

***ESTUDIO DE RADIOFÁRMACOS UTILIZADOS EN EL
DIAGNÓSTICO DE PROCESOS INFECCIOSOS MARCADOS CON
^{99m}Tc.***

***CARRERA: ESPECIALIZACIÓN EN RADIOQUÍMICA
Y APLICACIONES NUCLEARES.***

Alumno: Ronald Villanueva Alfaro.
Directora: Dra. Graciela Rabiller.

Diciembre, 2011.



UNSAM
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE
SAN MARTÍN

Indice	
Resumen	1

Capítulo 1: Procesos Inflamatorios e Infecciosos, Características.

1.1 Introducción.....	2
1.2 Antecedentes	3
1.3 Objetivos	4
1.4 Fisiología del proceso inflamatorio	5
1.5 Fisiología del proceso infeccioso	9
1.6 Inflamación e infección en prótesis articulares	14

Capítulo 2: Leucocitos marcados: utilidad en el diagnóstico por imágenes de procesos infecciosos.

2.1 Introducción.....	17
2.2 Antecedentes	18
2.3 Objetivos	22
2.4 Marcación de leucocitos como técnica diagnóstica	23
4.4.1 Procedimiento de marcación con ^{99m} Tc-HMPAO.....	29
2.4.2 Consideraciones prácticas de la marcación de leucocitos como técnica diagnóstica.....	35
2.5. Normativa de trabajo para el radiomarcaje de células blancas	37
2.5.1 Metodología de trabajo en una cabina de seguridad biológica	41

Capítulo 3: ^{99m}Tc-Ciprofloxacina: utilidad en los procedimientos de diagnóstico por

imágenes.

3.1 Introducción.....	44
3.2 Antecedentes	45
3.3 Objetivos	50
3.4 Antibióticos, generalidades.....	50

3.5 Ciprofloxacina	54
3.6.1 ^{99m} Tc-Ciprofloxacina.....	56
Conclusiones.....	61
Referencias bibliográficas.....	63

Le sigue el desarrollo del trabajo al índice propuesto, comenzando en la hoja siguiente.

RESUMEN

El tratamiento oportuno de procesos infecciosos representa una gran diferencia en la evolución de los pacientes afectados y su reinserción a la cotidianidad, así mismo, la reducción de costos económicos derivados, tanto en del tratamiento como de la no generación de ingresos por parte de los afectados, constituyen un argumento de peso que justifica la búsqueda de soluciones diagnósticas oportunas que maximicen el porcentaje de recuperación en las poblaciones afectadas.

Desplegar el abanico de herramientas con las que se cuenta actualmente en el campo de la medicina nuclear, además de las que son objeto de investigación representa el objetivo de este trabajo.

La descripción de la utilidad de ciertos radionucleidos en el marco del diagnóstico de procesos infecciosos, el uso de células blancas como radiotrazadores, sus beneficios, precauciones y expansión actual de la técnica, así como las consideraciones prácticas para ejecutarla de la mejor manera en la rutina diaria deben ser conocidas por los profesionales involucrados con las disciplina.

La factibilidad en la disposición y desarrollo de antimicrobianos marcados para diagnósticos generales y específicos, la investigación y potencial aplicación de anticuerpos específicos para las diferentes líneas celulares involucradas en los procesos infecciosos constituyen el cuerpo de esta investigación. Esto con el fin de exponer el panorama actual, tomar conciencia del mismo y a su vez del acelerado desarrollo de la medicina nuclear en diferentes vertientes, en este caso, el diagnóstico diferencial de procesos infecciosos.

CAPÍTULO I

PROCESOS INFLAMATORIOS E INFECCIOSOS, CARACTERÍSTICAS.

1.1 INTRODUCCIÓN

El control de los procesos y enfermedades infecciosas se han convertido actualmente en un objetivo de prioridad internacional. Se estima que a nivel mundial la mortalidad anual asociada a enfermedades infecciosas supera los trece millones de personas, cifra de la cual un desproporcionado número de víctimas corresponde a países subdesarrollados [15].

Se calcula que del total de muertes que se reportan anualmente en países en vías de desarrollo un 40% corresponde a enfermedades infecciosas, mientras que en países del primer mundo el porcentaje correspondiente a decesos por esta misma causa es del 1% [15].

La pérdida de vidas o productividad asociada a la prevalencia de enfermedades infecciosas impacta directamente en la realidad socioeconómica de todos los involucrados, desde los seres individuales hasta los países como un todo. La Organización Mundial de la Salud cataloga actualmente a las enfermedades infecciosas como el asesino más amplio a nivel mundial de niños y adultos jóvenes. El impacto económico final de procesos infecciosos cíclicos a nivel poblacional es la mayor causa de subdesarrollo en muchos países actualmente.

Actualmente la medicina nuclear busca el desarrollo y perfeccionamiento de diversas técnicas que permitan el diagnóstico temprano de diferentes procesos de etiología infecciosa, donde las caracterizaciones histopatológicas y los estudios convencionales no han dado resultados oportunos. Los esfuerzos se enfocan en la ampliación del campo de acción de los radioisótopos tanto en análisis in vitro como in vivo. El radioinmunoanálisis, los ensayos inmunoradiométricos y los métodos moleculares son ejemplos de los procedimientos in vitro. El primero se encarga de la detección del agente causal mediante el uso de anticuerpos e isótopos, los cuales no solamente permiten la localización temprana del ente responsable, sino también el grado de virulencia del cuadro y la evolución del mismo frente a un eventual tratamiento.

Los métodos moleculares con radionucleidos involucran reacciones con polimerasas con el objetivo de detectar el material genético del patógeno. La rapidez, sensibilidad y especificidad de estas técnicas les han permitido una participación activa en estudios epidemiológicos, así como la prevención y manejo de múltiples procesos infecciosos de gran envergadura a nivel mundial.

Las técnicas diagnósticas in vivo utilizando radionucleidos pueden ser clasificadas según proporcionen o no imágenes. Las primeras son las más conocidas pues involucran la administración de un radioisótopo vía intravenosa cuya acumulación en una zona anatómica de interés es detectada mediante el uso de un equipo externo; es aquí donde es aprovechado de manera conjunta el desarrollo tecnológico de sistemas de sección cruzada como la RMN, el SPECT-CT y el PET. Los métodos in vivo que no involucran el uso de imágenes se basan usualmente en la ingestión del radioisótopo por parte del paciente y la posterior medición de muestras sanguíneas o de aliento.

1.2 ANTECEDENTES

Uno de los avances más significativos en el campo de la salud durante el siglo pasado fue el desarrollo y expansión de antibiótico y vacunas destinadas al control y erradicación de diferentes cuadros infecciosos que aquejaron a las diferentes sociedades durante siglos. Sin embargo, a pesar de los logros obtenidos en el manejo de las mismas, optimizar el proceso mediante el diagnóstico oportuno es una tarea parcialmente pendiente.

Ha sido comprobado que los pronósticos alrededor de un proceso de etiología infecciosa varían significativamente según la prontitud del diagnóstico, así mismo los costos involucrados en el tratamiento del paciente disminuyen de manera considerable. La sensibilidad que ofrecen los métodos diagnósticos en medicina nuclear es aprovechada en pro del manejo oportuno tanto de procesos agudos como los que presentan grados de cronicidad considerable, donde la vida del paciente literalmente puede estar condicionada a un diagnóstico acertado.

El discernimiento preciso entre procesos infecciosos y asépticos condiciona directamente el manejo y potenciales consecuencias sobre el paciente, así mismo influye de manera indirecta en realidades tan significativas actualmente como la resistencia a antibióticos. Preguntas como etiología, severidad, causa y ubicación pueden ser respondidas utilizando el radiofármaco adecuado, el cual deberá presentar condiciones de especificidad y seguridad necesarias para garantizar una utilidad amplia y segura.

Realidades como la tuberculosis resistente a múltiples antibióticos han incrementado de manera alarmante los retos con respecto al diagnóstico y manejo de estos procesos. Así mismo, infecciones de difícil detección como abscesos intraabdominales, endocarditis y osteomielitis ven incrementada su dificultad diagnóstica debido a la aparición de nuevos protagonistas, dificultando y retrasando aún más el manejo de las mismas.

Otros conceptos como el reemplazo de articulaciones disfuncionales, de conocimiento humano desde hace miles de años, están presentando sus consecuencias activas para la práctica médica actual desde la segunda mitad del siglo XX. Factores como el aumento en la longevidad social combinado con las exigencias de la población joven han incrementado de manera importante el número de beneficiarios para procedimientos de este tipo, los cuales se calcula que excederán los 700 000 pacientes anuales para el 2030, solamente en los Estados Unidos [24].

Tomando en cuenta el alto porcentaje de las prótesis de cadera y rodilla que presentan infecciones luego de ser sometidas a un procedimiento de revisión (3% y 5% respectivamente), la optimización de los métodos diagnósticos que permitan diferenciar éstas del aflojamiento aséptico se vuelve preponderante.

La introducción de radiofármacos bajo esta finalidad diagnóstica ha incrementado la participación de la medicina nuclear en este campo. Los mismos ofrecen la ventaja de que los cambios fisiopatobiológicos que determinan su funcionalidad ocurren en etapas tempranas del proceso infeccioso, antes de que se presenten cambios anatómicos de compleja o difícil reversibilidad. Ante este panorama se busca ampliar su aplicación en el contexto de la fiebre de origen desconocido, donde se calcula que el 30% (o más para grupos etarios mayores) se debe a causas no infecciosas o se sospecha de procesos enmascarados, con el fin de establecer la necesidad de una terapia antimicrobiana óptima. Estudios realizados bajo esta orientación otorgan a la ^{99m}Tc -ciprofloxacina una especificidad del 100%, aunque una baja sensibilidad, alrededor del 67% [2,10].

1.3 OBJETIVOS

- Describir las características propias de los procesos de Infección e Inflamación con el fin de comprender de una mejor manera la finalidad del procedimiento diagnóstico por imágenes en Medicina Nuclear.

- Exponer la realidad fisiopatológica que acompaña al reemplazo protésico de articulaciones.

1.4 FISIOLÓGÍA DEL PROCESO INFLAMATORIO.

El cuerpo humano tiene múltiples maneras de autoprotección. Las mismas abarcan desde barreras físicas, como la capa externa de queratina de la piel, mediadores bioquímicos potentes que proporcionan una protección relativamente inespecífica contra una amplia gama de microorganismos, por ejemplo, las lágrimas y otras secreciones corporales contienen la enzima lisozima, y una barrera química más elaborada que proporcionan grupos de proteínas sanguíneas como la vía del complemento, entre otras; estas a su vez median una cascada de reacciones enzimáticas que en presencia de ciertas características moleculares de la superficie de algunos microorganismos, conducen a la lisis o aumento en la fagocitosis del agente invasor.

Sin embargo, las estrategias de defensa más complejas, dinámicas y eficaces son realizadas por células especializadas que se desplazan a través del cuerpo para buscar y destruir microorganismos o sustancias extrañas.

Dentro de este grupo se describen los neutrófilos y la serie de monocitos macrófagos, los cuales son células fagocíticas, que actúan principalmente englobando y digiriendo bacterias, desechos celulares y elementos identificados como extraños. Otro conjunto celular es constituido por los linfocitos y sus elementos relacionados, los cuales aunque tienen poca capacidad fagocítica participan en un número considerable de reacciones de protección dentro de la respuesta inmune. Ambas líneas celulares actúan en conjunto y dependen entre sí, en un grado considerable para su máxima eficiencia.

El proceso inflamatorio se puede definir como la respuesta no específica inicial ante la lesión tisular producida por un estímulo mecánico, químico o microbiano. Se caracteriza por la rápida acción humoral y celular, muy amplificada pero controlada, en la cual actúan Citoquinas, la Cascada del complemento, Cininas, Factores de coagulación y fibrinólisis que son disparadas en conjunto por la activación de macrófagos y células endoteliales ante la presencia de elementos considerados como extraños [3].

Esta respuesta local incluye modificaciones anatómicas y fisiológicas fundamentales del sitio involucrado con el fin de favorecer el proceso, como lo

son: vasodilatación, incremento de la permeabilidad microvascular, activación y adhesión celulares y coagulación.

Vasodilatación

Fundamentalmente se caracteriza por un aumento del diámetro vascular y del flujo sanguíneo, con el fin de facilitar el exudado proteínas, mediadores solubles y la migración de leucocitos hacia el tejido o sitio dañado.

El incremento del flujo sanguíneo local es producto de la vasodilatación ocasionada por la acción conjunta del óxido nítrico y derivados del ácido araquidónico como por ejemplo las prostaglandinas vasodilatadoras PGI_2 PGD_2 y PGE_2 , que se producen en el sitio de la injuria [3,8].

La producción y secreción de óxido nítrico en las células endoteliales y leucocitos es mediada y regulada por la enzima óxido nítrico sintetasa (ONSc), y provoca la relajación del músculo liso vascular, la adherencia leucocitaria y la inhibición de la agregación plaquetaria. Su acción sobre el tono vascular se produce tras la reacción con el grupo HEME de la enzima guanilato ciclasa, su consecuente activación y aumento de la producción de GMP cíclico que ejerce un efecto vasodilatador.

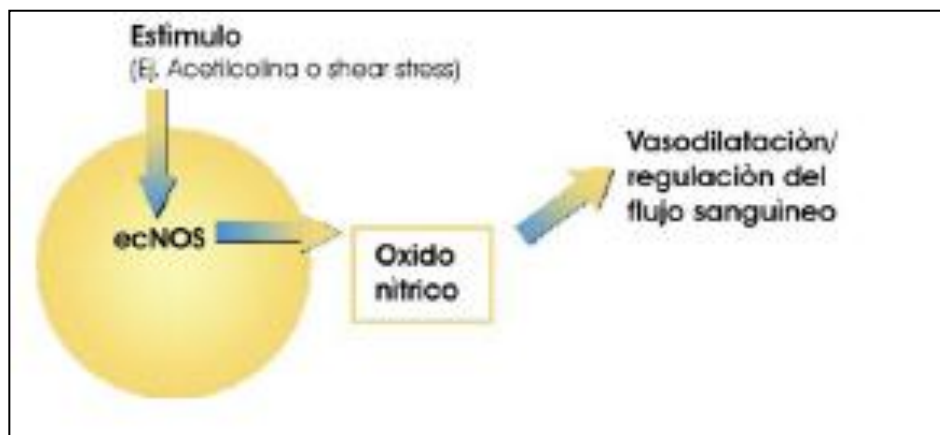


Figura 1. Vasodilatación debido a la producción de Oxido nítrico [3].

Los derivados del ácido araquidónico son compuestos biológicos muy activos, considerados como hormonas locales que ejercen su acción en el lugar donde se sintetizan. Así por ejemplo, el leucotrieno B_4 provoca la agregación de leucocitos polimorfonucleares, e induce su adhesión a células del endotelio vascular, comportándose como un potente quimiotáctico [8].

Al observar los estímulos inespecíficos que conllevan a la liberación del ácido araquidónico (por ejemplo: daño mecánico, isquemia, venenos activos sobre membranas), puede verse que éstos generalmente se manifiestan en estados en los cuales se produce daño celular mediado por la acción de metabolitos reactivos del oxígeno.

Se conoce que en el tejido dañado los leucocitos polimorfonucleares activan la producción de metabolitos reactivos del oxígeno a través de la enzima NADPH oxidasa asociada a su membrana. De tal forma los polimorfonucleares y el endotelio activado, además de generar especies reactivas de oxígeno producen agentes proinflamatorios como son los leucotrienos y prostanoídes derivados del ácido araquidónico, el factor activador de plaquetas y las interleuquinas [8].

Incremento de la permeabilidad microvascular

El proceso vasodilatador que acompaña la inflamación precede a un incremento de la permeabilidad vascular. Este cambio se debe a la retracción de las células endoteliales y al desarrollo de poros transcitoplasmáticos en dichas células, tanto por efecto directo causado por un trauma o agente agresor o por acción de los productos mediadores liberados por los leucocitos.

El proceso ocurre inicialmente en las vénulas postcapilares, con la consecuente exudación de un fluido rico en proteínas desde el compartimiento vascular hacia el compartimiento intersticial. Mediante esta respuesta exudativa se trasladan anticuerpos, proteínas y otros mediadores solubles de fase aguda hacia el sitio comprometido. Este incremento en la permeabilidad vascular es mediado por varios factores que incluyen la histamina, bradiquinina, el factor activador plaquetario, sustancia P y leucotrienos, como por ejemplo C₄, D₄ y E₄ [3,8].

Migración leucocitaria

El proceso exudativo desde el compartimiento vascular trae como consecuencia hemoconcentración y estasis en el sitio afectado. Este proceso facilita el movimiento de leucocitos hacia la superficie endotelial de los capilares y vénulas, (definido como marginación). La activación de las células endoteliales por citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), inicialmente induce expresión en la superficie celular de proteínas llamadas selectinas (SE y SP) que causan una unión débil de los leucocitos a la célula endotelial, proceso denominado rolling.

La producción continua de citoquinas estimula a su vez la expresión de moléculas de adhesión de alta afinidad con las células endoteliales llamadas integrinas (ICAM-1, ICAM-2), las cuales también son expresadas por los leucocitos en su superficie (LFA-1 y MAC-1). La migración de los leucocitos hacia el sitio de la inflamación es mediada por factores quimiotácticos, como productos bacterianos y componentes del complemento (IL-8, LPS, C5).

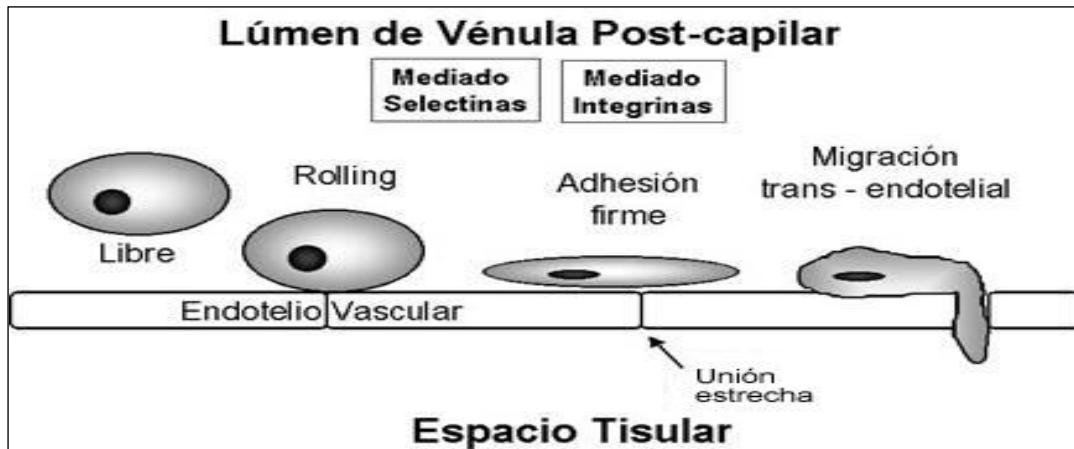


Figura 2. Proceso de Rolling, migración trans endotelial y unión fuerte al endotelio [3].

La respuesta inmune es correctamente controlada y funciona de forma efectiva para limitar la infección y promover la reparación tisular. Normalmente existe un balance entre citoquinas proinflamatorias como el TNF α , interleuquinas (IL-1, IL-12) y el interferón gamma (IFN- γ) y señales antiinflamatorias como las producidas por las interleuquinas IL-10, IL-4, IL-6, el factor de crecimiento transformador β y algunas prostaglandinas.

Interacciones neutrófilos-célula endotelial

Los polimorfonucleares, monocitos macrófagos y las células endoteliales son los efectores celulares de la respuesta inflamatoria. Las células endoteliales expuestas a mediadores humorales y leucocitarios se activan e inician la expresión de moléculas de adhesión y receptores en su superficie que favorecen el paso de polimorfonucleares hacia el tejido afectado, junto con la síntesis y secreción de citoquinas y otros mediadores inflamatorios secundarios como prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, factor activador de plaquetas (PAF), radicales libres de oxígeno, óxido nítrico (NO) y proteasas. Muchos de estos mediadores secundarios son también producidos por los leucocitos.

