

AVALIAÇÃO DE PROCESSOS INFLAMATÓRIOS NA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR EMPREGANDO LEUCÓCITOS AUTÓLOGOS MARCADOS COM TECNÉCIO-99m EM MODELO ANIMAL*

Cláudia Borges Brasileiro¹, Valbert Nascimento Cardoso², Bianca Ruckert³, Tarcísio Passos Ribeiro de Campos⁴

Resumo **OBJETIVO:** O objetivo deste estudo foi identificar processos inflamatórios na articulação temporomandibular empregando leucócitos autólogos marcados com tecnécio-99m hexametilpropilenoaminoxima (^{99m}Tc-HMPAO). **MATERIAIS E MÉTODOS:** Foi utilizado um modelo experimental de indução de artrite na articulação temporomandibular de dez coelhos machos da raça Nova Zelândia, por meio da injeção intra-articular de ovalbumina na articulação temporomandibular esquerda de cada animal. Para controle, na articulação contralateral foi injetada solução salina. Após a marcação dos leucócitos com ^{99m}Tc-HMPAO e injeção endovenosa deste complexo nos coelhos, imagens cintilográficas foram obtidas. **RESULTADOS:** Observou-se captação aumentada dos ^{99m}Tc-HMPAO-leucócitos na articulação temporomandibular esquerda quando comparada à direita. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste não-paramétrico de Wilcoxon. Houve diferença estatisticamente significativa dos valores das contagens por minuto de radioatividade, relativos à articulação inflamada quando comparados aos valores obtidos na articulação contralateral ($p = 0,0073$). **CONCLUSÃO:** O método empregando leucócitos autólogos marcados com ^{99m}Tc-HMPAO é capaz de identificar focos inflamatórios de forma precoce e precisa, o que poderá contribuir na conduta terapêutica dos pacientes, antes que alterações estruturais sejam instaladas.

Unitermos: Desordem temporomandibular; Artrite; ^{99m}Tc-HMPAO.

Abstract *Evaluation of inflammatory processes in temporomandibular joint employing technetium-99m-labelled autologous leukocytes in an animal model.*

OBJECTIVE: The present study was aimed at identifying temporomandibular joint inflammatory processes employing technetium-99m hexamethylpropylene amine oxime (^{99m}Tc-HMPAO)-labelled autonomous leukocytes. **MATERIALS AND METHODS:** We have utilized an experimental model of arthritis induction in ten adult male New Zealand rabbits by means of ovalbumin intra-articular injection into each left temporomandibular joint. For control purposes, saline solution was injected. After leukocytes radiolabelling with ^{99m}Tc-HMPAO and injection into rabbits, scintigraphic images were obtained. **RESULTS:** A higher ^{99m}Tc-HMPAO-leukocytes uptake was observed in left temporomandibular joint in comparison with the contralateral joint. Wilcoxon non-parametric test was applied for statistical analysis. There was a statistically significant difference between counts of radioactivity per minute in the inflamed joint and the contralateral one ($p = 0.0073$). **CONCLUSION:** The method employing ^{99m}Tc-HMPAO-labelled autologous leukocytes allows an early and accurate detection of inflammatory processes, contributing to the adoption of a therapeutic conduct for patients before structural alterations have occurred.

Keywords: Temporomandibular joint disorder; Arthritis; ^{99m}Tc-HMPAO.

* Trabalho realizado no Departamento de Engenharia Nuclear da Escola de Engenharia e na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

1. Mestre em Ciências e Técnicas Nucleares pela Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, Professora do Curso de Odontologia do Centro Universitário Newton Paiva.

2. Doutor em Ciências Nucleares pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/Universidade de São Paulo, Professor Adjunto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

3. Graduanda do Curso de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

4. PhD em Ciências Nucleares pela University of Illinois, Urban Champaign, EUA, Professor Adjunto do Departamento de Engenharia Nuclear da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Endereço para correspondência: Dra. Cláudia Borges Brasileiro, Rua Henrique Passini, 738/701, Serra, Belo Horizonte, MG, 30220-380. E-mail: claudiabb.prof@newtonpaiva.br / cbbbrasileiro@bol.com.br

Recebido para publicação em 20/12/2004. Aceito, após revisão, em 17/10/2005.

