

República de Cuba

*Centro de Investigaciones Clínicas (CIC). Centro Nacional de
Investigaciones Científicas (CNIC)*

*Marcaje de ciprofloxacina con ^{99m}Tc para el
diagnostico de infecciones. Comparación y
evaluación preclínica de dos métodos.*

*Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias
Farmacéuticas*

Autor: MSc. Abel Hernández Cairo

Ciudad de la Habana

2009

República de Cuba

***Centro de Investigaciones Clínicas (CIC). Centro Nacional de
Investigaciones Científicas (CNIC).***

***Marcaje de ciprofloxacina con ^{99m}Tc para el diagnóstico
de infecciones. Comparación y evaluación preclínica de
dos métodos.***

Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Farmacéuticas

Autor: MSc. Abel Hernández Cairo

Tutores: DrC. Francisco Zayas Crespo

DrC. Eduardo Fernández Sánchez

Ciudad de la Habana

2009

Agradezco la ayuda incondicional de muchas personas que influyeron positivamente en el desarrollo y culminación de la presente investigación y especialmente

- *A mis tutores, Dr. Francisco Zayas Crespo y Dr. Eduardo Fernández Sánchez; por su perseverancia y certera trasmisión de conocimientos.*
- *A mi familia por alentarme y apoyarme siempre.*
- *A mis compañeros de trabajo por su apoyo.*

Dedico este trabajo a mi queridos padre, hijo y esposa.

SINTESIS

Con el propósito evaluar dos metodologías para el radiomarcaje de ciprofloxacina con ^{99m}Tc y optimizar un radiofármaco seguro y eficiente para el diagnóstico gammagráfico de inflamaciones sépticas, se evaluaron dos variantes, en las cuales se incluyen aspectos novedosos en el proceso de síntesis de los radiocomplejos, una se basó en el radiomarcaje por vía directa, a cuyo producto final se le llamó F1 y la otra por vía indirecta y a su producto óptimo se le llamó F2. Ambas rindieron purzas radiofarmacéuticas superiores a 90%. F2 fue más estable en solución inyectable, en suero humano y en soluciones de cisteína. Ambos radiofármaco mostraron una biodistribución satisfactoria, con una acumulación en órganos abdominales, significativamente menor a la de los productos predecesores. La biocinética estuvo caracterizada por una rápida depuración sanguínea, lo que garantiza una satisfactoria relación lesión/fondo en las imágenes. Las dosis de radiación absorbidas estuvieron dentro de los límites permisibles. La evaluación de la actividad biológica *in vitro*, mostró que F1 se unió eficientemente a bacterias vivas, mientras que F2 no; lo que se pudo corroborar en los modelos de infección *in vivo*. El estudio de toxicología aguda y la tolerancia local endovenosa se realizó solo a F1 como el agente más promisorio para los objetivos perseguidos, la evaluación se realizó en ratones y se reportó que no se apreciaron signos clínicos de toxicidad. Se optimizaron dos radiofármacos que reconocen eficientemente inflamaciones musculares en modelos con ratas Wistar, pero solo F1 es útil para diferenciar un proceso inflamatorio infectado de uno estéril.

Tabla de contenidos

Capítulo I. INTRODUCCION	1
1.2 Objetivo General	4
1.2.1 Objetivos específicos	5
Capítulo II. REVISION BIBLIOGRAFICA	6
2.1 Fisiopatología de los procesos infecciosos	6
2.1.1 Inflamación aguda	6
2.1.2 Inflamaciones crónicas	6
2.2 Influencia de la medicina nuclear en el diagnostico de los procesos inflamatorios	7
2.3 Características que debe presentar el radiofármaco ideal para imágenes de inflamación e infección	8
2.4 Detección de inflamación con células blancas de la sangre radiomarcadas	9
2.5 Radiotrazadores no específicos para la detección inflamación e infecciones	13
2.5.1 ⁶⁷ Ga- citrato	13
2.5.2 ^{99m} Tc-Metiléndifosfonato (MDP)	14
2.5.3 Nanocoloides	15
2.5.4 Inmunoglobulina G humana inespecífica (IgG)	16
2.5.5 Sistema Avidina-biotina	18
2.5.6 Liposomas	20
2.5.7 Glutati6n	21
2.6 Radiotrazadores específicos para la detección de inflamaciones e infecciones	21
2.6.1 Anticuerpos monoclonales	21
2.6.2 Fragmentos de anticuerpos monoclonales y péptidos derivados de anticuerpos	26
2.6.3 Péptido antagonista tuftsin	27

2.6.4 Citoquinas	28
2.6.5 Péptidos quimiotáticos	31
2.6.6 J001X	32
2.6.7 Análogos de la somatostatina	32
2.6.8 Sustancia P	33
2.6.9 Defensinas	34
2.6.10 [¹⁸ F] fluor-2-desoxi-D-glucosa (FDG)	35
2.6.11 Antibióticos radiomarcados	36
2.6.11.1 Tetraciclinas	36
2.6.11.2 Quinolonas	37
2.6.11.3 Microesferas de izoniacida marcadas con ^{99m} Tc (^{99m} Tc-INH)	42
2.6.11.4 Ethambutol	42
2.6.11.5 Fluconazol	42
2.7 Estado actual del conocimiento del problema de investigación	43
Capítulo III. MATERIALES Y METODOS	45
3.1 Radiomarcajes	45
3.1.1 Formación del radiocomplejo por vía directa. Formulación 1 (F1)	45
3.1.2 Formación del radiocomplejo por vía indirecta. Formulación 2 (F2)	45
3.2 Controles de calidad del radio marcaje	47
3.2.1 Cromatografía en TLC sílica gel para cálculo de pureza de ^{99m} Tc-ciprofloxacina	47
3.2.2 Cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) fase reversa	48
3.3 Evaluación de la estabilidad de la marca	49
3.3.1 En solución inyectable	49
3.3.2 Reto contra cisteína	49

3.3.3 En suero humano	50
3.4 Comportamiento de la eficiencia de marcaje de F1 y F2 almacenados en congelación durante un período de tiempo	50
3.5 Control de esterilidad	50
3.6 Control de pirógenos	50
3.7 Farmacocinética, biodistribución y estimación de la dosimetría interna en humanos	51
3.7.1 Farmacocinética y biodistribución en ratas Wistar sanas	51
3.7.2 Estimación de la biodistribución y la dosimetría interna en humano	53
3.8 Ensayos de actividad biológica	55
3.8.1 <u>In vitro</u>	55
3.8.2 <u>In vivo</u>	55
3.9 Toxicología aguda y tolerancia local endovenosa	57
3.10 Análisis de los resultados	59
Capítulo IV. RESULTADOS	62
4.1 Radiomarcajes	62
4.1.1 Radiomarcaje por vía directa, formulación 1 (F1)	62
4.1.2 Radiomarcaje por vía indirecta, formulación 2 (F2)	65
4.2 Evaluación de la estabilidad del radiomarcaje	67
4.2.1 En solución inyectable	67
4.2.2 Reto contra cisteína	67
4.2.3 En suero humano	68
4.3 Comportamiento de la eficiencia de marcaje de F1 y F2 almacenados en congelación durante un período de tiempo	69
4.4 Control microbiológico	70

4.5 Control de pirógenos	70
4.6 Biodistribución y farmacocinética en ratas sanas	71
4.6.1 Biodistribución	71
4.6.2 Farmacocinética	73
4.6.3 Estimación de la biodistribución en humanos	76
4.6.4 Estimación de la dosimetría interna en humanos	77
4.7 Ensayos de actividad biológica	79
4.7.1 <u>In vitro</u>	79
4.7.2 <u>In vivo</u> .	79
4.8 Toxicología aguda y tolerancia local endovenosa	82
Capítulo V. DISCUSION	91
Capítulo VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	103
6.1 Conclusiones	103
6.2 Recomendaciones	104
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	105
PRODUCCIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA DEL AUTOR, RELACIONADA CON EL TEMA	128
ANEXOS	131

GLOSARIO DE TERMINOS

AcMo: Anticuerpo Monoclonal.

ADN: Acido dexoxiribonucleico.

AFS: Acido Formamidin Sulfónico.

ARCAL: Acuerdo Regional de Cooperación para América Latina

C18: Columnas para cromatografía líquida de alta resolución por fase reversa.

CENTIS: Centro de Isótopos.

CENPALAB: Centro de Producción de Animales de Laboratorio.

CIC: Centro de Investigaciones Clínicas

DMF: Dimetil Formamina.

EDTA: Etilen Diamino Tetraacético.

FDG: Fluor Desoxi Glucosa. .

F1: Formulación 1(Marcaje por vía directa).

F2: Formulación 2 (Marcaje por vía indirecta).

Fab: Fragmento de anticuerpo.

⁶⁷Ga: Galio 67. Radioisótopo.

HATU: o-(7-azabenzotriazol)1-1, 1, 3, 4 tetrametiluronio hexafluorofosfato.

HMPAO: Hexa Metil p-Amino Oxima.

HYNIC: Hidracino Nicotinamida.

IgG: Inmunoglobulina G. Anticuerpo.

IMEFA: Industria Medico Farmaceútica.

¹¹¹In: Indio 111. Radioisótopo.

kDa: Milésima parte de 1 Dalton. Unidad de peso de moléculas biológicas.

MDP: Metilen Difosfonato.

Megabequerels: Un milon de becquerels (unidad de medida de sustancia radiactiva)

MIBI: Metoxi Isobutil Isonitrilo.

