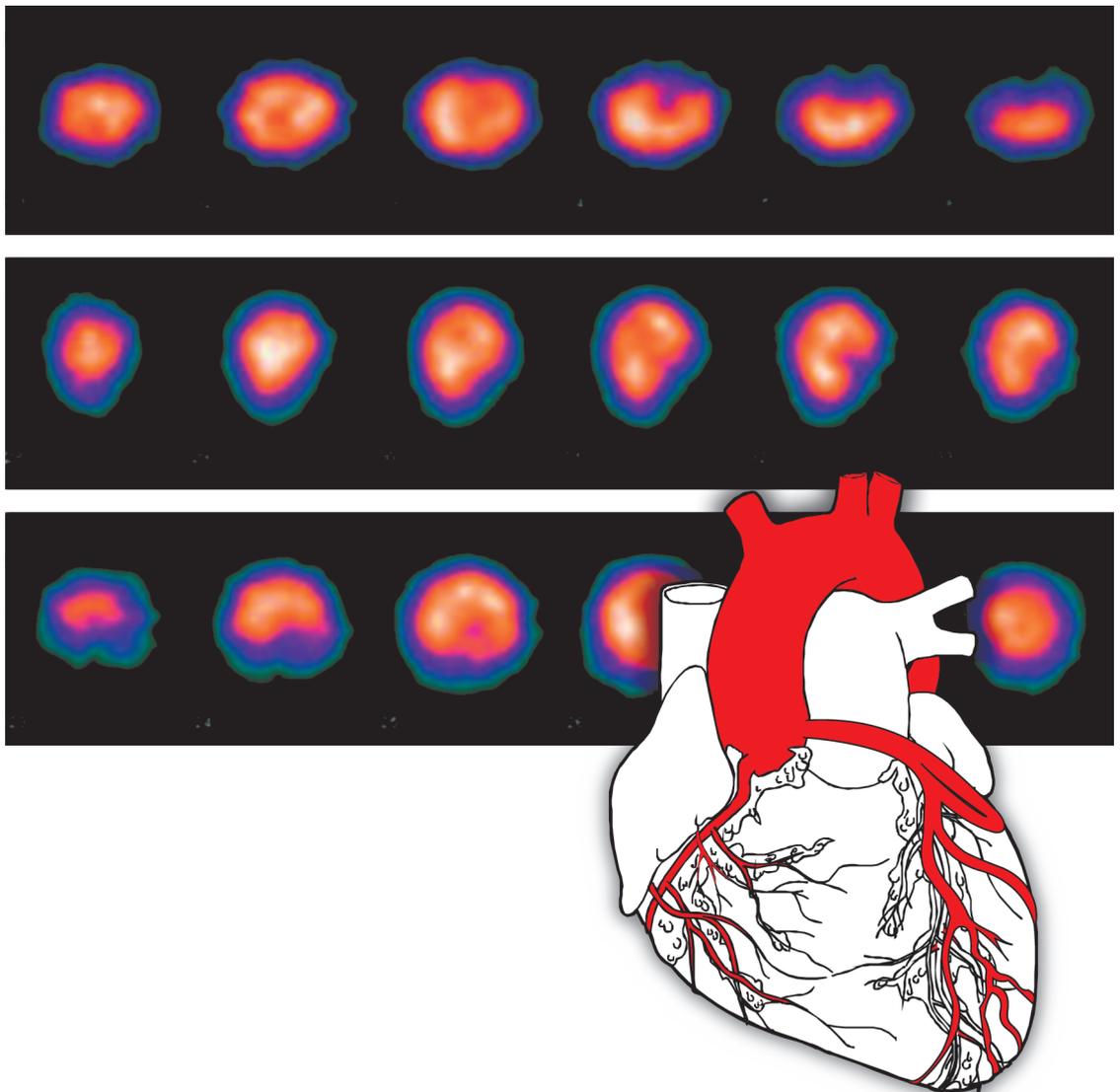


Grande Prémio **Bial** de Medicina 2004_ Menção Honrosa

Desenvolvimento de liposomas com afinidade para áreas miocárdicas isquémicas

ALEXANDRE ANTUNES, MARIA FILOMENA BOTELHO, CÉLIA GOMES, JOÃO JOSÉ PEDROSO DE LIMA,
JOÃO NUNO MOREIRA, SÉRGIO SIMÕES, LINO GONÇALVES



Responsável pela apresentação
José Alexandre Antunes

CARDIOLOGIA NUCLEAR – INVESTIGAÇÃO BÁSICA

**DESENVOLVIMENTO
DE LIPOSOMAS
COM AFINIDADE PARA ÁREAS
MIOCÁRDICAS ISQUÉMICAS**

GRANDE PRÉMIO BIAL DE MEDICINA 2004

ÍNDICE

ÍNDICE

Preâmbulo	7
Parte I – enquadramento teórico	11
Capítulo I – definição do problema	13
A – dados epidemiológicos	15
B – filogenia e fisiologia gerais do aparelho cardiovascular	15
C – a circulação coronária	16
D – função endotelial	17
E – reacção de stresse oxidativo	19
F – metabolismo miocárdico; consequências metabólicas da isquémia miocárdica	19
G – principais efeitos de uma oclusão coronária aguda; o enfarte agudo do miocárdio	20
Capítulo II – liposomas	21
A – considerações essenciais	23
B – liposomas e isquemia miocárdica	26
Parte II – trabalho experimental	31
Capítulo I – objectivos	33
Capítulo II – metodologia	37
A – preparação dos liposomas	39
B – controlo de qualidade	40
C – desenvolvimento do modelo animal de isquemia-reperfusão miocárdica	42
Capítulo III – resultados	49
A – eficiência de marcação do radiofármaco	51
B – eficiência de marcação dos liposomas	52
C – estudo cintigráfico	53
C.1 – aquisições dinâmicas	53
C.2 – aquisições cintigráficas estáticas do coração isolado	55
C.3 – imagens SPET do coração isolado	59
D – estudo de biodistribuição	60
Capítulo IV – discussão	63
A – aspectos metodológicos	65
A.1 – preparação dos liposomas e controlo de qualidade	65
A.2 – modelo experimental animal	66
A.3 – Utilização do ²⁰¹ Tl em simultâneo com os liposomas marcados com ^{99m} Tc	66

A.4 – avaliação funcional com radionuclídeos	·66
A.5 – avaliação da área de risco e de necrose miocárdica	·67
B – resultados obtidos	·67
B.1 – mortalidade	·67
B.2 – produção e marcação dos liposomas	·68
B.3 – execução da técnica cirúrgica	·68
B.4 – dinâmica dos liposomas marcados, na primeira hora após administração	·69
B.5 – Distribuição cardíaca dos liposomas marcados com ^{99m} Tc, distribuição cardíaca do ²⁰¹ Tl administrado e comparação das duas distribuições através de imagens cintigráficas	·69
B.6 – estudo de biodistribuição	·70
Capítulo V – conclusões	·73
Capítulo VI – bibliografia	·77

PREÂMBULO

PREÂMBULO

No estadio actual de desenvolvimento do conhecimento científico, a conjugação de ciências exactas com áreas de conhecimento tradicionalmente mais empírico como a Medicina, comprova o enorme enriquecimento que pode resultar da interação entre as várias vertentes do conhecimento. O importante contributo que áreas como a biofísica, a electrónica dos sinais digitais ou o processamento digital de sinais deram para o avanço da Medicina, colocam esta última numa posição privilegiada para que esse tipo de ligação multidisciplinar seja efectivado.

PARTE I
ENQUADRAMENTO TEÓRICO

CAPÍTULO I

DEFINIÇÃO DO PROBLEMA

A – Dados Epidemiológicos

Nas últimas décadas a Medicina sofreu grandes avanços diagnósticos e terapêuticos. No entanto, as doenças cardiovasculares mantêm-se como a principal causa de morbidade e mortalidade nos países desenvolvidos [1].

O forte impacto destas patologias deve-se ao facto de serem doenças com um envolvimento sistémico, poderem ter manifestações muitas vezes inaugurais graves, como um acidente vascular cerebral (AVC), um enfarte agudo do miocárdio ou mesmo morte súbita, assumirem quando não fatais um carácter crónico, e de atingirem significativamente indivíduos em idade produtiva.

Por outro lado, este grupo das doenças cardiovasculares parece particularmente susceptível de intervenção, pois responde de forma significativa a medidas de prevenção primária, secundária e terciária, como o demonstra por exemplo a diminuição da taxa de mortalidade global nos E.U.A. de 1950 para 1996 em 55% [2].

Temos assim reunidas condições para justificar o envolvimento de esforços a todos os níveis no sentido de minorar o impacto socioeconómico deste grupo nosológico.

As doenças cardiovasculares manifestam-se clinicamente como doença cerebrovascular, doença arterial periférica e doença coronária. Neste trabalho debruçar-nos-emos apenas sobre esta última.

B – Filogenia e Fisiologia gerais do aparelho cardiovascular

Todas as células vivas estão em actividade metabólica constante. Lípidos, glicose, aminoácidos, e oxigénio em aerobiose, têm que estar disponíveis para alimentar o metabolismo celular. Por outro lado, os produtos de excreção resultantes da actividade metabólica têm de ser removidos da célula para não se tornarem tóxicos. Em seres vivos unicelulares ou pluricelulares com uma organização simples como por exemplo os porifera ou platelminta, a difusão directa de solutos e solventes é suficiente para que as trocas anteriormente referidas ocorram nas células; no entanto, no processo de evolução dos animais metazoários, algumas células ficaram tão distantes do ambiente exterior que houve uma pressão de selecção para escolher os organismos que desenvolveram sistemas circulatórios rudimentares, como sejam os pertencentes ao filo Mollusca que possuem um sistema circulatório aberto. Desta forma, os organismos com um sistema vascular funcional capaz de manter a homeostasia a nível dos tecidos e dos órgãos continuaram a evoluir. Surgem assim os Annelida, com sistemas circulatórios fechados e um coração tubular. Esses sistemas, semelhantes a tubos, são formados por células e contêm no seu interior sangue, uma suspensão que possui, entre outros, pigmentos respiratórios capazes de armazenar e transportar oxigénio [3]. No topo evolutivo relativamente ao aparelho circulatório, está a superclasse dos Tetrápodes, pertencentes ao filo Cordata e subfilo Vertebrata: temos a classe dos peixes com apenas uma circulação composta de sangue venoso e um coração formado por 2 cavidades (uma aurícula e um ventrículo), os répteis já com duas circulações mas que se misturam parcialmente num coração com 3 cavidades (duas aurículas e um ventrículo parcialmente septado), e as classes das aves e dos mamíferos

possuidoras de duas circulações que funcionam em série e de um coração com quatro cavidades (duas aurículas e dois ventrículos).

Uma particularidade extremamente importante do coração é o facto de ter que cumprir a sua função propulsora de sangue em circunstâncias que por vezes apresentam um elevado grau de exigência: numa situação de exercício físico, por exemplo, aquele órgão pode ser forçado a quadruplicar o seu débito [4,5]. Para fazer face ao elevado aporte sanguíneo que o músculo cardíaco necessita para funcionar, o processo evolutivo levou ao desenvolvimento de um subsistema circulatório destinado a vascularizar o coração, que se denomina circulação coronária.

C – A circulação coronária

As artérias coronárias nascem na raiz da artéria Aorta. Existem regra geral dois vasos principais: um é a artéria coronária direita que é responsável pela irrigação da aurícula direita, do ventrículo direito e da face inferior do ventrículo esquerdo; o outro é a artéria coronária esquerda, que após um tronco comum se bifurca nas artérias descendente anterior e circunflexa. Estes vasos vascularizam as restantes porções do ventrículo esquerdo e a aurícula esquerda. Estes ramos principais das artérias coronárias estendem-se pela superfície cardíaca exterior pelo que se denominam epicárdicos. Deles nascem outros vasos de menor calibre que se ramificam e penetram no miocárdio, tendo por isso o nome de vasos intramiocárdicos (Fig. 1).

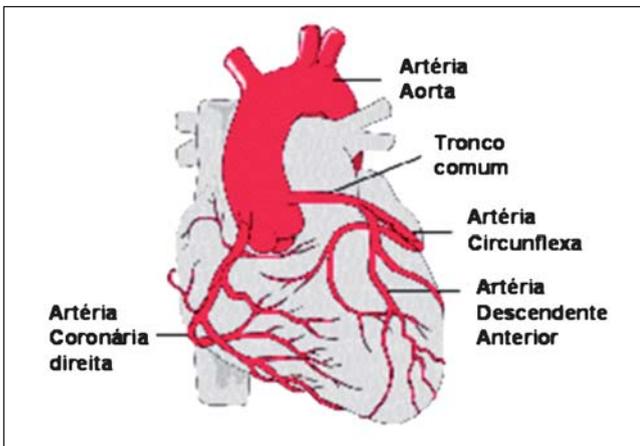


Fig. 1:
Circulação coronária
(mywebpages.comcast.net/wnor/thoraxlesson4.htm)

Como foi referido anteriormente, o coração tem que adaptar continuamente a sua *performance* mecânica às exigências fisiológicas de cada momento. Para que isso seja possível, as artérias coronárias têm que poder acompanhar as exigências metabólicas do miocárdio na dependência das variações do caudal sanguíneo. Na situação de exercício máximo, onde já vimos que o coração pode ter que quadruplicar o seu débito, o caudal coronário deverá ter um

aumento de até 400 %. Estas grandes variações no fluxo sanguíneo coronário são possíveis graças à existência de um mecanismo de autorregulação endógena [6-8].

A autorregulação endógena, mais evidente a nível das pequenas artérias e arteríolas, inclui duas vertentes: a resposta miogénica e a resposta mediada metabolicamente [9]. A primeira designa a capacidade destes vasos adaptarem o seu tónus como resposta directa a alterações da pressão no seu interior. Nesta situação, um aumento na pressão transmural local condiciona vasodilatação o que, por sua vez, leva ao aumento do débito sanguíneo. A resposta metabolicamente mediada consiste na produção, pelas células endoteliais, de substâncias vasoactivas em resposta às variações metabólicas locais: os mecanismos envolvidos não são bem conhecidos, mas os estudos sugerem que por exemplo um aumento na concentração local de metabolitos, leva a um aumento na produção de substâncias vasodilatadoras como o óxido nítrico (NO), enquanto uma diminuição da concentração daqueles produtos condiciona uma maior libertação de substâncias vasoconstrictoras, como a endotelina [6-12]. Este tipo de resposta ilustra bem o papel fundamental do endotélio para um funcionamento dinâmico correcto da circulação coronária. Debrucemo-nos um pouco mais sobre a chamada função endotelial.

D - Função Endotelial

O endotélio normal apresenta, de uma forma global, 3 funções principais que serão seguidamente descritas.

Tem uma função secretora metabolicamente activa. As células endoteliais são capazes de secretar substâncias vasoactivas. Algumas actuam de modo preponderante no controlo do tónus vascular, podendo ter quer um efeito vasodilatador como a prostaciclina, factor relaxante derivado do endotélio (EDRF), óxido nítrico (NO) ou factor hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), quer vasoconstrictor como a endotelina e os prostanóides vasoconstrictores [13-15]. Para além disso, as células do endotélio, assim como as células musculares lisas da média, secretam enzimas metaloproteinases que modulam de uma forma dinâmica a composição da matriz extracelular. O endotélio secreta ainda heparanos e factores de crescimento que regulam a proliferação das células musculares da média.

O endotélio tem também uma função anticoagulante/antitrombótica: as células endoteliais no seu estado normal são antitrombóticas, secretando prostaciclina capaz de inibir a agregação plaquetar, moléculas heparina-like e trombomodulina que activam a proteína C. Além disso, o endotélio secreta antitrombina III que inibe a formação e promove a clearance de trombina, e produz também activador tissular do plasminogénio (tPA) e activador inibidor do plasminogénio I (PAI-I) os quais podem ser modulados, positiva e negativamente respectivamente, pela trombina, angiotensina II e outras substâncias vasoactivas [16-18]. A integridade do endotélio e a carga negativa da superfície celular endotelial contribuem também para a sua função antitrombótica. No entanto, em situações de agressão/inflamação, as células endoteliais podem ser activadas tornando-se protrombóticas: aumenta a expressão na sua superfície de factor tissular que promove a activação da via intrínseca da cascata de coagulação com formação de fibrina, diminui a expressão de trombomodulina e aumenta a expressão de moléculas que promovem a adesão leucocitária.

Outra importante função endotelial é a função de barreira : o endotélio normal funciona como barreira, regulando selectivamente a passagem de constituintes sanguíneos pela parede vascular. A essa acção dá-se o nome de permeabilidade vascular que é levada a cabo através de vários mecanismos: formação de vesículas e canais transendoteliais envolvidos no transporte de substancias hidrossolúveis, existência da fase lipídica da membrana celular endotelial que promove o transporte de moléculas lipossolúveis, e existência de junções intercelulares tipo “tight junction” mais oclusivas a nível arterial e menos activas a nível capilar e pós-capilar [19]. Outro mecanismo envolvido é a contracção das células endoteliais, de forma semelhante à contracção das células musculares lisas, em resposta a uma variedade de agonistas (ex: trombina, histamina e ionomicina) com alteração da morfologia celular e formação de “gap junction” (Fig. 2).

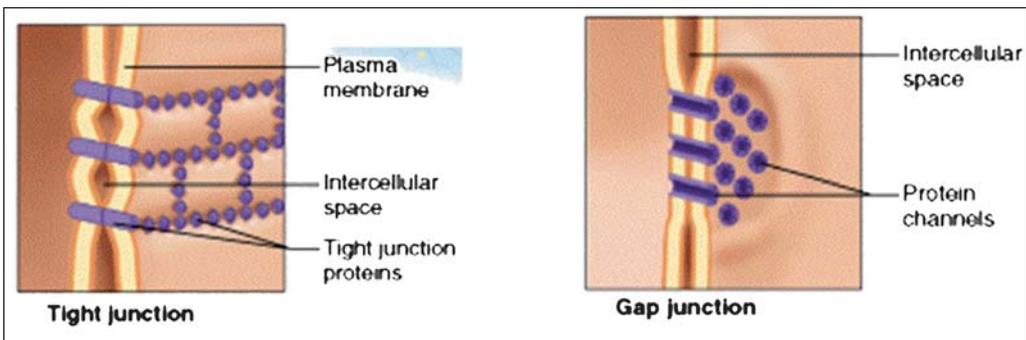


Fig. 2 – tight junction e gap junction

De uma forma geral pode dizer-se que o endotélio normal se encontra em equilíbrio dinâmico funcionando predominantemente em modo inibitório, ou seja, inibindo a adesão leucocitária, a trombose e o crescimento/contracção da média, e promovendo um tónus em que predomina a vasodilatação. No entanto, perante situações patológicas, as células endoteliais tornam-se activas aumentando a permeabilidade vascular, assumindo funções protrombóticas, promovendo a adesão leucocitária, e estimulando a proliferação e contracção das células musculares da média. Estas alterações funcionais podem ser fisiológicas como resposta inicial em determinadas situações tais como inflamação ou isquemia, mas, em caso de persistência da agressão ou em patologias crónicas como a hipertensão arterial ou aterosclerose tornam-se patológicas. Essa alteração funcional patológica do endotélio designa-se por disfunção endotelial.

