

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
Faculdade de Medicina  
Curso de Pós-graduação em Medicina: Clínica Médica

**DISTRIBUIÇÃO MIOCÁRDICA DE  $^{99m}\text{Tc}$ -SESTAMIBI**

**Avaliação em modelos de angioplastia coronariana em humanos  
e de fracionamento celular em ratos**

*PAULO DE ARAUJO CARVALHO*

TESE DE DOUTORADO apresentada para obtenção do  
TÍTULO DE DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Jorge Pinto Ribeiro

Co-orientadores: Sabah S. Tume, M.D.  
David Piwnica-Worms, M.D. Ph.D.

Porto Alegre, 1994

*À Maria Alice, Carolina e Betina pelo apoio incondicional, paciência e coragem no convívio além mar e, principalmente, na volta aos pagos.*

*À Hypólito e Lia, pela orientação e suporte em todos os momentos decisivos de minha vida.*

*À Hermann e Eloisa, pela compreensão e apoio aos nossos planos e realizações.*

## AGRADECIMENTOS

**Ao Dr. Jorge Pinto Ribeiro**, orientador do presente trabalho, pelas sugestões, acompanhamento e estímulo durante a realização do mesmo.

**Ao Dr. Jorge Luiz Gross**, coordenador do Curso de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica, quando do meu ingresso no curso e viagem ao exterior, pelo estímulo e pelas contribuições à minha formação.

**Aos Drs. Sabah S. Tumeh, David Piwnica-Worms e Leonard B. Holman**, co-orientadores e colaborador do presente trabalho.

**À James F. Kronauge, PhD e Mary Chiu, MS**, companheiros de horas de trabalho laboratorial e responsáveis por significativa parte dos dados obtidos.

**À William C. DeSisto CNMT**, técnico em Medicina Nuclear do Brigham and Women's Hospital, pelo inestimável apoio à realização dos estudos tomográficos.

**Aos Drs. Vladimir I. Vekshtein, George Alajaji, James S. Nagel, James Kirshenbaum, Mieko Kawamura e Alun G. Jones**, co-autores do presente trabalho, pelas inúmeras contribuições e sugestões no decurso do mesmo.

# ÍNDICE

## LISTA DE FIGURAS

## LISTA DE TABELAS

1- INTRODUÇÃO .....	1
2- REVISÃO DA LITERATURA	
2.1- PRINCÍPIOS GERAIS DA CINÉTICA DE RADIODTRAÇADORES NO ES- TUDO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA .....	3
2.2- O USO DE <sup>99m</sup> Tc-SESTAMIBI NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIO- CÁRDICA .....	13
2.2.1- Histórico .....	13
2.2.2- Química do <sup>99m</sup> Tc e de <sup>99m</sup> Tc-sestamibi.....	14
2.2.3- Transporte miocárdico .....	16
2.2.4- Farmacologia clínica .....	24
2.2.5- Aspectos técnicos .....	25
2.2.6- Aplicações clínicas .....	28
3- OBJETIVOS .....	31
4- DISTRIBUIÇÃO SUBCELULAR E ANÁLISE DE <sup>99m</sup> Tc-SESTA- MIBI EM CORAÇÃO DE RATO ISOLADO E PERFUNDIDO	
4.1 - INTRODUÇÃO .....	33
4.2 - MATERIAL E MÉTODOS .....	35
4.2.1 - Soluções utilizadas .....	35
4.2.2 - Preparação de coração isolado e perfundido .....	36
4.2.3 - Fracionamento tecidual .....	37
4.2.4 - Ensaios, marcadores e inibidores .....	39

4.2.5 - Análise da administração “in vivo” de $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi...	41
4.2.6 - Análise estatística .....	43
4.3 - RESULTADOS .....	43
4.3.1 - Distribuição subcelular .....	43
4.3.2 - Análise da possível ligação proteica no citosol .....	49
4.4 - DISCUSSÃO .....	50
4.4.1 - Associação mitocondrial de $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi em coração de mamífero .....	50
4.4.2 - Modelos correlatos e implicações clínicas .....	53
4.5 - CONCLUSÃO .....	55
5- UTILIZAÇÃO DE $^{99m}\text{Tc}$ -SESTAMIBI NA AVALIAÇÃO DA PER- FUSÃO MIOCÁRDICA PÓS-ANGIOPLASTIA CORONARIANA	
5.1 - INTRODUÇÃO .....	57
5.2 - MATERIAL E MÉTODOS .....	58
5.2.1 - Pacientes .....	58
5.2.2 - Estímulo com marca-passo e injeção de $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi ..	59
5.2.3 - Aquisição e quantificação das imagens .....	60
5.2.4 - Reavaliação dos pacientes .....	62
5.2.5 - Análise estatística .....	62
5.3 - RESULTADOS .....	62
5.3.1 - Pacientes estudados .....	62
5.3.2 - Seguimento angiográfico e clínico .....	63
5.3.3 - Análise das imagens tomográficas .....	64
5.4 - DISCUSSÃO .....	69
5.5 - CONCLUSÃO .....	72

6- DISCUSSÃO GERAL .....	73
7- CONCLUSÕES GERAIS .....	78
8- RESUMO .....	79
9- SUMMARY .....	81
10- BIBLIOGRAFIA .....	83

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura geral do complexo Tc-99m (I) hexakis (2-metoxiisobutil isonitrila).....	15
Figura 2. Ilustração esquemática das membranas plasmática e mitocondrial da célula miocárdica.....	18
Figura 3. Diagrama esquemático do procedimento de centrifugação diferencial aplicado aos corações de rato perfundidos pela técnica de Langendorff e conteúdo <sup>99m</sup> Tc-MIBI.....	38
Figura 4. Distribuição nominal de <sup>99m</sup> Tc-MIBI nas frações obtidas a partir de corações de ratos perfundidos.....	45
Figura 5. Correlação entre o conteúdo de malato desidrogenase (MDH) e <sup>99m</sup> Tc-MIBI nas frações "citosólicas" obtidas a partir de corações de rato perfundidos.....	46
Figura 6. Efeitos do succinato (10 mM) mais rotenona (1 µM) ou CCCP (5 µM) sobre o conteúdo de <sup>99m</sup> Tc-MIBI nos sedimentos de "fragmentos celulares e "mitocondrial".....	48
Figura 7. Distribuição fracionada corrigida de <sup>99m</sup> Tc-MIBI expressa como o percentual da atividade total obtida a partir de corações de rato perfundidos.....	52
Figura 8. Cortes tomográficos do eixo vertical longo médio do ventrículo esquerdo e cortes do eixo curto do ventrículo esquerdo, do ápice para a base, da perfusão miocárdica com <sup>99m</sup> Tc-MIBI (A) e curvas segmentares do perfil longitudinal da captação relativa deste traçador (B) em paciente assintomático até 7 meses após ACTP.....	66
Figura 9. Cortes tomográficos do eixo vertical longo médio do ventrículo esquerdo e cortes do eixo curto do ventrículo esquerdo, do ápice para a base, da perfusão miocárdica com <sup>99m</sup> Tc-MIBI (A) e curvas segmentares do perfil longitudinal da captação relativa deste traçador (B) em paciente com recorrência de dor torácica e isquemia demonstrada através de ergometria e SPECT miocárdio 7 meses após ACTP.....	67

Figura 10. Captação relativa de $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI para cada segmento estudado, antes e após a angioplastia.....	68
---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito da nigericina, amilorida e ouabaína sobre o sódio e potássio intracelulares e sobre a captação líquida de $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI em cultura de células miocárdicas de embrião de galinha .....	20
Tabela 2. Ultracentrifugação de coração de rato marcado "in vivo" com $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI: fração citosólica comparada ao complexo livre de $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI. ....	49
Tabela 3. Indução de isquemia miocárdica com marca-passo temporário (MPT). ....	59
Tabela 4. Dados demográficos, radiológicos e clínicos dos pacientes estudados. ....	63
Tabela 5. Captação segmentar de $^{99m}\text{Tc}$ MIBI normalizada à captação máxima no VE(média + SE). ....	65



## 1--- INTRODUÇÃO

---

A **C**ardiologia **N**uclear ocupa posição de destaque dentre os diversos métodos utilizados para o diagnóstico, o seguimento e a avaliação da eficácia terapêutica da cardiopatia isquêmica. Tal fato relaciona-se à singularidade das informações fornecidas pelos radiofármacos utilizados para o estudo da perfusão miocárdica, ou seja, o significado funcional de lesão coronariana, a extensão de miocárdio sob risco e sua viabilidade <sup>1</sup>.

Tálio-201 (<sup>201</sup>Tl) foi, por muitos anos, o radiotraçador de escolha para a avaliação da perfusão miocárdica, fornecendo a base para a validação das imagens planares, tomográficas através do SPECT - "Single Photon Emission Computed Tomography" e polares representadas por mapas bi-dimensionais da distribuição relativa do radiotraçador pelo miocárdio, todas utilizadas na avaliação da cardiopatia isquêmica <sup>2</sup>. Entretanto, como suas características físicas deixam a desejar (meia-vida física de 73 horas e fótons com energia de 69 a 83 KeV\*), permaneceu o interesse em desenvolver radiofármaco com propriedades mais favoráveis.

Recentemente, foram desenvolvidos complexos monocatiônicos do Tecnécio-99m (<sup>99m</sup>Tc) com grupos isonitrilas capazes de substituir o <sup>201</sup>Tl com vantagem devido às características físicas quase ideais do <sup>99m</sup>Tc <sup>3</sup>. Dentre as isonitrilas estudadas, a hexakis-2-metoxi-2-isobutil isonitrila apresenta as características de biodistribuição mais adequadas <sup>4</sup>, recebendo o nome genérico de sestamibi.

\* KeV- quilo elétron-volts = energia adquirida por um elétron acelerado através de diferença de potencial de 1 volt e igual a  $1,6022 \times 10^{-16}$  joules.

Embora muitos estudos <sup>4,5,6,7</sup> tenham demonstrado estreita correlação entre a capacidade diagnóstica do <sup>99m</sup>Tc-sestamibi e do <sup>201</sup>Tl, torna-se necessário o estudo da cinética intracelular e das aplicações clínicas peculiares ao <sup>99m</sup>Tc-sestamibi. O presente estudo objetiva a abordagem destes aspectos através da análise da distribuição subcelular do <sup>99m</sup>Tc-sestamibi (<sup>99m</sup>Tc-MIBI) em coração de rato isolado e perfundido e da sua utilização na avaliação da reperfusão miocárdica pós-angioplastia coronariana em humanos.

## 2--- REVISÃO DA LITERATURA

---

## 2.1---PRINCÍPIOS GERAIS DA CINÉTICA DE RADIODIAGNÓSTICOS NO ESTUDO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

Em Medicina Nuclear, a aplicação dos princípios da cinética de traçadores marcados por elementos radioativos baseia-se em modelos compartimentais, sendo um compartimento definido como o volume ou espaço dentro do qual o traçador distribui-se rápida e uniformemente. O número, interrelacionamento, organização e definição de compartimentos em determinado modelo compartimental é desenvolvido a partir do conhecimento de princípios fisiológicos e bioquímicos <sup>8,9</sup>.

A compartimentalização miocárdica pode ser caracterizada através de um agregado de unidades capilar-miócito dispostas em paralelo, onde cada unidade apresenta convexão-difusão do traçador, o qual é axialmente distribuído em 3 regiões (capilar, líquido intersticial e miócito) e atravessa duas barreiras (o endotélio capilar e o sarcolema)<sup>10</sup>. Para a presente revisão, deve-se acrescentar o compartimento subcelular do miócito cardíaco, o espaço intramitocondrial, e sua barreira, a membrana mitocondrial interna, aumentando a rota de distribuição axial do traçador.

Os processos através dos quais os substratos ou os traçadores atingem o sítio-alvo incluem a convexão, a permeação entre ou através das células endoteliais, a difusão através do interstício, o transporte através do sarcolema (ativo, passivo ou mediado por carreador), a reação química (metabolização) e a sua

retenção (resíduo). Os radiotraçadores utilizados para avaliação da perfusão miocárdica obedecem a esta seqüência com extração proporcional ao fluxo sanguíneo regional e retenção estável por tempo suficiente para que sejam adquiridas as imagens diagnósticas (tempo de residência). Não devem, porém, sofrer ação metabólica intracelular (reação química) que altere a relação de dominância do efeito do fluxo sanguíneo, ou seja, convexão, tempo de residência intracelular e saída do compartimento intracelular ("washout")<sup>10</sup>. A redução da convexão e do "washout" de metabólitos intracelulares é inerente ao evento isquêmico do miocárdio.

O miocárdio é ricamente suprido por rede capilar que funciona como região de troca entre a corrente sanguínea e o interstício após a convexão ou entrega dos radiotraçadores ao órgão-alvo. Os capilares miocárdicos possuem diâmetro médio de 5  $\mu$  estando separados, uns dos outros, por distância de 17 a 20  $\mu$ , sendo seu volume correspondente a 3,3% ou 0,035 ml/g do miocárdio. Há aproximadamente um capilar por miócito cardíaco. Fatores vasculares importantes a serem considerados durante a fase de convexão do radiotraçador incluem sua via de transporte (hemácia ou plasma - em vasos < 300  $\mu$  de diâmetro a velocidade das hemácias é 1,5 vezes a do plasma) e a dispersão do radiotraçador (força e velocidade da injeção endovenosa, diferença de fluxo laminar intravascular, flutuação do fluxo conforme o ciclo cardíaco e variação regional de fluxo em corações normais)<sup>11</sup>.

Além destas características anatômicas da microcirculação e da convexão dos radiotraçadores, para estudar-se a extração e retenção destes compostos é necessário conhecer suas propriedades fisio-químicas como sua dimensão

e forma molecular, seu grau de ionização e solubilidade lipídica<sup>12,13</sup>. O transporte de substratos, íons ou hormônios através da parede capilar do miocárdio pode ocorrer pelos seguintes processos: passagem de moléculas menores que a albumina por fendas aquosas de 10 nm de largura entre as células endoteliais com progressiva obstaculização conforme a configuração molecular; para substâncias lipossolúveis, dissolução e difusão através das faces luminal e abluminal da membrana celular das células endoteliais; transporte ativo ou facilitado mediados por carreadores e sujeito à saturação em altas concentrações de substrato, inibição por bloqueadores ou competidores e contra-transporte; difusão passiva lateral na intimidade da membrana das células endoteliais<sup>11</sup>.

Ao estabelecer-se um modelo com unidades capilar-miócito dispostas em paralelo, deve-se considerar a difusão radial (do capilar para o interstício) e axial (transmembrana) em cada unidade. A difusão radial do capilar para o miócito é extremamente rápida e pode ser desconsiderada uma vez que a distância a ser percorrida pelo traçador é  $< 10 \mu$  com tempo de difusão de aproximadamente 10 ms. Já, gradientes axiais a partir do líquido intersticial podem ser vantajados chegando o tempo de difusão axial a 1000 segundos, devendo, portanto, serem determinados na formulação de modelos compartimentais<sup>11</sup>.

Quanto ao transporte através do sarcolema, as únicas opções incluem o transporte passivo por dissolução através da membrana ou via mecanismos de transporte especializados. Para íons, a condutividade através de canais depende do gradiente de voltagem transmembrana e da periodicidade das alterações de voltagem. O transporte de íons xenobióticos como o rubídio e o tálio é feito através dos canais de sódio e potássio. A concentração intracelular de sódio é man-

tida através da bomba de sódio (sódio potássio ATPase)<sup>11,13</sup>.

A retenção intracelular do radiotraçador é fundamental para sua detecção e conseqüente estimativa do processo fisiológico a ser estudado. A transitoriedade da retenção do traçador está diretamente relacionada às suas características fisio-químicas, podendo sofrer alteração conformacional (reação química) ou permanecer inalterado com maior ou menor tempo de residência intracelular (gradiente eletronegativo de membranas ou dependente de carreadores)<sup>11-14</sup>. Se as reações intracelulares de transformação ou sequestro ocorrem com a mesma velocidade que o transporte através da membrana celular haverá igual oportunidade de reação intracelular ou de saída da célula<sup>11</sup>.

Com o progresso alcançado através do domínio da tecnologia para obtenção de imagens tomográficas, a técnica de “convexão/detecção do resíduo” para estimativa da perfusão através de traçadores pode ser estendida a diminutas áreas em diferentes compartimentos, que podem ser “abertos” ou “fechados” em relação à depuração do traçador. Mais comumente, os compartimentos são abertos, como é o caso dos radiotraçadores com distribuição e intercâmbio entre sangue e tecido. Deve-se salientar que as técnicas de detecção do resíduo ou do efluxo fornecem a mesma informação de forma diversa, ou seja, o conteúdo residual do traçador é a quantidade que entra no órgão-alvo menos aquela que sai através do efluxo. A vantagem potencial das imagens tomográficas de alta resolução é a de permitir a análise do resíduo em função do tempo para pequenas regiões do miocárdio<sup>11</sup>.

O embasamento teórico para a determinação da perfusão miocárdica é simples e foi estabelecido por Sapirstein<sup>9</sup> em 1956, ou seja, se determi-



nado traçador é injetado por via endovenosa, sua difusão inicial para os tecidos será proporcional à distribuição do débito cardíaco para aqueles tecidos. O protótipo de tal traçador é o potássio ( $K^+$ ) que por algum tempo após sua aplicação endovenosa, distribui-se proporcionalmente ao fluxo sanguíneo regional do miocárdio. Entretanto, à medida que o tempo passa, ocorre redistribuição deste  $K^+$  intracelular injetado, atingindo-se o equilíbrio com o potássio nativo.

Várias etapas sucedem-se até que determinado traçador atinja o compartimento alvo e aí seja temporariamente retido. São necessários, o aporte ao capilar através do fluxo sanguíneo, a sua extração para o tecido através da parede do capilar e a sua incorporação a determinado processo bioquímico. O aporte é feito através do fluxo sanguíneo (ml/min) ou perfusão (ml/min/g), enquanto sua extração pode ser “líquida” (diferença entre a entrada e a saída do traçador em estado de equilíbrio - *steady state*) ou “unidirecional” (refere-se à extração da corrente sanguínea para o tecido, excluindo a quantidade de traçador transferida do tecido para o sangue). A extração unidirecional pode ser medida pela observação da “taxa de captação” do traçador pelo tecido ou órgão, imediatamente após sua administração endovenosa. A extração dos radiotraçadores ocorre através da parede dos capilares e sua fração de extração depende da área de superfície da rede capilar, da permeabilidade capilar de determinado traçador e de seu aporte dado pelo fluxo sanguíneo. O “coeficiente de extração” de determinado radiotraçador é dado pela relação entre o produto da superfície (S) x permeabilidade capilar (P) e o fluxo sanguíneo através do capilar (F). A extração tissular de determinado traçador aumenta quando ocorre um aumento do produto SP (ml/min) ou quando há retardo de F através do capilar. Em determinada área tissular como o miocárdio,

para determinado valor do produto SP, quanto mais rápido o fluxo sanguíneo F, menor a chance de extração do radiotraçador <sup>8</sup>.

O termo “captação” é muitas vezes utilizado de forma imprecisa podendo significar o conteúdo de traçador (captação líquida ou *net uptake*) ou o ritmo de transporte do mesmo (taxa de captação ou *uptake rate*) em determinado compartimento ou tecido. Para fins da presente revisão, o termo captação será qualificado como “taxa de captação”, definida como a variação do conteúdo de radiotraçador na unidade de tempo (mg/min) e, como “captação” quando houver referência ao acúmulo do radiotraçador em determinado tecido ou órgão(mg/ml)<sup>15</sup>.

Após atingir a concentração de “equilíbrio” (aqui significando que a concentração do radiotraçador nos compartimentos atingiu valor constante em função do tempo), a concentração sanguínea será diferente da tissular, sendo que a razão das concentrações tecido/sangue, em equilíbrio, é caracterizada pelo “coeficiente de partição” ( $\lambda$ ). Para modelos compartimentais que avaliam fluxo sanguíneo e perfusão, este coeficiente pode ser expresso como o “volume de distribuição” do radiotraçador por unidade de massa do tecido em questão. O volume de distribuição para determinado radiotraçador é dado pela relação entre a atividade injetada (em mCi\* ou MBq\*\*) e a concentração do radiotraçador em determinado compartimento (em mCi/ml ou MBq/ml) <sup>8</sup>.

A maioria dos modelos compartimentais utilizados em Medicina Nuclear estão baseados na pressuposição de que a cinética dos traçadores é linear (farmacocinética de 1ª ordem), ou seja, ao dobrar-se a concentração dobra a eliminação do sistema. Esta passagem de substâncias através dos compartimentos

\* mCi - 1/1000 do Ci (Curie), unidade básica de radioatividade definida como  $3,7 \times 10^{12}$  desintegrações por segundo.

\*\* MBq - unidade SI de radioatividade equivalente a  $10^6$  desintegrações por segundo (1 mCi = 37 MBq).

é referida como “fluxo”/unidade de volume ou massa de tecido (moles/min/ml ou mg/min/g), sendo que a relação entre a concentração e o fluxo do radiotraçador entre os dois compartimentos é descrita pela constante de transferência “k”, cuja unidade é tempo<sup>-1</sup>. Em farmacocinética de 1ª ordem, a constante k representa a taxa de transporte de uma substância a partir de um compartimento por unidade de tempo (função exponencial análoga à constante de decaimento do radioisótopo), sendo que 1/k corresponde ao “tempo de trânsito médio” da substância neste compartimento (análogo à meia-vida do radioisótopo) <sup>8</sup>.

Grande parte das informações básicas para o desenvolvimento dos estudos por imagem com radiotraçadores foi obtida através da técnica de diluição de múltiplos indicadores injetados simultaneamente em animais com coração íntegro. Sua utilidade encontra-se na facilidade de comparação entre radiotraçadores com diferentes taxas de penetração na parede capilar ou no sarcolema, pressupondo-se que o transporte do traçador seja mais complexo que o do controle (albumina - pressuposto de que esta não deixe o espaço vascular). Os traçadores da perfusão miocárdica utilizados em Medicina Nuclear são substâncias “difusão-limitadas”, ou seja, à medida que aumenta o fluxo sanguíneo regional atinge-se o limiar da capacidade de difusão. A permeabilidade destes traçadores pode ser estimada a partir das curvas de diluição normalizadas, desde que sejam conhecidos os seguintes valores: a velocidade do fluxo plasmático ( $F_p$ ); o tempo de coleta da amostra ( $t$ ); a radioatividade de cada amostra ( $C_p$ ); e a dose injetada de cada radiotraçador ( $q_p$ ). Conhecidos estes parâmetros, a análise da curva de diluição fornece os seguintes dados <sup>12</sup>:

- fração do traçador que emerge do coração por segundo  $h(t)$ , que é dada

por:

$$h(t) = F_s \times C_t / q_0$$

- fração de extração instantânea  $E(t)$ , ou seja a diferença entre as curvas de transporte da albumina e do traçador, que é dada por:

$$E(t) = 1 - h_D(t) / h_R(t)$$

onde: D = fração difundível do traçador

R = fração do controle

- fração de extração média  $E_{MAX}$ , ou seja, o valor máximo no pico da curva  $E(t)$ .