Milicurie: La milesima parte de un curie (unidad de medida de sustancia radiactiva)

OIEA: Organismo Internacional de la Energía Atómica.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PBS: Buffer Fosfato de Sódio.

PM: Peso Molecular.

RMN: Resonancia Magnética Nuclear. Técnica imagenológica.

PNT: Procedimiento Normalizativo de Trabajo.

PRN: Proyecto Ramal Nuclear.

Redox: Reducción-Oxidación. Reacción química.

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Humana.

SnCl₂: Cloruro de estaño. Molécula en forma de sal utilizada como reductor.

SnF₂: Fluoruro de estaño II. Molécula en forma de sal utilizada como reductor.

TA: Temperatura ambiente.

TAC: Tomografía Axial Computarizada. Técnica imagenológica.

TEC-DOC: Documento de normas técnicas dictado por el OIEA.

T1/2 B: Tiempo al cual es eliminado del cuerpo el 50% de la dosis total de un fármaco.

T1/2 F: Periodo de semi-desintegración de un radioisótopo.

^{99m}Tc: Tecnecio 99 metaestable. Radioisótopo.

UBI: Ubiquidina. Peptido antimicrobiano.

UFC: Unidades formadoras de colonias.

Wikipedia: Enciclopedia libre (Internet).

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana.

GLOSARIO DE ANGLICISMOS

ATCC: American Type Culture Collection (Metodología para cultivo de células).

CRP: Coordinated Research Program (Programa de Investigación Coordinado).

FMLP: n-Formyl Metylonil Leucocyl Phenylalanina.

HAMA: Human Antimouse Antigen (Antígeno humano antiratón).

HNE2: Neutrophil Enaste Inhibitor 2.

HPLC: High Precision Liquid Cromatography (cromatografía líquida de alta resolución).

MIRD: Medical Internal Radiation Dose (Dosis medica de radiación interna)

Nuclear Medicine: Medicina Nuclear.

Origing: Programa computarizado para tratamiento de gráficos.

Pin hole: Tipo de colimador utilizado en cámaras gamma para estudiar animales y regiones pequeñas.

Pixel: Unidad de área en que se divide la matriz de la imagen gammagráfica.

Radioimmunosintigraphy: Técnica gammagráfica, basada en el uso de anticuerpos radiomarcados.

Sep-Pak: Tipo de columna cromatográfica.

Sopha Medical: Marca de una cámara gamma.

SPECT: Single Photon Emission Computer Tomography.

Student Newman Keuls: Prueba estadística para la comparación de medias.

Test de student: Prueba estadística para la comparación de medias.

Technology: Tecnología

Techniques: Técnicas

WBC: White Blood Cell.

Capítulo I. INTRODUCCION

Las enfermedades infecciosas provocan altas tasas de morbilidad y mortalidad en muchos países, pero especialmente en el tercer mundo. Pandemias como el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) siguen propagándose y diezmando poblaciones completas cada año. Se ha reportado que en el año 2007 vivían en el mundo 33,2 millones de personas infectadas con el VIH (World Health Statistic, 2008). Se advierte igualmente que las enfermedades infecciosas que más inciden en el número de fallecidos a nivel mundial se mantendrán como primeras causas de muerte hasta el 2030 y aunque habrá una disminución de tal incidencia, las pre-estimaciones son alarmantes. En el período comprendido entre el año 2004 y el 2030 el número de muertes en todo el mundo por infecciones del sistema respiratorio se estima que fluctúen entre un 7 y un 3,8 %; por VIH entre un 3,5 y 1,8 %; por tuberculosis entre 2,5 y 1,0 %; las neonatales y otras entre 1,9 y 10% (Mathers CD, 2006; World Mortality Report 2007, World Health Statistic, 2008). Estos indicadores ratifican que las mencionadas patologías, se van a mantener por varias décadas entre las primeras causas de fallecimiento y limitaciones físicas en la población mundial. En Cuba, la observación de la incidencia de estas dolencias es un tema priorizado por el MINSAP puesto que un número considerable de pacientes incapacitados físicos, lo son, a causa de enfermedades infecciosas, especialmente ortopédicas. Además entre 1995 y el 2007, el 1% del total de fallecimientos ocurrieron a causa de las referidas enfermedades (Anuario Estadístico MINSAP, 2007).

Es conocido que para la localización anatómica de lesiones infectadas se emplean varias técnicas imagenológicas, las más utilizadas son: la Tomografía Axial Computarizada (TAC) y la Resonancia Magnética Nuclear (RMN), ambas poseen gran resolución espacial; sin embargo, no son capaces de localizar los abscesos hasta que no se produce daño anatómico en los tejidos. La gammagrafía, en este sentido, presenta grandes ventajas, ya que permite el diagnóstico temprano de la lesión, mucho antes de que aparezca un daño tisular; además, posibilita la realización de imágenes de cuerpo entero cuando se precisa el estudio de un cuadro clínico con fiebre de origen desconocido o la sospecha de lesiones infecciosas profundas (Britton KE, 1997).

En algunos casos, el diagnóstico de un proceso infeccioso es obvio basado en la historia clínica y el examen físico del paciente, en otros es más difícil debido a que son asintomáticos o presentan síntomas inespecíficos. El diagnóstico temprano de un proceso inflamatorio infectado facilita la atención terapéutica a tiempo y evita, por tanto, la expansión de la enfermedad así como las complicaciones posteriores. Es en este sentido donde radica la principal utilidad de la medicina nuclear para la medicina interna. Antes de comenzar el tratamiento el médico debe conocer si el proceso inflamatorio es infeccioso y donde está localizado para tratarlo y seguirlo evolutivamente con éxito (Chianelli M, 1997).

Internacionalmente se han diseñado varios radiocompuestos para el diagnóstico gammagráfico de infecciones como son las células blancas de la sangre (leucocitos, linfocitos, plaquetas); varios tipos de moléculas endógenas como anticuerpos, glutatión, liposomas, péptidos quimiotácticos y citoquinas; también han sido introducidos algunos anticuerpos monoclonales y sus fragmentos producidos por ingeniería genética; varios radiofármacos como son los antibióticos, péptidos análogos de la somatostatina sintéticos, todos radiomarcados con ^{99m}Tc o con ^{111}In entre otros que han sido explotados en los últimos años; además del citrato de ^{67}Ga y algunos antibióticos radiomarcados con Fluor 18 (^{18}F), elemento emisor de positrones (Chianelli, M 1997). No obstante, aún no existe uno de elección, debido a que algunos presentan baja eficiencia diagnóstica, en lo referente a la diferenciación entre una inflamación infectada de una estéril y otros presentan una biodistribución que limita la exploración de regiones anatómicas en las que su concentración fisiológica es significativamente alta (Chianelli M et al, 1997).

Lamentablemente, en la actualidad los servicios de medicina nuclear nacionales no pueden realizar este tipo de diagnóstico debido, fundamentalmente, a que no disponen de un radiofármaco eficiente para ello. Dicha carencia se debe a los elevados precios de los productos que brindan las firmas comerciales, a la inaccesibilidad al mercado mundial y a la insuficiente infraestructura de los laboratorios de radiofarmacia para el radiomarcaje de hemoderivados. En la mayoría de los casos se diagnostica una infección cuando ya existe un deterioro anatómico importante, lo que irremediablemente complica la evolución del cuadro clínico. Una alternativa para ayudar a solucionar esta problemática radica en la

creación de un radiofármaco cubano, ya que se cuenta con la infraestructura humana y tecnológica necesaria que favorece la incorporación de una técnica gammagráfica para el diagnóstico de infecciones, que por demás resulte económica y eficiente para el diagnóstico específico de esta patología.

En los últimos años, la radiofarmacia ha ido incursionando persistentemente en la búsqueda de un radiofármaco ideal para el diagnóstico de infecciones, ideando, evaluando y desarrollando nuevos productos, lo que ha constituido uno de los retos mayores para la especialidad y es un problema aún sin resolver. La selección del radiofármaco a utilizar depende de varios factores: costo, disponibilidad, experiencia, situación clínica y eficacia establecida (Pickhardt PJ, 1996).

La ^{99m}Tc -ciprofloxacina es uno de los radiofármacos promisorios para el diagnóstico específico de infecciones, aunque no está exenta de desventajas (Britton KE, 1997). El fármaco ciprofloxacina está disponible en nuestro sistema nacional de salud y se utiliza como herramienta del manejo terapéutico, por ello se emprendió una investigación dirigida a optimizar una formulación modificada para el radiomarcaje de dicho antibiótico con ^{99m}Tc siguiendo dos vías diferentes. Dicha investigación ha sido diseñada con el objetivo de resolver la carencia del radiofármaco e introducir una alternativa de producción hospitalaria en aquellos centros que posean condiciones mínimas para ello.

Dado que las enfermedades infecciosas presentan una alta incidencia en Cuba y que nuestro país ha alcanzado un desarrollo sobresaliente en la Medicina Nuclear, ésta se ha convertido en una alternativa tecnológica muy útil para varias especialidades médicas, constituyendo un ***problema científico*** la carencia de un radiofármaco eficiente para estudios de procesos infecciosos, lo cual requiere de la introducción de un producto que posea la capacidad de acumularse en los abscesos de modo que permita la visualización gammagráfica de los mismos, acorde a las tendencias mundiales en el diagnóstico clínico avanzado.

Como vía para solucionar el problema científico se formula la siguiente hipótesis:

La ciprofloxacina radiomarcada con ^{99m}Tc , proporcionará un radiofármaco seguro y con una biodistribución en focos infecciosos, que hará posible la visualización de los mismos con una mejor precisión diagnóstica, presentando ventajas con relación a otros productos para el diagnóstico gammagráfico de las mencionadas patologías.