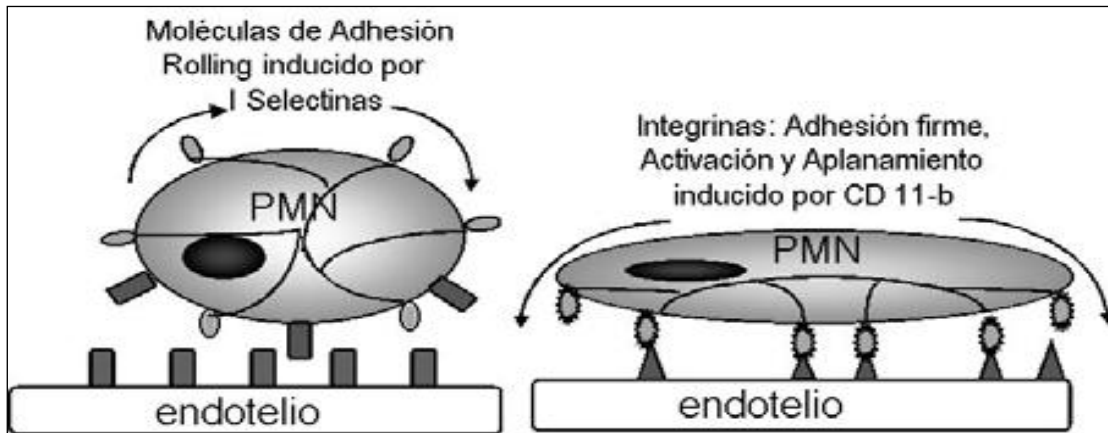


Figura 3. Unión de la célula endotelial y del polimorfonuclear a través de las selectinas e integrinas^[7].

Normalmente las células endoteliales expresan un fenotipo anticoagulante, antiadhesión y vasodilatador. Al ser activadas en el proceso inflamatorio expresan propiedades procoagulantes y proadhesión celular, activando la cascada de la coagulación y originando fenómenos trombóticos locales.

La localización, control y limitación de los procesos inflamatorios es vital para obtener una respuesta fisiológica protectora adecuada. La pérdida de este control local o una respuesta exagerada se traduce en manifestaciones clínicas anormales que son englobadas bajo el término de Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, SIRS.

1.5 FISIOLÓGÍA DEL PROCESO INFECCIOSO.

Las manifestaciones clínicas del proceso infeccioso guardan relación directa con la intensidad de la respuesta que el organismo desarrolla frente al agente causal. Es por ello que se concluye que los determinantes antigénicos de los agentes invasores actúan como detonantes de la respuesta inmune, que es la responsable directa en última instancia de los efectos deletéreos de las enfermedades infecciosas. La detonación de esta respuesta se materializa mediante la comunicación intercelular, que garantiza la activación de las células inmunes ^[34].

La naturaleza del elemento antigénico marca de alguna manera el tipo e intensidad de la respuesta y ésta es una de las causas de diferencia entre las manifestaciones clínicas de infección por un germen u otro.

En la membrana externa de todas las bacterias gramnegativas se encuentra el LPS, endotoxina que interactúa con el sistema retículoendotelial al igual como lo

hacen las exotoxinas estafilocócicas, los glucolípidos de las micobacterias y los mananos de la pared celular de las levaduras provocando así el estado séptico.

El LPS es un lipopolisacárido compuesto, formado por un componente antigénico variable y una porción constante denominada lípido A. Es un componente vital de la pared celular de estas bacterias, y constituye la fracción capaz de inducir la producción de interleuquina 1 (IL1), factor de necrosis tumoral (FNT), interferón γ (INF γ), inhibidor del plasminógeno, factor hístico de adhesión, y prostaglandinas (PG). En resumen, el lípido A es el responsable de disparar la respuesta del huésped frente a infecciones por gérmenes gram negativos [3].

En el caso de bacterias gram positivas el ácido murámico se destaca por ser un potente inductor de mediadores proinflamatorios, además de que la muramina en particular, por su similitud con los mediadores del sueño, es productora de una marcada somnolencia [34].

Cuando la endotoxina invade el torrente circulatorio se une a una variada gama de proteínas, destacando sin embargo una especial afinidad por una proteína ligante específica (proteína de fase aguda de síntesis hepática) denominada proteína ligante de lipopolisacáridos (LBP). Este complejo LPS-LBP entra en contacto con el monocito a nivel sanguíneo o con el macrófago a nivel tisular produciendo la activación celular.

Esta interacción es mediada por un receptor específico de membrana (CD14), el cual al ser activado transmite una señal intracelular a través de una proteína transmembrana llamada TLR4 para gram negativos y TLR2 para gram positivos, las cuales inducen la activación de mediadores intracelulares como las proteinquiinasas y el factor nuclear $K\beta$ que inician los procesos de transcripción génica para el TNF α , el cual es sintetizado en forma de preproteína, que finalmente ser secretada como factor de necrosis tumoral α maduro.

El TNF α y la IL-1 determinan la fisiopatología del estado infeccioso a través de sus efectos sobre la regulación de la temperatura, la resistencia y la permeabilidad vasculares, la médula ósea (aumento de los leucocitos) y numerosas enzimas tales como la lactatodeshidrogenasa y la lipoproteínlipasa, las cuales modifican el consumo de energía a nivel de varios tejidos.

Muchos de los efectos de las citoquinas son mediados a nivel de los tejidos efectores por el óxido nítrico, las prostaglandinas, los eicosanoides, el factor activador plaquetario y los derivados de la lipooxigenasa. La IL-1 y el TNF α estimulan la elaboración de otras citoquinas, lo que desencadena un efecto cascada

con múltiples funciones de amplificación y regulación a medida que las citoquinas inducen a otras citoquinas.

Un factor especialmente importante puede consistir en la producción local de IL-8 por los fibroblastos, células endoteliales y células mononucleares en la sangre periférica; esta citoquina cumple la función de reclutar y activar leucocitos polimorfonucleares que ulteriormente pueden provocar lesiones tisulares.

Durante las infecciones intensas el organismo también produce mayor cantidad de un grupo diferente de proteínas séricas conocidas como las proteínas de fase aguda, algunas de las cuales tienen efectos antimicrobianos, promoviendo su destrucción por la cascada del complemento.

Sistema del complemento (C_{5a})

La cascada del complemento forma parte del sistema y actúa produciendo lisis de células, bacterias y virus recubiertos; media el proceso de opsonización de patógenos facilitando su fagocitosis y produce fragmentos peptídicos que regulan las características de la respuesta inflamatoria e inmunitaria.

El sistema complemento puede ser activado por diferentes vías. La vía clásica constituida por el complejo antígeno-anticuerpo, la alternativa por la acción de los mismos anticuerpos o incluso mediante fracciones antigénicas aisladas. El grupo amino terminal de proteólisis de C₃, C₄ y C₅ liberan pequeños péptidos catiónicos, que se unen a receptores acoplados a la proteína G, en la superficie de varios tipos de células. La activación de estos receptores causa quimiotaxis de leucocitos, liberación de enzimas desde los gránulos citoplasmáticos y de citoquinas.

Citoquinas

Las citoquinas son los mensajeros fisiológicos de la respuesta inflamatoria. Son polipéptidos cuya función fundamental es intervenir en la transmisión de señales intercelulares. A diferencia de las hormonas endocrinas clásicas, las citoquinas son producidas por varios tipos de células más que por órganos específicos, de manera consecuente a distintos estímulos, principalmente exógenos y con frecuencia ejercen efectos fundamentalmente paracrinos.

Las citoquinas constituyen una gran familia de glicoproteínas de bajo peso molecular, que incluye: INF, interleuquinas (ejemplo: IL-1, IL-6 e IL-8), FNTα,

factores de crecimiento (FC), factores transformadores de crecimiento, factores estimulantes de colonias y quimoquinas. Se unen a receptores específicos de sus células blanco, provocando en éstas modificaciones que llevan a la síntesis y liberación de mediadores secundarios, por ejemplo en la inflamación inducen la liberación de otras citoquinas, óxido nítrico (NO) o metabolitos del ácido araquidónico (prostaglandinas y leucotrienos).

La infección es el mayor estímulo para la liberación de citoquinas por la acción de endotoxinas bacterianas, que son reconocidas por las células del sistema inmune innato. Otros estímulos no infecciosos pueden de igual manera inducir su síntesis y liberación desencadenando la reacción inflamatoria. Estos mediadores son capaces de establecer una verdadera red de acción, pues sus efectos muchas veces se superponen, contrarregulan o retroalimentan y además su producción habitualmente obedece a cambios en la homeostasia, por lo que su síntesis es constante y no son almacenadas a nivel celular.

Durante el proceso infeccioso, su acción global puede dividirse en dos ámbitos, uno pro inflamatorio, donde participan el FNT, IL-1, IL-6 e IL-8 y un segundo contrarregulador o antiinflamatorio, donde toma participación la IL-4, IL-10, IL-13, antagonista del receptor de la IL-1 (IL1ar), receptores solubles de FNT (FNTrs) y FC de linfocitos T [143].

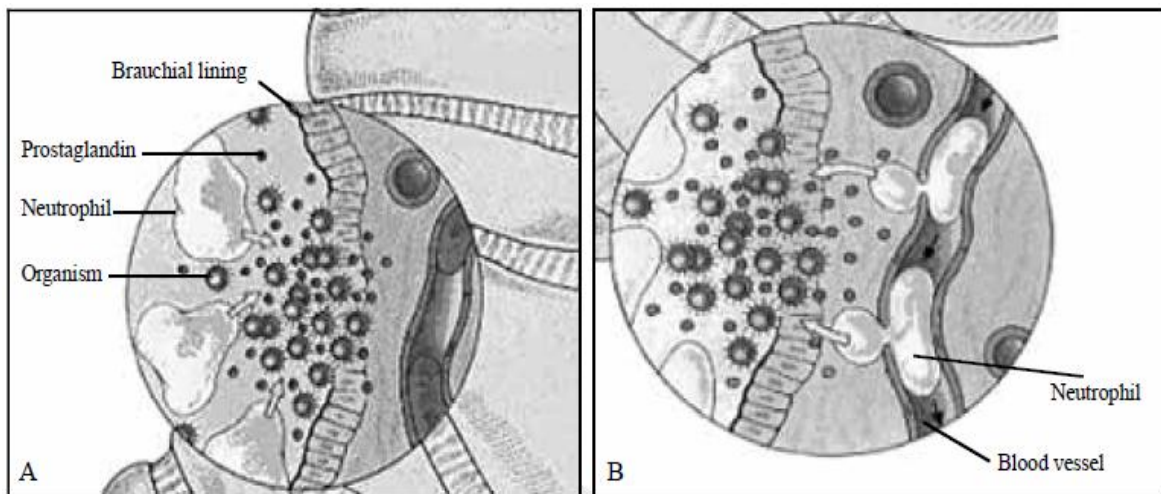


Figura 4. A. Quimiotáxis: la secreción de mediadores como histamina y prostaglandinas favorece la acumulación de leucocitos en el sitio de la infección. B. Incremento en la permeabilidad vascular que favorece el paso de leucocitos y macromoléculas [23].

El primer grupo presenta la iniciativa dentro del proceso, dentro del amplio grupo de sustancias que median la inflamación, y en las primeras cuatro a seis horas a

partir de la infección los monocitos y células endoteliales activadas garantizan niveles capaces de dar los primeros signos y síntomas como: fiebre, taquicardia y taquipnea además de iniciar por diferentes vías la activación del resto de los sistemas implicados que algunos denominan mediadores de segunda línea y que son los encargados de amplificar y profundizar la respuesta iniciada [143].

Paralelo a ello, y con origen en las mismas células, el grupo contrarregulador limita la hiperproducción de citoquinas, contrarrestando algunos de sus efectos deletéreos y obstaculizando la unión de algunas de las proinflamatorias a sus células diana [34].

En resumen, el proceso infeccioso puede describirse en tres estadios. En el estadio I en respuesta a una injuria se producen citoquinas que ponen en marcha un mecanismo local con liberación de mediadores destinado a la curación de heridas y al reclutamiento de células del sistema inmunitario.

Si la agresión es de suficiente magnitud se ingresa al estadio II, caracterizado por la liberación hacia la circulación de pequeñas cantidades de citoquinas que amplifican la respuesta local. Así pues, el TNF α , IL-1 β e IL-6 aparecen en la circulación, se reclutan macrófagos y plaquetas. En esta etapa se presentan los signos clínicos y de laboratorio que ponen de manifiesto la activación de la cascada inflamatoria. Puede presentarse fiebre y se estimula la hipófisis para liberar hormonas relacionadas al estrés y al hígado para sintetizar reactantes de fase aguda, tales como la proteína C reactiva y el fibrinógeno.

Esta respuesta de fase aguda es estrictamente controlada por la liberación simultánea de antagonistas endógenos (receptores solubles de TNF, antagonistas del receptor de IL-1, IL-4 e IL-10) con propiedades antiinflamatorias. Esta situación continúa hasta que ocurre la reparación tisular o curación de la herida, la infección se resuelve y la homeostasis se restaura, un ejemplo típico es el postoperatorio.

En caso de que la homeostasis no sea restablecida el proceso progresa al estadio III (SIRS), donde se inicia una respuesta sistémica masiva. El efecto de las citoquinas se transforma en deletéreo y los mediadores inflamatorios disparan distintas cascadas con activación sostenida del sistema retículoendotelial, pérdida de la integridad microvascular y disfunción de órganos distantes al sitio afectado inicialmente.

1.6 INFLAMACIÓN E INFECCIÓN EN PRÓTESIS ARTICULARES.

Los reemplazos articulares en cadera, rodilla, hombro y codo han llegado a ocupar un lugar habitual en las listas de procedimientos quirúrgicos. Los reemplazos protésicos han adquirido gran relevancia para el mejoramiento de las condiciones de vida de cientos de miles de paciente a nivel mundial con problemas de discapacidad y artritis.

Las prótesis articulares actuales son fabricadas utilizando combinaciones entre aleaciones metálicas (Cobalto-Cromo, o Titanio) y materiales plásticos (polietilenos ultra livianos), las cuales pueden ser atacadas por las células óseas del paciente receptor de múltiples maneras.



Figura 5. Derecha: prótesis de cadera y sus diferentes componentes. Centro: ubicación anatómica. Izquierda: cabeza con textura porosa para favorecer el crecimiento óseo [24].

La fijación de las mismas al hueso puede darse mediante el uso de adhesivos como el polimetilmetacrilato o mediante la inserción en la zona de segmentos óseos de crecimiento interno, los cuales son recubiertos con una capa porosa. Los componentes acetabulares pueden incluir la fijación a presión y el uso de tornillos ortopédicos con el fin de asegurar el sitio de inserción. Esfuerzos recientes buscan la texturización de la superficie protésica y la inclusión de hidroxiapatita, con el fin de estimular la fijación, el crecimiento y formación de hueso, esto con el fin de evitar el uso de adhesivos. [25,29].

El aflojamiento aséptico es radiográficamente evidente en más del 50% de las prótesis, y es usualmente un proceso inflamatorio dual prótesis-paciente. Los residuos particulados producidos por fragmentación activan los fagocitos tisulares presentes normalmente alrededor de la prótesis. La fagocitosis fallida de los mismos estimula citoquinas proinflamatorias y la secreción de enzimas

proteolíticas que dañan tanto el tejido óseo como el cartilaginoso, provocando consecuentemente osteólisis, pérdida del soporte óseo y finalmente de la prótesis.



Figura 6. Prótesis de rodilla, sus diferentes componentes y su ubicación en el componente óseo.

Histopatológicamente se desarrolla una estructura pseudomembranosa alrededor de la interfase adhesivo-hueso, la cual se convierte en sustrato potencial para el proceso infeccioso. Se ha determinado que componentes del sistema protésico como el polimetimetacrilato predisponen el espacio articular y al tejido óseo a procesos sépticos.

El proceso se da tras la conjunción de varios factores. Está demostrado que glicoproteínas plasmáticas propias como la fibronectina incrementan la adherencia del *S. aureus* al polimetilmetacrilato, y que muchas bacterias elaboran matrices fibrosas de exopolisacáridos que favorecen su crecimiento y la elaboración de finas biocapas protectoras que ocultan al patógeno de las defensas inmunológicas circulantes y los antibióticos sistémicos. El resultado final es la disminución de la cantidad de microorganismos necesarios para iniciar el cuadro infeccioso. Se ha determinado in vitro que el adhesivo no polimerizado inhibe la fagocitosis y la acción linfocítica y del complemento [25].

La composición de la pseudomembrana formada es variada, en la mayoría de los casos se da la presencia de histocitos y células gigantes, encontrándose linfocitos, células plasmáticas y neutrófilos en porcentajes menores. La presencia de éstos últimos constituye una diferencia importante en el diagnóstico diferencial entre el proceso infeccioso y el aflojamiento aséptico [25,29].

Las tasas de infección iniciales luego de la colocación de la prótesis ronda entre el 1-2%, creciendo de 3-5% luego de realizar procedimientos de revisión. Aproximadamente un tercio de las mismas se presentan en los primeros tres meses, un segundo tercio en el primer año y la fracción restante en periodos

mayores a un año o estadios posquirúrgicos. La remoción del implante es un procedimiento necesario para el tratamiento del proceso infeccioso, pero puede tener consecuencias como defectos óseos, acortamiento de la extremidad afectada y daños funcionales severos [25,29].

Se han identificado ciertas poblaciones de pacientes con características predisponentes para sufrir este problema. Entre ellas se destacan individuos con cirugías previas en el sitio de la prótesis, estados de inmunosupresión, edad muy avanzada, pobre estado nutricional, obesidad o enfermedades de fondo como artritis reumatoide, psoriasis y diabetes mellitus [25].

El proceso se desarrolla principalmente por dos vías patogénicas, la contaminación por vía hematógena que constituye del 20-40% de los casos y la introducción del agente infeccioso a través de una herida cercana al sitio de la prótesis o la contaminación de la misma durante el proceso quirúrgico [25].

Cualquier proceso que retrase la cicatrización normal incrementa el riesgo de infección. Necrosis isquémica, hematomas infectados y abscesos en el sitio de la sutura son predisponentes usuales para el proceso séptico. Esta situación se debe a que en los primeros días pos cirugía las capas fasciales no han cicatrizado en su totalidad, por lo tanto el tejido periprotésico profundo no se encuentra protegido por las barreras físicas usuales. Aunque la frecuencia de los casos atribuible a un grupo etiológico definido varía según los diferentes estudios, en general los bacilos gram negativos (25%), estafilococos cuagulasa negativos (22%), *Staphylococcus aureus* (22%) y microorganismos anaerobios (10%) son los agentes causales más comunes [25].

Se debe rescatar la importancia de realizar un diagnóstico rápido del proceso. El mismo no puede ser realizado únicamente basados en las manifestaciones clínicas, las mismas no son excluyentes en cuanto si el proceso es infeccioso o aséptico, así mismo, muchas de las evidencias obtenidas a partir de los estudios radiológicos toman mucho tiempo para ser notadas (en un periodo de tres a seis meses después de iniciado el proceso) ocasionando daños importantes en la integridad del paciente, muchos de los cuales pueden ser irreversibles. Por ejemplo, para lograr un diagnóstico acertado por vía radiológica de osteomielitis debe existir entre el 30 % y el 50 % de descalcificación, para que aparezcan diferencias de densidad ósea (signo de daño tisular) que permiten hacer la detección [25,26].

CAPÍTULO II

LEUCOCITOS MARCADOS: UTILIDAD EN EL DIAGNÓSTICO POR IMÁGENES DE PROCESOS INFECCIOSOS.

2.1 INTRODUCCIÓN

El proceso de elaboración de radiofármacos que permiten el diagnóstico de procesos infecciosos presenta algunos inconvenientes puntuales. El primero de ellos se relaciona con la complejidad que representa el proceso de marcaje de glóbulos blancos, definido como el gold estándar en este tipo de diagnósticos. Este procedimiento implica un tiempo de preparación prolongado, experiencia, facilidad y habilidad del operador, que disminuyan el riesgo ligado a la trasmisión de enfermedades por la manipulación de elementos y fluidos sanguíneos.

Con el fin de eliminar el manejo celular ex vivo se han desarrollado trazadores de células blancas que permitan implementar la técnica in vivo en el paciente. El más ampliamente utilizado involucra un fragmento de anticuerpo el cual se enlaza al epítipo NCA-90 en las células blancas [27].

