

Avaliação In Vivo da Distribuição das Células Autólogas Mononucleares da Medula Óssea no Tecido Miocárdico Infartado através da Marcação com ^{99m}Tc -HMPAO

Artigo Original

In Vivo Evaluation of the Distribution of the Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells in the Post Infarct Myocardium through Labeling with ^{99m}Tc -HMPAO

2

Jader Cunha de Azevedo, Cláudio Tinoco Mesquita, Patrícia Lavatori Corrêa, Renata Martins Félix, Gustavo Borges Barbirato, Cristina Cavalcanti, Daniel Borges Silva, Fernanda Marcelino Casa Grande, André Souza, Suzana Alves, Andréa Ferreira Haddad, Radovan Borojevic, Hans Fernando Rocha Dohmann

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Hospital Pró-Cardíaco (RJ)

Objetivos: Demonstrar a fixação das células autólogas mononucleares da medula óssea (CAMMO) no miocárdio, após a sua injeção intravascular. Quantificar a proporção da fixação das células em relação ao corpo inteiro e sua taxa de clareamento.

Métodos: Foram selecionados 20 pacientes na fase aguda do infarto do miocárdio; 19 foram submetidos à marcação de uma fração das células (10^6 células) com o ^{99m}Tc hexametil-propilenoamina-oxime (^{99m}Tc -HMPAO). Foram adquiridas imagens precoces e tardias de corpo inteiro e imagens tomográficas de tórax.

Resultados: Os pacientes apresentaram em média $29,9 \pm 14\%$ de área infartada nas imagens de perfusão miocárdica. A taxa de captação na área cardíaca foi $12,1 \pm 8,25\%$ nas imagens precoces e $7,8 \pm 6,31\%$ nas imagens tardias. A taxa de clareamento foi de $35,3 \pm 15,94\%$. A captação das células não apresentou correlação com o tamanho do infarto miocárdico ($r = -0,271$) e o clareamento não apresentou correlação nem com o tamanho do infarto miocárdico nem com o intervalo entre as aquisições das imagens ($r = -0,22$ e $r = 0,000024$).

Conclusão: A marcação das CAMMO com ^{99m}Tc -HMPAO permite demonstrar a sua fixação na área infartada, quantificando a sua proporção em relação à sua distribuição no corpo inteiro.

Palavras-chave: Transplante de células-tronco, Medicina nuclear, Cintilografia miocárdica, Marcação de células

Objectives: To demonstrate the engraftment of autologous bone marrow mononuclear cells into the myocardium after its intravascular delivery and to quantify the ratio of the setting of the cells in relation to the whole body and its washout rate.

Methods: 20 patients in the acute stage of myocardium infarction were selected; 19 were submitted to the labeling of a fraction of the cells (10^6 cells) with ^{99m}Tc -HMPAO. Early and delayed whole body images as well as chest tomography images were acquired.

Results: The patients presented mean $29.9 \pm 14\%$ of infarcted area in myocardial perfusion images. The mean cell engraftment in the cardiac area was $12.1 \pm 8.25\%$ and $7.8 \pm 6.31\%$ in the early and delayed images, respectively. The mean washout rate was $35.3 \pm 15.94\%$. The engraftment rate of cells was not correlated with the size of the myocardial infarction ($r = -0,271$) and the washout was correlated with neither the size of the myocardial infarction nor with the interval between image acquisitions ($r = -0.22$ e $r = 0.000024$).

Conclusion: The labeling of the autologous bone marrow cells with ^{99m}Tc -HMPAO allows to show their engraftment in the impaired myocardial area thus quantifying its ratio in relation to its distribution in the whole body.