- o produto “permeabilidade x área de superfície” capilar, é calculado a partir de  $E_{MAX}$ , quando o traçador está disperso no afluxo arterial e sua saída do compartimento extravascular para o intravascular é negligenciável:

$$PS_{CAP} = -F_s \times \log_e(1 - E_{MAX})$$

- extração miocárdica líquida do traçador  $E_{NET}$  que é dada pela integral da extração do traçador no período de tempo em que 99,99% da albumina (controle) deixa o sistema pelo efluente venoso. Este tempo varia de 1,5 a 6 minutos, dependendo da velocidade de fluxo sanguíneo.

- quando todo o traçador controle deixa o sistema, o valor final de  $E_{NET}$  do traçador em estudo é igual à função residual  $R(t)$ .

Além da técnica de múltiplos indicadores avaliados em coração íntegro, outros métodos que permitem a avaliação do transporte tissular e celular de traçadores inclui eritrócitos isolados, células miocárdicas fetais, neonatais ou adultas, fatias isoladas de miocárdio e coração isolado e perfundido (preparação de Langendorff <sup>13</sup> - coração é perfundido retrogradamente através da aorta, sob pressão ou fluxo constantes, permitindo controlar independentemente diversos pa-

râmetros fisiológicos como fluxo, trabalho, disponibilidade de substrato, aporte de drogas e recirculação) e em cultura de células miocárdicas<sup>15</sup> que são utilizadas na tentativa de caracterizar o transporte iônico intercompartimental, a atividade elétrica, a contratilidade, o metabolismo e a morfologia durante estado de equilíbrio fisiológico e após lesões reversíveis/irreversíveis, sem a complexidade de múltiplos compartimentos dispostos axialmente ou trauma da dissecação. Ambas possuem vantagens e desvantagens, mas a soma dos dados fornecidos tem sido útil, demonstrando acurácia e valor preditivo para o entendimento da cinética dos diversos traçadores (propriedades relacionadas ou independentes do fluxo sanguíneo).

Através dos estudos da cinética intercompartimental dos radio-traçadores em cultura de miócitos cardíacos de embrião de galinha<sup>14</sup>, o afluxo unidirecional (J) entre os compartimentos extra (e) e intracelular (i) pode ser estimado pela taxa de captação inicial, sendo descrito como:

$$J_{e-i} = k_{e-i} \times C_e$$

$$J_{i-e} = k_{i-e} \times C_i$$

onde: k = constante de transporte

C = concentração do radiotraçador

Em estado de equilíbrio:

$$J_{e-i} = J_{i-e} = J$$

O acúmulo líquido em compartimento intracelular em função do tempo é expresso como radioatividade intracelular:

$$dC_i / dt = J \times e^{-k_{i-e}t}$$

- se t tende a zero, a medida inicial da taxa

de captação fornece estimativa do afluxo do traçador, sendo que, na prática, se esta medida for obtida em intervalo  $< 1/6$  da meia-vida da troca intercompartimental o erro é  $< 10\%$  (concentração extracelular deve ser mantida alta em preparações de células em cultura ou em órgão inteiro submetido a taxas de fluxo constantes não fisiológicas e muito altas). Como o tamanho dos compartimentos, a taxa de transporte e a concentração do traçador podem variar, é importante o entendimento de sua cinética completa dos traçadores não dependentes do fluxo sanguíneo como os utilizados clinicamente no estudo da perfusão miocárdica.

Como estes radiotraçadores são cátions, sua distribuição intracelular pode ser dependente dos potenciais de membrana, sendo que a razão entre o conteúdo extracelular e intramitocondrial (a favor de gradiente eletronegativo) pode ser dada por uma variante da equação de Nernst <sup>14</sup>:

$$C_{\text{mito}} / C_e = e^{- (E_m + \Delta \Psi) F / RT}$$

onde:  $F/RT = 26 \text{ mV a } 37^\circ\text{C}$

$C_{\text{mito}}$  = concentração mitocondrial

$C_e$  = concentração extracelular

$E_m$  = potencial do sarcolema

$\Delta \Psi$  = potencial da membrana mitocondrial interna

## 2.2--- O USO DE $^{99m}\text{Tc}$ -SESTAMIBI NA AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA

### 2.2.1 - Histórico

A partir dos trabalhos de Davison <sup>16</sup>, Abrams <sup>17</sup> e Jones <sup>18</sup>, foi possível sintetizar complexos estáveis de alquil isonitrila com  $^{99m}\text{Tc}$  (I) metaestável em concentração de traçador ( $10^{-8}$  a  $10^{-9}$  M), avaliar a biodistribuição destes complexos em animais e estabelecer as correlações de estrutura molecular e função, prognosticando seu uso potencial em estudos da perfusão do miocárdio e marcação de células, plaquetas e lipossomos. Os grupos alquil utilizados foram metil, propil, butil terciário e metoxiisobutil, sendo que este último ( $^{99m}\text{Tc}$  metoxiisobutil isonitrila,  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI,  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi) caracteriza-se pelas propriedades mais adequadas para obtenção de imagens da perfusão miocárdica, ou seja, retenção hepática transitória com excreção biliar rápida e mínima retenção pulmonar<sup>4,19</sup>.

A análise química do  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI demonstra tratar-se de complexo catiônico monovalente com núcleo central de  $^{99m}\text{Tc}$  em estado de oxidação (I) circundado de forma octaédrica por 6 ligantes coordenados por átomos de carbono isonitrila (Figura 1).

Em estudo multicêntrico de fases I e II <sup>4</sup>, foram determinadas a segurança do  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI para uso em humanos e iniciadas as comparações com o  $^{201}\text{Tl}$ úlio, único agente perfusional de fóton único até então utilizado. Em 1990 o

$^{99m}\text{Tc}$ -MIBI foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos da América, passando a ser comercializado pela Du Pont Company com nome comercial de Cardiolite<sup>®</sup>. Desde então multiplicam-se os estudos que comparam este agente ao  $^{201}\text{Tálio}$  e que procuram determinar sua biodistribuição, características diagnósticas e prognósticas <sup>20,21</sup>.

### 2.2.2 - Química do $^{99m}\text{Tecnécio}$ e de $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi

Quase 80% dos traçadores utilizados em Medicina Nuclear são ligados ao  $^{99m}\text{Tc}$  devido à características físicas extremamente favoráveis que incluem: a meia-vida física de 6,02 horas; a desprezível emissão de elétrons propiciando o uso de doses em nível de mCi sem irradiação significativa do paciente; fótons monocromáticos de 140 KeV que permitem maior resolução espacial; e a sua disponibilidade através da produção a partir de gerador de  $^{99}\text{Mo}$  (Molibdênio-99) em solução estéril e apirogênica <sup>3</sup>.

Tecnécio, do grego “artificial”, é um dos membros do 7º subgrupo de elementos da tabela periódica descoberto em 1937, sendo um metal de cor cinza, com número atômico 43, ponto de derretimento aos 2160 °C e cristalização com padrão muito próximo à disposição hexagonal. Provém do  $^{99}\text{Mo}$ , o qual é produzido a partir da fissão de óxido de Urânio-235 enriquecido. Em seu estado meta-estável, o  $^{99m}\text{Tc}$  decai por transição isomérica ao estado pseudo-estável,  $^{99}\text{Tc}$  que, por sua vez, decai ao estado estável com meia-vida de 210 mil anos, transformando-se em Rutênio-99 ( $^{99}\text{Ru}$ ). A configuração eletrônica do átomo neutro do tecnécio no estado basal é descrita como  $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 4s^2 4p^6 4d^5 5s^1$ , sendo



que a perda de um número fixo de elétrons dos suborbitais s, d ou de suborbitais hibridizados resulta em diferentes estados de oxidação, por exemplo, a perda de um elétron de órbita 5s leva ao estado (I) de oxidação, menos estável, que estabili

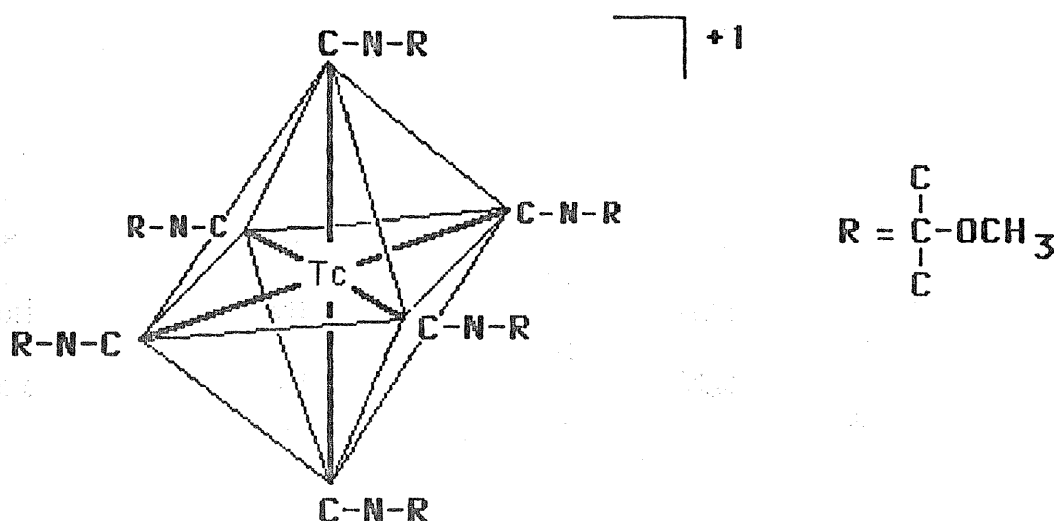


Figura 1: Estrutura geral do complexo Tc-99m (I) hexakis (2-metoxiisobutilisonitrila) enfatizando sua configuração octaédrica.

za-se ao formar complexos catiônicos como, por exemplo, com isonitrilas <sup>19</sup>.

O <sup>99m</sup>Tc é obtido a partir de um gerador de <sup>99</sup>Mo através da eluição com solução fisiológica e produção da solução de íon pertecnetato, um ânion de carga única e átomos de oxigênio em extremidade do tetraedro (<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>) com volume molecular de  $4 \times 10^{-23}$  cm<sup>3</sup>, ligado a átomo de sódio (<sup>99m</sup>TcNaTcO<sub>4</sub><sup>-</sup>) e estado de oxidação 7+. A maior parte da informação existente sobre a química do <sup>99m</sup>Tc (sem carreador ou complexo e em baixa concentração -  $\sim 10^{-9}$  M) foi obtida a partir do <sup>99</sup>Tc (com carreador ou complexos e em maiores concentrações -  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  M) utilizando-se técnicas analíticas como polarografia, espectroscopia de massa, cristalografia com raios-x, cromatografia, etc <sup>3</sup>.

A formação de complexos com as isonitrilas é possível através da redução do estado de oxidação de 7+ (VII) para 1+ (I) através da adição de cloreto estanoso ( $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), agente redutor em meio ácido. O  $^{99\text{m}}\text{TcNaTcO}_4^-$  é adicionado a “kit” contendo tetrafluoroborato de tetrakis (2-MIBI) na forma de sal de cobre (I) sendo a solução fervida por 10 minutos. O pH do produto reconstituído é de 5,5 e a eficiência de “marcação” > 90%. Após a reconstituição o  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI pode ser utilizado por 6 horas<sup>3</sup>.

### 2.2.3 - Transporte miocárdico

A partir de modelos experimentais em que as concentrações extracelulares são similares às clinicamente relevantes ( $10^{-10}$  M), verifica-se que tanto a carga catiônica quanto a lipofilicidade e a estrutura ramificada dos radicais alquila são necessárias para caracterizar as propriedades biológicas dos complexos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -isonitrilas<sup>23</sup>. Tais compostos lipofílicos sofrem partição através das membranas biológicas e sua carga positiva distribuída através da molécula permite que haja deslocamento passivo através da membrana em proporção ao potencial transmembrana. Como a célula miocárdica é rica em mitocôndrias (alto potencial eletronegativo da membrana mitocondrial interna -  $\Delta\Psi = -150$  a  $-200$  mV) há concentração adicional no compartimento intramitocondrial em relação ao citosol, após transporte através do sarcolema (potencial eletronegativo -  $E_m = -80$  a  $-90$  mV)<sup>15</sup>. A influência do  $E_m$  sobre a captação de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi pode ser separada da influência do  $\Delta\Psi$  através da despolarização quase completa do sarcolema pelo aumento da concentração extracelular de potássio e da adição do ionóforo de po

tássio - valinomicina. A captação líquida de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi em 60 min. cai 83,5% quando do uso de solução tampão com alta concentração de potássio e 96% quando adicionada a valinomicina, sendo que a captação deste traçador pode ser revertida pela exposição a este tampão. O efeito da valinomicina isola, provavelmente, o efeito da despolarização da membrana mitocondrial. Após uso de tampão com alta concentração de potássio e valinomicina, verifica-se que a taxa de captação de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi entre o espaço intra e extracelular é  $0,9 \pm 0,2$  (média  $\pm$  erro padrão), valor este próximo da unidade, o que sugere a ausência de mecanismo de captação que seja independente do potencial do sarcolema <sup>14,15</sup>.

Ao avaliar-se a captação líquida de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi em diferentes células, verifica-se que a célula miocárdica de embrião de galinha e de ratos possuem captação maior que fibroblastos e células endoteliais devido, provavelmente, ao seu maior potencial de membrana celular e mitocondrial, assim como ao maior volume mitocondrial, fatos que contribuem em parte para a aparente especificidade de captação miocárdica deste agente no cenário clínico <sup>15,24</sup>.

Já o efeito da energética mitocondrial sobre o acúmulo e retenção de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi é avaliado através de inibidores de transporte e ionóforos (Figura 2). A despolarização da célula miocárdica impede a captação ou provoca a saída de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi, enquanto a hiperpolarização de membranas aumenta significativamente sua retenção intracelular. Carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (CCCP) ou o 2,4 dinitrofenol são compostos que rapidamente desacoplam a mitocôndria através da despolarização de sua membrana interna, levando à imediata liberação do conteúdo intramitocondrial de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi, assim como à inibição de sua captação celular. A determinação simultânea do conteúdo celular de

ATP demonstra que a liberação de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi intracelular independe do metabolismo de fosfatos de alta energia. Também o uso de solução tampão com alta concentração de potássio induz à queda da captação deste radiotraçador devido à despolarização do sarcolema e, para as células miocárdicas despolarizadas desta forma, a adição de valinomicina provoca diminuição ainda mais acentuada de sua captação devido à despolarização seqüencial da membrana interna da mitocôndria (ver acima) <sup>14,15</sup>.

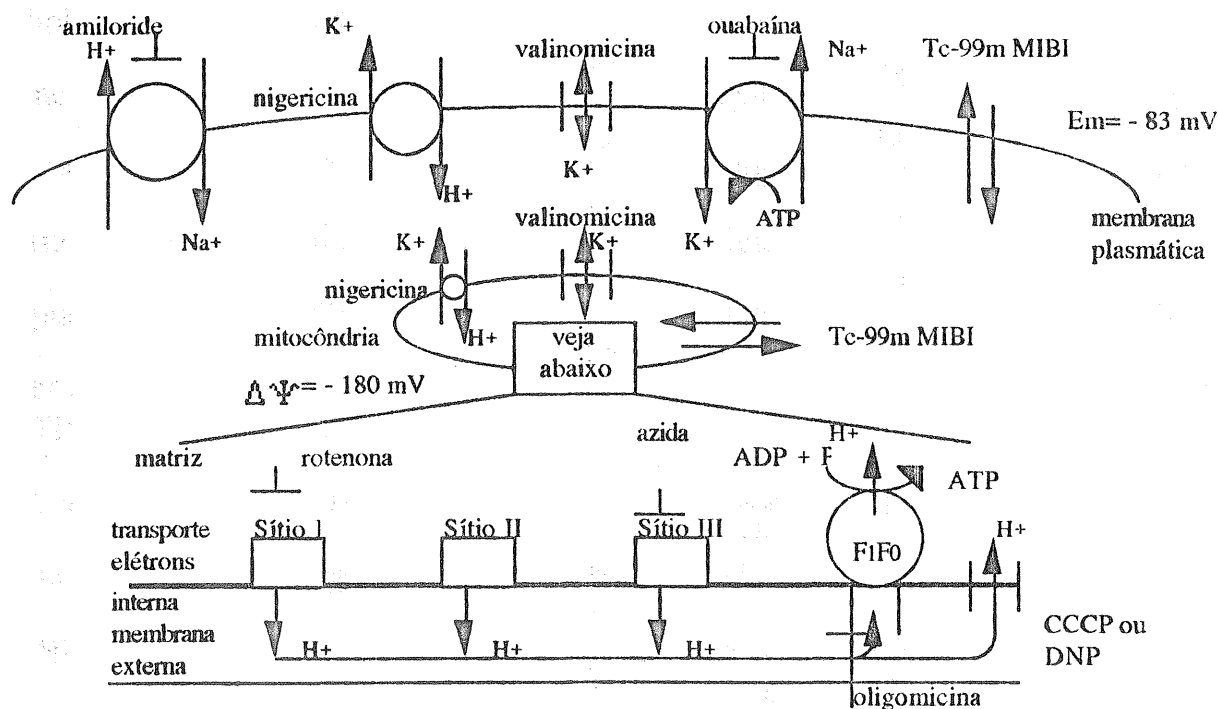


Figura 2. Ilustração esquemática das membranas plasmática e mitocondrial da célula miocárdica demonstrando o local de ação de ionóforos e inibidores utilizados na avaliação do acúmulo potencial-dependente de Tc-99m MIBI. CCCP, carbonil cianida m-clorofenilhidrazona; DPN, 2,4-dinitrofenol (Referência 14).

O uso de rotenona ou azida, inibidores específicos do sítio I e III do transporte mitocondrial de elétrons, respectivamente, não deve provocar colapso imediato de  $\Delta\Psi$ , não apresentando efeito sobre a retenção de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi. Já a nigericina, ionóforo que media a troca eletroneutra de  $\text{K}^+ / \text{H}^+$ , provoca o colapso de  $\Delta\Psi$ , produzindo hiperpolarização deste último, levando a aumento moderado da retenção intramitocondrial deste traçador. Quando adicionada à nigericina, a ouabaína -inibidor específico da  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  ATPase do sarcolema- reduz a captação de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi, sugerindo que a ação da nigericina pode também ser mediada pela interação direta ou indireta da bomba eletrogênica de  $\text{Na}^+$ . A ouabaína, quando isolada, causa mínimo efeito sobre a captação imediata de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi, porém provoca um aumento do seu acúmulo tardio. Este efeito também ocorre quando verapamil (bloqueador dos canais de  $\text{Ca}^{++}$ ) é adicionado à solução tampão, sugerindo que estes bloqueadores do transporte de cátions aumentariam o compartimento celular ou diminuiriam o efluxo celular deste traçador, refletindo uma hiperpolarização secundária da membrana mitocondrial interna ou uma contribuição do potencial do sarcolema (por exemplo, alteração da permeabilidade do  $\text{K}^+$  dependente do  $\text{Ca}^{++}$ )<sup>14,15,24,25</sup>.

Já, com o objetivo de determinar-se a influência da perda de  $\text{K}^+$  (queda do potencial do sarcolema) ou do aumento do ganho mitocondrial de  $\text{Ca}^{++}$  sobre o controle da captação celular líquida de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi, adicionou-se amilorida à solução tampão com nigericina. A amilorida é inibidora da troca de  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  e, em conjunto com a nigericina, provocou um pequeno aumento da captação líquida deste traçador, diminuiu parcialmente o aumento de  $\text{Na}^+$  intracelular e reduziu a carga mitocondrial de  $\text{Ca}^{++}$  quando comparado ao do efeito isolado

do da nigericina. Como há significativa perda de  $K^+$  intracelular com o emprego da nigericina ou da nigericina + amilorida, verifica-se queda do potencial do sarcolema, confirmando que o aumento da captação celular líquida de  $^{99m}Tc$ -sestamibi deve ter refletido o efeito da hiperpolarização da membrana mitocondrial interna desde que a bomba de  $Na^+$  esteja funcionando. Quando há inibição da bomba de  $Na^+$  pela ouabaína, na vigência do efeito da nigericina ou nigericina + amilorida, há inibição quase completa do acúmulo do radiotraçador, enquanto, nestas mesmas condições, a ausência de  $Ca^{++}$  provocou somente uma reversão parcial desta inibição. Tal fato sugere que a falta de acúmulo de  $^{99m}Tc$ -sestamibi deveu-se principalmente à depleção de  $K^+$  intracelular (efeito da nigericina) que resultou na des polarização do sarcolema quando comparado ao efeito da carga mitocondrial de  $Ca^{++}$  (Tabela 1) <sup>14,15</sup>.

Tabela 1 - Efeito da nigericina, amilorida e ouabaína sobre o sódio e potássio intracelular e sobre a captação líquida de  $^{99m}Tc$ -MIBI em culturas de células miocárdicas de embrião de galinha.

Tampão	$Na^+$	$K^+$	Captação de Tc-MIBI*
HEPES-MEBSS	180,9 ± 43,3	890,7 ± 36,7	194,6 ± 13,3
+ nigericina	423,8 ± 30,7	534,5 ± 31,8	306,8 ± 45,3
+ nigericina + amilorida	390,1 ± 17,2	493,4 ± 9,3	338,3 ± 26,6
+ nigericina + ouabaína	715,5 ± 16,8	46,0 ± 2,2	29,5 ± 3,8
+ nigericina + amilorida + ouabaína	859,2 ± 41,5	52,5 ± 10,6	60,6 ± 5,0
+ amilorida	101,6 ± 21,2	783,4 ± 26,4	154,1 ± 10,3
+ amilorida + ouabaína	416,8 ± 31,4	416,9 ± 10,8	245,4 ± 12,9
+ ouabaína	473,9 ± 21,2	405,2 ± 12,8	302,1 ± 16,4

Valores correspondem à média ± erro padrão de quatro determinações.

\* nmol/mg proteína

\*\* fmol/mg proteína x nM

MEBBS - modificação da solução salina balanceada de Earle.

HEPES - ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico

Adaptação da Tabela 2 em Piwnicka-Worms D, Kronauge JF, Chiu ML. Circulation 1990;82:1826-38 <sup>15</sup>.

