, o ⁹⁹Mo ($t_{1/2} = 65,94$ horas). A eficiente separação através deste sistema permite obter ^{99m}Tc com elevada actividade específica, na forma de solução aquosa de pertecnetato de sódio (Na^{99m}TcO₄). O ião pertecnetato (^{99m}TcO₄⁻) encontra-se no estado de oxidação +7 e apresenta uma geometria tetraédrica (número de coordenação = 4), estando o Tc⁷⁺ localizado no centro e os quatro oxigénios no ápex e cantos do tetraedro. A possibilidade de existir em oito estados de oxidação (-1 ao +7), conjugada com a variedade de geometrias de coordenação permitidas pelos números de coordenação entre 4 e 9, beneficiam o tecnécio de uma química rica e versátil que tem facilitado a síntese de uma grande variedade de complexos (Mahmood e Jones, 2003; Banerjee, 2001). Contudo, o estado de oxidação +7 não favorece a formação de complexos com ligandos doadores ou quelatos, sendo necessário proceder à sua redução. Este processo pode ser realizado com recurso a vários agentes redutores, sendo o cloreto estanoso o mais utilizado (Mahmood, 2003; Banerjee, 2001). É conhecido que o tecnécio forma centros metálicos susceptíveis de estabilizar com ligandos uni ou polidentados, doadores de O, N, S ou P, formando complexos de Tc com diferentes estados de oxidação (Jurisson, Cutler, Smith, 2008).

De um modo geral é possível realizar a marcação com ^{99m}Tc de biomoléculas como os polissacáridos através de três métodos: (1) método directo, que envolve a redução de complexos de coordenação entre o ^{99m}Tc e a biomolécula, através da ligação ao metal de grupos funcionais. O pertecnetato é adicionado ao ligando a marcar na presença do agente redutor, seguindo-se um período de incubação adequado ao processo de marcação. Este método é eficiente, rápido e de fácil execução. A maior limitação deste método está relacionada com a necessidade dos grupos funcionais que coordenam com o ^{99m}Tc não sejam determinantes para a actividade biológica da molécula. A estrutura dos complexos formados não é conhecida podendo ocorrer ligação não específica e formação de várias espécies radioquímicas. Em alternativa, a estratégia de síntese pode ser realizada utilizando métodos indirectos que incluem abordagens por integração ou conjugação. (2) O método da integração recorre a uma reacção em dois passos, na qual o pertecnetato é inicialmente reduzido na presença de um ligando lábil, que estabiliza o metal num estado de oxidação apropriado, seguindo-se a adição deste complexo intermédio à biomolécula, um doador mais forte e com maior estabilidade termodinâmica. A transferência do metal pré-reduzido para a biomolécula, forma o complexo metálico final. A principal vantagem desta estratégia é a minimização das alterações no tamanho, forma e polaridade da molécula, bem como evitar a formação de espécies hidrolisadas de ^{99m}Tc (Mahmood e Jones, 2003). (3) O método da conjugação envolve a ligação de um agente quelante bifuncional à biomolécula, num local que não seja determinante das suas propriedades biológicas. O metal deve manter-se afastado do fragmento biologicamente activo, podendo ser utilizado um espaçador para aumentar essa distância. Neste método existem duas abordagens possíveis: marcação seguida de conjugação, na qual ocorre a marcação do agente quelante bifuncional e posterior conjugação com a biomolécula; conjugação seguida de marcação, na qual decorre previamente a conjugação da biomolécula ao agente quelante bifuncional, seguida da marcação com ^{99m}Tc . Esta última poderá ser realizada por redução directa, na presença de um agente redutor, ou por transquelatação. Este método de marcação tem a vantagem de permitir o estudo da estrutura química do complexo e de minimizar as ligações não-específicas do radionuclídeo à biomolécula.

O mecanismo proposto para a marcação de hidratos de carbono com ^{99m}Tc foi descrito e caracterizado em 1981 por De Kievet, com base na marcação do glucoheptonato(GH)- $^{99/99m}\text{Tc}$. O estado de oxidação do ^{99}Tc no composto é +5, tendo-se verificado a existência de um *core* ($\text{Tc}=\text{O}$) $^{3+}$ e dois ligandos GH (Figura 11) em solução aquosa. Estudos de RMN demonstraram a

presença de dois anéis com cinco membros, formados ao nível da ligação bidentada entre os oxigénios dos grupos carboxilo terminal e hidroxilo adjacente do GH e o Tc. O composto é ainda estabilizado pela interacção entre o Tc e o oxigénio do grupo hidroxilo no carbono 4. Esta interacção adicional explica a maior estabilidade do GH quando comparado com compostos análogos.

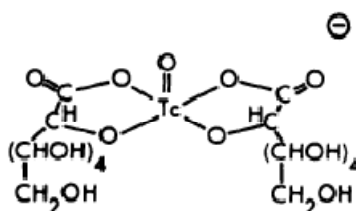


Figura 11 - Estrutura química do glucoheptonato-⁹⁹Tc proposta por De Kievet em 1981

4. Dosimetria

A absorção de energia da radiação ionizante pode causar danos em diferentes extensões nos tecidos vivos. Esta característica é utilizada como vantagem nas aplicações terapêuticas com radionuclídeos, mas no caso das aplicações diagnósticas revela-se uma limitação, uma vez que representa potencial risco para o doente. Em qualquer dos casos, é de extrema importância analisar quantitativamente a distribuição da energia nos tecidos do corpo, de modo a assegurar uma aplicação clínica precisa ou prever potenciais riscos (Cherry et al., 2003). A estimativa da dose de radiação resulta da correlação de factores relacionados com a área da física, relacionados com o transporte da energia e a sua deposição no corpo e que se encontram disponíveis sob a forma de ficheiros electrónicos em software adequado, e factores da área da biologia, relacionados com a biodistribuição e retenção do radiofármaco em estudo que resultam no número de desintegrações que ocorrem num órgão-fonte ao longo do tempo, podendo a qualificação dos dados ser realizada em modelo humano ou animal. A combinação destes dados com factores de dose, introduzidos nos fantomas *standard* disponíveis, permite a estimativa da dose de radiação. Neste sub-capítulo serão descritos os conceitos fundamentais do cálculo da dose de radiação absorvida bem como os sistemas utilizados na sua determinação.

Uma das principais grandezas avaliada na determinação dos efeitos da radiação num dado órgão é a *dose absorvida* (D). Corresponde à energia depositada por unidade de massa nos tecidos humanos e a unidade do Sistema Internacional (SI) é o Gray (Gy), sendo $1 \text{ Gy} = 1 \text{ Joule/kg}$ (Stabin e Brill, 2008). O conceito de dose absorvida tem por base a quantidade de radiação a que um órgão está sujeito, a partir da radiação emitida por uma ou mais fontes radioactivas existentes no corpo. A fonte e o alvo podem corresponder ao mesmo órgão, o que na realidade acontece frequentemente, já que um dos factores que mais contribui para a dose de radiação de um órgão é a radioactividade que esse órgão acumula. De um modo geral, os órgãos são considerados como fonte se apresentarem concentrações radioactivas superiores à concentração radioactiva média do corpo (Cherry et al., 2003). O seu cálculo pode ser realizado de acordo com a seguinte expressão que reúne os conceitos subjacentes a equações publicadas por vários autores ao longo dos anos (p.ex. MIRD, RADAR, ICRP) (Stabin e Brill, 2008):

$$D = N \times DF \tag{4.1}$$

onde N é o número de transições que ocorrem no órgão-fonte e DF é o factor de dose (do acrónimo inglês *Dose Factor*), que inclui dados do decaimento, fracção absorvida e a massa do órgão alvo e que será abordado posteriormente. Para estimar a dose de radiação recebida de um determinado radiotraçador é necessário obter as curvas actividade/tempo dos principais órgãos. Estes dados podem ser obtidos através de estudos em modelo animal, como foi o caso do presente trabalho, através de imagens adquiridas em humanos saudáveis ou ainda de uma combinação das duas aproximações.

Uma vez que os efeitos biológicos da radiação podem estar relacionados com a quantidade de dose absorvida, foi introduzido, pela International Commission on Radiological Protection (ICRP), em 1977, o conceito de *dose equivalente* (H) que descreve a eficiência dos diferentes tipos de radiação na produção de efeitos biológicos nos tecidos humanos. Para tal, à dose absorvida é acrescentado um factor de ponderação de acordo com o tipo e energia da radiação (W_R , do acrónimo inglês *radiation weighting factor*) (Stabin, 2008):

$$H = \sum_i D \times W_R \quad (4.2)$$

A unidade SI da dose equivalente H é o Sievert (Sv). Os valores recomendados para o factor de ponderação da radiação têm sofrido alterações, de acordo com a evolução da evidência dos efeitos biológicos. Actualmente a ICRP recomenda os valores que se encontram na Tabela 6.

Tabela 6 – Factores de ponderação da radiação (Adaptado de Stabin, 2008)

<i>Tipo e energia da radiação</i>	<i>Factor de ponderação W_r</i>
Fotões (todas as energias)	1
Electrões (todas as energias)	1
Neutrões, energia < 10 keV	5
10 keV a 100 keV	10
>100 keV a 2 MeV	20
>2 MeV a 20 MeV	10
>20 MeV	5
Protões, energia >2MeV	5
Partículas alfa, fragmentos de fissão, núcleos pesados	20

ICRP Publicação 60: *1990 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection*.

Nova York: Pergamon Press; 1001

O resultado final dos cálculos dosimétricos é uma estimativa da dose de radiação conferida aos maiores órgãos do corpo, o que representa um volume de informação que dificilmente permite obter a percepção do risco da utilização de um radiofármaco específico ou mesmo do risco comparativo, entre as doses dos procedimentos de Medicina Nuclear e as de outras técnicas de radiodiagnóstico. Neste sentido, é conveniente condensar toda a informação obtida num único valor, que considere ainda as características do órgão-alvo (Cherry et al., 2003). A *dose efectiva* (E) acrescenta um factor de ponderação (W_T , do acrónimo inglês *tissue weighting factor*) (Tabela 7) que traduz a radiosensibilidade que alguns órgãos ou sistemas de órgãos expressam para o desenvolvimento de efeitos estocásticos. Os valores assumidos para cada órgão têm como base a observação destes efeitos biológicos em populações expostas à radiação. Assim, esta grandeza corresponde à soma de todas as doses equivalentes, calculadas para cada órgão e multiplicadas pelo factor de ponderação (W_T), para uma dada exposição à radiação (Stabin, 2008).

$$E = \sum_i D \times W_T \quad (4.3)$$

Uma vez que o factor de ponderação é adimensional, a grandeza é expressa em unidades SI de Sieverts (Sv)(Cherry et al., 2003).

Tabela 7 – Factores de ponderação Recomendados pelo ICRP para o cálculo da Dose Efectiva (E) (Adaptado de Stabin, 2008).

Órgão	ICRP 26 (1977)	ICRP 60 (1991)
Gónadas	0,25	0,20
Medula Vermelha	0,12	0,12
Cólon	-	0,12
Pulmões	0,12	0,12
Estômago	-	0,12
Bexiga	-	0,05
Mama	0,15	0,05
Fígado	-	0,05
Esófago	-	0,05
Tiróide	0,03	0,05
Pele	-	0,01
Superfície Óssea	0,03	0,01
Restantes Órgãos	0,30 ^a	0,05 ^b

^a Dividido equitativamente pelos cinco órgãos com maior radiação. ^b Dividido equitativamente pelas glândulas supra-renais, cérebro, intestino grosso, intestino delgado, rins, músculo, pâncreas, baço, timo e útero.

4.1. Sistemas Dosimétricos

As equações acima apresentadas são equações genéricas. Muitos autores desenvolveram-nas de formas diferentes para aplicação em situações distintas. Frequentemente alguns dos factores das equações são agrupados para simplificar os cálculos, especialmente quando se pretende trabalhar com radionuclídeos cujo espectro de emissão é complexo. Dependendo do sistema / código utilizado cada factor que compõe as equações das grandezas dose absorvida e dose equivalente poderá ser mais ou menos decomposto (Stabin, 2008). Numa perspectiva de enquadramento histórico serão brevemente abordados os principais sistemas dosimétricos com aplicação em Medicina Nuclear, destacando-se o sistema RADAR, do qual evoluiu o software OLINDA/EXM utilizado no presente trabalho.

4.1.1. The International Commission on Radiological Protection

O método desenvolvido pela *International Commission on Radiological Protection* (ICRP) baseia-se na quantidade de radioactividade captada por um órgão, a massa desse órgão e o tempo de retenção do radioisótopo. Para o cálculo dosimétrico a partir deste método é necessário assumir as seguintes condições: a maioria dos órgãos é esférica e apresentam um raio efectivo; a captação da radioactividade pelo órgão é instantânea e apresenta uma distribuição uniforme; os pacientes assemelham-se ao “indivíduo médio”; e os pacientes devem tolerar os limites de dose ocupacionais. Apesar de actualmente estas considerações não serem válidas, foram consideradas aceitáveis quando propostas, apesar dos resultados obtidos serem sobrestimados.

4.1.2. O método MIRD

Nos anos 60 a *Society of Nuclear Medicine* (SNM) formou o *Medical Internal Radiation Dose* (MIRD) *Committee* com o objectivo de desenvolver um método de cálculo da dose de radiação interna, a partir de doses de radionuclídeos e radiofármacos com aplicação diagnóstica e terapêutica. Foram igualmente assumidas algumas condições: os órgãos internos são estruturas elipsóides ou cilindróides; a captação da radioactividade aproxima-se de uma curva exponencial em função do tempo; o tempo de retenção do radiofármaco nos órgãos é variável

e a concentração é homogénea; a excreção do radiofármaco pode ser representada por uma função exponencial simples ou composta; a área abaixo da curva actividade-tempo representa a actividade acumulada (\tilde{A}) e é expressa em $\mu\text{Ci} \times \text{h}$; deve-se considerar, para além do indivíduo médio, a “mulher média” e a “criança média” de várias idades. Surge então a equação do método MIRD para a dose absorvida:

$$D = \frac{\tilde{A}}{m_a} \sum_i \Delta_i \phi_i (r_k \leftarrow r_h) \quad (4.4)$$

Onde \tilde{A} é a actividade acumulada, m_a a massa do órgão (g), Δ_i constante de equilíbrio de dose absorvida e ϕ_i a fracção absorvida. Analisando cada um destes parâmetros verifica-se que esta equação se enquadra na equação genérica de *dose absorvida* (1.1) apresentada anteriormente.

A *Actividade Acumulada* [\tilde{A} , $(\text{Bq} \times \text{seg})$], representa o número de desintegrações que ocorre enquanto a fonte radioactiva está no órgão, sendo equivalente ao factor N da equação (1.1). O parâmetro DF da equação (1.1) agrupa os restantes factores da equação (1.3) m_a , Δ_i e ϕ_i .

O procedimento geral para o cálculo da *dose absorvida* (D) pelo método MIRD é composto por três fases (Cherry et al., 2003):

- Determinação da quantidade de radioactividade e do tempo de permanência no órgão-fonte através do parâmetro \tilde{A} . Quanto maior for a actividade e mais longo o tempo de permanência, maior será a dose de radiação a que o órgão está exposto. Uma vez que a quantidade de radioactividade num órgão varia em função do tempo, de acordo com uma determinada biocinética, a \tilde{A} pode ser determinada através da área abaixo da curva actividade-tempo descrita pela função de $A(t)$:

$$\tilde{A} = \int_0^{\infty} A(t) dt \quad (4.5)$$

Uma vez que as curvas actividade/tempo podem ser bastante complexas, tornando a equação (1.4) de difícil interpretação, considera-se uma das seguintes situações, de modo a simplificar o cálculo:

- A captação do órgão é “instantânea” (muito rápida relativamente ao período de semi-desintegração do radionuclídeo) e não existe excreção biológica. Neste caso, a curva actividade/tempo do radiotraçador é descrita pela equação do decaimento radioactivo.
- A captação no órgão é “instantânea” e a excreção é unicamente realizada por mecanismos biológicos (nos casos em que o $T_{1/2}$ físico é muito longo em relação ao $T_{1/2}$ biológico).

- A captação no órgão é “instantânea”, mas a eliminação ocorre por decaimento físico e excreção biológica, sendo neste caso necessário recorrer-se ao valor de $T_{1/2}$ efectivo.
- A captação não é “instantânea”. Este caso refere-se às situações em que o radiotraçador apresenta um padrão de captação lento no órgão em comparação com o $T_{1/2}$ físico.
- A segunda fase da determinação da *dose absorvida* D consiste no cálculo da quantidade total de energia radioactiva emitida pela fonte, que é dependente da energia e da frequência das emissões do radionuclídeo. A energia emitida por unidade de actividade acumulada (\tilde{A}) é dada pela grandeza *Constante de Equilíbrio de Dose Absorvida* [Δ , ($\text{Gy}\times\text{kg} / \text{Bq}\times\text{seg}$)], sendo necessário calcular este factor para cada tipo de emissão do radionuclídeo, de acordo com a equação:

$$\Delta_i = 1,6 \times 10^{-13} N_i E_i \quad (4.6)$$

onde E_i é a energia média (MeV) da emissão nº i e N_i é a frequência relativa dessa emissão. Estes valores encontram-se já calculados para os radionuclídeos com maior interesse em Medicina Nuclear (Cherry et al., 2003).

- Por fim, é necessário determinar a fracção da energia radioactiva emitida pelo órgão-fonte que é absorvida pelo órgão-alvo – Fracção Absorvida (ϕ). Este factor irá depender do tipo e da energia das emissões, bem como das relações anatómicas entre os órgãos – volume, forma, composição do tecido, distância e atenuação. No caso da radiação não-penetrante (energia <10keV) assume-se que toda a energia é depositada no local da emissão. Assim, a fracção absorvida toma o valor de $\phi = 1$, no caso de o órgão fonte e o órgão alvo serem o mesmo e o valor de $\phi = 0$, caso os órgãos sejam diferentes. (Cherry et al., 2003). A dose de radiação D emitida por um órgão fonte e recebida por um órgão-alvo é dada por:

$$\bar{D} = \frac{\tilde{A}}{m_a} \sum_i \phi_i(r_k \leftarrow r_h) \Delta_i \quad (4.7)$$

onde a notação $\phi_i(r_k \leftarrow r_h)$ indica a fracção da energia emitida pelo órgão-fonte (r_h), na emissão nº i , e absorvida pelo órgão-alvo (r_k) e m_a corresponde à massa do órgão alvo. (Cherry et al., 2003).

O cálculo dos valores de ϕ para radiação penetrante (fotões com energia > 10 keV) é bastante complexo devido à dependência que a energia apresenta em relação à atenuação e absorção dos fotões pelos tecidos. Neste sentido foram calculados os valores

de ϕ em modelos matemáticos humanóides, que incorporam órgãos e estruturas anatómicas de tamanho e forma “média” e que se encontram disponíveis em ferramentas electrónicas para cálculo da dose absorvida (Simpkin, 1999). Este problema foi simplificado pela introdução do valor S , a dose média por unidade de actividade acumulada, calculada através da equação 1.7 e sendo a unidade SI Gy/Bq.seg:

$$S(r_k \leftarrow r_h) = \frac{1}{m_a} \sum_i \Delta_i \phi_i(r_k \leftarrow r_h) \quad (4.8)$$

À semelhança dos valores de fracção absorvida, o parâmetro S foi calculado para diferentes pares de órgãos-fonte/alvo e para os radionuclídeos com maior interesse em Medicina Nuclear (Simpkin, 1999), tendo sido disponibilizado através do código MIRDOSE, nos anos 90 (Stabin e Brill, 2008). Dado o valor de S e da Actividade Acumulada \tilde{A} , a dose absorvida média recebida por um órgão-alvo é dada pela equação (1.8):

$$\bar{D}(r_k \leftarrow r_h) = \tilde{A} \times S(r_k \leftarrow r_h) \quad (4.9)$$

4.1.3. RAdiation Dose Assessment Resource (RADAR)

Este sistema consiste num recurso electrónico na Internet com o objectivo de providenciar uma disseminação rápida e numa escala mundial de dados importantes relacionados com os cálculos dosimétricos. O sistema RADAR apresenta provavelmente a fórmula mais simples e genérica para o cálculo da dose absorvida acumulada, já descrita na equação (1.1).

$$D = N \times DF \quad (4.10)$$

Onde N corresponde ao número de desintegrações que ocorre no órgão fonte e DF :

$$DF = \frac{k \sum_i y_i E_i \phi_i}{m} \quad (4.11)$$

O parâmetro DF é conceptualmente idêntico ao valor S definido pelo sistema MIRD.

Com base nos conceitos apresentados, foi desenvolvido pelos membros do sistema RADAR o código de software OLINDA/EXM (Organ Level INternal Dose Assessment / EXponential Modeling), uma versão revista e actualizada do código MIRDOSE do sistema MIRD, reescrita na linguagem de programação Java. No presente trabalho foi utilizado o software OLINDA para o cálculo da dose absorvida, sendo os *inputs* obtidos a partir de dados de modelo animal, que será brevemente referido.

4.2. Dosimetria em modelo animal

A estimativa da dose de radiação conferida por radiofármacos em fase de investigação é frequentemente realizada com recurso a modelos animais, nomeadamente pequenos roedores. A realização de estudos de biodistribuição nestes animais é um dado fundamental para a extrapolação de potenciais doses desses agentes em humanos. Para além deste facto, o surgimento de inúmeras aplicações terapêuticas envolvendo emissores internos testados em modelos animais torna o cálculo da dose estimada para os animais de extrema importância na explicação e controlo de potenciais episódios de radiotoxicidade observados durante os estudos (Stabin, 2006).

Nos estudos em modelo animal o composto é administrado num determinado número de animais que são posteriormente sacrificados em diferentes tempos, podendo realizar-se aquisição de imagens dos animais e/ou colheita dos órgãos para contagem da actividade (Stabin, 2008). Contudo a realização destes estudos necessita de preparação prévia, nomeadamente informação relativa aos resultados esperados. Alguns desses dados incluem a identificação dos órgãos-fonte, que se espera apresentar concentração significativa do radiofármaco, dos tempos de captação, retenção e excreção esperados para os órgãos-fonte, que irão influenciar o número e o momento das medições para colheita de dados, e as vias de excreção esperadas. Estes dados irão delinear o procedimento implementado nos estudos de biodistribuição. A interpretação dos resultados obtidos poderá ser realizada com base na obtenção de um modelo cinético, a partir das curvas actividade-tempo correspondente a cada órgão-fonte (Stabin, 2008).

À semelhança dos métodos estabelecidos e utilizados em modelos humanos, têm surgido algumas aproximações recorrendo a modelos animais teóricos, com simulação do transporte de radiação, permitindo obter factores de dose para órgãos-fonte e -alvo definidos. Alguns modelos aplicados recorrem a formas geométricas para a representação dos órgãos, nomeadamente formas elipsóides, podendo destacar outros com formas diferentes, como a aplicação de formas cilíndricas na representação do osso e medula óssea. O recurso a modelos realísticos permite a definição do tamanho, da forma e da sobreposição entre vários órgãos, baseando-se em diferentes modalidades de imagem médica morfológica, como a Tomografia Computorizada e a Ressonância Magnética Nuclear (Stabin, 2006).

VIII. *Resultados e Discussão*

Tendo em conta os métodos existentes para a detecção de obstipação, o desenvolvimento de técnicas capazes de auxiliar no diagnóstico diferencial, de forma não invasiva, pode ser um acréscimo à avaliação pré-tratamento. Se este factor estiver associado à possibilidade de obter imagens funcionais com a consequente localização e quantificação, a informação adicional obtida pode colmatar falhas observadas noutras técnicas de diagnóstico. A medicina nuclear pode constituir uma das soluções para esta aproximação, já que, através da administração de um radiofármaco, com características adequadas, é possível localizar e quantificar regiões de atraso no trânsito intestinal e indicar as causas mais prováveis subjacentes à presença de obstipação.

Sabe-se que compostos como a LBG e o quitosano, quando administrados oralmente, percorrem o tubo digestivo sem sofrer degradação por processos digestivos ou de fermentação e sem serem absorvidos quer ao nível gástrico quer ao nível intestinal.