*El análisis de la **aplicación y trascendencia** de los estudios que conforman esta tesis revela que estos se enmarcan en una línea de investigación priorizada en nuestro país, teniendo en cuenta que:*

- La detección de una lesión infecciosa a tiempo evita la complicación del paciente.
- Las enfermedades infecciosas están entre las primeras causas de morbilidad y mortalidad en nuestro país.
- El desarrollo de los estudios que muestren la eficacia y seguridad de un radiofármaco nacional que contribuya al diagnóstico de enfermedades infecciosas en las primeras etapas de aparición de la misma, revela una utilidad social y además es una vía de aportar al desarrollo económico del país.

***La novedad científica del tema** se sustenta no solo por el hecho de que la ^{99m}Tc -ciprofloxacina es el primer antibiótico radiomarcado para diagnóstico de procesos infecciosos desarrollado en el país; sino también porque se introdujeron aspectos novedosos en la técnica de radiomarcaje, como son, el uso del SnF_2 como reductor del radiometal y del hidracino nicotínico (HYNIC) como agente quelatante bifuncional.*

Para dar respuesta a la hipótesis planteada se estructuran los siguientes objetivos:

1.2 Objetivo General

Desarrollar una formulación de ^{99m}Tc -Ciprofloxacina para obtener un radiofármaco seguro y que permita la adquisición de imágenes gammagráficas que muestren alta precisión para el diagnóstico de procesos infecciosos.

1.2.1 Objetivos específicos

- 1- Evaluar dos metodologías para el radiomarcaje de la ciprofloxacina con ^{99m}Tc , siguiendo las vías directa e indirecta. Evaluar la esterilidad y la apirogenicidad de los productos.
- 2- Estimar la estabilidad del radiomarcaje en solución inyectable, en suero humano y en soluciones de cisteína, así como la pureza radioquímica que rinden los productos en el tiempo, una vez almacenados en congelación.
- 3- Evaluar la farmacocinética y la biodistribución en ratas Wistar sanas.
- 4- Valorar la actividad biológica *in vitro* mediante la estimación del porcentaje de unión a bacterias Staphilococcus aureus (SA) vivas e *in vivo*, en modelos de infección en ratas Wistar con SA y Escherichia coli (EC).
- 5- Estimar la toxicología aguda y la tolerancia local endovenosa en ratones albinos.

2.1 Fisiopatología de los procesos infecciosos

2.1.1 Inflamación aguda

Cuando ocurre un daño tisular o un microorganismo invade el cuerpo, varios mecanismos de defensa son activados para eliminar el estímulo nocivo. En respuesta a los antígenos y a los productos de degradación de los tejidos, son activados poderosos mecanismos tales como complementos y producción de anticuerpos, los que contribuyen a la eliminación de los invasores. Esta amplificación de la respuesta local propicia un reclutamiento de células de la sangre, granulocitos, linfocitos y componentes del plasma necesarios para la solución del problema. Colateralmente existe vasodilatación para incrementar el suplemento de sangre y al mismo tiempo se produce permeabilidad endotelial para facilitar la extravasación de proteínas y células. Además esto estimula la expresión de moléculas de adhesión sobre células endoteliales y de moléculas de adhesión complementaria sobre leucocitos. Primeramente, las células se adhieren al endotelio y después, por un mecanismo llamado diapédesis, ellas penetran al tejido inflamado siguiendo un gradiente de factores de atracción química; la amplificación produce una respuesta inmune diferenciada. El proceso comienza en pocos minutos después de producida una agresión al organismo y se resuelve en horas o días (Roitt I, 1994). Este proceso produce en el paciente los síntomas clásicos de una inflamación aguda (rubor, edema, calor y dolor) por lo que puede ser fácilmente diagnosticado por un examen clínico. Ejemplos de este tipo de reacción son las infecciones agudas y los traumas (Chianelli M, 1997).

2.1.2 Inflamaciones crónicas

Si el agente inflamatorio persiste, el carácter de la lesión inflamatoria cambia a inflamación crónica. Las células polimorfonucleares migran fuera de la lesión y desaparecen la vasodilatación, la permeabilidad vascular, la activación endotelial y los síntomas. La infiltración se vuelve predominantemente mononuclear, donde están presentes linfocitos y células de la serie monocito macrófagos. La futura progresión del proceso es fundamentalmente vía *in situ* con la consecuente proliferación de células infiltrantes. La solución del problema puede ser en semanas o años (Roitt I, 1994).

Una infiltración crónica de células mononucleares es también observada en otras reacciones inmunes mediadas por células tales como enfermedades autoinmunes, inflamaciones crónicas de los intestinos, rechazo de trasplantes y tumores. En estas condiciones patológicas, las células mononucleares son el tipo de células infiltrantes predominantes desde el principio. Otros ejemplos son las infecciones crónicas tales como la tuberculosis, los granulomas, la sarcoidosis y las dermatitis por contacto (Chianelli M, 1997).

2.2 Influencia de la medicina nuclear en el diagnóstico de los procesos inflamatorios

La medicina nuclear proporciona varias técnicas para el diagnóstico de inflamaciones basadas en la inyección de compuestos radiomarcados que se deben acumular en el foco inflamatorio. Los leucocitos autólogos radiomarcados migran específicamente al interior del sitio de inflamación por diapédesis; contrariamente muchos radiofármacos, tales como los nanocoloides y las inmunoglobulinas humanas inespecíficas (IgG) se acumulan en dichas lesiones siguiendo un mecanismo de extravasación no específico (Chianelli M, 1997).

El diagnóstico de inflamación aguda puede ser resuelto exitosamente con muchos de los radiofármacos disponibles en la actualidad. Si se precisa de un diagnóstico diferencial entre inflamación celular y no celular es necesario radiomarcarse células blancas de la sangre para poder hacer una distinción entre los dos procesos. Es un hecho que el diagnóstico diferencial entre una inflamación estéril y una infectada es muy difícil conseguirlo con los radiofármacos disponibles en la actualidad (Bleeker-Roves, 2004).

Debido a que en la inflamación crónica disminuye la hemodinámica en las zonas lesionadas, muchos radiofármacos no pueden acumularse en dichos sitios, lo que les confiere inutilidad diagnóstica; tal es el caso de los leucocitos marcados (granulocitos), los que no logran migrar al interior de los sitios inflamados. Con el objetivo de lograr un radiofármaco más efectivo se comenzaron a gestar proyectos encaminados a resolver esta demanda clínica; uno de los radiofármacos concebidos fue el citrato de galio (^{67}Ga) del cual se afirmaba que resolvería el problema del diagnóstico de infecciones crónicas (Bleeker-Roves, 2004) y el indio 111 (^{111}In -octreotide) el cual mostró resultados

alentadores en el diagnóstico de enfermedades granulomatosas y en la enfermedad de Graves (Krenning E, 1995).

2.3 Características que debe presentar el radiofármaco ideal para imágenes de inflamación e infección

Un radiofármaco para que sea eficiente en la detección de procesos infecciosos debe cumplir las siguientes características (Corstens FHM, 1999, Gemmel F, 2008; Martín Comín J, 2002; Renner HJJM, 2001 y Bleeker-Roves, 2004):

- Rápida delineación del foco y extensión de la enfermedad infecciosa.
- Acumulación fisiológica no significativa en la sangre, el hígado, el bazo, el tracto intestinal, los riñones, los huesos, la médula ósea y los músculos.
- Rápido aclaramiento sanguíneo, rápida acumulación en la zona afectada y buena relación lesión/fondo.
- Alta especificidad (discriminación entre infección e inflamación estéril)
- Ausencia de toxicidad y de respuesta inmune.
- Baja dosis de radiación.
- Amplia disponibilidad del radionúclido.
- Costos relativamente bajos.
- Preparación sencilla y reproducible.

No existe un radiofármaco que pueda ser útil para todas las indicaciones clínicas. La elección del mismo está basada sobre la experiencia preclínica y la situación clínica teniendo en cuenta el mecanismo fisiopatológico de cada enfermedad. Es preciso considerar si la biodistribución permite la identificación del proceso en el sitio de infección/inflamación. La dosis de radiación absorbida es también muy importante para establecer una ponderación entre riesgo y beneficio de cada producto disponible.

2.4 Detección de inflamación con células blancas de la sangre radiomarcadas.

Los focos inflamatorios pueden ser detectados usando células blancas de la sangre radiomarcadas. Administradas por vía intravenosa ellas migran específicamente al interior del tejido inflamado adhiriéndose al endotelio activado siguiendo un gradiente de factores quimiotácticos liberados en el proceso fisiopatológico (Zakhireh B, 1979). Esta técnica se realiza haciendo una extracción de sangre del mismo paciente, se separan los leucocitos los que se marcan *in vitro* en condiciones estériles y posteriormente se reinyectan al enfermo [Thakur M, 1977 ⁽¹⁾].

Se han diseñado procedimientos de radiomarcaje de los leucocitos tanto con indio 111 oxima (¹¹¹In-oxima) y con ¹¹¹In-tropolonato; como con tecnecio 99 metaestable-hexametil propilen amino oxima (^{99m}Tc-HMPAO). Se ha demostrado que dichas células se acumulan en los sitios de inflamación por quimiotaxis y son usados como transporte del radioisótopo hasta el foco infeccioso (Larinka M. 2001 ⁽¹⁾). Además se ha observado que la captación en un área es dependiente del funcionamiento de la quimiotaxis, del número y del tipo de células marcadas y del principal componente celular de la respuesta inflamatoria (Larinka M. 2003, Love C, 2004; Palestro CJ, 2000; Wolf G, 2001; Gratz S, 2002; El Esper, 2004; Weon YC, 2000; Ryan PJ, 2002).