Além da avaliação do transporte do  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi em células miocárdicas em cultura, o estudo da inibição metabólica destas mesmas células através da sua exposição prolongada ao iodoacetato (inibidor da glicólise) demonstra que, embora haja depleção quase completa do ATP celular, a polarização dos potenciais do sarcolema e membrana mitocondrial interna persistem por uma hora acompanhados da manutenção das taxas de captação em um minuto deste traçador <sup>25</sup>. Estes achados estão de acordo com dados microanalíticos e estruturais do modelo utilizado, assim como com os achados de estudos de lesões mitocondriais tardias induzidas por anóxia <sup>26,27</sup>. Em estudo recente <sup>28</sup>, os dados acima foram confirmados a partir da inibição simultânea da fosforilação oxidativa e da glicólise através da rotenona e do iodoacetato, respectivamente. Tal intervenção produziu queda rápida do conteúdo celular de ATP, porém sem lesão celular, o que foi comprovado pela quantificação da liberação de desidrogenase láctica (enzima liberada tardiamente durante evento isquêmico - > 60 minutos) que é precedida de alterações do conteúdo iônico e da ultraestrutura celular. A taxa de captação inicial de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi aumentou de  $10,6 \pm 0,8$  fmol/mg proteína/nM<sub>0</sub> para  $15,0 \pm 0,6$  fmol/mg proteína/nM<sub>0</sub> durante os 10 primeiros minutos, permanecendo elevada até 60 minutos (hiperpolarização das membranas do sarcolema e mitocondrial possivelmente relacionada à abertura de canais de K<sup>+</sup> ativados pelo ácido aracdônico e sensíveis ao ATP). Já o  $^{201}\text{Tl}$ , com mecanismo de captação celular dependente da bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase (inibida pela depleção de ATP), apresentou queda da taxa de captação neste mesmo período, indicando que possui cinética diversa do  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi durante este período inicial da lesão isquêmica miocelular. O aumento da concentração intracelular de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi durante depleção do ATP

não foi alterado pela presença de ouabaína (bomba de  $\text{Na}^+$  não interfere), enquanto a despolarização do sarcolema (solução tampão com alta concentração de potássio) reduziu em 93% a captação deste traçador durante depleção de ATP. Já a adição do desacoplador mitocondrial CCCP não alterou as taxas de captação inicial de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi durante a depleção de ATP, indicando que, nesta situação, o aumento da taxa de captação deste traçador é um processo que reflete primariamente a média do potencial do sarcolema. Portanto, ao contrário do que acontece quando da despolarização de  $\Delta\Psi$  em condições normais (rápido efluxo celular de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi), durante inibição metabólica o potencial da membrana mitocondrial interna não tem efeito significativo sobre a retenção deste traçador (despolarização precoce de  $\Delta\Psi$  mediada, provavelmente, pela abertura de canais de potássio ATP-sensíveis e não pela entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  para a mitocondria). Os dados acima descritos caracterizam o transporte de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi em miócitos isolados em cultura, para os quais a complexidade compartimental extracelular é eliminada e condições de equilíbrio podem ser atingidas <sup>15</sup>, devendo-se ter cuidado na extrapolação para a lesão isquêmica "in vivo". Para a análise mais completa da cinética deste traçador é necessária a confirmação destes dados em modelos que incluam os diversos compartimentos de distribuição miocárdica em órgãos intactos e isolados <sup>12,29,30</sup>.

Verifica-se através da análise estimativa de curvas de diluição de indicadores em modelos compartimentais para corações de animais isolados e perfundidos <sup>12</sup> que a  $h(t)$  do  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi, ou seja, a curva representativa da fração do traçador que emerge do coração/seg, está mais próxima da curva da albumina (curva de referência) quando comparada à do  $^{201}\text{Tl}$ , porém com sua por-



ção terminal abaixo da curva deste último. Isto significa que a extração miocárdica de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi é menor que a do  $^{201}\text{Tl}$  e que a sua retenção celular é maior. Já a fração de extração instantânea do  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi  $E(t)$ , ou seja, a diferença entre as curvas de transporte da albumina e do traçador em questão, é mais lenta que a do  $^{201}\text{Tl}$ , sugerindo um mecanismo de extração diverso e mais lento para o primeiro. A curva de retenção  $R(t)$  dos traçadores demonstra que há uma maior retenção inicial do  $^{201}\text{Tl}$ , sendo que esta disparidade desaparece em 2 a 3 minutos.

A extração máxima ( $E_{\text{MAX}}$ ) de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi está linear e inversamente relacionada com o fluxo sanguíneo miocárdico, enquanto sua permeabilidade capilar ( $\text{PS}_{\text{cap}}$ ) apresenta relação linear positiva com o fluxo sanguíneo, sendo discretamente positiva (permeabilidade maior com o aumento do fluxo coronariano) porque o aumento do fluxo é proporcionalmente maior do que a queda na extração do traçador. Para fluxos  $> 1,5$  a  $2,0$  ml/min/g de miocárdio há limitação da difusão capilar deste traçador devido, provavelmente, à diminuição da  $E_{\text{MAX}}$  para fluxos mais elevados. O efeito primário do aumento do fluxo sanguíneo coronariano ocorre sobre o “washout” miocárdico dos traçadores, sendo este relativamente modesto para o  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi em relação ao  $^{201}\text{Tl}$  <sup>12</sup>.

Aplicando-se os princípios acima descritos na análise dos efeitos da reperfusão coronariana sobre a extração e retenção miocárdica de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi e  $^{201}\text{Tl}$ , verifica-se que durante reperfusão (isquemia “no-flow” induzida por 30 a 60 minutos e “reflow” precoce - 5 a 10 minutos - ou tardio - 40 a 60 minutos)  $E_{\text{MAX}}$  e  $\text{PS}_{\text{cap}}$  de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi aumentam em 39% e 69%, respectivamente, e diminuem em 14% e 68% para  $^{201}\text{Tl}$ . Em estado basal, a extração líquida

da de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi foi 33% menor que a do  $^{201}\text{Tl}$ , enquanto durante “reflow” precoce foi 13% menor e durante “reflow” tardio foi 90% maior. Portanto, parece que o transporte de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi é relativamente maior durante a fase precoce de reperfusão, sendo mais eficientemente transportado que o  $^{201}\text{Tl}$ . O efeito dominante durante a reperfusão precoce parece ser a aceleração do “washout” do  $^{201}\text{Tl}$  em comparação ao aumento da retenção líquida de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi durante esta fase. Isto significa que o estado metabólico do miocárdio exerce efeito maior sobre a retenção do que sobre a extração de primeira passagem dos traçadores <sup>12</sup>.

Durante a reperfusão, as estimativas de troca interstício-miócito foram sempre mais altas para o  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi em relação ao  $^{201}\text{Tl}$ , assim como o volume intramiócito de distribuição foi maior para o primeiro (+ 28% para o primeiro e - 50% para o segundo, em relação ao controle). Estes achados sugerem que estes dois traçadores possuem mecanismos diversos de transporte e que a reperfusão tem efeito oposto sobre a troca tecido-capilar e sobre a retenção miocárdica dos mesmos <sup>12</sup>. Portanto, durante a fase precoce de reperfusão, a perfusão miocárdica pode ser superestimada pelo  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi e subestimada pelo  $^{201}\text{Tl}$ . Estes achados concordam com os obtidos com o modelo que utiliza cultura de células miocárdicas contráteis de embrião de galinha descritos acima.

#### 2.2.4 - Farmacologia clínica

A principal via de excreção de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi se faz através do sistema hepatobiliar com a presença deste radiotraçador em intestino delgado até 1 hora após sua aplicação endovenosa. Aproximadamente 27% da dose injeta-

da é eliminada pela urina e 33% pelas fezes em 48 horas. A retenção miocárdica deste traçador é de aproximadamente 1,2% da dose injetada em repouso e 1,5% quando injetada durante exercício ou vasodilatação com dipiridamol, enquanto a captação pulmonar de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi é negligenciável (razão coração / pulmão = 2,4 tanto em repouso quanto durante exercício). O “clearance” da circulação sanguínea ocorre de forma exponencial com o componente mais rápido apresentando um  $t_{1/2} = 4,3$  minutos em repouso e 1,6 minutos em exercício<sup>4,22</sup>.

A meia-vida efetiva do  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi é de 3 horas para o coração e 30 minutos para o fígado, tanto pós-exercício quanto em repouso, sendo o intestino grosso (transverso) o órgão com maior dose absorvida (~ 4,6 rads / 30 mCi ou ~ 46,6 mGy / 1.100 MBq), enquanto o coração é submetido à 0,57 rads, ovários à 1,22 rads, testículos 0,29 rads, medula óssea 0,72 rads e o corpo inteiro à 0,46 rads / 30 mCi.

#### 2.2.5 - Aspectos técnicos

O projeto, a síntese e o uso clínico de radiofármacos devem basear-se no conhecimento de seus mecanismos de captação e retenção celular. Intervenções farmacológicas, metabólicas e de alteração de fluxo sanguíneo podem ser realizados em preparações experimentais com aplicação “in vivo” do radiotraçador para posterior análise de curvas de diluição dos mesmos ou com retirada do coração para preparo de cortes miocárdicos. Outra forma de investigação inclui a retirada do coração e sua preparação em sistema que o mantenha nutrido e oxigenado como ocorre com a preparação de Langendorff. Estas técnicas de investiga-

ção que, em seu conjunto utilizam órgãos em seu estado natural, são complexas na medida em que para caracterizar o transporte transmembrana deve-se considerar o retardo da difusão do traçador em estudo devido a espaços extracelulares complexos, o trauma de dissecação e homogeneização, o pequeno volume celular em relação à área de superfície de trocas, à existência de heterogeneidade celular e à ausência de condições de equilíbrio uniformes<sup>12,15</sup>. Portanto, a técnica utilizada e a interpretação dos dados obtidos devem ser cuidadosas e, quando possível confirmados clinicamente ou em modelos experimentais em monocamadas de células em cultura. A cultura de células miocárdicas representa um modelo que minimiza os retardos de difusão extracelular fornecendo informações acerca do transporte iônico, da atividade elétrica, da contratilidade do miócito, do metabolismo, da morfologia celular em estado de equilíbrio fisiológico e após lesões reversíveis e irreversíveis em condições de verdadeiro equilíbrio. Deve-se, entretanto, considerar que, quando são utilizadas células como as miocárdicas de embrião de galinha, pode haver diferenças entre o metabolismo celular destas e de células adultas, assim como desdiferenciação estrutural e funcional, diferenças das propriedades eletrofisiológicas a agentes cardioativos, toxinas e neurotransmissores autonômicos (ausência de inervação funcional). Apesar destas questões, esta metodologia tem demonstrado eficácia e alto valor preditivo para a avaliação das propriedades de transporte independente de fluxo sanguíneo de radiotraçadores que avaliam a perfusão miocárdica em condições de equilíbrio<sup>15</sup>.

O resultado das investigações sobre a cinética miocárdica de radiotraçadores é baseada, até o presente momento, em dados obtidos e confirmados por diferentes metodologias, consideradas suas vantagens, desvantagens e diferen-

ças filogenéticas.

O intenso uso clínico destes radiotraçadores foi possível através da interpretação e extrapolação dos dados obtidos pelos métodos experimentais acima descritos. Entretanto, o teste funcional utilizado em humanos considera fundamentalmente, o aspecto do desequilíbrio do fluxo sanguíneo em diferentes territórios vasculares miocárdicos para o diagnóstico e prognóstico da cardiopatia isquêmica. Ultimamente, a grande utilidade do método cintilográfico gira em torno do estabelecimento da viabilidade do tecido miocárdico pós-reperfusão. Independente do objetivo da avaliação da perfusão miocárdica com radiotraçadores, o fluxo coronariano pode ser aumentado acima dos níveis de repouso através de exercício, da vasodilatação farmacológica e, em casos selecionados, do estímulo de marca-passo atrial ou ventricular <sup>31</sup>.

Em geral, o fluxo sanguíneo coronariano aumenta de 2 a 2,5 vezes em relação ao fluxo basal quando utilizada a estimulação cronotrópica com marca-passo, enquanto o exercício máximo leva a aumentos de 2 a 3,9 vezes e vasodilatadores como o dipiridamol até 5 vezes o fluxo basal. O aumento do fluxo é acompanhado de queda proporcional da resistência vascular <sup>31</sup>. Embora o marca-passo possua menor capacidade de aumento do fluxo sanguíneo miocárdico, sua utilização como indutor de taquicardia gradual e isquemia tem demonstrado alta correlação entre algumas alterações hemodinâmicas induzidas (frequência cardíaca e consumo de O<sub>2</sub>), a extensão e topografia do miocárdio hipoperfundido quando comparados ao exercício <sup>32-36</sup>. A sensibilidade e especificidade da cintilografia miocárdica com <sup>201</sup>Tl e estresse miocárdico com “pacing” atrial variaram de 82% a 95% e de 80% a 100%, respectivamente. Já a sensibilidade e especificidade do

eletrocardiograma e do surgimento de angina induzida pelo marca-passo variaram de 17% a 94% e de 60% a 100%, respectivamente, para o primeiro e 44% a 100% e de 60% a 100%, respectivamente, para o surgimento de angina <sup>36</sup>.

Quando da utilização de <sup>99m</sup>Tc-sestamibi, a magnitude do defeito perfusional miocárdico em qualquer dos segmentos do ventrículo esquerdo pode ser estabelecida através da razão entre a retenção do radiotraçador na área de provável isquemia e a retenção em área supostamente normal do mesmo corte tomográfico (SPECT) - quantificação relativa. Se o percentual de retenção desta razão não se alterar entre o estudo com estresse miocárdico (exercício, vasodilatação ou pacing) e o basal o defeito é considerado “fixo” (cicatriz miocárdica ou isquemia severa), enquanto se houver alteração desta razão entre o miocárdio com déficit perfusional e aquele considerado normal no estudo basal, o defeito é “reversível” indicando isquemia regional indutível. Esta reversibilidade não ocorre na isquemia crônica severa. Já quando houver cicatriz e tecido miocárdico isquêmico, defeito perfusional será designado de “parcialmente reversível”. A padronização das imagens quando da sua reconstrução e avaliação visual/quantitativa é fundamental para a reprodutibilidade e acurácia do estudo cintilográfico da perfusão miocárdica. A quantificação absoluta da retenção miocárdica de <sup>99m</sup>Tc-sestamibi é ainda tecnicamente inviável devido à falta de método que permita a correção da atenuação e do espalhamento dos fótons provenientes do miocárdio e de outras regiões vizinhas <sup>37-41</sup>.

#### 2.2.6 - Aplicações clínicas

O uso da cintilografia miocárdica perfusional com SPECT tem

crescido significativamente nos últimos anos, à medida que fica melhor caracterizado o seu real benefício na investigação da cardiopatia isquêmica. Sua utilização no diagnóstico de coronariopatia traz maior benefício para pacientes com probabilidade intermediária de doença coronariana, para os quais, um estudo normal da perfusão miocárdica com  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi baixa o risco de coronariopatia para níveis semelhantes aos da população em geral <sup>1,42</sup>.

A acurácia de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi parece discretamente superior à do  $^{201}\text{Tl}$  para a detecção de coronariopatia (sensibilidade 90% e 83%, especificidade de 93% e 80% e taxa de normalidade\* de 100% e 77%, respectivamente). Já, para a detecção de coronariopatia em vasos individuais, a sensibilidade é de 83% para o  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi e 70% para o  $^{201}\text{Tl}$ , enquanto a especificidade é de 77% e 75%, respectivamente <sup>43</sup>.

A demonstração de isquemia miocárdica e de miocárdio viável tem assumido importância cada vez maior com o surgimento de procedimentos intervencionistas como a angioplastia coronariana, a trombólise e a cirurgia de revascularização. As características físicas e de biodistribuição do  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi, principalmente o prolongado tempo de residência miocárdica, parecem ser favoráveis nestas situações específicas, necessitando, porém, de confirmação através de estudos clínico-laboratoriais. Estas características incluem a avaliação do fluxo sanguíneo regional, a integridade da membrana celular e a atividade metabólica, informações estas complementares as fornecidas pela avaliação da anatomia ou da função contrátil. O uso de  $^{201}\text{Tl}$  e da tomografia por emissão de pósitrons (PET) tem demonstrado acurácia semelhante na detecção de miocárdio viável. Embora aproximadamente 85% das regiões miocárdica identificadas como viáveis

por estes últimos agentes possam beneficiar-se com a revascularização, é improvável que todos estes pacientes beneficiem-se clinicamente (melhora de desempenho ventricular, da qualidade de vida e do prognóstico). Portanto, para a indicação da cirurgia de revascularização, a identificação de miocárdio viável é um dos fatores que devem ser levados em conta. Outros fatores incluem o quadro clínico, a anatomia coronariana, a função residual do ventrículo esquerdo e a evidência de isquemia indutível <sup>44</sup>.

Outra indicação do uso do estudo da perfusão miocárdica com <sup>99m</sup>Tc-sestamibi inclui a determinação da extensão do infarto agudo do miocárdio e do miocárdio peri-infarto sob risco em relação ao efeito do tratamento de reperfusão com trombolíticos. Dados recentes referentes ao uso deste traçador confirmam e acrescentam novos conceitos como: a limitada capacidade do eletrocardiograma (fase aguda) e da coronariografia em avaliar miocárdio sob risco (exceto para localização do infarto); o estabelecimento do valor potencial da angioplastia em pacientes não candidatos ao tratamento trombolítico; a presença de oclusão coronariana aguda e significativa extensão de miocárdio sob risco em pacientes sem elevação do segmento ST; a existência de significativa diferença entre a extensão de miocárdio sob risco e as dimensões finais da área infartada em pacientes com infartos dos segmentos anterior e inferior; a freqüente presença de miocárdio no-cauteado (“stunning”) e de hipercinesia compensatória que reduzem o valor da avaliação da função ventricular quando da alta hospitalar como medida das dimensões do infarto; e a ausência de utilidade do eletrocardiograma como medida das dimensões do infarto <sup>45</sup>.



### 3--- OBJETIVOS

---

O presente trabalho objetivou:

- a investigação da distribuição subcelular e da integridade química do  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi em preparação de coração íntegro, testando em mamíferos, os modelos desenvolvidos em células miocárdicas de aves em cultura.

- avaliar a utilidade de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi com SPECT na determinação da redução da quantidade de miocárdio sob risco imediatamente após angioplastia coronariana transluminal percutânea em humanos.

#### Hipóteses Conceituais

- estudos laboratoriais utilizando células miocárdicas de embrião de galinha sugerem que  $^{99m}\text{Tc}$  MIBI é capaz de avaliar a viabilidade celular através de seu “seqüestro” intra-mitocondrial, processo este dependente de energia gerada por significativo potencial eletronegativo presente no sarcolema e na membrana interna mitocondrial. Entretanto, estudos que utilizam preparações com coração de mamífero íntegro perfundido e técnica de fracionamento celular, sugerem que este radiofármaco possui aparente localização citosólica. Objetivando avaliar a discrepância entre estes achados, utilizou-se método idêntico ao proposto, para a preparação e fracionamento celular de órgão íntegro, porém, o conteúdo de  $^{99m}\text{Tc}$  MIBI de cada fração subcelular foi correlacionado a marcadores e substratos mitocondriais. A utilização da centrifugação como método de fracionamento celular deve provocar o extravasamento do conteúdo mitocondrial e a “contaminação” de outros compartimentos intracelulares.

- as características físicas e fisiológicas do  $^{99m}\text{Tc}$  MIBI favorecem a estratégia temporal proposta para avaliação dos benefícios da angioplastia coronariana.

- a técnica utilizada possibilita correlação entre a distribuição miocárdica de  $^{99m}\text{Tc}$  MIBI e a estimativa anatômica do grau de estenose residual pós-dilatação e/ou o seguimento clínico dos pacientes.

4--- DISTRIBUIÇÃO SUBCELULAR E ANÁLISE DE  $^{99m}\text{Tc}$   
-SESTAMIBI EM CORAÇÃO DE RATO ISOLADO E  
PERFUNDIDO

---

#### 4.1 --- INTRODUÇÃO

Hexakis (2-metoxiisobutil isonitrila) tecnécio (I) ( $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi) é um agente para imagem da perfusão miocárdica, recentemente aprovado pela "Food and Drug Administration", que explora as propriedades cintilográficas favoráveis do  $^{99m}\text{Tc}$  <sup>4,46</sup>. As investigações iniciais dos mecanismos de captação miocárdica e distribuição subcelular de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi em cortes de coração de cobaio sugeriam que este agente catiônico moderadamente lipofílico difundia-se através da membrana miocelular e localizava-se na fração citosólica <sup>13,47</sup>. Utilizando-se técnicas de centrifugação diferencial padronizadas, verificou-se que 84% da radioatividade recuperável estava associada à fração citosólica <sup>13</sup>. Utilizando-se técnicas similares em coração de embrião de galinha, complexos de tecnécio do ligante 2-carbo-metoxi isopropil isonitrila ( $^{99m}\text{Tc}$ -CPI), outro agente catiônico moderadamente lipofílico, foram encontrados predominantemente na fração membrana celular (61%) e na fração citosólica (25%) <sup>48</sup>. Como esperado, outros complexos catiônicos altamente lipofílicos de  $^{99m}\text{Tc}$  alquilisonitrilas foram relatados como estando associados predominantemente à fração de membrana celular em células miocárdicas de ratos em cultura ou em hemácias <sup>49</sup>. Entretanto estes estudos eram limitados pela falta de correlação funcional ou de marcadores enzimáticos que caracterizassem as frações tissulares quanto à possível contaminação cruzada dos constituintes celulares ou à presença de impurezas.

Recentemente, estudos com células de embrião de galinha em cultura <sup>14</sup>, fibroblastos de camundongo <sup>24</sup> e linhagens de células neoplásicas <sup>50</sup> têm

indicado que o mecanismo celular fundamental de captação e retenção de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi envolve a difusão simples através das membranas plasmática e mitocondrial em resposta a significativos potenciais transmembrana negativos, favorecendo a localização mitocondrial deste agente, quando em estado de equilíbrio <sup>14,24</sup>. Concomitantemente, pouca radioatividade foi detectada em associação inespecífica à membrana celular quando utilizou-se intervenções farmacológicas que despolarizam o sarcolema e a membrana mitocondrial <sup>14,24</sup>. O mecanismo de distribuição celular de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi independente do fluxo sanguíneo requereria, portanto, um modelo compartimental com três componentes (espaço extracelular, citosol, matriz mitocondrial interna) dispostos em série nos miócitos, ao invés do modelo com dois componentes proposto em estudos prévios com corações de cobaia <sup>13,47</sup>.

O objetivo deste estudo foi de investigar a distribuição subcelular e a integridade química de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi em preparações de coração inteiro, testando, desta forma, os modelos desenvolvidos com células miocárdicas de aves em cultura, em um sistema mamífero. A malato desidrogenase, uma enzima mitocondrial <sup>51</sup>, e substratos mitocondriais foram correlacionados com o conteúdo de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi de frações subcelulares para correção de qualquer contaminação cruzada inerente à metodologia. Técnicas de cromatografia e ultrafiltração foram utilizadas para testar possível ligação do composto principal à proteína solúvel ou seu metabolismo.