Neste trabalho foi realizado um estudo comparativo entre dois polissacáridos marcados com ^{99m}Tc : a goma de alfarroba (LBG) e o quitosano, com o objectivo de verificar se algum dos compostos apresenta características radioquímicas e biológicas mais favoráveis do que os radiofármacos actualmente em utilização clínica e que permitam a sua substituição. Para tal realizou-se a síntese dos respectivos complexos de ^{99m}Tc , avaliou-se a sua estabilidade *in vitro*, o comportamento biológico em modelo animal e a biodistribuição. Realizaram-se ainda os cálculos de dosimetria interna de modo a avaliar o risco potencial de desenvolvimento de efeitos biológicos pela radiação emitida por cada radiofármaco. Os resultados obtidos serão apresentados seguidamente, tendo sido recolhidos através da implementação dos procedimentos descritos no Capítulo X – Procedimentos Experimentais.

1. Estudo da solubilidade da LBG em solução aquosa

De acordo com os objectivos subjacentes à realização do estudo do trânsito do cólon abordados no capítulo VII, os radiofármacos a desenvolver deverão encontrar-se em solução aquosa, facilitando a síntese dos complexos, a ingestão por parte do doente e permitindo a sua diluição no restante conteúdo intestinal. Por este motivo, estudou-se inicialmente a solubilidade da LBG em solução aquosa, com o objectivo de observar a sua dissolução e a eventual formação de gel.

A dissolução da goma de alfarroba (LBG) em água destilada, à temperatura ambiente, numa concentração de 10mg/ml, produz a formação de uma suspensão que, quando aquecida a 90°C, solubiliza sob a forma de gel. Após o arrefecimento a viscosidade da solução aumenta. Quando a dissolução da goma é realizada directamente com água destilada a 90°C observa-se a solubilização imediata sob a forma de gel. A capacidade de formação de um gel a partir da molécula em suspensão pode ser uma vantagem, caso se verifique que a marcação é estável após o aquecimento, uma vez que permite obter informação funcional do trânsito do cólon através de imagens da progressão de um radiofármaco que pode ser preparado sob a forma líquida ou mais espessa.

A adição de solventes orgânicos, como o etanol a 10% (v/v) e o propilenoglicol, à suspensão de LBG em água destilada, à temperatura ambiente, tendo como objectivo a dissolução total da LBG, revelaram-se ineficazes.

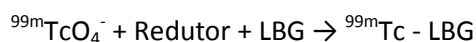
Dada a grande variação dos valores de pH ao longo do tubo digestivo, considerou-se necessário assegurar que a LBG mantinha a integridade durante o percurso após a administração oral. Nesse sentido, realizou-se o estudo da variação dos valores de pH entre 2 e 13, à temperatura ambiente, verificando-se que a suspensão é estável numa vasta gama de valores de pH, mantendo as suas características físicas. Apenas a valores de pH inferiores a 3 se observou o aparecimento de partículas em suspensão.

2. Síntese do complexo LBG-^{99m}Tc

Uma vez que não foi possível dissolver totalmente a LBG em solução aquosa procedeu-se à marcação radioactiva da suspensão obtida com LBG e em água destilada à temperatura ambiente (10mg/ml).

2.1. Optimização da quantidade de cloreto estanoso

Procedeu-se ao desenvolvimento de um método directo de redução para marcação da LBG com ^{99m}Tc, que envolveu a utilização de cloreto estanoso como agente redutor. Neste processo, a síntese do radiofármaco ocorre por redução do ^{99m}TcO₄⁻ (VII) a estados de oxidação inferiores por acção do agente redutor, na presença da LBG:



Para o efeito foram utilizadas soluções com diferentes concentrações de SnCl₂ com vista a optimizar o seu valor na marcação da LBG, conforme descrito no Capítulo X. As restantes condições experimentais de marcação foram mantidas ao longo do estudo de optimização. Os valores de pureza radioquímica obtidos ao longo do tempo, em função da concentração de SnCl₂.2H₂O, são apresentados na Figura 12. A média dos valores obtidos e os respectivos desvios padrão constam da Tabela 8.

A concentração de SnCl₂ = 2,1 × 10⁻⁴ mmol/ml apresenta os valores de pureza radioquímica mais elevados e estáveis, (99,9%) (Tabela 8). A estabilidade traduz-se pela menor variação ao longo do tempo, mantendo a proximidade em torno dos 100%, verificada na Figura 12, e pelo menor valor de desvio padrão – 0,15%, registado na Tabela 8. Observa-se ainda que as preparações com 2,1 × 10⁻⁴ mmol/ml de SnCl₂ atingem o valor mais elevado de pureza radioquímica (100%) 30 minutos após o início da reacção, mantendo-se durante pelo menos 24 horas (1440 minutos) à temperatura ambiente.

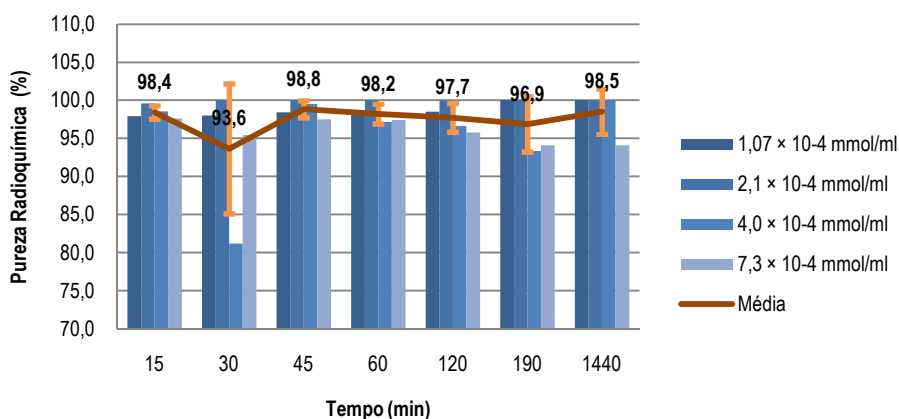


Figura 12 - Pureza radioquímica da LBG-^{99m}Tc (%) ao longo do tempo em função da concentração de SnCl₂ (mmol/ml). Média e desvio padrão dos resultados obtidos para cada tempo estudado.

Tabela 8 - Pureza radioquímica da LBG-^{99m}Tc (%) em função da concentração de SnCl₂ (mmol/ml). Valores médios e aos 60 minutos.

Concentração de SnCl ₂ (mmol/ml)	Pureza radioquímica (%)	
	60 min	Média (desvio padrão)
1,07×10 ⁻⁴	98,4	98,7 (±0,89)
2,1×10 ⁻⁴	100,0	99,9 (±0,15)
4,0×10 ⁻⁴	99,5	95,2 (±6,57)
7,3×10 ⁻⁴	97,5	96,0 (±1,56)

As preparações estudadas com diferentes concentrações apresentam igualmente média dos valores de pureza radioquímica bastante elevados (95,2% - 98,5%) e de acordo com os valores aceites pela comunidade científica (>90%) (Decristoforo e Zolle, 2007). Contudo possuem desvios padrão mais elevados (0,76% - 6,57%) (Tabela 8) que confirmam a maior dispersão dos resultados ao longo do tempo, observada na Figura 12, para cada concentração avaliada. Apesar de aos 15 minutos de reacção se verificarem valores de pureza radioquímica próximos (97,6% – 98,5%) entre todas as quantidades de SnCl₂.2H₂O estudadas, observa-se uma maior heterogeneidade de resultados após trinta minutos. De um modo geral, observa-se que os resultados estabilizam a partir dos 45 minutos, apresentando uma variação média máxima de 1,9% (96,9% - 98,8%). Face aos resultados obtidos, optou-se por utilizar a concentração de 2,1 × 10⁻⁴ mmol de SnCl₂.2H₂O nas preparações seguintes.

2.2. Optimização do volume de ^{99m}Tc

De acordo com a literatura consultada, alguns autores (Eun-Mi Kim, M.S. et al, 2005) obtiveram elevadas eficiências de marcação de um outro polissacárido utilizando um volume de 0,3 ml ^{99m}Tc . Neste sentido procurou-se estudar o efeito do volume de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ na marcação da LBG utilizando os volumes de 0,3ml e 0,5ml.

O composto foi sintetizado de modo a analisar a variável “volume de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ” ao longo do tempo, como consta na Figura 13. Para ambos os volumes analisados observa-se um aumento gradual da pureza radioquímica ao longo do tempo de incubação, que converge com o período inicial de incubação, no qual ocorre a marcação do composto, e já verificado durante o estudo de optimização da concentração de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Este aumento verifica-se até aos 60 minutos, para as marcações com 0,5 ml ($\text{EM}_{\text{máx}}=97,4\%$) e até aos 120 minutos para as marcações com 0,3 ml ($\text{EM}_{\text{máx}}=100\%$). Após estes períodos de incubação observam-se comportamentos distintos: uma diminuição da pureza radioquímica nas preparações com 0,5 ml de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e uma pureza de aproximadamente 100% nas preparações com 0,3 ml de solução de radionuclídeo. Ao longo do tempo estudado observa-se ainda que a pureza radioquímica se manteve acima dos 90% para qualquer das preparações. Numa perspectiva global, a média dos valores obtidos para cada variável traduz os resultados observados ao longo do tempo, nos quais as marcações com 0,3 ml de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ($\mu=98,2\% \pm 2,18$) apresentam eficiências de marcação superiores àquelas obtidas pelas marcações com 0,5 ml ($\mu=95,3\% \pm 1,73$), tendo sido seleccionado o volume de 0,3 ml de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ para as marcações subsequentes.

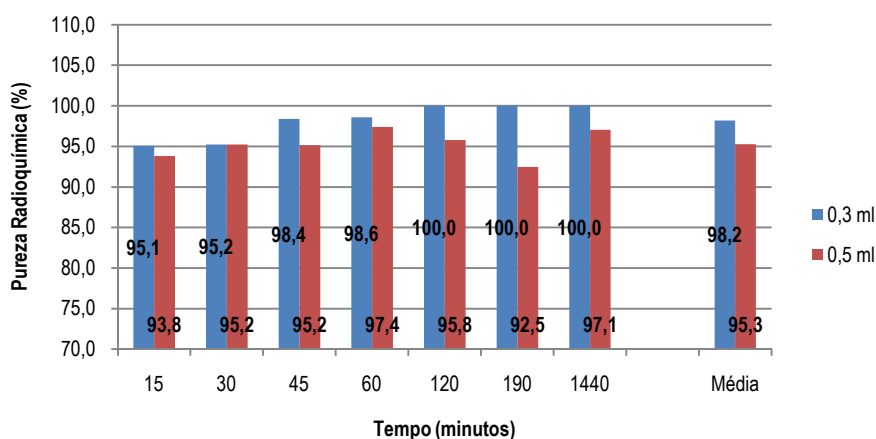


Figura 13 - Pureza radioquímica da LBG- ^{99m}Tc (%) ao longo do tempo após marcação com 0,3 ml e 0,5 ml de ^{99m}Tc

2.3. Efeito da variação do pH na marcação da LBG com ^{99m}Tc

De acordo com o método descrito no Capítulo Procedimentos Experimentais, prepararam-se várias soluções de LBG com 0,05mg ($2,2 \times 10^{-4}$ mmol) de SnCl_2 , às quais se adicionaram diferentes volumes de NaOH 0,1N, para estudar o efeito da variação do pH na eficiência de marcação do composto. Na Tabela 9 é possível observar os resultados obtidos.

Tabela 9 - Pureza radioquímica da LBG- ^{99m}Tc (%) em função do valor de pH a que ocorre a reacção de marcação (Média \pm desvio padrão)

Valor de pH	Pureza radioquímica (%)
	Média (desvio padrão)
3 a 4	99 ($\pm 2,3$)
4,5	≈ 100 ($\pm 0,0$)
5	94 ($\pm 0,9$)
6	91 ($\pm 15,7$)
7	95 ($\pm 5,7$)
8	≈ 100 ($\pm 0,0$)
9	92 ($\pm 9,5$)

Com a aplicação do protocolo descrito foi possível estudar um largo espectro de valores de pH (de pH=3 a pH=9) e observar a influência deste parâmetro no processo de síntese do radiofármaco. O valor de pH inicial das preparações, antes da adição da solução de NaOH variou entre 3 a 4, com a média de pureza radioquímica de $99\% \pm 2,3$. Através da análise da Tabela 9 é possível observar que, para todos os valores de pH estudados, a pureza radioquímica do radiofármaco se manteve acima dos 90% (91% - 100%) e, em 57% dos valores estudados, acima dos 95%, dados concordantes com os valores já descritos e aceites pela comunidade científica (>90%) (Decristoforo e Zolle, 2007). O valor que apresenta resultados mais baixos (pH=6) (EM=91% $\pm 15,7$) é também aquele cujo desvio padrão é mais acentuado. Os valores de pH=4,5 e pH=8 apresentam eficiências de marcação de aproximadamente 100%. De um modo geral a variação do valor de pH antes da reacção de marcação demonstrou que esta ocorre a qualquer valor de pH. Contudo, a formação de complexos de ^{99m}Tc com eficiência de marcação mais elevada ocorre quando o valor de pH se encontra entre pH=3 a 4,5 e pH=8, conduzindo à formação de complexos com estabilidade *in vitro* aceitável.

2.4. Estabilidade in vitro da LBG-^{99m}Tc após diluição

O estudo da estabilidade do complexo sintetizado após diluição é incontornável, uma vez que este parâmetro poderá sofrer alterações em duas fases da realização da cintigrafia de trânsito do cólon: antes da administração do radiofármaco, caso seja conveniente administrá-lo num volume superior ao volume de marcação e após a administração do radiofármaco, devido à diluição no restante conteúdo gástrico e intestinal.

A realização do estudo da estabilidade da solução de LBG-^{99m}Tc após variação do volume integrou várias preparações, de acordo com o método descrito na parte experimental (Capítulo X). A diluição para o volume de 10 ml foi realizada após 30 minutos, tendo sido determinada a pureza radioquímica das preparações até aos 180 minutos.

Os resultados obtidos foram comparados com o resultado médio correspondente à concentração de $2,1 \times 10^{-4}$ mmol/ml de cloreto estanoso, presente na Tabela 8. Na globalidade, os valores da pureza radioquímica de 1 para 10 ml, são mantidos, observando-se apenas um aumento da dispersão dos resultados ($\sigma=99,3\% \pm 1,9$), o que indica que a pureza radioquímica do composto não é alterada pela sua diluição (Figura 14). Os dados são igualmente coerentes com a avaliação da estabilidade ao longo do tempo, após diluição para o volume de 10 ml, na qual se verifica um aumento a partir do valor de 95% aos 30 minutos até aproximadamente 100% aos 120 minutos, mantendo-se o padrão de evolução da pureza radioquímica observado nas preparações não diluídas.

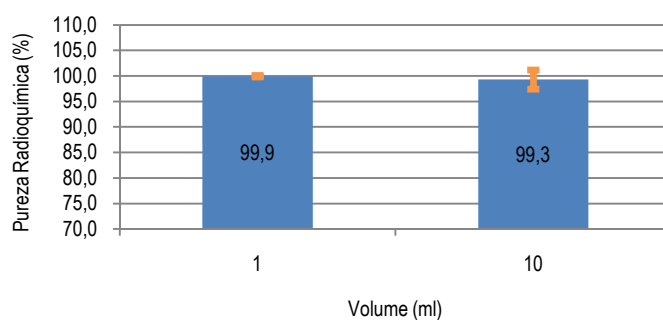


Figura 14 - Pureza radioquímica da ^{99m}Tc-LBG (%) com volume da solução = 1 ml e após diluição para o volume de 10 ml

Estes dados são fundamentais segundo duas perspectivas: a primeira, relacionada com o radiofármaco a administrar, já que o facto do composto manter a estabilidade após diluição permite a sua administração em volumes superiores ao volume de marcação, no caso de a

situação clínica o justificar. A segunda perspectiva está relacionada com a incorporação e consequente diluição do radiofármaco nos fluidos do tubo digestivo.

2.5. Estabilidade da preparação após variação da temperatura

No seguimento dos ensaios anteriores realizou-se o estudo da estabilidade da preparação LBG-^{99m}Tc após variação da temperatura. Obteve-se um valor médio de pureza radioquímica de 97,9%±4,8% para o volume de 1 ml e 100%±1,2% para o volume de 10 ml. Os cromatogramas apresentados seguidamente ilustram os resultados descritos.

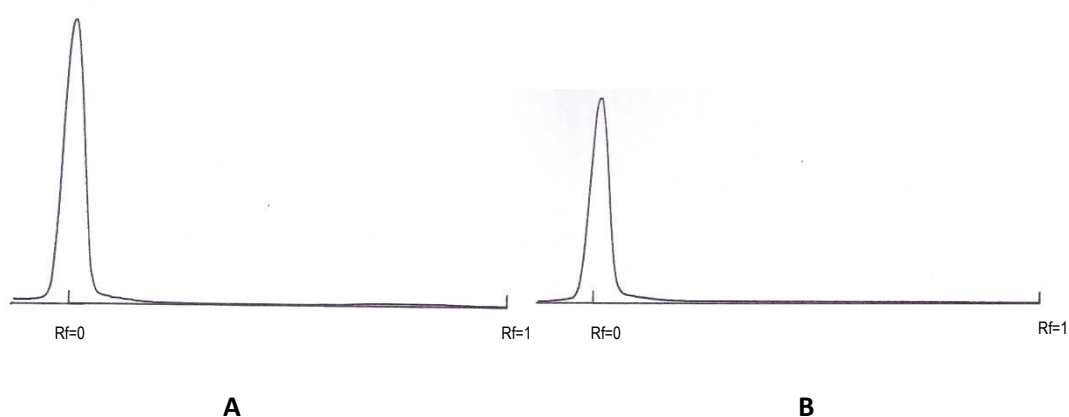


Figura 15 – Cromatogramas referentes à estabilidade da LBG-^{99m}Tc após variação da temperatura.
A–1ml; B–10ml

De acordo com os resultados obtidos conclui-se que a estabilidade do composto é mantida com o aumento da temperatura a 37°C, permitindo a sua administração em humano.

2.6. Síntese do complexo quitosano-^{99m}Tc

O quitosano é um polissacárido linear composto por β-(1-4) D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina. É obtido através da quitina, o elemento estrutural do exosqueleto dos crustáceos. O grupo amina tem um pKa ≈ 6,5, sendo este polissacárido solúvel em soluções ácidas a neutras. Permite o transporte de drogas polares através de superfícies epiteliais e é biocompatível e biodegradável. É dissolvido por completo em ácido acético, podendo, posteriormente, ser diluído em água.

Para a marcação com ^{99m}Tc foi adaptado o procedimento descrito por Eun-Mi Kim, M.S. et al (2005), utilizando uma concentração do polissacárido de 1mg/ml, conforme descrito no Capítulo dos Procedimentos Experimentais. Estudaram-se duas concentrações de SnCl_2 : $7,3 \times 10^{-5}$ mmol/ml, publicada por Eun-Mi Kim, M.S. et al (2005) e $2,1 \times 10^{-4}$ mmol/ml analisada na marcação da LBG no presente trabalho, onde se obtiveram resultados bastante satisfatórios. A eficiência de marcação das preparações ao longo do tempo em função da concentração de cloreto estanoso foi avaliada através da determinação da pureza radioquímica, como consta nos gráficos abaixo.

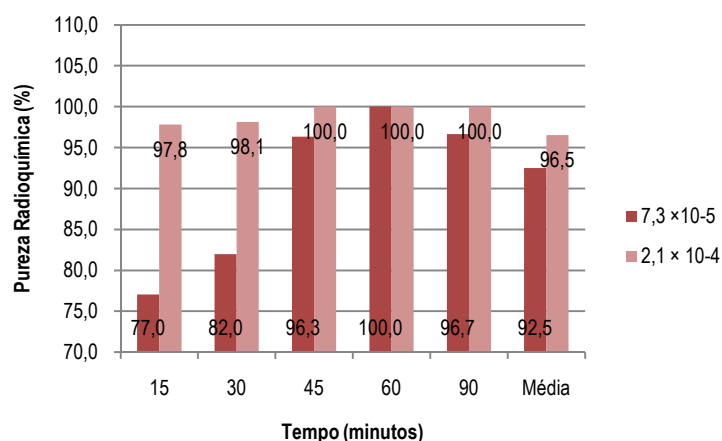


Figura 16 - Pureza radioquímica do quitosano- ^{99m}Tc (%) ao longo do tempo em função da concentração de SnCl_2 (mmol/ml) e média dos resultados.

Os resultados expressos na Figura 16 demonstram que a utilização de $2,1 \times 10^{-4}$ mmol/ml de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ conduz a valores de pureza radioquímica mais elevados em qualquer dos tempos de incubação avaliados. Observa-se que nos tempos iniciais, 15 e 30 minutos, os resultados obtidos com $7,3 \times 10^{-5}$ mmol/ml de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ são significativamente inferiores aos obtidos nas preparações com concentração mais elevada. Esta diferença diminui aos 45 e 60 minutos após o início da marcação, havendo uma aproximação ao valor ideal de 100%. Aos 90 minutos observa-se ainda que os resultados obtidos através das preparações com de $2,1 \times 10^{-4}$ mmol/ml de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se mantêm nos 100%, enquanto se verifica uma diminuição de cerca de 3% nos resultados de $7,3 \times 10^{-5}$ mmol/ml de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

De igual modo a média dos valores traduzem a superioridade dos resultados obtidos com $2,1 \times 10^{-4}$ mmol/ml de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Os valores de desvio padrão acentuam a heterogeneidade de resultados observada com a utilização de $7,3 \times 10^{-5}$ mmol de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\sigma=10\%$), face ao valor

apresentado pela utilização de $2,1 \times 10^{-4}$ mmol/ml ($\sigma=1,1\%$). Estes resultados estão relacionados com a disponibilidade do agente redutor que deverá ser utilizado em excesso tendo em vista a quantidade de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ a utilizar. Contudo deverá ser a quantidade mais baixa possível de modo a não conduzir o $^{99m}\text{TcO}_4^-$ a um estado de oxidação demasiado baixo, no qual não ocorra a marcação do polissacárido (Spies e Pietzsch, 2007).

3. Formulação sob a forma de kit

A maioria dos radiofármacos está disponível sob a forma de mistura reaccional liofilizada ou congelada, em concentrações e condições farmacêuticas tais que, por simples adição de pequenos volumes de solução aquosa de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ se obtém o radiofármaco pretendido, com rendimento reaccional elevado, pronto a ser administrado (Mallol J e Zolle I, 2007). Uma vez que as preparações de radiofármacos sob a forma de kit são vantajosas (Spies e Pietzsch, 2007), estudou-se a possibilidade de formular cada preparação (LBG e quitosano) sob a forma de mistura reaccional pronta a marcar. Para o efeito procedeu-se à preparação de soluções-mãe de LBG e quitosano com agente redutor nas concentrações e condições experimentais de acordo com o protocolo optimizado. A fim de definir as condições de armazenagem que garantissem uma melhor qualidade da preparação final foi também estudado o efeito da sua liofilização e congelação. A qualidade das soluções-mãe foi avaliada imediatamente após o seu fraccionamento e antes da implementação dos processos de conservação (liofilização e congelação). Deste modo garantiram-se elevados padrões de qualidade da solução, podendo-se avaliar, de modo independente, a influência do processo de preservação na marcação do radiofármaco, excluindo, assim, factores relacionados com a preparação.

3.1. Preparação das soluções para a formulação final

A qualidade da formulação final foi avaliada através da eficiência de marcação e pureza radioquímica. Este parâmetro foi avaliado ao longo do tempo, constando os resultados nas tabelas apresentadas abaixo.

Tabela 10 - Pureza radioquímica (%) da solução-mãe de LBG com ^{99m}Tc , em função do tempo

<i>Tempo (min)</i>	<i>Pureza Radioquímica (%)</i>
15	95,9
30	97,0
45	98,0
60	98,0
90	98,0
120	100,0
210	100,0
300	100,0

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 10 observa-se que estas preparações apresentam elevada pureza radioquímica após 15 minutos de incubação (>95%), aumentando continuamente até atingir o valor de aproximadamente 100% aos 120 minutos. Observa-se ainda, através do desvio padrão ($\sigma_{\text{máx}}=5,6\%$), que os resultados individuais de cada preparação foram bastante homogêneos em relação ao resultado global.

Tabela 11 - Pureza radioquímica (%) da solução-mãe de quitosano com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ em função do tempo

<i>Tempo (min)</i>	<i>Pureza Radioquímica (%)</i>
15	97,3
30	99,3
45	99,9
60	99,6
90	99,8
150	100,0

Todos os resultados obtidos são superiores a 95%, ($\mu=99,3\%$) (Tabela 11), sendo caracterizados por elevada homogeneidade, que se reflecte no valor do desvio padrão ($\sigma=1,03$).