Key words: Autologous bone marrow cells, Nuclear medicine, Myocardial scintigraphy, Cell labeling

Endereço para correspondência: medicina.nuclear@procardiaco.com.br | jadercazevedo@uol.com.br

Jader Cunha de Azevedo | Serviço de Medicina Nuclear e Imagem Molecular – Hospital Pró-Cardíaco | Rua General Polidoro, 192 | Botafogo, Rio de Janeiro - RJ | 22280-000

Recebido em 25/03/2006 | aceito em 10/04/2006

O infarto agudo do miocárdio (IAM) desencadeia uma cascata de eventos que culmina com a morte de miócitos e a substituição do tecido miocárdico por tecido fibrótico, acarretando a redução da função contrátil do coração. Estudos recentes com a terapia de transplante de células autólogas mononucleares da medula óssea (CAMMO) sugerem que estas possam ser utilizadas para minorar o processo de remodelamento cardíaco pós-infarto agudo do miocárdio^{1,2}.

Os mecanismos pelos quais as CAMMO promovem a recuperação da função ventricular após o IAM ainda não estão completamente esclarecidos. Acredita-se que estas células progenitoras possam favorecer o aumento da irrigação dos tecidos afetados através da neoangiogênese, seja pela sua diferenciação em células endoteliais, pela secreção local de fatores pró-angiogênicos, pela sinalização parácrina, pela inibição da apoptose peri-infarto ou mesmo pela diferenciação em miócitos. Independente do mecanismo responsável pela recuperação da função contrátil miocárdica, a fixação das células-tronco no miocárdio é o evento crítico inicial após o seu implante no coração. Apesar da técnica utilizada, há poucas evidências diretas de que as células-tronco após liberadas permanecem no miocárdio e em qual proporção³.

A imagem molecular permite, além da avaliação da perfusão miocárdica antes do implante das células marcadas, o acompanhamento evolutivo desses pacientes, seja pelas alterações da perfusão, do metabolismo ou da função contrátil do miocárdio. Novas técnicas vêm sendo empregadas na avaliação do mecanismo terapêutico, contribuindo para o melhor entendimento dos efeitos da terapia com células-tronco. O ^{99m}Tc-hexametil-propilenoamina-oxime (^{99m}Tc-HMPAO) é um traçador amplamente utilizado na medicina nuclear para a detecção de infecção / inflamação através da marcação dos leucócitos. Apesar de apresentar predileção por granulócitos, pode ser utilizado para marcar as células mononucleares, permitindo a realização de imagens tecnicamente adequadas para a análise da distribuição destas nos tecidos⁴. Alguns pesquisadores utilizaram a marcação das CAMMO com ^{99m}Tc-HMPAO para demonstrar a sua fixação e a sua distribuição no tecido miocárdico^{5,6}. Esta técnica pode permitir o melhor entendimento da terapia celular na síndrome coronariana aguda e ser um método auxiliar na avaliação das técnicas de implante celular.

Objetivos

Demonstrar a fixação das CAMMO marcadas com ^{99m}Tc-HMPAO no miocárdio após sua injeção intracoronariana ou no seio venoso coronariano; e quantificar a fixação das células no coração em relação ao corpo inteiro e a sua taxa de clareamento (do inglês, *washout*) no miocárdio.

Metodologia

Foram incluídos no estudo 40 pacientes com infarto agudo do miocárdio submetidos à terapia de angioplastia coronariana primária ou de resgate entre 48 e 72 horas após o infarto. Estes apresentavam redução da contratilidade segmentar, avaliada pela ecocardiografia, e defeito de perfusão miocárdica na área relacionada ao infarto avaliado pela cintilografia de perfusão miocárdica. Todos os pacientes realizaram cintilografia de perfusão miocárdica com ^{99m}Tc-Tetrofosmin em repouso, após administração de nitrato sublingual, antes da randomização para quantificar o tamanho da área de hipoperfusão miocárdica causada pelo IAM. Uma vez incluídos, os pacientes foram submetidos ao transplante de CAMMO entre o 3º e o 5º dias pós-IAM.