## 4.2 --- MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 --- Soluções Experimentais

Corações isolados de rato foram perfundidos com solução tampão modificada de Krebs-Henseleit com a seguinte composição (mM): 118 NaCl; 5,4 KCl; 0,8 MgSO<sub>4</sub>; 0,8 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,2 CaCl<sub>2</sub>; 26 NaHCO<sub>3</sub>; 5,6 dextrose; 4,0 HEPES. Este tampão foi continuamente borbulhado com 95% O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub> para atingir pH de 7,4 ± 0,05 e sua temperatura mantida em banho-maria a 37 °C. A infusão de radioisótopo foi feita através da adição de 1,5 a 3,3 mCi (55 a 122 MBq) de <sup>99m</sup>Tc MIBI aos 250 ml de solução tampão para os protocolos de “captação líquida” ou através da injeção em “bolo” de 0,8 a 3,0 mCi (30 a 111 MBq) de <sup>99m</sup>Tc MIBI em um acesso no aparato de perfusão, imediatamente antes da cânula aórtica.

Solução tampão I utilizada no fracionamento subcelular composto pelos seguintes (mM): 230 manitol; 70 sucrose; 3 MOPS; 2 EGTA; 0,2% albumina sérica bovina (BSA) (pêso/vol.); pH 7,2 titulado com KOH. Solução tampão II utilizada no fracionamento subcelular (mM): 110 KCL; 20 MOPS; 46 manitol; 14 sucrose; 2 EGTA; pH 7,5 titulado com KOH.

A síntese de <sup>99m</sup>Tc MIBI foi realizada utilizando-se “kit” fornecido por E.I. Du Pont, Medical Products Division, North Billerica, MA, Estados Unidos. Cloreto estano (0,075 mg) foi utilizado como agente redutor do

$^{99m}\text{Tc}$  e MIBI sob forma de sal -  $\text{Cu}(\text{MIBI})_4\text{BF}_4$ .  $^{99m}\text{Tc}$ -pertechnetato foi obtido a partir de gerador comercial de molibdênio/tecnécio (New England Nuclear, Billerica, MA, EUA) em 1-2 ml de solução fisiológica (0,15 M NaCl) e adicionado ao conteúdo do "kit" que foi aquecido por 15 minutos a 100 °C e resfriado a temperatura ambiente. A atividade do conteúdo final de 2 ml foi determinada em calibrador de dose padrão (CRC-12, Capintec, Ramsey, NJ, EUA) e a pureza radioquímica determinada através de cromatografia de camada fina utilizando etanol absoluto como fase móvel sendo maior que 97% (placas de óxido de Alumínio, J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA).

#### 4.2.2 --- Preparação de coração isolado e perfundido

Ratos Sprague-Dawley (machos ou fêmeas) foram anestesiados em câmara com éter dietílico. Após aprofundamento anestésico, os corações eram rapidamente removidos através de toracotomia paraesternal e imediatamente colocados em solução tampão Krebs-Henseleit a 4 °C com heparina (~100 unidades). Os órgãos eram rapidamente limpos de tecido conectivo, a aorta identificada e conectada ao aparato de perfusão através de cânula para perfusão retrógrada, com revestimento canular para circulação de água. Todos os corações foram inicialmente perfundidos por 10 minutos em solução tampão de Krebs-Henseleit a 37 °C com o objetivo de estabilização mecânica. A solução tampão foi infundida com fluxo constante (Master Flex Pump, Cole-Palmer Instruments Co., Chicago, IL, Estados Unidos da América) ou sob pressão constante (~ 80 cm de  $\text{H}_2\text{O}$ ) como descrito na secção dos Resultados.



Foram empregados dois protocolos experimentais de perfusão:

a) perfusão do coração por 17 minutos antes da injeção em “bolus” de 0,8 a 3,0 mCi de  $^{99m}\text{Tc}$  MIBI, seguida de 3 minutos adicionais de perfusão; ou b) perfusão por 20 minutos com solução tampão contendo 6 a 14  $\mu\text{Ci/ml}$  de  $^{99m}\text{Tc}$  MIBI à uma taxa de fluxo de 2,5 a 7 ml/minuto. Todos os experimentos foram realizados com aprovação da “Harvard Medical Area Standing Committee on Animals”, de acordo com a posição da “American Heart Association” sobre o uso de animais em pesquisa.

#### 4.2.3 --- Fracionamento tecidual

Após perfusão, os corações foram colocados em solução tampão I a 4 °C e novamente limpos de tecido conectivo, para então serem seccionados resultando em pequenos fragmentos de 1 a 2 mm. A seguir, os fragmentos eram homogeneizados através de três ou quatro passadas em homogeneizador tecidual de Potter-Elvehjen, para após, serem centrifugados durante 10 minutos (500 x g a 4 °C). O sobrenadante era descartado e o material depositado re-suspenso em 5 ml de solução tampão II a 4 °C para novamente ser homogeneizado na presença de 0,5 mg/ml de protease (nagarse, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, Estados Unidos da América). Após 3 minutos de ação digestiva da protease, esta era inibida pelo uso de 10 ml de solução tampão II contendo 0,2% de BSA. A seguir, os fragmentos maiores de tecido eram filtrados e o filtrado era novamente centrifugado por 5 minutos (5000 x g a 4 °C). Esta centrifugação gerava o “componente

sobrenadante I” (Figura 3) e o material depositado era re-suspenso em 10 ml de solução tampão II com BSA e centrifugado por 10 minutos a 500 x g a 4 °C e novamente por igual período e temperatura a 3000 x g, obtendo-se, respectivamente, o “componente de fragmentos de membrana” e o “componente mitocondrial”. O material sobrenadante é denominado “componente sobrenadante II” (Figura 3).

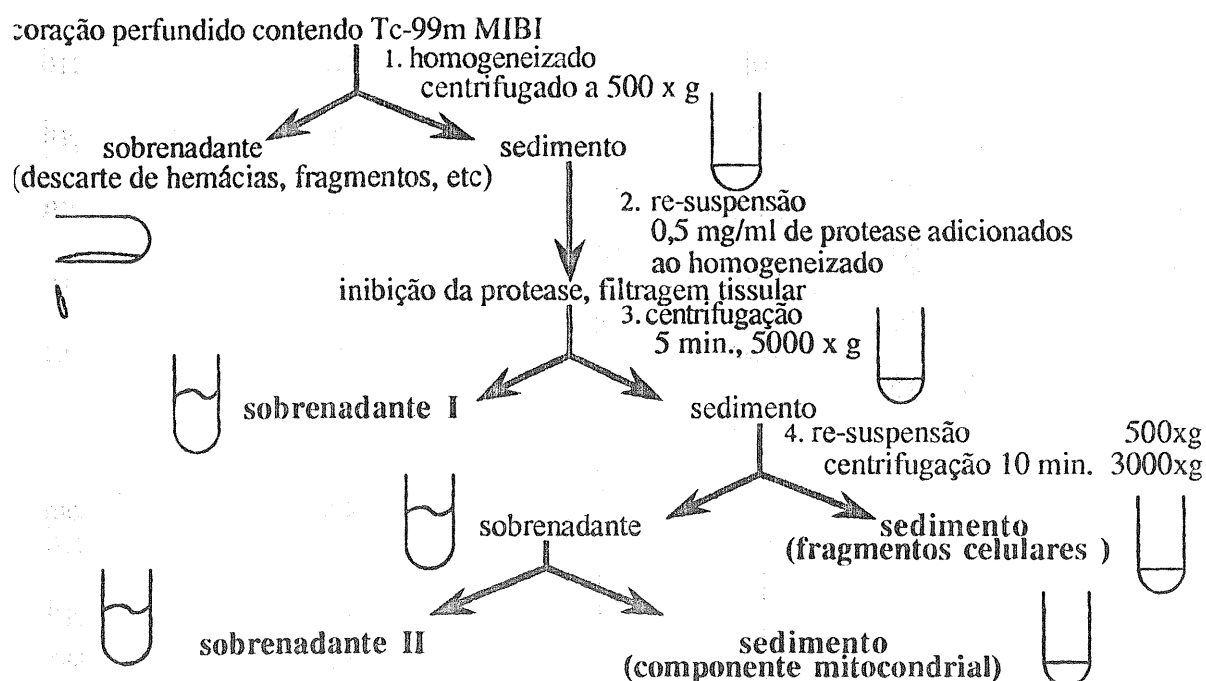


Figura 3. Diagrama esquemático do procedimento de centrifugação diferencial aplicado aos corações de rato perfundidos pela técnica de Langendorff e contendo  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI.

Para determinar-se o efeito da velocidade de centrifugação sobre a separação das diversas frações,  $^{99m}\text{Tc}$  MIBI foi adicionado à fração pós-protease obtida através da técnica descrita acima, exceto pelo fato de os corações serem perfundidos por solução de Krebs-Henseleit sem radioisótopo, sendo a fração pós-protease centrifu

gada por 5 minutos a 4 °C com 500 x g ou 15000 x g.

#### 4.2.4 --- Ensaios, marcadores e inibidores

A malato desidrogenase é uma enzima solúvel presente em nível da matriz mitocondrial interna e foi utilizada como “marcador” para a determinação da distribuição e vasamento do conteúdo mitocondrial nas diversas frações obtidas após as centrifugações. Com o objetivo de medir a atividade da malato desidrogenase, foi utilizado estudo fluorimétrico enzimático padronizado da oxidação de NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) pelo oxalacetato<sup>51</sup> (Kontron Instruments SFM 25, Zurich, Suíça; excitação de 340 nm e emissão de 460 nm).

Substratos específicos da cadeia respiratória mitocondrial foram utilizados na correlação do acúmulo total de <sup>99m</sup>Tc MIBI nas diversas frações subcelulares com o estado metabólico de mitocôndrias intactas após o processo de fracionamento. Após inibição da atividade da protease e filtração, o filtrado foi dividido em duas amostras, uma de “controle” e outra “tratada”. Nesta última, foram adicionados 10 mM de succinato, substrato específico para o Sítio II da cadeia de transporte de elétrons, e 1 µM de rotenona (composto inibidor Sítio I)<sup>14</sup>. As amostras foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente e centrifugadas por 5 minutos (5000 x g a 4 °C).

Também foi avaliado o efeito da adição de substrato mitocondrial às frações nas quais o <sup>99m</sup>Tc MIBI foi adicionado in vitro. Neste caso, os corações foram perfundidos com solução tampão de Krebs-Henseleit sem radiotraça

dor, sendo este adicionado somente após a inibição do efeito da protease e filtração, como acima descrito. Duas amostras foram novamente obtidas, controle e tratada, respectivamente, sendo incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente com e sem substrato e então centrifugadas por 5 minutos (5000 x g a 4 °C).

Com o objetivo de caracterizar mitocôndrias intactas passíveis de despolarização após fracionamento celular, foram utilizados 5 µM de carbonilcianeto clorofenilhidrazona (CCCP), substância desacopladora da fosforilação oxidativa <sup>14</sup>. Todos os reagentes foram obtidos da Sigma Chemical Co. e dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) antes de sua adição às soluções tampão. A concentração final de DMSO foi tipicamente < 0.25%, não afetando a cinética celular de <sup>99m</sup>Tc MIBI <sup>14</sup>.

As frações obtidas foram pesadas em tubos de centrífuga previamente tarados, sendo, à seguir, obtida a atividade de <sup>99m</sup>Tc em contador gama de poço (Omega 1- Canberra, Meriden, CT, Estados Unidos) para cada amostra. Foi aplicada correção para diferenças geométricas entre as amostras. O conteúdo protéico dos sedimentos foi determinado através de ensaio com bureta <sup>52</sup>.

A determinação da atividade relativa de <sup>99m</sup>Tc MIBI em cada fração tecidual (sedimento) foi obtida pela subtração da atividade residual do sobrenadante. Para esta correção foram considerados os valores de 0.65 g de proteína celular/g de peso celular seco e 0.8 g de proteína mitocondrial/g de peso mitocondrial seco <sup>56</sup>. Estes valores foram combinados aos obtidos experimentalmente, ou seja, 21 ± 3 g (n=8) de peso bruto/g de proteína celular e 26 ± 3 g (n=8) de peso bruto/g de proteína mitocondrial, medidos a partir dos sedimentos obtidos do protocolo ilustrado na Figura 3.

Os fatores de correção para o protocolo da análise das diferenças entre velocidades de centrifugação foram de  $29 \pm 8$  g (n=4) e  $16 \pm 3$  g (n=4) de peso bruto/g de proteína no sedimento para 500 x g e 15000 x g, respectivamente. Os resultados foram normalizados à atividade total de  $^{99m}\text{Tc}$  e expressos como percentual da atividade total da fração.

#### 4.2.5 --- Análise da administração "in vivo" de $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI

Ratos Sprague-Dawley foram anestesiados com éter dietílico e  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI foi injetado através de veia jugular exposta (15-20 mCi, 5,5-7,4 GBq por 0,5 ml). Aos 15 minutos após a injeção do radiofármaco, os animais foram sacrificados através de asfixia por éter e os corações foram removidos, sendo lavados em solução tampão fosfatada gelada (0,15 M ; pH 7,4; 4 °C). O coração foi picado com tesoura em pedaços de 1 a 2 mm que foram diluídos, em proporção de 2:1 por peso, em solução fisiológica tampão e homogeneizados em teflon de Potter-Elvehgem e misturador tissular de vidro. Esta mistura homogeneizada foi centrifugada a 3000 x g por 20 minutos a 4 °C e três alíquotas de 500 µl de sobrenadante, contendo primariamente os "componentes citosólicos", foram submetidas a microcentrifugador Centricon com limiar de 30 Kdaltons (Amicon, Beverly, MA, EUA) e centrifugados por 45 minutos a 3000 x g em rotor de ângulo fixo de 30°. O filtrado foi submetido a microconcentrador com limiar de 10 Kdaltons e centrifugado com a mesma técnica descrita acima e, novamente, submetido a microconcentrador com limiar de 3 Kdaltons. Após cada filtragem, 2 x 250 µl de solução tampão eram adicionados e a centrifugação repetida para remover a ativi-

dade não ligada à proteínas do volume de concentrado (~50 µl). A fração concentrada de atividade foi coletada através da inversão do microconcentrador e centrifugação, diferenciando, portanto, as contagens associadas com proteínas de alto peso molecular e a ligação inespecífica à membranas. Estudos de controle foram realizados através de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI adicionado à solução fisiológica para monitorizar a ligação ao filtro plástico.

O componente “citosólico” dos corações homogeneizados também foi testado para a presença de ligação proteica de qualquer das espécies que contivessem  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi através de cromatografia com dois sistemas diferentes de HPLC (“high-pressure liquid chromatography”). O primeiro foi um sistema de cromatografia por permeação de gel com base de sílica (GPC) que utiliza coluna de  $^{125}\text{I}$ odo-proteína como fase estacionária (1 cm x 25 cm) (Waters Assoc., Milford, MA, EUA) eluída com tampão aquoso como fase móvel (0,05 M, pH 7,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) com um fluxo de 1 ml / minuto. O segundo foi um sistema de cromatografia por troca de aníons (AEC) que consiste de uma coluna de troca de aníons Accell (4,6 mm x 250 mm) (Waters Assoc., Milford, MA, EUA) eluída por mais de 10 minutos com solução fisiológica (0,15 a 1,5 M) com gradiente linear de tampão fosfatado (0,05 M, pH 7) a 1 ml / minuto. Em ambos os sistemas, o cátion lipofílico “pai” é retido indefinidamente até que seja atingido gradiente de metanol até pelo menos 80%.

A identidade dos complexos localizados no coração de rato e que continham tecnécio foi estabelecida através da análise da atividade no componente “citosólico” do homogeneizado miocárdico utilizando-se o mesmo sistema cromatográfico com fase reversa (RP-HPLC) utilizado na validação da pureza do

“kit” de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI. Para esta técnica, a preparação das amostras envolvia a diluição da fração citosólica com etanol gelado (1:1, v:v) para desnaturação e precipitação de proteínas e centrifugação a 3000 x g por 5 minutos a 4 °C. A determinação das contagens/volume indicaram que não havia ligação significativa do  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI ao precipitado proteico. Amostras límpidas do sobrenadante foram analisadas através de sistema RP-HPLC que consistia de fase estacionária com ligação C-8 (partículas com 5  $\mu\text{m}$ , 10 cm x 0,46 cm) (Brownlee, OS-MP “cartridge”, Rainin Instruments, Woburn, MA, EUA) e fase móvel com gradiente linear para 100% de tampão aquoso  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4, 0,05 \text{ M}]$  a 95% de metanol em 5 minutos. Detecção radiométrica e ultravioleta seriada foi utilizada para monitorizar as eluições cromatográficas.

#### 4.2.6 --- Análise estatística

Os valores são expressos como a mediana (valores mínimos e máximos) como indicado no texto [(n) é o número de observações]. Significado estatístico foi estabelecido através de testes não-paramétricos descritos quando de sua utilização<sup>54</sup>. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

### 4.3 --- RESULTADOS

#### 4.3.1 --- Distribuição subcelular

A influência das diversas velocidades de centrifugação sobre a

atividade de  $^{99m}\text{Tc}$  no sedimento pós-protease dos corações de rato perfundidos foi testada para avaliar as potenciais fontes de erros na designação da atividade para cada compartimento subcelular. A atividade associada ao sedimento foi de 36% (26% a 48%) (n=4), 32% (15% a 45%) (n=8) e 50% (42% a 58%) (n=4) da atividade total para as velocidades de 500 x g, 5000 x g e 15000 x g, respectivamente. A separação obtida com velocidades de 500 x g e 5000 x g não foi significativamente diferente para  $\alpha = 0,05$  ao utilizar-se o teste de comparação múltipla para Kruskal-Wallis (ANOVA unidirecional), enquanto aquela obtida por 15000 x g aumentou em 56% a atividade associada ao sedimento. Uma vez que o objetivo desta série de experimentos era o de correlacionar o fracionamento da atividade de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI com um marcador mitocondrial e, ao mesmo tempo, verificar métodos previamente publicados, o protocolo que utiliza velocidade de centrifugação de 5000 x g continuou sendo analisado.

Utilizando-se o protocolo ilustrado na Fig. 3, cinco corações de rato perfundidos e injetados com  $^{99m}\text{Tc}$  MIBI em bolus apresentaram a seguinte distribuição de atividade do radiotraçador pelas diversas frações (% do total): sobrenadante I, 64% (50% a 80%); sobrenadante II, 22% (16% a 29%); fragmentos celulares, 14% (3% a 17%); e componente mitocondrial, 1% (0,6% a 4%) (Figura 4). O mesmo protocolo foi utilizado para avaliação da distribuição da atividade do radiotraçador após infusão contínua (n=6) com pressão ou fluxo constantes (Figura 4). Aplicando-se o teste de Friedman (ANOVA bidirecional) e o respectivo teste de comparações múltiplas, verifica-se que não há diferença significativa entre a distribuição da atividade nas diversas frações após injeção em bolus ou infusão contínua, havendo, entretanto, uma tendência de aumento da ativi-



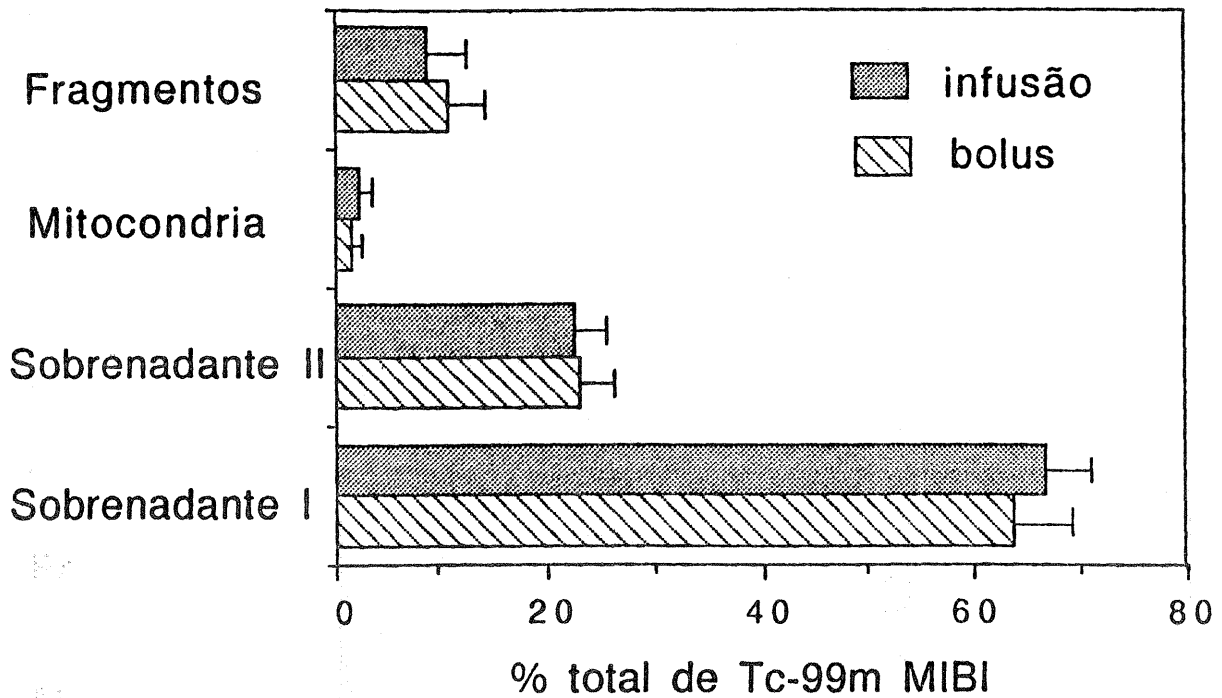


Figura 4. Distribuição nominal de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI nas frações obtidas a partir de corações de ratos perfundidos. O conteúdo do traçador em cada fração é expresso como o percentual do total de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI recuperável a partir dos protocolos de aplicação em "bolus" (n=5) ou por infusão (n=6).

dade associada ao compartimento mitocondrial (aumento de 40%) e diminuição da atividade na fração dos fragmentos celulares (decréscimo de 11%) para o protocolo de infusão contínua. Deve-se considerar, entretanto, que 65% da atividade de  $^{99m}\text{Tc}$  MIBI presente no sedimento obtido da centrifugação pós-protease era passível de liberação para o compartimento do "sobrenadante II" após sucessivas manipulações e centrifugações de acordo com o protocolo. Na realidade, experimentos de controle demonstraram que três re-suspensões sucessivas do sedimento obtido após ação da protease em solução tampão II (sem substrato mitocondrial),

cada uma seguida de centrifugação (5000 x g por 5 minutos) resultaram na presença de somente 1% da atividade total de  $^{99m}\text{Tc}$  MIBI no sedimento final em comparação a 39% de atividade retida quando da ausência destas manipulações.

A correlação entre a presença de malato desidrogenase e a atividade de  $^{99m}\text{Tc}$  MIBI nas diversas frações subcelulares é ilustrada na Figura 5. Agregando-se a atividade associada a ambos os sobrenadantes (frações “citosólicas”) encontrou-se 91% (89% a 94%) do total de malato desidrogenase (n=4) e 88% (84% a 96%) do total de  $^{99m}\text{Tc}$  MIBI (n=4). Utilizando-se o teste de Mann-Whitney para amostras independentes, não houve diferença significativa para a presença da enzima quando comparado o modo de administração (bolus x infusão contínua). O teste de Wilcoxon para amostras relacionadas não demonstrou diferença significativa para a comparação fracional (MDH versus MIBI) (n=4).