As soluções-mãe de LBG e quitosano preparadas de acordo com o procedimento otimizado no sub-capítulo anterior mantêm a mesma qualidade radioquímica que as soluções preparadas individualmente, tendo, por este motivo, sido utilizadas nos restantes estudos realizados.

3.2. Síntese do complexo LBG- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ a partir de kits congelados e liofilizados

Após a marcação de várias preparações de misturas reaccionais de LBG congelada e liofilizada, estudou-se a estabilidade *in vitro* ao longo do tempo, mantendo o volume de marcação final. Após reconstituição e marcação da solução liofilizada obteve-se uma suspensão final com partículas de grande tamanho que não se dissolviam com o passar do tempo e agitação do frasco. Consequentemente as eficiências de marcação foram significativamente inferiores às da marcação das soluções extemporâneas só atingindo valores aceitáveis 60 minutos pós início da reacção de marcação. No entanto a pureza radioquímica não se mantém estável ao longo do tempo. Na Figura 17 é possível observar os resultados obtidos.

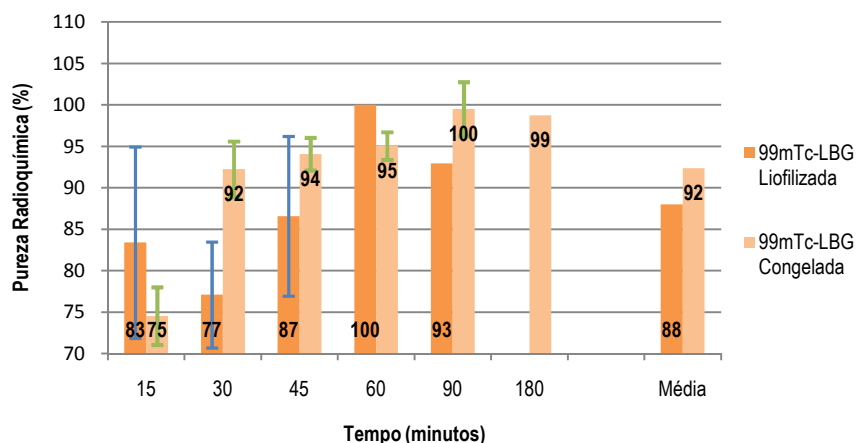


Figura 17- Pureza radioquímica (%) em função do tempo e média global, da LBG-^{99m}Tc preparada a partir da solução-mãe congelada e liofilizada.

Relativamente à solução conservada a -20°C, embora, nos tempos iniciais, apresente valores de eficiência de marcação inferiores, quando comparados com os valores da solução extemporânea ou mesmo da solução-mãe, rapidamente atinge valores >90% (30 minutos após marcação), alcançando o valor de aproximadamente 100% após 90 minutos de incubação. Verifica-se ainda pouca heterogeneidade nos resultados de cada tempo, traduzido pelo valor do desvio padrão correspondente ($\sigma_{\min}=1,6$ e $\sigma_{\max}=4,4$).

De um modo geral a pureza radioquímica do complexo de ^{99m}Tc obtida a partir da solução sob forma liofilizada é inferior à da solução congelada. Observa-se na Figura 17 uma variação acentuada dos valores, caracterizando-se por uma descida inicial do resultado, seguida de um aumento dos valores até aproximadamente 100% aos 60 minutos e novamente uma descida acentuada (7%) aos 90 minutos após o início da reacção de marcação. Até aos 45 minutos verifica-se que a solução liofilizada apresenta valores inferiores a 90%, não estando de acordo com os valores de eficiência de marcação de referência (>90%). Este período corresponde ao tempo de incubação necessário para a marcação, que ocorre aos 60 minutos. Contudo parece ser instável, já que aos 90 minutos se observa uma diminuição do valor da pureza radioquímica, provavelmente por degradação do composto. Verificam-se ainda desvios padrão mais elevados que na solução congelada (6,4 a 11,5 %) traduzindo uma maior heterogeneidade dos resultados. Os resultados apresentados poderão estar relacionados com a dificuldade de total solubilização do composto liofilizado após a reconstituição da formulação. A formação de agregados do polissacárido, que permanecem em suspensão, poderá resultar de uma conformação diferente adoptada pela molécula após o processo de liofilização e que resulta numa menor exposição dos grupos carboxilo que promovem a ligação

ao radionuclídeo. Por estes motivos optou-se por realizar os estudos de estabilidade *in vitro* seguintes apenas com a LBG-^{99m}Tc obtida a partir de soluções congeladas.

3.3. Síntese do complexo quitosano-^{99m}Tc a partir de kits congelados e liofilizados

Foram marcadas várias preparações após congelamento ou liofilização, tendo-se realizado o estudo da estabilidade *in vitro* ao longo do tempo, mantendo o volume de marcação final. Na Figura 18, apresentada de seguida, é possível observar os resultados obtidos.

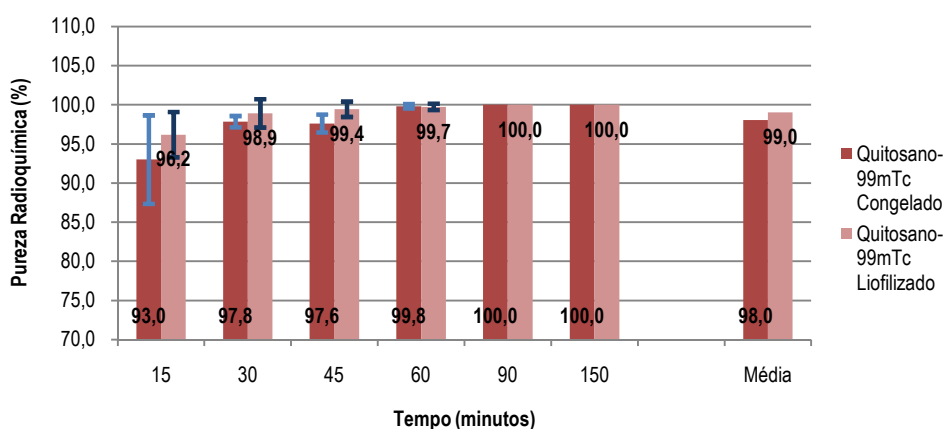


Figura 18 - Pureza radioquímica (%) em função do tempo e média global, do quitosano-^{99m}Tc preparado a partir da solução-mãe congelada e liofilizada.

Ambos os processos de conservação (liofilização e congelação) estudados apresentam resultados bastante próximos e com um padrão de distribuição semelhante. Nos tempos iniciais observam-se valores de eficiência de marcação mais baixos para ambas as preparações do que no caso das preparações extemporâneas, verificando-se um aumento gradual da pureza radioquímica até ser atingido o valor de aproximadamente 100% aos 90 minutos. Este período corresponde ao tempo de incubação necessário para que ocorra a reacção de marcação da molécula, e que já se tinha verificado na solução inicial. Embora com diferenças pouco significativas, os valores de pureza radioquímica apresentados pelas soluções liofilizadas ao longo do tempo são superiores aos valores obtidos pelas soluções congeladas, facto igualmente observável através da média dos valores obtidos (98% vs. 99%). De um modo geral os dados apresentam elevada homogeneidade, com valores de desvio padrão a variar entre 1,5% (solução liofilizado) e 2,7% (solução congelada), pelo que se optou pela liofilização do composto.

3.4. Estabilidade in vitro das preparações após marcação com ^{99m}Tc

Uma vez que a eficiência de marcação da LBG- ^{99m}Tc preparada a partir da formulação liofilizada é significativamente inferior à eficiência de marcação do complexo obtido através da formulação congelada, optou-se por estudar apenas a estabilidade *in vitro* das preparações congeladas. Relativamente ao quitosano- ^{99m}Tc , uma vez que foram obtidas purezas radioquímicas muito próximas em ambos os processos de conservação, optou-se por estudar a estabilidade *in vitro* dos complexos obtidos a partir de formulações liofilizadas e congeladas.

3.4.1. Estudo do efeito da diluição

Uma vez que o objectivo é preparar um radiofármaco para administração oral é importante assegurar a estabilidade *in vitro* ao longo do tempo das preparações submetidas a um processo de diluição.

▪ LBG- ^{99m}Tc

Procedeu-se à marcação de várias soluções de LBG congeladas e estudou-se o efeito da diluição para 5 e 10 ml, através do método descrito nos Procedimentos Experimentais. Obteve-se os resultados apresentados e discutidos seguidamente.

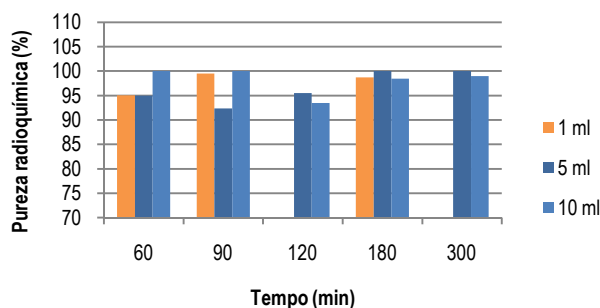


Figura 19 - Pureza radioquímica em função do tempo, da LBG- ^{99m}Tc (%) preparada a partir da solução-mãe congelada, no volume de marcação de 1 ml e após diluição para 5 e 10 ml.

Analisando o resultado da variação ao longo do tempo para a solução de LBG congelada e para ambas as diluições (Figura 19) observa-se que nos tempos de incubação iniciais a diluição de 10 ml conduz a uma pureza radioquímica mais elevada. Por outro lado, a diluição da preparação para 5 ml, que inicialmente apresenta valores de pureza radioquímica entre os 90-

95%, aumenta os seus resultados aos 120 minutos, atingindo aproximadamente 100% aos 180 minutos e mantendo este valor até ao último tempo estudado.

Através da Figura 20 observa-se que o comportamento global é mantido para ambos os volumes de diluição, no caso da solução congelada, tendo-se o valor da pureza radioquímica mantido acima dos 90% (5ml = 97%±3,4; 10 ml = 98% ± 2,7). Nesta perspectiva os valores obtidos pela diluição para 10 ml apresentam-se mais favoráveis em relação aos valores obtidos para os 5ml.

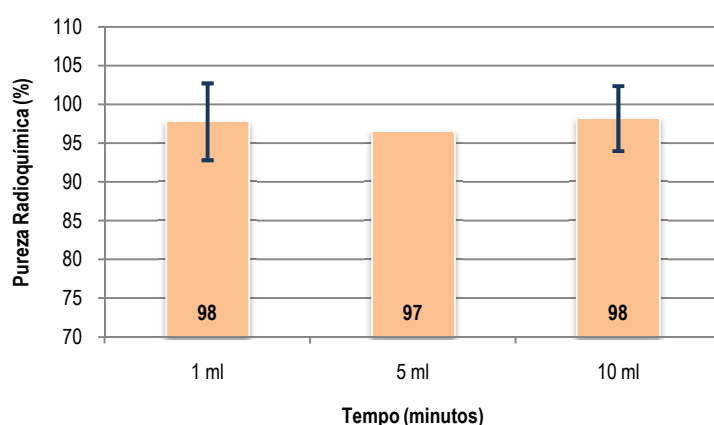


Figura 20 - Valor médio global da pureza radioquímica da LBG-^{99m}Tc (%) preparada a partir da solução-mãe congelada, no volume de marcação de 1 ml e após diluição para 5 e 10 ml.

▪ **Quitosano-^{99m}Tc**

Na sequência do estudo do efeito da diluição das misturas reaccionais de LBG foi igualmente realizado o mesmo estudo para os kits de quitosano. Para tal, procedeu-se à marcação de várias preparações congeladas e liofilizadas, de acordo com o método descrito, tendo-se obtido os resultados apresentados seguidamente.

Observa-se que a diluição para 5ml ou 10 ml da solução liofilizada não provoca alterações significativas nos valores de pureza radioquímica (Figura 21), que se mantêm próximos dos 100%.

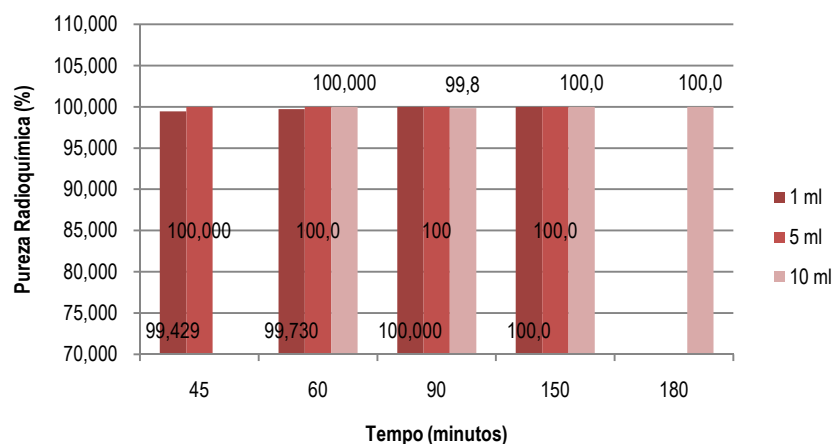


Figura 21 - Pureza radioquímica em função do tempo, do quitosano-^{99m}Tc (%) preparado a partir da solução-mãe liofilizada, no volume de marcação de 1 ml e após diluição para 5 e 10 ml.

Através das médias dos resultados obtidos para cada volume estudado verifica-se que ocorreu uma melhoria na pureza radioquímica quando se procedeu à diluição de ambas as soluções, congeladas e liofilizadas. Contudo, essa melhoria não se revela significativa nas soluções liofilizadas, já que o valor referente ao volume de 1ml se encontra muito próximo dos 100%. No que se refere aos resultados das soluções congeladas observa-se que o aumento do volume de diluição é igualmente acompanhado por um ligeiro aumento da média da pureza radioquímica até ao resultado aproximado de 100% (Figura 22).

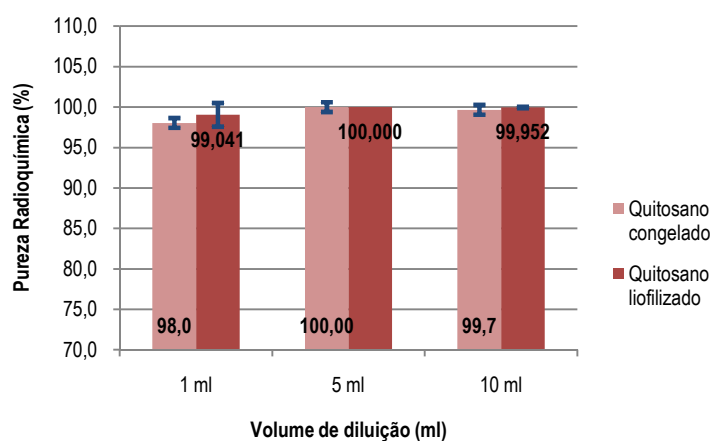


Figura 22 - Pureza radioquímica do quitosano-^{99m}Tc (%) preparado a partir da solução-mãe congelada e liofilizada, no volume de marcação de 1 ml e após diluição para 5 e 10 ml (Média + desvio padrão)

3.4.2. Estudo da variação do pH

A variação do pH foi realizada com o objectivo de estudar a estabilidade da LBG-^{99m}Tc e do quitosano-^{99m}Tc num largo espectro de pH, na perspectiva de antecipar a estabilidade das preparações *in vivo* em consequência das variações de pH verificadas ao longo do tracto gastrointestinal (estômago: pH = 2; cego: pH = 13). Neste sentido o estudo da variação do pH após a marcação de ambas as preparações foi efectuado em meio ácido e posteriormente em meio básico, permitindo observar o seu comportamento.

▪ LBG-^{99m}Tc

Após a marcação da mistura reaccional de LBG congelada com ^{99m}Tc verifica-se que o seu pH é de 3 a 4, estando a sua variação associada a alterações na pureza radioquímica, como consta do Figura 23.

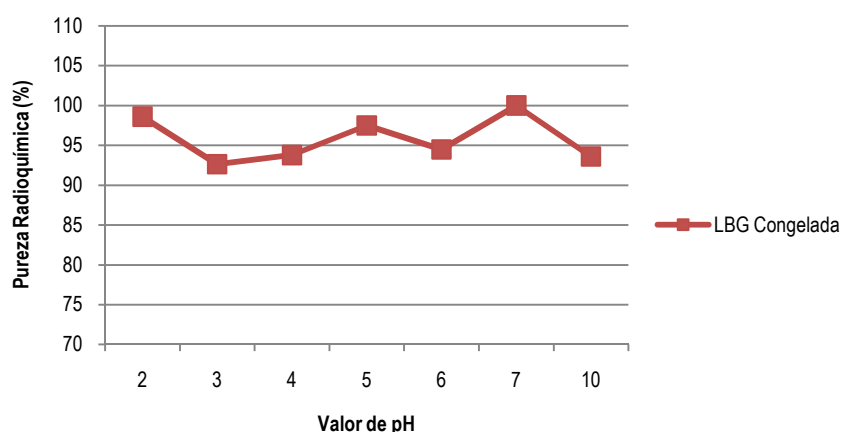


Figura 23 - Valor médio global da pureza radioquímica da LBG-^{99m}Tc (%) preparada a partir da solução-mãe congelada após variação do pH.

De um modo geral a variação do pH a partir do valor após a marcação (pH=3-4) resultou num aumento da pureza radioquímica (+5,1% - decréscimo do pH; +3,2% - aumento do pH) da LBG-^{99m}Tc. Dada a sequência do procedimento implementado, em que se expôs inicialmente o radiofármaco a um pH = 2 e, progressivamente, aumentou-se até um pH = 10, verifica-se que o aumento da pureza radioquímica não foi gradual, tendo regredido uma média de 1,9% com o aumento do valor de pH. Verifica-se que o maior decréscimo ocorre a pH = 6. Contudo, todos os valores obtidos apresentam-se acima dos 90%, sendo concordantes com os resultados obtidos na variação do pH do complexo obtido através da solução extemporânea e sugerindo a estabilidade *in vitro* de pH=2 a pH=10.

▪ Quitosano-^{99m}Tc

Relativamente à síntese do complexo quitosano-^{99m}Tc, a partir do kit congelado, verifica-se que o seu pH é de 4, enquanto no caso do composto liofilizado é de 5,5, encontrando-se no 0 a uma cor destacada: congeladas (azul escuro) e liofilizadas (azul claro). Em ambos os casos a sua variação provoca alterações na pureza radioquímica.

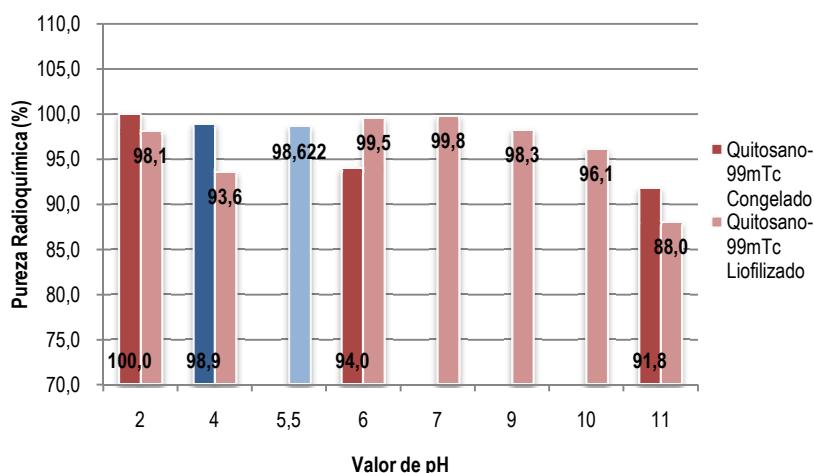


Figura 24 - Pureza radioquímica do quitosano-^{99m}Tc (%) preparado a partir da solução-mãe congelada e liofilizada, em função do pH.

Partindo do valor inicial da solução congelada, destacada na Figura 24 a azul-escuro, observa-se que a diminuição do valor de pH é acompanhada de um ligeiro aumento da pureza radioquímica (1,1%) até aproximadamente 100%. Pelo contrário verifica-se que ocorre uma diminuição da pureza radioquímica quando o pH é aumentado, inicialmente até pH=6 (-4,9%) e de seguida até pH= 11 (-2,2%).

Na solução liofilizada, cujo valor de pH após a marcação se encontra destacado no gráfico a azul-claro, ocorre o inverso. A diminuição do valor de pH é acompanhada de uma ligeira descida da pureza radioquímica (-2,75%) e o aumento do valor de pH até pH=7 traduz-se no aumento da pureza radioquímica em cerca de 1%. Nos valores de pH superiores a 7 observa-se uma diminuição gradual da pureza radioquímica, até atingir o valor mínimo inferior a 90% (88,0%) a pH=11.

Globalmente, as preparações mantêm valores de pureza radioquímica acima dos 90% em todos os valores de pH estudados, sendo os resultados da solução liofilizada ligeiramente superiores aos da solução congelada ($\mu = 96,5\%$ – solução liofilizada; $\mu = 96,2\%$ – solução congelada). Ambas as preparações apresentam ainda homogeneidade nos resultados ($\sigma =$

3,91% – solução congelada; $\sigma = 3,99\%$ – solução liofilizada). De um modo geral, a variação do pH após a marcação demonstrou que o composto sintetizado mantém níveis de estabilidade *in vitro* aceitáveis, sendo indicador de que manterá igualmente a sua estabilidade ao percorrer o tubo digestivo, onde se encontra sujeito a variações de pH.

3.4.3. Estudo da integridade da preparação ao longo do tempo

▪ **LBG-^{99m}Tc**

No sentido de aferir o período de validade da solução de LBG congelada foi realizado o estudo da eficiência de marcação ao longo do tempo pós armazenagem, tendo-se recorrido a soluções preparadas com uma antecedência compreendida entre os 11 e os 82 dias. Obtiveram-se os resultados que constituem as ilustrações apresentadas de seguida.

À semelhança do que se observou na solução inicial e da solução-mãe, após os 30 minutos de incubação inicial, no qual os valores de pureza radioquímica são mais reduzidos, ocorre um aumento gradual (Figura 25), sendo um padrão de comportamento comum aos diferentes dias de validade. Até ao 17º dia de validade verifica-se uma proximidade ao valor de pureza radioquímica de 95%. Os prazos de validade mais longos (46º - 82º dia) apresentam resultados que tendem a afastar-se da pureza radioquímica padrão verificada nas restantes preparações, com valores médios próximos de 90%. Denota-se, contudo, uma diminuição da dispersão dos resultados ao longo do tempo.

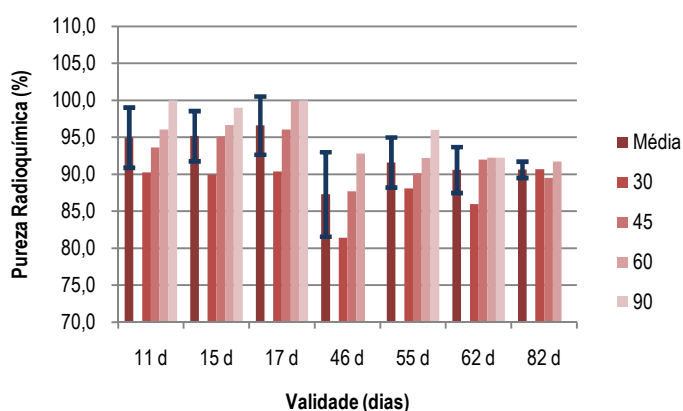


Figura 25 - Pureza radioquímica da LBG-^{99m}Tc (%) preparada a partir da solução-mãe, após vários dias de congelação. (Média + desvio padrão e dados ao longo do tempo)

Durante o período de validade estudado observam-se valores superiores a 90% aos 60 minutos, que se mantêm nos tempos seguintes. Numa análise mais pormenorizada de cada tempo estudado verifica-se que a dispersão dos resultados obtidos variou entre 3,0% (t=45min) e 7,1% (t=150min). Os períodos de armazenagem menos longos (11, 15 e 17 dias) apresentam valores de pureza radioquímica mais elevados ao longo do tempo e sempre superiores a 90%. O período de validade aceitável para o complexo LBG-^{99m}Tc, de acordo com os resultados, é de 17 dias, embora se possa colocar a hipótese de ser mais longo, uma vez que não foi estudado nenhum outro período entre o 17º e o 46º dia de validade.

▪ **Quitosano-^{99m}Tc**

Foi estudada a integridade ao longo do tempo da solução de quitosano liofilizada, recorrendo a soluções preparadas com uma antecedência compreendida entre os 2 e os 64 dias. Obteve-se os resultados que constituem a Figura 26.