Un segundo inconveniente surge al momento de determinar si el proceso inflamatorio esta directamente asociado a un ente infeccioso o se encuentra relacionado con otra causa de fondo, pregunta clave cuya respuesta determinará la continuación de un ciclo antibiótico. Para resolver este problema se investiga el posible desarrollo de marcadores que no interactúen con los mediadores del proceso inflamatorio propios del hospedero, sino con los detonantes del mismo presentes en el organismo infeccioso.

Otra estrategia en desarrollo que permita el diagnóstico oportuno de focos infecciosos consiste en el marcaje de antibióticos con ^{99m}Tc . En este ámbito se corren actualmente estudios clínicos con el objetivo valorar el marcaje de antibióticos ya existentes y optimizar tanto el grado de interacción con las bacterias como patrones de biodistribución.

Así mismo, nace la expectativa de desarrollar técnicas para el marcaje de otras drogas específicas para la identificación de infecciones ocasionadas por hongos o parásitos, cuyo diagnóstico oportuno será de gran beneficio principalmente en grupos de pacientes contagiados con VIH [27].

2.2 ANTECEDENTES

Los radiofármacos utilizados en el diagnóstico de procesos infecciosos han sido clasificados generalmente en específicos y no específicos. La distinción entre ambos lo marca el mecanismo de acción de cada uno de los grupos. Sin embargo, ambos deben compartir una serie de características ideales para su uso con este fin, entre ellas se describen: a) un alto y rápido porcentaje de localización en el sitio afectado, b) debe permanecer en el sitio blanco el tiempo suficiente para permitir la obtención de la imagen, c) la captación en sitios no afectados debe ser mínima, d) el grado de captación debe ser proporcional a la magnitud del proceso infeccioso, e) el agente debe ser marcable con ^{99m}Tc y presentar la facilidad de ser formulado en forma de kit, f) el proceso de marcación debe ser simple, g) el kit formulado debe presentar alta estabilidad, h) debe ser de bajo costo, i) debe presentar una dosimetría razonable y mínima respuesta inmune^[23].

Los agentes no específicos actúan basados únicamente en su capacidad de localizar el sitio en el cual se desarrolla el proceso inflamatorio, bajo el supuesto de que el mismo se encuentra acompañado por una infección.

Los agentes denominados específicos, que también muestran algún grado de inespecificidad, presentan algún grado de interacción con los componentes del sistema inmune del hospedero o con el ente causal del proceso, lo cual incrementa la efectividad del diagnóstico.

Como agente específico de referencia se ha designado a las células blancas marcadas con ^{111}In . Debido a variables como disponibilidad, costo y la obtención de imágenes de mejor calidad, la técnica de marcaje de células blancas ha sido modificada con la finalidad de utilizar ^{99m}Tc . Sin embargo, el uso de uno u otro radionucleido no exime a la técnica de inconvenientes, principalmente y en particular la manipulación de muestras sanguíneas del paciente, las cuales deben reinyectarse, esta realidad exige entrenamiento y una logística adecuada que reduzca al mínimo la probabilidad de accidentes, errores y contaminación cruzada^[19].

Ante los inconvenientes que presenta el marcaje de células blancas se invierten esfuerzos importantes con el fin de desarrollar procedimientos alternativos, es imperativa la necesidad de explorar diferentes opciones bioquímicas con el fin de obtener mejores imágenes diagnósticas, aclaramientos sanguíneos más rápidos y menor tasa de irradiación para los tejidos circundantes al trabajar tanto con ^{99m}Tc como con otros radioisótopos, sin embargo, el empleo de radiofármacos siempre trae consigo desventajas como costo, disponibilidad o rendimiento.

Los esfuerzos en esta dirección han fructificado. Investigaciones se han orientado al marcaje de péptidos catiónicos antimicrobianos, como por ejemplo la ubiquidina (UBI), presente en la fracción citosólica de macrófagos murinos activados con IFN- γ específicamente el fragmento sintético comprendido entre los aminoácidos 29 y 41.

Los ensayos han demostrado estabilidad en la marcación del péptido con ^{99m}Tc tanto mediante el método directo como indirecto. En el primero de los casos los estudios se han realizado utilizando BHK₄ como agente reductor, o sin éste. Experiencias realizadas en pacientes han demostrado alta especificidad y sensibilidad en el diagnóstico de osteomielitis vertebral. Debe tomarse en cuenta que los resultados obtenidos en ensayos de este tipo se encuentran condicionados por variables como la cantidad de unidades formadoras de colonias presentes en el sitio de infección, el agente causal del proceso y la cantidad de radiofármaco utilizado en cada uno de los ensayos. La marcación de ubiquidina mediante el método indirecto ha permitido la para la elaboración de kits con y $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-UBI 29-41}$ [9,19,23].

Las formulaciones investigadas presentaron elevada unión a bacterias y un perfil de eliminación preferiblemente renal para los dos primeros casos y hepato biliar para el tercero. Su administración en animales demostró especificidad para la localización de procesos infecciosos en periodos aproximados a las 2 horas pos inyección, y los ensayos realizados en fase I con $^{99m}\text{Tc-[EDA]-HYNIC-UBI 29-41}$ demostraron buenos resultados en la detección de procesos infecciosos ocasionados por *Candida albicans* y *S. aureus*, además de la ausencia de efectos adversos y una aclaración renal muy rápido en las primeras 24 horas pos inyección (85%) [9,19,23].

Otra molécula en análisis, clasificada como un marcador inespecífico, es el monómero biotinado de ácido etilendiaminotetracético (EB1). Éste también presenta la facilidad de ser producida como kit con alta estabilidad tanto in vivo como in vitro, alta actividad específica y facilidades para el marcaje con ^{99m}Tc [19].

Novedosos trabajos han sido expuestos sobre el marcaje de interleuquinas (IL-1, IL-2, IL-8), el factor plaquetario PL-4, el factor del complemento C_{5a} y péptidos de enlace a receptores en leucocitos, como el péptido quimiotáctico formil-Met-Leu-Phe (fMLP) entre otros [23].

Otros desarrollos fuertes se orientan al marcaje de anticuerpos antigranulocitos como el anti NCA-95 IgG, el anti SSEA-1 murino con IgM y el comercialmente ya disponible sulesomab, diseñado a base de fragmentos del anticuerpo monoclonal

murino antigranulocitos Immu-MN3 Fab'-SH. El Immu-MN3 es un antígeno que se encuentra sobre expresado en granulocitos activos durante los procesos inflamatorios. El uso de la formulación comercial se indica para el diagnóstico y localización de procesos infecciosos a nivel óseo en pacientes con sospecha de osteomielitis, o compromisos a nivel de extremidades inferiores como procesos ulcerativos propios del paciente diabético [21,23].

En este caso se presume que la unión a la célula blanco se produce posterior a la extravasación del anticuerpo marcado hacia el sitio de infección, donde se liga a las células blancas presentes en el medio. Los estudios realizados con ^{99m}Tc -sulesomab evidenciaron una buena correlación en los resultados obtenidos al ser comparado con ^{67}Ga -citrato en el diagnóstico de osteomielitis en pie diabético.

Otros estudios realizados compararon el sulesomab con leucocitos marcados con ^{99m}Tc -HMPAO en el diagnóstico de enfermedades inflamatorias a nivel intestinal y apendicitis no aguda con resultados positivos. Otros ensayos positivos se han realizado para el diagnóstico de aspergilosis pulmonar, infecciones de tejidos blandos e infecciones prostéticas articulares [23,27].

Un aspecto positivo de esta formulación ha sido la no aparición de Anticuerpos Antimurinos Humanos (HAMA) después de la administración del radiofármaco, ni elevación en los niveles de HAMA en aquellos pacientes con HAMA preexistente debido a la ausencia de la sección Fc del anticuerpo [21,23].

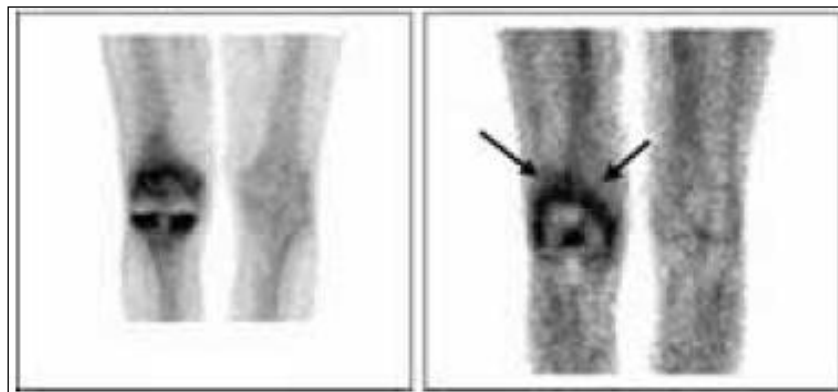
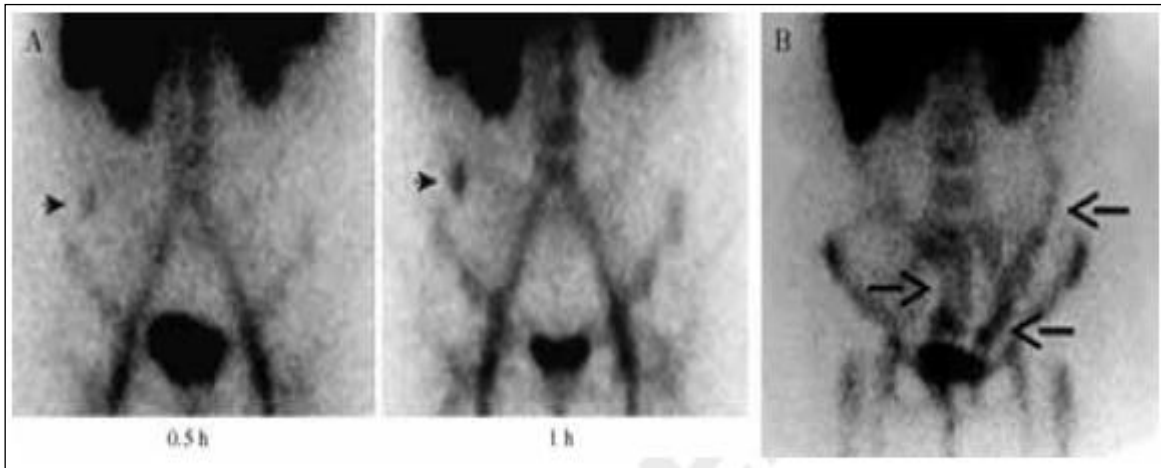


Figura 7: Imagen diagnóstica de un proceso a nivel de fémur con ^{99m}Tc -sulesomab [23].

El marcaje de neutrófilos también ha sido estudiado y desarrollado con el mismo fin diagnóstico, sobresaliendo el fanolesomab, anticuerpo monoclonal murino anti CD-15 IgM. La acumulación y posterior activación de los neutrófilos durante en el sitio de infección favorece la sobre expresión de CD15, y consecuentemente la adhesión del ^{99m}Tc -fanolesomab en el periodo de una hora pos inyección. Es

importante señalar que durante los ensayos el incremento en los pacientes de la



respuesta al HAMA no fue significativo.

Figura 8: A) Imagen diagnóstica de apendicitis con ^{99m}Tc -fanolesomab 30 y 60 minutos pos inyección, se observa la captación en el cuadrante superior derecho. B) Diagnóstico de un proceso infeccioso utilizando fanolesomab en un paciente con HIV [23].

La precisión en la evaluación diagnóstica de procesos infecciosos óseos protésicos utilizando radiofármacos ronda alrededor del 50-70%, y aunque la combinación de técnicas permite una precisión del 70-80%, ofreciendo modestas mejoras en la calidad de la imagen, no permite diferenciar un aflojamiento protésico aséptico de un proceso infeccioso [29].

De manera paralela se utilizan radioisótopos sin ligando para centelleogramas óseos, con este objetivo las técnicas han sido mejoradas, aumentando su eficiencia y sensibilidad. Sin embargo aún es prácticamente imposible diferenciar procesos osteolíticos, ambos presentes en procesos infecciosos y asépticos.

El ^{67}Ga -citrato es uno de los radioisótopos usados con este fin, presentando características provechosas para el diagnóstico por imágenes como por ejemplo un periodo de semidesintegración adecuado con su mecanismo de acción (78.2 h), alta solubilidad a pH fisiológico, estabilidad in vitro a temperatura ambiente (≤ 7 días).

Se describen dos mecanismos de acción del ^{67}Ga en el diagnóstico de procesos infecciosos. El primero, de poca importancia, es la captación por parte de los leucocitos y el segundo es la captación en moléculas confluyentes a sitios de inflamación como la lactoferrina (producida por los leucocitos) y los sideróforos

(moléculas solubles producidos por bacterias con el fin de facilitar el transporte de hierro).

La similitud química entre el Ga^{+3} y el Fe^{+3} favorece una alta afinidad del radioisótopo y el receptor CD71 de la transferrina, y posteriormente el transporte de éste al sitio de infección, donde se enlaza a con la lactoferrina, cuya presencia está fisiológicamente definida con el fin de secuestrar el hierro presente en el medio e inhibir de esta manera el crecimiento bacteriano. Sin embargo, a pesar de estas características el ^{67}Ga no presenta especificidad para procesos infecciosos sobre inflamatorios.

Otro trazador que despertó interés en su momento fue la ^{18}F -FDG, pues consideró el incremento metabólico y consecuente consumo de glucosa por parte de la fracción leucocitaria presente en el sitio afectado. Sin embargo a pesar de la alta sensibilidad de la técnica, la presencia de células blancas tanto en procesos sépticos como asépticos disminuyó la especificidad y precisión del diagnóstico, aunque debe resaltarse su utilidad en el diagnóstico de espindilodiscitis [23,29].

Las imágenes utilizando leucocitos marcados presentan mayor utilidad en la detección de procesos inflamatorios mediados por neutrófilos, pues teóricamente éstos están ausentes en procesos asépticos. Sin embargo, como se mencionó anteriormente los resultados presentan amplia variabilidad en la precisión de la técnica, atribuible al grado de cronicidad del proceso y a la “poca especificidad” del proceso inflamatorio.

OBJETIVOS

- Identificar las características y procedimientos relacionados a la preparación y marcaje con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ de células blancas en Medicina Nuclear para el diagnóstico de procesos infecciosos de origen diverso.

2.4 MARCACIÓN DE LEUCOCITOS COMO TÉCNICA DIAGNÓSTICA.

Desde su introducción hace más de treinta años, como procedimiento diagnóstico en medicina nuclear, la técnica de marcaje de células blancas continúa presentando modificaciones y mejoras, involucrando desde departamentos de investigación hasta unidades de Radiofarmacia con el fin de encontrar nuevas y

mejores aplicaciones que permitan resolver un conjunto de “vacíos diagnósticos” que persisten aún en el ambiente clínico.

A nivel de laboratorio, técnicas de cosecha celular que incluyen el uso de gradientes de densidad, centrifugación isopícnica, elutriación centrífuga y citometría de flujo, entre otras, han sido desarrolladas con el fin de aislar granulocitos y linfocitos-monocitos de las muestras sanguíneas, sin embargo los resultados, además de costosos, han proporcionado rendimientos de marcación poco satisfactorios, entre el 30-40%, y en otros se ha favorecido la activación metabólica y consecuentemente bajas tasas de sobrevivencia celular, inadecuadas para realizar estudios *in vivo* [35].

Ligandos lipofílicos.

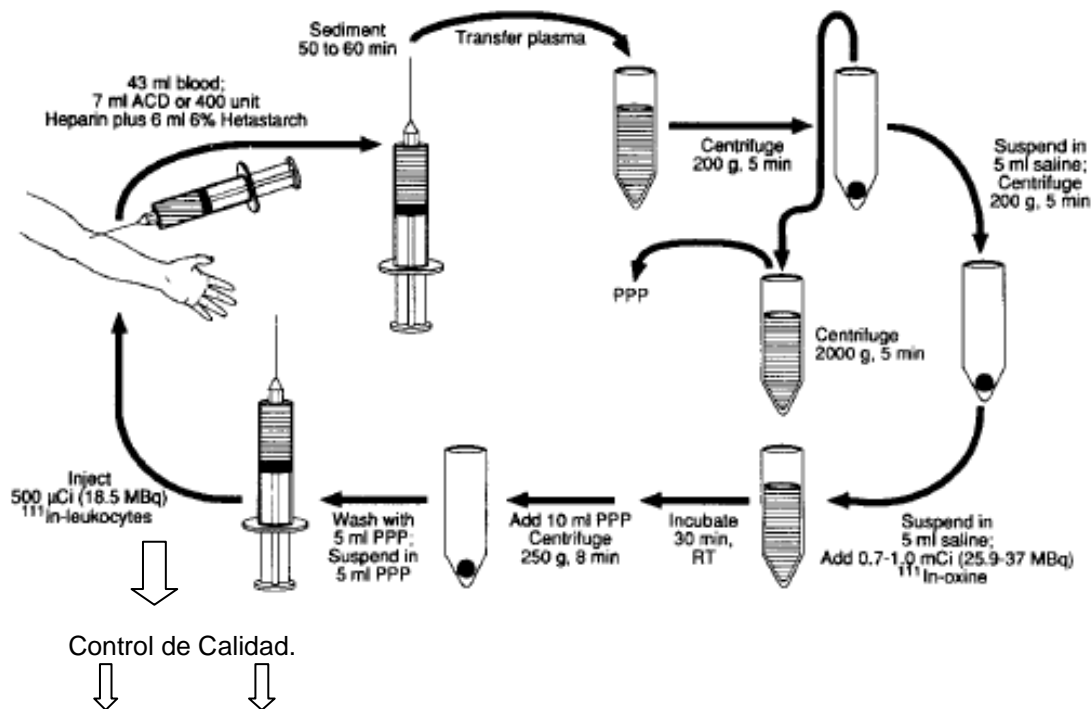
El uso de quelantes no polares, solubles en medios orgánicos, es aún la manera más efectiva de realizar el marcaje de leucocitos. Los mismos han sido ensayados con diferentes radioisótopos como ^{32}P , ^{51}Cr , ^{125}I , ^{67}Ga y ^{111}In , siendo con este último que se logró el desarrollo del ^{111}In -oxina, radiofármaco que ha presentado alta eficiencia para el marcaje de esta línea celular. Sin embargo, presenta como desventaja que su marcaje eficiente se debe llevar a cabo en ausencia del plasma, debido a que el ^{111}In transquela con facilidad de la oxina a la transferrina, resultando un complejo ^{111}In -transferrina que no logra ingresar a la célula [23,35].

Otras opciones desarrolladas con resultados positivos son el ^{111}In -tropolona y el ^{111}In -mercapto-piridina-N-óxido, aunque su uso no ha sido tan difundido. Además otros factores como costo, abastecimiento y características físicas propias del ^{111}In se han convertido en puntos en contra de estas opciones de marcaje.

Ante esta situación el uso de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ha crecido y tomado forma definida como técnica de marcación, aprovechando particularidades como bajo costo, amplia disponibilidad y una emisión de energía excelente para la obtención de imágenes. Muchos esfuerzos se han orientado con el fin de lograr adaptar los mismos quelantes utilizados con el ^{111}In al $^{99\text{m}}\text{Tc}$, manteniendo siempre la viabilidad celular evitando el daño o activación de la misma durante el aislamiento y desarrollo del marcaje.

No debe olvidarse el hecho de que los linfocitos son muy sensibles al daño por radiaciones ionizantes, y al respecto existen pocos estudios clínicos. Según los mismos, luego de marcar glóbulos blancos con una actividad de 740 MBq de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO el daño por radiación que sufren los linfocitos por la radiación sobre sí mismos se ha estimado un equivalente a 26 Gy de rayos X. Debido a la

inhibición completa de su capacidad proliferativa que muestran los linfocitos frente a dosis altas de radiación es importante considerar el riesgo de daño al que se exponen estas líneas celulares tras ser realizado un estudio centelleográfico de este tipo [35].



Viabilidad celular Rendimiento de Marcación.

Figura 9: Proceso de marcación de Leucocitos con ¹¹¹In-oxina [14].

Estudios in vitro realizados al administrar 100 MBq de granulocitos marcados con ^{99m}Tc determinó que los mismos absorbieron 1.8 Gy de radiación después de 25 minutos, y 8.4 Gy al cabo de cuatro horas. Sin embargo no evidenciaron signos de daño por radiación [35].