Desde 1977 se demostró que el ¹¹¹In en combinación con oxima o tropolonato, una vez difundido al interior de las células se disocia del complejo lipofílico y se une irreversiblemente a componentes intracelulares y nucleares, por lo que no es liberado de la célula con el tiempo (Thakur M, 1977 ⁽²⁾). Este radionúclido decae por emisión de dos rayos gamma de 172 y 247 kiloelectronvoltios (keV) con un período de semidesintegración ($T_{1/2F}$) de 67 horas. Dicha energía no es óptima para realizar imágenes en la cámara gamma, pero este largo $T_{1/2F}$ y su estabilidad *in vivo* permiten la realización de imágenes tardías. Un aspecto negativo referente al uso del ¹¹¹In para el marcaje de células blancas de la sangre radica en que el radioisótopo deposita una alta dosis de radiación aportada principalmente de los electrones Auger (Silvester D, 1983). Durante el marcaje de los leucocitos, típicamente con 300 microcuries (μ Ci), los granulocitos no son dañados pero los linfocitos mueren con tal actividad (Thakur M, 1984).

El radiomarcaje de dichas células con ^{99m}Tc se comenzó a gestar una vez introducida la producción y comercialización del primer generador de ^{99m}Tc por el National Laboratory

de Brookhaven de los Estados Unidos (Lentle B, 2003), este se considera el radioisótopo de elección para la mayoría de los estudios gammagráficos. Dicho radionúclido es el más atractivo en cuanto a costo, disponibilidad, baja dosimetría interna y externa. Pertenece al grupo VIIB de la tabla periódica de los elementos, es homólogo del Manganeso (Mn) y el Renio (Re). Tiene un $T_{1/2F}$ de 6.02 horas, es un emisor gamma puro y monofotónico, con una energía de 140 keV, para la cual la eficiencia de detección de la cámara gamma es óptima (Hnatowich DJ 1993 (2); 1994). Se obtiene a partir de la desintegración del molibdeno 99 (^{99}Mo); el 87,3% de los productos, de dicha desintegración corresponden al ^{99m}Tc y el 12,7% al ^{99}Tc .

Los leucocitos marcados con ^{99m}Tc (^{99m}Tc -HMPAO-leucocitos) se caracterizan por depositar una baja dosis de radiación (Costa D, 1988) y las imágenes adquiridas por la cámara gamma presentan una mayor resolución espacial (Thierens H, 1992).

Características clínicas de la mezcla de leucocitos autólogos radiomarcados:

La biodistribución y la cinética de los leucocitos radiomarcados con cualquiera de los dos radionúclidos son similares: ellos se acumulan significativamente en el hígado, el bazo, los pulmones y presentan un lento aclaramiento de la sangre. El ^{99m}Tc -HMPAO-leucocitos es menos estable, sin embargo, el complejo hidrofílico (secundario) formado 30 minutos después de formado el lipofílico (primario) es eliminado rápidamente a través de los riñones y los intestinos. La vejiga es visualizada dentro de la primera hora, la vesícula dentro de las primeras dos a tres horas y el intestino grueso después de las tres horas. Este patrón de biodistribución incide negativamente en el uso óptimo de esta técnica para la detección de lesiones en hígado, bazo y pulmones, así como en áreas cercanas. El uso de ^{111}In -leucocitos es preferido para la investigación de inflamaciones en riñones, vejiga y vesícula o si se necesita la adquisición de imágenes tardías, como en los casos de sospecha de infecciones crónicas o fiebres de origen desconocido. El ^{99m}Tc -HMPAO-leucocitos, es preferido por los investigadores para explorar todas las localizaciones restantes debido a la favorable dosimetría interna y a la mejor relación lesión/fondo que presentan las imágenes obtenidas (Peters A, 1994; Bleeker-Roves, 2004). La detección de inflamaciones intestinales con ^{99m}Tc -HMPAO-leucocitos no es un problema, el es típicamente bien localizado en menos de una hora después de la

inyección, el inconveniente está en que se requiere la realización de la imagen antes de que ocurra la excreción intestinal del ^{99m}Tc -HMPAO. Esta variante es preferida en pacientes pediátricos y cuando se necesita mejor resolución de la imagen tal como en el caso del diagnóstico de enfermedad de Crohn's en el intestino delgado.

La precisión para el diagnóstico de los leucocitos radiomarcados ha sido bien estudiada en inflamaciones intestinales (Saverymuttu S, 1985), osteomielitis, prótesis vasculares infectadas, enfermedades renales, infecciones pulmonares y fiebre de origen desconocido (Becquer W, 1995; Bleeker-Roves, 2004).

Características clínicas de la mezcla de linfocitos autólogos radiomarcados:

Los linfocitos son marcados con la misma técnica descrita para el radiomarcaje de la mezcla de leucocitos, pero se necesitan entre 50-80 mililitros de sangre y deben ser purificados de los granulocitos antes del radiomarcaje, este procedimiento introduce un riesgo potencial de contaminación de la muestra que debe ser readministrada al paciente. Varios estudios han sido reportados sobre el uso de los linfocitos radiomarcados con ^{111}In en sujetos normales y en pacientes enfermos. Los resultados obtenidos han sido buenos con algunos tipos de tumores hematológicos [Lavender J, 1977, Wagstaff J, 1981 ⁽¹⁾ y ⁽²⁾]. La técnica ha sido usada para obtener imágenes del páncreas inflamado por células mononucleares en pacientes diabéticos tipo I, pero con controversiales e inconclusos resultados (Kaldany A, 1982), un estudio mediante un modelo animal de diabético tipo I demostró que el radiocompuesto no se acumuló en el páncreas infiltrado (Gallina D, 1985).

Se ha demostrado que el marcaje de linfocitos con ^{111}In produce aberraciones cromosomales, así como incapacidad de proliferación de la célula después de una estimulación policlonal. Aunque los linfocitos son células con larga vida, ello no excluye que pueda ocurrir un daño celular importante a causa de la radiactividad, por lo que no se debe usar más de 20 μCi por cada 10^8 células, que es la máxima cantidad de linfocitos que pueden ser obtenidos de 100 mililitros (ml) de sangre. Dada la insuficiente actividad que presentaría la muestra de células radiomarcadas esta técnica es insuficiente para estudios imagenológicos en humanos dado que se necesitaría mucho para adquirir una

imagen con adecuada estadística de cuentas (Chianelli M, 1997). No obstante, han sido utilizados para estudios en animales o en pacientes con melanomas, con cáncer de colon y recto, donde han sido útiles para detectar metástasis. Estos resultados demostraron que la especificidad diagnóstica de estos radiofármacos para procesos infecciosos es baja [Wagstaff J, 1981 ⁽²⁾, Fisher B, 1989, Swift R, 1991; Griffith K, 1989].

Similares hallazgos han sido reportados en estudios de rechazo de trasplantes. Los ¹¹¹In-linfocitos han sido probados en la detección de rechazo de trasplantes ortopédicos y cardiacos en perros y de corazón-pulmón en ratas, donde se concluyó que cuando no son evidentes los signos clínicos de rechazo la infiltración linfocitaria es moderada (Mazzoni G, 1992).

Plaquetas radiomarcadas:

Las plaquetas marcadas con ¹¹¹In (¹¹¹In-plaquetas) han sido usadas en trasplantes de riñones y páncreas (Catafau A, 1989). Se ha demostrado que las referidas células se acumulan selectivamente en los rechazos agudos de trasplantes renales. Esto permitió distinguir entre la nefrotoxicidad causada por la ciclosporina y una necrosis tubular aguda. Debido a la complejidad del método de purificación y de marcaje, así como de su aplicación clínica, actualmente el radiocompuesto es usado en un limitado número de aplicaciones, incluidos pacientes sometidos a tratamientos con hemodiálisis con insuficiencia renal irreversible, para realizar diagnóstico diferencial entre fiebre de origen inmunológico y una infección (Lomeña F, 1994).

Ventajas y limitaciones del marcaje directo de las células blancas de la sangre:

El uso de leucocitos radiomarcados ha sido estudiados extensamente [Thakur ML, 1977 ^{(1) y (2)}] y por los resultados que se han obtenido ésta ha sido clasificada como la prueba de oro para la detección de inflamaciones. El radiomarcaje directo de las células requiere de mucho tiempo de procesamiento, condiciones especiales en el laboratorio y experiencia técnica. Es preciso destacar que tanto el paciente como el operador están expuestos a potenciales contaminaciones biológicas.

Para la detección de inflamaciones agudas los leucocitos son altamente sensibles y específicos (Becker W, 1995). Pero cuando se trata de procesos crónicos los resultados no

son satisfactorios. La disminución del suministro de sangre al área inflamada y de la permeabilidad vascular, así como el predominio de la infiltración de células mononucleares en esta etapa del proceso inflamatorio sugieren que los linfocitos radiomarcados deben ser los de elección, aunque debido a la alta radiosensibilidad de los mismos esta variante ya no es utilizada rutinariamente.