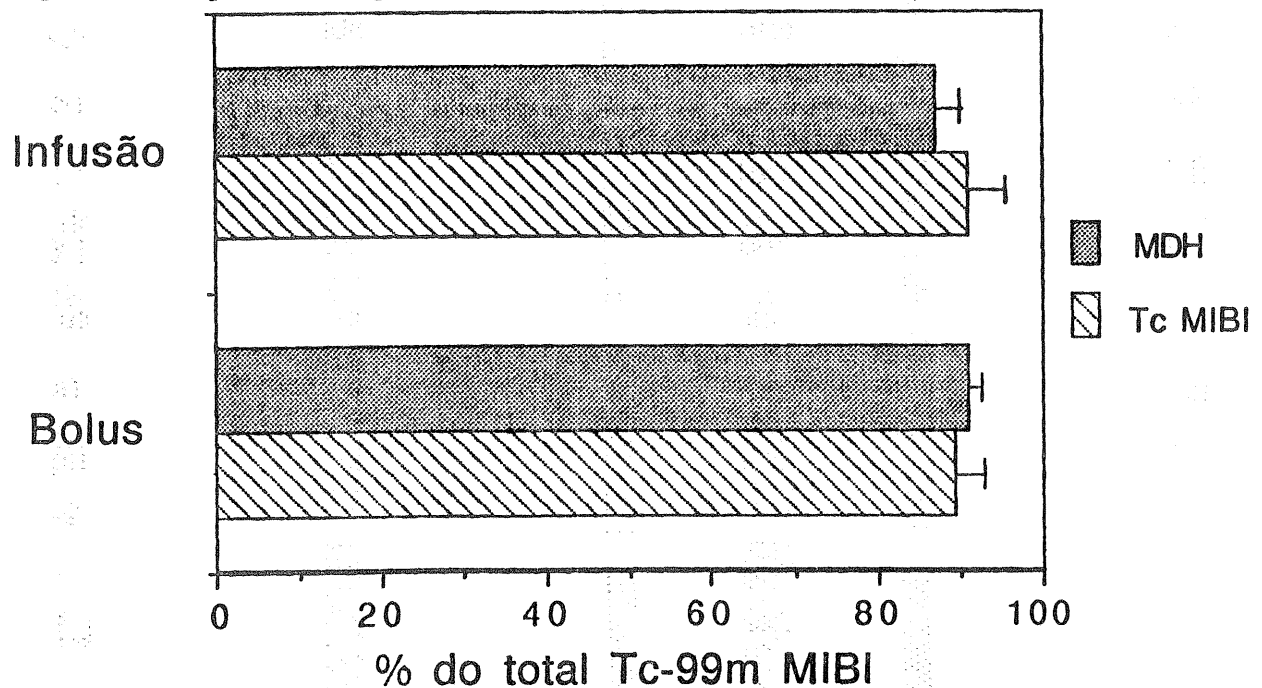


Figura 5. Correlação entre o conteúdo de malato desidrogenase (MDH) e  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI nas frações “citosólicas” obtidas a partir de corações de rato perfundidos. Os resultados estão expressos como percentual de atividade total recuperável do radiotraçador e da enzima em todas as frações utilizando-se o protocolo de infusão ou o de aplicação em “bolus”.

Com o objetivo de identificar a presença de mitocôndrias viáveis no sedimento das diferentes frações, induziu-se polarização substrato-específica da membrana mitocondrial com succinato (concentração final = 10 mM) e rotenona (concentração final = 1  $\mu$ M), adicionados ao filtrado antes da centrifugação (Figura 6). Dois protocolos foram utilizados:

1. Para os órgãos perfundidos com infusão contínua de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi, a adição de succinato/rotenona aumentou a quantidade de radiotraçador identificada no sedimento em 19% (n=5) em relação ao controle, diferença significativa ao utilizar-se o teste de Wilcoxon ( $p = 0.04$ ). Não houve diferença significativa entre a adição dos substratos ao filtrado imediatamente após o tratamento com protease ou nos passos seguintes do protocolo, ou seja, diretamente ao sobrenadante parcialmente purificado por duas centrifugações.
2. Para aqueles corações perfundidos sem a presença do radiotraçador, que foi adicionado "in vitro" ao filtrado após a ação da protease, succinato e rotenona aumentaram em 182% (n=8) a atividade  $^{99m}\text{Tc}$  MIBI associada ao sedimento em relação ao controle ( $p = 0.01$  - teste de Wilcoxon).

Ao combinar-se o aumento de atividade do traçador com a adição de substrato para todos os sedimentos de "fragmentos celulares" e para os "mitocondriais", houve aumento de 139% (n=11) e 24% (n=2), respectivamente, em relação ao controle (Figura 6). Portanto, após a adição de substrato mitocondrial, o aumento total da atividade do traçador em todos os sedimentos combinados

(n=13) foi de 119% (107% a 696%) ( $p = 0.01$  - teste de Wilcoxon para amostras relacionadas).

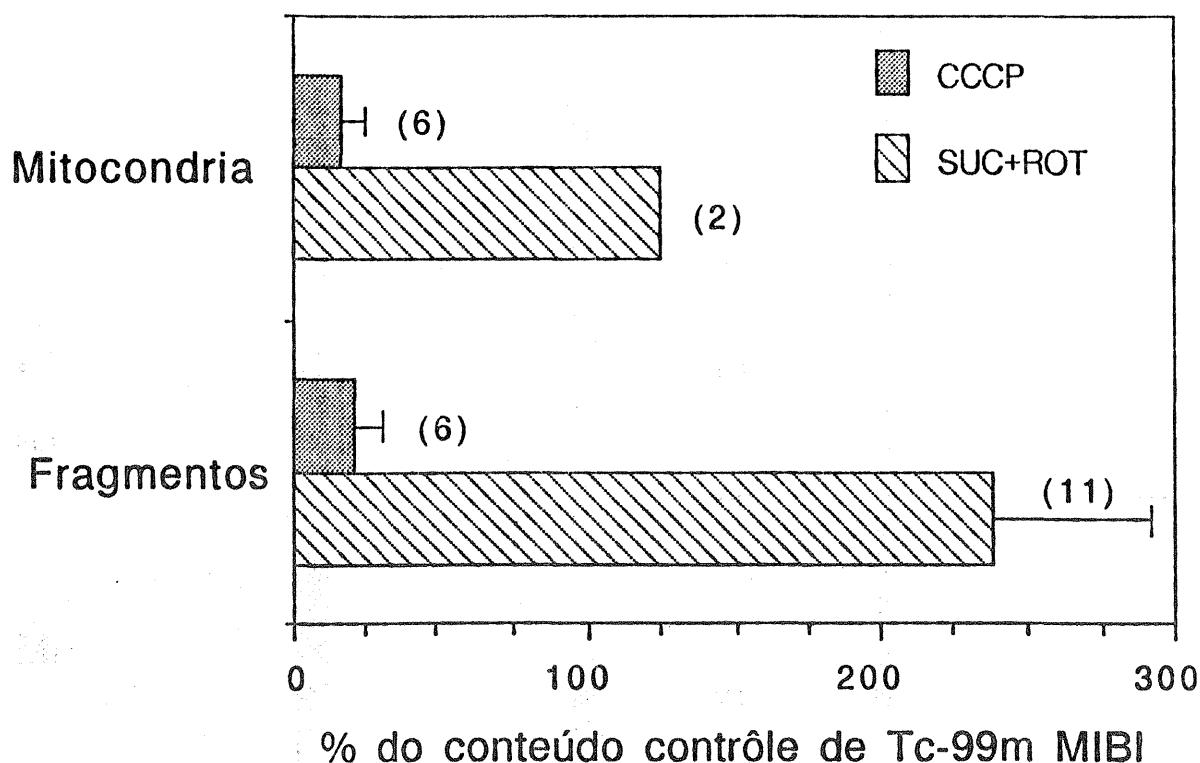


Figura 6. Efeitos do succinato (10 mM) mais rotenona (1  $\mu$ M) ou CCCP (5  $\mu$ M) sobre o conteúdo de <sup>99m</sup>Tc-MIBI nos sedimentos de "fragmentos celulares e "mitocondrial". Os resultados estão expressos como percentual de amostra pareada não tratada. Os números entre parênteses refletem o número de observações.

Já com o uso do desacoplador mitocondrial CCCP (concentração final de 5  $\mu$ M) adicionado ao sobrenadante "3 minutos pré-centrifugação" para obtenção das frações de fragmentos celulares e de mitocôndrias, houve redução de 20% (n=6) e 16% (n=6), respectivamente, na atividade de <sup>99m</sup>Tc MIBI em relação ao controle ( $p = 0.02$  utilizando-se o teste de Wilcoxon) (Figura 6). O teste de Mann-Whitney para amostras independentes mostrou não haver diferença significativa entre os protocolos - infusão contínua e injeção em bolus. Estes dados indi-

cam que, ao utilizar-se esta técnica de fracionamento celular, os sedimentos (fragmentos celulares e mitocôndrias) possuíam atividade de  $^{99m}\text{Tc}$  MIBI passível de liberação a partir do uso de CCCP, ou seja, ambos continham mitocôndrias viáveis.

#### 4.3.2 --- Análise da possível ligação protéica no citosol

Experimentos controle sobre a ultrafiltração de  $^{99m}\text{Tc}$  MIBI através de microconcentradores demonstraram que a maior parte da atividade atravessava os três filtros. Entretanto, uma quantidade substancial da atividade foi encontrada aderida ao material do filtro nos microconcentradores com limiar para 30 e 10 Kdaltons. Quando feita a comparação entre o  $^{99m}\text{Tc}$  MIBI controle obtido a partir de “kits” e o  $^{99m}\text{Tc}$  MIBI obtido do componente “citosólico” do homogeneizado de coração de rato, não houve diferença estatisticamente significativa neste intervalo de peso molecular (Tabela 2). Na realidade, somente  $7,6\% \pm 2,7\%$  da atividade citosólica foi encontrada em associação com a fração caracterizada como proteína ou biomoléculas maiores que 3 Kdaltons de peso molecular em comparação a  $5,0\% + 1,2\%$  nesta fração para o  $^{99m}\text{Tc}$  MIBI isolado<sup>55</sup>.

Tabela 2. Ultracentrifugação de coração de rato marcado “in vivo” com  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI: fração citosólica comparada ao complexo livre de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI

	<u>&gt;30K</u>	<u>Filtro</u>	<u>30K-10K</u>	<u>Filtro</u>	<u>10K-3K</u>	<u>Filtro</u>	<u>&lt;3K</u>
	(% atividade total)						
Coração de rato	$1,6 \pm 0,26$	$13,4 \pm 1,6$	$1,7 \pm 0,95$	$18,1 \pm 2,5$	$4,3 \pm 1,5$	$0,7 \pm 0,06$	$60,2 \pm 5,0$
$^{99m}\text{Tc}$ -MIBI	$0,9 \pm 0,18$	$18,9 \pm 3,0$	$1,1 \pm 0,23$	$17,3 \pm 1,8$	$3,0 \pm 0,78$	$0,6 \pm 0,14$	$58,2 \pm 4,5$

Valores são apresentados como o percentual da atividade total carregado em microconcentrado com maior limiar de peso molecular. Cada filtrado foi transferido para o próximo filtro com poros cada vez menores. Dados são fornecidos como a média  $\pm$  desvio padrão ( $n \geq 3$ ).

#### 4.4 --- DISCUSSÃO

A compreensão da biodistribuição de traçadores, tais como o agente perfusional miocárdico  $^{99m}\text{Tc}$  MIBI, é importante para utilização clínica apropriada dos mesmos. A técnica de cultura de miócitos de coração de embrião de galinha tem demonstrado ser um modelo celular eficaz e reprodutível para a avaliação de vários traçadores capazes de gerar imagens da perfusão miocárdica <sup>23</sup>. Estudos de fisiologia celular indicam que  $^{99m}\text{Tc}$  MIBI, um cátion modestamente lipofílico, é termodinamicamente seqüestrado pela mitocôndria de células viáveis devido à significativa diferença de potencial eletronegativo transmembrana em série existente entre o sarcolema e a membrana interna da mitocôndria <sup>14,24</sup>. Entretanto, estudos mais antigos, que utilizavam preparação de corações isolados e técnicas variadas de fracionamento por centrifugação diferencial, indicavam que a maior parte do  $^{99m}\text{Tc}$  MIBI estaria associada à fração "citosólica" <sup>13,47,48</sup>.

##### 4.4.1 --- Associação de $^{99m}\text{Tc}$ MIBI à mitocôndria em coração de mamíferos

O presente estudo comprova ser apenas aparente a localização citosólica de  $^{99m}\text{Tc}$  MIBI em corações íntegros e confirma que tal achado relaciona-se a artefato da técnica de homogeneização e fracionamento tissular, particularmente durante o processo de centrifugação. Diversos fatores indicam que, para o modelo experimental em mamíferos, a presença de  $^{99m}\text{Tc}$  MIBI associada à mitocôndria deixou de ocorrer durante o procedimento de centrifugação. Em primei-

ro lugar, aproximadamente 90% da ação da malato desidrogenase<sup>56</sup> (marcador so nível da matriz mitocondrial) ocorreu nas “frações citosólicas”, em correlação direta com a atividade de <sup>99m</sup>Tc MIBI. Tal fato indica lesão mitocondrial significativa durante o processo, a ponto de haver extravasamento do conteúdo enzimático a través da matriz mitocondrial interna. Em segundo lugar, houve aumento significativo da presença de <sup>99m</sup>Tc-MIBI nos sedimentos pós-centrifugação (tanto nos fragmentos celulares quanto no mitocondrial) quando da adição de substrato específico da respiração mitocondrial (succinato) <sup>56</sup> à solução tampão utilizada no fracionamento. Tal fato demonstra que, ao utilizar-se protocolo tecnicamente inadequado, existem mitocôndrias viáveis em ambos os tipos de sedimento, pois estas são capazes de repolarizar sua membrana interna aumentando a concentração do radiofármaco através de mecanismo potencial-dependente. Estes dados também indicam que a redução transitória do potencial de membrana devido à falta de substrato ou à redução da temperatura durante o fracionamento constituem-se em outros mecanismos para o deslocamento de <sup>99m</sup>Tc MIBI para a fração citosólica, independentes de lesão irreversível de membrana. Em terceiro lugar, a separação inadequada do sedimento de membrana celular com a presença de impurezas fica também confirmada pela queda significativa de contagens associadas ao sedimento a partir da adição de CCCP (desacoplador mitocondrial) <sup>56</sup>. E, por último, o aumento da velocidade de centrifugação para 15.000 x g provocou um incremento significativo da atividade do radiotraçador associado ao sedimento, demonstrando um seqüestro mitocondrial superior quando comparado ao obtido com 5.000 x g.

Se os dados obtidos através da técnica de fracionamento utilizada neste modelo mamífero forem correlacionados com os marcadores da integri-

dade mitocondrial, é possível aplicar-se um fator de correção para a atividade do radiofármaco em cada uma das frações subcelulares obtidas (Figura 7). Esta aná

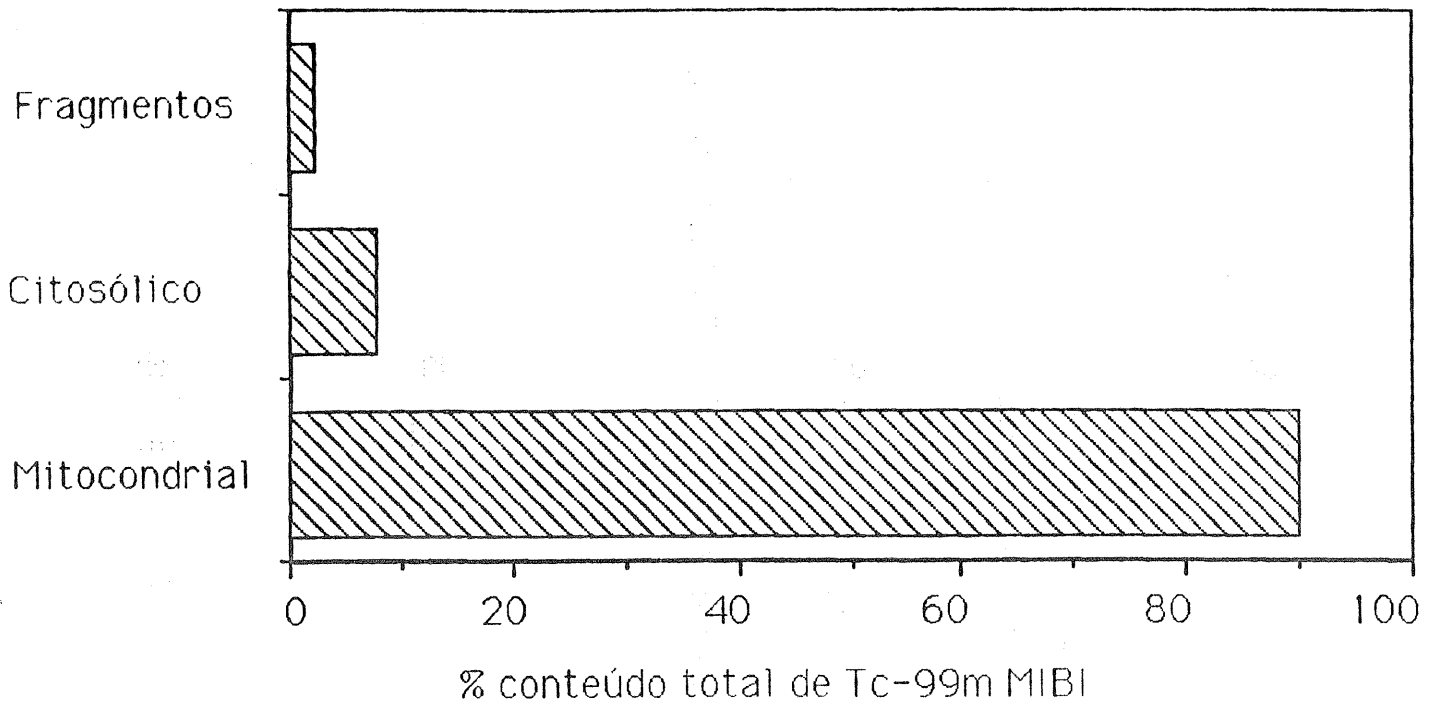


Figura 7. Distribuição fracionada corrigida de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI expressa como o percentual da atividade total obtida a partir de corações de rato perfundidos. O  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI associado à malato desidrogenase nos sobrenadantes I e II, ou aquele liberável através do tratamento dos sedimentos com CCCP foi designado à fração mitocondrial.  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI insensível à ação da CCCP no sedimento sem mitocôndrias foi designado a fragmentos e toda a atividade restante foi designada ao citosol. O fator de correção foi dado por:  
$$\text{Contagens/g por compartimento}_{\text{corr}} = (\text{contagem/g peso bruto}) - [(\text{contagem/ml})(\text{volume total de água})]$$
  
(ver página 40 deste manuscrito).

lise indicaria que aproximadamente 90% da atividade de  $^{99m}\text{Tc}$  MIBI está localizada na mitocôndria das células miocárdicas deste modelo em mamífero, dado este consistente com observações previamente obtidas em outros modelos experimentais (cultura de células miocárdicas de aves e células estudadas "in vitro").

A explicação alternativa para mecanismo de localização de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI baseado na sua ligação irreversível à proteína solúvel ou à biomolécula



cula não pode ser confirmada por este estudo. Embora alguma retenção de atividade de  $^{99m}\text{Tc}$  MIBI em homogeneizado cardíaco tenha sido observado com os instrumentos de ultracentrifugação Centricon, os resultados podem ser explicados pela adsorção hidrofóbica à membrana do filtro dos microconcentradores. Na verdade, mínimas diferenças de retenção entre a ultracentrifugação de  $^{99m}\text{Tc}$  MIBI proveniente de fração "citossólica" do miócito e de "kits" podem ser devidas a diferenças na taxa de filtração ou ligação competitiva de biomoléculas com a membrana. Além disto, a análise com HPLC forneceu indicação de que a atividade eluída a partir da coluna possuía grau de impureza  $< 5\%$ . Estes resultados dos estudos cromatográficos significam, entretanto, que se existe um conjugado  $^{99m}\text{Tc}$  MIBI-biomolécula "in vivo", este será, ou excepcionalmente lipofílico, o que não é consistente com conjugado solúvel encontrado no citosol, ou será uma interação excepcionalmente lábil que dissociaria produzindo um rápido "washout" do miócito, o que é contrário aos dados obtidos "in vivo". Conclui-se que a ligação irreversível à proteína citossólica não é mecanismo significativo para a localização de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI.

#### 4.4.2 --- Modelos correlatos e implicações clínicas

Dados obtidos com outros modelos experimentais em mamíferos, são consistentes com o modelo e as conclusões do presente estudo. Por exemplo, em estudo da reperfusão miocárdica a céu aberto em cães, lesão isquêmica severa produzida por oclusão da artéria coronária descendente anterior durante 3 horas, e seguida de reperfusão por 90 minutos, resultou na desvinculação do flu-

xo sangüíneo segmentar (medido através de microesferas) da captação de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI. O acúmulo deste radiotraçador foi cerca de 30% do valor correspondente ao fluxo sangüíneo pós-reperfusão <sup>57</sup>. Tal fato seria correlacionável a mecanismo dependente de energia para a localização mitocondrial deste radiofármaco. Resultados similares foram observados em suínos <sup>58</sup>. Em coração de rato perfundido pelo sistema de Langendorff, a inibição da fosforilação oxidativa ou a lise de membranas reduz a captação líquida e aumenta a depuração de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi <sup>29</sup>, enquanto em cortes de coração de cobaio incubados em condições hipóxicas há menor acúmulo de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi quando comparado a controle <sup>13</sup>. Portanto, em geral, uma parte significativa do acúmulo deste traçador parece depender do estado metabólico. Além disto, dados preliminares obtidos através da otimização da técnica de centrifugação diferencial aplicada a corações de cobaia com fornecimento de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi "in vivo", indicam que > 90% de atividade é encontrada na fração mitocondrial de forma substrato-dependente <sup>59</sup>.

Em condições de equilíbrio, na presença de concentração extracelular constante de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi, o potencial negativo do sarcolema pré-concentra este traçador no citosol em aproximadamente 5 vezes em relação ao espaço extracelular; as mitocondrias são então capazes de concentrar ainda mais  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi, até 300 vezes em relação ao citosol <sup>14,56</sup>. Este é resultado do metabolismo intermediário de substratos (ácidos graxos, glicose, piruvato) que fornecem equivalentes redutores aos citocromos mitocondriais de transferência de elétrons <sup>56</sup>. O depósito bioenergético final para o  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi é fornecido pelos potenciais negativos da membrana mitocondrial interna gerados pela translocação de prótons para fora da matriz durante transferência de elétrons (hipótese próton-

motriz).