Debido a que muchos y diversos factores afectan la eficiencia del procedimiento de marcación, deben tenerse en cuenta ciertas consideraciones al momento de realizar la misma, desde precauciones propias en el manejo de las células, factores condicionantes ligados a la técnica en sí y relacionadas con paciente mismo. Por ejemplo, algunas publicaciones señalan que el uso de medicamentos como corticosteroides, ciclosporina, azatioprina, ranitidina, nifedipina, procainamida, y/o consumo de drogas como el etanol, pueden afectar los rendimientos de marcación de células blancas [35].

Otros factores relacionados con el operador que pueden influir en el proceso final son la densidad y calidad de la muestra extraída, el tipo de anticoagulante utilizado (por ejemplo, la solución de ácido cítrico-dextrosa, ACD, es preferible al uso de heparina pues disminuye la tendencia de las células blancas a adherirse a componentes plásticos), el mantenimiento de las células en el plasma (las experiencias señalan que un factor determinante en la activación de los granulocitos es la separación de los mismos del plasma), el uso de aditivos y agentes sedimentantes^[35].

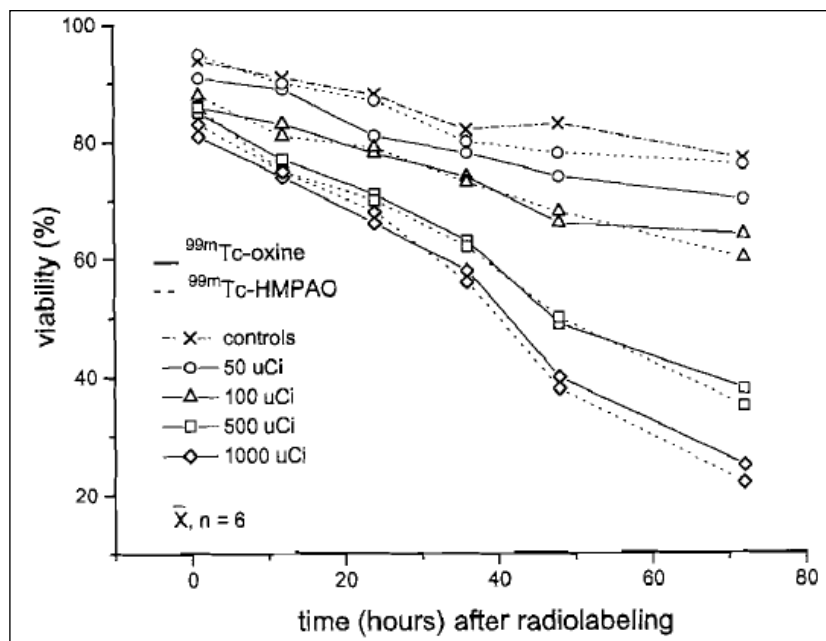


Figura 10. Efecto de la radiación en la viabilidad del monocito ^[35].

El uso del Tecnecio en marcaciones celular de este tipo inicia con la investigación y puesta a punto del ^{99m}Tc-propilen amino oxina (PnAO), como radiofármaco para el diagnóstico a nivel de sistema nervioso central. A partir de éste fue desarrollado el ^{99m}Tc-hexametil-propilen-amino-oxima (HMPAO), el cual a lo largo de los estudios realizados presentó una alta concentración a nivel cerebral, debido a su carácter lipofílico y la capacidad de difundir a través de la membrana (posterior a lo cual se transforma en un complejo secundario menos lipofílico y por lo tanto con menos capacidad de salida) y adherirse a los componentes intracelulares ^[30,35].

Estas propiedades condujeron a su estudio y posterior aplicación en el marcaje de leucocitos con altos rendimientos y a su disponibilidad comercial desde hace más de dos décadas, con aplicaciones clínicas principalmente en el diagnóstico de

enfermedades inflamatorias a nivel intestinal, como colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn, donde estudios realizados demostraron un buen valor pronóstico del método mediante la obtención de imágenes de buena calidad en periodos de tiempo cortos y con mayor comodidad tanto para el paciente como para el personal implicado. Recordemos que en el caso de estas entidades las estadísticas indican que el 50% de los pacientes presenta al menos un brote agudo anualmente, de ahí la importancia del diagnóstico en pro de prescribir el tratamiento adecuado que permita controlar esta cronicidad [7,35].

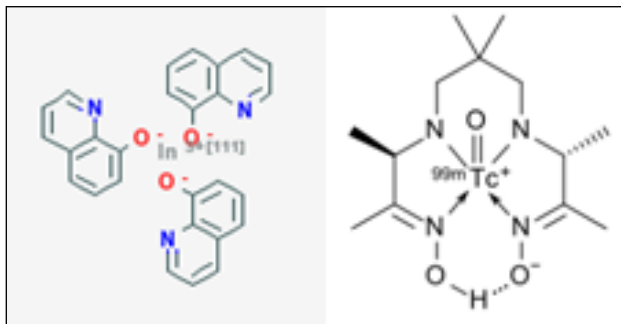


Figura 11: Estructura química de ^{111}In -Oxina y $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO.

Estrategias diagnósticas como la endoscopia asociada a toma de biopsias es el patrón de referencia, sin embargo, involucra la preparación del paciente y la contraindicación de la misma en fases agudas debido al riesgo de inducir perforación colónica y/o megacolon tóxico. La técnica radiológica simple o asociada con bario también implica la preparación del paciente y la tasa de no detección de lesiones en intestino delgado es alta [7].

Otras tendencias han orientado el uso del radiofármaco a la localización de abscesos y focos sépticos, procesos de endocarditis, neumonías, osteomielitis, acumulación a nivel tumoral, respuesta a cirugías esplenectómicas y definiciones de procesos infecciosos pos quirúrgicos [7,35].

Sin embargo, el HMPAO presenta desventajas como su rápida descomposición in vitro, alrededor de treinta minutos posterior a su preparación, periodo a partir del cual el porcentaje de unión inicial con el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ llega a verse disminuido por encima del 20%, así mismo, el HMPAO empieza a variar su naturaleza lipofílica a hidrofílica mediante un mecanismo que aún no está claro. Con el fin de solventar esta situación se han realizado estudios, los cuales señalan que el uso del CoCl_3 y azul de metileno pueden darle al radiofármaco una estabilidad de hasta cinco horas, sin embargo el mecanismo mediante el cual se logra la misma no se

conoce con certeza. Además, se ha determinado que entre el 20 y 25% del ^{99m}Tc se desliga del leucocito marcado en las primeras veinticuatro horas [23,35].

Luego de agregar el ^{99m}Tc al vial con HMPAO y antes de realizar la marcación de los leucocitos es de evidente importancia verificar el porcentaje de formación y la identidad lipofílica del complejo así como la pureza radioquímica del mismo.

Esta comprobación puede llevarse a cabo mediante un procedimiento cromatográfico de partición o una ITLC. En el primero de los casos se coloca una pequeña alícuota de ^{99m}Tc -HMPAO en un tubo conteniendo 3 ml de cloroformo y 3 ml de solución fisiológica. Luego de agitar cuidadosamente se procede a medir la actividad en cada una de las fases. La misma en la fase hidrofílica perteneciente a TcO_4 no debe superar el 10%. En el caso de la ITLC el procedimiento puede realizarse utilizando como fase móvil MEC y solución fisiológica.

Otros ligandos unidos al ^{99m}Tc como albúmina coloidal, sulfuro coloidal, sestamibi, teboroxima, mebrotfenin, disofenin, gluceptato, DMSA, fitato, oxina y pirofosfato también han sido estudiados, obteniéndose diversos resultados.

Por ejemplo, diferentes ensayos han llegado a obtener rendimientos de marcación con ^{99m}Tc -HMPAO de hasta el 79.4%, ^{99m}Tc -albúmina coloidal 11.7%, ^{99m}Tc -sulfuro coloidal 11.7%, ^{99m}Tc -sestamibi 11.1% y ^{99m}Tc -teboroxima 14.2%. El mebrotfenin, disofenin gluceptato y DMSA no presentaron afinidad con los leucocitos por lo cual el marcaje con éstos no fue viable. En el caso del pirofosfato, presentó rendimientos de marcación de hasta un 60%, sin embargo los leucocitos funcionales tras la marcación fueron recuperados en muy bajos porcentajes. Las experiencias realizados con fitato implicaron tiempos de incubación de hasta treinta minutos, con rendimientos de marcación de un 50% como máximo [35].

El uso del dímero de etil cisteína (ECD), se perfiló como una opción interesante al presentar una mayor estabilidad radioquímica en comparación con el HMPAO y una estabilidad in vitro de hasta 24 horas, sin embargo los rendimientos de marcación obtenidos fueron pobres, además de presentar una cinética de unión al leucocito más inestable y una velocidad de eliminación biológica muy elevada en muchos tejidos [35].

La viabilidad celular luego de la marcación es un parámetro tan importante como el rendimiento de marcación. Se han implementado diversas técnicas con el fin de optimizar este parámetro en el uso de los diferentes ligandos, pero los resultados obtenidos mostraron de manera paralela un detrimento en puntos como sensibilidad y especificidad de la célula marcada [35].

Los estudios realizados reflejan como luego del uso de HMPAO la adhesión celular no es afectada, sin embargo, se vio disminuida al utilizar albúmina coloidal, sestamibi, y teboroxima. Los ensayos realizados con sulfuro coloidal reflejaron un aumento en la misma, justificada por un posible aumento de la activación celular^[35].

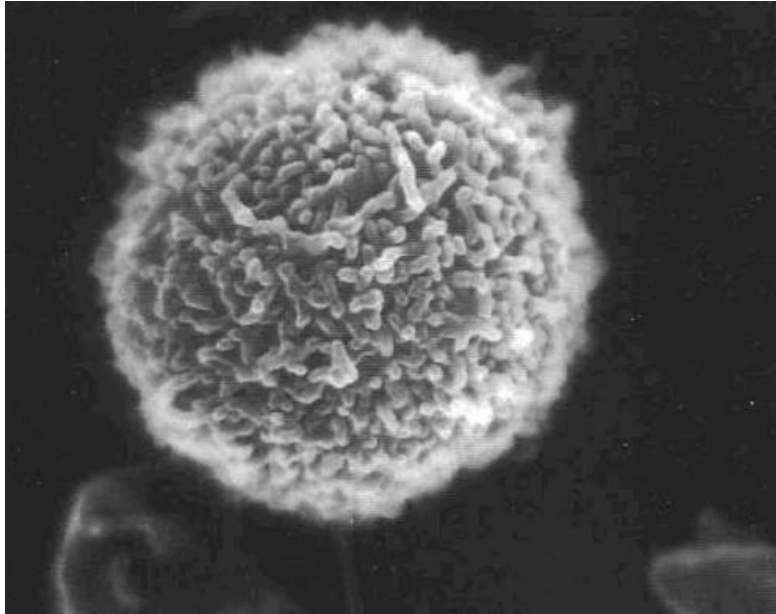


Figura 12. Linfocito humano luego de ser radiomarcado. No hay signos de alteraciones morfológicas visibles tras ser analizado por microscopía electrónica ^[35].

Otras pruebas realizadas con los diferentes ligandos, como por ejemplo, migración aleatoria (para medir la funcionalidad del granulocito), el ensayo de *Candida* killing y fagocitosis, no demostraron gran relevancia para la determinación de la viabilidad celular pos marcación, pues su sensibilidad no es suficiente para detectar cambios profundos que comprometan de manera potencial el comportamiento celular in vivo ^[35].

Para determinar de manera acertada el comportamiento celular in vivo, solamente es aplicable el seguimiento de la distribución de los leucocitos marcados luego de su inyección al paciente. Esta medición incluye la captura inicial transitoria en órganos como pulmón, bazo, hígado y médula ósea, donde se deben tener claras las variaciones en las cantidades relativas propias para cada uno en función del método de marcación utilizado. Una desventaja de la marcación con ^{99m}Tc es precisamente su acumulación inespecífica a nivel intestinal, la cual representa un inconveniente para la interpretación de imágenes.

El daño celular durante el procedimiento de marcación leucocitario provoca distribuciones celulares anormales. Como evidencia de esta situación se pueden mencionar por ejemplo un tiempo de tránsito prolongado a nivel pulmonar y/o una captura hepática excesiva como son señales de que el leucocito fue dañado durante el marcaje, o alteraciones en los linfocitos al realizarse el marcaje con ^{111}In que provocan alteraciones en los patrones de circulación de los mismos_[35].

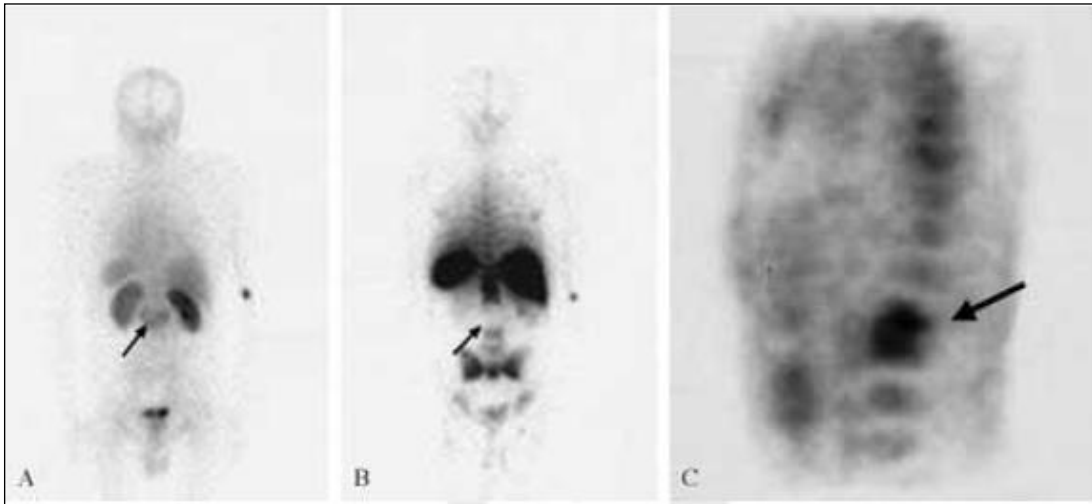


Figura 13: Imágenes de lesiones espinales obtenidas con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sulesomab, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO y ^{18}F -FDG. A) $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sulesomab, se observan el sitio de infección en L2 y L3 cuatro horas pos inyección. B) $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO-leucocitos, se observa fotopenia en el área afectada. C) Espondilodiscitis definida por la captura local de ^{18}F -FDG _[23].

2.4.1 PROCEDIMIENTO DE MARCACIÓN CON $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO.

El surgimiento nuevas opciones de desarrollo impulsó la investigación y ejecución de múltiples metodologías de marcación, con su consecuente influencia en la calidad e interpretación de las imágenes obtenidas. Ante esta situación, se funda en 1989 en Viena, Austria, la Sociedad Internacional de Radiomarcación de Elementos Sanguíneos (ISORBE, por sus siglas en inglés), con la finalidad de proveer un espacio científico para el intercambio de conocimiento y experiencias, y a su vez unificar criterios para la estandarización del método de marcación con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO _[30].

Como todo procedimiento que involucre la manipulación de fluidos humanos y tenga como norma la preservación de su esterilidad, la marcación de células debe ser realizada dentro de una campana de flujo laminar, y todos los insumos utilizados dentro de la misma deben guardar las condiciones de asepsia correspondientes, así como el encargado del procedimiento debe procurarse la

indumentaria necesaria con el fin de salvaguardarse a sí mismo en caso de un potencial accidente.

Deba aclararse que a menos de que se especifique otra situación el procedimiento se realiza a temperatura ambiente, y los volúmenes de muestra en caso de pacientes pediátricos debe guardar proporción a su masa corporal. Como se mencionó anteriormente se debe ser muy cuidadoso con todos los pasos del ensayo, pues factores como el tiempo de incubación, el pH, temperatura, tiempo y velocidad de centrifugación son determinantes para maximizar los rendimientos de marcaje [30,35].

Según ISORBE el procedimiento estandarizado de marcación de células blancas con ^{99m}Tc -HMPAO es el siguiente:

1. Utilizando un set de infusión con una mariposa y una aguja calibre 19 G extraer los siguientes volúmenes sanguíneos en dos jeringas distintas rotuladas como "A" y "B".

La jeringa A debe contener 30 mililitros de sangre y 5 mililitros de ACD-A.

La jeringa B debe contener 15 mililitros de sangre y 2.5 mililitros de ACD-A.

El contenido de las jeringas debe ser mezclado suavemente. En el caso de pacientes con conteos sanguíneos menores a 5000 leucocitos/mm³ el volumen extraído debe ser superior a los 45 mililitros.

2. Agregue 6 ml de hidroxietilalmidón (HES) en la jeringa A, evitando la formación de burbujas y espuma. Mezcle suavemente el contenido de la jeringa, una a la jeringa una aguja calibre 19-21 G con su correspondiente mariposa y permita la separación del plasma, generalmente este proceso requiere de 30 a 60 minutos.

3. Coloque el contenido de la jeringa B en un tubo Falcon de 30 ml y centrifugue a temperatura ambiente durante diez minutos a 2000 g. Separe los leucocitos del plasma (éste será utilizado para lavados próximos y la reinyección de las células al paciente) .

4. Transfiera las células obtenidas en el paso 2 a un tubo Falcon de 30 ml, evitando la contaminación celular. Centrifugue durante cinco minutos a 150 g.

5. Remueva el plasma obtenido de esta centrifugación, y resuspenda los leucocitos en un mililitro del plasma obtenido de la jeringa B. Utilizando una

pipeta Pasteur aspire en sentido vertical, suavemente y evitando la formación de espuma, la agitación del tubo en sentido circular y el golpeteo suave del tubo pueden favorecer la resuspensión celular.

6. Adicione aproximadamente un mililitro de ^{99m}Tc -HMPAO recientemente marcado (con una actividad superior a 749 MBq) y mezcle suavemente. Debido a la inestabilidad propia del radiofármaco debe utilizarse en un periodo menor a treinta minutos luego de su preparación.

7. Incube por diez minutos y agregue 3 ml de plasma.

8. Centrifugue durante cinco minutos a 150 g. Remueva el líquido sobrenadante conteniendo la fracción de radiofármaco que no se unió a los leucocitos. Consérvelo para el posterior cálculo de la eficiencia de la marcación.

9. Lave las células marcadas con un mililitro de plasma adicionado a través de las paredes del tubo, procurando no dañar las células. Remueva el plasma sobrenadante, consérvelo para calcular la eficiencia de marcaje y añada un mililitro del plasma retenido del paso anterior.

10. Resuspenda los leucocitos marcados en un volumen de 3 a 5 ml de plasma.

11. Mida la actividad de las fracciones de plasma conservadas en los pasos 8 y 9, luego utilícelas para resuspender los leucocitos marcados.

12. Utilizando una jeringa sin aguja arrastre la suspensión de células remanente en el tubo.

13. Inyecte la dosis vía intravenosa.

14. Calcule el porcentaje de eficiencia.

Para este paso se sugiere utilizar la fórmula:

$$\frac{\text{Actividad de células marcadas}}{\text{Actividad total añadida}} \times 100$$

Para realizar el control de calidad se sugiere tomarse en cuenta la viabilidad del estudio con azul de trypan y un frotis de las células marcadas en suspensión.

Como un apéndice la ISORBE da algunas opciones para el desarrollo del método del método consensuado. Se enumerarán de manera correspondiente a los pasos citados anteriormente [30].

Paso 1. De manera alternativa a la extracción utilizando dos jeringas los 45 ml de sangre pueden ser agregados directamente a un tubo Falcon de 60 ml conteniendo 7.5 ml de ACD-A. En este caso, 17 ml de la muestra anticoagulada será transferida a un segundo tubo Falcon de 30 ml con el fin de obtener el plasma como se indica en el paso 3.

Paso 2. Es posible utilizar solamente 4 ml de HES, o en su lugar, 2 ml de metilcelulosa estéril diluida en solución fisiológica al 0.9%. El HES es el único expansor de plasma avalado por la FDA.