2.5 Radiotrazadores no específicos para la detección de inflamación e infecciones

2.5.1 ^{67}Ga - citrato

El ^{67}Ga es radioisótopo producido en ciclotrón (Larinka M. 2003) que constituye el primer radionucleido empleado para la detección de sitios de inflamación e infección (Martín-Comín J. 2002; Lavender JP, 1971). Tiene $T_{1/2F}$ de 78 horas un decaimiento por emisión de rayos gamma con energías que varían en un rango entre 93-880 keV, las energías dominantes son de 93, 184, 296 y 388 keV. Una parte es excretada a través de los riñones en las primeras 24 horas y el resto por el colon. Pasadas 48 horas, alrededor del 75% de la dosis inyectada es retenida por el cuerpo donde se acumula en el hígado, hueso, médula ósea y tejidos blandos.

El ^{67}Ga -citrato se comenzó a utilizar en la práctica clínica desde 1969 para el diagnóstico de la enfermedad de Hodgkin's, además ha sido usado para diagnosticar otras patologías incluyendo inflamaciones, infecciones y algunas patologías del esqueleto (Edwards C, 1969; Halpern S, 1980; Wassie E, 1994; Bleeker-Roves, 2004). A pesar de los años de experiencia en el uso de este radiofármaco el mecanismo preciso por el que se acumula en órganos normales y tejidos patológicos no está totalmente dilucidado. Sin embargo, se ha aceptado que como es un análogo del hierro, se une a la transferrina circulante en forma iónica y de esta forma logra tener acceso a las células fijándose al receptor de dicha proteína (Sohn M, 1993). En inflamaciones agudas, penetra por extravasación del epitelio vascular y se une a la lactoferrina excretada en el lugar por los leucocitos o a los sideróforos producidos por los microorganismos (Becker W, 1995). Sin embargo, han sido postulados otros mecanismos de acumulación por células metabólicamente activas, tales como la activa acumulación del citrato como sustrato del ciclo de Krebs (Becker W, 1995).

Este radiofármaco se caracteriza por aportar una buena sensibilidad diagnóstica, pero baja especificidad dado que se acumula igualmente tanto en tumores, en inflamaciones agudas, crónicas, estériles e infectadas (Borman T, 1986). Extraordinariamente este es uno de los pocos radiofármacos que muestran buena sensibilidad para la detección de inflamaciones crónicas (Kao C, 1993; Sulavik S, 1993). Es conocido que el receptor de la transferrina es un marcador de activación tardía expresado en las células T durante el proceso inflamatorio (Roitt I, 1994) y esto es posible que explique su acumulación en estas condiciones patológicas (Bleeker-Roves, 2004).

Debido a que el ^{67}Ga posee largos $T_{1/2F}$ y tiempo de vida media biológica ($T_{1/2B}$), provoca altos niveles de dosis de radiación absorbida. Además no está disponible fácilmente y no reúne las características nucleares óptimas para lograr imágenes de calidad en la cámara gamma. Su uso es limitado a estudios de osteomielitis crónica, infecciones pulmonares y fiebre de origen desconocido, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. En dichos casos las exploraciones con ^{67}Ga -citrato es la técnica de elección, pues debido a su elevada sensibilidad puede detectar tumores y enfermedades del tejido conectivo. Por su baja especificidad, este radiofármaco es utilizado en combinación con otros (Wassie E, 1994, Bucosme J, 1991; Bleeker-Roves, 2004).

2.5.2 ^{99m}Tc -Metiléndifosfonato (MDP)

Son utilizados únicamente para estudios de infecciones óseas, las gammagrafías son positivas en las horas o días subsiguientes al comienzo de la infección. Inicialmente la lesión infectada se observa como una zona fotón-deficiente (fría) que en pocos días mostrará aumento de la captación del radiofármaco (caliente) de modo característico. La acumulación de ^{99m}Tc -MDP depende de la integridad del lecho vascular ya que la mayor presión intramedular que se presenta en la osteomielitis puede disminuir el flujo sanguíneo y, consecuentemente, impedir la acumulación significativa del radiofármaco. Presenta baja especificidad diagnóstica pero alta sensibilidad (Resnick D, 1998).

2.5.3 Nanocoloides

Los nanocoloides son unas partículas pequeñas de 30 nanómetros (nm) de diámetro, las cuales son rápidamente depurados de la circulación. Ellos son degradados por las células lisosomales del sistema retículo endotelial (SRE) y excretados a través de los intestinos y

los riñones (Larinka M, 2003; Martín-Comín JM, 2002). Se infiltran al interior del área inflamada, debido al incremento de la permeabilidad vascular regional y se acumulan en el área debido a que son fagocitados por los macrófagos (Schrijver MD, 1987, Larinka M. 2003; Martín Comín JM, 2002). La acumulación de ^{99m}Tc -nanocoloides en las inflamaciones es relativamente baja en comparación con la de otros radiofármacos (McAfee J, 1991), pero debido a su rápido aclaramiento sanguíneo, es posible obtener una buena relación lesión/fondo de forma rápida; la exploración gammagráfica es completada en una hora.

Estos compuestos son usados para el estudio de la osteomielitis, artritis reumatoide y rechazo de trasplantes renales (Struele K, 1988; Liberatore M, 1992; Frick M, 1976; Massenguil S, 1992). En el estudio de inflamaciones músculo-esqueléticas ellos muestran una precisión diagnóstica comparada a la de ^{111}In -leucocitos y tienen mejor sensibilidad en las fases tardías de infecciones agudas donde la permeabilidad vascular está incrementada (Struele K, 1988). En el diagnóstico de infecciones en tejidos blandos y del sistema gastrointestinal no se han realizado reportes alentadores sobre la efectividad de estos radiofármacos (Wheeler J, 1990), probablemente debido a la lenta y baja acumulación en las lesiones y por el impedimento que ocasiona la excreción fisiológica del radiofármaco a través de la vía intestinal. En estudios de pacientes con sospecha de rechazo al trasplante renal no es posible distinguir si la acumulación observada se debe a un rechazo del trasplante o por necrosis tubular aguda (Frick M, 1976). Estos radiofármacos experimentan el inconveniente de poder distinguir entre infección e inflamación estéril, ya que penetran en lesiones inflamatorias estériles por diapédesis (Styles C, 1985).

2.5.4 Inmunoglobulina G humana inespecífica (IgG)

El uso de inmunoglobulinas no específicas radiomarcadas se generalizó en una época para el diagnóstico de inflamación/infección. Su uso es seguro y simple, son de origen humano por lo que raras veces producen reacciones adversas. Están disponibles en el mercado.

La acumulación de las ^{99m}Tc -IgG en el sitio de una inflamación aguda fue un descubrimiento accidental en un experimento donde se les usaba como control para

anticuerpos monoclonales específicos (Rubin R, 1988). Desde entonces ha sido usada para un amplio espectro de enfermedades inflamatorias e infecciosas (Rubin R, 1989; Bleeker-Roves, 2004). Su mecanismo de acción no está claramente dilucidado pero se supone que en parte es inespecífico por entrada al sitio afectado debido a la permeabilidad vascular (Morrel E, 1989, Renner HJMJ, 2001; Bleeker-Roves, 2004), y en parte específico debido al enlazamiento a los receptores Fc expresados en las células infiltrantes (Fischman A, 1990; Renner HJMJ, 2001; Bleeker-Roves, 2004). También se plantea que se acumulan en los sitios de infección por unión específica a las bacterias (Calame W, 1991; Renner HJMJ, 2001; Bleeker-Roves, 2004). Sin embargo, su acumulación parece ser principalmente no específica, pues en experimentos con modelos animales de inflamación estéril se ha demostrado que donde no existen receptores Fc ellas se acumulan eficientemente (Saptogino A, 1989). Esta sospecha se constató en otro modelo animal de inflamación aguda donde se observó que los radiofármacos en cuestión fueron localizados primeramente dentro del área edematosa del foco inflamatorio (Morrel E, 1989).

Las IgG han sido marcadas con ^{99m}Tc y con ^{111}In . El mecanismo de acumulación es el mismo para ambos radionúclidos. Sin embargo, existen diferencias significativas entre los dos radiofármacos. Se ha demostrado en modelos de inflamación en animales, que la acumulación de ^{111}In -IgG fue significativamente mayor en la zona inflamada respecto a la que se observó con ^{99m}Tc -IgG (Oyen W, 1992). En un estudio posterior fue demostrado que dicha diferencia se debe a que el ^{111}In libre también se acumula en la región inflamada después que se disocia de la inmunoglobulina (Claessens R, 1995). Este hallazgo explica la alta relación lesión/fondo que experimentan los estudios realizados con ^{111}In -IgG respecto a la que experimentan los realizados con ^{99m}Tc -IgG en imágenes tardías. Por esta razón se prefiere el ^{111}In -IgG para estudios de inflamaciones crónicas. La biodistribución de los dos radiofármacos es similar y ambos presentan una cinética lenta. La ^{99m}Tc -IgG presenta una acumulación pulmonar elevada, lo que lo invalida en estudios de infecciones en dichos órganos y en el resto de la zona torácica (Buscombe J, 1991). Los estudios de inflamaciones intestinales crónicas también han presentado resultados desalentadores (Spinelli F, 1990). En osteomielitis crónicas se han obtenido resultados

satisfactorios así como en artritis reumtoides (Liberatore M, 1992; De Bois MHW, 1992; Sciuk J, 1991).