À semelhança dos resultados obtidos nas preparações iniciais e na solução-mãe verifica-se que os valores mais baixos de pureza radioquímica correspondem aos tempos iniciais (t=15 minutos; $\mu = 94,3\%$), sendo igualmente onde se verifica maior dispersão dos resultados ($\sigma=5,8\%$). Com excepção do valor obtido aos 15 minutos na preparação com 64 dias os restantes valores encontram-se acima dos 90% em todos os tempos analisados. Este facto é traduzido nos resultados das médias de cada período de validade (Figura 26). Mais, após o tempo t=30 minutos todas as preparações apresentam resultados de pureza radioquímica acima dos 95%, tendendo progressivamente para o valor de 100%.

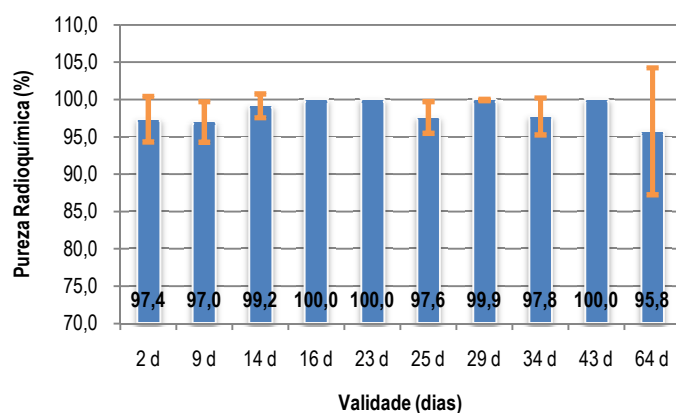


Figura 26 - Pureza radioquímica do quitosano-^{99m}Tc (%) preparado a partir da solução-mãe, vários dias após a liofilização.

A média dos valores obtidos para cada período de armazenagem analisado encontra-se na Figura 26, onde é possível observar elevados valores de pureza radioquímica em todas as preparações estudadas. Todos os resultados apresentam-se acima dos 95%, verificando-se uma baixa dispersão dos resultados obtidos [$\sigma_{\min} = 0\%$; $\sigma_{\max} = 8\%$ (t=64d)].

Foi igualmente avaliada a integridade da solução de quitosano congelada ao longo do tempo, recorrendo a soluções preparadas com uma antecedência compreendida entre os 2 e os 29 dias. Obteve-se os resultados que constituem as ilustrações apresentadas abaixo, referentes a um período máximo de avaliação de 60 minutos.

As preparações foram avaliadas aos 30, 45 e 60 minutos após a marcação com ^{99m}Tc , tendo-se verificado a existência de um padrão de distribuição dos resultados em dois períodos de validade (2 e 29 dias). Este padrão consiste num valor de pureza radioquímica ligeiramente inferior nos tempos iniciais e um aumento gradual com o avançar do tempo de estudo, em concordância com os resultados obtidos anteriormente nas preparações extemporâneas e na solução-mãe. Para estes dois períodos todos os valores se encontram acima dos 95%, sendo atingido o valor de 100% aos 60 minutos.

As preparações correspondentes ao período de 19 dias apresentam resultados inferiores e mais heterogénios, relativamente às restantes preparações. Os valores demonstrados aos 15 e 30 minutos são inferiores a 90% (89% e 89,5% respectivamente), verificando-se um aumento de cerca de 6,5% aos 45 minutos.

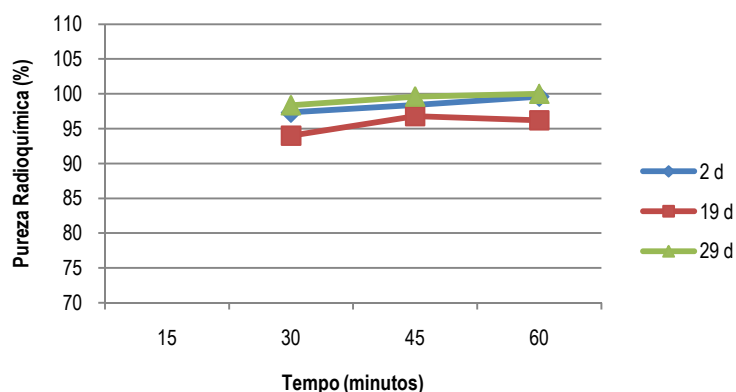


Figura 27 - Avaliação da integridade do quitosano-^{99m}Tc preparado a partir da solução-mãe congelada (dias de armazenagem). Pureza radioquímica (%) ao longo do tempo.

Os resultados médios obtidos para cada período de validade (Figura 28) corroboram os dados apresentados, verificando-se o valor médio global mais baixo nas preparações com 19 dias, sendo também estas as que apresentam o desvio padrão mais elevado ($\sigma=4,1\%$).

As preparações com valores médios mais elevados (29 dias) são as que apresentam os resultados menos dispersos, traduzidos no valor de $\sigma=1,1\%$.

Globalmente, todos os resultados obtidos neste estudo são superiores a 90%.

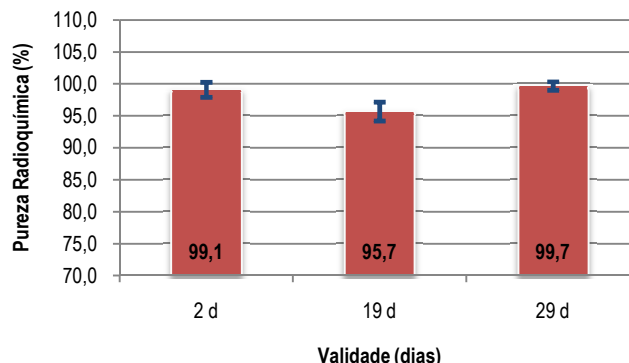


Figura 28 - Pureza radioquímica do quitosano-^{99m}Tc (%) preparado a partir da solução-mãe, após vários dias de congelamento.

Neste sentido e apesar de o quitosano-^{99m}Tc obtido a partir de soluções congeladas apresentar valores superiores a 90% a partir dos 45 minutos após o início da reacção de marcação, considera-se que o quitosano-^{99m}Tc preparado a partir de formulações liofilizadas apresenta resultados de pureza radioquímica superiores e em tempos mais precoces. Por outro lado, o facto de ser liofilizado conduz a um período de validade mais longo, garantido valores de pureza radioquímica superiores a 95% até 64 dias após a liofilização.

A análise e discussão dos resultados obtidos, referentes à otimização das condições experimentais de marcação dos polissacáridos, LBG e quitosano, com ^{99m}Tc e avaliação da respectiva estabilidade *in vitro*, conduziram à obtenção de dois complexos de ^{99m}Tc nas seguintes condições:

- A 10 mg do ligando (LBG) adicionar 1 ml de água destilada e 0,05mg de cloreto estânico dihidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ($2,2 \times 10^{-4}$ mmol) mantendo selada a atmosfera azotada. O composto pode ser conservado através do congelamento, por um período de 17 dias, mantendo as propriedades inalteradas. Para a obtenção do radiofármaco, adicionar 0,3ml (37 a 740 MBq) de $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$. Para que a reação de marcação seja completa, é necessário que esta mistura permaneça em incubação, à temperatura ambiente, durante 30 minutos.
- A 1 mg do ligando (quitosano) adicionar 1 ml de ácido acético e 0,05mg de cloreto estânico dihidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ($2,2 \times 10^{-4}$ mmol) mantendo selada a atmosfera azotada. O composto pode ser conservado após liofilização, por um período de 64 dias, mantendo as propriedades inalteradas. Para a obtenção do radiofármaco, adicionar 0,3ml (37 a 740 MBq) de $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$. Para que a reação de marcação seja completa, é necessário que esta mistura permaneça em incubação, à temperatura ambiente, durante 30 minutos.

Uma vez que se verificou que os compostos são estáveis aos diferentes valores de pH gastrointestinais, a diferentes diluições e após o aumento da temperatura (37°C) e sendo conhecido antecipadamente que a LBG não sofre digestão ao longo do tubo digestivo (Semena, 1975), é possível assumir a hipótese de que a LBG- ^{99m}Tc e o quitosano- ^{99m}Tc manterão a sua estabilidade após incorporação e diluição nos diferentes fluidos digestivos, o que estimula a sua aplicação em estudos *in vivo*.

4. Estudos in vivo

Na sequência dos ensaios de estabilidade *in vitro* realizaram-se os estudos *in vivo*, nos quais se incluem os estudos de biodistribuição e farmacocinética de ambos os radiofármacos, em ratinho da estirpe *Balb/c nu/nu*, assim como a dosimetria associada à administração destes radiotraçadores. O conhecimento da biodistribuição em ratinho saudável é fundamental para se inferir acerca de possíveis alterações do padrão em casos de obstipação. Associadamente, estes estudos fornecem informação acerca da eventual absorção e distribuição dos radiofármacos desenvolvidos, assim como das principais vias de excreção.

4.1. Biodistribuição em Animais Saudáveis

Para estudar a biodistribuição administraram-se oralmente, com recurso a sonda, uma actividade de $13,7 \pm 10,9$ MBq LBG-^{99m}Tc ou de $20,5 \pm 12,8$ MBq de quitosano-^{99m}Tc, num volume de cerca de 200 μ L cada. Após a administração os animais foram sacrificados, em grupos de três, aos 30, 60, 120, 240, 360, 480, 720 e 1440 minutos, para colheita de órgãos.

▪ **LBG-^{99m}Tc**

Os resultados da biodistribuição da LBG-^{99m}Tc demonstram a progressão do radiofármaco ao nível do tracto digestivo ao longo de 24 horas estudadas. A percentagem de actividade injectada nos diferentes órgãos ao longo do tempo consta da Figura 29. De acordo com o previsto, os órgãos com maior actividade foram o intestino grosso e o intestino delgado, onde se verifica um aumento gradual da actividade até um valor máximo às 24 horas, de 33,7% e 8,1%, respectivamente. A captação nestes órgãos é visível logo a partir dos 30 minutos, com valores de percentagem de dose próximos dos 5%, o que indica uma progressão rápida do radiofármaco, provavelmente relacionada com o facto de os ratinhos não permanecerem anestesiados (imóveis) no período entre a administração do radiofármaco e o sacrifício.

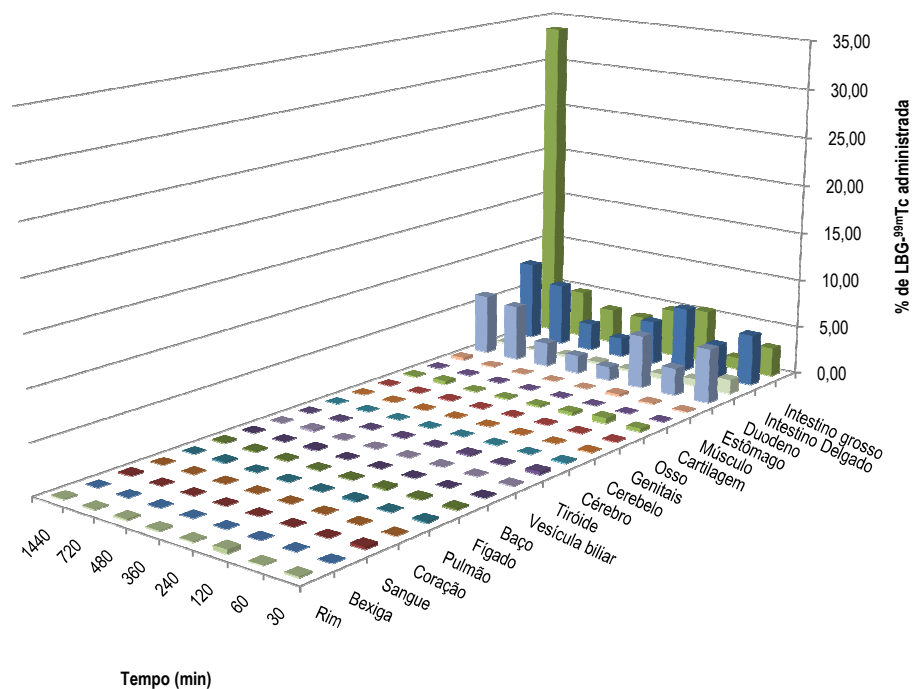


Figura 29 - Biodistribuição em % dose administrada de LBG-^{99m}Tc em ratinhos Balb/c nu/nu

Ao nível do estômago observa-se ainda uma percentagem de dose administrada considerável nos períodos iniciais após a administração do radiofármaco, concordante com o padrão normal de retenção gástrica após administração oral. Os restantes órgãos apresentam percentagens de captação do radiofármaco muito baixas (<0,56%), sendo indicativo de que este permanece apenas no tubo digestivo.

Na Figura 30 é possível observar a percentagem de actividade administrada em função do tempo, ao nível do intestino, tendo sido separado o conteúdo dos diferentes segmentos intestinais das respectivas paredes. Verifica-se alguma retenção da actividade administrada por parte das paredes do intestino, com uma percentagem de dose administrada inferior a 3%. Este valor pode ser justificado devido à anatomia do seu lúmen, o que dificulta a separação entre o conteúdo e o órgão. A maior acumulação verifica-se no intestino grosso e no intestino delgado, onde a existência de vilosidades intestinais em grande número causa uma maior retenção do radiofármaco. O contrário verifica-se nas paredes do duodeno, onde se observa retenção do radiofármaco inferior a <0,5% (Figura 30). Durante o trabalho experimental observou-se ainda alteração da consistência das fezes de acordo com a progressão intestinal, justificada pelo volume de água que é absorvido pelas fibras ao longo deste percurso. O facto de as fezes se encontrarem mais líquidas ao nível do duodeno facilita a remoção do seu

conteúdo. Por outro lado, ao nível dos restantes segmentos intestinais, o facto de as fezes se encontrarem mais espessas promove a sua retenção nas vilosidades das paredes intestinais.

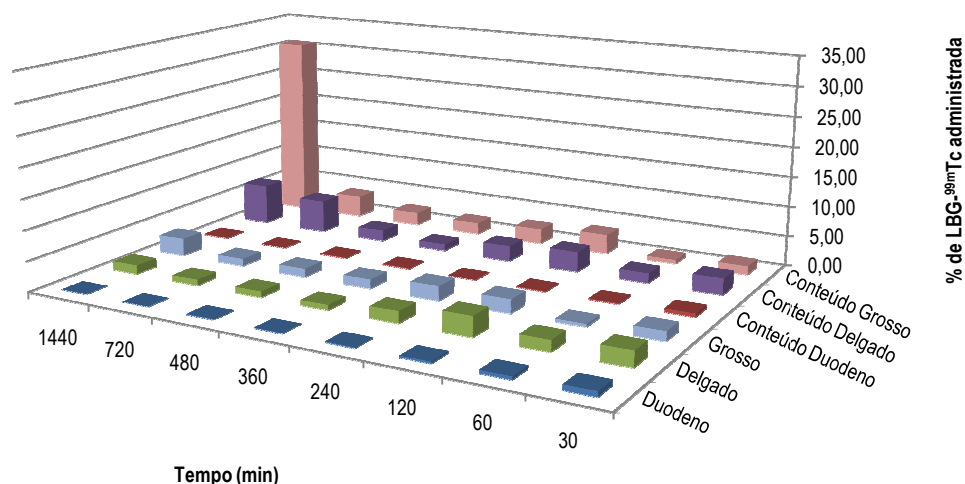


Figura 30 – Percentagem da actividade de LBG-^{99m}Tc administrada ao longo do tempo no intestino. Parede dos vários segmentos (duodeno, restante intestino delgado e intestino grosso) e respectivo conteúdo.

A progressão do radiofármaco pode ser observada através da Figura 31, onde constam os dados referentes à percentagem total de actividade administrada nos diferentes segmentos do intestino. Numa fase inicial, e até aos 480 minutos observa-se a progressão do radiofármaco dos órgãos mais proximais do tubo digestivo, em direcção ao intestino grosso, mais distal, traduzindo o percurso normal dos alimentos. Aos 720 e 1440 minutos verifica-se um aumento da percentagem do radiofármaco no intestino delgado e intestino grosso.

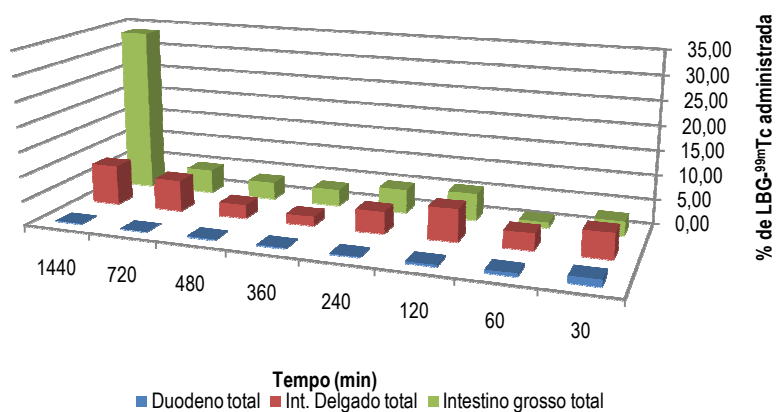


Figura 31 – Progressão da LBG-^{99m}Tc ao longo do intestino. Percentagem da actividade administrada ao longo do tempo nos segmentos intestinais totais.

Uma vez que se detectou uma captação hepática muito baixa (<0,2%) ao longo do tempo (Figura 32), não se poderá atribuir este aumento da actividade intestinal a uma absorção tardia do radiofármaco pelo sistema porta-hepático e posterior eliminação intestinal. Os órgãos envolvidos na via de excreção renal apresentam igualmente uma baixa captação, sendo a captação renal máxima <0,4% aos 120 minutos (Figura 32).

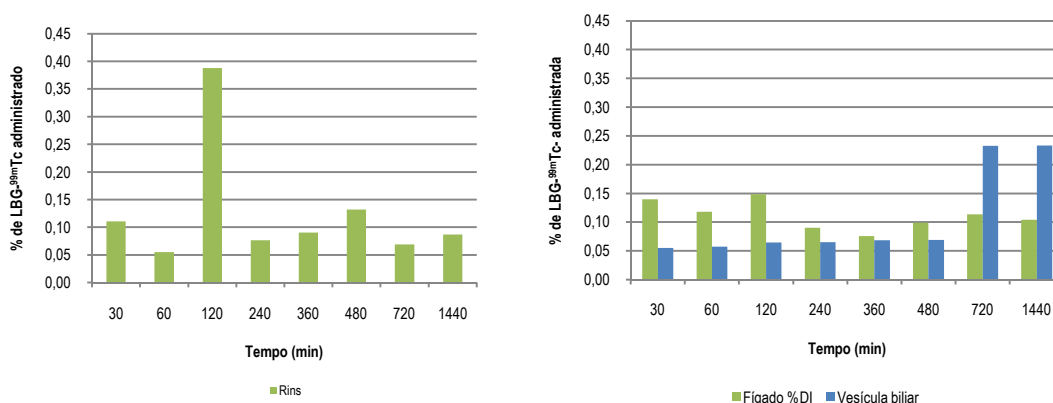


Figura 32 – Perfil de captação, retenção e excreção da LBG-^{99m}Tc nas principais vias de excreção: renal (esquerda) e hepato-biliar (direita). Valores em percentagem de LBG-^{99m}Tc administrada.

A excreção máxima na urina e na bÍlis ocorre aos 720 minutos após administração do radiofármaco (Tabela 12), sendo o valor de percentagem de dose administrada por grama de flúido de 3,24% e 3,74%, respectivamente.

Tabela 12 – Excreção da LBG-^{99m}Tc através da urina e da bÍlis em função do tempo. Valores em percentagem de dose de LBG-^{99m}Tc administrada por grama de flúido.

Tempo (min)	Urina (% Dose administrada/g)	BÍlis (% Dose administrada/g)
30	0,46	2,41
60	0,22	0,14
120	0,36	0,19
240	0,03	0,61
360	0,08	0,64
480	0,20	0,61
720	3,24	3,74
1440	0,51	0,09

Estes dados validam a hipótese de que o complexo sintetizado a partir da LBG se mantém no tubo digestivo até ser eliminado por via fecal, não sendo digerido e / ou absorvido ao longo do seu percurso.

▪ **Quitosano-^{99m}Tc**

Os resultados da biodistribuição do quitosano-^{99m}Tc demonstram um padrão de progressão muito semelhante ao padrão obtido com a LBG-^{99m}Tc. De um modo global verifica-se que o radiofármaco permanece ao nível do trato digestivo, durante as 24 horas estudadas (Figura 33). Os órgãos com maior percentagem de captação e retenção do radiofármaco foram os órgãos do tubo digestivo, nomeadamente o intestino grosso e o intestino delgado, tal como já se tinha verificado para a LBG-^{99m}Tc. As principais diferenças relacionam-se com os valores máximos de percentagem de dose administrada em cada segmento intestinal, sendo mais baixos no quitosano-^{99m}Tc, quando comparado com a LBG-^{99m}Tc (intestino grosso – 8,2% às 12h; intestino delgado – 3,9% às 24h). A captação nestes órgãos é também visível a partir dos 30 minutos, apresentando uma percentagem de dose administrada de 1,7% no duodeno, 2,1% nos restantes segmentos do intestino delgado e 0,6% no intestino grosso. Os restantes órgãos principais apresentam percentagens de captação do radiofármaco muito baixas (<0,25%), sendo indicativo de que este permanece apenas no tubo digestivo.

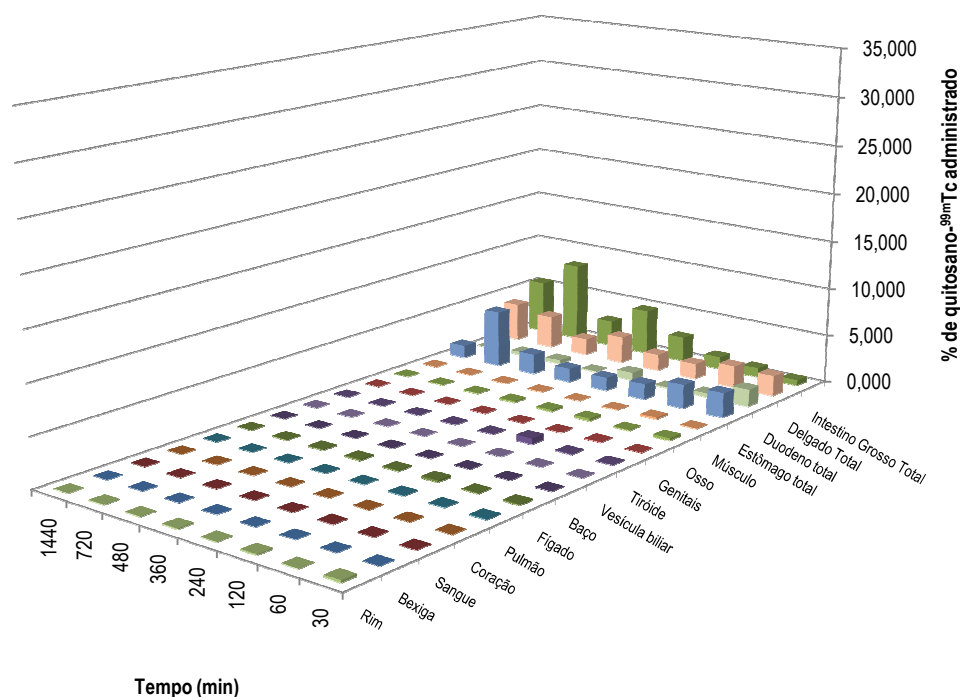


Figura 33 – Biodistribuição em % de dose de quitosano-^{99m}Tc administrada em ratinhos Balb/c nu/nu

Através dos resultados do gráfico apresentado abaixo verifica-se que a retenção do quitosano- ^{99m}Tc nas paredes intestinais é bastante baixa ($\approx 1\%$), sendo os valores mais elevados observados ao nível do intestino delgado e grosso, à semelhança do que se observou nos resultados da LBG- ^{99m}Tc .