Portanto, para uso clínico, estes dados sugerem que o  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi é um agente perfusional capaz de avaliar a viabilidade miocárdica. Estas propriedades talvez possam ser melhor exploradas durante a avaliação pós-reperfusão, quando o acúmulo deste traçador refletiria a viabilidade miocárdica sob condições de avaliação independente do reestabelecimento do fluxo sanguíneo (angiografia). Na presença de lesão miocelular pós-isquêmica severa, há queda tanto do potencial do sarcolema quanto da mitocôndria (despolarização) conseqüente ao desarranjo metabólico e à ruptura de membranas, levando à diminuição da força que leva ao acúmulo de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi. O acúmulo miocárdico deste traçador poderia servir como sonda não invasiva de "fóton único" para a bioenergética tissular, objetivando, especificamente, a avaliação do estado dos potenciais de membrana. Isolado ou em combinação com outros traçadores,  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi poderia monitorizar a presença de lesão severa, possivelmente irreversível <sup>28</sup>. Como a energética mitocondrial é um aspecto fundamental para uma variedade de insultos tissulares além da isquemia (tóxicos, quimioterápicos, actínicos), há razões para acreditar-se que estes princípios sejam também aplicáveis a outros tecidos capazes de acumular  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi (músculo esquelético, fígado, rins e uma variedade de tumores).

#### 4.5 --- CONCLUSÃO

Em resumo, quando se correlaciona o fracionamento de marcador do conteúdo mitocondrial com a distribuição de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi, este agente

pode ser localizado no compartimento mitocondrial. Não há evidência de ligação "in vivo" com proteínas citosólicas. Estes dados estendem ao miocárdio de mamíferos resultados "in vitro" previamente obtidos em cultura de células. Deve-se ter cautela ao utilizar técnicas de fracionamento tissular para localizar radiofármacos difusíveis com mecanismo de seqüestro energia-dependente.

**5- UTILIZAÇÃO DE  $^{99m}\text{Tc}$ -SESTAMIBI NA AVALIAÇÃO  
DA PERFUSÃO MIOCÁRDICA PÓS-ANGIOPLASTIA  
CORONARIANA**

---

## 5.1 --- INTRODUÇÃO

A angioplastia coronariana transluminal percutânea (ACTP) foi introduzida em 1977 como opção para o tratamento de coronariopatia <sup>60-62</sup>. Embora a incidência de complicações agudas após a ACTP tenha diminuído com o aumento da experiência e melhorias técnicas, a incidência de reestenose 3 a 6 meses após este procedimento permanece em torno de 30%, mesmo com o uso de agentes antitrombóticos, anticoagulantes, antagonistas do Ca<sup>++</sup>, dieta suplementar com óleo de peixe ou, ainda, novas tecnologias com laser e cateteres <sup>63</sup>. O aumento da probabilidade de reestenose tem sido ligado a fatores de risco como angina instável, diabetes mellitus, dilatação da artéria coronária descendente anterior, severidade da lesão pré-dilatação, dissecação extensa e dimensão de estenose residual <sup>64,65</sup>. A incidência relativamente alta de re-estenose e a possibilidade de sua prevenção <sup>67</sup> dão ênfase a método não-invasivo capaz de identificar precocemente e permitir o seguimento de pacientes sob risco.

Vários testes não-invasivos como o eletrocardiograma de esforço, a ventriculografia radioisotópica e os estudos da perfusão miocárdica com <sup>201</sup>Tálio têm sido utilizados na identificação e na previsão de reestenose <sup>67-69</sup>. Como a cineangiocoronariografia realizada logo após a dilatação coronariana pode subestimar o significado funcional de estenose residual, estes testes não-invasivos podem desempenhar um papel complementar importante logo após a dilatação coronariana, estabelecendo padrão de reperfusão basal para o seguimento <sup>70</sup>.

Recentemente, complexos de <sup>99m</sup>Tc-isonitrila como o <sup>99m</sup>Tc-

sestamibi (hexakis [metoxiisobutil isonitrila] tecnécio [I]) foram introduzidos como traçadores da perfusão miocárdica <sup>46,71,72</sup>. Devido à sua depuração mais lenta, à melhores propriedades para obtenção de imagens, à menor exposição do paciente à radiação e à cinética celular distinta, este traçador apresenta vantagens quando comparado ao <sup>201</sup>Tálio para avaliação da reperfusão miocárdica <sup>4,73,74</sup>. Como a “redistribuição” deste novo agente perfusional lipofílico é muito menor que a do <sup>201</sup>Tálio <sup>74</sup>, o <sup>99m</sup>Tc-MIBI pode ser utilizado como potencial complemento à angiografia para avaliar o significado funcional da lesão coronariana imediatamente antes da angioplastia.

O objetivo do presente estudo foi o de avaliar a utilidade deste novo traçador da perfusão miocárdica utilizando-se a tomografia por emissão de fóton único (“Single Photon Emission Computed Tomography - SPECT”) para estimar a redução da quantidade de miocárdio “sob risco” imediatamente após a ACTP.

## 5.2 --- MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 --- Pacientes

Quinze pacientes com angina estável e lesão significativa (estenose maior que 70%) em um ou mais vasos epicárdicos foram incluídos seqüencialmente no presente estudo, sendo quatorze destes submetidos à angioplastia de um vaso e somente um ao tratamento de dois vasos. O esquema terapêutico anti-anginoso foi mantido em todos os indivíduos e incluía uma combinação de beta-

bloqueadores, nitrato e antagonistas do Ca<sup>++</sup>. Um paciente estava recebendo digoxina. Todos os pacientes consentiram, por escrito, em participar do presente estudo e foram submetidos à angioplastia coronariana entre agosto de 1988 e fevereiro de 1989.

### 5.2.2 --- Estímulo com marca-passo e injeção de <sup>99m</sup>Tc-MIBI

Após a canulação da artéria e veia femorais à esquerda, um cabo de marca-passo bipolar transvenoso (5F) foi posicionado sob fluoroscopia em nível do ápice do ventrículo direito (n=6) ou no átrio direito (n=9). Iniciou-se incremento progressivo da frequência cardíaca até alcançar-se 85% da frequência máxima prevista para a faixa etária (220 - idade), ou até o surgimento de dor anginosa, ou ainda, até o surgimento de alterações eletrocardiográficas indicativas de isquemia (infra-desnívelamento do segmento ST > 1 mm a 0.08 segundos após o ponto J) (Tabela 3). Neste momento, foram injetados por via endovenosa perifé

Tabela 3 - Indução de isquemia miocárdica com marca-passo temporário (MPT)

Paciente	MPT	FC		Angina		Alterações ECG	
		1º Dia / 2º Dia	1º Dia / 2º Dia	1º Dia / 2º Dia	1º Dia / 2º Dia		
1	Atrial	155 / 150	+ / ±	+ / -			
2	Atrial	155 / 155	+ / +	+ / +			
3	Ventr.	132 / 130	+ / -	- - - - -			
4	Ventr.	150 / 150	+ / -	- - - - -			
5	Atrial	140 / 140	+ / -	+ / -			
6	Atrial	100 / 100	+ / -	+ / -			
7	Ventr.	130 / 130	+ / ±	- - - - -			
8	Atrial	150 / 150	+ / -	+ / -			
9	Atrial	130 / 130	+ / -	+ / -			

FC= frequência cardíaca; (±) indica desconforto ou sensação de pressão ao nível da região precordial; (+) positivo ou (-) para dor anginosa ou alterações isquêmicas eletrocardiográficas.



rica 740 MBq de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI (Cardiolite<sup>®</sup>, Du Pont Diagnostic Division, N. Billerica, MA, Estados Unidos). O estímulo com marcapasso foi mantido durante um a dois minutos pós-injeção do radiofármaco. A seguir realizou-se a angioplastia coronariana, porém não sem antes confirmar-se o retorno ao estado basal, sem evidência de isquemia miocárdica (em média 10 minutos após a cessação do estímulo). O estudo tomográfico por emissão (SPECT) foi obtido 2 a 3 horas após a angioplastia (1<sup>o</sup> Dia). Dos quinze pacientes injetados imediatamente antes da angioplastia coronariana, somente onze apresentavam-se clinicamente estáveis para submeterem-se à tomografia por emissão e, destes, dois foram excluídos do estudo por ter-se comprovado a presença de infarto miocárdico prévio. Para os nove pacientes em condições de completar o estudo (Tabela 4), o cabo do marca-passo foi mantido até o dia seguinte (16 a 20 horas pós-injeção), quando novo estímulo foi induzido, repetindo a frequência cardíaca obtida no dia anterior. Nova dose de 740 MBq de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI foi injetada por via endovenosa e segundo SPECT foi obtido obedecendo ao mesmo intervalo de tempo entre injeção e imagem (2<sup>o</sup> Dia).

### 5.2.3 --- Imagens de SPECT e sua quantificação

Os estudos de SPECT foram obtidos através de sistema Starcam 400/AC (General Electric Medical Systems, Milwaukee, WI, Estados Unidos da América). Para adquirir 64 imagens (10 segundos/imagem) em 180<sup>o</sup> (45<sup>o</sup> oblíquo anterior direito a 135<sup>o</sup> oblíquo posterior esquerdo) foi utilizado colimador de baixa energia, propósito geral e os dados foram armazenados em matriz de 64 x 64 pixels e filtrados com filtro de Ramp-Hanning (frequência de corte 0,5 ciclos/

centímetro). Cortes tomográficos transaxiais foram gerados através de técnica padrão de retroprojeção e as múltiplas aquisições de diferentes estudos para o mesmo paciente foram pareadas através de “software” para reconstrução oblíqua que geravam cortes tomográficos anatomicamente comparáveis dos eixos curto e longos do ventrículo esquerdo. Os cortes tomográficos dos eixos curto, longo vertical e longo horizontal possuíam espessura de 1 pixel (tamanho do pixel = 0,63 cm). Os cortes tomográficos do eixo curto com defeito perfusional máximo e o corte longo vertical médio do ventrículo esquerdo foram utilizados para identificar e quantificar a captação miocárdica de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI. Para ambos os estudos tomográficos de cada paciente, foram geradas duas regiões de interesse com aproximadamente 9 pixels de área, uma sobre a região com defeito perfusional e a outra sobre segmento normalmente perfundido como demonstrado pelos cortes do eixo curto do ventrículo esquerdo. O corte tomográfico central do eixo vertical longo foi utilizado para a avaliação perfusional do ápice do ventrículo esquerdo, evitando desta forma, a interferência de “efeito de volume parcial” sobre a determinação da atividade/pixel. Pelo mesmo motivo, cortes tomográficos do eixo curto correspondentes à base e ao ápice do ventrículo esquerdo foram excluídos da análise quantitativa. A densidade de contagens (número médio de contagens/pixel) em cada região de interesse foi “normalizada” à região com máxima densidade de contagens em todo o ventrículo e dispostas em forma de gráfico em função do corte tomográfico correspondente, do ápice para a base.

#### 5.2.4 --- Reavaliação dos pacientes

Os pacientes incluídos neste estudo foram reavaliados através de angiografia coronariana (n=4), cintilografia miocárdica com  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI (n=2) e, clinicamente, através de questionário (n=9) até sete meses após a angioplastia coronariana.

#### 5.2.5 --- Análise estatística

A mediana e os valores mínimos e máximos da densidade de contagem das diversas regiões dos segmentos isquêmicos e normoperfundidos (segmentos controle) do ventrículo esquerdo foram utilizadas na avaliação das diferenças de captação de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI pré e pós-angioplastia coronariana.

O teste de Wilcoxon foi utilizado na comparação entre o curso sintomático e assintomático dos pacientes após angioplastia e um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

### 5.3 --- RESULTADOS

#### 5.3.1 --- Pacientes estudados

Nove pacientes (7 homens e 2 mulheres) com média de idade igual a 66 anos (intervalo de 49 a 71 anos) foram incluídos no estudo. Todos esta-

vam clinicamente estáveis e não possuíam evidencia de infarto miocárdico prévio. O início de angina variou de 1 a 84 meses antes da angioplastia e todos apresentavam doença coronariana significativa à cineangiocoronariografia. Em todos os pacientes, a angioplastia foi considerada exitosa com uma redução  $\geq 30\%$  da estenose, abaixo de 50% residual. Os dados demográficos, os estudos funcionais, os resultados angiográficos e o seguimento dos pacientes estão descritos na Tabela 4.

### 5.3.2 --- Seguimento angiográfico e clínico

Em três dos quatro pacientes com recorrência de angina, reestenose ao nível da lesão dilatada foi angiograficamente demonstrada dois dias, três e quatro meses após a angioplastia (nº 2, 1 e 7, respectivamente - Tabela 4). O

Tabela 4 - Dados demográficos, radiológicos e clínicos dos pacientes estudados

Paciente	Idade	Sexo	Classe NYHA	ECG/TEE Pré/Pós*	ANGIOGRAFIA				ANGIOPLASTIA		AVAL. CLINICA
					DA	Cx	ACD	FE%	Vaso Tratado		
1	59	M	III	+ / +	CABG	N	90%	59	ACD	90-40%	A / R
2	69	M	II	+ / NR	70%	N	80%	58	ACD	80-50%	A / R
3	71	M	II	+ / NR	80%	70%	N	69	DA Cx	80-40% 70-40%	A / P
4	57	M	III	+ / NR	N	90%	N	85	Cx	99-30%	C / -
5	67	F	III	+ / -	90%	N	70%	90	DA	90-40%	C / -
6	49	M	II	+ / -	99%	N	N	80	DA	99-40%	Tc/N
7	61	M	II	+ / NR	95%	N	N	NR	DA	95-50%	A / R
8	49	M	II	+ / NR	70%	N	N	NR	DA	70-20%	C / -
9	65	F	II	+ / -	50%	40%	90%	88	ACD	90-30%	Tc/An

Pré/Pós - antes e após angioplastia; NYHA - New York Heart Association; ECG/TEE - eletrocardiograma/teste ergométrico em esteira; DA - artéria coronaria descendente anterior; Cx - artéria circunflexa; ACD - artéria coronaria direita; FE - fração de ejeção do VE; NR - não realizado; N - normal; An - anormal; A - angiografia; Tc - teste ergométrico em esteira com avaliação da perfusão miocárdica com  $^{99m}\text{Tc}$  MIBI; P - patente; R - restenose; C - seguimento clínico; (+) recorrência de angina; (-) assintomático; CABG - cirurgia de revascularização.

quarto paciente (nº 3 - Tabela 4) apresentou dor precordial três meses após o tratamento, porém os vasos tratados permaneciam patentes ao estudo angiográfico.

Uma paciente com queixa de desconforto precordial, porém sem alterações eletrocardiográficas ao teste de esforço, apresentou captação anormal de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi sugestiva de isquemia persistente no território do vaso tratado (ACD), sete meses após a angioplastia coronariana (paciente nº 3 - Tabela 4).

Os demais pacientes (nº 4, 5, 6 e 8 - Tabela 4) permaneceram assintomáticos até a reavaliação, sete meses após o tratamento. Destes, somente o paciente nº 6 foi submetido a seguimento com teste de esforço e nova avaliação da perfusão miocárdica com  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi, sem evidência de isquemia ao eletrocardiograma ou ao estudo radioisotópico.

### 5.3.3 --- Análise das imagens tomográficas

A análise visual das imagens correspondentes ao eixo curto do ventrículo esquerdo demonstrou defeitos de perfusão inequívocos em 10/12 segmentos com lesão significativa pré-angioplastia, e evidente reperfusão em 7/10 territórios vasculares tratados. A avaliação quantitativa regional da captação de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI normalizada à atividade máxima do ventrículo está descrita na Tabela 4.

A atividade do radiotraçador em segmentos supridos por artérias angiograficamente normais foram utilizados como controle na demonstração das alterações perfusionais pós-tratamento. A captação relativa destes segmentos (n=9) foi de 94% (92% a 96%) pré-angioplastia e 94% (91% a 98%) pós-an-

gioplastia (p=NS). Quatro pacientes assintomáticos ao seguimento (nº 4, 5, 6 e 8 - Tabela 4) e um paciente com recidiva de dor precordial pós-angioplastia, porém sem re-estenose à angiografia (paciente nº 3 - Tabela 4) apresentaram captação relativa de 61% (46% a 68%) pré-angioplastia e 73% (61% a 80%) pós-angioplastia para os segmentos tratados (n=6) (p<0.02). Imagens representativas deste grupo encontram-se dispostas nas Figura 8. Três pacientes com evidência angiográfica de re-estenose (pacientes nº 1, 2 e 7 - Tabela 4) e um com isquemia miocárdica persistente ao teste ergométrico com <sup>99m</sup>Tc-MIBI (paciente nº 9 -Tabela 4) apresentaram captação relativa de 72% (69% a 76%) pré-angioplastia e de 73% (70% a 76%) pós-angioplastia para os segmentos tratados (n=4) (p=NS). Imagens representativas deste grupo encontram-se na Figura 9.

A redução média da estenose foi similar para os dois grupos (sintomático e assintomático ao seguimento) (Tabela 5).

Tabela 5 - Captação segmentar de <sup>99m</sup>Tc MIBI normalizada à captação máxima no VE (mediana e valores mínimos e máximos)

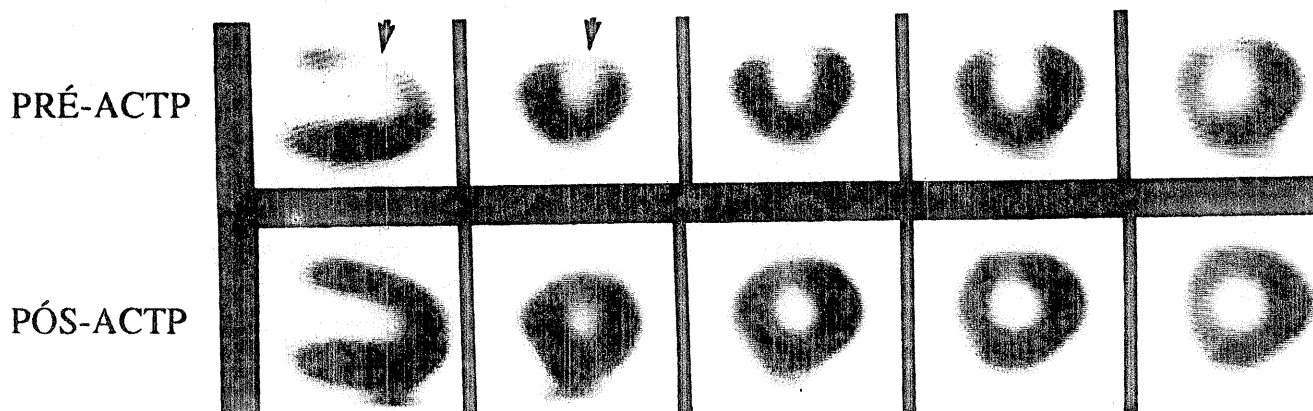
Segmentos	1º Dia (pré-AC)		2º Dia (pós-AC)	Média de Redução da Lesão	Melhora na Captação Pós-AC*
Contrôle (n=9 segm.)	9 4% (92 - 96)	* *	9 4% (91 - 98)	- - - -	- - - -
Assintomáticos (n=6 segm.)	6 1% (46 - 68)	* * *	7 3% (61 - 80)	4 2%	6 / 6
Sintomáticos (n=4 segm.)	7 2% (69 - 76)	* *	7 3% (70 - 76)	4 8%	1 / 4

\* análise visual das imagens

\*\* p = não significativo (NS)

\*\*\* p < 0.02

A



B

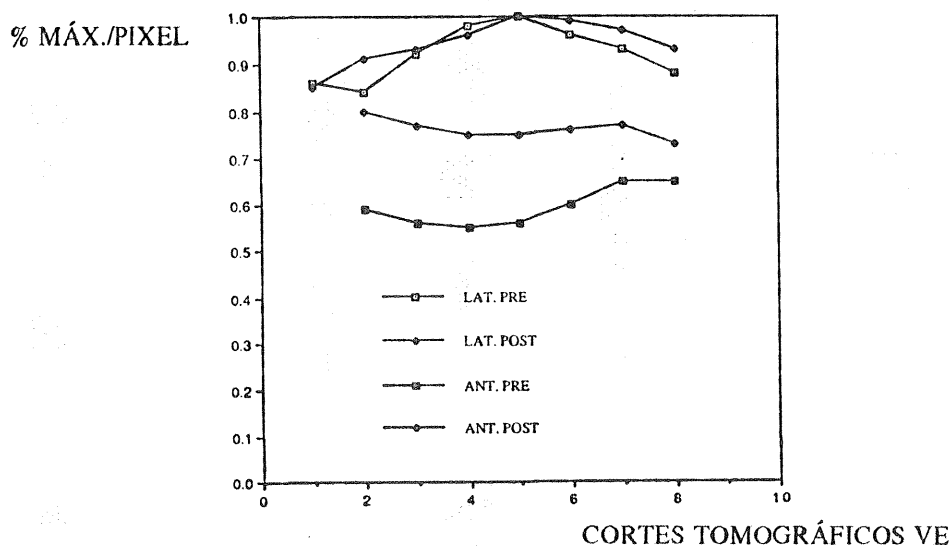


Figura 8. Cortes tomográficos do eixo vertical longo e eixo curto do ápice para a base do ventrículo esquerdo (A) e perfis segmentares longitudinais da captação miocárdica relativa de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI (B) em paciente assintomático até 7 meses após angioplastia coronariana. Os cortes pré-ACTP demonstram déficit perfusional do segmento anterior (setas) do ventrículo esquerdo (estenose de 90% da artéria coronária descendente anterior), enquanto, as imagens tomográficas pós-ACTP demonstram melhora significativa da captação e retenção do traçador (lesão residual de 40%). Os perfis longitudinais segmentares não demonstram alteração significativa da captação relativa de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI para o segmento lateral, enquanto há significativo aumento da atividade no segmento anterior.