A noção de que a função endotelial não é imutável mas que se encontra num equilíbrio dinâmico podendo modificar-se em resposta a determinadas situações patológicas, foi um dos conceitos mais importantes em Biologia vascular na última década. A disfunção endotelial existe provavelmente, com maior ou menor precocidade, em todas as doenças cardiovasculares; esta perturbação funcional, que surge como resposta quer a situações de agressão ou stresse ambiental como choque térmico ou metais de transição, quer em situações fisiopatológicas como inflamação ou isquemia, integra-se claramente na chamada reacção de stresse oxidativo.

E - Reacção de stresse oxidativo

O oxigénio, elemento indispensável à vida aeróbia, torna-se agressor quando origina as chamadas espécies reactivas de oxigénio (ROS): espécies químicas independentes que possuem um ou mais electrões desemparelhados na orbital externa. Estas substâncias, quando produto do metabolismo nos seres vivos, têm a capacidade de interagir com moléculas orgânicas chamadas alvo tais como lípidos, proteínas ou ácido desoxirribonucleico (DNA), do que pode resultar a morte celular ou então uma proliferação celular descontrolada.

As células vasculares do endotélio, células musculares lisas e células da adventícia produzem ROS que incluem, entre outras, anião superóxido, peróxido de hidrogénio, óxido nítrico e peroxinitrito [20]. Na presença de determinadas condições fisiopatológicas como situações inflamatórias, isquemia ou hipertensão arterial, a produção de ROS pelas células da parede vascular está aumentada, situação conhecida como stresse oxidativo [21]. O excesso dessas substâncias parece desempenhar um papel essencial na patogénese daquelas perturbações: o ião superóxido por exemplo, reage rapidamente com o NO dando origem ao peroxinitrito, substância estável e muito tóxica capaz entre outras de oxidar lípidos membranares danificando as respectivas membranas e de alterar a função de diversos enzimas. A hipertrofia das células musculares lisas produzida pela angiotensina II é em grande parte mediada pelo peróxido de hidrogénio [22]. As ROS contribuem também para a inflamação vascular estimulando a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais. Há ainda evidência de que os produtos do metabolismo oxidativo originam a libertação de factores de crescimento e activam metaloproteinasas da matriz extracelular, contribuindo assim para o surgimento de lesões nas células da íntima.

F – Metabolismo miocárdico; consequências metabólicas da isquémia miocárdica

As células musculares cardíacas, denominadas cardiomiocitos, conseguem utilizar no seu metabolismo variados substratos tais como ácidos gordos livres, glicose, lactato, piruvato, corpos cetónicos e aminoácidos. Em situações com adequada disponibilidade de oxigénio, o metabolismo miocárdico é predominantemente oxidativo; o substrato utilizado vai depender de variadas condições, nomeadamente da sua concentração arterial, que provém em grande parte da dieta alimentar, e dos níveis hormonais séricos particularmente de insulina [23]. Numa situação de jejum, por exemplo, os ácidos gordos livres são o substrato preferencial, provindo da sua oxidação 60 a 70% do oxigénio total consumido pelo miocárdico [24]. No estado pós-prandial, pelo contrário, é a glicose exógena o composto mais utilizado. Nos doentes diabéticos mal controlados, em que os níveis de insulina estão diminuídos e a hiperglicémia é frequente, é também a glicose exógena o substrato mais utilizado [25,26].

Numa situação de isquémia miocárdica, cuja etiologia mais comum é a diminuição do fluxo sanguíneo coronário por doença aterosclerótica, há diminuição do oxigénio disponível, pelo que a oxidação de ácidos gordos livres diminui tornando-se a glicose exógena no substrato preferencial. Este composto vai ser por um lado metabolizado aerobicamente, num grau directamente proporcional à quantidade de oxigénio residual existente, e por outro lado, o predominante, de forma anaeróbia como o demonstra o aumento na produção de lactato. A quantidade de energia produzida nestas

condições, embora não permita uma adequada funcionalidade do miocárdio afectado, é por vezes suficiente para preservar a integridade celular [27]. A glicose é utilizada na degradação de adenosina trifosfato (ATP) em adenosina, que se difunde para fora das células, causando nas situações agudas arteriolodilatação e dor anginosa. Há também acumulação intracelular de ácidos gordos livres e acetil-carnitina, bem como perturbação da síntese proteica. A diminuição da libertação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático e a acumulação de hidrogeniões (H^+) que competem com o cálcio na ligação às proteínas contrácteis, contribuem para a disfunção sistólica do miocárdio; por outro lado, a diminuição do ATP intracelular disponível, assim como a diminuição da internalização de cálcio intracelular pelo retículo sarcoplasmático, levam ao prolongamento da interacção do cálcio com os miofilamentos causando disfunção diastólica. Os canais iónicos membranares ficam disfuncionantes levando a uma perda de potássio e acumulação de sódio, cálcio e água a nível intracelular. Esta alteração dos gradientes iónicos predispõe a um aumento do automatismo e a uma perturbação da condução do impulso nervoso, favorecendo o aparecimento de circuitos de reentrada.

Quando para além da isquemia miocárdica se verifica uma posterior reperfusão, espontânea ou induzida, há um aumento da produção de ROS que reagem com proteínas, lípidos e ácidos nucleicos contribuindo para a disfunção miocárdica.

Se a perfusão desce abaixo de um limiar crítico, verifica-se um aumento tal nas concentrações de lactato e iões H^+ que inibe a glicólise levando à disrupção da membrana plasmática e morte celular [27].

As consequências de uma isquemia e isquemia-reperfusão não são limitadas aos miocitos estendendo-se também às células endoteliais. Como resultado, surge vasoconstrição e tendência trombogénica localizadas.

G - Principais efeitos de uma oclusão coronária aguda; o enfarte agudo do miocárdio

À oclusão aguda de uma artéria coronária principal segue-se, após alguns segundos, uma sequência típica de eventos: redução progressiva da velocidade de contracção e relaxamento ventriculares, elevação do segmento ST no traçado electrocardiográfico, aumento da pressão telediastólica ventricular e hipocinésia (contractilidade reduzida) da região afectada durante a sístole.

Quando a isquemia persiste surge o enfarte agudo do miocárdio, com morte celular da região miocárdica afectada e consequente acinésia (contractilidade nula) ou discinésia (expansão paradoxal). Estudos experimentais no cão, por exemplo, mostram o surgimento de morte celular focal após cerca de 20 minutos de isquemia. A confluência subendocárdica desses focos torna-se aparente aos 40 minutos, estendendo-se progressivamente para a região subepicárdica que é atingida após cerca de 3 a 4 horas. Por esta altura a morte celular desenvolveu-se em cerca de 90% da sua extensão final, a qual se estabelece após cerca de 6 horas de isquemia. Se considerarmos um coração sem disfunção prévia, quando o enfarte envolve mais de 15% do ventrículo esquerdo, verifica-se uma diminuição da fracção de ejeção e aumento da pressão e volume telessistólicos desta câmara cardíaca; quando a percentagem de envolvimento é superior a 25% surgem sinais evidentes de insuficiência cardíaca, e nos casos em que o envolvimento é superior a 40% surge o choque cardiogénico [28].

Esta sequência de eventos hemodinâmicos e electrocardiográficos que se observa na experimentação animal é semelhante à observada em seres humanos.

CAPÍTULO II

LIPOSOMAS

A - Considerações essenciais

No final dos anos 60, Alec Bangham publica um dos seus trabalhos na área da Bioquímica, onde relata que quando é adicionada água a uma mistura lipídica seca se formam estruturas esféricas com dupla membrana lipídica a que chama liposomas [29]. Com efeito, se numa solução aquosa suspendermos fosfolípidos a uma temperatura em que as respectivas cadeias de ácidos gordos se encontram fluidas (acima da respectiva temperatura de transição de fase), o excesso de meio aquoso leva à formação espontânea de vesículas multilamelares concêntricas de dupla camada fosfolipídica separadas por meio aquoso – liposomas multilamelares (MLV) (Fig. 3)[30].

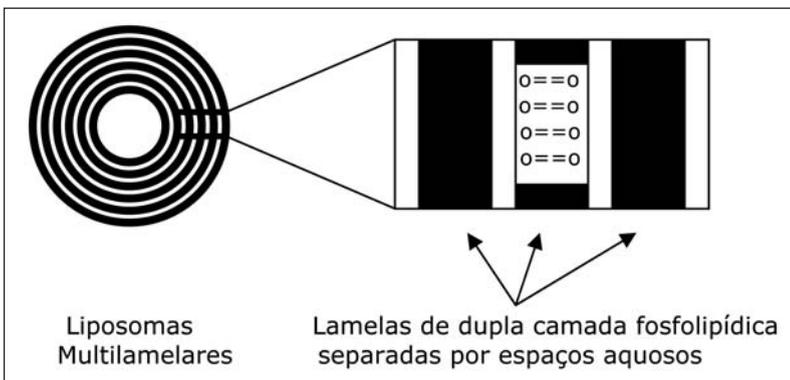


Fig 3 – liposomas multilamelares

A habilidade dos liposomas para englobar água e conseqüentemente solutos numa estrutura fechada de dupla camada fosfolipídica conduziu ao seu uso como modelo de membrana biológica para estudos de permeabilidade. O fosfolípido mais usado tem sido a fosfatidilcolina do ovo. Os liposomas formados por este fosfolípido neutro são de um modo geral permeáveis à água, iões e não-electrólitos [31,32,33]; no entanto, a permeabilidade dos liposomas apresenta variações com a carga dos lípidos usados: se à fosfatidilcolina adicionarmos lípidos com carga positiva (ex: stearylamina) os liposomas catiónicos resultantes serão impermeáveis aos catiões, ao passo que adicionando lípidos de carga negativa (ex: contendo ácido fosfátídico) os respectivos liposomas aniónicos são já permeáveis aos catiões. *A permeabilidade aos protões é baixa para qualquer tipo de liposomas.* Os aniões difundem-se bem através de todos os tipos de liposomas qualquer que seja a sua carga [32,34]. Se aumentarmos o grau de saturação ou o comprimento das cadeias de ácidos gordos dos fosfolípidos, a sua fluidez diminui originando uma diminuição na permeabilidade dos respectivos liposomas [35]. Também se verifica uma diminuição da permeabilidade se adicionarmos Colesterol aos fosfolípidos, novamente devido a uma diminuição na fluidez da bicamada lipídica [36]. A adição de algumas proteínas como a lisosima [37], a proteína básica da mielina [38] e imunoglobulinas [39] aumenta a permeabilidade aos aniões e à glicose, enquanto anestésicos como o éter e o clorofórmio produzem um aumento na permeabilidade aos catiões [40].

Os liposomas são portanto capazes de sequestrar soluções aquosas; a velocidade com que os solutos se escapam do interior destas vesículas (leakage) depende da sua composição e da natureza do soluto. No entanto, moléculas de reduzidas dimensões contendo poucas ligações de hidrogénio escapar-se-ão do interior de liposomas qualquer que seja a sua composição, enquanto moléculas grandes como proteínas permanecerão no interior de quaisquer liposomas desde que não se verifique uma quebra na estrutura destes [41].

Se se incluírem agentes farmacológicos no meio durante a manufactura dos liposomas, aqueles serão encapsulados na fase aquosa se forem hidrofílicos ou intercalados na fase lipídica se forem hidrofóbicos [29]. Assim sendo, para além do seu papel como modelo de membrana biológica, os liposomas começaram mais recentemente a ser encarados como possíveis vesículas transportadoras de fármacos [30]. Se até ao surgimento desta nova vertente para o uso dos liposomas já se tinham desenvolvido vários métodos e variações para a sua preparação, desde essa data numerosos estudos se têm realizado.

No que respeita à preparação dos liposomas diversos métodos foram desenvolvidos pelos vários investigadores nesta área, nomeadamente o chamado método de fase reversa em que uma solução lipídica em etanol é injectada numa solução aquosa através de uma fina agulha hipodérmica. Obtém-se uma suspensão contendo liposomas cujas dimensões variam de acordo com a pressão da injeção [42]. Um outro método descrito detalhadamente por Bangham *et al* [43] e ainda hoje o mais usado (embora apenas como fase inicial de métodos mais complexos) designa-se por método de desidratação-rehidratação. Consiste na preparação de uma solução lipídica (solução-mãe) que é submetida a evaporação do solvente num evaporador rotativo durante o tempo necessário para que se forme, num balão de vidro, um filme lipídico muito fino. Seguidamente, o balão com o filme adsorvido é colocado numa estufa de vácuo até à completa evaporação do solvente, normalmente de um dia para o outro. Posteriormente, o filme é hidratado com uma solução aquosa que pode ou não conter um fármaco. Formam-se assim grandes liposomas multilamelares.

Com os métodos acima referidos os liposomas resultantes podem apresentar dimensões muito heterogéneas. Juliano e Stamp [44] demonstraram que a circulação e captação *in vivo* de liposomas varia significativamente com a dimensão destes; de facto, quando os grandes liposomas multilamelares são injectados por via endovenosa têm um tempo de circulação pequeno (inferior a 30 minutos) devido à rápida captação pelo Sistema Mononuclear Fagocítico (SMF). Esta característica dificulta o seu uso para visualização ou actuação em órgãos que não o fígado ou baço. Se os MLVs forem sujeitos a uma energia mecânica como a agitação manual ou um processo de “sonicação”, eles formam vesículas unilamelares (Fig. 4) que podem ser seguidamente filtrados através de uma extrusão sob pressão em que se obtém liposomas com dimensões homogéneas de acordo com o filtro usado. Podem assim obter-se liposomas de dimensões variáveis, desde os pequenos (diâmetro inferior a 50 nm) designados por SUV (small unilamelar vesicles) aos de maiores dimensões (entre 50 e 100 nm) que se denominam LUVs - large unilamelar vesicles (Fig. 5). Os SUVs e os LUVs têm um tempo de circulação muito maior que os MLVs.

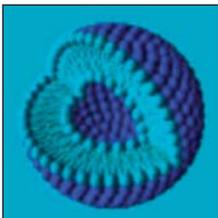


Fig. 4 – Liposomas unilamelares
www.nutraceutia.com/Products

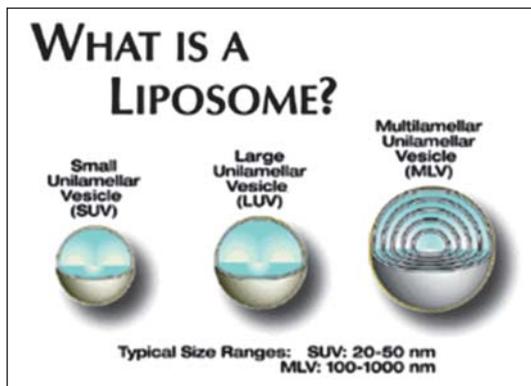


Fig 5 – SUVs, LUVs e MLVs.
(www.nutraceutia.com/Products/Hgh/collagenRX/liposomes.htm)

Para o uso de liposomas *in vivo* como transportadores é fundamental a possibilidade de, uma vez administrados, acompanhar a sua distribuição. Um dos métodos mais usados consiste na marcação dos liposomas com agentes emissores gama de modo a possibilitar a sua detecção cintigráfica. Várias técnicas têm sido desenvolvidas para a marcação de liposomas com radioisótopos. Como características importantes de um método de marcação radioactiva destacam-se a possibilidade de uso de radioisótopos facilmente disponíveis, maneáveis e com propriedades físicas adequadas ao tipo de estudo e processo de marcação, uma eficiência de marcação elevada, e a estabilidade *in vitro* e *in vivo* dos liposomas marcados.

Até à actualidade foram desenvolvidas várias técnicas de marcação de liposomas: pode ser efectuada durante a manufactura, ou seja, os liposomas são marcados por incorporação do radioisótopo na fase lipídica ou por encapsulamento na fase aquosa durante a manufactura. Este método apresenta desvantagens que incluem baixa eficiência de marcação, dificuldade em manter e provar a esterilidade do liposoma e o facto da produção dos liposomas ter que ser feita pouco tempo antes do seu uso clínico. Pode também efectuar-se a marcação da superfície do liposoma após a sua manufactura sendo os liposomas marcados através de ligações químicas ou físicas entre o radioisótopo e a superfície do liposoma. Permite a produção prévia de liposomas (eventualmente num local distante daquele onde serão utilizados) e a sua marcação apenas pouco antes do seu uso. Este método mostrou no entanto problemas na estabilidade *in vivo* devido à exposição da superfície do liposoma às proteínas em circulação. A marcação após manufactura pode também ser efectuada por incorporação na dupla camada lipídica. Neste caso, procede-se à quelação do radioisótopo com um quelante lipofílico, seguida de uma incubação com os liposomas. Apesar da eficiência de marcação *in vitro* ser elevada, a sua eficiência *in vivo* tem sido questionada pois o complexo radioisótopo-quelante é susceptível de ser trocado por lipoproteínas circulantes.

Um outro método de marcação de liposomas é a incorporação de um quelante lipídico durante a manufactura do liposoma com posterior marcação da superfície da vesícula. Normalmente os quelantes são formados por DTPA (Ácido dietilenotriamina pentacético) conjugado com um ácido gordo de cadeia longa ou uma molécula fosfolipídica. Os liposomas são então encubados com o radioisótopo que se liga ao quelante na superfície externa do liposoma. A principal desvantagem deste método é a falta de estabilidade *in vivo*, provavelmente pela

exposição do radiofármaco à superfície do liposoma que o torna susceptível de sofrer interações com moléculas circulantes ou mesmo ser fagocitado pelo SMF. Mais recentemente foi desenvolvido o método de Marcação da fase aquosa do liposoma após manufactura (“after loading”) onde o radioisótopo é transportado através da membrana lipídica para a fase aquosa por um quelante lipofílico. O complexo irá seguidamente interagir com um agente previamente encapsulado na fase aquosa durante a hidratação tornando-se hidrofílico. Desta forma fica irreversivelmente preso na fase aquosa do liposoma. Este método tem demonstrado elevada eficiência de marcação (> 80%); além disso é provavelmente o método com melhor estabilidade *in vivo* devido ao facto do traçador estar protegido de interações exteriores. Por esta razão, este método de marcação tem-se mostrado o mais promissor nos últimos 10 anos.