INTRODUÇÃO

A desordem temporomandibular (DTM) é um termo utilizado para abranger várias alterações clínicas que envolvem a articulação temporomandibular (ATM), a musculatura da mastigação e as estruturas associadas. A tomografia linear, a tomografia computadorizada e a ressonância magnética são métodos altamente sensíveis, amplamente utilizados na avaliação das desordens inflamatórias da ATM, mas pouco precisos na determinação dos estágios iniciais da inflamação. Estes e outros méto-

dos radiográficos rotineiramente utilizados no estudo das DTM, tais como radiografias panorâmicas, radiografias transcranianas e artrografias, permitem a visualização de alterações anatômicas já instaladas. A cintilografia, por basear-se em alterações fisiológicas e bioquímicas, como aumento da permeabilidade vascular, aumento do fluxo sanguíneo local e extravasamento celular, permite a identificação precoce de alterações inflamatórias, ao contrário dos métodos convencionais de imagem. A utilização de leucócitos autólogos marcados com índio-111 (¹¹¹In) e tecnécio-99m (^{99m}Tc) é

considerada como “padrão ouro” no diagnóstico de processos inflamatórios.

O objetivo deste estudo foi identificar focos inflamatórios na ATM empregando leucócitos autólogos marcados com ^{99m}Tc-hexametilpropilenoaminooxima (^{99m}Tc-HMPAO) em modelo animal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Dez coelhos adultos machos da raça Nova Zelândia foram utilizados neste estudo. Para a indução da artrite, os animais foram sensibilizados com 4 mg de ovalbumina (Sigma) em 1 ml de adjuvante completo de Freund, administrados, por via intradérmica, em cinco sítios (0,2 ml cada). Após duas semanas, foi aplicada uma dose de reforço utilizando a mesma concentração. Cinco dias após o reforço, os animais foram testados para sensibilização, por injeção intradérmica de 100 µl de uma solução de ovalbumina 400 µg/ml em solução salina. Após confirmação dos sinais associados a uma resposta imunológica, tais como, edema e principalmente eritema, a artrite foi induzida unilateralmente na ATM esquerda por injeção intra-articular de 0,2 ml (20 mg/ml) de ovalbumina em solução salina (articulação-foco). Como controle, na articulação contralateral foi injetado 0,2 ml de solução salina (articulação-controle)⁽¹⁾. Durante os procedimentos de indução da artrite, os animais foram anestesiados com xilasina (Rompun® – 20 mg/ml, 5 mg/kg de animal, intramuscular) associada a quetamina (Dopalen® – 100 mg/ml, 40 mg/kg de animal, intramuscular).

O sangue dos animais foi coletado (30 ml) cinco dias após a indução do processo inflamatório e os leucócitos foram separados e marcados com ^{99m}Tc-HMPAO⁽²⁾. O rendimento de marcação foi calculado e a lipofilicidade do HMPAO foi determinada.

As imagens cintilográficas foram realizadas uma hora após injeção endovenosa de ^{99m}Tc-HMPAO-leucócitos. Imagens estáticas foram obtidas nas visões dorsal e ventral na região do foco e, em seguida, foram realizadas imagens de corpo inteiro para investigar a biodistribuição dos leucócitos radiomarcados. A comparação dos valores de contagem por minuto (cpm) relativos à articulação inflamada (articulação-foco) e ao lado contralateral (articula-

ção controle) foi realizada utilizando-se o teste não-paramétrico de Wilcoxon (teste do sinal para valores pareados). O nível de significância adotado foi de 1% ($p < 0,01$).

Para realização de tomografias computadorizadas, uma semana após a realização das imagens cintilográficas, foram selecionados dois animais aleatoriamente. Foram realizados vários cortes com espessuras de 10 mm, em seções oblíquas, na região da ATM, em condições de operação a 130 kV e 340 mAs.