En un estudio para corroborar una infiltración de células mononucleares en un modelo de transplante pulmonar en perros, para diagnosticar rechazo utilizando la ^{99m}Tc -IgG los resultados fueron deficientes (Larcos G, 1993). En pacientes diabéticos insulina dependientes, las referidas inmunoglobulinas radiomarcadas con ^{99m}Tc , no mostraron acumulación en el páncreas durante el período prediabético. La acumulación pancreática de la ^{99m}Tc -IgG fue evidente cuando existía un daño en el metabolismo endocrino del páncreas (Signore A, 1996), probablemente relacionado al edema del páncreas exocrino o a daños endoteliales frecuentemente reportados en pacientes diabéticos con problemas en el control del metabolismo. La indicación más plausible de la ^{99m}Tc -IgG se basa en su uso para el diagnóstico de inflamaciones e infecciones del sistema músculo-esquelético.

La ^{111}In -IgG muestra buena sensibilidad en infecciones pulmonares (Buscombe J, 1993) y también en infecciones e inflamaciones abdominales (Becker W, 1995). Se ha comparado la precisión diagnóstica de ^{111}In -IgG con respecto a ^{111}In -leucocitos en enfermedades inflamatorias crónicas del intestino, donde ^{111}In -IgG mostró buena sensibilidad y especificidad aún cuando su precisión diagnóstica fue menor (Mairal L, 1995).

^{111}In -IgG se prefiere para el estudio de inflamaciones e infecciones de hueso y articulaciones donde se han obtenido excelentes resultados (Oyen W, 1992), así como en estudios de fiebre de origen desconocido (Klejin ED, 1992). En el diagnóstico de endocarditis no se muestran buenos resultados donde se ha demostrado bajas sensibilidad y especificidad diagnóstica, probablemente debido a los altos niveles de actividad circulantes (Becker W, 1995).

Este radiofármaco posee baja especificidad, es decir que no es posible discriminar entre sitios de infección e inflamación estéril (Renner HJJM, 2001; Marrero LO, 2003) pero si puede utilizarse como localizador de las lesiones en los pacientes con fiebre de origen desconocido e infecciones pulmonares, especialmente en los neutropénicos y en los inmunocomprometidos (Renner HJJM, 2001; Dass SS, 2002), así como en la detección de artritis reumatoidea activa (Cindas A, 2001). Por la gran dependencia del pool sanguíneo para su localización, no es útil en las imágenes de lesiones vasculares y

cardíacas (Renner HJJM, 2001 y Dass SS, 2002). Se han obtenido resultados similares, a los obtenidos con leucocitos marcados, en la detección de procesos inflamatorios en el sistema osteomioarticular (Nijhof MW, 1997; Corstens FHM, 1999; Zayas F, 2002; Bleeker-Roves, 2004). Es considerada útil solo como prueba de pesquisaje para infecciones de las prótesis articulares (Larinka M, 2003).

Aunque su uso ha ido decreciendo en el tiempo, ^{111}In -IgG puede ser eficientemente usado para el diagnóstico en condiciones muy particulares, con una precisión diagnóstica comparable con la de los leucocitos y los nanocoloides radiomarcados. Pueden preferirse, en particular cuando no existen las condiciones de laboratorio para el marcaje de células o cuando las condiciones clínicas del paciente impidan la obtención de voluminosas muestras de sangre y no se cuenta con un radiofármaco más eficiente.

2.5.5 Sistema Avidina-biotina

Las avidinas son una familia de proteínas presentes en los huevos de anfibios, reptiles y aves; la estreptavidina que es producida por *streptomyces avinii*, es parte de la misma familia. Tanto la avidina como la estreptavidina, las cuales poseen pesos moleculares entre 60-64 kilodaltons (kDa) tienen cuatro sitios de unión para la biotina con muy alta afinidad ($K_d=10^{15}$) (Lazzeri E, 1999; Renner HJJM, 2001). La biotina también conocida como vitamina H es un compuesto de bajo peso molecular que puede ser marcada con diferentes radiometales. El sistema avidina-biotina es bien conocido en inmunología donde es usado para el marcaje indirecto de proteínas a causa de su capacidad de amplificar la señal. Este sistema ha sido usado para el marcaje *in vivo* de anticuerpos monoclonales (MoAb) con el propósito de utilizarlo en el radioinmuno diagnóstico de tumores. También es llamado sistema de pre-blanco, la inyección de estreptavidina conjugada con MoAb es seguida por la inyección, 20-24 horas más tarde de biotina radiactiva (Hnatowich D, 1987). Los anticuerpos biotinilados son buscados por la avidina o la estreptavidina, como tercer paso se inyecta la biotina radiomarcada (Paganelli G, 1991). Cuando la biotina radiactiva es inyectada la estreptavidina circulante ya se ha aclarado lo suficiente de la sangre y está casi toda concentrada en el tejido blanco. Dicha biotina radiactiva se acumula en el tejido inflamado al unirse irreversiblemente a la

estreptavidina, mientras la biotina que no se unió es rápidamente excretada por los riñones y presenta mínima acumulación en órganos normales.

Hasta hoy no existe evidencia alguna de que la avidina o la estreptavidina provoquen reacciones tóxicas (Martín-Comín J, 2002). Sin embargo, ellas son de origen heterólogo y provocan respuestas inmunes. La mayor ventaja de esta técnica es su gran concentración en el tejido blanco, lo que provoca una alta relación lesión/fondo, lo que a su vez posibilita la adquisición temprana de imágenes gammagráficas. Otra de sus ventajas radica en que la actividad es administrada sobre una molécula de bajo peso molecular (biotina) que se localiza y aclara rápidamente, mientras que la presencia de streptavidina posibilita la adquisición de imágenes tardías (Rusckowski, 1996; Lazzeri E; 2004), así como el poder amplificador (4 moles de biotina/ mol de avidina).

El uso del sistema avidina-biotina fue bien estudiado en modelos de infección aguda en animales, donde se demostró que se acumuló más en el área infectada que $^{111}\text{In-IgG}$ (Rusckowski M, 1992). Este método aporta buena precisión en el diagnóstico de infecciones en prótesis vasculares (Samuel A, 1996). Es eficiente para visualizar focos de osteomielitis crónica donde la concentración focal del sistema streptavidina- $^{111}\text{In-biotina}$ en las zonas infectadas es significativa a los 10 minutos de inyectado el radiactivo, dicha concentración se mantiene por 24 horas (Rusckowski M, 1996).

2.5.6 Liposomas

Son vesículas lipídicas microscópicas que usualmente se aplican como transportadoras de drogas para incrementar su solubilidad y para lograr deposición selectiva o disminuir toxicidad (Nassander U, 1990; Martín-Comín J, 2002; Larinka M, 2003 y Renner HJJM, 2001). Dichas vesículas son rápidamente captadas por el sistema retículo endotelial (SRE), de ahí que radiomarcados con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ son utilizados para el diagnóstico de infección e inflamación (Morgan J, 1985; Williams B, 1987). Se forman espontáneamente cuando fosfolípidos anfifílicos son expuestos en una solución acuosa (Dass SS, 2002). Cuando son radiomarcados e inyectados por vía endovenosa, presentan un largo $T_{1/2\beta}$ y se fijan selectivamente en tumores y lesiones infecciosas. Marcados con ^{111}In fueron usados en

estudios para detectar abscesos experimentales en modelos con animales (Boerman O, 1995), donde se observaron concentraciones significativas por más de 48 horas.

Su uso se basa en la afinidad de los leucocitos polimorfonucleares y los macrófagos mononucleares por esas vesículas. Los liposomas llegan al sitio de la infección por permeabilidad vascular (Renner HJMM, 2001; Andreopoulos D, 2002) y son rápidamente aclarados por el sistema monocítico-fagocítico (Larinka M, 2003; Corstens FHM, 1999) pero si se les añade un polímero hidrofílico (polietilenglicol) se les protege del reconocimiento por los monocitos-fagocitos, se prolonga el período de residencia en la circulación y se les capta en los sitios patológicos (Larinka M. 2003; Renner HJMM, 2001; Corstens FHM, 1999 y Dass SS, 2002). El poder ser marcados con ^{99m}Tc y obtenerse imágenes dentro de las primeras cuatro horas posteriores a la inyección constituye su principal ventaja. Al acumularse significativamente en el hígado, en el bazo y la médula ósea enmascaran abscesos en el abdomen superior y en la columna vertebral (Dass SS, 2002). La técnica de preparación de estos radiofármacos es compleja (Dams ET, 2000). Factores como el tamaño y la composición lipídica afectan la habilidad de los liposomas para localizarse en los sitios de inflamación e infección. No distinguen entre inflamación aséptica e infección (Dass SS, 2002). La aparición de efectos adversos ha limitado su utilización (Carreras JL, 2002; Laverman P, 2000; Brouwers AH, 2000).

2.5.7 Glutación

El glutatión es un tripéptido que contiene aminoácidos con grupos sulfhidrilos (-SH) que pueden ser fácilmente radiomarcados con ^{99m}Tc . Estudios realizados con ^{99m}Tc -glutathione han reportado que el radiofármaco se concentra en articulaciones inflamadas, en una mayor proporción que la IgG (Ercan M, 1994), y que puede ser utilizado para la detección de metástasis en pacientes con melanoma (Duman Y, 1995). Su uso para el diagnóstico de inflamaciones e infecciones no ha tenido aceptación debido a su gran afinidad por los procesos tumorales, lo que le confiere baja especificidad.

2.6 Radiotrazadores específicos para la detección de inflamaciones e infecciones

Las técnicas de medicina nuclear aunque sensibles, son de elevada sensibilidad y baja especificidad, ya que es difícil la precisión diagnóstica de una infección aguda o crónica. Una vía para resolver estos problemas lo constituye el diseño de radiocomplejos dirigidos a receptores específicos presentes en distintos tipos de células y tejidos.