O estudo foi aprovado pela CONEP (nº 7824) e todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Os pacientes foram randomizados em dois grupos: o primeiro, o grupo tratado que recebeu o implante das células-tronco no miocárdio (n=20), e o segundo, o grupo-controle, que não recebeu implante das células tronco no miocárdio. Todos os pacientes receberam terapia medicamentosa convencional para doença arterial coronariana (antiplaquetários, betabloqueadores, anti-hipertensivos, estatinas e nitrato oral). Nos pacientes do grupo tratado, uma fração das células-tronco administradas (1% do total - 10⁶ células) foi marcada com ^{99m}Tc-HMPAO.

As células autólogas mononucleares da medula óssea foram marcadas conforme técnica descrita anteriormente⁶ e liberadas através de um cateter-balão por via intracoronariana ou no seio venoso coronariano.

Observou-se a distribuição tecidual das células marcadas nas imagens precoces e tardias de corpo inteiro nas projeções anterior e posterior, com matriz 1024 x 256 e na velocidade de 12 centímetros por minuto. Para a localização topográfica das células no coração, foram adquiridas imagens tomográficas de tórax com protocolo semelhante ao utilizado para a aquisição das imagens de perfusão miocárdica. Foram adquiridas imagens com 64 projeções de 20

segundos cada, com matrix 64 x 64 e foram reconstruídas por retroprojeção com filtro Butterworth e processadas utilizando o pacote de softwares e-Soft 3.0 (*Cedars – Sinai, Guido Germano e Emory Cardiac Toolbox*). Todas as imagens foram adquiridas em gama-câmera de duas cabeças (*Ecami-Duet – Siemens*) com colimador de baixa energia e alta resolução.

A média geométrica das contagens na área cardíaca das imagens de corpo inteiro anterior e posterior foi relacionada com a média geométrica no corpo inteiro (Co/CI) nas imagens precoces e tardias. As imagens tomográficas de tórax foram comparadas às imagens tomográficas de perfusão miocárdica em repouso, para a localização topográfica da distribuição das CAMMO marcadas.

A taxa de clareamento foi calculada pela fórmula: $(Co/CI \text{ precoce} - Co/CI \text{ tardia}) / Co/CI \text{ precoce}$.

Os resultados foram expressos em média \pm desvio-padrão e para testes de correlação foi utilizado o teste de Pearson.

Resultados

Foram selecionados 20 pacientes para o grupo tratado com administração das CAMMO marcadas com $^{99m}\text{TC-HMPAO}$, sendo que um paciente não recebeu a marcação das células por dificuldade técnica. Um paciente recebeu marcação das células com dois isótopos, uma fração das células foi marcada com ^{18}F -Fluorodesoxiglicose (FDG).

Neste último, apesar de as imagens permitirem avaliar a distribuição das CAMMO no miocárdio, não foram utilizados os seus dados de quantificação na análise estatística por apresentarem interferência do radioisótopo de maior energia (FDG).

Os pacientes que receberam as CAMMO marcadas através do seio venoso representaram 31% (n=6) do total da amostra estudada e, pela via intracoronariana, foram 69% (n=13). Os pacientes do sexo masculino representaram 63% (n=12) do total e a idade média foi $56,3 \pm 12,07$ anos. A média da área acometida pelo infarto foi $29,9 \pm 14\%$, conforme avaliado pela quantificação da perfusão miocárdica (Figura 1).

O intervalo médio entre a administração das CAMMO marcadas e as imagens precoces foi de $3,7 \pm 1,03$ horas, o intervalo médio entre a administração das células marcadas e as imagens tardias foi de $22,4 \pm 3,85$ horas e o intervalo entre as duas aquisições foi em média $18,7 \pm 3,75$ horas.

Em todos os pacientes foi possível determinar a localização topográfica das células marcadas no miocárdio, exceto em um onde foi observada retenção difusa do traçador na projeção cardíaca.

A média de captação das CAMMO marcadas na área cardíaca (Co/CI precoce) nas imagens precoces foi de $12,1 \pm 8,25\%$ e a média de captação nas imagens tardias (Co/CI tardia) foi igual a $7,8 \pm 6,31\%$, sendo que a taxa média de clareamento foi de $35,3 \pm 15,94\%$ (Tabela 1).