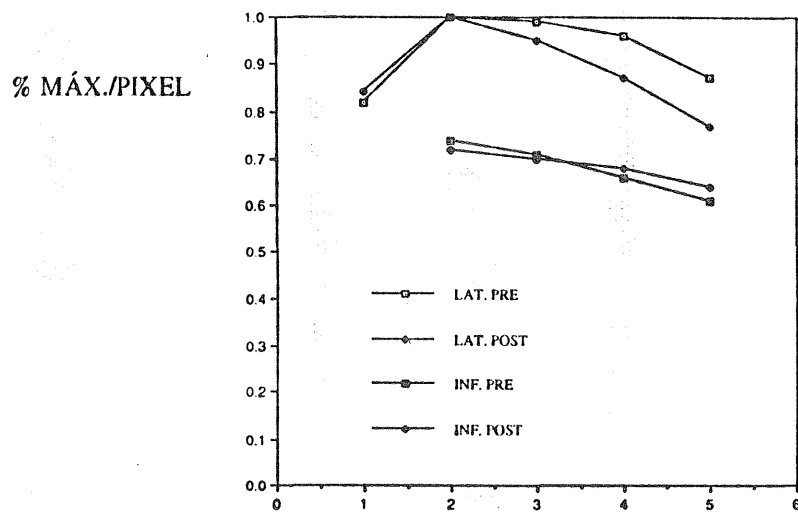
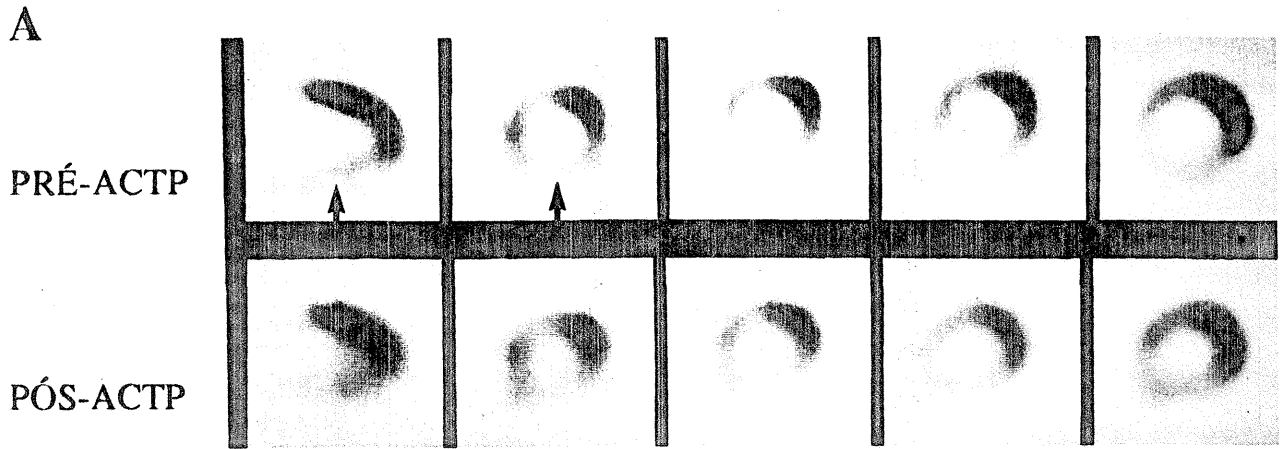


Figura 9. Cortes tomográficos do eixo vertical longo e eixo curto do ápice para a base do ventrículo esquerdo (A) e perfis segmentares longitudinais da captação miocárdica relativa de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI (B) em paciente com dor torácica recorrente e isquemia persistente demonstrada através de teste ergométrico e SPECT com  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI 7 meses após angioplastia coronariana. Os cortes pré-ACTP demonstram déficit perfusional do segmento inferior (setas) do ventrículo esquerdo (estenose de 90% da artéria coronária direita) e anormalidade menos intensa em região ântero-septal (estenose de 50% da artéria coronária descendente anterior). As imagens tomográficas pós-ACTP demonstram que não há melhora significativa da captação e retenção do traçador, embora a lesão residual da artéria coronária direita seja de 30%. Os perfis longitudinais segmentares da atividade em ventrículo esquerdo demonstram graficamente que não há alteração significativa da captação relativa de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI para os segmento inferior antes e após ACTP.



Ao analisar-se a variação percentual relativa na captação de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI para cada um dos segmentos tratados, antes e após angioplastia, há evidente melhora da captação para o grupo assintomático ou com ausência de re-estenose à angiografia (Figura 10). Neste grupo, o paciente cuja captação variou menos após a angioplastia (Figura 10 - seta) era diabético grave e negou-se ao seguimento angiográfico ou ao teste de esforço e SPECT com  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI, tendo permanecido assintomático durante os 7 meses de seguimento não podendo, portanto, ser afastada a presença de re-estenose silenciosa.

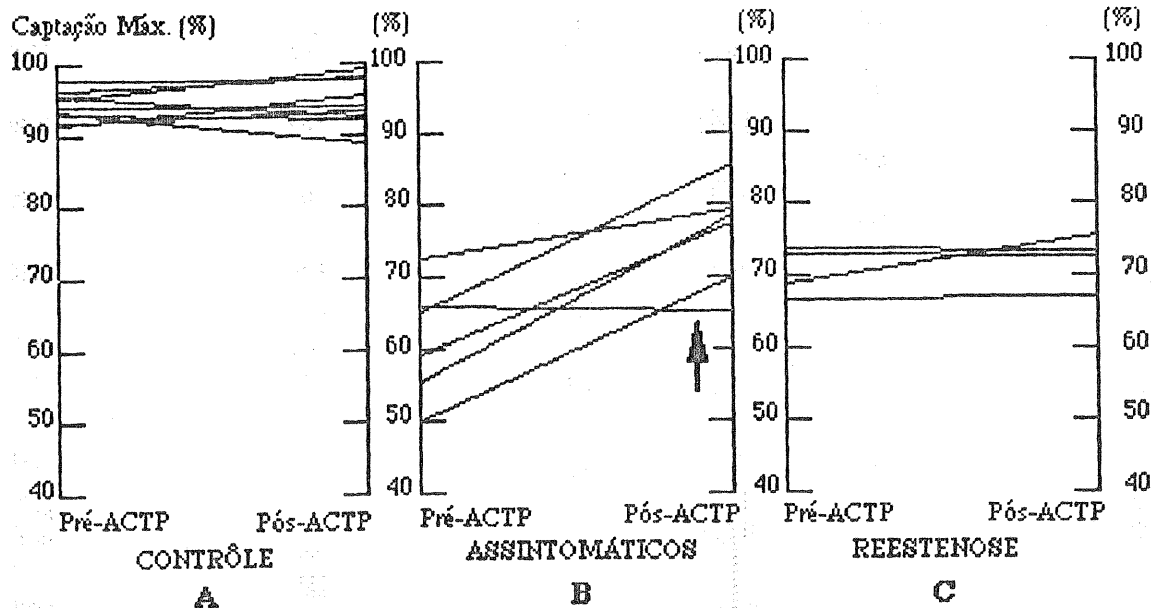


Figura 10. Captação relativa de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI para cada segmento estudado, antes e após angioplastia. (A) Segmentos com vasos angiograficamente normais (n=9). (B) Segmentos com vasos tratados com êxito em pacientes assintomáticos até 7 meses após ACTP (n=4) e com dor torácica recorrente, porém com vasos pèrvios à angiografia (n=2). O segmento identificado por seta pertence a paciente com diabetes melito severo, assintomático, não sendo possível excluir isquemia silenciosa. (C) Segmentos com vasos tratados com êxito em pacientes com angina recorrente ou evidência de isquemia persistente até 7 meses.

## 5.4 --- DISCUSSÃO

A angiografia coronariana <sup>76,77</sup> e a cintilografia miocárdica perfusional com <sup>201</sup>Tálio <sup>78-80</sup> têm sido utilizados na avaliação, a curto e a longo prazo, dos resultados da angioplastia coronariana. Aproximadamente 30% dos pacientes apresentam re-estenose da lesão tratada 3 a 6 meses após o procedimento. Nobuyoshi et alli. <sup>81</sup> demonstraram que há evidência angiográfica de re-estenose em 14,6% dos pacientes submetidos à angioplastia coronariana já nas primeiras 24 horas após a angioplastia considerada exitosa e que a taxa de reestenose aumenta marcadamente entre 1 e 3 meses após este procedimento, com aumento modesto após 90 dias. O presente estudo sugere que o uso do SPECT miocárdico com <sup>99m</sup>Tc-sestamibi, obtido de 16 a 20 horas após a angioplastia coronariana em segmentos não infartados, é útil na avaliação da quantidade de miocárdio “sob risco” imediatamente após a dilatação coronariana, correlacionando-se, possivelmente, com o seu resultado clínico. Pacientes com reestenose demonstrada angiograficamente (n=3) ou com isquemia demonstrada ao teste ergométrico e SPECT com <sup>99m</sup>Tc-MIBI (n=1) apresentaram uma diferença média de aproximadamente 2% da captação miocárdica pré e pós-angioplastia ( $P = NS$ ). Já, os pacientes que, ao contrário, não apresentaram recorrência de angina (n=4) ou que apresentou dor torácica com estudo angiográfico demonstrando patência do vaso dilatado (n=1) exibiram aumento médio de 15% da captação miocárdica pós-angioplastia ( $P < 0,02$ ). Entretanto, como somente 2/5 dos pacientes assintomáticos no seguimento obtiveram documentação por imagem da patência do vaso tratado, é possível que

possa ter existido re-estenose “silenciosa” não detectada em 3 dos 5 pacientes. Conseqüentemente, re-estenose “silenciosa” ou mesmo hiperemia reativa podem ter influenciado estes resultados preliminares.

Diferentes motivos podem explicar a ausência de melhora da perfusão miocárdica demonstrada por  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI para o grupo de pacientes submetidos à angioplastia exitosa. Inicialmente, é possível que tenha ocorrido reestenose durante o intervalo de 16 a 20 horas entre os estudos de SPECT pré e pós-angioplastia. Isto, entretanto, é pouco provável uma vez que 3 dos 4 pacientes que não apresentaram melhora da perfusão ao estudo cintilográfico estavam assintomáticos e sem alterações eletrocardiográficas que sugerissem isquemia durante a estimulação com marca-passo durante o estudo do Dia 2. O quarto paciente (paciente 2) apresentou dor torácica persistente e alterações eletrocardiográficas indicativas de isquemia com estudo angiográfico feito 48 horas após a angioplastia que demonstrou reestenose do vaso tratado (Tabelas 3 & 4). Em segundo lugar, um possível déficit de fluxo sanguíneo distalmente à lesão dilatada com diminuição da convexão de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI poderia explicar a melhora da perfusão neste grupo de pacientes. De acordo com Wilson et alli.<sup>82</sup> aproximadamente 50% dos pacientes submetidos à angioplastia coronariana apresentam redução transitória da reserva coronariana imediatamente após a angioplastia, que normaliza-se na ausência de re-estenose. Tal redução do fluxo de reserva coronariano distal à lesão dilatada poderia levar à redução da convexão do  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI precocemente após a angioplastia exitosa. A captação miocárdica de cloreto de  $^{201}\text{Tálio}$ , também um agente perfusional miocárdico, correlaciona-se com o fluxo de reserva coronariana em pacientes com coronariopatia significativa submetidos à angioplastia<sup>83</sup> e que de-

monstraram anormalidade persistente do fluxo coronariano apesar da resolução da lesão epicárdica. Conseqüentemente, pacientes que demonstram melhora parcial da captação miocárdica de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI imediatamente após a angioplastia podem evidenciar, mais tarde, melhora adicional da captação, presumindo-se que haja uma relação direta entre a captação deste radiotraçador e o fluxo de reserva coronariano. Para o presente estudo, entretanto, os pacientes que apresentaram re-estenose não obtiveram melhora parcial da captação de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI, mas sim defeito perfusional inalterado após a angioplastia.

Em estudo recente por Pellikka et ali <sup>84</sup>,  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI foi utilizado na avaliação inicial das alterações da perfusão miocárdica 18 a 48 horas e 6 a 14 dias após tratamento do infarto agudo do miocárdio com trombolíticos. Neste estudo, somente 6 pacientes apresentaram melhora parcial da perfusão miocárdica no período de 6 a 48 horas, melhora esta que tornou-se máxima no estudo de 6 a 14 dias após o tratamento. Esta resposta mais lenta da captação do  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI à reperfusão, possivelmente relaciona-se ao grau de atordoamento miocárdico peri-infarto com diminuição do transporte transmembrana deste cátion lipofílico. Isto foi demonstrado recentemente em estudo com miócitos ventriculares de embrião de galinha em cultura nos quais a captação de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI diminuiu durante componente mais tardio da lesão miocárdica <sup>14</sup>.

No presente estudo, a avaliação angiográfica provavelmente superestimou a verdadeira melhora do fluxo coronariano para aqueles pacientes sem melhora da captação de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI e que apresentaram reestenose documentada. Este mesmo grupo de pacientes apresentou captação média de 71% do segmento em questão em relação à captação máxima do ventrículo esquerdo, enquan-

to o grupo assintomático após a angioplastia apresentou captação segmentar de 61% da captação máxima do ventrículo, sugerindo que o primeiro grupo apresentava doença mais extensa ou que houvesse sido submetido a estresse submáximo com estímulo por marca-passo. Esta última hipótese pode ser descartada uma vez que a efetividade do estímulo com marca-passo foi comprovada pela indução de angina ou alterações eletrocardiográficas que foram revertidas antes da angioplastia. A extensão da doença, entretanto, não pode ser completamente avaliada pois a presença da “doença de pequenos vasos” pode causar uma diminuição difusa da captação miocárdica de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI, especialmente no segmento “controle”, aumentando a captação relativa dos segmentos tratados.

## 5.5 --- CONCLUSÃO

Os presentes achados sugerem que o SPECT com  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI pode ser complementar ao estudo angiográfico na avaliação dos benefícios iniciais da reperfusão miocárdica, mas estudos adicionais são necessários para estabelecer o valor prognóstico deste radiotraçador para este grupo selecionado de pacientes.

## 6--- DISCUSSÃO GERAL

---

A doença coronariana é uma das principais causas de morte em países industrializados, sendo que em 1989 foram registrados cerca de 1,5 milhões de casos de infarto agudo do miocárdio nos Estados Unidos da América <sup>85</sup>, sendo responsável por aproximadamente 36% dos óbitos nas principais capitais do Brasil <sup>88</sup>. A revascularização miocárdica na coronariopatia crônica e aguda faz com que surja a necessidade de identificar-se a extensão da isquemia miocárdica e de estabelecer-se a presença de miocárdio viável, para que, em associação a dados referentes à anatomia coronariana, função ventricular, idade biológica e doenças associadas, seja prescrito o melhor tratamento. Através do armamentário diagnóstico disponível à moderna Cardiologia, o tratamento prescrito deve ser avaliado quanto à sua efetividade em reperfundir o miocárdio e preservar ou melhorar a função ventricular.

A cintilografia miocárdica com <sup>201</sup>Tl constitui técnica eficaz e consagrada para a determinação da extensão de miocárdio sob risco e da presença de miocárdio viável <sup>86</sup>. Entretanto, as características físicas e de biodistribuição deste radioisótopo deixam a desejar, especialmente para a avaliação da eficácia do tratamento em situações agudas <sup>1,7,21,46,58,70,81,85</sup>.

Com o surgimento de <sup>99m</sup>Tc-alquilisonitrilas, especialmente o <sup>99m</sup>Tc-sestamibi, tornou-se possível a análise do estado do fluxo coronariano com maior flexibilidade de tempo para obtenção das imagens (maior tempo de residência intramiocárdica em comparação ao <sup>201</sup>Tl) e melhor qualidade de imagem <sup>4</sup>. A capacidade diagnóstica deste novo agente demonstrou-se semelhante ou melhor que a do <sup>201</sup>Tl<sup>4-7</sup>. A partir destes estudos preliminares tornou-se imperioso o me-

lhora entendimento de sua cinética miocárdica e da aplicação em situações clínicas específicas como na avaliação da eficácia da angioplastia coronariana.

Com os estudos iniciais de Mousa et alii <sup>13,48</sup>, onde foi utilizada a técnica de fracionamento celular com homogeneização e centrifugação de miócitos de cobaio, ficou aparente a localização "citosólica" de <sup>99m</sup>Tc-sestamibi, sugerindo os autores que este traçador atravessaria a membrana celular por difusão passiva localizando-se no citosol, implicando, portanto, em distribuição miocárdica dependente do fluxo sangüíneo. Estudos em outros modelos de células em cultura sugeriam, todavia, que haveria um componente de retenção intramiocárdica deste traçador relacionado ao gradiente eletronegativo entre as membranas celular e mitocondrial interna com acúmulo intramitocondrial quando em equilíbrio. Este componente seria, portanto, independente do fluxo coronariano e caracterizaria um compartimento adicional para sua distribuição <sup>12,14,15,23-25,28,30,48-50,59</sup>.

Buscando estabelecer a razão desta discrepância entre os modelos citados acima, o presente estudo repetiu a técnica utilizada por Mousa et alii <sup>13</sup> acrescentando marcadores mitocondriais e estabeleceu que a técnica utilizada por estes autores induzia à ruptura de mitocôndrias e conseqüente "contaminação" do conteúdo citosólico. Tal fato confirma os achados descritos em modelos "in vitro" de localização mitocondrial para o <sup>99m</sup>Tc-sestamibi e os estende para o coração de mamíferos. Em estudo recente, Crane et alii <sup>30</sup> confirmam nossos achados utilizando cortes de ventrículo de cobaias. Verificaram que mais de 90% do radiotraçador localizava-se na fração mitocondrial. Neste estudo, assim como em todos os demais que utilizam a técnica de fracionamento por ultracentrifugação, deve-se considerar que este fracionamento dos compartimentos subcelulares é tarefa com-



plexa e delicada uma vez que envolve a tentativa de extração de organelas frágeis envoltas por matriz proteica fibrosa enquanto devem ser mantidas seu funcionamento e retenção do radiotraçador. Todos estes métodos fornecem, no máximo, populações representativas de organelas e compartimentos, assim como dos eventos fisiológicos relacionados.

A extrapolação destes achados para situações de uso clínico da cintilografia miocárdica com  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi traz interessantes contribuições com aplicação imediata e futura para o entendimento da cinética deste traçador em humanos. As propriedades físicas e de biodistribuição do  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi descritas acima, induzem ao raciocínio de que se aumentarmos o tempo de oferta celular deste traçador, maior será sua concentração mitocondrial enquanto estiverem íntegras as membranas celular e mitocondrial interna. Tal fato torna-se importante na avaliação de isquemia miocárdica crônica grave ou em pacientes com bloqueio de ramo esquerdo (nestes últimos há diminuição do potencial do sarcolema e possível diminuição do gradiente eletronegativo <sup>87</sup>), quando tanto o  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi quanto o  $^{201}\text{Tl}$ , injetados em bolo endovenoso durante avaliação de repouso, não serão extraídos em quantidade suficiente para serem detectados. Portanto, a infusão lenta, só possível com  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi, poderá trazer importante colaboração para a acurácia da cintilografia na diferenciação tecido miocárdico viável versus fibrose miocárdica.

Outro fato importante refere-se à diferença da cinética celular independente de fluxo sangüíneo entre o  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi e  $^{201}\text{Tl}$ , quando correlacionados a eficiência de extração celular e diferentes estágios da lesão celular is-

quêmica "in vivo". Verifica-se que estes traçadores respondem de forma diversa à depleção de ATP<sup>28</sup>. À medida que aumenta o grau de lesão celular com depleção de ATP, porém ainda com manutenção da função do sarcolema, há um aumento da captação de <sup>99m</sup>Tc-sestamibi e uma diminuição da captação de <sup>201</sup>Tl. Em tal estágio de lesão miocárdica isquêmica, o <sup>99m</sup>Tc-sestamibi apresentará maior acurácia que o <sup>201</sup>Tl na detecção de miocárdio viável. Deve-se ressaltar, entretanto, que provavelmente deva ser utilizada infusão contínua de <sup>99m</sup>Tc-sestamibi "in vivo" na tentativa de aproximar-se das condições de equilíbrio "in vitro".

Já os estudos de Crane et ali<sup>30</sup> demonstraram que em miocárdio irreversivelmente lesado não há acúmulo de <sup>99m</sup>Tc-sestamibi e que, ao induzir-se sobrecarga celular e mitocondrial de Ca<sup>++</sup> (ponto de irreversibilidade de lesão isquêmica), há liberação quase total do conteúdo celular deste traçador.

Como corolário, verifica-se que, quando da injeção endovenosa em bôlo de <sup>99m</sup>Tc-sestamibi utilizada nos atuais protocolos de investigação clínica, região miocárdica de hipocaptação e retenção deste traçador pode significar redução de fluxo sanguíneo ou inviabilidade celular com ou sem redução de fluxo e distribuição miocárdica "normal" representa fluxo normal para células viáveis.

A utilização destes princípios em pacientes portadores de coronariopatia crônica imediatamente antes e até 24 horas após a revascularização miocárdica através da angioplastia fornece um modelo onde alguns destes princípios podem ser analisados. O estudo clínico desenvolvido no presente trabalho permitiu verificar-se a potencialidade do <sup>99m</sup>Tc-sestamibi em avaliar os resultados imediatos da revascularização, traduzindo-se na hipótese de que aqueles pacientes

que apresentarem melhora significativa da perfusão miocárdica imediatamente após a angioplastia beneficiaram-se efetivamente do procedimento (significado funcional de lesão residual) e provavelmente estarão menos sujeitos ao risco de reestenose. Tais afirmativas devem, entretanto, ser confirmadas por estudos apropriadamente planejados com grupos de pacientes não tão selecionados.

## 7--- CONCLUSÕES GERAIS

---

O presente estudo permite as seguintes conclusões:

- quando se utiliza técnica de fracionamento celular em coração de rato isolado e perfundido com possibilidade de ruptura de estruturas intracelulares, marcadores do conteúdo mitocondrial correlacionam-se com a concentração de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi, demonstrando, indiretamente a localização intramitocondrial deste radiotraçador.

- ao contrário de estudos iniciais que indicavam a existência de ligação de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi à proteína citosólica, o presente estudo não confirma tal ligação.

- os achados descritos em estudos com culturas de miócitos de embrião de galinha são estendidos ao estudo de miocárdio intacto de mamíferos.

- o SPECT miocárdico com  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi imediatamente antes e após a angioplastia coronariana transluminal percutânea é modelo promissor para avaliação dos benefícios da revascularização miocárdica e complementa a angiografia coronariana neste grupo selecionado de pacientes.

- a melhora > 15% da perfusão miocárdica regional entre o estudo cintilográfico pré- e pós-angioplastia coronariana parece caracterizar grupo com reperfusão efetiva do território miocárdico sob risco, sendo que estudos complementares são necessários para melhor definir este valor e determinar sua capacidade preditiva para a ocorrência de re-estenose da lesão tratada.

## 8--- RESUMO

---

O presente estudo objetivou avaliar a distribuição miocárdica de  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi utilizando os modelos de fracionamento celular em coração de rato isolado e perfundido, e de angioplastia coronariana em humanos.

Com o objetivo de abordar a aparente discrepância existente entre dados obtidos em células em cultura e preparações de corações íntegros, foram utilizados corações de rato perfundidos através da preparação de Langendorff e perfundidos com hexakis (2-metoxi isobutil isonitrila) tecnécio(I) ( $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI). Os corações foram fracionados através de técnica padronizada de centrifugação e as frações contendo  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI foram correlacionadas ao marcador mitocondrial malato desidrogenase (MDH) e a substratos mitocondriais.

A fração "citosólica" continha 88% (84-96) do total de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI, mas também continha 91% (89-94) de toda a atividade de MDH determinada através desta metodologia. A análise cromatográfica da atividade na fração citosólica demonstrou que > 95% deste agente estava presente como complexo catiônico original livre; sua localização, portanto, não estava relacionada à ligação a moléculas com baixo peso molecular. A adição do desacoplador mitocondrial CCCP ( $5\ \mu\text{M}$ ) aos sedimentos "mitocondrial" e de "fragmentos celulares" liberou até 84% do conteúdo de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI e a adição do substrato mitocondrial succinato ( $10\ \mu\text{M}$ ) na presença de rotenona ( $1\ \mu\text{M}$ ) aumentou em 139% o conteúdo de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI em relação ao controle. Estes dados indicam que aproximadamente 90% da atividade "in vivo" de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI está associada à mitocôndria de forma dependente de energia como um complexo catiônico livre que migra durante o fracionamento e centrifugação.