Los anticuerpos monoclonales fueron los primeros ejemplos de esta nueva clase de radiofármacos y en pocos años fueron diseñados varios tipos, basados en este tipo de reacción.

2.6.1 Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales son inmunoglobulinas producidas por líneas celulares híbridas (hibridomas) derivadas de la fusión de linfocitos B de animales previamente inmunizados con células de mieloma. Los hibridomas heredan del linfocito parenteral, la capacidad de producir anticuerpos y del mieloma la posibilidad de crecer en cultivos. A causa de que los hibridomas se seleccionan para un reconocimiento antigénico y clonan en etapas muy tempranas, los anticuerpos secretados por estas células tienen una única y elevada especificidad - son, por tanto, monoclonales - propiedad que permite una vez radiomarcados, su radiolocalización sobre un blanco (antígeno) previamente determinado (Gavilondo JV, 1995).

Los MAb han sido usados en la detección de procesos inflamatorios e infecciosos, ya que se unen directamente a antígenos presentes en la superficie de los leucocitos o a moléculas de adhesión endotelial. La preparación del radiofármaco es sencilla y además son seguros, pues no presentan riesgos biológicos.

Anticuerpo con afinidad para antígenos de granulocitos. Los MAb radiomarcados más utilizados para estos fines son el BW250/183 e IgG1, preparados como juegos de reactivos para el marcaje con ^{99m}Tc y están disponibles comercialmente. Se unen con alta afinidad ($K_d = 2 \times 10^9$) al antígeno no específico 95 (NCA-95), el cual se expresa en granulocitos humanos, promielocitos y mielocitos. Se ha observado que después de la unión a los granulocitos no provocan influencias negativas en dichas células (Becker W, 1994; Martín-Comín J, 2002; Oliva JP, 2002; Klett R, 2003).

Pasadas cuatro horas de una inyección intravenosa se puede observar que el 55% se localiza en la médula ósea, el 10% en el hígado y el 5% en el bazo; el 30% restante se encuentra en circulación, distribuida entre los granulocitos circulantes y libre en el plasma. La acumulación de los anticuerpos radiomarcados en el sitio inflamado es de una parte porque están unidos a los granulocitos y además porque los anticuerpos radiomarcados libres penetran dentro de la región inflamada, debido a la permeabilidad vascular y una vez allí de la región inflamada se unen a los granulocitos. Después de acumularse en órganos periféricos se aprecia una significativa disminución de concentración en sangre. No es posible un diagnóstico diferenciado entre inflamación estéril e infectada, pues se observa acumulación no específica en tumores (Martín-Comín J, 2002; Oliva JP, 2002; Klett R, 2003).

En el uso de los BW250/183 se han reportado resultados satisfactorios en el diagnóstico de inflamaciones crónicas intestinales, donde se han observado captaciones incrementadas hasta después de 24 horas posteriores a la inyección. No hay excreción del radiocomplejo por vía intestinal. Se han reportado también resultados alentadores en el estudio de infecciones de injertos vasculares, prótesis vasculares en el corazón y de abscesos pulmonares, pero no en neumonías (Becker W, 1994 ⁽¹⁾). En el diagnóstico de infecciones óseas, los abscesos localizados en los segmentos periféricos de los huesos son diagnosticados con una sensibilidad mayor que en los segmentos proximales; ello es debido a que existe una alta unión fisiológica del anticuerpo a la médula ósea.

La dosis a usar depende que se produzca respuesta inmune y formación de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA), por lo que es recomendado aplicar menos de 125 µg de anticuerpos por paciente.

AcMo Anti SSEA-1 IgM (LeuTech[®]: Anti-CD15, Fanolesomab[®]) radiomarcado con ^{99m}Tc: este anticuerpo es una IgM murina que interactúa con el antígeno CD15, específicamente expresado en los neutrófilos. Su tamaño molecular es de aproximadamente 50 kDa, por lo que se acumula rápidamente en el sitio de la infección (Love C, 2003 y 2004; Rubello D, 2004). No induce respuesta HAMA (Thakur M, 1996 y 2001) y después de radiomarcado proporciona buenas imágenes en menos de 60 minutos post inyección. El ^{99m}Tc-anti SSEA-1 no presenta retención pulmonar (Love C, 2004). Se prefieren las imágenes

tardías o secuenciales a las cuatro y 24 horas (Wolf G, 2001). Ocasiona una disminución temporal del conteo de leucocitos circulantes, que se recupera a la hora después de la administración intravenosa [Love C, 2004; Palestro CJ, 2002; Keelan E, 1994 ⁽¹⁾] En estudios iniciales han mostrado una sensibilidad del 91% y una especificidad del 70% (Palestro CJ, 2002).

Anticuerpos con antígenos sobre linfocitos. Anticuerpos anti CD2 radiomarcados han sido utilizados para el diagnóstico de rechazo de trasplantes renales (Baum R, 1990).

El CD3 es un antígeno asociado con receptores de las células T, él es un mediador de funciones biológicas después de activados por el enlace del anticuerpo. Han sido estudiados pacientes con artritis reumatoide mediante el ^{99m}Tc-OKT3 (Marcus C, 1994), donde se reporta que el acúmulo del anticuerpo radiomarcado coincide con una inflamación intensa en articulaciones antes de que se presentaran los síntomas clínicos. El uso de este anticuerpo también es asociado con otros efectos debidos a que al unirse al receptor promueve la liberación de citoquinas.

Los anti CD4 radiomarcados han sido eficientes en la detección de inflamaciones de las articulaciones en pacientes con artritis reumatoide (Becker W, 1990). En estudios comparativos usando anti CD4 radiomarcado y ^{99m}Tc-IgG policlonal humana, ambas preparaciones mostraron similares acumulaciones en las articulaciones inflamadas. Con anti CD4 se notó una actividad de fondo menor debido a su alta acumulación hepática y esplénica, lo que provocó mejor relación lesión fondo en el área afectada (Kinner R, 1993).

La evaluación de anti CD25 (IL-2R cadena alfa) para la detección de rechazo de trasplante cardíaco en ratas, reportó discretos avances respecto a su precisión diagnóstica (Theirez P, 1989).

Anticuerpos que actúan por adhesión molecular. Las moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM y selectina E, promueven la migración de leucocitos dentro del tejido inflamado los cuales son sobre-expresados durante el proceso inmune (Shimizu Y, 1992). Los Anti-ICAM-MoA-radiomarcados han sido valorados para el diagnóstico de rechazo de trasplantes en modelos con animales (Bellen J, 1994). Las anti-selectina E-MoA han

sido estudiadas en modelos animales de artritis, donde se observó que se acumulan selectivamente en articulaciones inflamadas [Keelan E, 1994 ⁽¹⁾].

Una de las ventajas que presentan los anticuerpos es su fácil acceso al antígeno blanco que está expresado sobre la superficie de las células; estos no necesitan migrar dentro del tejido inflamado para fijarse a sus receptores [Keelan E, 1994 ⁽²⁾].

AcMo radiomarcados anti-Selectina E: La selectina-E es una molécula de adhesión endotelial exclusivamente expresada en la superficie de las células activadas ("inflamadas") y capaces de unirse a los leucocitos [Keelan E, 1994 ⁽¹⁾ y ⁽²⁾]. No es específica para el diagnóstico de infecciones. Fragmentos F (ab')₂ de un AcMo anti selectina-E radiomarcado con ¹¹¹In o ^{99m}Tc se han usado satisfactoriamente en el estudio de las artritis (Jamar F, 1995 y 1997). Debido a la posibilidad de inducir respuesta HAMA, se ha desarrollado por bioingeniería un anticuerpo de una sola hélice que impide el desarrollo de dicha respuesta (Renner HJJM, 2001).

AcMo directos contra antígenos microbianos: Al menos en teoría son más específicos para imágenes de infección, se han obtenido resultados prometedores en la detección de lesiones sifilíticas, de neumonía por *Pneumocystis carini* y de infecciones por *Pseudomona aeruginosa* (Dass SS, 2002).

Anticuerpos radiomarcados: Ventajas y Limitaciones.

El uso de los anticuerpos presenta varias ventajas comparados con los leucocitos autólogos radiomarcados. La principal es que se evita la manipulación con muestras biológicas que presenta una potencial posibilidad de contaminación para el paciente y para el operario. Además, ellos muestran mejor sensibilidad y especificidad en las mismas condiciones patológicas. También debido a su enlazamiento a receptores específicos es que se pueden localizar células específicas en las distintas fases del proceso inflamatorio. Sin embargo, su uso está caracterizado por las siguientes desventajas y limitaciones:

- Tienen altos pesos moleculares, lo cual puede ocasionar un impedimento para la difusión al interior de los sitios de inflamación.

- Tienen un largo periodo de semieliminación plasmática, ellos no son eliminados por los riñones, sino por el hígado y el sistema retículo endotelial. Por estas razones muestran alta radiactividad de fondo, la que decrece lentamente en el tiempo. Es por ello que se requiere un largo intervalo de tiempo entre la inyección del anticuerpo radiomarcado y la adquisición de las imágenes para obtener la mejor relación lesión- fondo.
- Son de origen heterólogo e inducen respuesta HAMA, con el posible desarrollo de reacciones alérgicas, anticuerpos anti-idiotípicos, lo que altera la farmacocinética del radiofármaco. Esta es la mayor limitación cuando la ejecución de estudios evolutivos con el mismo anticuerpo es necesaria (Bosslet K, 1989).
- Después de la unión específica a los receptores se produce una disminución considerable de la población celular y se producen efectos indeseables [Becker W, 1994 ⁽¹⁾; Marcus C, 1994].