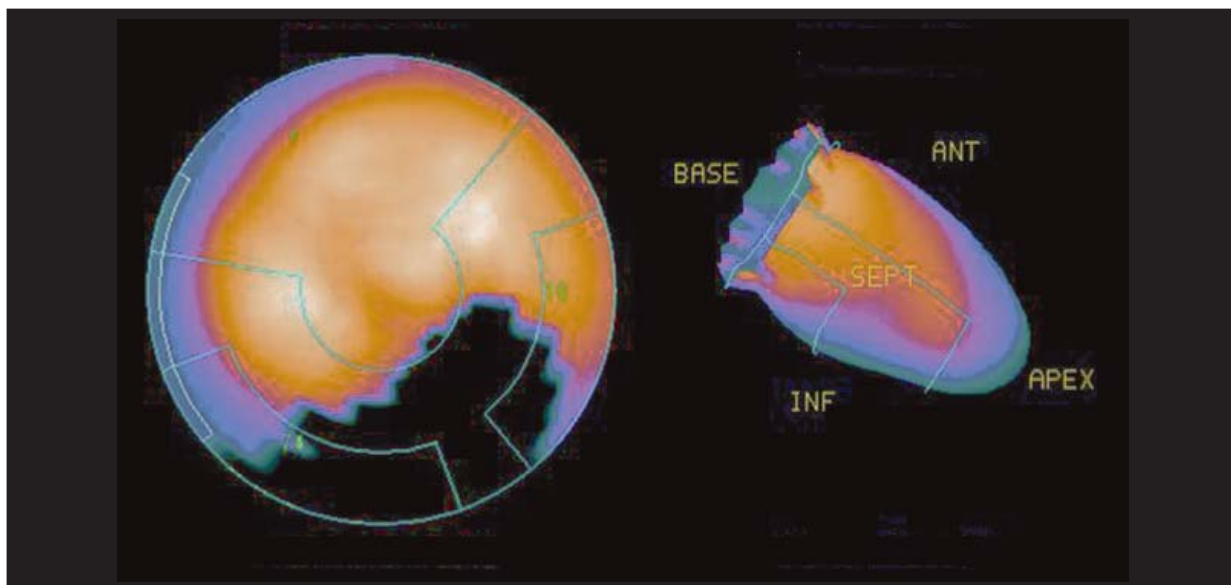


Figura 1

QPS – A esquerda mapa polar demonstrando hipoperfusão na parede inferior e ínfero-lateral do ventrículo esquerdo quantificada em 32%. A direita reconstrução tridimensional da imagem de perfusão.

Tabela 1

Valores em percentual da relação da captação do radiotraçador na área cardíaca (Co) e corpo inteiro (CI) nas imagens precoces e tardias. Taxa de clareamento em percentual e tamanho do defeito de perfusão em percentual do ventrículo esquerdo (QPS)

	Co/CI		Clareamento (%)	QPS (%)
	precoce (%)	tardia (%)		
1	23,50	17,82	24,17	9,00
2	19,71	14,56	26,13	21,00
3	28,54	22,47	21,27	42,00
4	7,56	6,62	12,43	37,00
5	25,35	17,57	30,69	9,00
6	13,49	4,45	67,01	10,00
7	6,35	3,01	52,60	44,00
8	9,31	4,36	53,17	13,00
9	13,75	6,58	52,15	24,00
10	18,30	11,80	35,52	38,00
11	14,00	6,70	52,14	21,00
12	13,84	7,57	45,30	44,00
13	2,76	1,94	29,71	31,00
14	2,25	1,69	24,89	34,00
15	3,45	2,96	14,20	39,00
16	5,71	4,79	16,08	39,00
17	4,32	2,34	45,83	57,00
18	4,98	3,42	31,33	27,00
Média	12,10	7,80	35,30	29,90
DP	8,25	6,31	15,94	14,01

A captação das células marcadas não apresentou correlação com o tamanho do IM ($r=-0,271$) (Figura 2) assim como o clareamento não apresentou correlação nem com o tamanho do IM (Figura 3) nem com o intervalo entre as aquisições das imagens ($r=-0,22$ e $r=0,000024$) (Figura 4).