O Tecnécio 99 metastável (^{99m}Tc) é o radioisótopo mais usado em Medicina Nuclear convencional. Tem um período de semi-desintegração de 6 horas o que permite injectar elevada actividade no doente com uma dosimetria favorável. A sua energia da emissão gama (140 KeV) é ideal para a espessura dos cristais de cintilação habitualmente usados nas câmaras gama. Associadamente, o ^{99m}Tc está facilmente disponível pois é produzido num gerador de Molibdénio (^{99}Mo) e tem uma química fácil e bem conhecida.

Neste trabalho optámos por um método de marcação da fase aquosa do liposoma após manufactura: foi utilizado o quelante hexametilpropilenoamina oxima também designado por exametazima (HMPAO) liofilizado, que forma quelatos com o ^{99m}Tc originando moléculas lipofílicas. As moléculas de ^{99m}Tc -HMPAO são então adicionadas a liposomas previamente produzidos contendo glutatião reduzido encapsulado; vão atravessar a bicamada lipídica e reagir com o glutatião reduzido presente na fase aquosa, formando um complexo hidrofílico, pelo que fica irreversivelmente encapsulado dada a incapacidade de atravessar a fase lipídica. A eficácia de marcação com este método varia de 85 a 98%. A estabilidade dos liposomas marcados é elevada quer *in vitro* quer *in vivo*. Todos os tipos de liposomas podem ser marcados com ^{99m}Tc através deste método com elevada estabilidade. É ainda possível encapsular o glutatião com o quelante metálico desferroxamina para que o liposoma possa ser marcado simultaneamente com ^{99m}Tc e isótopos de maior período (ex: Índio-111). Com estes últimos é possível estudar a biodistribuição dos liposomas até 10 dias após administração.

Os liposomas foram pela primeira vez encarados como possíveis transportadores terapêuticos em 1971 por Leathwood e Ryman [45]: os autores conseguiram encapsular com sucesso o enzima glucamilase do *Aspergillus niger* usando os liposomas para o tratamento de doenças do armazenamento de glicogénio. Desde então a ideia estendeu-se a várias outras aplicações clínicas como o tratamento de neoplasias através do encapsulamento de fármacos para quimioterapia [46, 47, 48, 49], encapsulamento de agentes quelantes para tratamento de intoxicações por metais pesados [50, 51] e também mais recentemente o uso de liposomas para o diagnóstico e tratamento de situações de isquémia mesentérica [52, 53] e miocárdica (estudos com experimentação animal), assim como agentes de visualização usados em medicina nuclear e agentes de contraste em ecografia.

B - Liposomas e isquemia miocárdica

A localização selectiva de agentes farmacológicos em áreas de isquémia facilita de sobremaneira os procedimentos quer diagnósticos (avaliação da lesão coronária e miocárdica) quer

terapêuticos (por forma a tentar evitar ou reverter as consequências da isquémia). De facto, um impedimento maior ao uso de fármacos no tratamento dos síndromes coronários agudos é o acesso limitado e inespecífico ao miocárdio isquémico uma vez que a chegada de qualquer agente terapêutico depende do fluxo sanguíneo regional que se encontra sempre diminuído [54]. Desde a década de 1970 vários investigadores se têm dedicado ao uso de liposomas na isquémia miocárdica. Caride e Zaret [55] publicam em 1977 um trabalho onde usam um modelo canino de isquémia miocárdica e administram às 24 horas de oclusão coronária MLVs de carga positiva, neutra e negativa marcados com $^{99m}\text{Tc-DTPA}$; neste estudo concluem que os Liposomas de carga positiva e neutra se concentram predominantemente na área de enfarte, portanto de forma inversamente proporcional ao fluxo coronário regional. Em 1981 Mueller et al [54] usam também um modelo canino de isquémia, mas desta feita administram Liposomas unilamelares de pequenas dimensões com carga positiva e neutra que são marcados com ^{131}I -Albumina de forma a evitar a leakage do marcador encapsulado. Neste estudo a administração dos liposomas com o radiofármaco é feita às 4 horas de isquémia coronária. Os autores concluem que os Liposomas positivos e neutros se concentram em maior quantidade no miocárdio isquémico sendo maior esta proporção relativa nos liposomas catiónicos; estudos de microscopia electrónica mostram que o conteúdo dos liposomas se localizou nos espaços intravascular e intersticial e a nível das células endoteliais e miócitos isquémicos. Em 1984 novamente Caride e Zaret [56] publicam um novo estudo onde usam também um modelo canino de isquémia miocárdica mas administram MLVs de carga positiva e negativa marcados com $^{99m}\text{Tc-DTPA}$ à primeira hora após oclusão coronária (grupo I) e às 24 horas de oclusão coronária (grupo II). O estudo da dinâmica dos liposomas administrados é feito aos 2 min. e às 2h após a sua injeção. Os autores concluem que em ambos os grupos a distribuição inicial dos 2 tipos de liposomas (aos 2 minutos) é semelhante e directamente proporcional ao fluxo sanguíneo regional (FSR), mas que aos 120 min. a acumulação de liposomas positivos é inversamente proporcional ao FSR (acumulam-se em maior quantidade em zonas isquémicas) o que não acontece com os liposomas negativos. Relativamente a estes resultados os autores colocam a hipótese de que os liposomas positivos reagirão com o tecido isquémico de forma diferente em relação aos liposomas negativos; a carga positiva dos liposomas catiónicos poderá favorecer interações com as membranas celulares negativas (exs: endocitose dos liposomas ou fusão membranar) quer do endotélio vascular quer dos miócitos isquémicos, ou os liposomas positivos poderão ter maior sensibilidade a produtos libertados pelos miócitos isquémicos para a circulação vizinha (exs: enzimas lisosómicas, fosfolipases membranares) que levam à rotura da membrana liposómica com libertação do seu conteúdo para os espaços intravascular e intersticial das regiões isquémicas (Fig. 6).

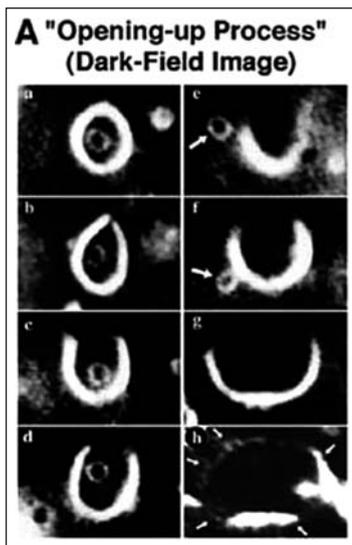


Fig.6 – rotura da membrana lipídica do liposoma, com libertação do seu conteúdo

Uma vez demonstrada a apetência dos liposomas neutros e catiónicos por zonas de miocárdio isquémico, os investigadores procuraram desenvolver a sua especificidade; assim, com base na observação de que os miócitos normais (com membranas celulares intactas) não interagem com anticorpos antimiosina (Ac-AM), surgem trabalhos nos quais, em liposomas unilamelares, neutros ou catiónicos, são intercalados Ac-AM na sua fase lipídica (denominados imunoliposomas) (Figs. 7 e 8) [57-61].

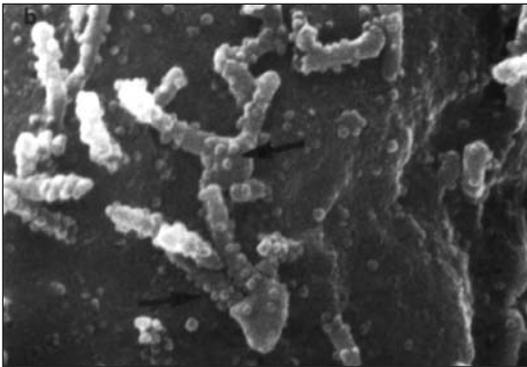


Fig 7 – imunolipossoma; imagem em ME.
(www.luinz.ch/onkwww/lipos.htm)

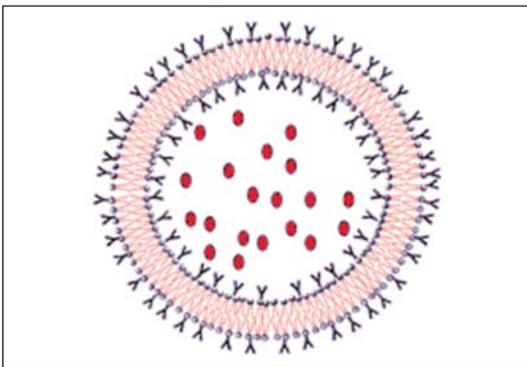


Fig 8 – imunolipossoma; imagem esquemática.
(www.pharmj.com/Editorial/19990828/education/parenteral.html)

Estes estudos confirmam a hipótese de que a incorporação de Ac-AM em liposomas aumenta significativamente a relação concentração de liposomas em miocárdio isquémico/normal; os referidos anticorpos parecem efectivamente aumentar a especificidade dos liposomas para áreas miocárdicas isquémicas onde existem miócitos que sofreram morte celular.

Já no início da década de 90 Torchilin e seus colaboradores publicam trabalhos usando lípidos derivados do polietilenoglicol (PEG) [58,62,63]; de acordo com os autores, com a utilização destes polímeros flexíveis há formação de uma “cápsula protectora” que atrasa a opsonização dos liposomas pelas proteínas plasmáticas e consequente reconhecimento pelo SMF, com maior tempo circulação (Fig. 9).

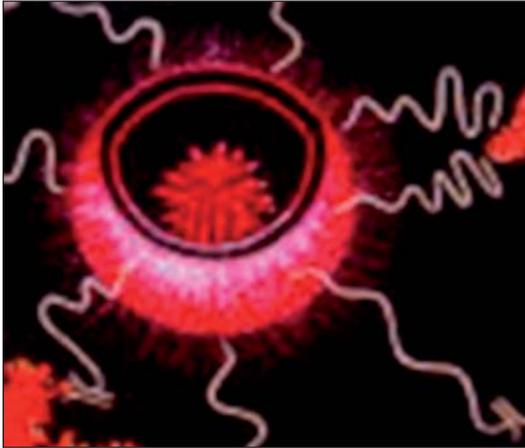


Fig 9 – liposoma peguilado;
imagem esquemática.

Os estudos publicados com liposomas peguilados mostram bons resultados no que respeita à sua acumulação absoluta em regiões de miocárdio isquêmico, provavelmente relacionados com o seu maior tempo circulatório. No entanto, a relação concentração em miocárdio isquêmico/normal é mais baixa do que a dos liposomas com Ac-AM, o que não nos surpreende pois embora estejam mais tempo em circulação a sua especificidade não é superior à dos liposomas unilamelares não peguilados.

A questão pertinente de como será o comportamento de liposomas simultaneamente peguilados e com Ac-AM foi também já estudada [58]: não parece haver um efeito aditivo dos dois efeitos, ou seja, com a incorporação dos anticorpos em liposomas peguilados o aumento na concentração em regiões isquémicas é apenas ligeiro.

Os trabalhos publicados nos últimos anos, em que são usados liposomas unilamelares, neutros ou de carga positiva, peguilados, e em alguns casos com Ac-AM incorporados, envolvem já uma tentativa de intervir farmacologicamente de forma a diminuir os efeitos negativos quer da própria isquémia quer da chamada “lesão de reperfusão” [61,64-66].

Nestes trabalhos são usados modelos animais de isquemia-reperfusão miocárdica (coelho, cão) com grupos que em média variam de 3 a 15 elementos.

Não estão publicados quaisquer estudos a nível nacional com o uso de liposomas na isquémia miocárdica.

PARTE II
TRABALHO EXPERIMENTAL

CAPÍTULO I

OBJECTIVOS

Contextualizado em estudos previamente publicados, pretendemos com este trabalho desenvolver liposomas com afinidade para miocárdio isquémico. Nesse sentido, procederemos à criação de um modelo animal de isquémia-reperfusão funcionante e reprodutível bem como à produção de liposomas unilamelares, neutros peguilados e positivos não peguilados. Esses liposomas serão marcados na sua fase aquosa após manufactura com ^{99m}Tc , garantindo-se um controlo de qualidade da produção e marcação dos referidos liposomas através de sistemas cromatográficos adequados, de forma a comprovar eficiência de marcação e estabilidade *in vitro* elevadas. Procederemos à injeção dos liposomas supracitados no modelo animal acima referido após um período de 90 minutos de isquémia miocárdica, acompanhando durante as 3 horas seguintes a distribuição dos liposomas injectados através de aquisições de imagens cintigráficas com o uso de uma câmara de raios gama. Realizaremos ainda a injeção simultânea de tálio-210, acompanhando também durante as 3 horas seguintes a sua distribuição através de aquisições de imagens cintigráficas com o uso de uma gama câmara. Após o estudo cintigráfico *in vivo* procederemos ao sacrifício do animal e à extracção cardíaca, que será seguida de uma perfusão de corantes específicos de forma a diferenciar grosseiramente as zonas de miocárdio são (cora de azul), miocárdio viável (cora de vermelho) e miocárdio necrosado (cora de negro). Seguidamente realizaremos uma imagem cintigráfica do coração isolado. É ainda nosso objectivo a extracção de uma amostra de tecido das 3 regiões miocárdicas atrás referidas bem como dos restantes órgãos, com contagem em contador de poço para cálculo da actividade específica e estudo de biodistribuição.

CAPÍTULO II METODOLOGIA

A - Preparação dos liposomas:

O primeiro passo na preparação dos liposomas é a obtenção do filme lipídico. A solução-mãe dos liposomas neutros peguados é constituída por fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), metoxi (polietileno glicol) (2000) distearoil fosfatidiletanolamina (mPEG 2000-DSPE) e N-(3'-piridilditio propionil) amino-poli(etileno glicol) (2000) distearoilfosfatidiletanolamina (PDP-PEG 2000-DSPE) numa concentração molar 2:1:0,08:0,02; a solução-mãe dos liposomas positivos é composta por DOTAP e colesterol com uma razão molar 3:1. Começamos por colocar a solução num balão pêra revestido internamente com Clorofórmio (CHCl_3) sendo a rolha revestida com silicone. Este recipiente é levado ao evaporador rotativo em velocidade máxima durante cerca de 2 horas para evaporação do solvente. O balão é colocado em posição quase horizontal para que o filme lipídico que se forma fique o mais fino possível. Após as 2 horas no evaporador rotativo o filme é colocado na estufa de vácuo por mais 24h.

Em seguida procede-se à hidratação e encapsulamento de glutatião reduzido, numa concentração de 50 mM. Para isso, adiciona-se ao filme lipídico uma solução hidratante contendo glutatião reduzido diluído em soro fisiológico (84 microlitros de solução de glutatião em 1,167 ml de solução salina). A mistura é então homogeneizada no agitador durante cerca de 2 minutos, sendo seguidamente aquecida em banho-maria à temperatura de transição de fase por 10 min. Esta sequência é repetida 2 vezes.

Seguidamente, com a finalidade de obter liposomas com menor disparidade de diâmetros, procede-se a uma extrusão manual dos liposomas multilamelares obtidos após hidratação. É utilizado um filtro composto por 2 membranas de policarbonato justapostas com poros de 100nm. A solução é aquecida a uma temperatura acima da temperatura de transição de fase para aumentar a fluidez da membrana liposomal, e com a ajuda de 2 microseringas fazem-se 20 passagens através do filtro. A solução obtida é armazenada à temperatura de 4° C até ao momento da marcação radioactiva para utilização.

Cerca de 30 minutos antes do momento em que irão ser utilizados, os liposomas são marcados com o radioisótopo. Em primeiro lugar procede-se à marcação do quelante Hexametilpropilenamina oxima (HMPAO) com o ^{99m}Tc : obtemos, de um gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, cerca de 1110 MBq (30 mCi) de ^{99m}Tc num volume final de 0,2ml. O radioisótopo é em seguida adicionado a um frasco de HMPAO liofilizado. O ^{99m}Tc vai formar quelatos com o HMPAO gerando-se uma molécula lipofílica. Devido à existência no liofilizado de um agente redutor ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – Cloreto estanhoso dihidratado), o ^{99m}Tc injectado vai passar do estado de oxidação +7 ao estado +5 ligando-se este último aos grupos electrodadores do HMPAO. O radiofármaco obtido é retirado para uma seringa. A solução obtida contém, para além do complexo lipofílico primário (^{99m}Tc -HMPAO) alguns produtos contaminantes, nomeadamente Tecnécio Livre que não passou do estado de oxidação +7 ao +5 não se ligando portanto aos grupos electrodadores do HMPAO, complexo reduzido-hidrolisado (Tecnécio que se reduziu e não se ligou ao HMPAO, e Tecnécio que foi reduzido e ligado ao HMPAO sofrendo no entanto hidrólise), e o chamado complexo secundário (o composto ^{99m}Tc -HMPAO lipossolúvel é instável, com tendência a tornar-se hidrossolúvel. Este último é denominado complexo secundário).

Finalmente é feita a marcação dos liposomas com o traçador ^{99m}Tc -HMPAO, sendo no entanto antes retirada uma amostra desta solução para se proceder ao controlo de qualidade,

como se descreve posteriormente. O processo consiste em adicionar o traçador à suspensão dos liposomas, ficando estes mistura a incubar durante 15 minutos, para que ocorra a difusão do ^{99m}Tc -HMPAO através da bicamada lipídica para o interior das vesículas e, deste modo, ocorra a marcação dos liposomas.

A solução final dos liposomas marcados contém, conforme referido anteriormente, produtos contaminantes. Uma vez que essas substâncias possuem menor massa que os liposomas, podem ser em grande parte eliminadas através de um processo de cromatografia por exclusão molecular (CEM). Com esta técnica, os componentes de menor massa (Tecnécio livre, complexo reduzido-hidrolisado e complexo hidrofílico secundário) ficarão em grande parte retidos na coluna de gel, sendo o eluato final formado maioritariamente por liposomas. Para a CEM usou-se uma seringa de 1ml, no fundo da qual foi colocado um filtro milipore. De seguida encheu-se a coluna cromatográfica com gel Sephadex® G25, tendo o cuidado de não deixar nenhuma bolha de ar. A coluna foi então estabilizada com soro fisiológico a um pH de 7,6. Colocou-se a solução dos liposomas marcados no topo da coluna cromatográfica adicionando novamente soro fisiológico, o que permitiu o arrastamento da solução através do gel e evitou a secagem da coluna. A solução final foi recolhida num tubo de plástico com tampa.