Para avaliar o benefício precoce da angioplastia coronariana transluminal percutânea (ACTP) bem sucedida, foi utilizada a tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) da perfusão miocárdica com  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI em nove pacientes consecutivos. O SPECT de estresse miocárdico foi obtido através do estímulo com marca-passo artificial imediatamente antes da ACTP e 16 a 20 horas após, sendo que as imagens perfusionais foram obtidas 2 a 3 horas após o estímulo com marca-passo e injeção de  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI. Re-estenose foi demonstrada angiograficamente em 3 pacientes, os quais não apresentaram melhora da perfusão após ACTP. Quatro pacientes assintomáticos até 7 meses após ACTP apresentaram melhora média de 15% da perfusão segmentar após o procedimento. Dois pacientes apresentaram dor torácica após ACTP, sendo que um destes demonstrou patência do vaso tratado e melhora > 15% da perfusão deste território. O segundo paciente não apresentou melhora da perfusão (não foi obtida correlação angiográfica). Estas observações preliminares sugerem que o  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi é importante complemento à angiografia na estimativa da extensão de miocárdio "sob risco" antes e após a ACTP.



## 9--- SUMMARY

---

The present study evaluated the myocardial distribution of  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi using models of coronary angioplasty in humans and of cellular fractionation in isolated perfused rat hearts.

To address the apparent discrepancy between cultured cells and whole heart preparations, Langendorff-perfused rat hearts loaded with hexakis (2-methoxyisobutyl isonitrile) technetium (I) ( $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI) were fractionated by a standard differential centrifugation method and fractional contents of  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI were correlated with the mitochondrial marker, malate dehydrogenase (MDH), and mitochondrial substrates. The "cytosolic" fraction nominally contained 88% (84-96) of total  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI, but also contained 91% (89-94) of total MDH activity by this method. Chromatographic analysis of activity in the "cytosolic" fraction demonstrated that > 95% of the agent was present as the original free cationic complex; binding to a small molecular weight cytosolic protein was not involved in localization. Addition of the mitochondrial uncoupler CCCP (5  $\mu\text{M}$ ) to both "mitochondrial" and "cell fragment" pellets released up to 84% of  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI content and addition of the mitochondrial substrate succinate (10  $\mu\text{M}$ ) in the presence of rotenone (1  $\mu\text{M}$ ) enhanced  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI content by up to 139% over the control. These correlative data from rat hearts indicate that approximately 90% of  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI activity in vivo is associated with mitochondria in an energy-dependent manner as a free cationic complex, but migrates during fractionation/centrifugation.

To assess the early benefits of successful percutaneous translu-

minimal coronary angioplasty (PTCA),  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) was used in nine consecutive patients. SPECT stress studies were done by artificial cardiac pacing just prior to PTCA and 16-20 hours later, with perfusion images obtained 2-3 hours after pacing stress and  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI injection. Angiographic restenosis was demonstrated in three patients at a later date, and all of these showed no significant improvement on the perfusion study after PTCA. All four patients asymptomatic at 7 months following PTCA had an average 15% improvement in segmental perfusion after the procedure. In two patients symptomatic after PTCA, one showed angiographic patency and had > 15% improvement in perfusion, while the second showed no scintigraphic improvement (no angiographic data obtained). These preliminary observations suggest that  $^{99m}\text{Tc}$ -sestamibi is an important adjunct to angiography in estimating the amount of myocardium "at risk" before and after PTCA.

## 10--- BIBLIOGRAFIA

---

- 1- ZARET BL, WACKERS FJT, SOUFER R. Nuclear Cardiology. In: BRAUNWALD E. Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine. 4th Edition, Philadelphia, W.B. Saunders Co., 1992, pp. 277-311.
- 2- MAHMARIAN JJ, VERANI MS. Exercise thallium-201 perfusion scintigraphy in the assessment of coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1991;67:2D-11D.
- 3- SAHA GB. Fundamentals of Nuclear Pharmacy. 3rd Edition, New York, Springer-Verlag, 1992, pp. 98-105.
- 4- WACKERS FJT, BERMAN DS, MADDAHI J, et alii. Technetium-99m hexakis 2-methoxyisobutyl isonitrile: human biodistribution, dosimetry, safety, and preliminary comparison to thallium-201 for myocardial perfusion imaging. *J Nuc Med* 1989;30:301-311.
- 5- ISKANDRIAN AS, HEO J, KONG B, LYONS E, MARSCH S. Use of technetium-99m isonitrile (RP-30A) in assessing left ventricular perfusion and function at rest and during exercise in coronary artery disease, and comparison with coronary arteriography and exercise thallium-201 SPECT imaging. *Am J Cardiol* 1989;64:270-275.
- 6- KIAT H, MADDAHI J, ROY LT, et alii. Comparison of Tc-99m methoxy isobutyl isonitrile with Tl-201 imaging by planar and SPECT techniques for assessment of coronary disease. *Am Heart J* 1989;117:1-11.
- 7- MAISEY MN, et alii. European multi-centre comparison of thallium-201 and technetium-99m methoxyisobutylisonitrile in ischemic heart disease. *Eur J Nuc Med* 1990;16:869-872.
- 8- SORENSON JA, PHELPS ME. Physics in Nuclear Medicine. Orlando, Grune & Stratton Inc., 1987, pp.465-517.
- 9- SAPIRSTEIN LA. Fractionation of the cardiac output of rats with isotopic potassium. *Cir Res* 1956;4:689-692.
- 10- ROSE CP, GORESKY CA, BACH GG. The capillary and sarcolemmal barriers in the heart. An exploration of labeled water permeability. *Circ Res* 1977;41:515-533.
- 11- BASSINGTHWAIGHTE JB. Overview of the processes of delivery: flow, transmembrane transport, reaction, and retention. *Circulation* 1985;72 (Suppl. IV):39-46.
- 12- LEPO JA. Cardiac transport of single photon myocardial perfusion agents. In: ZARET BL, BELLER GA. Nuclear Cardiology: State of the Art and Future Directions. St. Louis, Mosby Year Book Inc., 1993, pp. 35-44.

- 13- MOUSA SA, WILLIAMS SJ, SANDS H. Characterizations of in vivo chemistry of cations in the heart. *J Nuc Med* 1987;28:1351-1357.
- 14- PIWNICA-WORMS D, KRONAUGE JF, CHIU ML. Uptake and retention of hexakis (2-methoxyisobutylisonitrile) technetium (I) in cultured chick myocardial cells: mitochondrial and plasma membrane potential-dependance. *Circulation* 1990;82:1826-1838.
- 15- PIWNICA-WORMS D, KRONAUGE JF. Transport mechanisms of SPECT perfusion tracers in cultured cells. In: ZARET BL, BELLER GA. Nuclear Cardiology. State of the art and future directions. St. Louis, 1993, pp.25-34.
- 16- DAVISON A, ORVIG C, TROP HS, et alii. Preparation of oxobis (dithiolate) complexes of technetium (V) and rhenium (V). *Inorg Chem* 1980;19:1988-1992.
- 17- ABRAMS MJ, DAVISON A, JONES AG, COSTELLO CE, PANG H. Syntesis and characterization of hexakis (alkyl isocyanide) and hexakis (aryl isocyanide) complexes of technetium (I). *Inorg Chem* 1983;22:2798-2800.
- 18- JONES AG, DAVISON A. The relevance of basic technetium chemistry to Nuclear Medicine. *J Nucl Med* 1982;23:1041-1043.
- 19- DEWANJEE MK. The chemistry of  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled radiopharmaceuticals. *Sem Nuc Med* 1990;20:5-27.
- 20- BERMAN DS, KIAT H, VAN TRAIN K, GARCIA E, FRIEDMAN J, MADDAHI J. Technetium  $^{99m}$  sestamibi in the assessmente of chronic coronary artery disease. *Sem Nuc Med* 1991;21:190-212.
- 21- VERANI MS. Thallium-201 and technetium- $^{99m}$  perfusion agents; whre we are in 1992. In: ZARET BL, BELLER GA. Nuclear Cardiology. State of the art and future directions. St. Louis, 1993, pp. 216-224.
- 22- TAILLEFER R. Technetium- $^{99m}$  sestamibi myocardial imaging: same-day rest-stress studies and dipyridamole. *Am J Cardiol* 1990;66:80E-84E.
- 23- PIWNICA-WORMS D, KRONAUGE JF, HOLMAN BL, DAVISON A, JONES AG. Comparative myocardial uptake characteristics of hexakis (alkylisonitrile) technetium (I) complexes: effect of lipophilicity. *Invest Radiol* 1989;24:25-29.
- 24- CHIU ML, KRONAUGE JF, PIWNICA-WORMS D. Effect of mitochondrial and plasma membrane potentials on accumulation of hexakis (2-methoxyisobutylisonitrile) technetium (I) in cultured mouse fibroblasts. *J Nucl Med* 1990;31:1646-1653.

- 25- PIWNICA-WORMS D, KRONAUGE JF, DELMON L, et alii. Effect of metabolic inhibition on technetium-99m-MIBI kinetics in cultured chick myocardial cells. *J Nuc Med* 1990;31: 464-472.
- 26- MURPHY E, LEFURGEY A, LIEBERMAN M. Biochemical and structural changes in cultured heart cells induced by metabolic inhibition. *Am J Physiol* 1987;253:C700-C706.
- 27- ANDERSON BS, YEE T, JONES DP. Mitochondrial transmembrane potential and pH gradient during anoxia. *Am J Physiol* 1987;252:C349-C355.
- 28- PIWNICA-WORMS D, CHIU ML, KRONAUGE JF. Divergent kinetics of thallium-201 and technetium-99m-sestamibi in cultured chick ventricular myocytes during ATP depletion. *Circulation* 1992;85:1531-1541.
- 29- BEANLANDS RSB, DAWOOD F, WEN WH, et alii. Are the kinetics of technetium-99m methoxyisobutyl isonitrile affected by cell metabolism and viability ? *Circulation* 1990;82: 1802-1814.
- 30- CRANE P, LALIBERTÉ R, HEMINWAY S, THOOLEN M, ORLANDI C. Effect of mitochondrial viability and metabolism on technetium-99m-sestamibi myocardial retention. *Eur J Nucl Med* 1993;20:20-25.
- 31- HOFFMAN JI. Maximal coronary flow and the concept of coronary vascular reserve. *Circulation* 1984;70:153-159.
- 32- HELLER GV, AROESTY JM, PARKER JA, et alii. The pacing stress test: thallium-201 myocardial imaging after atrial pacing. Diagnostic value in detecting coronary artery disease compared with exercise testing. *J Am Coll Cardiol* 1984;3:1197-1204.
- 33- \_\_\_\_\_, AROESTY JM, MCKAY JM, et alii. The pacing stress test: a reexamination of the relation between coronary artery disease and pacing-induced electrocardiographic changes. *Am J Cardiol* 1984;54:50-55.
- 34- MCKAY RG, AROESTY JM, HELLER GV. The pacing stress test reexamined: correlation of pacing-induced hemodynamic changes with the amount of myocardium at risk. *J Am Coll Cardiol* 1984;3:1469-1481.
- 35- AROESTY JM, MCKAY RG, HELLER GV. Simultaneous assessment of left ventricular systolic and diastolic dysfunction during pacing-induced ischemia. *Circulation* 1985;5:889-900.

- 36- STRATMANN HG, KENNEDY HL. Evaluation of coronary artery disease in the patient unable to exercise: alternatives fo exercise testing. *Am Heart J* 1989;117:1344-1365.
- 37- SORENSON JA, PHELPS ME. Physics in Nuclear Medicine. Orlando, Grune & Stratton Inc., 1987, pp.404-423.
- 38- KAHN JK, McGHIE I, AKERS MS, et alii. Quantitative rotational tomography with Tl-201 and Tc-99m 2-methoxy-isobutyl-isonitrile. A direct comparison in normal individuals and patients with coronary artery disease. *Circulation* 1989;79:1282-1293.
- 39- WATSON DD. Methods for detection of myocardial viabilty and ischemia. In: ZARET BL, BELLER GA. Nuclear Cardiology. State of the art and future directions. St. Louis, 1993, pp.65-76.
- 40- GERMANO G, VAN TRAIN KF, GARCIA EV, et alii. Quantification of myocardial perfusion with SPECT: current issues and future trends. In: ZARET BL, BELLER GA. Nuclear Cardiology. State of the art and future directions. St. Louis, 1993, pp.25-34.
- 41- GARCIA EV, COOKE CD, VAN TRAIN KF, et alii. Technical aspects of myocardial SPECT imaging with technetium-99m sestamibi. *Am J Cardiol* 1990;66:23E-31E.
- 42- HAMILTON GW, TROBAUGH GB, RITCHIE JC, et alii. Myocardial imaging with Tl-201: an analysis of clinical usefulness based on Bayes theorem. *Semin Nuc Med* 1978; 8:358-364.
- 43- MADDAHI J, KIAT H, FRIEDMAN JD, et alii. Technetium-99m-sestamibi myocardial perfusion imaging for evaluation of coronary artery disease. In: ZARET BL, BELLER GA. Nuclear Cardiology. State of the art and future directions. St. Louis, 1993, pp.191-200.
- 44- BONOW RO, DILSIZIAN V. Thallium 201 for assessment of myocardial viability. *Semin Nucl Med* 1991;21:230-241.
- 45- GIBBONS RJ. Myocardium at risk and the effect of reperfusion therapy in acute myocardial infarction: new insights from technetium-99m-sestamibi. In: ZARET BL, BELLER GA. Nuclear Cardiology. State of the art and future directions. St. Louis, 1993, pp.236-250.
- 46- JONES AG, ABRAMS MJ, DAVISON A, et alii. Biological studies of a new class of technetium complexes: the hexakis (alkylisonitrile) technetium (I) cations. *Int J Nucl Med Biol* 1984;11:225-234.



- 47- MOUSA SA, WILLIAMS SJ. Myocardial uptake and retention of Tc-99m hexakis-aliphatic isonitriles: evidence for specificity [Abstract]. *J Nucl Med* 1986;27:995.
- 48- PIWNICA-WORMS D, KRONAUGE JF, HOLMAN BL, et alii. Hexakis (carbomethoxy isopropyl isonitrile) technetium (I), a new myocardial perfusion imaging agent: binding characteristics in cultured chick heart cells. *J Nucl Med* 1988;29:55-61.
- 49- SANDS H, DELANO ML, GALLAGHER BM. Uptake of hexakis (t-butylisonitrile) technetium (I) and hexakis-(isopropylisonitrile) technetium (I) by neonatal rat heart and human erythrocytes. *J Nucl Med* 1986;27:404-408.
- 50- DELMON-MOINGEON LI, PIWNICA-WORMS D, VAN DEN ABBEELE AD, et alii. Uptake of the cation hexakis (2-methoxyisobutylisonitrile)-technetium (I) by human carcinoma cell lines in vitro. *Cancer Res* 1990;50:2198-2202.
- 51- OCHOA S. Malic dehydrogenase from pig heart. *Methods enzymol* 1955;1:735-739.
- 52- GORNALL AG, BARDAWILL CJ, DAVID MM. Determination of serum proteins by means of a biuret reaction. *J Biol Chem* 1949;177:751-766.
- 53- LEFURGEY A, INGRAM P, LIEBERMAN M. Quantitative microchemical imaging of calcium in Na-K pump inhibited heart cells. *Cell Calcium* 1988;9:219-235.
- 54- SIEGEL S. Estatística Não-Paramétrica. McGraw-Hill do Brasil. São Paulo 1975.
- 55- KRONAUGE JF, KAWAMURA M, LEPISTO E, et alii. Metabolic studies of the myocardial perfusion agent Tc-MIBI. In: MAZZI U. Technetium and rhenium in chemistry and nuclear medicine 3. New York, Cortiona International, 1990, pp. 677-681.
- 56- DARLEY-USMAR VM, RICKWOOD D, WILSON MT. Mitochondria: a practical approach. Oxford, IRL Press, 1987, p. 1-321.
- 57- SINUSAS AJ, TRAUTMAN KA, BERGIN JD, et alii. Quantification of area at risk during coronary occlusion and degree of myocardial salvage after reperfusion with technetium-99m methoxyisobutyl isonitrile. *Circulation* 1990;82:1424-1437.
- 58- FREEMAN I, GRUNDWALD AM, HOORY S, BODENHEIMER MM. Effect of coronary occlusion and myocardial viability on myocardial activity of Tc-99m-sestamibi. *J Nucl Med* 1991;32:292-298.
- 59- CRANE PD, PIWNICA-WORMS D, KRONAUGE JF, et alii. Cardiac retention of Tc-99m-sestamibi is related to mitochondrial viability [Abstract]. *J Nucl Med* 1991;32:957.

- 60- GRUENTZIG AR, MYLER RK, HANNA EH, TURINA WW. Coronary transluminal angioplasty. *Circulation* 1978;111(Suppl.III):55.
- 61- \_\_\_\_\_. Transluminal dilation of coronary artery stenosis. *Lancet* 1978;1:263-264.
- 62- \_\_\_\_\_, SENNING A, SIEGENTHALER WW. Non-operative dilation of coronary artery stenosis: percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1979;301: 61-68.
- 63- BAIM WW. Interventional Catheterization Techniques: Percutaneous Balloon Angioplasty, Valvuloplasty, and Related Procedures. In BRAUNWALD E. Heart Disease. Philadelphia, WB Saunders, 1988, pp. 1379-1394.
- 64- ROUBIN GS, KING III SB, DOUGLAS JR WW. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: the Emory Hospital experience. *Am J Cardiol* 1987;60:39B-43B.
- 65- LANGE RA, HILLIS LD. Short and long-term complications of coronary angioplasty. *Chest* 1989;96:151-157.
- 66- MCBRIDE W, LANGE RA, HILLIS LD. Restenosis after successful coronary angioplasty: pathophysiology and prevention. *N Engl J Med* 1988;318:1734-1739.
- 67- EL-TAMIMI H, DAVIES GJ, HACKETT D, et alii. A very early prediction of restenosis after successful coronary angioplasty: anatomical and functional assessment. *J Am Coll Cardiol* 1990;15:259-264.
- 68- O'KEEFE JR JH, LAPEYERE AC, HOLMES DR, GIBBONS WW. Usefulness of early radionuclide angiography for identifying low-risk patients for late restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 1988;61:51-54.
- 69- BREISBLATT WM, WEILAND FL, SPACCAVENTO WW. Stress Thallium-201 imaging after coronary angioplasty predicts restenosis and recurrent symptoms. *J Am Coll Cardiol* 1988;12:1199-1204.
- 70- HOLMES WW. Very early prediction of restenosis after successful coronary angioplasty: how early is early and can we identify it? *J Am Coll Cardiol* 1990;15:265-265.
- 71- HOLMAN BL, JONES AG, LISTER-JAMES J, et alii. A new Tc-99m labeled myocardial imaging agent, hexakis (t-butyl-isonitrile)-technetium (I) [Tc-99m TBI]: initial experience in the human. *J Nucl Med* 1984;25:1350-1355.

- 72- HOLMAN BL, SPORN V, JONES AG, et alii. Myocardial imaging with technetium-99m CPI: initial experience in the human. *J Nucl Med* 1987;28:13-18.
- 73- SIA ST, HOLMAN BL. Dynamic myocardial imaging in ischemic heart disease: use of technetium-99m isonitriles. *Am J Card Imag* 1987;1:125-131.
- 74- FRANCESCHI M, GUIMOND J, ZIMMERMAN RE, et alii. Myocardial clearance of Tc-99m hexakis 2-methoxy-2-methylpropyl isonitrile (MIBI) in patients with coronary artery disease. *Clin Nucl Med* 1990;15:307-312.
- 75- VERANI MS, JEROUDI M, MAHMARIAN JJ, et alii. Quantification of myocardial infarction during coronary occlusions and myocardial salvage after reperfusion using cardiac imaging with technetium-99m hexakis 2-methoxyisobutyl isonitrile. *J Am Coll Cardiol* 1988;12:1573-1581.
- 76- BROWN BG, BOLSON EL, DODGE AL et alii. Percutaneous transluminal coronary angioplasty and subsequent restenosis: quantitative and qualitative methodology for their assessment. *Am J Cardiol* 1987;60:34B-38B.
- 77- SERRUYS PW, LUIJTEN HE, BEATT KJ, et alii. Incidence of restenosis after successful coronary angioplasty: a time-related phenomenon. *Circulation* 1998;77:361-371.
- 78- LIM YL, OKADA RD, CHESLER DA, et alii. A new approach to quantification of exercise Thallium-201 scintigraphy before and after intervention: application to define the impact of coronary angioplasty on regional myocardial perfusion. *Am H J* 1984;108:917-925.
- 79- GUTMAN J, ROZANSKI A, GARCIA EG, et alii. Complementary roles of scintigraphy and angiographic techniques in assessment of the extent of coronary artery disease. *Am H J* 1982;104:653-660.
- 80- HIRTZEL HO, NUESCH K, GRUENTZIG AR, LUETOLF UM. Short- and long-term changes in myocardial perfusion after percutaneous transluminal coronary angioplasty assessed by Thallium-201 exercise scintigraphy. *Circulation* 1981;63:1001-1007.
- 81- NOGUYOSHI M, KIMURA T, NOSAKA H, et alii. Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: serial angiographic follow-up of 229 patients. *J Am Coll Cardiol* 1988;12:616-623.

- 82- WILSON RF, JOHNSON MR, MARCUS ML, et alii. The effect of coronary angioplasty on coronary flow reserve. *Circulation* 1988;77:873-885.
- 83- LEGRAND V, AUERON FM, BATES ER, et alii. Value of exercise radionuclide ventriculography and thallium-201 scintigraphy in evaluating successful coronary angioplasty: comparison with coronary flow reserve, translesional gradient and percent diameter stenosis. *Eur Heart J* 1987;8:329-339.
- 84- PELLIKKA PA, BEHRENBECK T, VERANI MS, et alii. Serial changes in myocardial perfusion using tomographic technetium-99m-hexakis-2methoxy-2-methylpropyl-isonitrile imaging following reperfusion therapy of myocardial infarction. *J Nucl Med* 1990;31:1269-1275.
- 85- SCHOEDER H, FRIEDRICH M, TOPP H. Myocardial viability: what do we need? *Eur J Nucl Med* 1993;20:792-803.
- 86- BROWN KA. Prognostic value of Thallium-201 myocardial perfusion imaging. A diagnostic tool comes of age. *Circulation* 1991;83:363-381.
- 87- CHIALE PA, PASTORI JD, SANCHEZ RA, ELIZARI MV, ROSENBAUM MB. Contrasting effects of verapamil and procainamide on rate-dependent bundle branch block: pharmacologic evidence for the role of depressed calcium channel responses. *J Am Coll Cardiol* 1990;15:633-669.
- 88- BRISCOE J. Brasil - The new challenge of adult health. World Bank Country Study. Washington, The World Bank, 1990.