Nas Figuras 5 e 6 podem ser observadas imagens de corpo inteiro, obtidas após a administração das CAMMO marcadas. Nas Figuras 7 e 8 observa-se a distribuição topográfica das CAMMO marcadas e a sua comparação com o padrão perfusional obtido antes de sua administração.

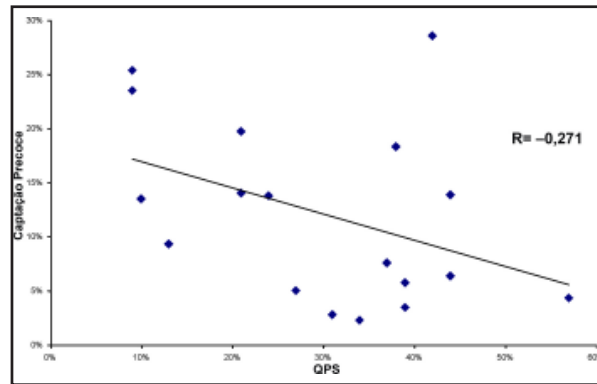


Figura 2

Relação da captação do radiotraçador pelo tecido miocárdico nas imagens precoces e tamanho do defeito de perfusão miocárdica (QPS)

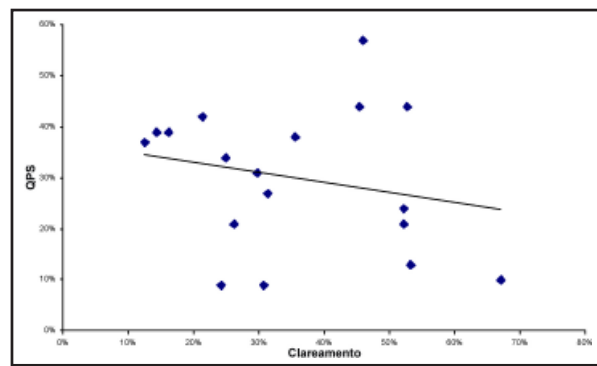


Figura 3

Relação do tamanho do defeito de perfusão miocárdica (QPS) com a taxa de clareamento do radiotraçador ($r = -0,22$)

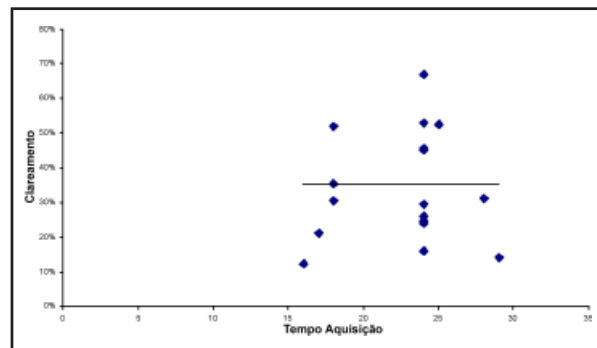


Figura 4

Relação do clareamento do radiotraçador com o intervalo de aquisição das imagens ($r=0,000024$)