B - Controlo de qualidade:

Radiofármaco (^{99m}Tc -HMPAO)

Conforme referido acima, a solução final dos liposomas pode conter produtos contaminantes; daí a importância de se proceder a um controlo de qualidade. Dada a possibilidade de haver três contaminantes, são necessários três sistemas cromatográficos combinados para a completa determinação da qualidade do composto (Fig. 10). Para esse efeito, e segundo instruções do fabricante baseadas no método descrito por Neirinckx e al em 1987, utilizaram-se como fase estacionária duas tiras de ITLC-SG da Gelman Sciences INC. de 10 cm de comprimento e 1 cm de largura, e uma tira de papel Whatman nº 1 da WHATMAN CHROMATOGRAPHY PRODUCTS de iguais dimensões.



Fig.10 – Imagem de um sistema de microcromatografia ascendente

Todas as tiras são referenciadas a lápis, com três traços transversais, a 1 cm, 5 cm e 9 cm a partir da extremidade inferior. Em cada uma das tiras, sobre a primeira das referências que marca a origem, colocam-se 2 μ l de solução, sendo imediatamente colocadas em frascos que contém 1 cm³ da fase móvel. O sistema n^o 1 é constituído por uma das tiras de ITLC-SG e utiliza como solvente a butanona p.a. Merck; o sistema n^o 2 é constituído pela segunda tira de ITLC-SG e tem como solvente o cloreto de sódio a 0,9%; o sistema n^o 3 é a tira de papel Whatman n^o 1 e tem como solvente uma solução aquosa de acetonitrilo p.a Merck a 50%. Após a frente do solvente ter atingido a terceira referência as tiras são retiradas dos frascos, secas e adquiridas as imagens para a câmara de raios gama para se fazer a quantificação (NEIRINCKX et al, 1987) (Fig. 11).

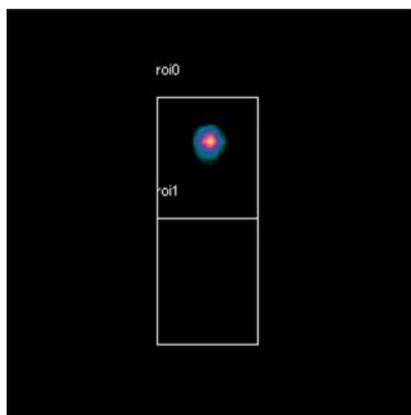


Fig. 11 - Desenho das zonas de interesse correspondentes às metades inferior e superior da tira cromatográfica, para quantificação

No primeiro dos sistemas (fase estacionária: ITLC-SG; fase móvel: butanona) o complexo ^{99m}Tc-HMPAO secundário e o ^{99m}Tc reduzido não ligado permanecem na origem, enquanto o complexo lipofílico ^{99m}Tc-HMPAO e o pertecnetato livre migram com a frente do solvente.

O segundo sistema (fase estacionária: ITLC-SG; fase móvel: cloreto de sódio a 0,9%) detecta a presença de pertecnetato livre que migra com o solvente, enquanto o complexo lipofílico ^{99m}Tc-HMPAO, o complexo hidrofílico ^{99m}Tc-HMPAO e o ^{99m}Tc-reduzido não ligado permanecem na origem. O sistema n^o 3 (fase estacionária: papel Whatman n^o 1; fase móvel: solução aquosa de acetonitrilo a 50%) detecta a presença de ^{99m}Tc-reduzido não ligado que permanece na origem, enquanto o complexo lipofílico ^{99m}Tc-HMPAO, o complexo secundário hidrofílico ^{99m}Tc-HMPAO e o ^{99m}TcO₄ migram com a frente do solvente.

Com as contagens obtidas para cada um dos seis fragmentos obtidos, e após correcção da actividade de fundo, calculam-se as percentagens de cada um dos contaminantes, assim como a percentagem do complexo lipofílico ^{99m}Tc-HMPAO:

% complexo secundário ^{99m}Tc -HMPAO + ^{99m}Tc -Red não ligado:

$$\frac{\text{atividade do fragmento 1}}{\text{atividade total da tira do 1}^\circ \text{ sistema}} \times 100$$

$$\% \text{ de } ^{99m}\text{TcO}_4: \frac{\text{atividade do fragmento 4}}{\text{atividade total da tira do 2}^\circ \text{ sistema}} \times 100$$

% de ^{99m}Tc -Red não ligado:

$$\frac{\text{atividade do fragmento 5}}{\text{atividade total da tira do 3}^\circ \text{ sistema}} \times 100$$

$$\% \text{ de complexo lipofílico } ^{99m}\text{Tc}\text{-HMPAO marcado} = 100 - (\% \text{ de complexo secundário } ^{99m}\text{Tc}\text{-HMPAO} + \% \text{ de } ^{99m}\text{TcO}_4 + \% \text{ de } ^{99m}\text{Tc}\text{-Red não ligado})$$

Liposomas marcados

Para o controlo de qualidade da marcação dos liposomas é necessário apenas um sistema cromatográfico, que utiliza como fase estacionária uma tira de ITLC-SG e para fase móvel soro fisiológico. Neste sistema, os liposomas permanecem na origem, enquanto os traçadores não englobados migram com a frente do solvente.

C - Desenvolvimento do modelo animal de isquemia-reperfusão miocárdica:

Foram utilizados neste trabalho coelhos (*Oryctolagus cuniculus hyplus*) machos adultos (Fig. 12).



Fig. 12 – Coelhos (*Oryctolagus cuniculus hyplus*) machos adultos



Os animais foram primeiramente sedados com cloridrato de xilazina a 2% (0,5cc/Kg IM). Após 10 minutos foi-lhes administrada atropina (0,5mg IM). Procedeu-se então a uma tricotomia ventral e em seguida foi puncionada uma veia periférica de uma orelha (Fig. 13)

Fig. 13 – tricotomia ventral



Em seguida efectuou-se a anestesia com cloridrato de ketamina (2,5mg/Kg em bólus ev inicial, seguido de bólus com a mesma dose a cada 15 min.), e foi colocada uma perfusão lenta de soro com glicose a 5%. Foram posicionados eléctrodos nas raízes dos membros e monitorizada a frequência cardíaca. Seguidamente realizou-se uma traqueostomia, sendo inserido um tubo endotraqueal com calibre de 3,0 mm que foi adequadamente fixado (Fig. 14).

Fig. 14 – traqueostomia com inserção de tubo endotraqueal

Após um intervalo de aproximadamente 10 min para estabilização dos animais procedeu-se a uma toracotomia lateral esquerda, sendo que a partir do momento em que se alcançou o espaço pleural com colapso pulmonar os coelhos foram colocados em ventilação artificial com ar atmosférico enriquecido com oxigénio terapêutico com a ajuda de um ambu pediátrico.

Procedeu-se a uma incisão anterior do pericárdio. Em seguida o coração foi suspenso na sua bolsa pericárdica, após o que, para induzir isquemia miocárdica, se laqueou a artéria coronária descendente anterior no início do seu terço distal através de um nó efectuado com linha cirúrgica de seda (Fig. 15).

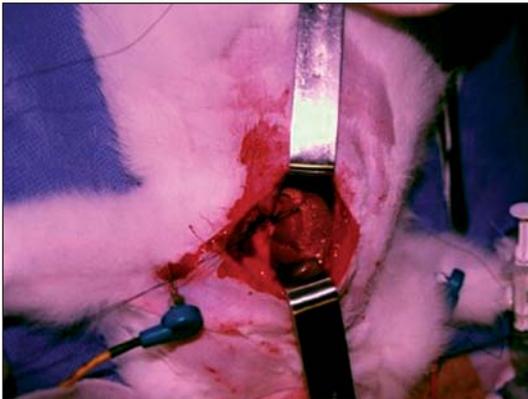


Fig. 15 – laqueação da artéria coronária descendente anterior

Após 90 minutos de isquemia o nó foi seccionado para permitir a reperfusão e simultaneamente procedeu-se à injeção, através do acesso venoso auricular, dos liposomas marcados com o radioisótopo ^{99m}Tc e de 37 MBq de Tálcio 201, seguida de um flush de soro. Quatro coelhos foram injectados com liposomas peguilados de carga neutra e três coelhos com liposomas catiónicos não peguilados. Após a reperfusão coronária e administração dos liposomas marcados os coelhos foram colocados na gamacâmara (Fig. 16), procedendo-se a uma aquisição dinâmica durante a primeira hora pós-reperfusão para matrizes de 64x64 com 120 imagens de 30 segundos em vista anterior, na janela de energia do Tecnécio (140 ± 20 Kev). Seguidamente realizaram-se aquisições estáticas em vista anterior de 128x128 pixels com duração individual de 2 minutos, a cada meia hora, para 2 janelas de energia: 140 ± 20 keV (Tecnécio) e 72 ± 20 Kev (Tálcio).



Fig. 16 – Aquisições na câmara de raios gama

No final da 5ª aquisição estática (às 3 horas de reperfusão) procedeu-se ainda à realização de uma tomografia por emissão de fóton simples (SPET) em 2 janelas de energia: 140 ± 20 keV (Tecnécio) e 72 ± 20 keV (Tálio). Foi usada uma matriz de 64x64, zoom 2, órbita circular com minimização da distância, e com aquisição num arco de 180 graus desde 45° em incidência oblíqua anterior direita até 135° em incidência oblíqua posterior esquerda. A reconstrução foi efectuada sem correcção de atenuação e utilizando técnica de retro projecção filtrada, para o que se usou um filtro de Butterworth com uma frequência crítica de 1,5 associado a um filtro de rampa com uma potência de 12,6.

Procedeu-se em seguida ao sacrifício dos animais. Foi realizada uma incisão desde a fúrcula esternal até à sínfise púbica, para expôr os órgãos. Após lavagem circulatória com soro fisiológico, foi executada a extracção cardíaca. De imediato se procedeu à perfusão de uma solução de trifeniltetrazolium a 1% na artéria coronária descendente anterior distalmente ao ponto da laqueação, e simultaneamente à perfusão de uma solução de azul de Evans a 0,25% na Aorta ascendente (Fig. 17). Este procedimento permitiu uma diferenciação grosseira das zonas miocárdio são (cora de azul), miocárdio viável (cora de vermelho) e miocárdio necrosado (cora de castanho).

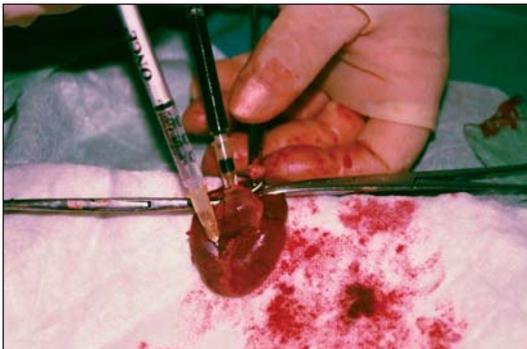


Fig. 17 – injeção de corantes

Tendo passado cerca de 3,5 horas após as injeções dos radiofármacos, o coração isolado foi colocado na câmara de raios gama e realizaram-se aquisições estáticas de 128x128 elementos de resolução com duração individual de 2 minutos para 2 janelas de energia: 140 ± 20 keV (Tecnécio) e 72 ± 20 Kev (Tálio). As aquisições foram realizadas em 2 incidências: ventrículo esquerdo (IE – Fig. 18A) e ventrículo direito (ID - Fig. 18B).

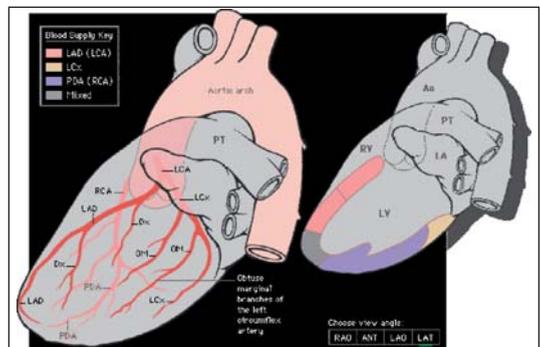


Fig. 18A – esquematização da incidência IE; o círculo colorido representa o local onde esteve laqueada a artéria coronária descendente anterior

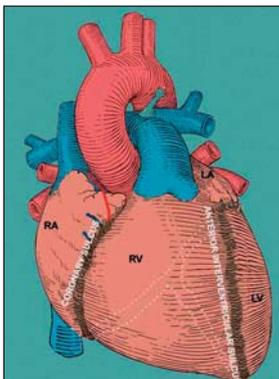


Fig. 18B – Esquemática da incidência ID; o círculo colorido representa o local onde esteve laqueada a artéria coronária descendente anterior. (mywebpages.comcast.net/wnor/thoraxlesson4.htm)

As imagens obtidas na janela de energia do ^{99m}Tc corresponderão à distribuição cardíaca dos liposomas marcados.

No que respeita às imagens na janela do ^{201}Tl , tendo em conta que a frequência cardíaca média (F.C.M.) no coelho adulto em repouso é cerca do triplo da F.C.M. basal no ser humano adulto, deverão corresponder predominantemente à redistribuição cardíaca do radiofármaco no miocárdio isquêmico viável.

A área cardíaca onde ocorre a redistribuição do ^{201}Tl deve estar incluída na região miocárdica vascularizada pela porção distal da artéria descendente anterior que foi experimentalmente ocluída.

Quanto maior a coincidência entre as imagens cintigráficas de redistribuição cardíaca do ^{201}Tl correspondentes ao território de miocárdio isquêmico viável e as imagens de maior concentração dos liposomas marcados na janela do ^{99m}Tc , mais elevada será a afinidade dos liposomas utilizados pelas regiões isquêmicas.

Os resultados obtidos foram primeiramente avaliados através da observação visual qualitativa das imagens processadas; para uma análise semi-quantitativa procedemos da seguinte forma: nas imagens do ^{201}Tl desenhámos, para as duas incidências IE e ID, uma zona de interesse que abrangesse a região de miocárdio isquêmico e uma zona de interesse que correspondesse a miocárdio predominantemente são. Em seguida, as zonas definidas nas imagens do ^{201}Tl foram transpostas para as imagens do ^{99m}Tc .

Para cada zona de interesse foram obtidos os seguintes parâmetros: número de contagens total (CT), o valor do píxel com contagem máxima (CM), e o valor médio das contagens na zona (MED). Finalmente foram calculados os coeficientes de captação (C.C.) da área isquêmica em relação ao miocárdio normal, tanto para o ^{201}Tl como para o ^{99m}Tc :

$$\text{C.C.} = \frac{\text{contagem máxima (CM) na zona de interesse que inclui miocárdio viável}}{\text{valor médio (MED) da zona de interesse com miocárdio predominantemente são}}$$

Com os resultados obtidos para cada coelho calculámos os valores médios e respectivos desvios padrão.

No seguimento das aquisições estáticas, após cerca de 4 horas da administração dos radiofármacos, o coração isolado e com as cavidades preenchidas com pequenas esferas de vidro foi submetido a uma tomografia por emissão de fotão simples (SPET) em 2 janelas de energia: 140 ± 20 keV (Tecnécio) e 72 ± 20 Kev (Tálio). Foi usada uma matriz de 64x64, zoom 2, órbita circular com minimização da distância, e com aquisição num arco de 360 graus, para 64 vistas. A reconstrução foi efectuada sem correcção de atenuação e utilizando técnica de retro projecção sem uso de qualquer filtro.

Após as aquisições cintigráficas foi colhida uma amostra de cada uma das 3 zonas miocárdicas identificadas com os corantes atrás referidos, e depois de extraídos os restantes órgãos foi também colhida uma amostra de urina, sangue, bÍlis, fígado, baço, pulmão, vesícula, intestino delgado, intestino grosso, tiróide, cérebro, cerebelo, bexiga, genitais, costela, apêndice xifóide, estômago, músculo, gordura e rim. As amostras foram colocadas em tubos de vidro sendo calculadas as massas numa balança de precisão PRECISA 205 A Superbal séries (Fig. 19).



Fig. 19 – colheita de amostras de órgãos

Este aparelho permite uma precisão de 10^{-4} g. Seguidamente foram calculadas as contagens específicas (contagens por grama de tecido) num contador de poço DPC-gama-12, Berthold Germany (Fig. 20).



Fig. 20 – Contador de poço

O contador tem doze detectores; cada um deles possui um cristal de iodeto de sódio acoplado a um tubo fotomultiplicador. Este contador é controlado por um computador onde corre um programa específico denominado GMS que permite a leitura simultânea dos doze canais e subtração da actividade de fundo. Os resultados em cpm (contagens por minuto) são depois impressos numa folha de cálculo, com correcção do decaimento. Com base nestes dados foi efectuado um estudo de biodistribuição.

O sistema detector utilizado foi uma câmara de raios gama - Maxicamera digital General Electric 400 AC, dedicada à aquisição, controlada por computador. Esta câmara tem 61 fotomultiplicadores associados a pré-amplificadores, que multiplicam e transformam, primeiro em luz e depois em sinal eléctrico, os fotoelectrões resultantes das cintilações que ocorrem num cristal circular de iodeto de sódio activado com tálio, com 3/8 de polegada de espessura e 400 mm de diâmetro. O computador de controlo na aquisição de imagem é um Genic (General Electric). Está ligado ao detector através de cabos do tipo RS232 e simultaneamente ligado em rede ao sistema de processamento. O sistema de visualização é um monitor policromático de 17 polegadas com uma resolução de 1280x1024 pixels, 256 cores a partir de uma paleta de 16,7 milhões de cores. As imagens de aquisição são de formato DICOM sendo transferidas para um sistema de processamento eNTREGA do mesmo fabricante. Trata-se de um computador com processador Pentium IV, com 512 MB de memória RAM e um disco rígido de 36 GB. O sistema de visualização de imagens deste computador é um monitor policromático Hewlet Packard A4331A de 19 polegadas, com um sistema de arquivo em disco óptico. A resolução é de 1280x1024 pixels com 256 cores.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

Foram utilizados sete coelhos neste trabalho. Os animais apresentavam um peso corporal médio e distribuição pelo sexo semelhante nos 2 grupos considerados: Grupo I os coelhos em que foram administrados liposomas neutros peguilados e Grupo II os coelhos em que foram administrados liposomas positivos não peguilados (Tabela I).