A realização deste estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (Cetea/UFMG), conforme protocolo nº 033/03.

RESULTADOS

A média total dos rendimentos de marcação foi de 51%. Com relação à lipofilicidade, o percentual de radioatividade, em µCi, presente na fase oleosa foi sempre superior ao percentual relativo da fase aquosa. O percentual médio encontrado na fase orgânica foi de 81%, enquanto na fase inorgânica foi de 19%.

A imagem cintilográfica estática, projeção ventral, realizada uma hora após a injeção endovenosa de ^{99m}Tc-HMPAO-leucócitos, mostrou maior captação de leucócitos radiomarcados na ATM esquerda (foco inflamatório) e menor captação de radiação na ATM direita (controle) (Figura 1).

A captação em todos os experimentos foi sempre maior na articulação foco. A articulação inflamada (foco) apresentou valores superiores de atividade na região de interesse (ROI), em cpm, estatisticamente significativos quando comparados aos valores de atividade obtidos na articulação contralateral (controle) ($p = 0,0073$). As imagens cintilográficas dinâmicas, projeções ventral e dorsal, obtidas uma hora após a injeção endovenosa de ^{99m}Tc-HMPAO-leucócitos, mostraram biodistribuição fisiológica dos leucócitos radiomarcados, com captação pelo fígado, baço e pulmão (Figura 2).

Não foram observadas alterações estruturais nas superfícies articulares da articulação-foco nas imagens tomográficas obtidas 12 dias após a indução do processo inflamatório (Figura 3).

DISCUSSÃO

As desordens funcionais da ATM estão relacionadas a um distúrbio do complexo cêndilo-disco, a uma incompatibilidade estrutural das superfícies articulares e à instalação de processos degenerativos e inflamatórios articulares que fazem parte de um grupo de condições que acometem o sistema mastigatório denominado DTM⁽³⁾. Os dados coletados por meio da anamnese e do exame clínico dos pacientes são a base para o estabelecimento de um diagnóstico correto dos distúrbios da ATM. Em algumas situações, informações adicionais ob-

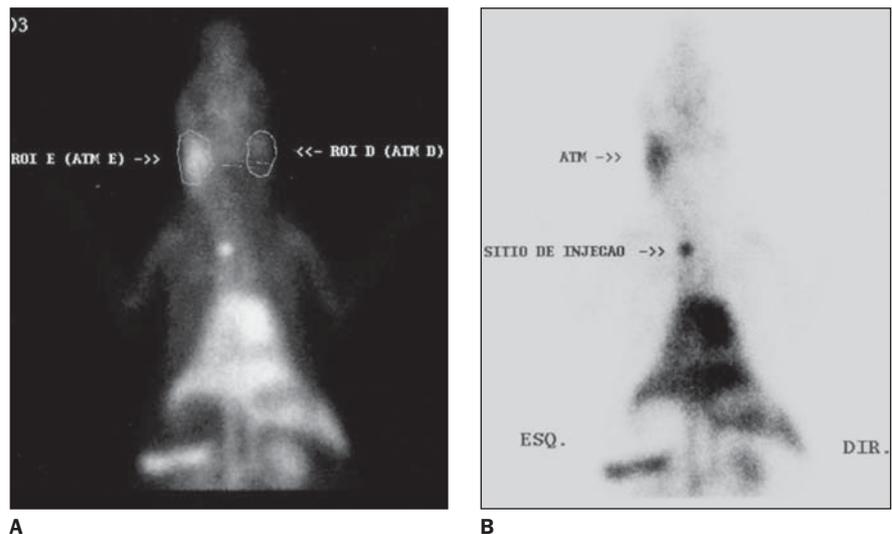


Figura 1. Imagens cintilográficas estáticas — projeção ventral —, uma hora após injeção endovenosa de ^{99m}Tc-HMPAO-leucócitos.