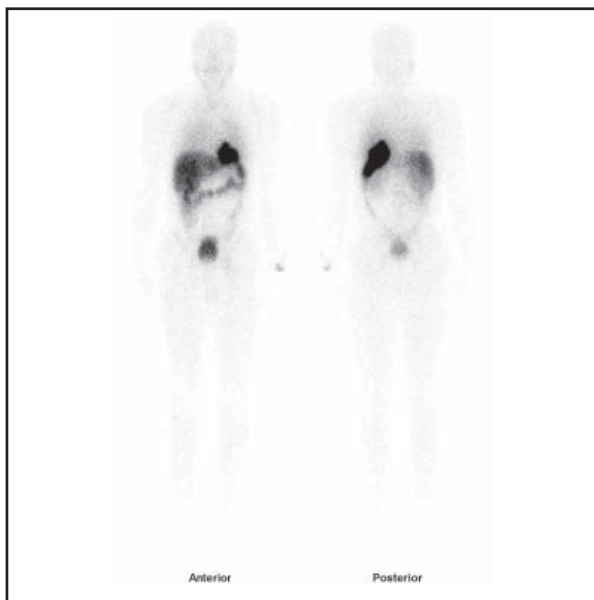


Figura 5
Imagens de corpo inteiro nas incidências anterior e posterior adquiridas duas horas após a administração das CAMMO marcadas. Observamos intensa fixação das células na projeção da área cardíaca e no fígado. Eliminação fisiológica do material radioativo na bexiga e intestino.

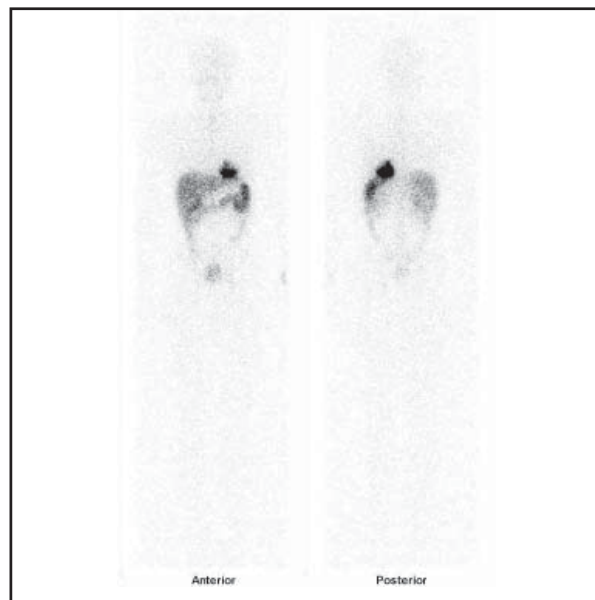


Figura 6
Imagens de corpo inteiro nas incidências anterior e posterior adquiridas 24 horas após a administração das CAMMO marcadas. Ainda podemos observar intensa fixação das células na projeção da área cardíaca.

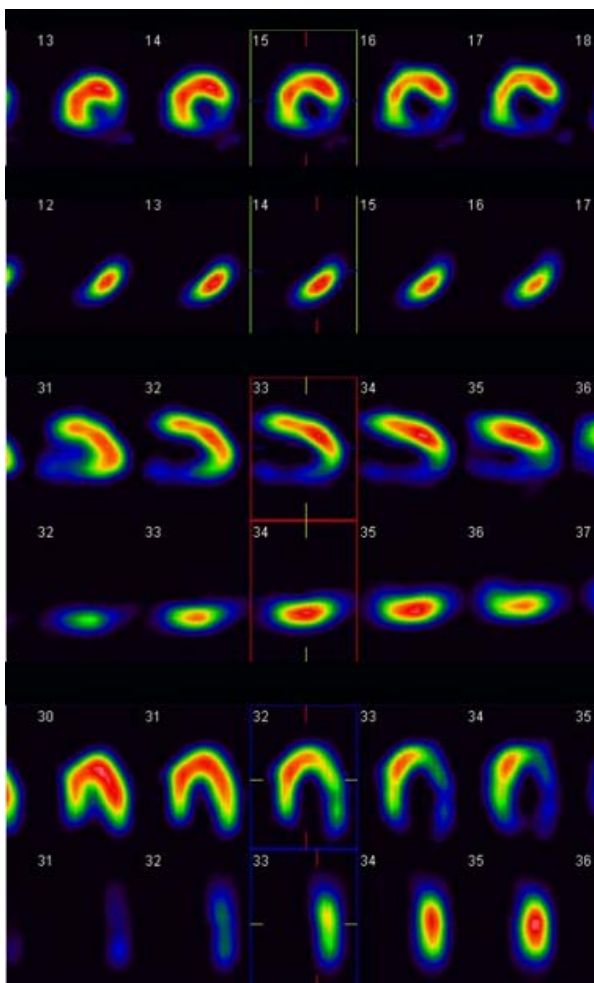
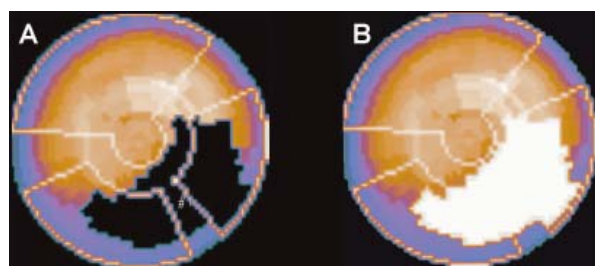