Paso 4. Las fuerzas de centrifugación pueden ser variadas desde 90 g hasta 150 g. En estos casos el tiempo de centrifugación debe incrementarse con el objetivo de recobrar un porcentaje adecuado de leucocitos (por ejemplo, siete minutos de centrifugación para una fuerza de 110 g). El uso de fuerzas más grandes incrementa el riesgo de contaminar con plaquetas los leucocitos.

Paso 5. Los leucocitos pueden ser resuspendidos en un volumen menor de plasma (ejemplo 0.5 ml). Esta variante presenta mayor complejidad que la resuspension en un ml, pero incrementa el rendimiento de marcación.

Paso 6. Esta recomendado que el método se lleve a cabo en un medio 50% en plasma. Por lo tanto, si la resuspensión es llevada a cabo con 0.5 ml de plasma deben adicionarse 0.5 ml de ^{99m}Tc -HMPAO.

Paso 7. Aunque la eficiencia de marcaje a 37°C es levemente superior a la realizada a temperatura ambiente, no es recomendable realizar la marcación a esta temperatura.

CONTROL DE CALIDAD

Al igual que los demás radiofármacos, el procedimiento de marcación de leucocitos con ^{99m}Tc -HMPAO debe ser sujeto a un estricto control de calidad previa inyección al paciente. El cálculo de porcentaje de marcación debe ser determinado mediante la fórmula descrita anteriormente, así mismo la viabilidad celular mediante el ensayo con azul de trypan, posteriormente la biodistribución debe ser observada mediante la medición de la actividad a nivel pulmonar treinta

minutos pos inyección, cuya nulidad debe presentarse como una imagen fotopénica.

El procedimiento para llevar a cabo el ensayo de viabilidad con azul de trypan es el siguiente:

- a) Previo al ensayo se requiere una solución de azul de trypan al 0.2% (p/v) en agua, y NaCl al 4.25% (p/v).
- b) Mezclar cuatro partes de la solución de azul de trypan con una parte de la solución de NaCl.
- c) Mezclar una parte de la nueva solución de azul de trypan con una parte de la suspensión de leucocitos.
- d) Realizar bajo el microscopio la cuenta de células muertas (teñidas de azul) y viables. La muestra contabilizada debe ser superior a 200 células en total.
- e) Calcular el porcentaje de viabilidad mediante la fórmula:
$$\frac{\text{Células vivas}}{\text{Células totales}}$$

El ensayo se aprueba con una viabilidad superior al 96%.



Figura 14: Ensayo de viabilidad leucocitaria con azul de trypan.

Ligando hidrofílicos.

A diferencia de los compuestos lipofílicos el método de marcaje utilizando coloides de $^{99m}\text{Tc-Sn}$ se basa en la fagocitosis del mismo por parte del leucocito, lo cual otorga al método el beneficio de evitarse la separación de los mismos de la muestra total.

Inicialmente el procedimiento presentó como inconveniente la variabilidad y el tamaño de las partículas obtenidas ($>2\mu\text{m}$), resultando en rendimientos de marcaje bajos. El problema fue solucionado con el diseño de un kit con soluciones separadas de SnCl_2 y NaF , las cuales eran mezcladas al momento de la preparación del coloide, obteniéndose un tamaño de partícula más homogéneo y con dimensiones factibles para la fagocitosis leucocitaria ($1.2\text{-}2\mu\text{m}$) [23].

Luego de su formación, el coloide presenta una estabilidad de más de seis horas, y el método de marcaje se basa en la incubación de la muestra sanguínea junto con el coloide. Esta técnica se encuentra comercialmente disponible y aplicada ampliamente en Europa y Australia.

Posterior a su administración, las imágenes revelan focos hipercaptantes a nivel pulmonar, los cuales disminuyen en intensidad de manera progresiva, y llegan a desaparecer en un periodo de tres horas posterior a su inyección; similar comportamiento se observa con los leucocitos marcados con $^{99\text{m}}\text{Tc-HMPAO}$. Esta característica exige prudencia en el diagnóstico de procesos en esta zona.

Esta técnica ha presentado resultados muy positivos en el diagnóstico de la enfermedad inflamatoria intestinal en niños y adultos, así mismo en la ubicación zonas de infección. Su utilidad es manifiesta en el diagnóstico de articulación de Charcot en pie diabético utilizado de forma conjunta con el escaneo de médula ósea. En enfermedad de Crohn el coloide presenta una excreción en heces de hasta un 10% (usualmente es menor al 0.03%), donde de manera concomitante se observan las áreas afectadas por el proceso inflamatorio [23].

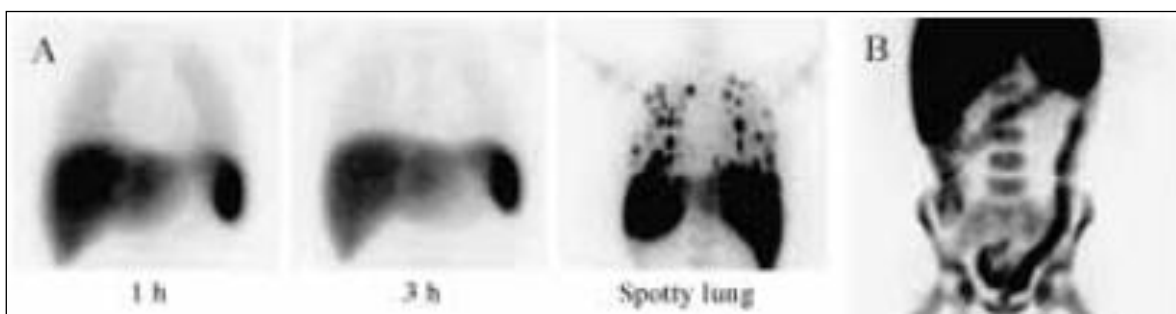


Figura 15: A) Disminución progresiva en la intensidad de captura del $^{99\text{m}}\text{Tc-Sn}$ a nivel pulmonar. En la imagen continua se observan los grumos propios de la reconstitución deficiente del kit. B) Estudio de enfermedad inflamatoria intestinal con $^{99\text{m}}\text{Tc-Sn}$ [23].

Otras bondades adicionales del método son el volumen de muestra necesario, el cual abarca desde 5-20 ml, facilitando el estudio en pacientes pediátricos y neonatos, además el procedimiento consume mucho menos tiempo que el

marcaje con ligandos lipofílicos. Sin embargo, se debe ser cuidadoso al preparar el coloide para evitar la formación de grumos que finalmente se reflejaran en imágenes moteadas a nivel pulmonar.

Como desventajas de la técnica en comparación con la marcación con ^{99m}Tc -HMPAO se pueden señalar una mayor captación a nivel hepático, lo cual se refleja en las imágenes a la altura de esta zona, unión reversible a la membrana del eritrocito y un costo económico mayor.

2.4.2 CONSIDERACIONES PRÁCTICAS DE LA MARCACIÓN DE LEUCOCITOS COMO TÉCNICA DIAGNÓSTICA

Como se mencionó anteriormente, la opción diagnóstica que representa la marcación de células blancas no está exenta de inconvenientes. Además de las precauciones propias ligadas a la manipulación de fluidos biológicos durante el marcaje se debe considerar el peso de la técnica en sí como método diagnóstico.

En este apartado los estudios reflejan algún grado de variabilidad en torno a los resultados, justificado por un relativo grado de afinidad de los leucocitos hacia los procesos inflamatorios, el cual suele traslaparse con la migración de los mismos a médula ósea. De ahí que la distribución hematopoyética, tan variable en sí misma, dificulta la interpretación de imágenes aisladas, pues resulta difícil diferenciar la imagen entre un proceso infeccioso y una captura anormal por parte de médula ósea.

Este problema se ha solucionado con la adición a la técnica de Sulfuro coloidal marcado con ^{99m}Tc . Ambos (células y coloide) se acumulan en médula ósea, pero solamente los leucocitos presentan afinidad por el proceso infeccioso, por lo tanto al obtenerse imágenes correspondientes a la actividad de los leucocitos marcados sin la participación del Sulfuro coloidal se deduce correspondiente a un proceso infeccioso. Esta modificación de la técnica ha llevado a obtener resultados con una precisión del 95% o mayores para el diagnóstico de procesos infecciosos asociados a prótesis [29].

Sin embargo, el estudio centelleográfico leucocito/médula ósea presenta algunos inconvenientes. Por ejemplo, el proceso in vitro de marcaje es laborioso y no siempre posible, además mantiene el contacto con derivados sanguíneos. La técnica necesita ser mejorada con el fin de reducir su complejidad y costo, lo cual debe ser considerado pues en su mayoría la población afectada son ancianos o pacientes con problemas de movilidad.

Es importante estar consciente de que un trazador o la combinación de varios no brindan resultados igualmente satisfactorios en el diagnóstico de la totalidad de los casos de infecciones ortopédicas. Por ejemplo, la centelleografía leucocito/médula presenta gran utilidad en el diagnóstico de procesos infecciosos protésicos, pero sin embargo no presenta igual funcionalidad en un caso de osteomielitis espinal.

De manera análoga el uso de leucocitos marcados sin sulfuro coloidal presenta buenos resultados en el estudio de osteomielitis a nivel de la sección delantera del pie en pacientes diabéticos, sin embargo debe utilizarse combinado si se requiere hacer la evaluación de la misma patología en la zonas media o trasera de dicha extremidad, considerando la necesidad frecuente de realizar un diagnóstico diferencial con articulación de Charcot.

Debe tenerse claro que, si bien es cierto las evidencias iniciales en una investigación justifican la profundidad de nuevas aplicaciones, los resultados obtenidos no deben extrapolarse a situaciones donde no existen evaluaciones previas. La individualización de cada caso es imperativa, así como la confirmación histopatológica del diagnóstico siempre que sea posible.

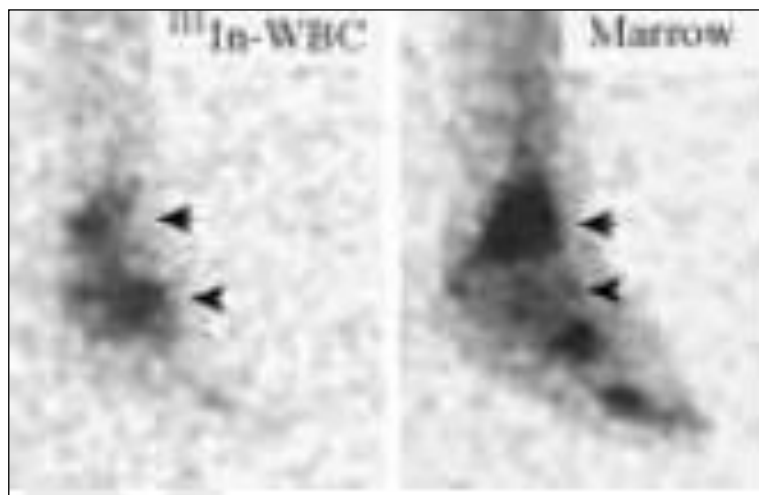


Figura 16: Estudio centelleográfico leucocito/médula ósea de articulación de Charcot con ^{111}In -leucocito. La mayor captación a nivel de la tibia distal señala la actividad propia de la médula ósea, actividad de los leucocitos marcados observada en la zona media del pie confirma el proceso infeccioso en esta área [23].

2.5 NORMATIVA DE TRABAJO PARA EL RADIOMARCAJE DE CÉLULAS BLANCAS

Se debe recordar que un servicio de radiofarmacia que realice tareas de marcación celular es categorizado por parte de la IAEA como nivel 2b, por lo tanto debe cumplir con una serie de condiciones prácticas y estructurales con el fin de preservar las condiciones de seguridad y esterilidad durante la manipulación y marcaje de los diferentes grupos celulares autólogos y componentes de re inyección, asegurando con esto finalmente el éxito del ensayo en todas sus dimensiones [20].

Se encuentra normado que el funcionamiento operativo de un recinto clase 2b debe estar a cargo de al menos dos personas, uno de los cuales debe poseer un entrenamiento básico en aspectos como: manipulación aséptica de células, radiomarcaje de células sanguíneas autólogas, transferencia de soluciones estériles, manejo de material biológico y biopeligroso, operación y mantenimiento de centrifugas, microscopios y hemocitómetros, y procedimientos de limpieza y manejo de muestras seriadas con el fin de disminuir el riesgo de contaminación cruzada. Debe restringirse la entrada al recinto a personas ajenas al procedimiento de marcación

Equipo

En lo referente a equipamiento y limpieza de los mismos y el espacio de trabajo la IAEA señala los siguientes requisitos.

Cabina de seguridad biológica: la manipulación de células con fines diagnósticos requiere de una cabina Clase IIA para localizada y de uso exclusivo en esta tarea. La misma deberá contar con condiciones de diseño internas que permitan su completa sanitización y el menor contacto con partículas y microorganismos del ambiente [20].

Debe recordarse que una cabina de seguridad biológica es un equipo diseñado para proporcionar una barrera de contención con el fin de trabajar de una forma segura con agentes infecciosos. Han sido estructurados con el fin de mantener el área de trabajo libre de partículas o potenciales contaminantes perjudiciales tanto para el operador como para el material con el cual se trabaja, y su elección deberá realizarse tomando en cuenta factores como el tipo de material que se manipula, la generación de aerosoles durante el procedimiento y el grado de protección frente a la contaminación ambiental [18,28].

Este objetivo se logra mediante la combinación de elementos electromecánicos y físicos (como flujo laminar, diferencia de presiones) que impulsan el airea través de filtros de gran superficie, situados de manera estratégica y con una eficiencia de retención de partículas (de un tamaño en promedio mayor a $0.3\mu\text{m}$) superior al 99.99%, que generalmente se generan en forma de aerosoles tras procedimientos varios [28].

Las cabinas de seguridad tipo II están diseñadas para ofrecer protección al operador, ambiente y al producto que se manipula dentro de ellas. Se clasifican en diferentes subtipos, siendo los más comunes A (cuando el aire es reciclado dentro del recinto), B1, B2 y B3 (cuando el aire es extraído del área de trabajo a través de un ducto). Cuentan en su estructura con dos rejillas, una frontal y una trasera, a través de las cuales es succionado el aire que circula sobre la superficie de trabajo, aislando de esta manera al operador de los agentes contenidos en el interior de la cabina [28].

Dispone además de un filtro HEPA a través del cual se suministra un flujo vertical laminar de aire que protege al producto y un segundo filtro HEPA (de extracción) a través del cual sale el aire de la cabina, asegurando mediante este diseño que el aire que circula dentro de la cabina está libre de contaminantes y puede ser reciclado [28].

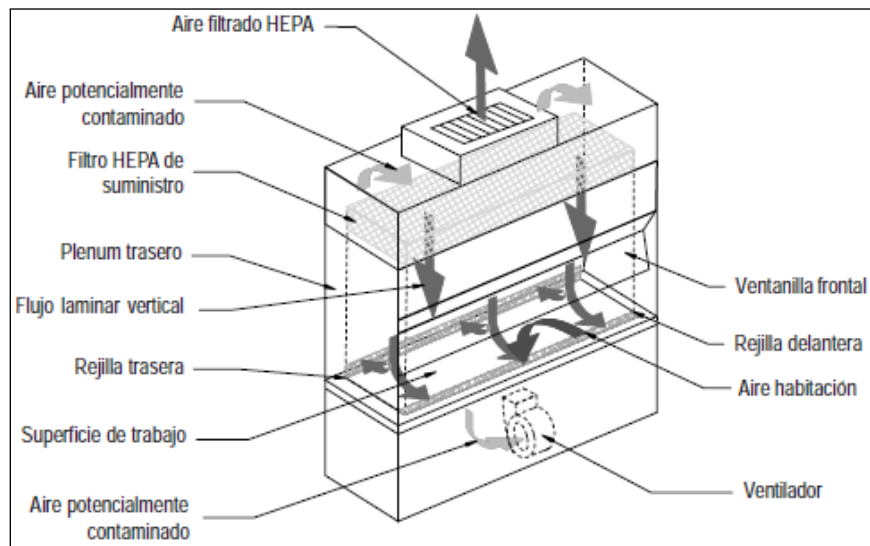


Figura 17: Cabina de seguridad biológica tipo II A [28].

Centrífuga: para mayor seguridad del operador se sugiere el uso de un dispositivo blindado (y refrigerado según ISORBE). Para el manejo y separación de

componentes sanguíneos es necesaria una centrífuga cerrada que asegure el confinamiento de posibles salpicaduras. La misma debe ser sanitizada con hipoclorito de sodio al 1% o glutaraldehído al 2%, en el caso de utilizarse el primero, la limpieza debe continuarse con agua estéril, con el fin de eliminar los cristales de hipoclorito de sodio remanentes tras el primer procedimiento [20].

Es normado además de parte del organismo regulador la limpieza del equipo, tanto interna como en sus superficies, con desinfectantes de amplio espectro bacteriano y viral antes de iniciar las tareas diarias y entre pacientes sucesivos, entre las opciones recomendadas se encuentra el uso de alcohol isopropílico/etanol al 70%, o gluconato de clorhexidina al 0.25% en etanol al 70%. Debe procurarse realizar un procedimiento de marcación a la vez y realizar la limpieza del piso en intervalos periódicos, así como procurar la pronta limpieza de salpicaduras [20].

Personal y procedimientos.

Durante la manipulación y marcaje de células con fines diagnósticos es necesario mantener la viabilidad y esterilidad de las mismas, así mismo disminuir el riesgo del operador tras la exposición a material biológico y radioactivo.

Los operadores relacionados con el procedimiento de radiomarcaje deben estar vacunados contra el virus de hepatitis B, así mismo haber recibido el entrenamiento básico. Debe recalarse que si un trabajador sufre de algún tipo de afección viral o bacteriana, presenta heridas abiertas o exudativas es preferible no se involucre con tareas de este tipo hasta que mejore su condición [20].

La toma de muestras sanguíneas debe ser realizada por personal entrenado, quien deberá utilizar guantes todo el tiempo. Es importante cubrir las paredes de la jeringa con un anticoagulante adecuado antes de realizar la extracción. Con el fin de evitar la hemólisis y el daño celular se recomienda en la medida de lo posible el uso de agujas calibre 21 G, así mismo, todas las muestras deben rotularse con el nombre del paciente, número de identificación y fecha y hora a la que se tomó la muestra. Es prudente registrar las eventuales particularidades que se presenten durante el procedimiento de marcación y referentes al paciente. El transporte de las mismas debe realizarse según las normativas vigentes y bajo blindaje según corresponda [20].

Otro requisito de seguridad es el uso de vestimenta protectora y descartable durante la estancia dentro de la sala de marcación, la cual debe ser retirada al abandonar la misma. El lavado de manos es imperioso después de realizar el un

procedimiento, preferiblemente con un agente desinfectante suave, como por ejemplo gluconato de clorhexidina al 5% [20].

Debe recordarse evitar la manipulación innecesaria, ruptura o doblaje de jeringas desechables, las cuales deberán mantener puesto el capuchón siempre que sea posible. En caso de pinchaduras deberá seguirse el protocolo de notificación y descontaminación correspondiente.

Manejo de células marcadas.

La formación de grumos debe ser verificada visualmente antes de entregar la muestra marcada para su reinyección. La misma deberá contar con la identificación señalada anteriormente y entregada personalmente al personal a cargo. La jeringa debe ser invertida repetidamente antes de su inyección con el fin de resuspender las células, las cuales deberán ser inyectadas lentamente.

Disposición de residuos.

Las jeringas usadas y materiales de este tipo deben ser desechados en recipientes resistentes y almacenados en un lugar destinado para tal fin dentro del centro de salud y de acuerdo con las políticas del mismo. Tanto los residuos biológicos como radioactivos generados por los procedimientos deberán descartarse en contenedores cerrados con las características correspondientes a cada tipo de desecho [20].

La remoción de la indumentaria utilizada debe realizarse sin olvidar que es un potencial reservorio de material contaminado, por lo tanto siguiendo las precauciones debidas.

Control de calidad.

Durante el desarrollo del procedimiento no debe olvidarse la estabilidad del $^{99m}\text{TcHMPAO}$ (30 minutos) u otro ligandos utilizados. El cálculo del porcentaje de marcación es un paso que no debe omitirse, así mismo la verificación de la viabilidad celular mediante el ensayo con azul de trypan [20].