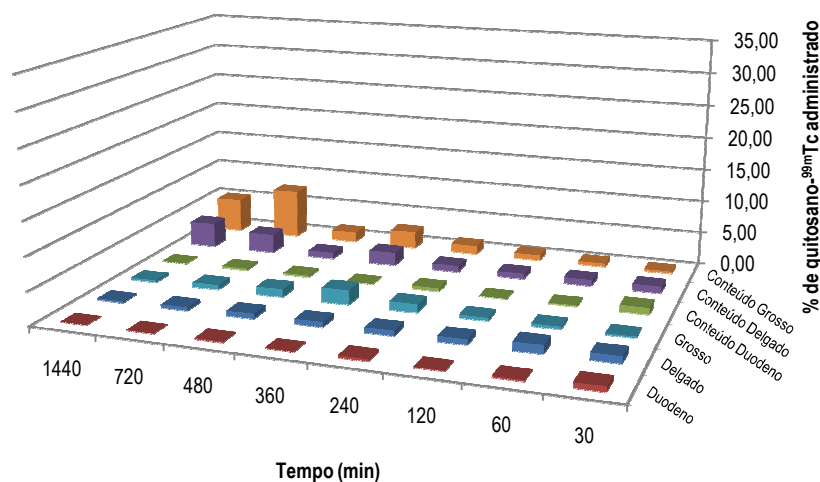


Figura 34 – Percentagem da actividade de quitosano- ^{99m}Tc administrado ao longo do tempo nos vários segmentos intestinais.

Parede dos órgãos (duodeno, restante intestino delgado e intestino grosso) e respectivo conteúdo. Analogamente aos que se verificou na biodistribuição da LBG- ^{99m}Tc , também a captação intestinal do quitosano- ^{99m}Tc apresenta valores de percentagem de radiofármaco administrado mais elevados nos segmentos mais proximais e nos períodos mais precoces, observando-se a progressão do radiofármaco no sentido distal e nos tempos mais tardios (Figura 35), sendo compatível com o padrão característico da administração oral.

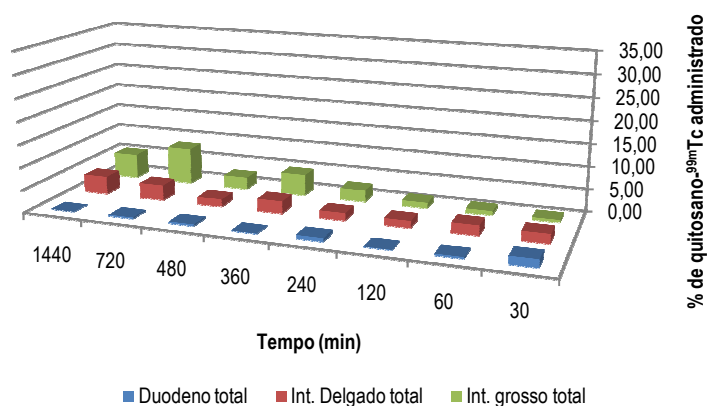


Figura 35 – Percentagem da actividade de quitosano- ^{99m}Tc administrado ao longo do tempo nos vários segmentos intestinais totais.

Não se observa retenção da actividade nos órgãos envolvidos na excreção renal e hepatobiliar. A retenção máxima de actividade a nível renal verifica-se aos 30 minutos pós administração do radiofármaco e representa 0,22% da dose administrada (Figura 36). Aos 120 minutos observa-se captação hepática máxima de 0,19%. Qualquer um destes valores não é significativo, pelo que se pode considerar que o quitosano-^{99m}Tc permanece na via gastrointestinal, desde o momento da sua administração oral até à eliminação através das fezes. Este factor é fundamental, tendo em vista os objectivos propostos para a aplicação clínica do radiofármaco. No caso de se pretender visualizar uma alteração do trânsito intestinal, seja por obstrução ou motilidade alterada, a administração do quitosano-^{99m}Tc irá auxiliar a sua caracterização, através da análise do padrão de retenção intestinal do radiofármaco nas imagens adquiridas.

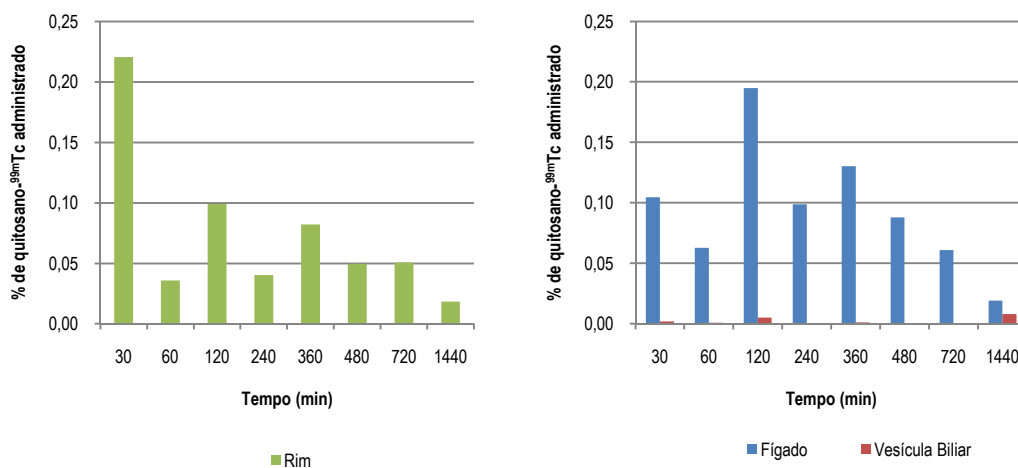


Figura 36 – Perfil de captação, retenção e excreção do quitosano-^{99m}Tc nas principais vias de excreção: renal (esquerda) e hepato-biliar (direita). Valores em percentagem de quitosano-^{99m}Tc administrado.

Serão apresentados de seguida os resultados obtidos a partir das imagens adquiridas em ratinho e do intestino.

4.2. Imagiologia com LBG-^{99m}Tc e quitosano-^{99m}Tc

As imagens adquiridas através da câmara-gama após a administração da LBG-^{99m}Tc e do quitosano-^{99m}Tc, e visualizadas na estação de trabalho Xeleris, após normalização para uma escala de cores apropriada, permitem avaliar a progressão do radiofármaco ao longo do tubo digestivo, como pode ser observado nas Figura 37 e Figura 38. De um modo geral o padrão observado é semelhante entre os dois radiofármacos e é concordante com os resultados

obtidos no estudo de biodistribuição. Contudo, a progressão do quitosano-^{99m}Tc pareça ser mais rápida, devido à existência de maior quantidade de actividade a nível intestinal em cada tempo estudado. Embora aos 30 minutos se verifique retenção da actividade ao nível intestinal na imagem de quitosano-^{99m}Tc, nas restantes imagens iniciais (60, 120 e 240 minutos) é já possível observar captação intestinal em ambos os radiofármacos. Simultaneamente visualiza-se captação gástrica e ausência de captação ao nível do esófago, o que indica que a administração foi realizada correctamente. Não se visualiza captação no restante organismo do ratinho. Nas imagens tardias (6 e 24 horas) são melhor visualizadas as regiões intestinais mais distais, localizadas em termos anatómicos nos quadrantes esquerdos do abdómen. Todavia, devido à anatomia do ratinho, não é possível distinguir, através da imagem, os diferentes segmentos intestinais. Observa-se ainda alguma retenção da actividade a nível gástrico nas imagens tardias e não se observa actividade noutras localizações exteriores ao tubo digestivo. Nas imagens das fezes obtidas 6h após a administração é já possível observar eliminação de ambos os radiofármacos.

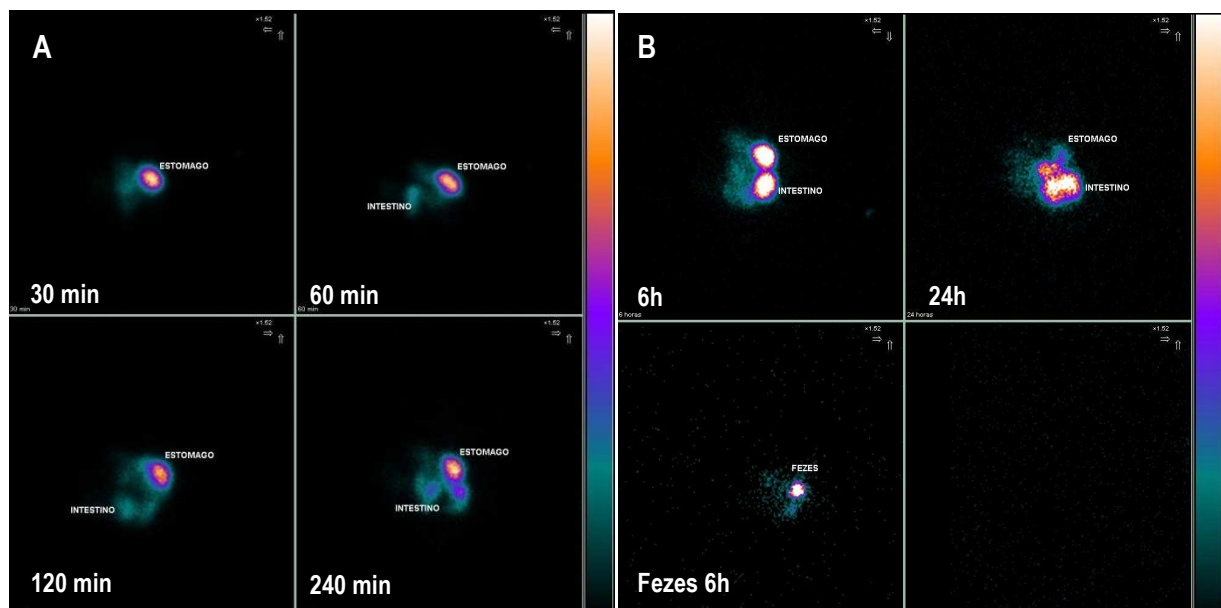


Figura 37 – Imagens obtidas através da câmara-gama do ratinho 3, administrado com LBG-^{99m}Tc.

A – Imagens inicial (30, 60, 120 e 240 minutos) onde é já possível observar captação intestinal. B – Imagens tardias (6 e 24 horas) onde são melhor visualizadas as regiões intestinais mais distais e imagem das fezes (6h). Todas as imagens estão referenciadas à mesma escala de cores.

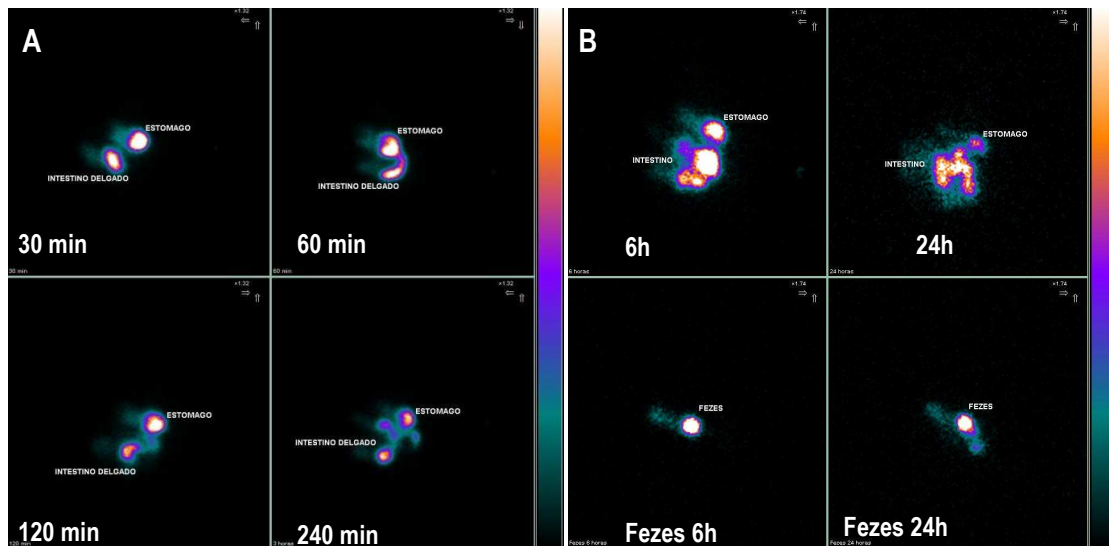


Figura 38 – Imagens obtidas através da câmara-gama do ratinho 8, administrado com quitosano-^{99m}Tc. A – Imagens inicial (30, 60, 120 e 240 minutos) com visualização da captação intestinal. B – Imagens tardias (6 e 24 horas) com visualização das regiões intestinais mais distais e imagens das fezes (6h e 24h). Todas as imagens estão referenciadas à mesma escala de cores.

Após o sacrifício do animal foram adquiridas igualmente imagens do intestino delgado e do intestino grosso, para cada radiofármaco estudado, como pode ser observado nas figuras apresentadas abaixo. Esta informação foi complementada com o recurso a regiões de interesse (ROIs). Sobre o intestino foram desenhadas ROIs com o mesmo tamanho e através das quais se obteve informação proporcional à captação do LBG-^{99m}Tc e do quitosano-^{99m}Tc, tal como as contagens totais, as contagens médias e as contagens máximas, que constam em anexo.

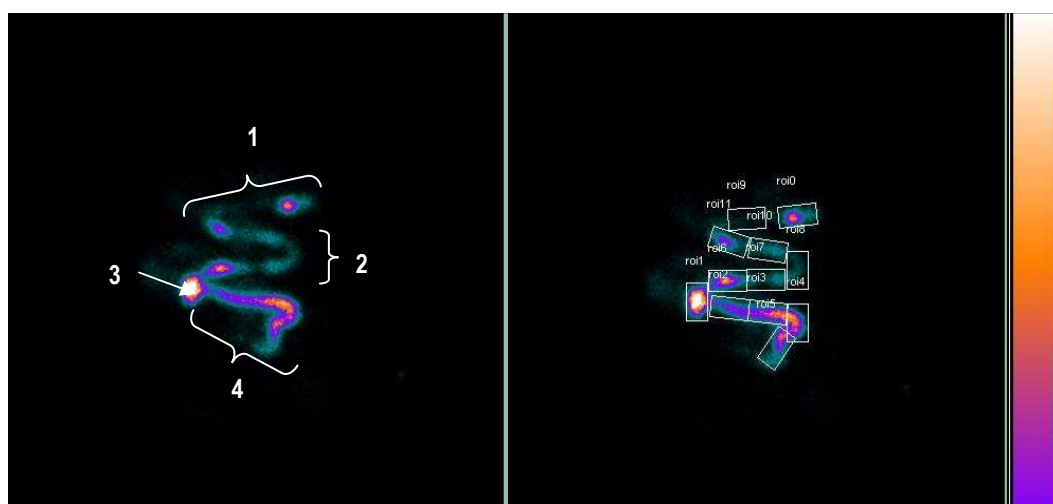


Figura 39 – Exemplo das imagens do intestino após administração da LBG-^{99m}Tc adquiridas e do processamento realizado.

A – Imagem do intestino do ratinho 48 (sacrifício aos 30min pós administração), após dissecação do órgão, adquirida na câmara-gama. Disposição sinusoidal do intestino: 1 – duodeno; 2 – restante intestino delgado; 3 – cego e apêndice; 4 – cólon. B – Intestino após processamento e disposição de ROIs.

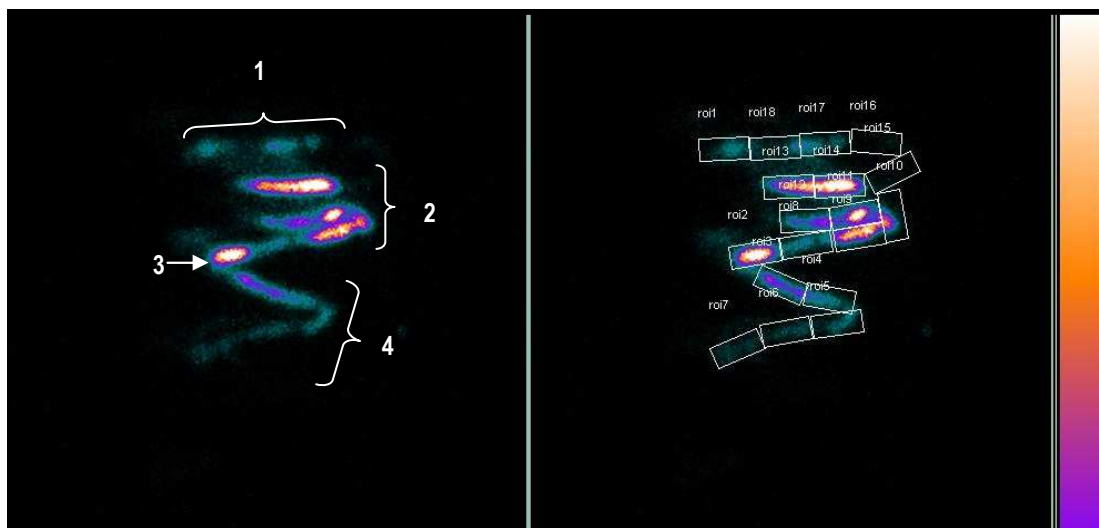


Figura 40 – Exemplo das imagens do intestino adquiridas após administração do quitosano-^{99m}Tc e do processamento realizado.

A – Imagem do intestino do ratinho 51 (sacrifício aos 30min pós administração), após dissecação do órgão, adquirida na câmara-gama. Disposição sinusoidal do intestino: 1 – duodeno; 2 – restante intestino delgado; 3 – cego e apêndice; 4 – cólon. B – Intestino após processamento e disposição de ROIs.

A partir dos dados obtidos através do processamento das imagens acima apresentadas e que se encontram em anexo foi possível obter gráficos paramétricos que traduzem a progressão dos radiofármacos ao longo do intestino, em função do tempo.

Através do gráfico correspondente à LBG-^{99m}Tc (Figura 41) é possível confirmar alguns dos resultados obtidos através dos estudos de biodistribuição e das imagens adquiridas em ratinho, nomeadamente o facto de o radiofármaco progredir no sentido dos segmentos mais distais do intestino ao longo do tempo. Contudo, contrariamente aos dados relativos à imagem de ratinho, aos 30 minutos verifica-se a presença de actividade ao nível intestinal, em todos os segmentos analisados. Esta diferença poderá estar relacionada com a dificuldade de analisar, em termos anatómicos, as imagens dos ratinhos adquiridas. De notar que nos períodos mais tardios a actividade existente ao nível do duodeno e restante intestino delgado diminui consideravelmente, concentrando-se maioritariamente ao nível do intestino grosso. A partir dos 240 minutos observa-se uma excreção nas fezes que varia entre 10% a 30% da actividade total.

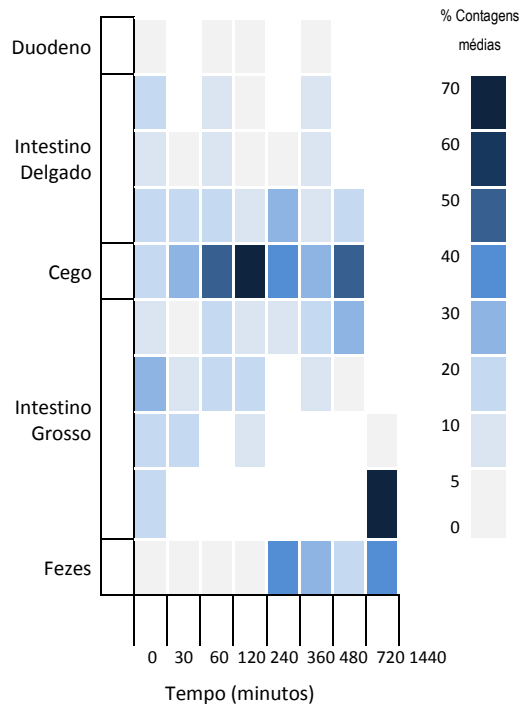


Figura 41 – Gráfico paramétrico do trânsito intestinal da LBG-^{99m}Tc (% contagens médias) obtida a partir das imagens do intestino.

No que respeita ao gráfico do quitosano-^{99m}Tc observa-se que globalmente existe uma tendência de progressão do radiofármaco desde os segmentos proximais do intestino, nos tempos iniciais, até aos segmentos distais e eliminação nas fezes, nos períodos de tempo tardios.

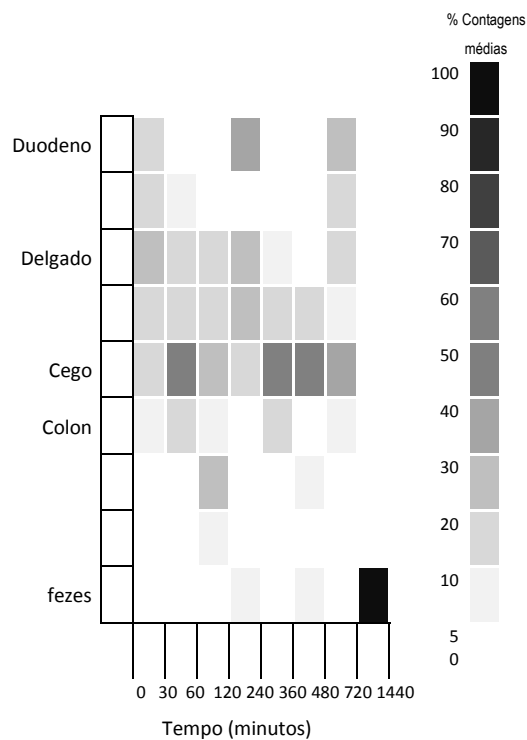


Figura 42 – Imagem paramétrica do trânsito intestinal do quitosano-^{99m}Tc (% contagens médias) obtida a partir das imagens do intestino.

Verifica-se que aos 30 minutos após a administração do radiofármaco já existe retenção da actividade ao nível intestinal, sendo concordante com os dados da avaliação das imagens. Contudo, essa progressão ocorre apenas nos segmentos anteriores ao cego, estando de acordo com os resultados obtidos através dos estudos de biodistribuição.

Em ambos os gráficos observa-se que ocorre uma elevada e prolongada retenção dos radiofármacos ao nível do cego. Isto deve-se provavelmente à sua estrutura anatómica, em forma de saco, que promove a retenção do conteúdo intestinal e não deverá ser considerado retenção patológica.

A análise dos dados obtidos pela aquisição de imagens em ratinho e do intestino/fezes permite completar os resultados obtidos anteriormente, através dos estudos de biodistribuição: os complexos LBG-^{99m}Tc e quitosano-^{99m}Tc são estáveis *in vivo*, percorrendo o tracto gastrointestinal sem que ocorra captação por parte de outros órgãos. Tal como referido anteriormente este é um factor fundamental tendo em conta o objectivo da possível aplicação clínica dos compostos.

4.3. Estudo dosimétrico em ratinho

A estimativa da dose absorvida para cada um dos radiofármacos estudados encontra-se nas tabelas apresentadas abaixo, sendo apresentada em valores de dose equivalente (*H*) e dose efectiva (*E*) total e para cada órgão, em mSv/MBq.

Tabela 13 – Dose absorvida total e por órgão após administração de LBG-^{99m}Tc. Valores de dose equivalente e dose efectiva em mSv/MBq.

<i>Órgão Alvo</i>	<i>DE (H)</i> (mSv/MBq)	<i>ED (E)</i> (mSv/MBq)
Supra-renais	0,00E+00	1,61E-05
Cérebro	0,00E+00	1,63E-06
Glândula mamária	2,08E-04	6,92E-05
Parede vesícula biliar	7,48E-04	0,00E+00
Parede Intestino Grosso	0,00E+00	6,38E-04
Intestino Delgado	2,38E-03	1,98E-04
Parede Estômago	7,12E-03	1,42E-02
Parede Intestino Delgado	5,28E-03	4,40E-04
Miocárdio	0,00E+00	0,00E+00
Rins	0,00E+00	4,48E-05
Fígado	0,00E+00	2,92E-04
Pulmão	4,26E-04	4,26E-04
Músculo	0,00E+00	1,14E-05
Ovários	0,00E+00	0,00E+00
Pâncreas	0,00E+00	4,43E-05
Medula óssea	1,40E-04	1,40E-04
Osteoblastos	9,01E-05	3,00E-05
Pele	0,00E+00	9,35E-06
Baço	0,00E+00	5,51E-05
Testículos	8,12E-03	6,50E-03
Timo	0,00E+00	7,29E-06
Tiróide	7,98E-03	1,33E-02
Parede bexiga	6,87E-04	5,72E-04
Útero	0,00E+00	3,60E-05
Corpo Inteiro	0,00E+00	0,00E+00
Dose Total	3,32E-02	3,71E-02

Organ Doses (mSv/MBq), Nuclide: Tc-99m (6,01E00 hr), Newborn

DE (H) – Dose Equivalent

ED (E) – Effective Dose

Tabela 14 – Dose absorvida total e por órgão após administração de quitosano-^{99m}Tc.

Valores de dose equivalente e dose efectiva em mSv/MBq.