Figura 7 (esquerda)
Imagens de reconstrução tomográficas do coração nos eixos curto, longo vertical e longo horizontal. 1^a, 3^a e 5^a linhas demonstram área de hipoperfusão miocárdica nas paredes inferior e ínfero-lateral do ventrículo esquerdo. 2^a, 4^a e 6^a linhas demonstram a distribuição das CAMMO marcadas nas paredes do coração.

Figura 8 (abaixo)
A) Mapa polar de perfusão demonstrando a área de hipoperfusão na parede inferior e ínfero-lateral, área escura. B) Mapa polar demonstrando a distribuição das CAMMO marcadas (área branca) complementando a área de hipoperfusão miocárdica.



Discussão

A medicina nuclear cada vez mais se sobressai como método não-invasivo na avaliação funcional dos diversos eventos cardiovasculares. Na última década vem acompanhando o desenvolvimento da terapia com células-tronco, principalmente no que diz respeito ao estudo da localização da distribuição das células-tronco no organismo. Os radiotraçadores mais estudados são o ^{111}In Índio, o ^{18}F -FDG e o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO. O ^{111}In Índio apresenta meia-vida maior (2,8 dias) e há alguns relatos de que poderia causar danos estruturais e funcionais às células marcadas, prejudicando a sua diferenciação e proliferação^{7,8}; no entanto na realidade brasileira, a sua principal limitação é o fato de não estar amplamente disponível para a comercialização no país. O ^{18}F -FDG apresenta características físicas excelentes com a geração de imagens de melhor definição e está disponível para a comercialização no país, porém apresenta uma menor eficácia na marcação das células e uma meia-vida curta (2 horas) o que impede a sua utilização no acompanhamento em longo prazo das células marcadas³. A marcação de células mononucleares da medula óssea com o ^{18}F -FDG, apesar de resultados favoráveis, ainda apresenta experiência limitada e uma eficácia de marcação abaixo da ideal.

A marcação dos leucócitos com o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO é uma técnica amplamente empregada na detecção de focos de infecção e inflamação⁹. Recentemente vem desempenhando papel importante na marcação das células-tronco, possibilitando avaliar in vivo o comportamento destas nos tecidos, por cerca de 18 a 24 horas após o seu implante^{4,6,10}. As CAMMO podem ser marcadas com sucesso com o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO sem afetar a sua viabilidade e preservando a sua habilidade de adesão e proliferação em meios de cultura; assim, esta técnica é útil para monitorar a sua distribuição pelo corpo inteiro¹¹.

O presente estudo aponta esta técnica de marcação celular e imagem como uma forma exequível, simples e reprodutível para monitorar o movimento das CAMMO após a sua liberação no tecido miocárdico. Possibilitou a realização de imagens tecnicamente adequadas tanto topográficas como para quantificar o percentual de células que permaneceram no miocárdio após o tratamento por períodos relativamente prolongados de até 29 horas.

O tamanho da área acometida pelo infarto não influenciou na intensidade de captação das células pelo miocárdio e não influenciou também no seu

clareamento tecidual. Talvez isto possa ser explicado pela captação preferencial das células no bordo da área infartada observada nas imagens tomográficas. Portanto, a intensidade de captação das células e seu clareamento não apresentaram correlação com a massa de miocárdio acometido pelo infartado.