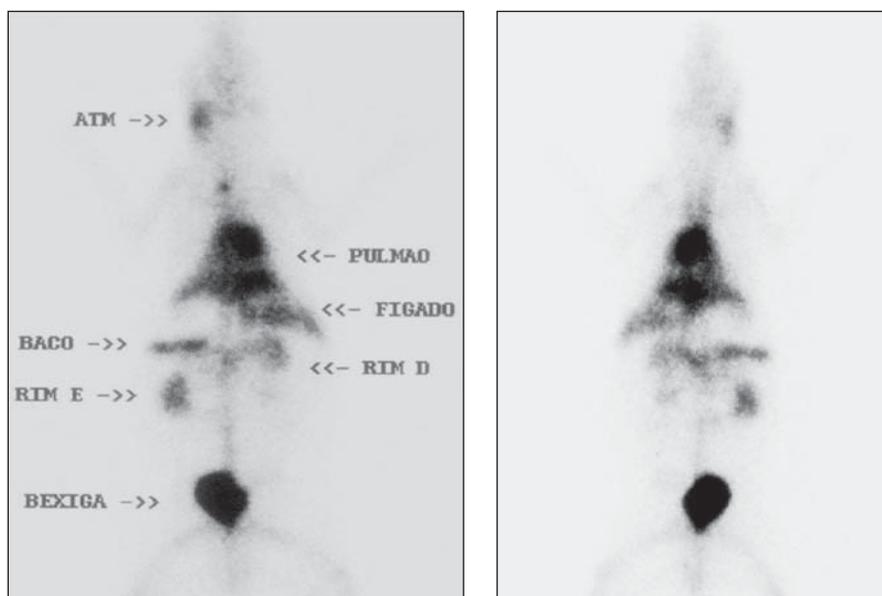


Figura 2. Imagens cintilográficas dinâmicas — projeções ventral (A) e dorsal (B) —, uma hora após injeção endovenosa de ^{99m}Tc -HMPAO-leucócitos, mostrando a distribuição fisiológica dos leucócitos radiomarcados.

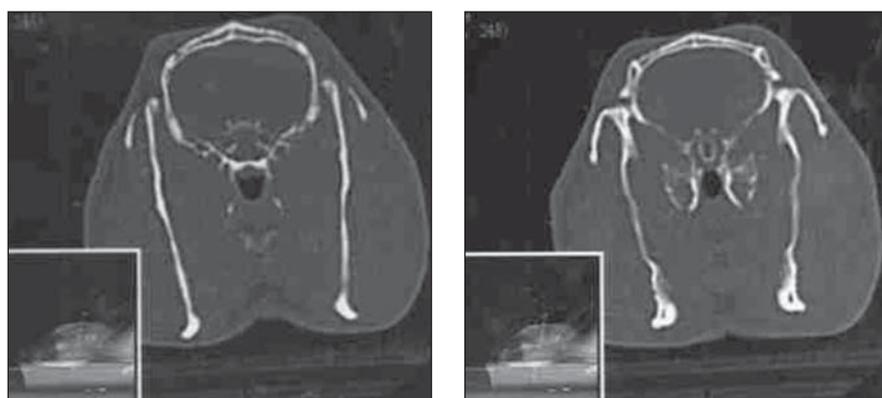


Figura 3. Imagens tomográficas — projeção dorsal —, obtidas 12 dias após indução da artrite. Cortes em secções oblíquas na região da ATM.

tidas através de exames complementares são necessárias⁽⁴⁾. A radiografia panorâmica e transcraniana, a tomografia linear e computadorizada, a artrografia, a ultra-sonografia e a ressonância magnética são métodos de diagnóstico utilizados para avaliar a anatomia e as desordens da ATM⁽⁵⁾. Entretanto, todos esses métodos de diagnóstico dependem de alterações estruturais para indicar a presença de um processo inflamatório. Desse modo, os métodos descritos acima são incapazes de diagnosticar um foco inflamatório precocemente.