Tabela I – Descrição dos 2 grupos de coelhos estudados

Grupo	Coelhos	Peso (Kg)	Sexo (M/F)	Liposomas usados
I	1,2,3,4	3,9+0,32	4/0	Neutros peguilados
II	5,6,7	4,1+0,35	3/0	Positivos não peguilados

A - Eficiência de marcação do radiofármaco

A eficiência foi calculada através de imagem cintigráfica das tiras de cromatografia, tendo para isso sido colocadas directamente sobre o detector (isoladas com uma folha de plástico). Para a quantificação foi usada uma matriz 128x128 pixels e o tempo de aquisição foi de 30 segundos (Fig. 21).

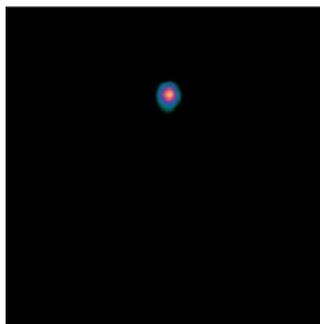


Fig. 21 – imagem cintigráfica do primeiro sistema cromatográfico

O algoritmo usado calcula o integral de actividade da linha ao longo do comprimento da tira, expressando este valor sob a forma de um gráfico actividade/comprimento. De acordo com os cálculos descritos na metodologia, obtivemos, para a percentagem de complexo lipofílico primário $^{99m}\text{Tc-HMPAO}$ ($\%^{99m}\text{Tc-HMPAO}$), os resultados constantes na tabela II:

Tabela II – eficácia de marcação do radiofármaco

Coelho	1	2	3	4	5	6	7	Média+DP
$\%^{99m}\text{Tc-HMPAO}$	81	85	89	88	81	70	75	81,3+6,9

B - Eficiência de marcação dos liposomas

Foi quantificado o número de contagens da tira cromatográfica da forma descrita no item anterior (Fig. 22).

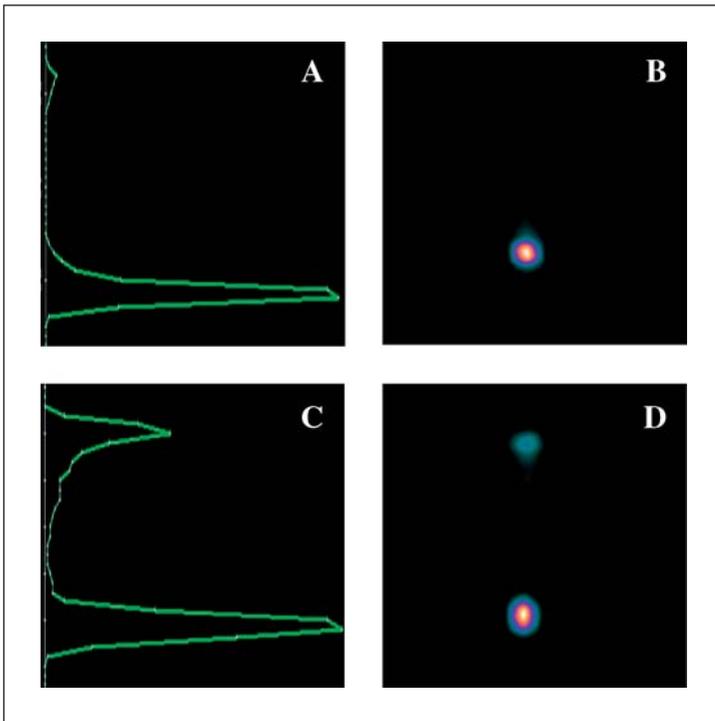


Fig. 22

A – exemplo de gráfico actividade/percurso do sistema cromatográfico para liposomas neutros peguilados. B - Imagem cintigráfica da tira correspondente ao gráfico A. C – exemplo de gráfico actividade/percurso do sistema cromatográfico para liposomas positivos não peguilados. D – Imagem cintigráfica da tira correspondente ao gráfico C

Conforme a metodologia descrita, obtivemos, para a percentagem de liposomas marcados, os seguintes resultados (Tabela III e gráfico 1):

Tabela III – eficácia de marcação dos liposomas

Coelho	1	2	3	4	5	7	8	Média Grupo I	Média Grupo II
% liposomas marcados	91	86	94	86	57	44	68	89,25±3,95	56,33±12,01

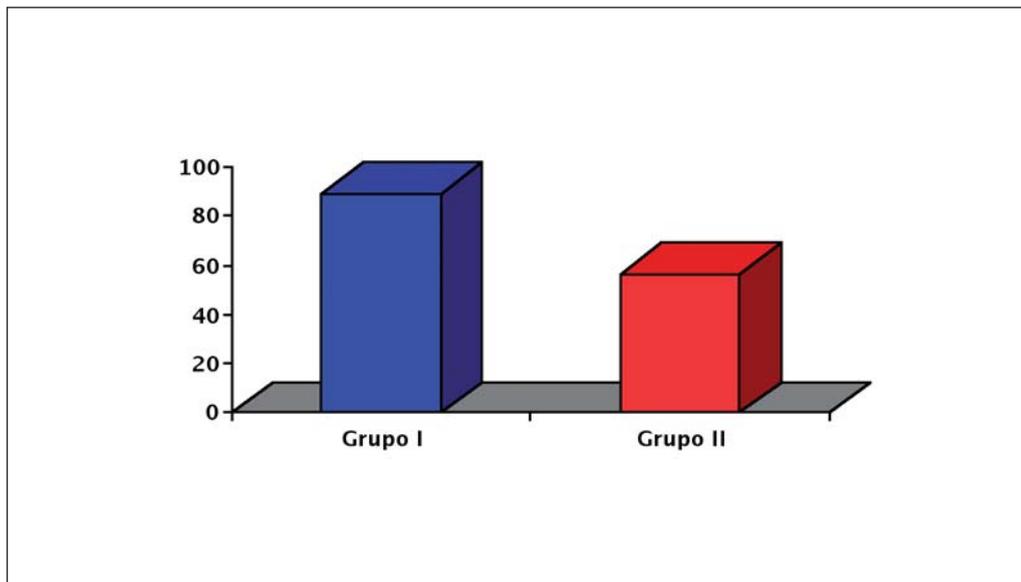


Gráfico 1 – eficácia de marcação dos liposomas

C – Estudo Cintigráfico

C.1 – Aquisições dinâmicas

A aquisição dinâmica durante a primeira hora pós-reperusão, em matrizes de 64x64 com 120 imagens de 30 segundos, em vista anterior, na janela de energia do Tecnécio (140 ± 20 keV), permitiu, após o desenho de áreas de interesse em vários órgãos (coração, pulmão, fígado e rim), obter as respectivas curvas actividade/tempo. Estes valores foram corrigidos para o decaimento do Tecnécio e expressos em percentagem de actividade injectada. Finalmente foram efectuados gráficos relativos aos valores médios nos 2 grupos considerados (Gráficos. 2A e 2B).

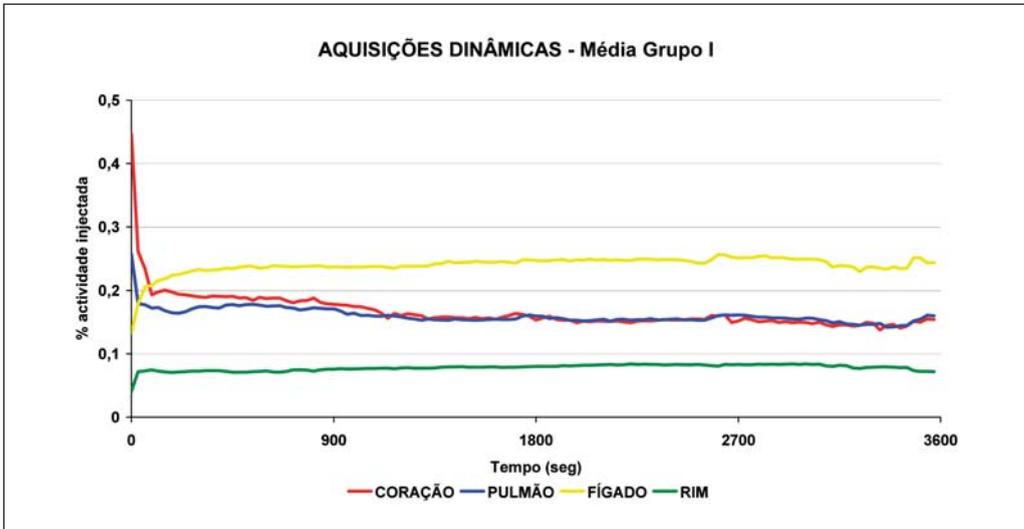


Gráfico 2A – Tradução gráfica dos valores médios correspondentes às aquisições dinâmicas, na primeira hora pós-reperusão, para o coração, pulmão, fígado e rim no grupo I (liposomas neutros peguados)

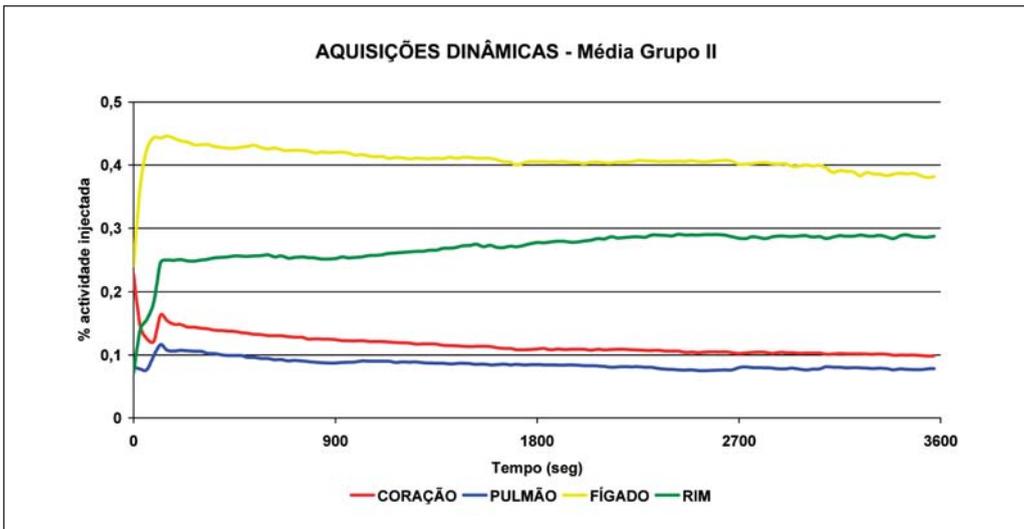


Gráfico 2B – Tradução gráfica dos valores médios correspondentes às aquisições dinâmicas, na primeira hora pós-reperusão, para o coração, pulmão, fígado e rim no grupo II (liposomas positivos não peguados)

C.2 - Aquisições cintigráficas estáticas do coração isolado

Conforme a descrição metodológica, 3,5 horas após as injeções dos radiofármacos o coração isolado foi colocado na câmara de raios gama, directamente sobre o colimador de orifícios paralelos de baixa energia e alta resolução, e realizaram-se aquisições estáticas nas incidências esquerda (IE) e direita (ID). Como já foi referido, as imagens obtidas na janela de energia do ^{99m}Tc correspondem à distribuição miocárdica dos liposomas marcados; relativamente às imagens na janela do ^{201}Tl , tendo em conta que a frequência cardíaca média (F.C.M) no coelho adulto em repouso é cerca do triplo da F.C.M. basal no ser humano adulto, irão corresponder predominantemente à redistribuição cardíaca do radiofármaco no miocárdio isquémico viável (Figs. 23. A e 23.B).

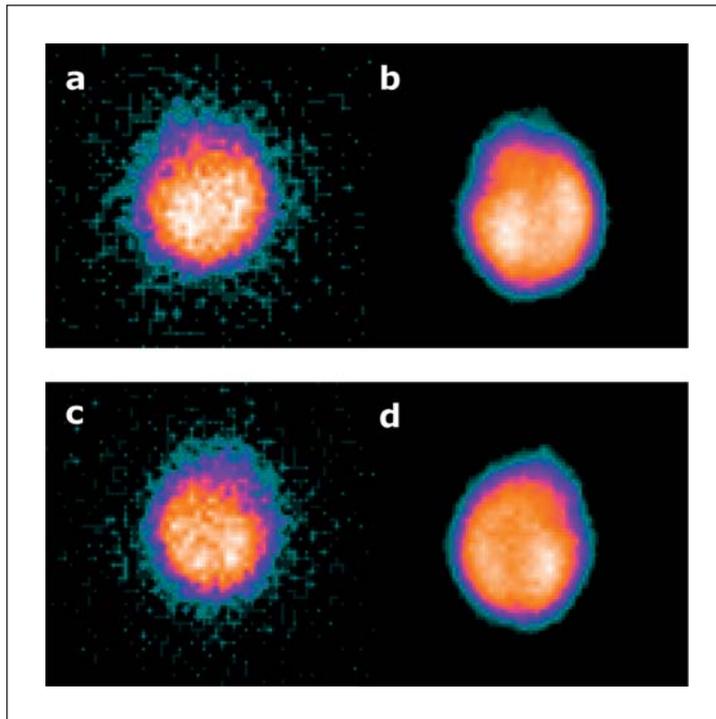


Fig. 23.A – Imagens estáticas do coração isolado de um coelho do grupo I, nas incidências esquerda (IE) e direita (ID), nas janelas de energia do ^{201}Tl e ^{99m}Tc

- | | |
|--------------------------|--------------------------|
| a – IE ^{201}Tl | b – IE ^{99m}Tc |
| c – ID ^{201}Tl | d – ID ^{99m}Tc |

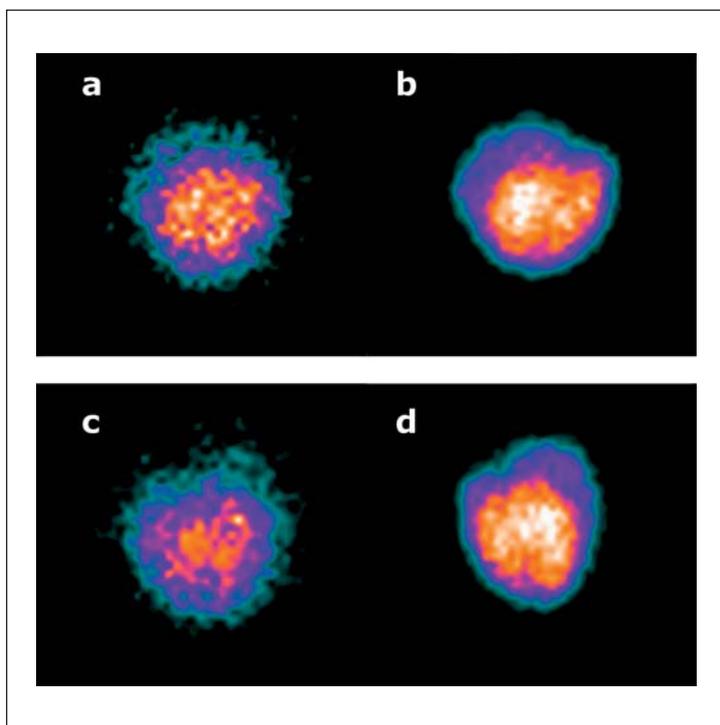


Fig. 23.B – Imagens estáticas do coração isolado de um coelho do grupo II, nas incidências esquerda (IE) e direita (ID), nas janelas de energia do ^{201}Tl e $^{99\text{m}}\text{Tc}$

a – IE ^{201}Tl b – IE $^{99\text{m}}\text{Tc}$
 c – ID ^{201}Tl d – ID $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Em todos os animais dos 2 grupos estudados, a inspeção visual das imagens cintigráficas tardias do ^{201}Tl , correspondentes à sua redistribuição, pareciam efectivamente corresponder à região miocárdica vascularizada pela porção distal da artéria descendente anterior que foi experimentalmente ocluída.

Além disso, parecia também haver coincidência entre as imagens cintigráficas de redistribuição cardíaca do ^{201}Tl correspondentes ao território de miocárdio isquémico viável e as imagens de maior concentração dos liposomas marcados na janela do $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Para tentar objectivar esta primeira análise visual qualitativa, procedemos, conforme o esquema metodológico, ao desenho de áreas de interesse para cálculo dos coeficientes de captação: nas imagens de IE ^{201}Tl desenhamos como áreas de interesse a metade esquerda que abrange a região de miocárdio isquémico e a metade direita correspondente a miocárdio são. Nas imagens de ID ^{201}Tl desenhamos também duas áreas de interesse, mas neste caso a metade direita abrange o miocárdio isquémico e a metade esquerda corresponde a miocárdio são.

Em seguida, as zonas definidas nas imagens do ^{201}Tl foram transpostas para as imagens do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Fig. 24).

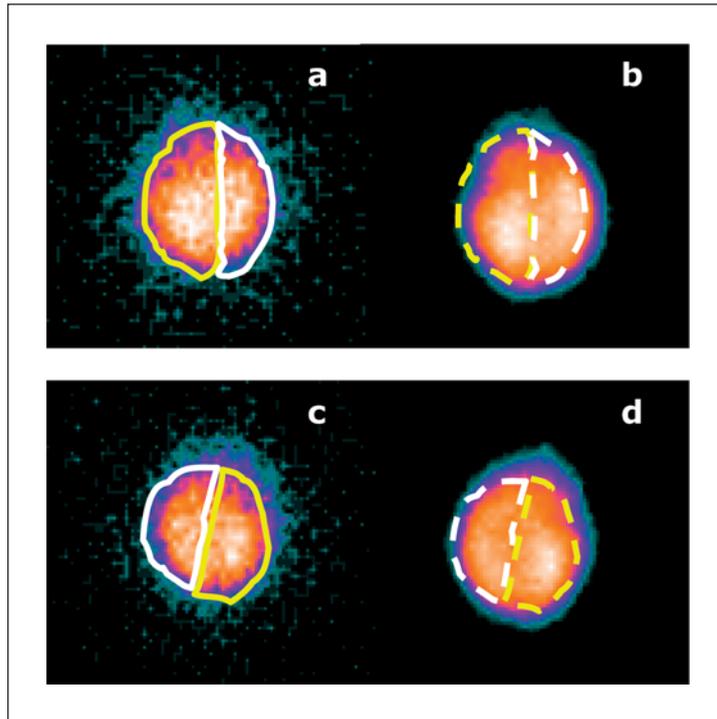


Fig. 24 – Exemplo de desenho de áreas de interesse nas imagens ^{201}Tl e sua transposição para as imagens $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

a – IE ^{201}Tl

b – IE $^{99\text{m}}\text{Tc}$

c – ID ^{201}Tl

d – ID $^{99\text{m}}\text{Tc}$

■ - área de interesse que inclui região de miocárdio isquêmico viável

□ - área de interesse que inclui miocárdio predominantemente são

Para cada área de interesse foram então calculados os seguintes parâmetros: número de contagens total (CT), o valor do píxel com contagem máxima (CM), e o valor médio das contagens na área (M). Finalmente foram calculados os coeficientes de captação (C.C.) da área isquêmica em relação ao miocárdio normal, tanto para o ^{201}Tl como para o $^{99\text{m}}\text{Tc}$:

$$\text{C.C.} = \frac{\text{contagem máxima (MC) na área de interesse que inclui miocárdio viável}}{\text{valor médio (A) da área de interesse com miocárdio são}}$$

Depois de calculados os C.C. para todos os animais, obtiveram-se os respectivos valores médios e desvios padrão (Tabela IV e gráfico 3).