O clareamento, ou seja, a proporção em que o radiotraçador deixou o tecido miocárdico, não foi influenciado pelo intervalo médio entre a aquisição das imagens, que foi de $22,4 \pm 3,85$ horas. Esta análise foi realizada para tentar determinar se o clareamento do radiotraçador foi proporcional ao intervalo de aquisição, mostrando não haver uma correlação linear entre o tempo e a saída das células do tecido miocárdico.

Os mecanismos que determinam a fixação das células-tronco no tecido infartado não estão bem elucidados; no entanto, para que isto ocorra é necessário que as células estejam viáveis após sua manipulação e que preservem suas propriedades de adesão e quimiotaxia. Novos trabalhos com bases biomoleculares poderão esclarecer quais os mecanismos responsáveis pela adesão das células-tronco na área infartada. Assim também, o acompanhamento desses pacientes poderá, no futuro, determinar se a proporção da fixação das CAMMO no tecido miocárdico terá influência sobre os resultados clínicos e a recuperação do miocárdio acometido por infarto.

As limitações do estudo se dão principalmente devido à meia-vida relativamente curta do isótopo, que é de seis horas, não permitindo analisar por períodos maiores o comportamento das células nos tecidos. Embora não se tenham realizado cálculos mais complexos que levassem em consideração o decaimento do material radioativo e a sua meia-vida biológica, espera-se minorar estas interferências com a quantificação relativa da atividade na área cardíaca e no corpo inteiro e não utilizando valores absolutos da atividade.

Conclusão

A marcação das células autólogas mononucleares da medula óssea com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO é exequível e capaz de demonstrar sua fixação na área infartada e a sua distribuição nos demais tecidos do corpo. Permitiu ainda a quantificação da retenção na área cardíaca em relação ao resto do corpo, demonstrando que entre 10% e 20% das células, em média, ficam retidas no coração após a administração intravascular em pacientes após infarto agudo do miocárdio.

Referências

1. Smits AM, van Vliet P, Hassink RJ, et al. The role of stem cells in cardiac regeneration. *J Cell Mol Med.* 2005;9(1):25-36.
2. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet.* 2004;364:141-48.
3. Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, et al. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation.* 2005;111:2198-202.
4. Corrêa PL, Mesquita CT, Félix RM. Assessment of bone marrow mononuclear cells distribution by radioactive labelling after stem cell therapy in acute ischemic stroke. [Abstract]. *Stroke.* 2006;37(2):647.
5. Lishmanov Y, Sazonova V, Chernov T, et al. Tracking of autologous mononuclear bone marrow cells after intracoronary infusion by direct labeling with ^{99m}Tc-HMPAO in patients with cardiac disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2004;31(Supl 2):S321.
6. Mesquita CT, Corrêa PL, Félix RC, et al. Autologous bone marrow mononuclear cells labelled with ^{99m}Tc hexamethylpropylene amine oxime scintigraphy after intracoronary stem cell therapy in acute myocardial infarction. *J Nucl Cardiol.* 2005;12:610-12.
7. Aicher A, Brenner W, Zuhayra M, et al. Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling. *Circulation.* 2003;107:2134-139.
8. Brenner W, Aicher A, Eckey T, et al. ¹¹¹In-labeled CD34+ hematopoietic progenitor cells in a rat myocardial infarction model. *J Nucl Med.* 2004;45:512-18.
9. Capriotti G, D'Alessandria C, Garin E, et al. An *In Vitro* study to compare ^{99m}Tc-Stannous Colloids and ^{99m}Tc-HMPAO for labelling human leukocytes. *Q J Nucl Med.* 2004;48:229-36.
10. Bengel FM, Schachinguer V, Dimmeler S. Cell-based therapies and imaging in cardiology. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2005;32:S304-S416.
11. Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, et al. Systemic delivery of bone marrow – derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation.* 2003;108:863-68.