2.5.1 METODOLOGÍA DE TRABAJO EN UNA CABINA DE SEGURIDAD BIOLÓGICA

Con el fin de obtener los mejores resultados al realizar un determinado procedimiento dentro de una cabina de seguridad biológica se han probado una

serie de procedimientos, los cuales seguidos sistemáticamente ayudarán a obtener el resultado deseado [28].

Planear los procedimientos a realizar: antes de ingresar el operador debe tener conocimiento sobre las funciones a realizar, además coordinar con los demás miembros del equipo con el fin de reducir al mínimo las interrupciones durante el uso de la cabina.

Poner en marcha la cabina: en esta etapa se llevan a cabo una serie de actividades entre las cuales destacan la preparación del área de trabajo, apagar la lámpara UV, encender la luz fluorescente, verificar la correcta abertura de la ventana frontal (entre 20-25 cm), verificar la no obstrucción de las rejillas de retorno de aire, encender el ventilador, permitir el flujo de aire dentro de la cabina entre 5-15 minutos y verificar la lectura de la presión.

Preparación previa: antes de iniciar cualquier procedimiento el operario debe: lavarse las manos y brazos con un jabón germicida, vestirse con la indumentaria de protección correspondiente (bata manga larga, con puños ajustados y guantes de goma, gorro, anteojos y cubrebocas), rociar y limpiar las superficies interiores con etanol al 70% o con un desinfectante adecuado y permitir que el aire que circula dentro de la cabina seque las superficies.

Instalar los materiales y equipos: debe procurarse por parte del operador introducir en la cabina únicamente el material y equipo requerido para realizar el procedimiento, sin sobrecargar la misma, tratando de colocar el material de forma que no se crucen los materiales sucios con los limpios, ni se obstruyan las rejillas delanteras o traseras. Es muy importante evitar ingresar a la cabina materiales emisores de partículas. Los recipientes para material contaminado deben ubicarse en la parte trasera derecha de la cabina, usualmente se coloca allí la bolsa para desechos biopeligrosos, un recipiente con desinfectante para las pipetas y un basurero para punzocortantes [18,28].

Desarrollar los procedimientos: al iniciar el proceso debe procurar introducir lentamente las manos dentro del área de trabajo, realizando los procesos de forma metódica y cuidadosa, partiendo de las zonas limpias hacia las zonas contaminadas, trabajando de cinco a diez centímetros sobre la superficie y por detrás de la zona de partición de humos (zona en la cual el aire estéril descendente se divide para seguir su recorrido a través de las rejillas anterior y posterior de la cabina). Es importante evitar técnicas o procedimientos bruscos que puedan alterar los patrones de flujo del aire dentro de la cabina, manteniendo

todos los materiales, al menos cuatro pulgadas, dentro del marco de la ventana frontal de la cabina [18,28].

Los procedimientos deben ser realizados hacia el fondo del área de trabajo, y evitar el uso de mecheros, pues se rompe el patrón de flujo laminar e incluso se corre el riesgo de quemar alguno de los filtros. En su lugar, puede trabajarse con incineradores de tipo eléctrico. Debe evitarse el retiro de las manos del área de trabajo hasta que todos los procedimientos hayan sido completados y todo el material potencialmente peligroso haya sido desechado. No debe olvidarse descartar los guantes en el recipiente para material contaminado dentro de la cabina.

En el caso que se presente durante el proceso un derrame o salpicadura, todos los objetos dentro de la cabina deberán someterse a una descontaminación de superficie mientras la misma continua en operación.

Al concluir la jornada debe permitirse que el aire fluya libremente al interior de la cabina sin que exista ninguna actividad en el interior y proceder a sanitizar los objetos que hayan estado en contacto con material contaminado antes de ser retirados de la cabina. Las bandejas abiertas o contenedores deben ser cubiertos antes de ser retirados de la cabina.

Finalmente debe rociarse y limpiar todas las superficies interiores con una solución adecuada y permitir que el aire que circula dentro de la cabina seque las superficies interiores. Los elementos de protección personal deben ser dispuestos de la manera más adecuada y en el lugar correspondiente. Proceder al lavado de manos con jabón y agua abundante, apagar el ventilador, la lámpara fluorescente y cerrar la abertura frontal. No se debe olvidar encender la lámpara ultravioleta antes de abandonar el recinto.

MANEJO DE LA INSTRUMENTACIÓN

Al planear y realizar las actividades dentro de una campana de flujo deben tenerse en cuenta ciertos procedimientos básicos según sean los instrumentos que se estén utilizando para llevar a buen fin las mismas, a continuación una serie de recomendaciones acorde principalmente al uso de pipetas, jeringas y agujas [28].

Pipetas

Debe procurarse utilizar siempre las pipetas con dispositivos y ayudas mecánicas que garanticen la seguridad, evitando evidentemente pipetear con la boca. Todas

las actividades que involucren el uso de éstas deben ser realizadas dentro de la cabina, en especial al trabajar con agentes infecciosos o radioactivos. Nunca deberán prepararse materiales biopeligrosos soplando aire exhalado a través de una pipeta dentro de un líquido ni forzar el mismo fuera de la pipeta.

Otra practica que se debe evitar es mezclar agentes biopeligrosos o por succión o expulsión mediante una pipeta, y a su vez la liberación de gotitas infecciosas al medio. Debe colocarse una toalla humedecida descartable con desinfectante sobre la superficie de trabajo, y descargar el contenido de la pipeta cerca del recipiente final, permitiendo que el líquido descargado fluya pegado a la pared del recipiente en donde se deposita el fluido.

Las pipetas contaminadas reutilizables deben colocarse en forma horizontal dentro de un recipiente que contenga líquido desinfectante en cantidad suficiente para cubrirlas, el cual se procederá posteriormente a autoclavar. Las pipetas contaminadas desechables deben descartarse dentro del basurero para elementos punzocortantes, procediendo a desechar el mismo como material infeccioso cuando se alcance entre $2/3$ y $3/4$ partes de su capacidad. En la medida de lo posible ambos tipos de elementos de descarte deberán permanecer dentro de la cabina durante los procedimientos.

Jeringas y agujas

En general se considera que las jeringas y las agujas son dispositivos peligrosos, y su uso debe restringirse a procedimientos para los cuales no hay otra alternativa, sin embargo debe evitarse el uso de jeringas y agujas en sustitución de las pipetas.

Las jeringas deben ser desechables con aguja incorporada siempre que sea posible. Al igual que las pipetas no deben sacarse de la cabina y manipularse con guantes puestos. El llenado de la jeringa debe ser cuidadoso para minimizar la formación de burbujas de aire, las cuales en caso de formarse deben extraerse de forma vertical, con un algodón humedecido con un desinfectante plegado sobre la punta de la aguja.

Al igual que las pipetas no deben usarse las jeringas para mezclar líquidos con agentes infecciosos. Debe evitarse igualmente doblar, cortar, remover o reinsertar las agujas a las jeringas, si es necesario remover una aguja contaminada de una jeringa debe realizarse con cuidado. En caso de utilizar jeringas y agujas reutilizables disponer de un recipiente diferente que contenga desinfectante para contenerlas una vez utilizadas, el cual no debe ser el mismo recipiente que se

utiliza para las pipetas, para evitar que tengan que clasificarse y separarse posteriormente. Al igual que las pipetas descartables éstas deben desecharse en el recipiente de punzocortantes.

UBICACIÓN DE LA CABINA DE SEGURIDAD

En la medida de lo posible debe procurarse la instalación de este tipo de dispositivos en sectores alejados de corrientes de aire, como por ejemplo puertas, ventanas y salidas de ventilación, recordando siempre que el aire del recinto en el cual se ubica la cabina debe ser clase C.

Como se mencionó anteriormente, el flujo de personal dentro del área de preparaciones debe ser el más bajo posible, a fin de evitar que posibles corrientes de aire generadas por el movimiento continuo de personas alteren el equilibrio de los flujos de aire ^[18].

CAPÍTULO III

^{99m}Tc-CIPROFLOXACINA: UTILIDAD EN LOS PROCEDIMIENTOS DE DIAGNÓSTICO POR IMÁGENES.

3.1 INTRODUCCIÓN

Un paso vital en el tratamiento de pacientes con signos febriles es la pronta e inequívoca localización de la causa y/o foco infeccioso, para lo cual se deposita la confianza en los resultados de estudios microbiológicos, los cuales muchas veces no presentan la utilidad necesaria. De manera paralela y englobada en esta realidad se da el envejecimiento de la población mundial, el consecuente crecimiento en la incidencia de enfermedades articulares degenerativas, y la necesidad de cirugías de reemplazo articular aparejado a ello. Afecciones como la artropatía degenerativa o artritis comandan los diagnósticos que imperan procedimientos como la artroplastia total de cadera.

Algunas estadísticas señalan que este tipo de procedimientos muestran alguna evidencia radiográfica de aflojamiento al cabo de diez años de colocada y el 30 % requiere revisión. Este punto presenta importantes dificultades diagnósticas, debido a que el aflojamiento aséptico de las prótesis y un potencial proceso

infecciosos ofrecen presentación clínica y hallazgos histopatológicos muy similares entre ellos [26].

Como es conocido, los procesos infecciosos tienen una significativa morbimortalidad si se retrasa su detección o si el tratamiento inicial es incorrecto, además de producir una elevada incidencia de las formas crónicas y secuelas muy limitantes, estética y funcionalmente. Por ejemplo, el tratamiento del aflojamiento aséptico implica una única revisión ortopédica, la cual requiere generalmente un día de internamiento hospitalario, en cambio, un proceso infeccioso puede exigir una artroplastia escisional, seguida de un ciclo extenso de antibióticos parenteral, además de someter al paciente a revisiones ortopédicas periódicas durante un periodo prolongado posterior a la cirugía [29].

Por tanto, es de evidente importancia la localización precoz, la determinación de la extensión y el seguimiento de estas enfermedades por métodos no invasivos, y es en este escenario que los estudios gammagráficos deben ser valorados como primera técnica imagenológica, aprovechando la capacidad que ofrece el procedimiento de ofrecer información diagnóstica sobre el proceso inflamatorio antes de observar modificaciones anatómicas que aumenten la complejidad del tratamiento [13,26].

El panorama actual, como se ha comentado en el capítulo anterior, no ofrece una claridad absoluta en el diagnóstico y el empleo de un radiofármaco en particular, más aún considerando el grado relativo de inespecificidad ligado a todos los desarrollos con que se cuenta. Los antibióticos de diferentes familias marcados con ^{99m}Tc aparecen como una nueva opción, en particular la Ciprofloxacina, molécula perteneciente a la familia de las quinolonas, ha presentado resultados alentadores en estudios realizados con más de mil pacientes, impulsando así la exploración de otros antimicrobianos marcables con un mejor grado de interacción con los agentes infecciosos, y a su vez patrones de biodistribución más favorables [27].

3.2 ANTECEDENTES

La ciprofloxacina es un agente antimicrobiano de la familia de las quinolonas, cuyo mecanismo de acción es a nivel de los procesos involucrados con la síntesis del ADN. Los primeros estudios con este antibiótico marcado con ^{99m}Tc se llevaron a cabo en el Hospital San Bartolomé, en Londres en el año de 1996, por el equipo liderado por el Dr. Britton, y desde entonces se ha estudiado su eficacia diagnóstica en múltiples cuadros infecciosos [11].

Las primeras experiencias de los grupos investigadores conducidos por Britton, Vinjamuri y Hall fueron realizados en pacientes con infecciones protésicas de cadera y rodilla, osteomielitis, artritis reumatoide, endocarditis, neumonía, infecciones del tracto urinario y gastrointestinal, así como en piel y tejidos blandos, notándose la especificidad y capacidad del antimicrobiano de diferenciar entre procesos estériles y sépticos, con resultados de 83% y 91% respectivamente. Comparaciones posteriores realizadas con el método de leucocitos marcados presentaron una mejor resolución, mayor sensibilidad y menor tiempo de estudio_[2,6,11].

Inicialmente las experiencias fueron realizadas utilizando el ácido sulfónicoformamidina como agente reductor (FSA), sin embargo, posteriormente esta formulación fue modificada y el agente oxidante pasó a ser tartrato estañoso, cuya elaboración como kit se encuentra disponible a nivel comercial_[2,11].

Aunque aún no está muy claro, se presume que el mecanismo de acción de la molécula marcada es el mismo que presenta el antibiótico no marcado, acumulación y enlace a la enzima ADN-girasa bacteriana y su consecuente inactivación_[29].

Las investigaciones iniciales indican que la ciprofloxacina marcada presenta una sensibilidad moderada (70-85%), y una alta especificidad (91-96%), aunque recientes estudios han revelado casos de infecciones ortopédicas donde los porcentajes de especificidad y sensibilidad se invierten, creando controversia y obligando a los investigadores a realizar un análisis de las técnicas aplicadas en el diagnóstico de este tipo de infecciones. Aún así, la ciprofloxacina marcada con ^{99m}Tc ha presentado la capacidad de ubicar procesos infecciosos generados por bacterias_[29,32].

Entre las ventajas que presenta el uso de ciprofloxacina marcada con ^{99m}Tc, adicionales al amplio espectro de acción del antibiótico en sí, en comparación con el uso de leucocitos marcados se pueden citar:

- No presenta captación en médula ósea, lo cual favorece el diagnóstico en huesos largos y en columna vertebral.
- La independencia de la técnica del conteo de células blancas que presente el paciente al momento de la prueba y no está condicionada por el estado de las mismas.

- La formulación puede ser distribuida en forma de kit comercial, agilizando sobremanera la dinámica del estudio.
- El procedimiento se libera de la potencial transmisión de enfermedades propias de la manipulación de fluidos sanguíneos [11].

Aunque algunos de los resultados obtenidos en estudios realizados con este antibiótico han generado dudas sobre su selectividad entre procesos, se remarcan características importantes del compuesto como su disponibilidad, bajo costo, rápido aclaramiento sanguíneo, y facilidad de radiomarcaje [32].

Además, la ciprofloxacina es transportada por macrófagos, neutrófilos y monocitos, y posee la característica de penetrar la fibrina, componente esencial de la respuesta inflamatoria. Presenta una baja adhesión a proteínas plasmáticas (entre el 20-30%), una estructura no ionizada que le proporciona una alta facilidad de difusión, maximizada por la permeabilidad capilar y transporte de fluidos extracelulares consecuentes al proceso infeccioso [11].

Se han desarrollado y estudiado tres formulaciones adicionales del antibiótico marcado cuyos resultados en humanos reflejan buena especificidad, y en animales razones de captación en tejido infectados de hasta cinco veces mayor en el tejido infectado. Los ensayos realizados a nivel de laboratorio han demostrado resultados positivos tanto al inocular cepas de bacterias gram positivas (*S. aureus*) como gram negativas (*E. coli*) en animales de experimentación [11].

De igual manera se realizan investigaciones con otros miembros de la familia de las quinolonas como por ejemplo Levofloxacina, Norfloxacina, Ofloxacina y la Enrofloxacina marcadas con ^{99m}Tc o la Flerofloxacina y Trovafloxacina, fluoroquinolonas marcadas con ^{18}F y la ^{14}C -Sparfloxacina para el estudio en PET de la farmacocinética de estos antibióticos tanto en modelos animales como en humanos [2,12,31].

En referencia a la enrofloxacina los estudios de laboratorio presentaron una alta actividad específica y pureza radioquímica pos marcación, así como una estabilidad comparable a la presentada por la ciprofloxacina, concluyendo finalmente que ambos antibióticos no presentan diferencias significativas en su capacidad de diferenciar entre procesos infecciosos causados por agentes bacterianos y procesos asépticos. Solamente se encontró diferencia en el grado de captación en hígado y baso, donde la enrofloxacina presentó un nivel de actividad mucho más marcado que la ciprofloxacina, situación relacionada con una mayor lipofilidad de la enrofloxacina marcada en relación con su análogo [2,32].

Similares experiencias se han realizado con la sparfloxacin, la cual se caracteriza por tener un espectro de acción más amplio que la ciprofloxacina. Esta cualidad justifica, según los involucrados en los estudios, la obtención de mejores captaciones y mayor utilidad en el diagnóstico de procesos infecciosos a nivel abdominal en comparación con su análogo, manteniendo, claro está, la capacidad de distinción entre procesos infecciosos e inflamatorios. Al igual que en el caso de la ciprofloxacina, los resultados obtenidos con respecto a la especificidad del método también han sido cuestionados [2,4].

Antibióticos de otras familias también han sido estudiados con el fin de evaluar su efectividad en esta línea diagnóstica, por ejemplo aminoglucósidos y cefalosporinas. En el primero de los casos se han realizado ensayos en ratas y conejos con ^{99m}Tc -kanamicina para la detección de *S. aureus* encontrándose rendimientos de marcación superiores al 95% (sin el uso de quelantes bifuncionales), una estabilidad de hasta seis horas del antibiótico marcado, y un porcentaje de enlace a bacterias in vitro comparable con la ^{99m}Tc -ciprofloxacina [22].

En el caso de las cefalosporinas las investigaciones más profundas se han realizado con Ceftizoxima marcada con ^{99m}Tc . La ceftizoxima pertenece a la tercera generación de esta familia, posee actividad β -lactámase y un espectro de acción tanto gram positivo como negativo, involucrando gérmenes como Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae*, *N meningitidis* y *S. aureus* [17].

Los estudios realizados tanto en animales presentaron buenos niveles de captación, los cuales fueron incrementando conforme avanzó el periodo pos inyección, justificado por la fijación progresiva y específica del radiofármaco en el sitio de la infección. La principal desventaja observada con este radiofármaco es la alta eliminación por vía hepática, la cual alcanzó hasta un 11% de la actividad total administrada, complicando la toma de imágenes para el diagnóstico de procesos abdominales; en cuanto a los demás tejidos la captación fue relativamente baja, resaltándose su no captación en médula ósea que combinada con la observada a nivel muscular (0.05%) convierten al radiofármaco en un agente idóneo para el diagnóstico de procesos infecciosos osteoarticulares [2,13].

Otra de las observaciones realizadas reflejó una acumulación del radiofármaco en abscesos sépticos en un tiempo de 30 minutos pos inyección, lo cual significa que aunado al proceso de marcación el proceso diagnóstico podría completarse en un periodo de una hora. Los porcentajes de sensibilidad, especificidad y precisión observados en estudios con seres humanos fueron de 100%, 83%, y 94% respectivamente para procesos infecciosos diversos [2,13].

Otras clases de antimicrobianos son estudiados con el fin de desarrollar métodos diagnósticos principalmente dirigidos a poblaciones más susceptibles. Por ejemplo, las infecciones ocasionadas por hongos son un serio problema para pacientes con VIH, transplantados o en tratamiento quimioterapéutico. Entre los agentes en estudio se encuentra el ^{99m}Tc -fluconazol, el EB-A2 (anticuerpo monoclonal contra *Aspergillus galactomannan*) y la chitinasa marcada con ^{123}I . Este último es el que al parecer ha demostrado resultados más alentadores, los cuales indican la capacidad del mismo de acumularse en *C. albicans* y *Aspergillus fumigatus* [23].

Orientado hacia estos mismos grupos poblacionales se encuentran los ensayos con ^{99m}Tc -etambutol y ^{99m}Tc -isoniazida, para el diagnóstico oportuno de afecciones causadas por micobacterias. Estudios en ratones y conejos para el primero de los antibióticos demostró la acumulación de este potencial radiofármaco en el sitio afectado desde un periodo de 2 horas pos inyección, e incrementando la captación en las cuatro horas posteriores y manteniéndose 24 horas después. Avances relacionados con el mismo son esperados con entusiasmo [10,22].

Los ensayos con ^{99m}Tc -isoniazida obtuvieron porcentajes de marcación superiores al 98%, y una estabilidad mayor a seis horas a temperatura ambiente. Los resultados en conejos evidenciaron una buena estabilidad in vivo del radiofármaco, así como la excreción hepática del mismo radiofármaco y la acumulación en lesiones inoculadas con *M. tuberculosis*, en modelos animales [22].