Órgão Alvo	DE (H) (mSv/MBq)	ED (E) (mSv/MBq)
Supra-renais	0,00E+00	2,72E-05
Cérebro	0,00E+00	6,25E-07
Glândula mamária	4,88E-04	1,63E-04
Parede vesícula biliar	2,99E-03	0,00E+00
Parede Intestino Grosso	0,00E+00	2,81E-03
Intestino Delgado	6,90E-03	2,88E-04
Parede Estômago	5,20E-03	1,04E-02
Parede Intestino Delgado	5,94E-02	2,48E-02
Miocárdio	0,00E+00	0,00E+00
Rins	2,19E-03	9,12E-05
Fígado	0,00E+00	1,17E-03
Pulmão	8,65E-04	8,65E-04
Músculo	0,00E+00	2,23E-05
Ovários	1,20E-02	9,63E-03
Pâncreas	0,00E+00	4,88E-05
Medula óssea	5,79E-04	5,79E-04
Osteoblastos	3,49E-04	1,16E-04
Pele	0,00E+00	3,66E-05
Baço	0,00E+00	3,52E-05
Testículos	0,00E+00	0,00E+00
Timo	0,00E+00	5,59E-06
Tiróide	4,03E-03	6,72E-03
Parede bexiga	0,00E+00	9,65E-04
Útero	0,00E+00	8,88E-05
Corpo Inteiro	0,00E+00	0,00E+00
Dose Total	9,51E-02	5,88E-02

Organ Doses (mSv/MBq), Nuclide: Tc-99m (6,01E00 hr), Newborn

*DE (H) – Dose Equivalent**ED (E) – Effective Dose*

Os valores de dose equivalente e efectiva total por unidade de actividade obtidos pela LBG-^{99m}Tc ($H = 0,033\text{mSv/MBq}$ e $E=0,037\text{mSv/MBq}$ respectivamente) são ligeiramente inferiores aos valores verificados para o quitosano-^{99m}Tc ($H=0,095\text{mSv/MBq}$ e $E=0,059\text{mSv/MBq}$ respectivamente). Em comparação com os resultados obtidos para outros radiofármacos em modelo animal (ratinho), verifica-se que os valores de dose absorvida apresentados por ambos os radiofármacos em estudo são bastante favoráveis (e.g. Citrato-⁶⁷Ga: $H=0,18\text{mSv/MBq}$ e $E_{\text{c\acute{o}lon}} = 1,6\text{mSv/MBq}$) (Bellen et al., 1995).

Os valores mais elevados de dose efectiva por órgão da LBG-^{99m}Tc correspondem à tiróide ($E=0,013\text{ mSv/MBq}$), e à parede do estômago ($E=0,014\text{ mSv/MBq}$), o que poderá estar associado a alguma percentagem de pertecnetato devido a reoxidação *in vivo* do composto. As

paredes do intestino delgado e intestino grosso, considerados órgão-alvo, apresentam valores bastante reduzidos ($E=4,4 \times 10^{-4} \text{mSv/MBq}$ e $E=6,4 \times 10^{-4} \text{mSv/MBq}$, respectivamente). Os testículos apresentam-se como órgão-crítico, obtendo uma dose efectiva de $E=6,5 \times 10^{-3} \text{mSv/MBq}$.

Através dos valores de dose efectiva por órgão, referentes ao quitosano- $^{99\text{m}}\text{Tc}$, verifica-se que a parede do intestino delgado ($E=2,5 \times 10^{-2} \text{mSv/MBq}$) e do estômago ($E=1,0 \times 10^{-2} \text{mSv/MBq}$) são os órgãos com maior dose absorvida. A dose conferida ao restante órgão-alvo (côlon) é bastante inferior ($E_{\text{côlon}} = 2,8 \times 10^{-3} \text{mSv/MBq}$). Os ovários são considerados como órgão-crítico, uma vez que o seu valor de dose efectiva é de $E=9,6 \times 10^{-3} \text{mSv/MBq}$.

De um modo geral, os resultados de dose equivalente e dose efectiva, total e por órgão, apresentados por ambos os radiofármacos são bastante favoráveis, quando comparados com os restantes radiofármacos em utilização clínica, suportando a sua possível introdução na prática clínica.

IX. Conclusão

Tendo em vista o objectivo principal proposto para o trabalho apresentado nesta tese, síntese, avaliação da estabilidade *in vitro*, avaliação do comportamento biológico *in vivo* e determinação da dosimetria interna de complexos de ^{99m}Tc com ligandos polissacáridos, na perspectiva de avaliar a sua potencial aplicação clínica em estudos do trânsito do cólon, e de acordo com os resultados apresentados é possível afirmar que a LBG- ^{99m}Tc e o quitosano- ^{99m}Tc apresentam características favoráveis para possível aplicação clínica no estudo cintigráfico do trânsito do cólon.

A partir dos dados dos estudos de optimização das condições de síntese dos complexos de LBG- ^{99m}Tc e o quitosano- ^{99m}Tc e avaliação da estabilidade *in vitro* é possível concluir que estes compostos conduzem a valores de pureza radioquímica superiores a 90%, mantendo a estabilidade após diluição, aumento da temperatura a 37°C e variação de pH entre 2 e 10. A formulação da LBG congelada e do quitosano liofilizado sob a forma de kit conduz a valores de pureza radioquímica elevados. Contudo a LBG- ^{99m}Tc apresenta um prazo de validade mais curto (17 dias) em comparação com o quitosano- ^{99m}Tc (64 dias), tornando este complexo mais vantajoso em termos radioquímicos. Estes resultados suportam a possível aplicação clínica em humano, por via oral.

Os complexos em estudo apresentam um padrão de biodistribuição *in vivo* semelhante, mantendo-se no intestino até ser eliminado por via fecal e não sendo digeridos e/ou absorvidos ao longo do seu percurso, o que constitui uma vantagem para a aplicação clínica proposta neste trabalho.

As dificuldades sentidas na análise das imagens adquiridas em ratinho, devido à sobreposição anatómica dos órgãos em estudo, poderão ser minimizadas em estudos futuros pela realização de um estudo dinâmico nos primeiros 30 minutos após a administração do radiofármaco, de modo a obter informação mais precisa acerca do período de chegada do radiofármaco aos diferentes segmentos intestinais. Contudo, os dados obtidos corroboram na sua maioria os resultados dos estudos de biodistribuição.

A estimativa de dose efectiva obtida é bastante favorável, em comparação com outros radiofármacos utilizados actualmente na cintigrafia do trânsito do cólon ($E_{\text{LBG-}^{99m}\text{Tc}}=0,037\text{mSv/MBq}$; $E_{\text{quitosano-}^{99m}\text{Tc}}=0,095\text{mSv/MBq}$). Sugere-se, no entanto, a realização de um estudo comparativo com um dos radiofármacos utilizados na prática clínica para este exame,

como por exemplo o citrato-⁶⁷Ga, de modo que os resultados de dose absorvida sejam obtidos através de um protocolo idêntico.

Os resultados sugerem que a LBG-^{99m}Tc e o quitosano-^{99m}Tc apresentam características favoráveis para possível aplicação clínica no estudo cintigráfico do trânsito do cólon.

X. Procedimento Experimental

1. Materiais

A LBG foi gentilmente oferecida pelos Serviços Farmacêuticos do Hospital Garcia de Orta – Almada, tendo a sua solubilidade sido estudada por uma adaptação do protocolo descrito por Barata, M. e al (2006). O quitosano foi obtido comercialmente à Sigma, contendo aproximadamente 20% de β -1,4-N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) e aproximadamente 80% de β -1,4-D-glucosamina (GlcN), preparado por desacetilação parcial da quitina. A sua marcação foi efectuada pela modificação do método apresentado por Kim, E. et al (2005). O $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$ foi obtido por eluição de um gerador de radionuclídeos $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (Amersham, Mallinkrodt ou MDS Nordion SA) com uma solução de NaCl 0,9%. A actividade de pertecnetato foi medida numa câmara de ionização (Aloka, Curiemeter IGC-3, Tokyo, Japan). O aquecimento das soluções foi realizado num banho-seco blindado com termostato. O ^{67}Ga -citrato e os reagentes foram disponibilizados pela Unidade de Ciências Químicas e Radiofarmacêuticas do Instituto Tecnológico e Nuclear - Sacavém. Os reagentes não especificados foram adquiridos comercialmente como reagentes p.a..

2. Procedimentos gerais

Todos os procedimentos que envolveram a manipulação de substâncias radioactivas não seladas foram efectuados num laboratório com as condições exigidas pelas normas de protecção e segurança contra radiações (PSR) em vigor. A manipulação das substâncias radioactivas foi efectuada em condições de PSR, com luvas de protecção e barreira de chumbo com visor de vidro impregnado com sais de chumbo. Os frascos que continham soluções radioactivas foram colocados dentro de contentores de chumbo com espessura adequada à actividade da amostra. Dentro do laboratório foi sempre utilizado um dosímetro individual de corpo inteiro que permite determinar a dose de radiação recebida pelo operador. Antes de sair do laboratório as mãos, os pés e o corpo foram monitorizados num detector de radiação adequado para esse fim. Todos os frascos e soluções utilizadas na síntese de complexos ^{99m}Tc foram previamente purgados com azoto. As soluções de cloreto estânico foram preparadas imediatamente antes da sua utilização.

3. Estudo da solubilidade da LBG em solução aquosa

Atendendo ao objectivo específico de sintetizar um novo complexo de ^{99m}Tc com a LBG e dado que a marcação de compostos é normalmente efectuada em solução aquosa, realizou-se o estudo da sua solubilidade.

Tendo por base a técnica de preparação da goma de alfarroba descrita por Barata, M. et al (2006) foram realizadas várias modificações de modo a estudar a dissolução da LBG, que serão apresentados seguidamente. No final de cada procedimento a preparação foi observada e os resultados foram registados.

Para cada procedimento introduziram-se 10 mg de LBG num frasco de vidro. Efectuaram-se diversas tentativas: foi estudada a dissolução da LBG em água destilada à temperatura ambiente, após variação do valor de pH entre pH=2 e pH=13, com adição simultânea de etanol 10% (v/v), com adição simultânea de propilenoglicol, com posterior aquecimento e directamente em água destilada quente.

Para o estudo da dissolução em água destilada adicionou-se aos 10 mg de LBG, em agitação no agitador magnético, 1 ml de água destilada à temperatura ambiente, tendo-se mantido a agitação durante 10 minutos. No final desse período a preparação foi observada quanto à dissolução da goma e à formação de gel. Após o registo dos dados, foi determinado o valor de pH inicial através do método colorimétrico, com recurso a papel indicador. De seguida adicionaram-se $4 \times 20 \mu\text{l}$ de HCl 0,1M, medindo-se o valor de pH e observando-se possíveis alterações em cada intervalo, até obter um valor de pH=2. Foi realizado um procedimento semelhante para o estudo da dissolução com variação do valor de pH até pH = 13, tendo sido adicionadas $8 \times 10 \mu\text{l}$ de NaOH 1N.

No seguimento dos procedimentos apresentados foi estudada a dissolução da goma de alfarroba em água destilada e etanol e em água destilada e propilenoglicol. Para tal e à semelhança do estudo anterior, adicionou-se aos 10 mg de LBG, em agitação, 1 ml de água destilada à temperatura ambiente, tendo-se mantido a agitação durante 10 minutos. No final deste período adicionaram-se a cada preparação $10 \times 100 \mu\text{l}$ de $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ a 10% ou $10 \times 100 \mu\text{l}$ de $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$ a 10%. No intervalo de cada adição observaram-se as preparações de modo a verificar possíveis alterações.

Após o estudo da dissolução da goma à temperatura ambiente foi estudado o efeito do aquecimento nas suas propriedades físicas. Neste sentido, foram testadas duas abordagens distintas – o aquecimento da preparação após a dissolução à temperatura ambiente e a dissolução directamente em água destilada quente. No primeiro caso a preparação inicial de 10 mg de LBG em 1 ml de água destilada foi colocada em banho-seco, previamente estabilizado nos 90°C, durante 30 minutos. Na segunda abordagem adicionou-se, em agitação, aos 10 mg de LBG 4 ml de água destilada a 90°C, em quatro porções de 1 ml, tendo-se mantido as condições durante 10 minutos. Em ambas as situações e após o período de incubação referido, as alterações do comportamento físico da LBG foram observadas e registadas.

4. Síntese do complexo LBG- ^{99m}Tc

4.1. Optimização da concentração de LBG na solução

De acordo com as referências apresentadas na introdução teórica foram estudadas três concentrações de LBG – 1, 2 e 10 mg/ml, com o objectivo de obter uma preparação com características físicas adequadas à realização da cintigrafia de trânsito do cólon. Assim, após pesar a massa necessária de LBG (Tabela 15) num frasco de vidro, adicionou-se, em agitação, no agitador magnético, o volume de água destilada necessária, tendo-se mantido a agitação durante 10 minutos. No final as preparações obtidas foram observadas quanto à dissolução da LBG e à formação de gel e os resultados foram registados.

Tabela 15 – Quantidades utilizadas na optimização da concentração de LBG

<i>Massa de LBG (mg)</i>	<i>Volume de H₂O (ml)</i>	Concentração final (mg/ml)
5	5	1
10	10	1
10	5	2
10	1	10
100	10	10

4.2. Optimização da concentração de cloreto estanoso

A aproximação utilizada para a marcação da LBG com ^{99m}Tc foi através do método directo de redução, com adição de cloreto estanoso. Foram preparadas soluções de LBG com a concentração de 10mg/ml, já estudada, de acordo com o método previamente descrito (10mg LBG + 1 ml H₂O). Preparou-se igualmente uma solução de cloreto estanoso, a partir da qual se retiraram volumes diferentes, ajustados de modo a obter as diferentes concentrações em estudo (Tabela 16), de acordo com o seguinte procedimento: num balão de fundo liso colocaram-se 10mg ($4,4 \times 10^{-2}$ mmol) de SnCl₂.2H₂O (massa molar = 225,6g) e adicionou-se 0,16 ml (0,2N) de solução concentrada de HCl 12N, necessária para a sua completa dissolução. Esta foi favorecida colocando o balão num banho de água quente e agitando frequentemente. Quando se observou uma solução totalmente dissolvida e límpida, diluiu-se com água destilada até atingir o volume final de 10 ml.

Adicionou-se, em agitação, o volume de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ adequado (Tabela 16) a cada preparação de LBG, de modo a obter uma determinada concentração de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Ainda em agitação, adicionou-se 0,5 ml de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$, tendo-se incubado a preparação, à temperatura ambiente e em agitação, durante 10 minutos. A actividade e hora da marcação foram registadas.

Tabela 16 – Quantidades utilizadas na optimização da quantidade de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

<i>Volume</i> <i>$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (ml)</i>	<i>Quantidade de</i> <i>SnCl_2 (mmol)</i>	<i>[LBG]</i> <i>(mg/ml)</i>	<i>Volume Final</i> <i>(ml)</i>	<i>$[\text{SnCl}_2]_{\text{M}}$ Final</i> <i>(M)</i>
0,2	$8,8 \times 10^{-4}$	10	1,2	$7,3 \times 10^{-4}$
0,1	$4,4 \times 10^{-4}$	10	1,1	$4,0 \times 10^{-4}$
0,05	$2,2 \times 10^{-4}$	10	1,05	$2,1 \times 10^{-4}$
0,025	$1,1 \times 10^{-4}$	10	1,025	$1,07 \times 10^{-4}$

O valor óptimo da concentração de cloreto estanoso foi identificado através do estudo da eficiência de marcação e avaliação da pureza radioquímica da LBG- $^{99\text{m}}\text{Tc}$, obtido aos 15', 30', 45', 60', 120', 190' e 1440' (24h) após o início da reacção de marcação e de acordo com a técnica descrita no sub-capítulo 7.

4.3. Optimização do volume de $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Com o objectivo de optimizar o volume de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ foram preparadas soluções de LBG com a concentração de 10mg/ml (10mg LBG + 1 ml H_2O + 0,05mg ($2,2 \times 10^{-4}$ mmol) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). De seguida adicionou-se, em agitação, um determinado volume de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ (0,3 ml ou 0,5 ml), incubando 10 minutos à temperatura ambiente e mantendo a agitação. A actividade e hora da marcação foram registadas e aos 15', 30', 45', 60', 120', 190' e 1440' (24h) após o início da reacção de marcação determinou-se a pureza radioquímica, de acordo com o método descrito no sub-capítulo 7.

4.4. Efeito do pH na marcação da LBG com $^{99\text{m}}\text{Tc}$

O estudo da variação deste parâmetro foi realizado com o objectivo de optimizar o pH a que ocorre a marcação da LBG com $^{99\text{m}}\text{Tc}$, tendo esta variação sido realizada antes da adição do radionuclídeo. Para tal preparam-se soluções de LBG com a concentração de 10mg/ml e mediu-se o valor de pH através do método colorimétrico, com recurso a papel indicador

universal de pH 1-10. Adicionou-se, em agitação, um dos seguintes volumes de uma solução de NaOH 0,1N: 50µl, 100µl, 150µl, 200µl, 250µl, 300µl, 350µl, 400µl, tendo-se medido, de seguida, o valor de pH. Adicionou-se à preparação 0,5ml de $^{99m}\text{TcO}_4^-$, em agitação, e incubou-se, à temperatura ambiente, durante 10 minutos. Registou-se a actividade e hora da marcação e efectuou-se o método descrito no sub-capítulo 7, aos 15', 30', 45', 60', 90' e 120' após o início da reacção de marcação, de modo a identificar o valor óptimo de pH a que ocorre a marcação.

4.5. Estabilidade in vitro da LBG- ^{99m}Tc após diluição

Procedeu-se ao estudo da variação do volume da solução para 10 ml, a partir de soluções de LBG preparadas de acordo com os parâmetros já otimizados e descritos anteriormente nos pontos 4.1, 4.2 e 4.3 do presente capítulo. Após a síntese da LBG- ^{99m}Tc determinou-se a pureza radioquímica e adicionou-se 10 ml de água destilada. A estabilidade ao longo do tempo foi avaliada com base na pureza radioquímica do complexo aos 30', 120' e 180' após a marcação, de acordo com o método que será descrito ponto 7.

4.6. Estabilidade in vitro da LBG- ^{99m}Tc após variação da temperatura

O composto foi preparado de acordo com o procedimento otimizado até ao momento. Em 50% das preparações adicionou-se 10 ml de água destilada, tendo as restantes 50% permanecido com o volume de marcação inalterado. Todas as preparações foram aquecidas em banho-maria seco a 37°C durante 10 minutos, tendo-se registado as alterações das propriedades físicas observadas. A estabilidade ao longo do tempo foi avaliada com base no resultado da pureza radioquímica após cada preparação ter sido retirada do banho seco, de acordo com o método que será descrito no sub-capítulo 7.

5. Síntese do complexo quitosano-^{99m}Tc

O quitosano é um polissacárido biodegradável e possui uma enorme capacidade de formar quelatos com iões metálicos. Por este motivo o quitosano e os seus derivados têm sido largamente estudados, nomeadamente a sua marcação com ^{99m}Tc (Kim, E. 2005). Este composto é dissolvido por completo em ácido acético, podendo, posteriormente, ser diluído em água destilada.

O procedimento de marcação do quitosano seguido neste trabalho tem por base a técnica descrita por Kim, E. et al (2005), tendo sido feitas as modificações necessárias: a uma solução composta por 1 mg de quitosano dissolvido em 1 ml de ácido acético 1% e favorecida por agitação durante alguns minutos, adicionou-se 0,02 mg ($8,8 \times 10^{-5}$ mmol) ou 0,05 mg ($2,2 \times 10^{-4}$ mmol) de SnCl₂. Adicionou-se, de seguida, 0,3 ml de ^{99m}TcO₄⁻ (50μCi – 160μCi), tendo a preparação permanecido em incubação durante 10 minutos à temperatura ambiente, com agitação ocasional. No final deste período procedeu-se à determinação da pureza radioquímica de acordo com o método descrito no sub-capítulo 7, aos 15, 30, 45, 60 e 90 minutos após o início da reacção de marcação.

6. Formulação sob a forma de kit

As misturas reacionais liofilizadas / congeladas foram dispensadas a partir de soluções-mãe, preparadas nas condições de marcação previamente otimizadas, de modo a obterem-se valores de eficiência de marcação e pureza radioquímica elevados. O protocolo em estudo é descrito seguidamente. Com a elaboração de cada solução-mãe foram dispensados vários frascos com soluções de LBG e de quitosano prontas a marcar com ^{99m}Tc , tendo sido liofilizados cerca de 50% e os restantes 50% congelados. Para cada uma das preparações reservou-se um frasco que foi marcado no próprio dia de modo a avaliar a qualidade da solução-mãe. O procedimento de marcação seguido foi o descrito no sub-capítulo 2. A avaliação das condições de armazenamento e a identificação de qual a mais adequada para as soluções preparadas foi realizada através da determinação da eficiência de marcação com ^{99m}Tc , seguida de determinação da pureza radioquímica ao longo do tempo.

6.1. Preparação das soluções para a formulação final

6.1.1. Preparação da solução de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

A solução de SnCl_2 preparada foi utilizada em ambas as soluções-mãe de LBG e quitosano. A 6mg de SnCl_2 (0,026mmol) adicionou-se 0,05ml (0,02N) de solução concentrada de HCl 12N, tendo-se favorecido a sua dissolução, colocando o balão num banho de água quente. Quando se observou uma solução límpida, procedeu-se à diluição com água destilada, obtendo um volume final de 30ml ($8,8 \times 10^{-4}$ mmol SnCl_2/ml);

6.1.2. Preparação e fraccionamento da solução-mãe de LBG

Para a preparação da solução-mãe de LBG pesou-se 100mg de LBG num frasco de vidro e adicionou-se, em agitação, 7,5ml de água destilada à temperatura ambiente. Mantendo a agitação, adicionou-se 2,5ml ($2,2 \times 10^{-3}$ mmol) da solução de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ previamente preparada, de modo a obter a concentração final da solução de 10mg/ml. Após um período de 10 minutos, durante o qual foi mantida a agitação, dispensou-se 1 ml da solução (10mg LBG + $2,2 \times 10^{-4}$ mmol SnCl_2) em cada frasco de vidro. Uma das preparações foi utilizada para marcação no próprio dia. As restantes foram armazenadas no congelador a -20°C , após serem purgadas com azoto em frasco capsulado, ou liofilizadas, purgadas com azoto, capsuladas e armazenadas no frigorífico a 4°C .

6.1.3. Preparação e fraccionamento da solução-mãe de quitosano

Para a preparação da solução-mãe de quitosano pesou-se 9mg de quitosano num frasco de vidro e adicionou-se, em agitação, 3ml de ácido acético ($C_2H_4O_2$). A agitação foi mantida até o soluto estar completamente dissolvido. Ainda em agitação adicionou-se 3,75 ml de água destilada e 2,25ml ($1,9 \times 10^{-3}$ mmol) da solução de $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ previamente preparada. Após um período de 10 minutos, no qual foi mantida a agitação, dispensou-se 1 ml da solução (1mg quitosano + $2,2 \times 10^{-4}$ mmol $SnCl_2$) em cada frasco de vidro. À semelhança das preparações de LBG, utilizou-se uma das preparações de quitosano para marcação no próprio dia. As restantes foram armazenadas no congelador a $-20^\circ C$, após serem purgadas com azoto em frasco capsulado, ou liofilizadas, purgadas com azoto, capsuladas e armazenadas no frigorífico a $4^\circ C$.

6.2. Síntese dos complexos LBG- ^{99m}Tc e quitosano- ^{99m}Tc a partir de kits congelados

Uma vez que os procedimentos de síntese dos complexos de LBG e de quitosano congelados são idênticos, serão descritos seguidamente em conjunto. Os frascos contendo os compostos iniciais (LBG e quitosano) foram retirados do congelador e colocados à temperatura ambiente durante cerca de 15 minutos. De seguida adicionou-se a cada frasco 0,3ml de $^{99m}TcO_4^-$, perfazendo um volume total de marcação de 1,3 ml e agitaram-se cuidadosamente após a introdução do pertecnetato de sódio. A actividade e hora da marcação foram registadas. As preparações obtidas foram agitadas várias vezes ao longo do tempo de incubação, tendo-se realizado o controlo da qualidade, de acordo com o método descrito no sub-capítulo 7, aos 15, 30, 45, 60, 90, 150 e 180 minutos após a marcação.