A detecção precoce da resposta celular a processos inflamatórios que acometem a

ATM é decisiva na determinação de um diagnóstico definitivo antes do comprometimento estrutural das superfícies articulares⁽⁶⁾. As imagens cintilográficas realizadas com o emprego de leucócitos marcados, com o isótopo radioativo ^{99m}Tc , permitem diagnosticar focos inflamatórios no estágio inicial da doença. Vários estudos na literatura foram efetivos na avaliação de diversos tipos de condições inflamatórias empregando leucócitos marcados com o complexo ^{99m}Tc -HMPAO⁽⁷⁻⁹⁾. Entretanto, nenhuma pesquisa que utilizasse este método no estudo de alterações inflamatórias envolvendo especificamente a ATM foi en-

contrada. Dessa forma, a proposta deste trabalho foi utilizar a cintilografia com leucócitos radiomarcados no diagnóstico precoce de distúrbios inflamatórios que acometem a ATM em modelo animal.

Com relação à marcação dos leucócitos, os resultados obtidos mostraram rendimento médio da ordem de 51%. Este dado mostra que cerca de metade das moléculas do complexo ^{99m}Tc -HMPAO que foram incubados com os leucócitos penetrou no seu interior marcando-os. Os resultados obtidos estão de acordo com os descritos por Martin-Comin *et al.*⁽¹⁰⁾, que encontraram um valor médio de 55,3% a 75,4% de rendimento de marcação de leucócitos humanos.

Para a obtenção de um bom rendimento de marcação de leucócitos da ordem de 55%, torna-se imprescindível determinar a lipofilicidade do HMPAO. O valor médio de lipofilicidade do HMPAO obtido neste estudo foi de 81%. Estudos na literatura demonstraram que, no momento da marcação dos leucócitos, a lipofilicidade do HMPAO era de 85%⁽⁸⁾ e 78%⁽¹⁰⁾.

Neste estudo, após uma hora da administração endovenosa em coelhos, os leucócitos marcados apresentaram captação fisiológica pelo pulmão, fígado e baço, em concordância com vários trabalhos descritos na literatura^(8,10-12). Este dado sugere que não tenha havido destruição dessas células durante o processo de marcação, ressaltando a integridade das mesmas. A captação de radioatividade observada na bexiga é devida à eliminação renal do complexo HMPAO marcado com ^{99m}Tc . Parte do complexo ^{99m}Tc -HMPAO pode deixar o interior dos leucócitos, iniciando um processo de eliminação renal, minutos após a injeção dos leucócitos radiomarcados^(13,14).

A interpretação das imagens cintilográficas quando se emprega leucócitos marcados requer a comparação da radioatividade da ROI com a radioatividade em uma região referencial normal pré-determinada⁽¹⁵⁾. Neste estudo, a articulação contralateral, tratada com solução salina, foi utilizada como articulação-controle. Em todos os animais a atividade registrada na articulação-foco (ATM inflamada) foi estatisticamente maior que na articulação-controle ($p = 0,0073$). Portanto, fica evidente uma captação maior dos leucócitos

radiomarcados no sítio da inflamação, estatisticamente significativa, cinco dias após a indução do processo inflamatório, o que abre uma perspectiva para a utilização desse método no diagnóstico precoce de desordens inflamatórias da ATM.

A tomografia computadorizada é o método de diagnóstico mais preciso para avaliação dos componentes ósseos da ATM e possíveis alterações estruturais das superfícies articulares^(15,16). Entretanto, as imagens tomográficas obtidas sete dias após as imagens cintilográficas não foram capazes de revelar qualquer anormalidade na região da ATM. Este resultado vem corroborar a hipótese de que os leucócitos radiomarcados podem auxiliar no diagnóstico precoce de focos inflamatórios da ATM, já que esse método se baseia em alterações fisiológicas e não anatômicas. Os eventos vasculares (vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular) e celulares (exsudação de leucócitos) dos processos inflamatórios são características fisiológicas importantes na inflamação aguda. Embora o método de leucócitos radiomarcados seja considerado por alguns pesquisadores^(12,13) como “padrão ouro” para o diagnóstico precoce de inflamação, indiferente da região que se encontra o local da agressão, não há registros na literatura da aplicação deste método na avaliação de processos inflamatórios que envolvam a ATM. Assim, este estudo mostrou que o método de leucócitos autólogos marcados com ^{99m}Tc-HMPAO é capaz de identificar focos inflamatórios na

região da ATM, abrindo nova perspectiva para a utilização da técnica em diagnósticos na área odontológica.