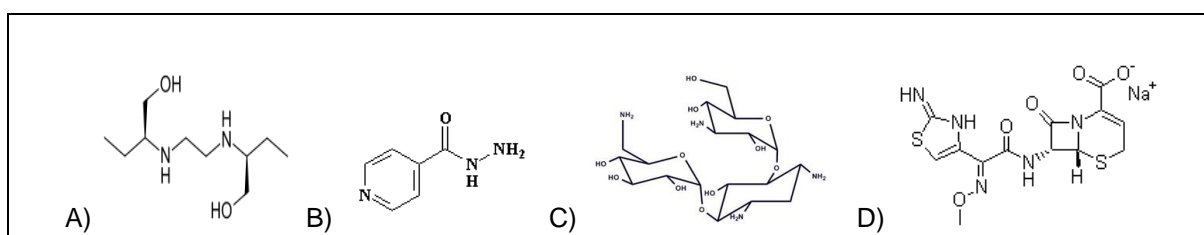


Figura 18: Estructura química de antibióticos marcables con ^{99m}Tc en estudio actualmente: A) Etambutol; B) Isoniazida; C) Kanamicina; D) Ceftizoxima.

3.3 OBJETIVOS

- Describir el desarrollo de antibióticos marcados en el diagnóstico diferencial por imágenes de procesos infecciosos.

- Puntualizar el papel que desempeña en la actualidad la Ciprofloxacina como herramienta diagnóstica en la Medicina Nuclear.

3.4 ANTIBIÓTICOS, GENERALIDADES.

Los antibióticos son sustancias químicas específicas producidas por organismos vivos cuyos análogos estructurales obtenidos mediante procedimientos de síntesis o semisíntesis tienen la capacidad, a diferentes concentraciones, de inhibir procesos vitales en una o varias especies de microorganismos.

El desarrollo de los antibióticos inicia de manera indirecta tras las observaciones de Pasteur, quien concluyó que el crecimiento de una especie bacteriana puede verse inhibida por la aparición de una segunda en el mismo medio de cultivo. Estas experiencias fueron secundadas por los hallazgos de Emmerich y Low en 1899 con el uso de *Pseudomonas aeruginosa* [11].

En 1929 Alexander Fleming aisló de un hongo de la familia *Penicilium* un compuesto capaz de destruir colonias de *Staphylococcus aureus*, la cual denominó penicilina. La concentración del principio activo presente en el material extraído por Fleming constituía solamente un 10% del total, y el siguiente paso fue la prueba del componente puro en animales, por parte de Florey, Chain y Abraham en la Universidad de Oxford, cuyos resultados positivos proporcionaron el incentivo para la fabricación de la misma a escala industrial a partir de 1942 [11,25].

A partir de este momento, las penicilinas se convirtieron en uno de los grupos de antibióticos con mayor importancia, y muchos de los desarrollos actuales de antimicrobianos han partido del núcleo base de la penicilina para la síntesis de nuevos agentes.

Los antibióticos son clasificados con base en la estructura de su núcleo base, y sus mecanismos de acción se encuentran condicionados por la constitución anatómica y fisiológica de las bacterias. En general los mismos se orientan con el objetivo de dañar la conformación de la pared y membrana celular o la inhibición directa o indirecta de la síntesis de ARN y ADN. Se citan a continuación los grupos más relevantes utilizados en la práctica clínica [17].

Sulfonamidas: son análogos y antagonistas competitivos del ácido para-aminobenzoico (PABA), usado por las bacterias para la síntesis de ácido fólico. Las sulfonamidas actúan como inhibidores competitivos de la enzima dihidropteroato sintetasa, responsable de la incorporación del PABA al ácido

dihidropteroico, precursor inmediato del ácido fólico. Los microorganismos sensibles a esta familia son aquellos que deben sintetizar su propio ácido fólico, y no pueden utilizar el folato preformado, como lo hacen los mamíferos.

Penicilinas: derivados del ácido 6-aminopenicilámico, con un anillo beta lactámico fundido con un anillo tiazolidínico. Su mecanismo de acción puede comprenderse en dos procesos, el primero, una acción lítica mediante la ruptura del balance entre las proteínas penicilínicas de enlace (PBPs) y la acción de la hidrolasa mureina, con la consecuente interrupción del ensamblaje del peptidoglicano (componente heteropolimérico de la pared celular que provee rigidez mecánica y estabilidad a la misma). El segundo mecanismo, no lítico, consiste en la alteración del potencial de membrana celular.

Algunas penicilinas han sido combinadas con inhibidores irreversibles de la enzima β -lactámase, como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, incrementando el espectro de acción de las mismas y disminuyendo la destrucción del anillo como mecanismo de resistencia. Estos compuestos en sí mismos poseen pobre actividad antimicrobiana.

Cefalosporinas: su mecanismo de acción es análogo al de las penicilinas, inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana. Se encuentran divididas en cuatro generaciones según su espectro de acción, conforme han progresado las mismas su acción sobre gram positivos ha disminuido e incrementado su efecto sobre gram negativos.

Carbapenémicos: estos derivados β -lactámicos contienen este anillo unido a otro insaturado sin el azufre característico del anillo tiazolidínico. Su espectro de acción es más amplio que el de sus predecesores.

Tetraciclinas: es este grupo se encuentran miembros elaborados por bacterias y semisintéticos, todos ellos congéneres de la naftacenocarboxamida policíclica. Las tetraciclinas son agentes bacteriostáticos, y su ingreso a la célula se produce a través de canales hidrofílicos en la membrana celular y un posterior sistema dependiente de energía que las lleva a través de la membrana citoplasmática. Su mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis proteica mediante la unión con la subunidad ribosomal 30 S, evitándose el acceso del aminoacil ARN_t al sitio aceptor en el complejo ribosoma ARN_m y consecuente síntesis protéica.

Macrólidos: son agentes bacteriostáticos, su mecanismo de acción se basa en la supresión de la síntesis proteica mediante el enlace con la subunidad 50 S del ribosoma, mismo sitio de unión que el cloranfenicol. Se cree que la eritromicina no presenta una inhibición directa del enlace pero evita en paso de translocación en

el cual las moléculas sintetizadas por el peptidil ARN_t pasan del sitio aceptor al donador en la unidad ribosomal.

Aminoglucósidos: son antibióticos bactericidas y concentración dependientes. Luego de difundir a través de los canales acuosos de la membrana celular hacia el espacio periplásmico son introducidos al citoplasma mediante un transportador dependiente de potencial. Una vez ahí, los aminoglucósidos se unen de manera irreversible a la subunidad 30 S del complejo ribosomal, interfiriendo de manera prematura con la correcta lectura del ARN mensajero y ocasionando consecuentemente la producción de proteínas no funcionales y la muerte celular.

Rifampicinas: los miembros de este grupo ejercen su efecto bactericida a través de la inhibición de la ARN polimerasa dependiente de ADN. Esto se logra mediante la formación de un complejo estable con la enzima, específicamente en el sitio β con lo cual se suprime la iniciación de la cadena en la síntesis de ARN. Altas concentraciones de este agente logran también inhibir la la ARN polimerasa dependiente de ADN y la transcriptasa en virus.

Anfenicoles: sus integrantes presentan difusión a través de la membrana celular bacteriana y posterior unión reversible a la subunidad 50 S ribosomal, evitándose consecuentemente la transferencia de los aminoácidos a las cadenas peptídicas en formación, obstruyéndose de esta manera el proceso de síntesis proteica.

Lincosamidas: aunque no presentan relación estructural con las tetraciclinas o los anfenicoles las clindamicinas actúan inhibiendo de igual manera la subunidad 50 S y suprimiendo la síntesis proteica, esta es la esta razón que no se indican de manera concomitante en la práctica, evitándose así la inhibición de la acción terapéutica entre ellos.

Vancomicina: este glicopéptido tricíclico, activo contra bacterias gram positivas, es producido por el *Streptococcus orientalis*. Su acción bactericida se ejecuta mediante la inhibición en la síntesis de la pared celular mediante el enlace a la D-alanil-D-alanina terminal de las unidades precursoras en la formación de la estructura. La vancomicina se presenta como la única opción terapéutica disponible ante la aparición de cepas resistentes a β -lactámicos.

Polimixinas y Colistina: su acción se encuentra restringida a microorganismos gram negativos. Son definidos como agentes anfipáticos acción de superficie, que presentan una interacción intensa con los fosfolípidos de la membrana penetrando en ellos y desestabilizando la integridad de la membrana celular del germen.

Quinupristin/Dalfopristin: este grupo se encuentra reservado para el tratamiento de infecciones complicadas por gérmenes gram positivos multiresistentes y en procesos ocasionados por *E. faecium* resistente a vancomicina. Ambos son inhibidores de la subunidad 50 S ribosomal, el quinupristin se une al mismo sitio de acción que los macrólidos ocasionando la obstrucción en la elongación polipeptídica y consecuentemente de la síntesis proteica. El dalfopristin se une a un sitio cercano en la misma subunidad interfiriendo con formación de la cadena polipeptídica y a su vez favorece un cambio conformacional en la misma que sinergiza la unión del quinuprostin y ocasiona la muerte celular.

Oxazolidinonas: el miembro representativo es el Linezolid, molécula con acción bacteriostática y bactericida principalmente orientada a gram positivos. Su acción se basa en la inhibición de la síntesis proteica por parte del complejo 70 S al evitar la unión de las subunidades 50 S y 23 S en el ribosoma. Su uso se encuentra reservado para cepas resistentes a β -lactámicos y vancomicina.

Teicoplanina: al igual que la vancomicina, la Teicoplanina es un inhibidor de la síntesis de la pared celular activo solamente contra gram positivos. Su acción es bactericida (excepto para enterococos) y activo contra agentes meticilino resistentes.

Metronidazol: es un antibiótico con acción antiparasitaria. Actúa mediante la desestructuración del ADN. Ingresa a la célula mediante difusión pasiva, donde posteriormente sufre una reducción química debido a la acción del metabolismo anaerobio de los microorganismos sensible, generando radicales libres que provocan la pérdida de la estructura helicoidal del ADN, ruptura en las cadenas e inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos.

Quinolonas: este grupo será descrito a continuación.

3.5 CIPROFLOXACINA

La 4-fluoroquinolona, ciprofloxacina, es un antibiótico sintético de amplio espectro perteneciente justamente a la familia de las quinolonas, específicamente a la segunda generación de las mismas.

Los integrantes de la familia de las quinolonas penetran hasta el núcleo celular a través de los canales de la membrana, y es aquí donde se desarrolla su mecanismo de acción, la inhibición de dos de los miembros de la familia de las enzimas topoisomerasas: la ADN girasa y la topoisomerasa IV, esenciales en la

actividad metabólica de las bacterias. En los organismos gram negativos el sitio blanco es inicialmente la ADN girasa, al contrario de los gram positivos, donde se da la inhibición inicial de la topoisomerasa IV [17].

Durante el metabolismo celular es constante el enrollamiento y desenrollamiento de algunos segmentos de las cadenas cromosómicas. La enzima ADN girasa se encarga de regular la separación de las cadenas de ADN propias de los procesos de replicación y transcripción, la acción de la topoisomerasa se centra en la cadena hija de ADN producto de la replicación del mismo. De ahí que la inhibición conjunta de ambas enzimas consecuentemente interrumpa el proceso metabólico normal en la bacteria.

Las quinolonas presentan una rápida actividad bactericida tanto en la fase de replicación como en las fases de latencia, donde la síntesis proteica se encuentra detenida, pues al contrario de los demás miembros de este grupo la ciprofloxacina posee un mecanismo dual de acción bactericida, la acción citada sobre la ADN girasa que caracteriza al grupo y una segunda acción sobre la síntesis proteica [11].

Como se mencionó anteriormente, esta molécula tiene acción tanto sobre bacterias gram positivas (ej. *S.aureus*, *Streptococcus spp.*), gram negativas (ej. *Salmonella spp*, *E. coli*, *Shigella spp*, *Vibrio spp*), así como sobre organismos anaerobios (*P. aeruginosa*). Esta característica es muy importante al considerar la variabilidad etiológica de los procesos infecciosos [1].

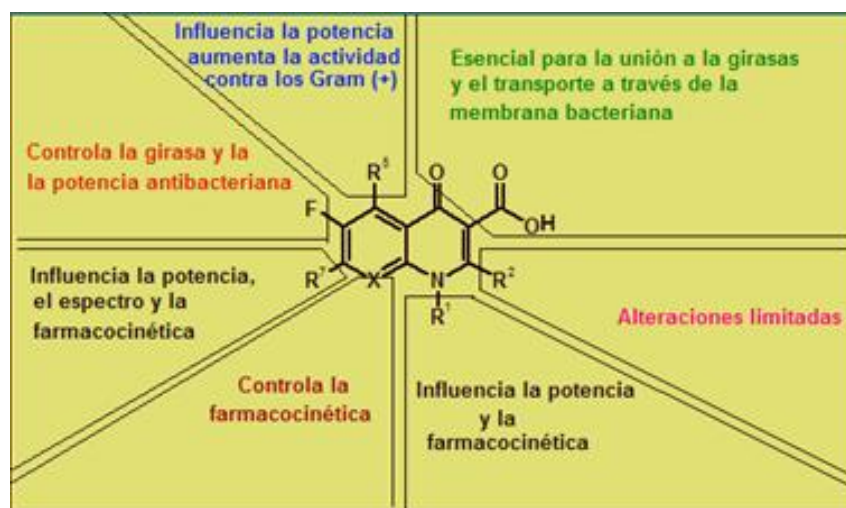


Figura 19: Estructura base de la familia de las quinolonas.

Una ventaja relevante es que la resistencia farmacológica de algunos microorganismos al fármaco no condiciona su utilidad diagnóstica una vez

marcada con el radionucleido. Para el caso de las ciprofloxacina los mecanismos de resistencia con frecuencia se relacionan con mutaciones en los sitios de unión con las enzimas topoisomerasa y la girasa y el desarrollo de barreras impermeables. Otro de los mecanismos involucrados es el desarrollo de bombas expulsoras de eflujo. Un estudio realizado con cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa* con resistencia comprobada al antibiótico mediante el desarrollo de bombas de eflujo, demostró que el antibiótico marcado no era expulsado por las bacterias, por lo tanto la utilidad diagnóstica del mismo no era afectada por este factor. Dos son las explicaciones posibles a este hallazgo, la primera es que el complejo ^{99m}Tc -ciprofloxacina no es reconocido por las bombas, y la segunda es que el potencial ^{99m}Tc disociado dentro de la célula bacteriana no atraviesa la membrana, por lo tanto no puede ser expulsado [1,33].

Los miembros de esta familia presentan rangos de vida media variados, de tres a cinco horas para norfloxacina y ciprofloxacina, y más amplios, hasta 20 horas en el caso de la Sparfloxacina. Presentan un alto volumen de distribución, los cuales en ocasiones exceden el volumen corporal total de agua con concentraciones en orina, riñón, pulmón, próstata, bilis, macrófagos y neutrófilos más altos que en plasma. Presentan concentraciones más bajas que el plasma en el fluido cerebro espinal y prostático, así como en hueso. Es importante destacar el uso de las mismas en infecciones óseas, articulares y tejidos blandos, aunque debido a su amplio espectro de acción el uso de las quinolonas esta ampliado a múltiples padecimientos [17].

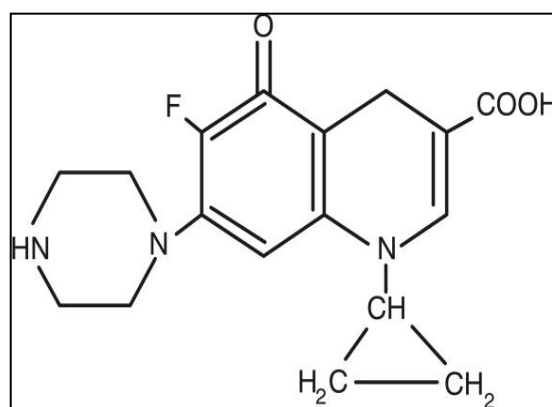


Figura 20: Estructura química de la ciprofloxacina.

Las quinolonas presentan una baja unión a proteínas (por lo general alrededor del 15-30%), y sus vías de eliminación difieren entre los diferentes miembros del grupo, siendo ésta hepática o renal, moléculas como la ciprofloxacina, norfloxacina y ofloxacina, son eliminadas por vía renal. En el caso de las dos primeras presentan una vida media de eliminación de alrededor de tres horas; la

trovafloxacin, grapefloxacin, pefloxacin o sparfloxacin, siguen un tránsito hepático, presentando esta última un periodo medio de eliminación de 20 horas [17]. Algunos de los miembros requieren ajustes en su dosificación en caso de pacientes en las cuales sus vías de excreción presenten algún grado de compromiso, sin embargo para el ámbito de medicina nuclear esta consideración no es relevante, debido a la poca cantidad de producto administrado.

Aunque por lo general las quinolonas son bien toleradas los efectos secundarios de su administración no son de relevancia en el ámbito en cuestión, aunque es prudente consultar al paciente si ha presentado algún episodio de hipersensibilidad al uso de estos antibióticos anteriormente.

3.5.1 ^{99m}Tc-CIPROFLOXACINA

La ciprofloxacina fue el primer antibiótico que se marco con ^{99m}Tc para el diagnóstico de procesos infecciosos. Las primeras experiencias fueron desarrolladas hace más de quince años, involucrando el uso de formamidina sulfínica (FSA) como agente reductor en atmósfera de N₂. El proceso era completado con el calentamiento a 100°C durante diez minutos para favorecer la unión ^{99m}Tc-ciprofloxacina (debe resaltarse que el antibiótico no es afectado al calentarse a estas temperaturas). Sin embargo, debido a la poca estabilidad del FSA a altas temperaturas los rendimientos de marcación obtenidos fueron relativamente bajos (alrededor del 55±8%) [2,16].

La técnica fue mejorada utilizando resinas de intercambio aniónico con el fin de retener el ^{99m}Tc libre. Este paso incrementó el porcentaje de pureza (>98%) y la eficiencia de marcación (>95%), con una estabilidad del complejo entre cuatro y ocho horas. La ITLC realizada utilizando solución salina como eluyente presentó un R_f de 0.7 y para el antibiótico y el radiofármaco respectivamente, mientras que por HPLC se obtuvieron tiempos de elución de 8.8 y 6.1 minutos de manera respectiva [2,12].

Los ensayos in vitro con *S.aureus*, *P.aeruginosa* y *E.coli* presentaron porcentajes de captura de 58.5%, 50.2% y 43.9% respectivamente. Se utilizándose como control ^{99m}Tc-metildifosfonato y un cultivo con bacterias muertas los cuales presentaron captaciones menores al 2.5% y 10% respectivamente. Se observó un porcentaje de unión a proteínas de radiofármaco del 56.8±7.4%, un aclaramiento renal acompañado probablemente de secreción tubular [2, 6,12].

Resultados in vivo realizados con esta formulación presentaron una sensibilidad para la detección del proceso infeccioso del 83%. Los resultados de la misma variaron en los diferentes grupos de pacientes, desde un 89% para el grupo de pacientes con problemas óseos hasta un 38% en la detección de endocarditis. La especificidad presentó el mismo comportamiento, con un valor promedio del 91%, siendo mayor en el grupo con problemas a nivel abdominal (100%) y más bajo en el grupo óseo (71%). Las dosis administradas a cada paciente, vía intravenosa lenta estuvieron en el rango de 370-400 MBq [2,6,16].

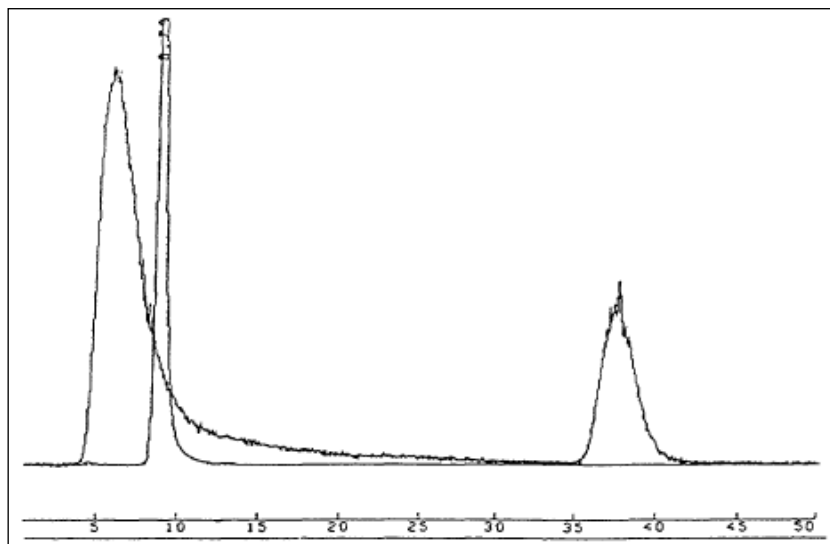


Figura 21: Perfiles cromatográficos en HPLC del ^{99m}Tc -ciprofloxacin. Tiempos de retención Cip: 6.1; ^{99m}Tc -cip 8.8; $^{99m}\text{TcO}_4$: 37.1 minutos. Condiciones: columna nucleosil C_{18} , Fase móvil: acetonitrilo/tributilamonio Br 0.01M, buffer PO_4 (20:80), pH: 3 [16].