Tabela IV – coeficientes de captação

Incidência	Grupo I		Grupo II	
	²⁰¹ Tl	^{99m} Tc	²⁰¹ Tl	^{99m} Tc
IE	2,38±0,35	2,0±0,39	2,93±0,51	2,05±0,17
ID	1,94±0,26	2,03±0,5	2,78±0,38	2,03±0,28

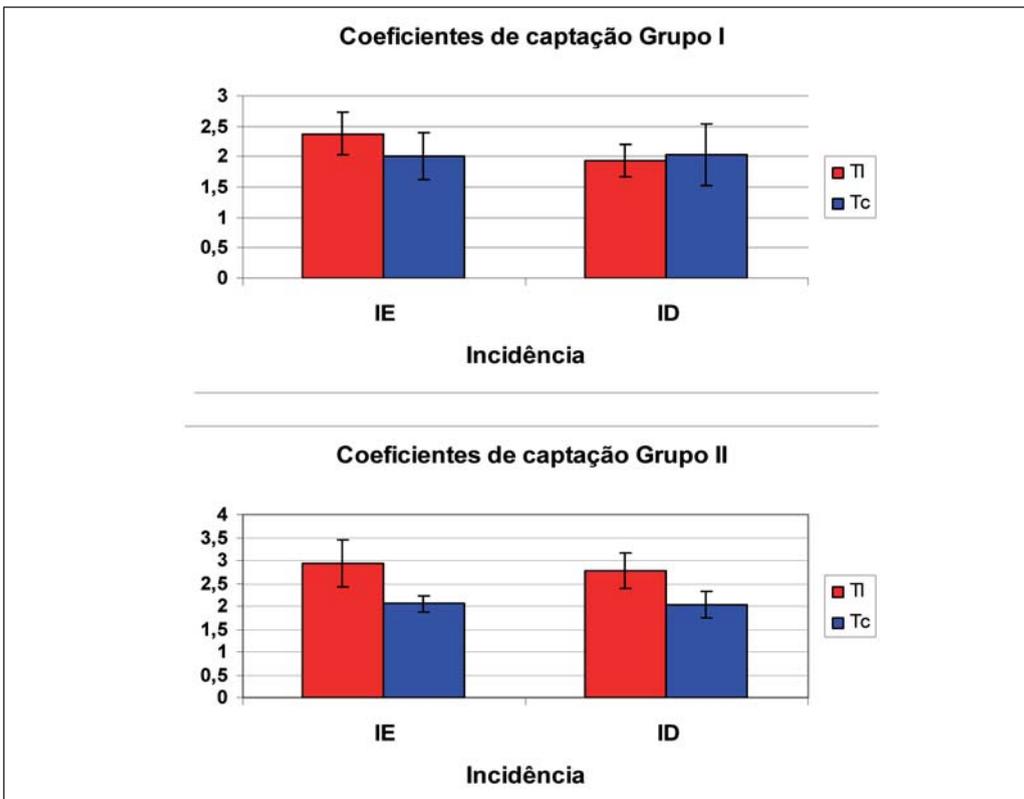


Gráfico 3 – eficácia de marcação dos liposomas

C.3 – Imagens SPET do coração isolado

De acordo com a descrição metodológica, o coração isolado foi submetido a uma tomografia por emissão de fóton simples (SPET), igualmente para 2 janelas de energia: 140 ± 20 keV (Tecnécio) e 72 ± 20 Kev (Tálio). Foi usada uma matriz de 64x64, zoom 2, órbita circular com minimização da distância, pelo que usámos uma cama específica, e com aquisição num arco de 360 graus, para 64 vistas. A aquisição tomográfica foi realizada com uma colimador de orifícios paralelos, de baixa energia e alta resolução (Fig. 25).

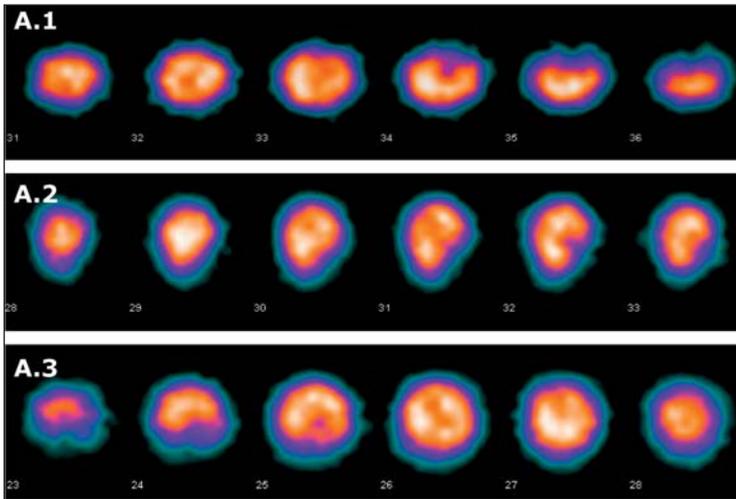


Fig. 25.A – Imagem SPET do coração isolado de um animal do grupo I (injectado com liposomas neutros peguados) na janela do ^{201}Tl :

- A.1 – cortes transversais
- A.2 – cortes sagitais
- A.3 – cortes longitudinais

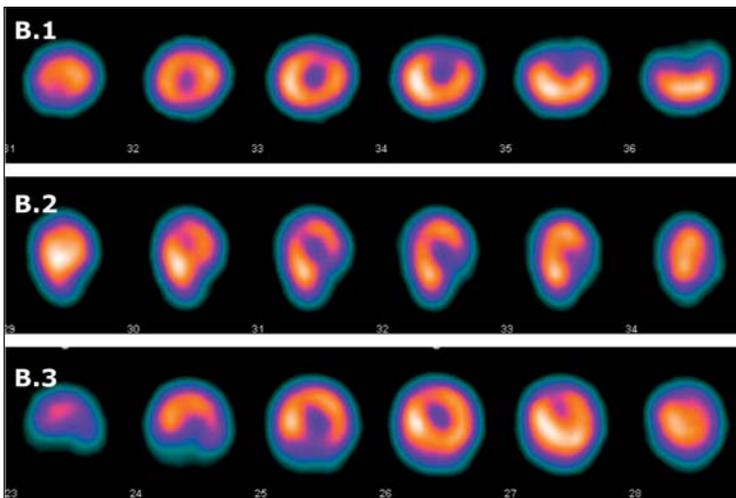


Fig. 25.B – Imagem SPET do coração isolado de um animal do grupo I (injectado com liposomas neutros peguados) na janela do $^{99\text{m}}\text{Tc}$:

- B.1 – cortes transversais
- B.2 – cortes sagitais
- B.3 – cortes longitudinais

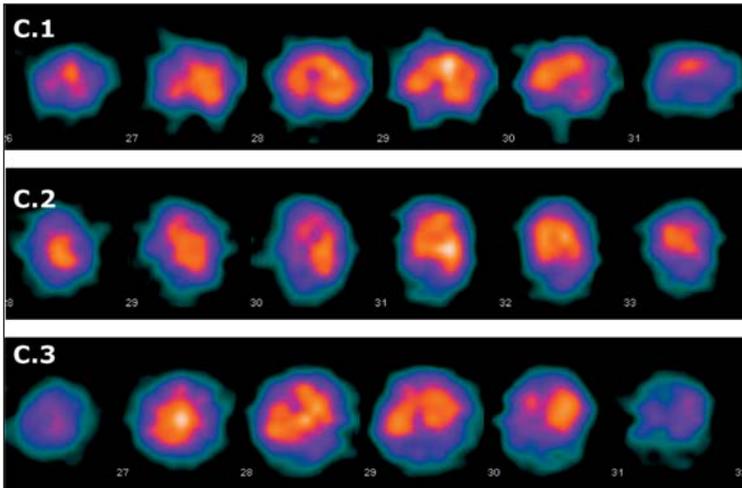


Fig. 25.C – Imagem SPET do coração isolado de um animal do grupo II (injectado com liposomas positivos não peguados) na janela do ^{201}Tl :
C.1 – cortes transversais
C.2 – cortes sagitais
C.3 – cortes longitudinais

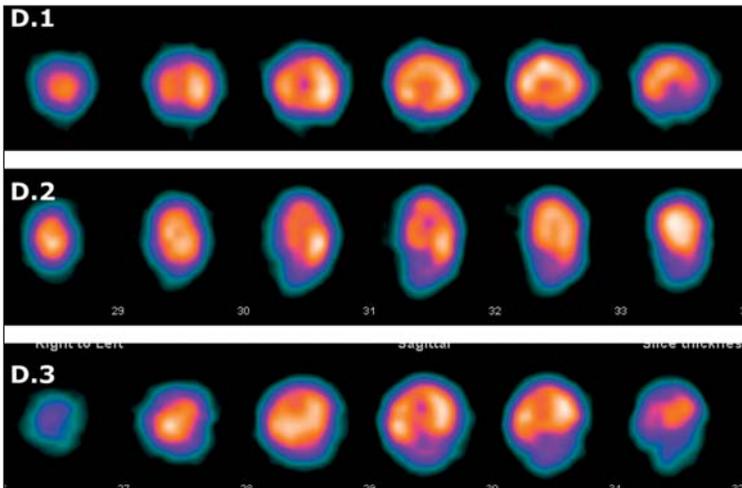


Fig. 25.D – Imagem SPET do coração isolado de um animal do grupo II (injectado com liposomas positivos não peguados) na janela do $^{99\text{m}}\text{Tc}$:
D.1 – cortes transversais
D.2 – cortes sagitais
D.3 – cortes longitudinais

D - Estudo de biodistribuição

Tal como descrito na metodologia, foi feito para cada coelho o cálculo da actividade específica e estudo de biodistribuição para os órgãos considerados. Para os 2 grupos de coelhos foi calculada a média e desvio padrão relativamente a cada órgão (Tabela V) e traduzida graficamente (Gráficos 4A e 4B).

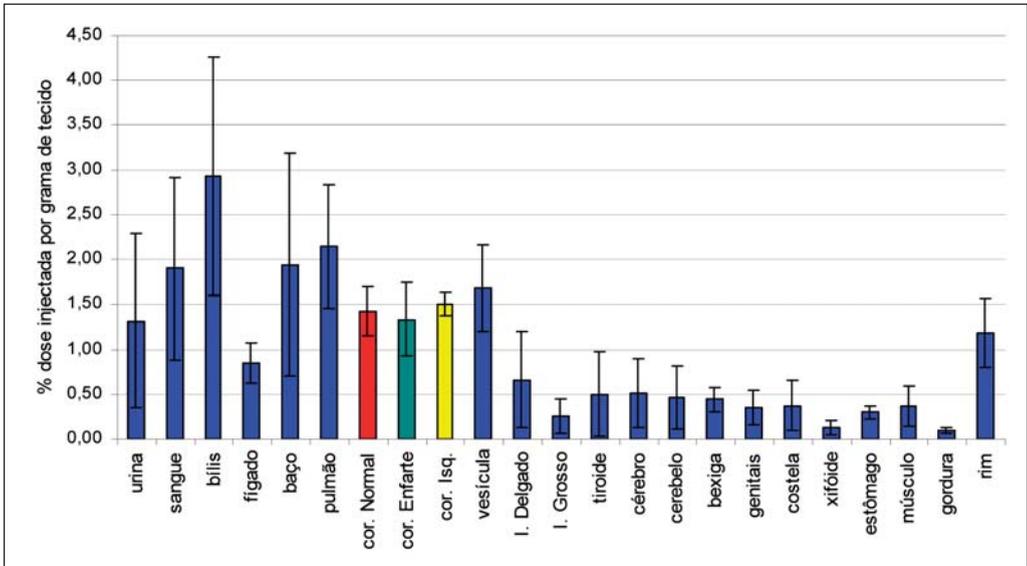


Gráfico 4A – Tradução gráfica dos resultados do estudo de biodistribuição: médias e desvios padrão para cada órgão no Grupo I

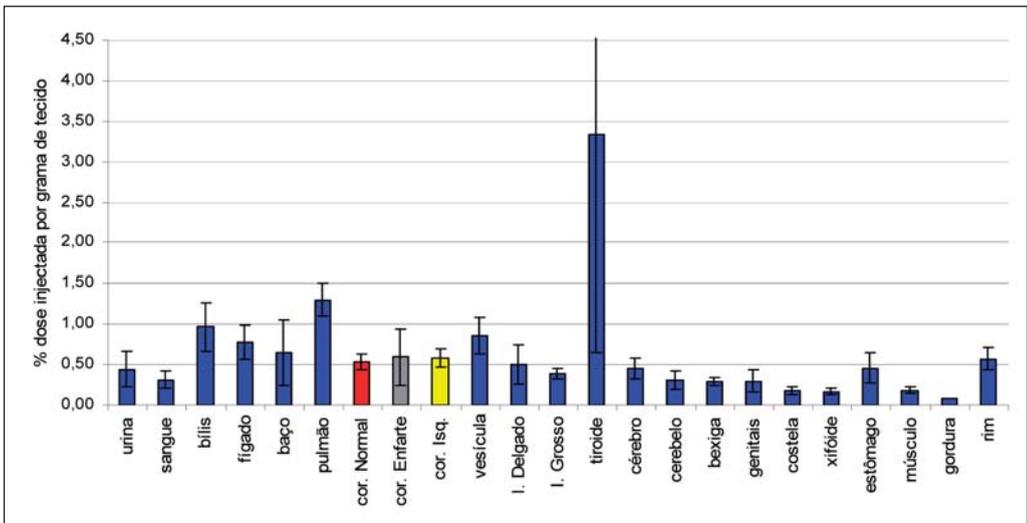


Gráfico 4B – Tradução gráfica dos resultados do estudo de biodistribuição: médias e desvios padrão para cada órgão no Grupo II

Tabela V – Valores do estudo de biodistribuição: médias e desvios padrão para cada órgão nos Grupos I e II

Órgão	Grupo I		Grupo II	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
Urina	1,32	0,97	0,44	0,22
Sangue	1,90	1,02	0,31	0,11
Bílis	2,93	1,33	0,97	0,30
Fígado	0,84	0,22	0,78	0,21
Baço	1,94	1,24	0,65	0,40
Pulmão	2,15	0,69	1,30	0,20
Coração normal	1,42	0,28	0,53	0,09
Coração enfarte	1,33	0,41	0,59	0,34
Coração isquemia	1,50	0,12	0,58	0,12
Vesicular	1,68	0,48	0,85	0,23
Int. delgado	0,66	0,54	0,50	0,25
Int. grosso	0,26	0,19	0,39	0,06
Tiróide	0,50	0,48	3,34	2,70
Cérebro	0,51	0,38	0,45	0,13
Cerebelo	0,46	0,36	0,31	0,11
Bexiga	0,44	0,14	0,29	0,05
Genitais	0,36	0,19	0,30	0,14
Costela	0,37	0,28	0,18	0,05
Xifóide	0,13	0,08	0,16	0,04
Estômago	0,30	0,07	0,46	0,19
Músculo	0,37	0,23	0,19	0,04
Gordura	0,10	0,04	0,08	0,00
Rim	1,19	0,39	0,57	0,14

CAPÍTULO IV

DISCUSSÃO

A - Aspectos Metodológicos

A.1 – Preparação dos liposomas e controlo de qualidade.

Os liposomas assumem neste trabalho um papel essencial que se presta a várias considerações: em primeiro lugar a escolha do(s) tipo(s) a utilizar obrigou a uma pesquisa exaustiva e minuciosa na literatura já publicada. Procurámos seleccionar as composições com melhores resultados demonstrados em modelos animais de isquemia miocárdica, tendo a nossa escolha recaído sobre liposomas unilamelares de carga positiva e neutra. O aumento do tempo de circulação dos liposomas através do uso de lípidos derivados do polietilenoglicol foi também por nós assumido como aspecto de grande relevo, pelo que optámos pela sua utilização num dos tipos de liposomas.

Para o uso de liposomas *in vivo* é fundamental a possibilidade de, uma vez administrados, acompanhar a sua distribuição. Um dos métodos mais usados consiste na marcação dos liposomas com agentes emissores gama de modo a possibilitar a sua detecção cintigráfica. Optámos neste trabalho pela marcação da fase aquosa do liposoma após manufactura (“after loading”) dadas as elevadas eficiência de marcação e estabilidade *in vivo*. O radioisótopo escolhido foi o Tecnécio 99 metastável (^{99m}Tc). O ^{99m}Tc tem um período de semi-desintegração de 6 horas o que permite injectar elevada actividade no doente com uma dosimetria favorável e a energia da sua emissão gama (140 KeV) é ideal para a espessura dos cristais de cintilação habitualmente usados nas câmaras gama. Associadamente, o ^{99m}Tc está facilmente disponível pois é produzido num gerador de Molibdénio (^{99}Mo) e tem uma química fácil e bem conhecida. Foi utilizado o quelante hexametilpropilenoamina oxima também designado por exametazima (HMPAO) liofilizado, que forma quelatos com o ^{99m}Tc de elevada lipofilicidade. O ^{99m}Tc -HMPAO é então adicionado a liposomas previamente produzidos contendo glutatião reduzido encapsulado, vai atravessar a bicamada lipídica e reagir com o glutatião reduzido presente na fase aquosa, formando um complexo hidrofílico, pelo que fica irreversivelmente encapsulado dada a incapacidade de atravessar a fase lipídica.

Quando se procede à marcação do quelante HMPAO com o ^{99m}Tc , a solução obtida contém, para além do complexo lipofílico primário (^{99m}Tc -HMPAO) alguns produtos contaminantes nomeadamente tecnécio livre, tecnécio reduzido-hidrolisado não ligado, e o chamado complexo secundário de ^{99m}Tc -HMPAO. Daí a importância de um estrito controlo da eficiência de marcação. Foram necessários três sistemas microcromatográficos combinados para a completa determinação da qualidade do composto, dada a possibilidade de haver três contaminantes.