CONCLUSÃO

O método de leucócitos autólogos marcados com ^{99m}Tc-HMPAO mostrou-se eficaz na identificação precoce de focos inflamatórios na ATM em modelo animal.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio financeiro da Fapemig e Capes, à Fundação Ezequiel Dias e à Dra. Carla Flávia de Lima (Ecograf) responsável pela realização das imagens cintilográficas.

REFERÊNCIAS

1. Tominaga K, Alstergren P, Kurita H, Kopp S. Clinical course of an antigen-induced arthritis model in the rabbit temporomandibular joint. *J Oral Pathol Med* 1999;28:268–273.
2. Roca M, Martin-Comin J, Becker W, *et al.* A consensus protocol for white blood cells labelling with technetium-99m hexamethylpropylene amine oxime. *International Society of Radiolabelled Blood Elements (ISORBE)*. *Eur J Nucl Med* 1998;25:797–799.
3. Crusol-Rebello IMR, Campos PSF, Rubira IRF, Panella J, Mendes CMC. Evaluation of the relation between the horizontal condylar angle and the internal derangement of the TMJ – a magnetic resonance imaging study. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17:176–182.
4. Epstein JB, Caldwell J, Black G. The utility of panoramic imaging of the temporomandibular joint in patients with temporomandibular disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;92:236–239.
5. Uysal S, Kansu H, Akhan O, Kansu O. Comparison of ultrasonography with magnetic resonance imaging in the diagnosis of temporomandibular joint internal derangements: a preliminary investigation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94:115–121.
6. Alder ME, Dove SB, Murrah VA, Salinas F, Williams RF. Magnetic resonance spectroscopy of inflammation associated with the temporomandibular joint. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;74:515–523.
7. Peters AM, Danpure HJ, Osman S, *et al.* Clinical experience with ^{99m}Tc-hexamethylpropyleneamineoxime for labeling leucocytes and imaging inflammation. *Lancet* 1986;2:946–949.
8. Roddie ME, Peters AM, Danpure HJ, *et al.* Inflammation: imaging with Tc-99m HMPAO-labelled leukocytes. *Radiology* 1988;166:767–772.
9. Vorne M, Lantto T, Paakkinen S, Salo S, Soini I. Clinical comparison of ^{99m}Tc-HMPAO labelled leucocytes and ^{99m}Tc-nanocolloid in the detection of inflammation. *Acta Radiol* 1989;30:633–637.
10. Martin-Comin J, Cardoso VN, Plaza P, Roca M. Hank's balanced salt solution: an alternative resuspension medium to label autologous leukocytes. Experience in inflammatory bowel disease. *Braz Arch Biol Tech* 2002;45:39–44.
11. Peters AM. The utility of [^{99m}Tc] HMPAO-leucocytes for imaging infection. *Semin Nucl Med* 1994;24:110–127.
12. Martin-Comin J. Clinical applications of radiolabelled blood elements in inflammatory bowel disease. *Quart J Nucl Med* 1999;43:74–82.
13. Rennen HJJM, Boerman OC, Oyen WJG, Corstens FHM. Imaging infection/inflammation in the new millennium. *Eur J Nucl Med* 2001;28:241–252.
14. Palestro C. Radionuclide imaging of the painful joint replacement: past, present and future. *Braz Arch Biol Tech* 2002;45:9–14.
15. Gynther GW, Tronje G, Holmlund AB. Radiographic changes in the temporomandibular joint in patients with generalized osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;81:613–618.
16. Vasconcelos BCE, Silva EDO, Kelner N, Miranda KS, Silva AFC. Meios de diagnóstico das desordens temporomandibulares. *Rev Cir Traumatol Buco-Maxilo-Fac* 2002;2:49–57.