Posteriormente se desarrollo una nueva formulación utilizando Sn como agente reductor, envasado de manera separada al antibiótico. El procedimiento de marcación consistió en agregar en primer paso el ^{99m}Tc al vial con el agente reductor y posteriormente el antimicrobiano, con un periodo de incubación de 15 minutos (ensayos con animales realizados involucrando tiempos de incubación del radiofármaco de 1-30 minutos no mostraron diferencias significativas en los rendimientos de marcación). Se obtuvieron rendimientos de marcación >96% evitando el calentamiento y la purificación, y un comportamiento tanto in vivo como in vitro muy similar entre las dos formulaciones [2,11].

Para esta formulación el control de calidad puede llevarse a cabo mediante el método cromatográfico utilizando ITLC, papel Whatman 3MM o TLC-Aluminio. Como fases móviles el uso de acetona (90%) o metiletilcetona (MEC) presentan practicidad y son accesibles en cualquier centro de medicina nuclear. Los R_f

respectivos obtenidos con estas fases móviles y papel Whatman 3MM como fase estacionaria fueron ^{99m}Tc -Cipro $R_f = 0$, $^{99m}\text{TcO}_4$ $R_f = 1$; ^{99m}Tc -Cipro $R_f = 0$, $^{99m}\text{TcO}_4$ $R_f = 1$ [11].

Las imágenes obtenidas con ambas formulaciones en diferentes estudios presentaron una importante actividad renal, ligada a la vía natural de excreción del antibiótico, y bajas actividades a nivel hepatoesplénico e intestinal que disminuyeron en intensidad con el tiempo. No se presentó actividad en hueso sano, tejidos blandos, médula ósea o músculo. Así mismo, no se observó captación por parte de la flora bacteriana normal así como tampoco en cerebro, hueso sano, tejidos blandos o médula ósea (ventaja considerable para el diagnóstico de procesos a nivel esternal y cardiaco). No fueron reportados efectos adversos luego de la administración intravenosa del radiofármaco, por lo general los ensayos en pacientes utilizaron viales con 2mg del antibiótico marcado con 400 ± 20 MBq, de los cuales se administró en promedio una actividad de 370 MBq, los viales fueron reconstituidos con 1ml de solución fisiológica [2,6, 4, 31].

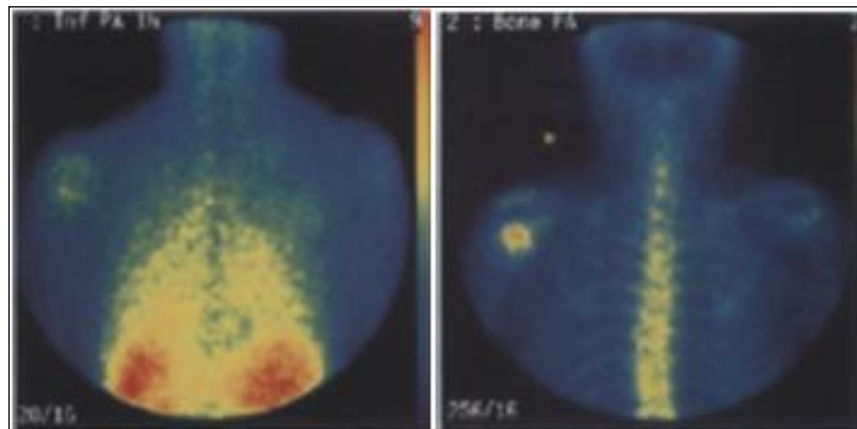


Figura 22: Proceso osteomielítico a nivel de húmero derecho. Derecha: imagen captada con ^{99m}Tc -ciprofloxacina. Izquierda: estudio con ^{99m}Tc -exametazina-leucocitos. Nótese la diferencia de captación a nivel de médula ósea [6].

Experiencia clínica.

Las primeras experiencias en infecciones ortopédicas y hueso realizadas con el antibiótico marcado presentaron una alta precisión, especialmente en procesos crónicos. Los estudios realizados in vivo e in vitro presentaron altas concentraciones del antibiótico marcado en abscesos inducidos por agentes gram negativos y positivos, sin localización en inflamaciones estériles. Tampoco se observó captura del radiofármaco por parte de neutrófilos o macrófagos presentes

en las zonas de infección, así como la aparente no influencia de tratamientos antibióticos previos en la cinética de acumulación del radiofármaco [2].

Los estudios multicéntricos realizados en procesos inflamatorios agudos/crónicos y cuadros de infección/ fiebre, presentaron una sensibilidad del 93%, especificidad del 86%, precisión del 90%, y valores predictivos positivo-negativo del 92% y 86% respectivamente para diagnóstico de infección. Otros estudios realizados en pacientes con infecciones en hueso específicamente han presentado 94%, 83%, y 89% de sensibilidad, especificidad y precisión respectivamente. Ensayos realizados en grupos de pacientes con cuadros infecciosos de diferentes etiologías (osteomielitis, prótesis ortopédicas, tuberculosis, tejidos blandos, infecciones abdominales, endocarditis) también han proporcionado porcentajes de sensibilidad y especificidad destacados, respaldados con cultivos de laboratorio [2,4].

Sin embargo, se han presentado ensayos con resultados totalmente distintos, en los cuales se concluye la incapacidad del radiofármaco de diferenciar entre osteomielitis y artritis sépticas y de procesos inflamatorios estériles. Además se han obtenido bajas especificidades en estudios animales para infecciones protésicas en diferentes modelos. Esta variabilidad en los resultados es justificada por múltiples razones, como diferencias en las poblaciones de estudio, diferencias en los tiempos de toma de imágenes y distintos procedimientos para realizar la marcación del antibiótico [2,5,31].

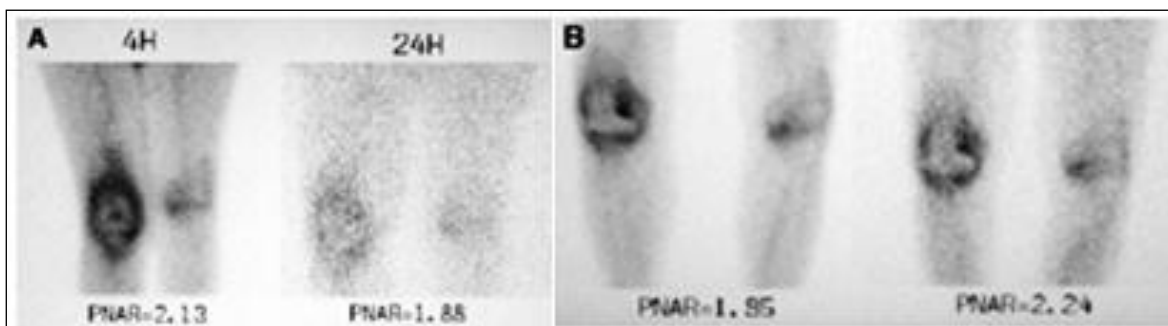


Figura 23: Ejemplo de centelleografía con ^{99m}Tc -ciprofloxacina en prótesis de rodilla. Izquierda: captación en rodilla derecha, cavidad sinovial y tibia periprotésica infectada. Derecha: imagen de un remplazo de rodilla derecha aséptico, obsérvese la actividad a nivel de cavidad sinovial, tibia periprotésica y fémur [4].

Algunos de los estudios que presentaron pérdida de especificidad del radiofármaco se dieron en el diagnóstico de inflamaciones asépticas de prótesis de rodilla, procesos pseudoartrósicos, reumatismo poliandrómico y fibrosis espinal pos quirúrgica. Así mismo, casos de falsos positivos en los estudios fueron encontrados en pacientes con displasia fibrosa, necrosis avascular, artritis

psoriática y reumatoide, prótesis articulares no infectadas y artroplastias inflamatorias [2,4].

Estudios experimentales en ratones reflejaron captura del radiofármaco en abscesos tanto estériles como sépticos, e igualmente en fluido sinovial y cartílago dañado aséptico en conejos. Esta situación es justificada en algunos estudios por el tamaño de la ciprofloxacina, el cual favorece su difusión pasiva y su exudación hacia espacios intersticiales por las condiciones locales de permeabilidad aumentada. Sin embargo, la persistencia de la actividad aún en imágenes tomadas 24 horas pos inyección lleva a pensar en la existencia de otros mecanismos de captación [2,4].

Las prácticas mostraron que las imágenes tomadas una hora posterior a la aplicación fueron difusas en el foco infeccioso, pero mejoraron al retrasar el tiempo de toma de imagen, los ensayos realizados con diferentes formulaciones presentaron como parte de su protocolo tomas de imagen una y cuatro horas pos inyección, e imágenes adicionales 24 horas después en casos dudosos. Se observó que la toma de imágenes normalizadas 24 horas posteriores a la aplicación disminuyó el porcentaje de falsos positivos e incrementó la especificidad de la técnica.



Figura 24: Derecha: diagnóstico de infección intrafalangeal en el dedo índice de la mano izquierda con ^{99m}Tc -ciprofloxacina. Centro: estudio realizado tres meses después. Izquierda: Imagen de comprobación 24 horas después permitió descartar el proceso infeccioso y confirmar la artropatía inflamatoria [4].

Otras observaciones prácticas derivadas de los diferentes ensayos fueron la facilidad en la toma de imágenes y la robustez ligada al procedimiento de preparación del radiofármaco; sin embargo debe señalarse que un procedimiento de preparación poco cuidadoso puede llevar a la formación de altas cantidades de coloides de Tecnecio [2,5].

Uno de los detalles interesantes observados durante los ensayos fue que en ciertos procesos, como por ejemplo abscesos, los leucocitos marcados se acumularon dentro del mismo, donde las bacterias estaban muertas, mientras que el antibiótico radiomarcado se acumuló en la periferia de los mismos, donde se encontraban la mayor cantidad de gérmenes vivos, la estrategia de retrasar el tiempo de toma de imagen mejoraron la calidad de las mismas para este caso en particular [2,6].

CONCLUSIONES.

Las investigaciones en torno al desarrollo de agentes para el diagnóstico específico de procesos infecciosos se encaminan en diferentes vías. Todas ellas buscando la conjugación óptima de características que permitan al radiofármaco compararse con el gold estándar y posicionarse como nuevo agente de elección en la mayor cantidad de casos posibles, evadiendo de una vez por todas el inconveniente que representa la manipulación in vivo de fluidos y células humanas.

Recordemos que hasta el momento la técnica de ^{99m}Tc -HMPAO-leucocitos ocupa el lugar preponderante debido a ventajas como su alto rendimiento de marcación, muy baja adhesión celular, bajo costo, amplia disponibilidad, funcionalidad en el diagnóstico de múltiples procesos y una emisión de energía excelente para la obtención de imágenes. Sin embargo además de las desventajas de estabilidad ligadas a las características propias de las moléculas implicadas, no debe olvidarse el hecho de que la técnica no presenta la especificidad y sensibilidad ideal, las cuales aunque mejoran al ser combinada con otros procedimientos, los beneficios obtenidos no alcanzan para justificar una generalización de estas variantes.

No debe omitirse el hecho de que cualquier procedimiento aprobado, optimizado y con resultados destacables siempre está condicionado al seguimiento constante de las buenas prácticas de manufactura y a la realización de los controles de calidad necesarios con el fin de justificar la exposición del paciente a la radiación ionizante en pro de obtener los mayores beneficios.

Los desarrollos paralelos alcanzados en investigaciones para ampliar las técnicas de marcación en interleuquinas, péptidos de enlace a receptores en leucocitos, anticuerpos antigranulocitos o péptidos antimicrobianos se encuentran en la mayoría de los casos superando los diferentes escalones que representan los

ensayos clínicos y preclínicos, y aunque los resultados han sido alentadores (y presentan la ventaja de ser marcables con ^{99m}Tc) no son suficientes aún para su disposición a nivel de los sistemas de salud

Ante este panorama marcaje de antibióticos despunta, desde hace algunos años, como una opción válida. Presentando ventajas tangibles como su disposición en forma de kit, la omisión del contacto con derivados biológicos y la no captación por parte de la medula ósea.

El desarrollo del marcaje de ciprofloxacina y su posicionamiento a nivel comercial en algunos países ha generado importantes debates sobre su utilidad real en torno al fin esperado, no se ha llegado aún a un consenso entre los diferentes grupos de investigadores quienes discrepan con los resultados obtenidos, los cuales presentan fluctuaciones importantes. Debe aclararse que la formulación comercial de ciprofloxacina para marcaje con ^{99m}Tc no fue aprobada en el año 2004 por parte de la FDA para iniciar estudios clínicos fase III.

Por lo tanto su uso a criterio del equipo de medicina nuclear cual debe verse sopesado por los inconvenientes implicados en la instauración de la técnica y los beneficios reales, derivados de un potencial estudio a nivel local, donde se tomen en cuenta las características particulares de las sub poblaciones de interés.

Esta realidad ha impulsado el desarrollo de otros procedimientos con esta orientación, la marcación de otras quinolonas, aminoglucósidos y cefalosporinas se encuentra en estudio a nivel in vitro y en animales, presentando hasta el momento resultados alentadores, pero que igualmente está pendiente superar la barrera de la aplicación en humanos a pequeña y gran escala para evaluar su desempeño.

De esta manera sucede también con otros antimicrobianos marcados enrumbados hacia diagnósticos más específicos, como la tuberculosis (con el caso de la isoniazida y el etambutol) o infecciones causadas por hongos, en pro de cubrir problemas frecuentes en ciertas sub poblaciones cuyo número lamentablemente va en aumento, y que con lo cual demanda a la comunidad científica la unión de esfuerzos con el fin de encontrar soluciones objetivas anticipadas a potenciales amenazas generales

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Bayer HealthCare Pharmaceuticals. *Ciproxina: monografía del producto*. Alemania.
2. Benitez A, Roca M, Martín-Comin J. *Labeling of antibiotics for infection*. Q J Nucl Med Imaging 2006; 50:147-152.
3. Briceño I. *Sepsis: Definiciones y Aspectos Fisiopatológicos*. Medicrit 2005; 2(8):164-178.
4. Britton K, Wareham D, Das S, et al. *Imaging bacterial infection with 99mTc-ciprofloxacin (Infecton)*. J Clin Pathol 2002; 55:817-823.
5. Britton K, Das S, Solanki K. *Ability of 99mTc-Ciprofloxacin Scintigraphy to Discriminate Between Septic and Sterile Osteoarticular Diseases*. J Nucl Med.2003; 44:922-923.
6. Britton K, Vinjamuri S, Hall A, et al. *Clinical evaluation of technetium-99m infecton for the localisation of bacterial infection*. Eur J Nucl Med. 1997; 24:553-556.
7. Carrera D, Domenech A, Mora J, et al. *Utilidad pronóstica de la gammagrafía con leucocitos marcados ^{99m}Tc-HMPAO en la enfermedad inflamatoria intestinal*. Rev Esp Med Nucl. 2006; 25:380-386.
8. Companioni M. *Acido araquidónico y radicals libres: su relación con el proceso inflamatorio*. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas 1995; 14.
9. Crudo J, Nevares N, Zapata A, et al. *Un estudio completo sobre la obtención de ^{99m}Tc-UBI 29-41 y su comportamiento in vitro e in vivo: su potencial uso en imágenes de infecciones*. Alasbimm Journal 2005;7(28)
10. Das S, Hall A, Wareham D, et al. *Infection Imaging with Radiopharmaceuticals in the 21st Century*. Brazilian Archives of Biology and Technology. 2002; 45:25-37.
11. De Andrade P. *Ciprofloxacina-^{99m}Tc: marcação de biodistribuição no diagnostico de infecção*. IPEN. São Paulo. 2004.

12. Gano L, Patrício L, Cantinho G, et al. *Ciprofloxacin in Imagin Infective Versus Sterile Inflammation*. Instituto Tecnológico e Nuclear, Scavem, Portugal.
13. Gomes V, Rabiller G, Iglesias F, et al. *Gammagrafía con ^{99m}Tc-ceftizoxima en ratas normales y ratas con absceso inducido*. Rev Esp Med Nucl. 2005; 24(5):312-318.
14. Gopal B. S. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. 5th ed. Ed. Springer. 2004. USA.
15. Groth S, Khan B, Padhy A, et al. *Combating Infection in Developing Countries: The IAEA Contribution*. IAEA. Austria.
16. Hall A V, Solanki K K, Vinjamuri S, et al. *Evaluation of the efficacy of ^{99m}Tc-Infecton, a novel agent for detecting sites of infection*. J Clin Pathol 1998; 51:215-219.
17. Hardman J, Limbird L, Goodman A. Goodman & Gilman: The Pharmacological basis of Therapeutics. 10th ed. Ed. Mc Graw-Hill. USA.
18. Hernández A, Luna P. *NPT 233: Cabinas de seguridad biológica*. Centro Nacional de Condiciones de Trabajo, Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. España.
19. IAEA. *Development of kits for ^{99m}Tc radiopharmaceuticals for infection imaging*. TecDoc-1414. 2004. Austria.
20. IAEA. *Operational Guidance on Hospital Radiopharmacy. A Safe and Effective Approach*. 2008. Austria.
21. Inmunomedics GmbH. *Leukoscan: Ficha Técnica del Producto*. Alemania.
22. Jehangir M, Mushtaq A, Malik S, et al. *Synthesis and evaluation of ^{99m}Tc-Kanamycin and ^{99m}Tc-Isoniazid for infection imaging*. IAEA: Trends in Radiopharmaceuticals (ISTR-2005). Vol I.
23. Kumar V. *Radiolabeled white blood cells and direct targeting of microorganisms for infection imaging*. Q J Med Mol Imaging. 2005; 49:325-328.
24. Love Ch, Tomas M, Marwin S, et al. *Role of Nuclear Medicine in Diagnosis of the Infected Joint Replacement*. RadioGraphics. 2001;21: 1229-1238.
25. Mandell G, Benett J, Dolin R. *Principles and Practice of Infectious Disease*. 5th ed. Ed. Churchill Livingstone. 2000. USA.

26. Marrero L, Álvarez R, Hernández A, et al. *Valor de la gammagrafía con ^{99m}Tc -ciprofloxacina cubana en la detección de las prótesis de cadera infectadas.* Rev Cubana Ortop Traumatol 2006; 20(1)
27. Mather S. *New Horizons in Radiopharmaceuticals.* IAEA Bulletin 45/1,2003,62-65.
28. OPS. *Cabinas de seguridad biológica: uso, desinfección y mantenimiento.* Washinton, D.C. 2002.
29. Palestro C. *Joint Replacement and Infection.* J Nucl Med 2003; 44:927-929.
30. Roca M, Martín-Comin J, Becker W, et al. *A consensus protocol for White blood cells labeling with technetium-99m hexamethylpropylene amino oxima.* Eur J Nucl Med 1998; 25:797-799.
31. Sarda L, Crémieux A, Lebellec Y, et al. *Inability of ^{99m}Tc -Ciprofloxacin Scintigraphy to Discriminate Between Septic and Sterile Osteoarticular Diseases.* J Nucl Med.2003;44:920-926.
32. Siaens R, Renen H, Boerman O, et al. *Syntesis and Comparison of ^{99m}Tc -Enrofloxacin and ^{99m}Tc -Ciprofloxacin.* J Nucl Med 2004; 45:2088-2094.
33. Sierra J, Rodríguez-Puig D, Soriano A, et al. *Accumulation of ^{99m}Tc -Ciprofloxacin in Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2008; 52:2691-2692.
34. Velázquez J. *Principales protagonistas en la respuesta inflamatoria a la infección.* Rev Cubana Pediatr 1998; 70(2): 84-91.
35. Zolle Ilse. *Technetium-99m Pharmaceuticals: Preparation and Quality Control in Nuclear Medicine.* Ed. Springer. 2007. Austria.