A segunda cromatografia de exclusão molecular em Sephadex[®] foi realizada para assegurar que a solução de liposomas marcados a injectar não contivesse quaisquer vestígios de traçadores não englobados, do que resultaria uma biodistribuição errónea. Para confirmar a inexistência de traçadores não englobados, posteriormente à cromatografia de exclusão molecular foi realizada uma microcromatografia ascendente usando ITLC-SG como fase fixa e soro fisiológico como fase móvel.

A.2 – Modelo experimental animal

No que respeita à escolha do melhor modelo animal para o estudo do enfarte agudo do miocárdio, encontramos facilmente defensores de um determinado modelo em relação aos restantes. Neste trabalho, a técnica cirúrgica de laqueação da artéria coronária descendente anterior, utilizada para provocar isquemia aguda, está muito dificultada em animais de pequeno porte. Além disso, a utilização de metodologia cintigráfica torna difícil, por motivos de resolução espacial, a utilização de animais de pequenas dimensões. Foi também determinante na nossa escolha o uso de um modelo animal já usado em trabalhos semelhantes de modo a podermos fazer comparações mais fidedignas. Neste contexto a nossa opção foi para o uso do coelho. A docilidade deste animal, a presença de veias superficiais adequadas à administração farmacológica e sobretudo o seu fácil manuseamento no biotério, constituíram ainda vantagens adicionais da nossa escolha.

A.3 – Utilização do ^{201}Tl em simultâneo com os liposomas marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$

O ^{201}Tl foi injectado no mesmo tempo dos liposomas marcados. Trata-se de um catião monovalente com um comportamento biológico semelhante ao do potássio. A sua captação celular envolve um transporte activo através da bomba de Na^+/K^+ pelo que só tem lugar na presença de uma membrana celular íntegra. A elevada extracção deste radiofármaco na primeira passagem pelo tecido miocárdico, bem como a proporcionalidade directa que existe entre a sua captação celular e o fluxo sanguíneo local, permitem a utilização do ^{201}Tl para estudos de perfusão miocárdica com aquisição de imagens cintigráficas logo após a sua administração. Depois da captação inicial pelo tecido miocárdico com perfusão normal, verifica-se captação mais lenta pelas zonas miocárdicas hipoperfundidas mas ainda viáveis; as imagens que se obtêm cerca de 3 a 4 horas após a sua administração permitem identificar o miocárdio isquémico viável [71]. Este processo de redistribuição do ^{201}Tl está na base da sua utilização para estudos de viabilidade miocárdica [71,72].

No nosso trabalho, as imagens estáticas e SPET do coração isolado na janela do ^{201}Tl que foram obtidas passadas pelo menos 3,5 horas da sua administração, irão corresponder à redistribuição cardíaca do radiofármaco no miocárdio isquémico viável.

A.4 – Avaliação funcional com radionuclídeos

Na grande maioria dos estudos publicados com uso de liposomas *in vivo*, a sua distribuição é objectivada através do uso de técnicas de anatomia patológica como a microscopia de fluorescência [49,67], ou com recurso a estudos de biodistribuição com traçadores radioactivos [52-56,61,65,66]. Existem apenas alguns trabalhos em que são obtidas imagens cintigráficas, sobretudo nas áreas da oncologia e reumatologia [68-70]. No nosso trabalho, utilizámos tanto as imagens cintigráficas como os estudos de biodistribuição, com o máximo de informação quantitativa em ambas as vertentes. As aquisições dinâmicas permitiram a obtenção de curvas

% actividade administrada/tempo para vários órgãos na 1^a hora pós-reperfusão; as aquisições estáticas do coração isolado possibilitaram uma primeira análise qualitativa da distribuição do ²⁰¹Tl e dos liposomas marcados com o ^{99m}Tc bem como o cálculo dos coeficientes de captação; e as imagens de SPET tornaram possível uma melhor comparação visual entre a distribuição cardíaca do ²⁰¹Tl e dos liposomas marcados com o ^{99m}Tc.

A.5 – Avaliação da área em risco e de necrose miocárdica

A área em risco tem sido avaliada pela maior parte dos autores através da injeção de corantes vitais (azul monoastral ou azul de Evans) nos vasos coronários não ocluídos bem como na porção proximal do vaso ocluído. Com esta técnica são identificadas de uma forma macroscópica as zonas de miocárdio coradas de azul que correspondem a miocárdio são e as zonas que não estão coradas constituem a área em risco [54,65].

Para uma distinção, na área em risco, do tecido viável do tecido necrosado, é usada frequentemente a técnica de coloração com tetrazolina. Esta técnica baseia-se na injeção no território vascular isquémico de tetrazolina, a qual permite distinguir macroscopicamente o tecido viável que cora de vermelho do tecido necrosado que cora de castanho [54].

As técnicas descritas são de fácil execução e não onerosas, mas apresentam algumas desvantagens. No que respeita ao uso de azul de Evans não existem dúvidas de que é adequado para avaliar a área em risco em modelos experimentais de enfarte agudo do miocárdio com poucas horas ou até 2 dias de evolução. No entanto, tendo em consideração o desenvolvimento natural e por vezes extenso de vasos colaterais para o interior da área em risco, que se inicia a partir do segundo dia de enfarte, a utilização desta técnica a partir desta altura pode associar-se a erros importantes na avaliação da dimensão da área em risco. Relativamente à coloração com tetrazolina trata-se de uma técnica grosseira, pois não permite identificar as complexas interdigitações que se estabelecem entre as zonas necróticas e não necróticas, habitualmente visíveis apenas com a ajuda do microscópio [3].

No nosso trabalho foi possível a utilização das duas técnicas de coloração sem prejuízo dos resultados pelas respectivas limitações, dado que utilizámos um modelo experimental de enfarte agudo do miocárdio com apenas 90 minutos de evolução e ainda porque não pretendíamos medir de forma rigorosa a necrose miocárdica ou a área em risco.

B – Resultados obtidos

B.1 – Mortalidade

A mortalidade cirúrgica no nosso trabalho foi nula, enquadrando-se ao nível dos melhores resultados apresentados noutros estudos publicados que descrevem valores entre os 0% e os 15% [52-56]. Este facto ficou a dever-se a uma metodologia cuidada e rigorosa no que respeita a cuidados pré-operatórios e à execução da técnica cirúrgica com suporte anestésico.

A baixa taxa de mortalidade encontrada, aliada como veremos adiante à constância dos resultados obtidos para cada grupo estudado, traduz ainda, na nossa opinião, o sucesso num dos objectivos deste trabalho que foi a criação de um modelo animal de isquemia-reperusão funcionante e reprodutível.

B.2 – Produção e marcação dos liposomas

A produção de liposomas e a sua marcação constitui um processo longo e minucioso que obedece a uma metodologia rigorosa já extensivamente descrita.

No que respeita à eficiência de marcação do radiofármaco obtivemos valores uniformemente elevados de $81,3\% \pm 6,9$ (média \pm desvio padrão). Trata-se de um valor elevado que significa a existência de quantidades reduzidas de produtos contaminantes, condição essencial para o passo seguinte de marcação dos liposomas com o radiotraçador.

A marcação radioactiva dos liposomas foi efectuada através da adição do traçador à suspensão dos liposomas, ficando a incubar durante 15 minutos à temperatura ambiente. A solução final contém, conforme referido anteriormente, produtos contaminantes que correspondem predominantemente a traçador não englobado. Uma vez que essas substâncias possuem dimensões inferiores às dos liposomas, podem ser em grande parte eliminadas através de um processo de cromatografia de exclusão molecular.

O controlo da eficiência da marcação dos liposomas, realizado através de microcromatografia ascendente em ITLC-SG, revelou uma eficiência de marcação elevada para os liposomas neutros peguilados utilizados no grupo I, com média e desvio padrão de $89,25\% \pm 3,95$. São valores concordantes com os descritos na literatura que se situam entre os 85 e 98%. Relativamente à marcação dos liposomas positivos não peguilados utilizados no grupo II os resultados foram consideravelmente mais baixos, assumindo uma média e desvio padrão de $56,33\% \pm 12,01$. Uma vez que a eficiência de marcação do radiofármaco foi constante e elevada em todos os coelhos estudados, podemos assumir que a suspensão do traçador que foi adicionada aos liposomas utilizados, continha em todos eles um predomínio de complexo lipofílico primário ($^{99m}\text{Tc-HMPAO}$) apto a atravessar a bicamada lipídica dos liposomas para sua marcação. Sendo a eficiência de marcação dos liposomas positivos não peguilados utilizados no grupo II muito inferior à dos liposomas neutros peguilados utilizados no grupo I, esse facto ficará certamente a dever-se a diferenças entre os dois tipos de liposomas. Na nossa opinião, essa diferença corresponde provavelmente a uma menor estabilidade *in vitro* dos liposomas positivos não peguilados, podendo significar a perda do seu conteúdo radioactivo.

B.3 – Execução da técnica cirúrgica

Os procedimentos cirúrgicos anteriormente descritos na metodologia, nomeadamente a traqueostomia com inserção de tubo endotraqueal, toracotomia lateral esquerda, incisão anterior do pericárdio, suspensão cardíaca na bolsa pericárdica, identificação e laqueação da artéria

coronária descendente anterior no início do seu terço distal através de um nó efectuado com seda cirúrgica, e secção do nó após 90 minutos de isquemia para permitir a reperusão, foram de fácil execução no modelo animal escolhido, decorrendo sem quaisquer complicações. A técnica desenvolvida mostrou ser reprodutível e funcional para o objectivo a que nos propusemos.

B.4 – Dinâmica dos liposomas marcados, na primeira hora após administração

A aquisição dinâmica durante a primeira hora após administração dos liposomas marcados, com imagens em vista anterior na janela de energia do tecnécio-99m (140 ± 20 keV), permitiu, após o desenho de zonas de interesse no coração, no pulmão, no fígado e no rim, obter as respectivas curvas actividade/tempo. Estes valores foram corrigidos para o período de decaimento do ^{99m}Tc (6 horas) e expressos em percentagem de actividade injectada. Durante este período de tempo, a actividade presente no coração e no pulmão correspondeu na sua maioria ao compartimento sanguíneo de liposomas, enquanto a actividade detectada no fígado e no rim traduziu fundamentalmente o metabolismo e excreção do conteúdo liposómico.

A análise dos gráficos 2A e 2B leva-nos a concluir que, na primeira hora após administração, os liposomas neutros peguilados são menos captados a nível hepático e renal permanecendo por isso mais em circulação do que os liposomas positivos não peguilados. Estes resultados confirmam o aumento do tempo de circulação que se obtém com o uso de derivados do polietilenoglicol.

B.5 – Distribuição cardíaca dos liposomas marcados com ^{99m}Tc , distribuição cardíaca do ^{201}Tl administrado e comparação das duas distribuições através de imagens cintigráficas

Conforme a descrição metodológica, 3,5 horas após as injecções dos radiofármacos o coração isolado foi colocado na câmara de raios gama e realizaram-se aquisições estáticas nas incidências esquerda (IE) e direita (ID) para as janelas de energia do Tecnécio (140 ± 20 keV) e do Tálío (72 ± 20 Kev). Como já foi referido, as imagens obtidas na janela de energia do ^{99m}Tc correspondem à distribuição miocárdica dos liposomas marcados e as imagens na janela do ^{201}Tl traduzem a redistribuição cardíaca do radiofármaco no miocárdio isquémico viável.

À inspecção visual, em todos os animais dos 2 grupos estudados as imagens cintigráficas tardias do ^{201}Tl , correspondentes à sua redistribuição, pareciam corresponder à região miocárdica vascularizada pela porção distal da artéria descendente anterior que foi experimentalmente ocluída. Além disso, parecia também haver coincidência entre as imagens cintigráficas de redistribuição cardíaca do ^{201}Tl correspondentes ao território de miocárdio isquémico viável e as imagens de maior concentração dos liposomas marcados na janela do ^{99m}Tc . Para tentar objectivar esta primeira análise visual qualitativa, procedemos, conforme o esquema metodológico, ao desenho de áreas de interesse para cálculo dos coeficientes de captação. Os valores que apurámos para os referidos coeficientes foram, nos dois grupos estudados, todos superiores a 1,9, quer para o ^{201}Tl quer para o ^{99m}Tc . Estes resultados sugerem a existência de afinidade dos 2 tipos de liposomas utilizados para miocárdio isquémico viável.

No seguimento das aquisições estáticas, o coração isolado foi submetido a uma tomografia por emissão de fóton simples (SPET), igualmente para 2 janelas de energia: 140 ± 20 keV (Tecnécio-99m) e 72 ± 20 Kev (Tálio-201). Foi usada uma matriz de 64x64, zoom 2, órbita circular com minimização da distância, e com aquisição num arco de 360 graus, para 64 vistas. À semelhança do que se verificou com as imagens estáticas, a análise visual das imagens obtidas em todos os coelhos dos dois grupos estudados revelou coincidência entre as imagens cintigráficas de redistribuição cardíaca do ^{201}Tl , correspondentes ao território de miocárdio isquémico viável, e as imagens de maior concentração dos liposomas marcados na janela do $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Todos estes resultados apontam para a existência de afinidade quer dos liposomas neutros peguilados quer dos liposomas positivos não peguilados para miocárdio isquémico viável. No entanto, tratam-se apenas de análises qualitativas ou semiquantitativas. Só através do posterior estudo de biodistribuição pudemos obter resultados quantitativos.

B.6 – Estudo de biodistribuição

Para uma correcta apreciação dos resultados do estudo de biodistribuição, é importante saber quais os produtos radioactivos em circulação e conhecer as suas dinâmicas *in vitro* e *in vivo*. A figura 26 pretende esquematizar esse complexo processo.

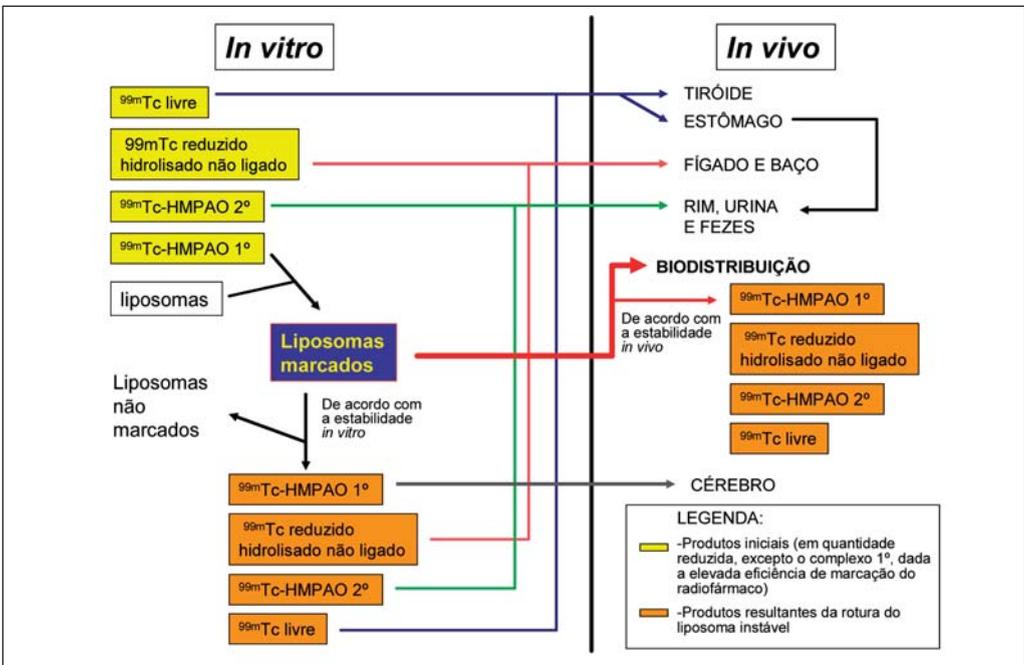


Fig. 26 – desenho esquemático da dinâmica de biodistrib. dos liposomas marcados

Quando analisamos os valores obtidos da percentagem de actividade injectada por grama de tecido, não devemos esquecer que para além dos liposomas marcados, existem outros traçadores em circulação cujas concentrações relativas irão variar fundamentalmente de acordo com a estabilidade *in vitro* e *in vivo* dos liposomas em uso.

No que respeita aos valores de biodistribuição dos liposomas neutros peguilados usados no grupo I, temos à partida uma elevada estabilidade *in vitro* comprovada pela alta eficiência de marcação dos liposomas. Por essa razão, e tendo em conta que a eficiência de marcação prévia do radiofármaco também foi elevada, as quantidades de ^{99m}Tc livre, tecnécio reduzido hidrolisado não ligado, complexo ^{99m}Tc -HMPAO hidrofílico secundário e complexo ^{99m}Tc -HMPAO lipofílico primário não encapsulados *in vitro*, serão muito reduzidas. Podemos assim dizer que, a suspensão de liposomas marcados administrada no grupo I apresenta um elevado grau de pureza radioquímica, o que significa que os resultados da biodistribuição traduzem com rigor, a real afinidade dos liposomas por cada órgão analisado.

Relativamente aos resultados obtidos com os liposomas positivos não peguilados usados no grupo II, embora à semelhança do grupo I a eficiência de marcação do radiofármaco tenha sido elevada, a eficiência de marcação dos liposomas foi bastante inferior. Quer isso dizer que, devido a uma menor estabilidade *in vitro* dos liposomas positivos não peguilados, a suspensão dos liposomas marcados administrados ao grupo II continha os traçadores não englobados ^{99m}Tc livre, tecnécio reduzido hidrolisado não ligado, complexo ^{99m}Tc -HMPAO hidrofílico secundário e complexo ^{99m}Tc -HMPAO lipofílico primário em quantidades não desprezáveis. Deste modo, os resultados da biodistribuição traduzem a afinidade dos liposomas por cada órgão analisado, mas esses valores estarão enviesados, fruto de uma estabilidade *in vitro* reduzida, pela presença significativa de traçadores não englobados.

Da análise dos resultados *in vivo* obtidos com os liposomas neutros peguilados no grupo I, podemos dizer que estes apresentam uma afinidade cardíaca elevada relativamente à generalidade dos outros órgãos, apenas comparável com os pulmões, o sangue, o fígado, o baço, a vesícula, a bília, o rins e a urina. A presença de actividade nestes órgãos tem significado diferente. Assim, a actividade no sangue e nos pulmões está em relação com um maior tempo circulatório dos liposomas, enquanto que nos outros órgãos a sua presença traduz as suas vias de metabolismo e excreção. No que respeita à distribuição cardíaca relativa, os resultados obtidos nas 3 regiões consideradas são semelhantes; no entanto, o miocárdio necrosado apresenta valores ligeiramente inferiores e o miocárdio viável valores ligeiramente superiores ao miocárdio normal.