6.3. Síntese dos complexos LBG- ^{99m}Tc e quitosano- ^{99m}Tc a partir de kits liofilizados

Do mesmo modo, os procedimentos de síntese dos complexos de LBG e quitosano liofilizados são idênticos, tendo sido descritos em conjunto. Os frascos contendo os compostos iniciais (LBG e quitosano) foram retirados do frigorífico e colocados à temperatura ambiente. Numa seringa preparou-se 0,3ml de $^{99m}TcO_4^-$, perpez-se com água destilada até 1ml e adicionou-se a cada frasco. Após a introdução do pertecnetato de sódio as preparações foram agitadas

cuidadosamente e a actividade e hora da marcação registadas. Ao longo do tempo de incubação foram agitadas várias vezes, tendo-se realizado o controlo da qualidade aos 15, 30, 45, 60, 90, 150 e 180 minutos após a marcação.

6.4. Estabilidade *in vitro* das preparações após marcação com ^{99m}Tc

A estabilidade dos complexos de ^{99m}Tc obtidos a partir dos compostos congelados ou liofilizados de LBG e quitosano, preparados através de soluções-mãe, foi avaliada quanto à variação do volume, do valor de pH e da determinação do período de validade, sendo os procedimentos descritos seguidamente. Em cada parâmetro estudado foi utilizado o mesmo procedimento para as preparações de LBG e de quitosano. Os compostos foram preparados a partir de soluções-mãe, conforme descrito no ponto 6.1, e marcados de acordo com os métodos descritos nos pontos 6.2 e 6.3 do presente capítulo.

6.4.1. Estudo do efeito da diluição

Após a síntese dos complexos tecneciados de LBG e quitosano as preparações incubaram durante 30 minutos à temperatura ambiente, tendo-se adicionado, em agitação, um volume de 5 ml ou 10 ml de água destilada previamente purgada. A agitação das preparações foi mantida durante 10 minutos. A pureza radioquímica de cada preparação foi determinada 45, 60, 90, 120, 150, 180 e 300 minutos após a diluição.

6.4.2. Estudo da variação do pH

O comportamento das preparações congeladas e das preparações liofilizadas perante a variação do pH foi estudado separadamente após marcação com ^{99m}Tc e variação do volume até 10ml. Mais uma vez a estabilidade *in vitro* da preparação foi avaliada através da determinação da pureza radioquímica da LBG- ^{99m}Tc e do quitosano- ^{99m}Tc . Quinze minutos após a síntese dos complexos tecneciados de LBG e quitosano o valor do pH inicial das preparações foi medido recorrendo ao método colorimétrico, com papel indicador. Adicionou-se em agitação, 10 ml de água destilada, previamente purgada e mediu-se novamente o valor do pH após a diluição. A pureza radioquímica foi determinada de acordo com o método descrito no sub-capítulo 7. Adicionou-se, de seguida, em agitação e gota a gota, 70µl de HCl 0,1M até obter um valor de pH=2, tendo sido determinada a pureza radioquímica do complexo de ^{99m}Tc sempre que se verificou alteração do valor de pH. Adicionou-se, posteriormente, em agitação

e gota a gota, 300µl de NaOH 0,1N até obter um pH=10. Foi igualmente determinada a pureza radioquímica do complexo de acordo com o método descrito no sub-capítulo 7, sempre que se verificou alteração do valor de pH

6.4.3. Estudo da integridade da preparação ao longo do tempo

No sentido de aferir o período de validade de cada preparação foi realizado o estudo da eficiência de marcação ao longo do tempo pós armazenagem. Para tal, prepararam-se, de acordo com os procedimentos previamente descritos, compostos de LBG e quitosano através de soluções-mãe, que foram conservados através do congelamento ou liofilização. Registou-se o número de dias desde a preparação da solução-mãe até ao dia da marcação com ^{99m}Tc tendo-se sintetizado cada um dos complexos de acordo com os procedimentos descritos nos pontos 6.2 e 6.3. A pureza radioquímica de cada preparação foi determinada aos 30, 45, 60, 90, 120 e 150 minutos após a marcação.

7. Controlo da Qualidade da LBG-^{99m}Tc e do quitosano-^{99m}Tc

Após os procedimentos de marcação, o radiofármaco obtido foi sujeito a testes de controlo da qualidade, que incluíram a determinação do pH pelo método de comparação de cores (pH-Fix 1.0-14.0, Whatman) e a determinação da pureza radioquímica por cromatografia ascendente em camada fina (TLC, do acrónimo inglês *Thin-Layer Chromatography*). Este é um método analítico fiável, rápido e simples, que permite a separação e quantificação das principais impurezas radioquímicas dos complexos tecneciados - pertecnetato livre ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) e espécies reduzidas de tecnécio hidrolisado (^{99m}Tc coloidal). O método baseia-se na progressão de uma fase móvel (solvente) ao longo de uma camada adsorvente (fase estacionária) devido a forças de capilaridade. Dependendo da distribuição dos componentes entre as fases móvel e estacionária, a amostra radioactiva irá migrar ao longo da fase estacionária com diferentes velocidades, separando as impurezas (Decristoforo e Zolle, 2007). A distância que cada componente da amostra percorre é, então, expressa como o valor R_f – migração relativa de um componente em relação à frente de solvente, dado pela seguinte expressão:

$$R_f = \frac{\text{Distância do componente à origem}}{\text{Distância da frente de solvente}} \quad (7.1)$$

O valor de R_f varia entre 0 e 1, correspondendo o valor $R_f = 0$ à retenção do componente no ponto de aplicação (origem) e o valor de $R_f = 1$ à migração do componente com a frente de solvente. O princípio de separação subjacente a este método é a adsorção superficial (forças electrostáticas) e é dependente do sistema cromatográfico escolhido (conjunto fase móvel/estacionária) (Decristoforo e Zolle, 2007).

No presente trabalho, e uma vez que os complexos desenvolvidos apresentam um comportamento coloidal, foi utilizado apenas um sistema cromatográfico para quantificar a presença de ^{99m}Tc livre. Na maioria dos sistemas TLC os componentes coloidais ou com partículas ficam retidos na origem e a alteração da fase móvel ou estacionária não altera as suas propriedades migratórias (Decristoforo e Zolle, 2007). Para quantificar a presença de tecnécio livre ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) utilizou-se, como fase estacionária, placas de 10 cm de comprimento e 1 cm de largura de cromatografia instantânea em camada fina impregnada com sílica gel (ITLC-SG do acrónimo inglês *Instant Thin-Layer Chromatography*, Pall Corporation) e, como fase móvel e 2-butanona (metiletilcetona – MEK). As placas de ITLC são mais rápidas e apresentam uma resolução superior quando comparadas com outras fases estacionárias utilizadas em TLC (Decristoforo e Zolle, 2007). Neste sistema cromatográfico o $^{99m}\text{TcO}_4^-$ separa-se dos restantes componentes, acompanhando a frente do solvente enquanto o complexo- ^{99m}Tc e o ^{99m}Tc -

reduzido-hidrolizado permanecem na origem, de acordo com o representado na 0.

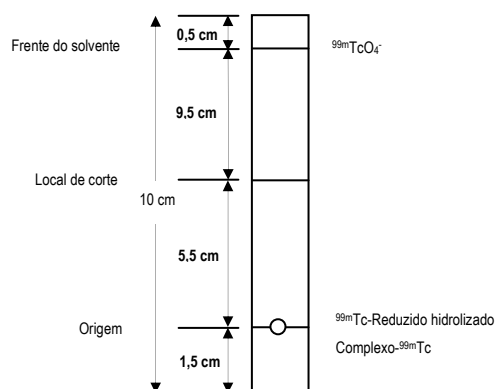


Figura 43 - Sistema que possui como fase estacionária ITLC-SG e como fase móvel o MEK.

Deste modo, a pureza radioquímica de um complexo de ^{99m}Tc é expressa pela percentagem da actividade presente na forma química desejada relativamente à radioactividade total presente na amostra, devendo ser superior a 90% (Decristoforo e Zolle, 2007). Antes da realização da cromatografia para a quantificação do complexo marcado e do ^{99m}Tc livre, as tiras são assinaladas com finos traços a lápis a 1,5 cm, 5,5 cm e 9,5 cm, da base para o topo. Estes traços marcam a origem ($R_f=0$), o ponto médio ($R_f = 0,5$) e a frente do solvente ($R_f = 1$), respectivamente. O solvente é colocado numa tina cromatográfica fechada, de modo a saturar a atmosfera. Sobre a marca que referencia a origem aplica-se uma gota do complexo- ^{99m}Tc . Sem deixar secar a tira, esta é colocada dentro da tina de vidro, em posição vertical, tendo em atenção que o traço que marca a origem deve estar acima do nível do solvente. Após a frente do solvente atingir o traço de referência que se encontra a 0,5 cm da extremidade superior retira-se a tira e deixa-se secar. Coloca-se num suporte adequado para realizar a leitura da radioactividade num radiocromatógrafo (Berthold LB 2723), à velocidade de 1200mm/h, equipado com um cristal de cintilação de NaI(Tl) com 20 mm de diâmetro. O resultado obtido consiste numa curva actividade-comprimento, que traduz a distribuição da radioactividade ao longo da tira cromatográfica. Todos os picos correspondentes a cada componente são pesados individualmente numa balança analítica. A quantidade percentual de cada componente é dada pelo peso do pico correspondente em relação ao peso total da curva actividade-comprimento obtida. Assim, a percentagem (%) de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ consiste em:

$$\% \text{ } ^{99m}\text{TcO}_4^- = \frac{\text{Peso}_{\text{pico } R_f=0,8-1,0}}{\text{Peso}_{\text{curva total}}} \times 100 \quad (7.2)$$

e a pureza radioquímica do radiofármaco desenvolvido traduz-se por:

$$\text{Pureza } RQ(\%) = 100 - \left(\% \text{ } ^{99m}\text{TcO}_4^- \right) \quad (7.3)$$

8. Estudos in vivo

Após a optimização dos procedimentos para a marcação da LBG e do quitosano com ^{99m}Tc foram realizados os estudos *in vivo* com o objectivo de estudar a biodistribuição dos radiofármacos assim como também a dosimetria associada à administração destes radiotraçadores.

Os estudos *in vivo* e dosimétricos foram realizados sob a orientação da Prof. Doutora Maria Filomena Botelho, no Instituto de Biofísica e Biomatemática do Instituto Biomédico da Investigação da Luz e Imagem (IBILI) – Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Para a sua realização, utilizaram-se ratinhos *Balb-c nu/nu* com massas que variaram entre as 16 g e as 34 g. Antes do início dos estudos os animais permaneceram no biotério, com acesso a alimentação e água destilada *ad libitum*. O desconhecimento do comportamento biológico das moléculas em estudo levou a que os estudos de biodistribuição fossem realizados em animais saudáveis. Estes estudos permitem obter informação acerca da absorção, distribuição e excreção, assim como da fixação em órgãos-alvo da LBG- ^{99m}Tc e do quitosano- ^{99m}Tc . Os dados obtidos através do estudo de biodistribuição foram utilizados nos cálculos de dosimetria interna.

8.1. Biodistribuição em Animais Saudáveis

Após anestesia com uma solução de isoflurano administrada por inalação, administrou-se oralmente uma actividade de $13,7 \pm 10,9$ MBq de LBG- ^{99m}Tc e de $20,5 \pm 12,8$ MBq de quitosano- ^{99m}Tc . Após a administração do radiofármaco, os ratinhos foram colocados em gaiolas individuais, com jejum de sólidos e acesso apenas a água destilada, de modo a possibilitar a monitorização da excreção urinária e fecal dos radiofármacos. Os produtos da excreção foram monitorizados no momento do sacrifício de cada rato.

O sacrifício foi realizado por deslocamento cervical, de acordo com a legislação em vigor. Foram utilizados três ratos aos 30, 60, 120, 240, 360, 480, 720 e 1440 min após a administração do radiofármaco. Em cada tempo atrás referido, recolheram-se os vários órgãos inteiros (coração, pulmão, tiróide, vesícula biliar, fígado, baço, estômago, duodeno, intestino delgado, intestino grosso, rins, genitais, bexiga, cérebro e cerebelo), assim como alguns tecidos (cartilagem, músculo, osso e sangue) e fluidos de excreção (bilis, urina, conteúdo do estômago

total, conteúdo do duodeno total, conteúdo do intestino delgado total e conteúdo do intestino grosso total). Cada órgão, tecido ou fluido, depois de pesado, foi contado num contador de poço durante 1 minuto. Todas as medições foram obtidas em contagens por minuto (CPM), tendo sido convertidas para actividade de acordo com a calibração do contador de poço. Uma vez que na maior parte dos órgãos foi possível realizar a recolha integral, a sua actividade foi expressa sob a forma de percentagem da actividade total administrada. Contudo, nos casos dos tecidos, biliar e urina, tal não se verificou, tendo sido calculada a percentagem da actividade total administrada por grama de tecido/fluido (% actividade administrada/grama), de acordo com a seguinte expressão:

$$\% \text{ Actividade administrada/grama} = \frac{CPM_{\text{totais do órgão}} / \text{massa}_{\text{órgão}}}{CPM_{\text{actividade total administrada}}} \times 100 \quad (8.1)$$

Com base nos valores de referência (percentagem da massa total do animal) dos diferentes tecidos/fluidos, foi determinada a % da actividade total administrada para os tecidos, nomeadamente 40% para o músculo, 10% para o osso (esqueleto) e 6% para o sangue.

8.2. *Imagiologia com LBG-^{99m}Tc e quitosano-^{99m}Tc*

Para os estudos de imagem nuclear, utilizaram-se ratinhos *Balb/c nu/nu* após anestesia, segundo o protocolo atrás referido. Trinta minutos após a administração oral de cerca de 14 MBq de LBG-^{99m}Tc e de 21 MBq de quitosano-^{99m}Tc, iniciou-se a aquisição de imagens estáticas através de uma câmara-gama (GE 400 AC), colimada com colimador paralelo de baixa energia e alta resolução, para um computador de aquisição GenieAcq, que a controla. Os ratinhos foram posicionados em decúbito ventral directamente na face do colimador da câmara-gama. As condições técnicas de aquisição de imagem incluíram uma matriz de 256x256 pixéis, duração individual total de 2 minutos e com zoom 2, aos 30, 60, 120 e 240 minutos após a administração de cada radiofármaco. As imagens adquiridas posteriormente tiveram uma duração total superior, de acordo com o número de períodos de semi-desintegração decorridos, nomeadamente, 4 minutos nas imagens adquiridas aos 360 e 480 minutos, 8 minutos nas imagens adquiridas aos 720 minutos e 16 minutos nas imagens adquiridas aos 1440 minutos. Foram ainda adquiridas imagens das fezes eliminadas e do intestino após o sacrifício. As imagens assim adquiridas foram transferidas para uma estação de trabalho

Xeleris GE, onde foram processadas.

O processamento das imagens do intestino consistiu no desenho de regiões de interesse (ROIs) sobre o duodeno, restante intestino delgado e intestino grosso. Para cada imagem foram desenhadas ROIs com as mesmas dimensões que se dispuseram ao longo da imagem do intestino e para as quais se obteve parâmetros proporcionais à distribuição dos radiofármacos, como as contagens totais, contagens médias e as contagens máximas. Obteve-se igualmente os mesmos parâmetros nas imagens das fezes em cada tempo. Os dados obtidos através das imagens do intestino e das fezes foram trabalhados de modo a obter um gráfico paramétrico do movimento do radiofármaco desde o duodeno até ao cólon e fezes eliminadas. O duodeno e o cego foram considerados como segmentos únicos, enquanto o restante intestino delgado e o intestino grosso foram divididos em 3 e 4 segmentos respectivamente, de modo a se observar a progressão ao longo da sua extensão. Com base nas contagens médias obtidas para cada segmento intestinal foi determinada a percentagem da actividade total correspondente. Em ambos os gráficos foi considerada a percentagem máxima obtida por um segmento para a definição da escala a aplicar, tendo-se utilizado a escala de 0-70% no gráfico da LBG-^{99m}Tc e 0-100% no gráfico do quitosano-^{99m}Tc. Utilizando uma gradação de 10% foi atribuída uma intensidade de cor adequada de modo a criar a escala aplicada.

8.3. Estudo dosimétrico em ratinho

Os tempos de retenção dos radiofármacos em cada órgão estudado foram calculados a partir dos dados biológicos obtidos nos estudos de biodistribuição em modelo animal. Os cálculos da dose absorvida foram realizados de acordo com os métodos definidos pelo comité MIRD, utilizando o código de software OLINDA.

Tal como descrito previamente, no Capítulo VII – Dosimetria em modelo animal, foi necessário definir o procedimento experimental com base nos resultados esperados de biodistribuição dos radiofármacos. Assim, definiram-se os órgãos-fonte esperados, tendo-se identificado como tal os órgãos do tubo digestivo com capacidade de retenção/armazenamento, nomeadamente o estômago, o intestino delgado e o intestino grosso. No caso do intestino delgado considerou-se o duodeno separadamente do restante intestino. Uma vez que não se esperaria uma captação do radiofármaco por parte das paredes dos órgãos citados,

considerou-se, inicialmente, como órgão-fonte o seu conteúdo. Contudo, após a colheita dos dados verificou-se que as paredes destes órgãos apresentavam também actividade elevada pelo que foi considerado todo o órgão como fonte. Os restantes órgãos estudados foram considerados como órgão-alvo, tendo sido dado destaque ao fígado e vesícula biliar, devido à possibilidade de o radiofármaco sofrer absorção intestinal e, através do sistema porta-hepático, ser captado ao nível destes órgãos, e ainda à tiróide, rins e bexiga, como controlo da qualidade *in vivo* na identificação de $^{99m}\text{TcO}_4^-$. Foram recolhidos dados em 8 momentos diferentes, de acordo com o perfil de captação, retenção e excreção esperado, designadamente aos 30, 60, 120, 240, 360, 480, 720 e 1440 minutos após a administração do radiofármaco. Em cada momento foram recolhidos dados de três animais, de modo a assegurar a significância estatística dos resultados. Foi realizado o procedimento de recolha de dados descrito anteriormente para os estudos de biodistribuição em modelo animal. Os *inputs* necessários para o software OLINDA/EXM traduzem o número de desintegrações por órgão fonte por unidade de actividade administrada. Assim, para cada órgão foram introduzidos os dados referentes à percentagem da actividade de radiofármaco administrada e o tempo correspondente, de modo a obter a fórmula que traduz o perfil de retenção do radiofármaco. A partir das fórmulas de todos os órgãos-fonte é possível determinar a dose absorvida, de acordo com os cálculos expressos na Introdução.

XI. Bibliografia

- Associazione per la NeUroGastroenterologia e la Motilità Gastrointestinale. (2006). Retrieved 29 de Janeiro de 2006, from <http://jml.anemgi.org/constipation-forum/constipation/introduction.html>
- Altomare, D. F., Portincasa, P., Rinaldi, M., Ciaula, A., Martinalli, E., Amoruso, A., Palasciano., Memeo, V. (1999). Slow-transit constipation. Solitary symptom of a systemic gastrointestinal disease. *Dis Colon Rectum*, 42, 231-240.
- Asli, I., Ehsani MJ, Javadi, H. (2005). Colon transit scintigraphy by 67Ga-citrate for idiopathic constipation. *Iran J Radiol*, 2, 131-136.
- Association, A. G. (2000). American Gastroenterological Association medical position statement: Guidelines on constipation. *Gastroenterology*, 119, 1761-1778.
- Banerjee, S., Pillai M.R., Ramamoorthy, N. (2001). Evolution of Tc-99m in diagnostic radiopharmaceuticals. *Sem Nucl Med*, 31(4), 260-277.
- Barata, M., Lourenço, R., Capacho, A., Fonseca, J., Cyrne, C. (2006). Enterografia peroral por tomografia computurizada: avaliação da patologia do intestino delgado por tomografia computurizada multicorte com contraste oral de goma de alfarroba-sorbitol. *J Port Gastrenterol*, 13, 131-138.
- Bartholomeusz, D., Chatterton, B.E., Bellen, J.C., Gaffney, R., Hunter, A. (1999). Segmental colonic transit after oral 67Ga-citrate in healthy subjects and those with chronic idiopathic constipation. *J Nuclear Medicine*, 40, 277-282.
- Bellen, J. C., Penglis, S., Tsopeles, C. (1992). An alternative radiopharmaceutical to 111In DTPA for colonic transit studies. *Aust NZ J Med*, 22, 414.
- Bellen, J. C., Chatterton, B.E., Penglis, S., Tsopeles, C. (1995). Gallium-67 Complexes as Radioactive Markers to Assess Gastric and Colonic Transit. *J Nucl Med*, 36, 513-517.
- Bennink R, P. M., Maegdenbergh V, Geypens B, Rutgeerts P, De Roo M, Mortelmans L. (1999). Evaluation of small-bowel transit for solid and liquid test meal in healthy men and women. *Eur J Nucl Med*, 26, 1560-1566.
- Bonapace ES, M. A., Davidoff S, Krevsky B, Fisher RS, Parkman HP. (2000). Whole gut transit scintigraphy in the clinical evaluation of patients with upper and lower gastrointestinal symptoms. *Am J Gastroenterol*, 95, 2838-2847.
- Bouchoucha, M., Devroede, G., Faye, A., Le Toumelin, P., Arhan, P., Arzac, M. (2006). Colonic response to food in constipation. *Int J Colorectal Disease*, 21, 826-833.
- Bouhnik Y, R. L., Simoneau G, Vicaut E, Neut C, Flourié B, Brouns F, Bornet F. (2004). The capacity of nondigestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobacteria in healthy humans: a double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, dose-response relation study. *Am J Clin Nutr*, 80, 1658-1664.
- Bowel, L. Retrieved 10 de Abril de 2006, from www.fleshandbones.com/readingroom/pdf/1028.pdf
- Bruneton, J. (2001). *Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales* (3ª Edición ed.). Paris: Technique et Documentation-Lavoisier.
- Burton DD, C. M., Mullan BP, Forstrom LA, Hung JC. (1997). Colonic transit scintigraphy labelled

- activated charcoal compared with ion Exchange pellets. *J Nucl Med*, 38, 1807-1810.
- Camilleri, M., Colemont, L.J., Phillips, S.F., et al. (1989). Human gastric emptying and colonic filling of solids characterized by a new method. *Am J Physiology*, 257, G284-G290.
- Caner, B. E., Ercan, M.T., Kapucu, L.O. Et al. (1991). Functional assessment of human gastrointestinal tract using 99mTc-latex particles. *Nuclear Medicine Communicatons*, 12, 539-544.
- Cann, P. A., Read, N.W., Brown, C., Hobson, N., Holdsworth, C.D.,. (1993). Irritable bowel syndrome: relationship of disorders in the transit os a single solid meal to symptomm patterns. *Gut*, 24, 405-411.
- Charles F., C., M., Phillips S.F., Thomforde, G.M., Forstrom, L.A. (1995). Scintigraphy of the Whole Gut: clinical evaluation of transit disorders. *Mayo Clinic Proceedings*, 70, 113-118.
- Cheng, K., Tsai, S, Lin, W. (2003). Gallium-67 activated charcoal: a new method for preparation of radioactive capsules for colonic transit study. *Eur J Nuclear Medicine Molecular Imaging*, 30, 907-911.
- Cherry, S., Sorenson, J., Phelps, M. (2003). *Physics in Nuclear Medicine*. Philadelphia: Saunders, Elsevier.
- Chourasia, M. K., Jain, S.K. (2004). Polysaccharides for colon targeted drug delivery. *Drug Delivery*, 11, 129-148.
- Cummings, J. The large Intestine in Nutrition and disease. *Danone Chair Monograph Faculty of Medicine, University of Cambridge*. Cambridge.: Faculty of Medicine, University of Cambridge.
- Cummings, J. H., Bingham, S.A., Heton, K.W., Eastwood, M.A. (1992). Fecal weight, colon cancer risk and dietary intake of non-starch polysaccharides (dietary fiber). *Gastroenterology*, 103, 1783-1789.
- Darwiche, G., Björgell, O., Almér, L. (2003). The addition of locust bean gum but not water delayed the gastric emptying rate of a nutrient semisolid meal in healthy subjects. *BMC Gastroenterology*, 3, 12-18.
- de Graaf, E. J., Gilberts, E.C., Schouten, W.R. (1996). Role of segmental colonic transit time studies to select patients with slow transit constipation for parcial left-sided or subtotal colectomy. *Br J Surg*, 83, 648-651.
- Decristoforo C, Z. I. (2007). Quality control methods for 99mTc Pharmaceuticals. In I. Zolle (Ed.), *Technetium-99m Pharmaceuticals: Preparation and Quality Control in Nuclear Medicine*. (pp. 123-149). Berlin: Springer.
- Du, J., Marquez, M., Hiltunen, J., Nilsson, S., Holmberg, A. (2000). Radiolabelling of dextran with rhenium-188. *Applied Radiation and isotopes*, 53, 443-448.
- Education, O. R. I. f. S. a. Radiation internal dose information center. Retrieved 09-09-2009, from <http://dwb.unl.edu/Teacher/NSF/C03/C03Links/www.orau.gov/ehsd/mirdose.htm>
- Eising EG, V. d. O. M. (1998). Differentiation of prolonged colonic transit using scintigraphy with Indium-111-labelled polystyrene pellets. *J Nucl Med*, 39, 1062-1066.
- Emmanuel, A. V., Kamm, A.M. (2001). Response to a behavioural treatment, biofeedback, in constipated patients is associated with improved gut transit and autonomic inervation. *Gut*, 49, 214-219.
- Esperança Pina, J. (2004). *Anatomia humana dos órgãos*. Lisboa: Lidel.

- Freedman, P. N., Goldberg, P.A., Fataar, A.B., Mann, M.M. (2006). A comparison of methods of assessment of scintigraphic colon transit. *J Nuclear Medicine Technology*, 34, 76-81.
- Glia, A., Lindberg, G., Nilsson, L., Mihocsa, L., Åkerlund, J.E. (1999). Clinical value of symptom assessment in patients with constipation. *Dis Colon Rectum*, 42, 1401-1410.
- Glickman, R. (1998). Inflammatory bowel disease: Ulcerative colitis and Crohn's Disease. In A. Fauci (Ed.), *Harrison's Principles of Internal Medicine* (pp. 1579-1583). New York: McGraw-Hill.
- Grybäck P, J. H., Blomquist L, Schnell P, Hellström P. (2002). Scintigraphy of the small intestine: a simplified standard for study of transit with reference to normal values. *Eur J Nucl Med*, 29, 39-45.
- Guarner F, M. J. (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet*, 361, 512-519.
- Hardy, J. G., Wood, E., Clark, A.g., Reynolds, J.R. (1986). Whole-bowel transit in patients with irritable bowel syndrome. *Eur J Nuclear Medicine Molecular Imaging*, 11, 393-396.
- Hassan, F., Al-Enizi, E., Elgazzar, A. (2006). Digestive system 1: gastrointestinal tract. In A. Elgazzar (Ed.), *The Pathophysiologic basis of Nuclear Medicine* (pp. 395-405). Berlin: Springer.
- Henkin R, B. D., Dillehay G, Halama J, Karesh S, Wagner R, Zimmer A (Ed). (2006). *Nuclear Medicine* (2nd Edition ed.). Philadelphia: Mosby, Elsevier.
- Henze, E., Robinson, G., Kuhl, D., Schelbert, H. (1982). Tc-99m Dextran: a new blood-pool-labelling agent for radionuclide angiocardiology. *J Nucl Med*, 23, 348-353.
- Isselbacher, K., Podolsky, D. (1998). Approach to the patient with gastrointestinal disease. In A. Fauci (Ed.), *Harrison's Principles of Internal Medicine* (pp. 1579-1583). New York: McGraw-Hill.
- Jacob, S. W., Francone, C., Lossow, W. (1990). *Anatomia e fisiologia humana*. (5ª Edição ed.). Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, S.A.
- Jurisson S, C. C., Smith S. (2008). Radiometal complexes: characterization and relevant in vitro studies. *Q J Nuclear Medicine Molecular Imaging*, 52, 222-234.
- Kamm, M. A., Hawley, P.R., Lennard-Jones, J.E. (1988). Outcome of colectomy for severe idiopathic constipation. *Gut*, 29, 969-973.
- Kamm, M. A., van der Sijp, J.R., Hawley, P.R., Phillips, R.K., Lennard-Jones, J.E. (1991). Left hemi-colectomy with rectal excision for severe idiopathic constipation. *Int J Colorectal Disease*, 6, 49-51.
- Kiely JM, N. J., Graewin SJ, Pitt HA, Swartz-Basile DA. (2005). Altered Intestinal Motility in leptin-deficiente obese mice. *J Surgical Research*, 124, 98-103.
- Kim, E., Jeong, H., Park, I, Cho, C., Kim, C., Bom, H. (2005). Hepatocyte-targeted nuclear imaging using ^{99m}Tc-Galactosylated chitosan: conjugation, targeting and biodistribution. *J Nucl Med*, 46, 141-145.
- Koch, A., Voderholzer, W., Klauser, A., Müller-Lissner, S. (1997). Symptoms in chronic constipation. *Dis Colon Rectum*, 40, 902-906.
- Konijnenberg, M., Bijster, M., Krenning, E., Jong, M. (2004). A stylized computational model of the ret for organ dosimetry in support of preclinical evaluations of peptide receptor radionuclide therapy with ⁹⁰Y, ¹¹¹In or ¹⁷⁷Lu. *J Nucl Med*, 45, 1260-1269.
- Kowalsky, R. J., Falen, S.W. (2004). *Radipharmaeaceuticals in Nuclear Pharmacy and Nuclear Medicine*. (2ª Edição ed.). Washington: American Pharmacists Assiciation.
- Krevsky B., M., L.S., D'ercole F., Maurer, A.H., Fisher R.S. (1986). Colonic transit scintigraphy. A

- physiologic approach to the quantitative measurement of colonic transit in humans. *Gastroenterology*, *91*, 1102-1112.
- Lewis SJ, H. K. (1997). Increasing butyrate concentration in the distal colon by accelerating intestinal transit. *Gut*, *41*, 245-251.
- Lubowski, D. Z., Chen, F.C., Kennedy, M.L., King, D.W. (1996). Results of colectomy for severe slow transit constipation. *Dis Colon Rectum*, *39*, 23-29.
- Lundin, E., Kalbom, U., Westlin, J.E., Kairemo, K., Jung, B., Husin, S., Pahlman, L., Graf, W. (2004). Scintigraphic assessment of slow transit constipation with special reference to right- or left- sided colonic delay. *Colorectal Dis*, *6*, 499-505.
- Lundin, E. (2005). *Slow Transit Constipation. Aspects of Diagnosis and Treatment*. (Vol. 31). Uppsala: Digital Comprehensive Summaries of Uppsala.
- Lynn, R., Friedman, L. (1998). Irritable Bowel Syndrome. In A. Fauci (Ed.), *Harrison's Principles of Internal Medicine* (pp. 1579-1583). New York: McGraw-Hill.
- Madsen, J. L., Jensen, M. (1989). Gastrointestinal transit of technetium-99m-labeled cellulose fibre and indium-111-labeled plastic particles. *J Nuclear Medicine*, *30*, 402-406.
- Mahamood, A., Jones, A. (2003). Technetium Radiopharmaceuticals. In M. Welch, Redvanly, C. (Ed.), *Handbook of Radiopharmaceuticals. Radiochemistry and applications*. (pp. 323 - 362). West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.
- Malagelada, J. (2004). Gastrointestinal motility and perception disorders re-visited. *Rev Esp Enferm Dig*, *96*(7), 477-483.
- Marteau P, P. P., Dpré J, Béra-Maillet C, Bernalier A, Corthier G. (2001). Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol*, *67*(10), 4939-4942.
- Martin Behe, Jin D., Wolfgang Becker, Thomas Behr, Christa Angerstein, Marcela Márquez, Jukka Hiltunen, Sten Nilsson and Anders R. Holmberg. (2001). Biodistribution, blood half-life, and receptor binding of a somatostatin-dextran conjugate. *Medical Oncology*, *18*(1), 59-64.
- Matsunaga, K., Hara, K., Imaruma, T, Fujioka, T., Takata, J., Karube, Y. (2005). Technetium labelling of dextran incorporating cysteamine as aligand. *Nuclear Medicine and Biology*, *32*, 279-285.
- Maurer, A., Parkman, H. (2006). Update on gastrointestinal scintigraphy. *Semin Nucl Med*, *36*, 110-118.
- McLean, R. G. (2004). Studies of small bowel and colonic transit. In S. S. G. P.J. Ell (Ed.), *Nuclear Medicine in clinical diagnosis and treatment*. (pp. 825-835). New York: Churchill Livingston.
- McLean RG, K. D., Talley NA, Tait AD, Freiman J. (1999). The utilization of colon transit scintigraphy in the diagnostic algorithm for patients with chronic constipation. *Digestive Diseases and Sciences*, *44*, 41-47.
- McLean RG, S. R., Gaston-Parry D, Barbagallo S, Baker J, Lyons NR, Bruck CE, King DW, Lubowski DZ, Talley NA. (1990). Colon transit scintigraphy in health and constipation using oral Iodine-131-cellulose. *J Nucl Med*, *31*, 985-989.
- McLean RG, S. R., Lubowski DZ, King DW, Barbagallo S, Talley NA. (1992). Oral colon transit scintigraphy using indium-111 DTPA: variability in healthy subjects. *Int J Colorect Dis*, *7*, 173-176.
- McLean RG, S. R., Barbagallo S, King DW, Stein P, Talley NA. (1995). Colon transit scintigraphy

- using oral Indium-111-labelled DTPA. Can scan pattern predict final diagnosis? *Digestive Diseases and Sciences*, 40(12), 2660-2668.
- Mease, R. C., Lambert, C. (2001). Newer methods of labeling diagnostic agents with Tc-99m. *Sem Nucl Med*, 31(4), 278-285.
- Notghi, A. L. P., Hutchinson, R., Kumar, D., Dulley, N., Harding, L.K. (1994). Use of geometric center and parametric images in scintigraphic colonic transit studies. *Gastroenterology*, 107, 1270-1277.
- Nylund, G., Öresland, T., Fasth, S., Nordgren, S. (2001). Long-term outcome after colectomy in severe idiopathic constipation. *Colorectal Dis*, 3, 253-258.
- O'Conner, M. K. (1996). *The Mayo Clinic Manual of Nuclear Medicine*. (1ª Edição ed.). New York: Churchill Livingstone.
- Palm K, L. K., Ros J, Grasjo J, Artursson P. (1999). Effect of molecular charge on intestinal epithelial drug transport: pH-dependent transport of cationic drugs. *J Pharmacol Experimental Therapeutics*, 291, 435-443.
- Pessoa, U. F. Retrieved 30/09/2009, from <http://www2.ufp.pt/~pedros/bq/carb.htm>
- Proano, M., Camilleri, ., Hillips, S.F., Brown, M.L., Thomforde, G.M, Chapman, N. et al. (1990). Transit through the human colon: regional quantification in the unprepared bowel. *Am J Physiology*, 258, G856-862.
- Redmond, J. M., Smith, G.W., Barofsky, I., Ratych, R.E., Goldsborough, D.C., Schuster, M.M. (1995). Physiological tests to predict long-term outcome of total abdominal colectomy for intractable constipation. *Am J Gastroenterol*, 90, 748-753.
- Richmond JP, W. M. (2004). Review of the literature on constipation to enable development of a constipation risk assessment scale. *J Orthopaedic Nursing*, 8, 192-207.
- Rinaudo, M. (2004). Role of substituents on the properties of some polysaccharides. *Biomacromolecules*, 5, 1155-1165.
- Ringel, Y., Sperber A.D., Drossman, D.A. (2001). Irritable Bowel Syndrome. *Annu Ver Med*, 52, 319-338.
- Rizzo, V., Tomaselli, F., Gentile, A., La Malfa, S., Maccarone, E. (2004). Rheological properties and sugar composition of locust bean gum from different carob varieties (*Ceratonia siliqua* L.). *Journal of Agricultural and food chemistry*, 52, 7925-7930.
- Roberts, J. P., Newell, M-S., Deeks, J.J., Waldron, D.W., Garvie, N.W., Williamns, N.S. (1993). Oral [¹¹¹In] DTPA scintigraphic assessment of colonic transit in constipated subjects. *Dig Dis Sci*, 38, 1032-1039.
- Rouvier, H., Delmas, A. (1996). *Anatomia humana: Descriptiva, topográfica y funcional*. (5ª Edição ed.). Barcelona: Masson.
- Salminen S, B. C., Boutron-Rualt MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau MC, Roberfroid M, Rowland I. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*, 80(suppl. 1), S147-S171.
- Seeley, R., Stephens, T., Tate, P. (1995). *Anatomy & Physiology*.: Mosby, Inc.
- Smart RC, M. R., Gaston-Parry D, Barbagallo S, Bruck CE, King DW, Lubowski DZ, Talley NA. (1991). Comparison of oral Iodine-131-Cellulose and Indium-111-DTPA as tracers for colon transit scintigraphy: Analysis by colon activity profiles. *J Nucl Med*, 32, 1668-1674.
- Smith, T., Petoussi-Hens, N., Zankl, M. (2000). Comparison of internal radiation doses estimated by MIRD and voxel techniques for a "family" of phantoms. *Eur J Nucl Med*,

- 27, 1387-1398.
- Stabin, M., Peterson, T., Holburn, G., Emmons, M. (2006). Voxel-based mouse and rat models for internal dose calculations. *J Nucl Med*, 47, 655-659.
- Stabin, M. (2008). *Fundamentals of Nuclear Medicina Dosimetry*. New York: Springer.
- Stanghellini V, T. C., Corinaldesi R. (2000). Standards for non-invasive methods for gastrointestinal motility: Scintigraphy. A position statement from the Gruppo Italiano di Studio Motilità Apparato Digerente. *Digest Liver Dis*, 32, 447-452.
- Stubbs, J. B., Valenzuela, G.A., Stubbs, C.C. et al. (1991). A non-invasive scintigraphic assessment of the colonic transit of non-digestible solids in man. *J Nuclear Medicine*, 32, 1375-1381.
- Thompson, W. G., Longstreth, G.F., Drossman, D.A., Heaton, K.W., Irvine, E.J., Müller-Lissner, S.A. (1999). Functional bowel disorders and functional abdominal pain. *Gut*, 45, 43-47.
- Turnbull G, V. S., Burnstein M. The colon. In A. Thomson, Shaffer E. (Ed.), *First principles of gastroenterology. The basis of disease and an approach to management*. (5th Edition ed.). Ortho: Janssen.
- Urbain, J. L., Malmud, L.S. (2007). Gastrointestinal System. In P. E. Christian, Waterstram-Rich, K.M. (Ed.), *Nuclear medicine and PET/CT: Technology and Techniques*. (6th edition ed.). Philadelphia: Mosby, Elsevier.
- von der Ohe, M. R., Camilleri, M. (1992). Measurements of small bowel and colonic transit: indications and methods. *Mayo Clinic Procedures*, 67, 1169-1179.
- Weiner, R. E., Thakur, M.L. (2003). Chemistry of gallium and indium radiopharmaceuticals. In M. Welch, Redvanly, C. (Ed.), *Handbook of radiopharmaceuticals. Radiochemistry and applications*. (pp. 363-399). Chinchester: John Wiley & Sons Ltd.
- Wingårdh, K., Strand, S. (1989). Evaluation in vitro and in vivo of two labelling techniques of different 99mTc-dextran for lymphoscintigraphy. *Eur J Nucl Med*, 15, 146-151.
- Wulbrand U, F. M., Pfestroff A, Fehman HC, Du J, Hiltunen J, Marquez M, Arnold R, Westlin JE, Nilsson S, Holmberg AR. (2002). A novel somatostatin conjugate with a high affinity to all five somatostatin receptor subtypes. . *Cancer*, 94(4 Suppl), 1293-1297.
- Yijia Shen, S. Z., Chuan He, Feihu Guo, Xinrong Deng and Jin Du. (2009). Synthesis of octreotide-dextran-avidin for pretargeted peptide imaging and therapy of câncer. *J Nucl Med*, 50(Supplement 2), 1916-1916.
- Retrieved 3 de Julho de 2007, from <http://potency.berkeley.edu/chempages/LOCUST%20BEAN%20GUM.html>
- Retrieved 3 de Julho de 2007, from http://www.cargilltexturizing.com/products/hydrocolloids/locust/cts_prod_hydro_loc.shtml
- Retrieved 10-04-2006, from <http://www.fao.org/docrep/W8079E/w8079e0l.htm>
- Retrieved 3 de Julho de 2007, from <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v16je07.htm>
- Retrieved 19-07-2006, from <http://www.romecriteria.org/>
- Retrieved 29-01-2006, from <http://www.wrongdiagnosis.com/c/constipation/stats-country.htm>
- Normal Gastrointestinal Motility and Function. Retrieved 10 de Abril de 2006, from www.med.unc.edu/ibs
- World Gastroenterologist Organization. Retrieved 9-02-2006, from www.omge.org/globalguidelines/guideline04/g_data4_en.htm

XII. Anexos

1. Resultados dos estudos de biodistribuição do LBG-^{99m}Tc em ratinho em percentagem da dose administrada (%DA)

Órgão / Tempo	30 min	60 min	120 min	240 min	360 min	480 min	720 min	1440 min
Urina	0,00	0,01	0,01	0,31	0,00	0,00	0,24	0,00
Sangue	0,23	0,01	0,02	0,00	0,00	0,01	0,00	0,09
Fígado	0,14	0,12	0,15	0,09	0,08	0,10	0,11	0,10
Baço	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00	0,12	0,01	0,02
Pulmão	0,12	0,04	0,15	0,02	0,02	0,02	0,13	0,02
Coração	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00
Int. grosso (parede)	1,52	0,49	2,26	2,36	1,50	1,38	1,21	2,89
Int. grosso (conteúdo)	1,43	0,66	3,22	2,50	1,91	2,16	3,62	30,80
Intestino Grosso Total	2,95	1,15	5,48	4,87	3,41	3,54	4,83	33,69
Tiróide	0,27	0,04	0,13	0,03	0,03	0,02	0,04	0,01
Cérebro	0,10	0,00	0,04	0,01	0,00	0,00	0,03	0,00
Cerebelo	0,04	0,00	0,02	0,00	0,00	0,01	0,02	0,00
Bexiga	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Genitais	0,05	0,02	0,02	0,01	0,01	0,06	0,01	0,01
Osso	0,33	0,56	0,30	0,16	0,11	0,04	0,33	0,07
Cartilagem	0,01	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,04	0,00
Estômago	2,81	1,40	2,51	0,49	0,69	0,68	0,70	0,91
Estômago (conteúdo)	2,72	1,37	2,91	0,88	1,13	1,76	5,01	5,25
Estômago total	5,54	2,76	5,41	1,37	1,82	2,44	5,71	6,16
Gordura	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00
Rim	0,11	0,05	0,39	0,08	0,09	0,13	0,07	0,09
Vesícula biliar	0,06	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,16	0,00
Bílis	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,10	0,00
Músculo	0,06	0,10	0,23	0,01	0,01	0,02	0,05	0,24
Duodeno (parede)	0,84	0,51	0,29	0,14	0,09	0,12	0,03	0,04
Duodeno (conteúdo)	0,56	0,17	0,13	0,04	0,13	0,09	0,03	0,08
Duodeno total	1,41	0,68	0,43	0,18	0,22	0,21	0,05	0,12
Int. Delgado (parede)	2,50	1,81	3,25	1,91	0,82	0,97	0,95	1,45
Int. Delgado (conteúdo)	2,71	1,62	3,33	2,55	1,10	1,82	5,44	6,70
Delgado Total	5,21	3,43	6,58	4,46	1,93	2,79	6,39	8,14

2. Resultados dos estudos de biodistribuição do quitosano-^{99m}Tc em ratinho em percentagem da dose administrada (%DA)

Órgão / Tempo	30 min	60 min	120 min	240 min	360 min	480 min	720 min	1440 min
Urina	0,003	0,000	0,019	0,008	0,000	0,014	0,053	0,000
Sangue	0,016	0,007	0,016	0,003	0,002	0,003	0,001	0,000
Fígado	0,104	0,063	0,195	0,099	0,130	0,088	0,061	0,019
Baço	0,014	0,009	0,008	0,003	0,004	0,003	0,002	0,001
Pulmão	0,088	0,031	0,053	0,014	0,019	0,011	0,010	0,007
Coração	0,007	0,003	0,011	0,004	0,003	0,006	0,009	0,000
Int. grosso (parede)	0,230	0,399	0,455	1,268	2,161	1,181	0,699	0,319
Int. grosso (conteúdo)	0,325	0,535	0,816	1,290	2,540	1,507	7,472	5,165
Intestino Grosso Total	0,556	0,934	1,271	2,558	4,701	2,687	8,171	5,484
Tiróide	0,042	0,080	0,584	0,054	0,035	0,033	0,029	0,003
Cérebro	0,008	0,004	0,004	0,025	0,005	0,002	0,001	0,001
Cerebelo	0,002	0,003	0,001	0,007	0,010	0,005	0,001	0,000
Bexiga	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Genitais	0,010	0,056	0,022	0,008	0,009	0,009	0,008	0,001
Osso	0,236	0,080	0,243	0,175	0,144	0,055	0,040	0,000
Cartilagem	0,002	0,003	0,003	0,007	0,003	0,001	0,001	0,000
Estômago	1,094	1,335	0,809	0,674	0,735	0,853	0,705	0,277
Estômago (conteúdo)	1,396	1,086	0,763	0,659	0,658	1,190	5,118	0,997
Estômago total	2,490	2,421	1,572	1,333	1,393	2,044	5,823	1,274
Gordura	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Rim	0,221	0,036	0,099	0,040	0,082	0,050	0,051	0,018
Vesícula biliar	0,002	0,001	0,005	0,000	0,001	0,001	0,001	0,000
Bílis	0,001	0,000	0,004	0,004	0,007	0,004	0,001	0,000
Músculo	0,041	0,174	0,033	0,014	0,028	0,017	0,018	0,001
Duodeno (parede)	0,754	0,196	0,071	0,312	0,032	0,160	0,049	0,007
Duodeno (conteúdo)	0,997	0,175	0,024	0,483	0,035	0,218	0,256	0,008
Duodeno total	1,751	0,371	0,095	0,795	0,068	0,378	0,304	0,014
Int. Delgado (parede)	1,049	1,276	0,779	0,755	0,751	0,746	0,483	0,227
Int. Delgado (conteúdo)	1,038	0,945	0,786	0,928	1,988	0,938	2,860	3,703
Delgado Total	2,087	2,221	1,565	1,682	2,740	1,685	3,343	3,930

3. Resultados do processamento da imagem do intestino adquiridas após administração de LBG-^{99m}Tc em ratinho (percentagem contagens médias).

Segmento intestinal	30 min	60 min	120 min	240 min	360 min	480 min	720 min	1440 min
Duodeno	2,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Delgado 1	11,02	0,00	3,38	0,40	0,00	0,00	0,00	0,00
Delgado2	7,36	7,50	5,02	2,63	3,06	5,71	2,34	0,00
Delgado 3	10,12	21,60	6,22	1,88	11,18	4,55	4,90	0,00
Cego	10,57	17,45	23,21	27,87	21,60	19,03	24,47	0,00
Colon1	10,57	17,45	23,21	27,87	21,60	19,03	24,47	0,00
Colon2	10,57	17,45	23,21	27,87	21,60	19,03	24,47	0,00
Cólon 3	5,67	3,16	9,57	2,87	3,90	9,45	10,35	0,00
Cólon 4	19,21	4,24	6,12	4,92	0,00	5,03	2,37	0,00
Cólon 5	12,79	11,09	0,00	2,60	0,00	0,00	0,00	0,00
Fezes	0,04	0,05	0,05	1,07	17,08	18,19	6,64	100,00
Total	100	100	100	100	100	100	100	100

4. Resultados do processamento da imagem do intestino adquiridas após administração de quitosano-^{99m}Tc em ratinho (percentagem contagens médias).

Segmento intestinal	30 min	60 min	120 min	240 min	360 min	480 min	720 min	1440 min
Duodeno	11,20	0,96	0,00	6,99	2,44	1,53	19,54	0,00
Delgado 1	2,45	4,97	2,47	33,36	0,47	0,00	1,04	0,00
Delgado2	45,54	23,42	14,34	29,79	9,11	8,88	29,08	0,00
Delgado 3	8,96	7,04	15,33	8,39	9,25	12,42	4,95	0,00
Cego	10,93	39,44	25,01	11,01	47,24	54,05	32,44	0,00
Colon1	5,82	9,41	7,42	2,66	13,37	4,21	4,82	0,00
Colon2	5,82	9,41	7,42	2,66	13,37	4,21	4,82	0,00
Cólon 3	3,32	2,76	19,20	0,50	2,54	7,20	1,52	0,00
Cólon 4	3,47	2,57	8,81	0,00	0,00	1,98	0,00	0,00
Cólon 5	2,48	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Fezes	0,01	0,02	0,01	4,63	2,23	5,52	1,80	100,00
Total	100	100	100	100	100	100	100	100