Analisando os resultados obtidos com os liposomas positivos não peguilados no grupo II, temos valores uniformemente inferiores aos do grupo I com excepção da tiróide, provavelmente consequências da sua menor estabilidade *in vitro*. Porém, outro facto chama a atenção: a pequena actividade detectada nos pulmões, e principalmente, no sangue. Atribuímos esse resultado a um menor tempo de permanência no *pool* sanguíneo, ou seja, estes liposomas positivos são muito mais rapidamente captados pelos órgãos de distribuição. Quanto à distribuição cardíaca, é também elevada relativamente à generalidade dos outros órgãos, sendo igualmente apenas comparável com os órgãos de metabolismo e líquidos de excreção. No que respeita à distribuição cardíaca relativa, os resultados obtidos nas 3 regiões consideradas são também semelhantes; no entanto, o miocárdio necrosado apresenta agora valores ligeiramente superiores e o miocárdio normal valores ligeiramente inferiores ao miocárdio viável.

Quando comparámos os resultados qualitativos e semiquantitativos obtidos nas imagens cintigráficas estáticas e SPET do coração isolado, com os valores quantitativos de actividade encontrados nas 3 regiões miocárdicas consideradas no estudo de biodistribuição, fomos surpreendidos por um facto: a evidência das imagens obtidas, no sentido de haver uma captação claramente superior de liposomas pelo miocárdio isquémico relativamente ao miocárdio normal, não foi correspondida nos estudos de biodistribuição onde a actividade obtida nas regiões miocárdicas consideradas foi apenas discretamente inferior no miocárdio normal relativamente ao miocárdio isquémico. Fomos então rever cuidadosamente todos os passos metodológicos bem como os resultados obtidos em todos os coelhos estudados. Desta análise, encontramos como possível explicação para o facto, a utilização de técnicas macroscópicas grosseiras para a identificação das zonas miocárdicas de risco e de necrose. Embora estas se afigurassem inicialmente como adequadas para os objectivos propostos, o risco de erro não desprezável a que estão sujeitas poderá ter enviesado os resultados obtidos na sequência da sua utilização.

CAPÍTULO V CONCLUSÕES

Este trabalho reveste-se de alguma complexidade, pois envolve variadas áreas de conhecimento como a bioquímica, a medicina nuclear, a cardiologia e a cirurgia, requerendo um nível de exigência elevado em todas elas. Esta afirmação aplica-se quer no que respeita a materiais envolvidos como o laboratório de bioquímica e produtos para produção dos liposomas, o laboratório de investigação experimental para preparação e manutenção dos animais e o laboratório de medicina nuclear incluindo um gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$, uma câmara de raios gama e *software* adequado para o processamento de imagens, quer ainda no que respeita a técnicas e conhecimentos em causa, pois envolve experiência em produção e marcação de liposomas, conhecimentos em cardiologia assim como conhecimentos e experiência de cirurgia animal para a criação do modelo de isquemia-reperusão. Não podemos deixar de referir todo um trabalho de pesquisa por forma a reunir os resultados publicados até ao momento actual permitindo a delineação de objectivos actuais e pertinentes e a organização de uma metodologia precisa.

Relativamente aos resultados obtidos podemos concluir:

- Foram produzidos liposomas neutros peguilados e positivos não peguilados marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$. A eficiência de marcação do radiofármaco usado para a marcação foi elevada. No que respeita à eficiência de marcação dos liposomas, obtivemos bons resultados com os liposomas neutros peguilados mas os valores conseguidos com os liposomas positivos não peguilados foram bastante inferiores, consequência provável de uma menor estabilidade *in vitro*.
- Desenvolveu-se um modelo animal de isquemia-reperusão funcionante e reprodutível.
- Verificou-se uma captação importante a nível cardíaco, quer em termos absolutos quer em relação aos outros órgãos, em ambos os tipos de liposomas utilizados. No entanto, os valores obtidos com os liposomas positivos não peguilados foram inferiores aos dos liposomas neutros peguilados, provavelmente devido à sua maior instabilidade *in vitro* e ao seu menor tempo de circulação. No que respeita à captação cardíaca dos liposomas, comparando os três tipos de miocárdio, os valores quantitativos que obtivemos nas 3 regiões miocárdicas consideradas foram, nos dois tipos de liposomas utilizados, apenas discretamente inferiores no miocárdio normal relativamente ao miocárdio isquémico.
- A maior captação de liposomas neutros peguilados por parte do miocárdio isquémico ocorre nas áreas onde a redistribuição do ^{201}Tl está presente. Esta evidência não é tão acentuada para os liposomas positivos.
- Estes diferentes comportamentos, sugerem que a composição da parede liposómica terá de ser reformulada, no sentido de maximizar a afinidade para as áreas isquémicas e simultaneamente minimizar a captação pelo miocárdio normal e necrosado.

Perante os resultados obtidos, afigura-se-nos como continuação lógica deste trabalho, uma intervenção na composição da membrana liposomal no sentido de obter liposomas com uma afinidade mais selectiva para o miocárdio isquémico viável. Para além disso, as técnicas de identificação das zonas de risco e de necrose a utilizar futuramente deverão ser mais rigorosas de forma a minimizar o risco de erro.

CAPÍTULO VI BIBLIOGRAFIA

1. National Heart, Lung, and Blood Institute. "Morbidity and Mortality Chartbook on Cardiovascular, Lung, and Blood diseases". US Dept. of Health and Human Services; 1998.
2. American Heart Association. "1999 Heart and Stroke: statistical update".
3. Gonçalves L. Dissertação de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra intitulada "Influência do factor de crescimento básico dos fibroblastos na evolução do enfarte agudo do miocárdio num modelo animal consciente"; 1999.
4. Fozzard HA, Arnsdorf MF. "Cardiac electrophysiology". In: Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, Katz AM, Morgan HE, eds. *The Heart and cardiovascular system*, 2d ed. New York: Raven Press;1991:63.
5. Pelzer D, Pelzer S, McDonald TF. "Ca channels in heart". In: Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, Katz AM, Morgan HE, eds. *The Heart and cardiovascular system*, 2d ed. New York: Raven Press;1991:1049.
6. Olsson RA, Bungler R, Spaan JAE. "coronary circulation". Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, Katz AM, Morgan HE, eds. *The Heart and cardiovascular system*, 2d ed. New York: Raven Press;1991:1393.
7. Austin RE Jr, Smedira NG, Squers TM, Hoffman JI. "influence of cardiac contraction and coronary vasomotor tone on regional myocardial blood flow". *Am J Physiol* 1994;266:H2542.
8. Muller JM, Davis MJ, Chilian WM. "Integrated regulation of pressure and flow in the coronary microcirculation". *Cardiovasc. Res* 1996;32:668.
9. Dube GP, Bemis KG, Greenfield JC Jr. "Distinction between metabolic and myogenic mechanisms of coronary hyperaemic response to brief diastolic occlusion". *Circ Res* 1991;68:1313.
10. Ely SW, Matherne GP, Coleman SD, Berne RM. "Inhibition of adenosine metabolism increases myocardial interstitial adenosine concentration and coronary flow". *J Mol Cell Cardiol* 1992;24:1321
11. Stepp DW, Van Bibber R, Krool K, Feigl EO. "Quantitative relation between interstitial adenosine concentration and coronary blood flow". *Circ Res* 1996;79:601.
12. Ishibashi Y, Duncker DJ, Zhang J, Bache RJ. "ATP-sensitive K⁺ channels, adenosine, and NO-mediated mechanisms account for coronary vasodilatation during exercise". *Circ Res* 1998;82:346.
13. Moncada S, Vane JR. "Arachidonic acid metabolites and the interaction between platelets and blood vessel walls". *N Engl J Med* 1979;300:1142.
14. Taylor SG, Weston AH. "Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium". *Trends Pharmacol Sci* 1988;9:272.

15. Lin L, Balazy M, Pagano PJ, et al. "Expression of prostaglandin H₂-mediated mechanism of vascular contraction in hypertensive rats: relation to lipoxygenase and prostacyclin synthase activities". *Circ Res* 1994;74:197.
16. Griglewsky RJ, Botting RM, Vane JR. "Mediators produced by the endothelial cell". *Hypertension* 1988;12:530.
17. Rosenberg RD, Rosenberg JS. "Natural anticoagulant mechanisms". *J Clin Invest* 1984;74:1.
18. Esmon CT, Owen WG. "Identification of an endothelial cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C". *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:2249.
19. Svensjo E, Grega GJ. "Evidence for endothelial cell-mediated regulation of macromolecular permeability by post-capillary venules". *Fed Proc* 1986;45:89.
20. Beckman JS, Koppenol WH. "Nitric Oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly". *Am J Physiol* 1996;271:C1424.
21. Harrison DG, Galis Z, Parthasarathy S, et al. "Oxidative stress and hypertension". In: Izzo JL, Black HR, eds. *Hypertension Primer*. Baltimore: Lippincott, Williams and Wilkins; 1999:163.
22. Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, et al. "p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells". *J Biol Chem* 1996;271:23,317.
23. Schricke U, Schwaiger M. "Discordant viability techniques". *Heart and Metabolism* 2000;10:37-43.
24. Opie L. "Fuels: aerobic and anerobic metabolism" in: Opie L, ed. *The Heart physiology, from cell to circulation*. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1998;295.
25. Opie LH, Owen P, Riemersma RA. "Relative rates of oxidation of glucose and free fatty acids by ischemic and non-ischemic myocardium after coronary artery ligation in the dog". *Eur J Clin Invest* 1973; 3: 419-435.
26. Neely JR, Whitmer JT, Rovetto MJ. "Effect of coronary blood flow on glycolytic flux and intracellular pH in isolated rat hearts". *Circ Res* 1975; 37: 733-741.
27. Bax JJ, Klein LJ, Sloof GW et al. "Metabolic imaging in the evaluation of myocardial ischemia and viability". *Heart and Metabolism* 2000;10:11-22.
28. Maseri A. "Ischemic Heart Disease". New York: Churchill Livingstone;1995.
29. Phillips WT et al. "Delivery of gamma-imaging agents by liposomes". *Advanced Drug Delivery Reviews* 37 (1999), 13-32.
30. DA Tyrrel, TD Heath et al. "New aspects of Liposomes". *Biochimica et Biophysica Acta*, 457 (1976), 259-302.

31. de Gier J, Mandersloot JG, Van Deenen LLM. *Biochimica et Biophysica Acta*, 150 (1968), 666-675.
32. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. *J. Mol. Biol.*, 13 (1965), 238-252.
33. de Gier J, Mandersloot JG, Hupkes JV et al. *Biochimica et Biophysica Acta*, 233 (1971), 610-618.
34. Nichools P, Miller N. *Biochimica et Biophysica Acta*, 356 (1974), 184-198.
35. Bittman R, Blau L. *Biochemistry*, 11 (1972), 4831-4839.
36. Chapman D, Penkett SA. *Nature*, 211 (1966), 1304-1305.
37. Kaplan JH. *Biochimica et Biophysica Acta*, 290 (1972), 339-347.
38. Gould RM, London Y. *Biochimica et Biophysica Acta*, 290 (1972), 200-218.
39. Weissmann G, Brand A, Franklin EC. *J. Clin. Invest.*, 53 (1974), 536-543.
40. Johnson SM, Miller KW, Bangham AD. *Biochimica et Biophysica Acta*, 307 (1973), 42-57.
41. Sessa G, Weissmann G. *J. Biol. Chem.*, 245 (1970), 3295-3301.
42. Batzri S, Korn ED. *J. Cell Biol*, 66 (1975), 621-634.
43. Deamer DW, Hill MW, Bangham AD. *Biophys. J.*, 16 (1976), A.111.
44. Juliano RL, Stamp D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 63 (1975), 651-658.
45. Gregoriadis G, Leathwood PD, Ryman BE. *FEBS Lett.*, 14 (1971), 95-99.
46. Gregoriadis G. *FEBS Lett.*, 36 (1973), 292-296.
47. Colley CM, Ryman BE. *Biochem. Soc. Trans.*, 3 (1975), 157-159.
48. Papahadjopoulos D, Allen TM, Gabizon A et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88 (1991), 11460-11464.
49. Yuan F, Leunig M, Huang SK et al. *Cancer Research*, 54 (1994), 3352-3356.
50. Rahman YE, Rosenthal MW, Cerny EA. *Science*, 180 (1973), 300-302.
51. Rahman YE, Rosenthal MW, Cerny EA et al. *Lab. Clin. Med.*, 83 (1974), 640-647.
52. Palmer TN, Caride VJ, Fernandez LA et al. "Liposome accumulation in ischemic intestine following experimental mesenteric occlusion". *Biosci Rep.*, 1 (1981), 337-344.
53. Palmer TN, Caride VJ, Caldecourt MA et al. "The mechanism of Liposome accumulation in infarction". *Biochimica et Biophysica Acta*, 797 (1984), 363-368.
54. Mueller TM, Marcus ML, Mayer HE et al. "Liposome Concentration in Canine Ischemic Myocardium and Depolarized Myocardial Cells". *Circulation Research*, 49 (1981), 405-415.

55. Caride VJ, Zaret BL. "Liposome accumulation in regions of experimental myocardial infarction". *Science*, 198 (1977), 735-737.
56. Caride VJ, Twikler J, Zaret BL. "Liposome Kinetics in Infarcted Canine Myocardium". *J. of Cardio. Pharm.* 6 (1984), 996-1005.
57. Torchilin VP, Klibanov AL, Huang L et al. *FASEB J*, 6 (1992), 2716-9.
58. Torchilin VP, Narula J, Halpern E, Khaw BA. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1279 (1996) 75-83.
59. Torchilin VP. *J Mol Recognit.*, 9 (5-6) (1996), 335-46.
60. Torchilin VP. *Immunomethods*, 4(3) (1994), 244-58.
61. "Myocardial salvage and cardioprotective treatments in rat hearts with ischemia-reperfusion injury". Center for gamma-ray imaging, the University of Arizona, Oct 2000.
62. Klibanov AL, Marayama K, Torchilin VP, Huang L. *FEBS Lett* 268 (1990), 235-7.
63. Mori A, Klibanov AL, Torchilin VP, Huang L. *FEBS Lett* 284 (1991), 263-6.
64. Murohara T, Margiotta J, Phillips LM et al. "cardioprotection by liposome-conjugated sialyl Lewis^x-oligosaccharide in myocardial ischaemia and reperfusion injury". *Cardiovasc Res* 30 (1995) 965-74.
65. Smalling RW, Feld S, Ramanna N et al. "Infarct salvage with liposomal prostaglandin E₁ administered by intravenous bolus immediately before reperfusion in a canine infarction-reperfusion model". *Circulation* 1995;92:935-43.
66. Feld S, Li G, Wu A et al. "Reduction of canine infarct size by bolus intravenous administration of liposomal prostaglandin E₁: comparison with control, placebo liposomes, and continuous intravenous infusion of prostaglandin E₁". *Am Heart J* 1996;132:747-57.
67. Mclean JW, Fox EA, Baluk P et al. "Organ-specific endothelial cell uptake of cationic liposome-DNA complexes in mice". *The Am Physio Soc* 1997, 0363-6135/97; H387-403.
68. Richardson VJ, Ryman BE, Jewkes RF et al. "Tissue distribution and tumor localization of ^{99m}Tc labelled liposomes in cancer patients". *Brit Journ of Cancer* 1979;40:35-43.
69. Morgan JR, Williams LA. "Technetium-labelled liposome imaging for deep-seated infection". *The British Journal of Radiology* 1985;58:35-9.
70. Williams F, McCall IW, Park WM, et al. " Gallium-67 scanning in the painful total hip replacement". *Clin Radiol* 1981;32:431-9.
71. Pohost GM, Okada RD, O'Keefe DD et al. "Thallium redistribution in dogs with severe coronary artery stenosis of fixed caliber". *Circ Res* 1981;48:439-446.
72. Schricke U, Schwaiger M. "Discordant viability techniques". *Heart and Metab.* 2000;10:37-43.

Grande Prémio de Medicina 2004_Menção Honrosa

O **PRÉMIO BIAL** foi criado em 1984 com o objectivo de distinguir e divulgar trabalhos de investigação de grande repercussão na área da Saúde. Com periodicidade bienal, representa actualmente um dos galardões de maior significado em toda a Europa tendo já premiado alguns dos mais notáveis profissionais de saúde de diversos países.

Promovido pela **FUNDAÇÃO BIAL**, o **PRÉMIO BIAL** conta com os altos patrocínios do Senhor Presidente da República, do Conselho de Reitores das Universidades Portuguesas e da Ordem dos Médicos.

Na sua décima primeira edição o júri do **PRÉMIO BIAL** foi constituído pelo Prof. Doutor João Martins Correia, que presidiu, e pelos Professores Doutores Armando Porto, Francisco Carneiro Chaves, João Lobo Antunes, Maria da Graça Morais e Nuno Grande.

Entre as obras apresentadas a concurso, o júri atribuiu o **GRANDE PRÉMIO BIAL DE MEDICINA** ao trabalho “Intratamoral Injection of Dendritic Cells Engineered to Secrete Interleukin-12 by Recombinant Adenovirus in Patients with Metastatic Gastrointestinal Carcinomas”, da autoria dos Professores Doutores Ignacio Melero, Guillermo Mazzolini e Jesús Prieto.

A obra “Avaliação Nefrológica de uma População com Litíase Cálcica Idiopática Recorrente – Experiência de 7 anos da Consulta de Nefrolitíase do Serviço de Nefrologia do Hospital de Santa Maria”, da autoria da Dra. Adelaide Serra e do Dr. Fernando Domingos, recebeu o **PRÉMIO BIAL DE MEDICINA CLÍNICA**. Foram também distinguidas três obras com **Menções Honrosas**.

Na edição do ano de **2006** a **FUNDAÇÃO BIAL** disponibiliza para cada uma das modalidades os seguintes valores pecuniários: o **GRANDE PRÉMIO BIAL DE MEDICINA** beneficiará de 150 mil euros e ao **PRÉMIO BIAL DE MEDICINA CLÍNICA** serão atribuídos 50 mil euros. Cada uma das **Menções Honrosas** será contemplada com 5 mil euros.