2.6.2 Fragmentos de anticuerpos monoclonales y péptidos derivados de anticuerpos

La ventaja que presentan los fragmentos de anticuerpos con respecto a la biomolécula intacta radica en su bajo peso molecular. Ellos presentan un rápido aclaramiento plasmático, además penetran mejor en el tejido inflamado y son menos inmunogénicos [Becquer W, 1994 ⁽¹⁾; Fischmann A, 1993]. Dado que dichos fragmentos no presentan la porción Fc, esto les confiere mejor especificidad ya que no reconocen el receptor de Fc presente en los monocitos. Para vencer los problemas que ocasionan los anticuerpos heterólogos fueron sintetizados anticuerpos quiméricos y humanizados. Estos son producidos por técnicas recombinantes, su región constante es de origen humano y la región específica para la unión del antígeno es de origen murino. En los quiméricos toda la región variable es de origen murino y corresponde a la secuencia específica del murino original; en los humanizados toda la molécula es humana con la excepción de la región que reconoce al antígeno. Dicho reconocimiento es responsabilidad de tres islotes de 5 a 10 aminoácidos, llamadas regiones de complementariedad determinada (CDR), dicha

secuencia es determinada de la región del anticuerpo murino e injertada sobre la secuencia constante humana. Estos productos han sido usados en pacientes oncológicos donde se ha reportado que existe una mejor tolerancia a ellos (Hazra D, 1995; Khaw B, 1993).

Basado en el mismo principio, existen pequeños péptidos cuya función es la unión a los receptores, están terminados en pequeñas unidades que son derivados de las CDR de los anticuerpos. Estos péptidos forman la región del anticuerpo que reconoce los antígenos y están compuestos por 5-30 aminoácidos (Fischmann A, 1993).

Fragmentos de anticuerpos antigranulocitos: Los fragmentos Fab' y F(ab')₂ radiomarcados han sido usados para el diagnóstico de tumores en el humano (Siccardi A, 1989) y para la detección *in vivo* de granulocitos [Becker W, 1994 ⁽²⁾]. Se han realizado además estudios de detección de infecciones en tejidos blandos utilizando fragmentos ^{99m}Tc-antigranulocitos Fab' en los que se ha corroborado una precisión diagnóstica comparada a la obtenida con leucocitos radiomarcados, en imágenes adquiridas en un tiempo menor a una hora y con una respuesta HAMA insignificante [Becker W, 1994 ⁽²⁾].

Fragmentos anti selectina-E F(a)₂. Los fragmentos anti selectina-E F(ab')₂ han sido usados para detectar enfermedades inflamatorias intestinales crónicas (Bhatti M, 1996). Ellos se acumulan selectivamente en las lesiones de colitis ulcerativas y enfermedad de Crohn's; también fue demostrada hiper-expresión de la selectina-E en la mucosa intestinal según estudios *in vitro*. En los pacientes con la enfermedad inactiva no se apreciaron acumulaciones del radiofármaco.

En un estudio comparativo con fragmentos anti- selectin-E F(ab') radiomarcado y con ¹¹¹In-HIG, donde se estudiaron 20 pacientes con artritis reumatoide, los fragmentos anti-selectin-E F(ab') mostraron acumulación significativa en articulaciones activas, lo cual mostró buena correlación con la clínica y mejor sensibilidad que con ¹¹¹In-HIG (Chapman P, 1996).

Fragmentos F(ab') contra antígenos microbianos. El uso de fragmentos específicos contra antígenos microbianos radiomarcados ha sido evaluado para la detección de infecciones. Anticuerpos monoclonales directamente contra la bacteria pseudomonas

aeruginosa han sido usados en modelos de infección en ratas (Rubin R, 1988) y en pacientes con neumonía por pneumocitis carini, donde se reportó buena precisión diagnóstica (Thakur M, 1990). Sin embargo, esta propuesta solo puede ser usada en poblaciones con riesgo de infecciones específicas (Goldenberg D, 1994).

2.6.3 Péptido antagonista tuftsin

El tuftsin es un tetrapéptido derivado de la porción Fc de la IgG; ellos promueven la fagocitosis y la quimiotaxis de macrófagos y neutrófilos por unión a receptores específicos en dichas células. Un antagonista tuftsin (TKPPR) ha sido sintetizado y estudiado por su uso en la detección, *in vivo*, de áreas de inflamación aguda. En un estudio experimental de colitis ulcerativa en ratas fue apreciada gran acumulación en las lesiones, aún mayores que las observadas con ¹¹¹In-leucocitos y en menos tiempo (0.5-1h) (Peers S, 1995).

2.6.4 Citoquinas

Las citoquinas son una clase de péptidos muy promisorios para la obtención de radiofármacos con potencialidades para el diagnóstico certero de varios tipos de condiciones patológicas. Ellas experimentan reacción con receptores específicos expresados sobre la superficie celular de poblaciones conocidas. Los receptores de citoquinas, usualmente de alta afinidad, son generalmente expresados en bajos niveles sobre las células, pero su expresión puede ser regulada durante la activación. Varios complejos citoquina-receptor operan en enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunes, tumores y en otras condiciones patológicas. La expresión patológica de los receptores en los tejidos afectados es un blanco para el diagnóstico de enfermedades (Nicola N, 1994; Bleeker-Roves, 2004).

Muchas citoquinas tienen buena potencialidad como radiofármacos las que están caracterizadas por:

- Bajo peso molecular.

- Rápidos tiempos de vida media biológica y aclaramiento sanguíneo.
- Alta afinidad por sus receptores específicos.
- Disponible por técnicas de DNA recombinante.
- Son de origen humano y carecen de inmunogenicidad.

Aunque las citoquinas radiomarcadas tienen potencialidad para el estudio de condiciones fisiopatológicas de varias enfermedades, solo pocas de ellas han sido usadas para el diagnóstico de infecciones.

Interleuquina 1 (IL 1). La IL-1 radiomarcada con ^{123}I ha sido usada en modelos animales de inflamaciones agudas. Los resultados mostraron que el radiofármaco se iba acumulando progresivamente en la zona lesionada más que la mioglobina radiomarcada (proteína control); la máxima relación lesión/fondo fue obtenida a las 48 horas de administrado el radiocompuesto (Van der Laken, 1996). Sin embargo la IL-1 es tóxica *in vivo* y dado que la máxima cantidad que puede ser usada sin causar efectos adversos es 10 nanogramos (ng)/kg⁻¹, esto la invalida para el diagnóstico en humanos. Para resolver el problema de la toxicidad se investigó la IL-1ra que es una antagonista para los receptores de la IL-1, a los cuales se une con una afinidad similar pero no produce efectos biológicos indeseables. Sin embargo se ha demostrado la pobre acumulación de IL-1ra radiomarcada en abscesos, lo que compromete su potencialidad para estos fines (Van der Laken C, 1996).

Interleuquina 2 (IL-2). Varias condiciones patológicas tales como enfermedades autoinmunes, rechazo de trasplantes y aún tumores son caracterizados por infiltración crónica de células linfomononucleares en tejidos blanco. Como una consecuencia de activación *in vivo*, las células infiltrantes expresan receptores para la IL-2, en su superficie (Semenzato G, 1992). Lo que sugiere que la IL-2 radiomarcada puede reconocer células mononucleares infiltradas. Después de una inyección intravenosa de IL-2 radiomarcada ellas se acumula en los sitios de acumulación patológica, uniéndose con alta afinidad a sus receptores, lo que permite la visualización de los procesos patológicos mediante la técnica gammagráfica. La gammagrafía positiva con IL-2

radiomarcada nos permite corroborar la presencia de linfocitos T activados y por tanto el estado activado del proceso inflamatorio.

El uso de IL-2 radiomarcada ha sido extenso en modelos en animales y en humanos. En modelos en animales de diabetes mielitis humana autoinmune con ratas Bio Breeding Worcester (BB/W) y ratones obesos no diabéticos, mostró que después de la administración intravenosa, la ^{123}I -IL-2 se acumuló en el páncreas entre 5-15 minutos después y fue retenido en el órgano afectado (Signore A, 1987 y 1992). Estos resultados fueron confirmados por gammagrafía y por conteos de radiactividad del órgano después del sacrificio de los animales. Los exámenes histológicos del páncreas mostraron una correlación positiva entre la radiactividad y el título de linfocitos infiltrados en dicho órgano, los estudios autoradiográficos confirmaron que la radiactividad fue asociada con la unión IL-2 radiomarcada a sus receptores sobre la superficie de los linfocitos infiltrantes.

Estudios en humanos mostraron que ^{123}I -IL-2 puede ser usada con éxito para la detección *in-vivo* de la presencia de linfocitos en varias condiciones patológicas, incluyendo a los diabéticos insulino dependientes, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, enfermedad de Crohn's y otras enfermedades autoinmunes [Signore A, 1993⁽¹⁾ y ⁽²⁾ y 1996]. Otros estudios para la evaluación en el diagnóstico de enfermedades gastrointestinales mostraron una correlación positiva entre el número de células infiltrantes con receptores para IL-2 infiltradas en la mucosa del yeyuno determinado por técnicas histológicas y la acumulación de radiactividad en el yeyuno causada por ^{123}I -IL-2 (Signore A, 1995).

En un estudio en pacientes con enfermedad tiroidea autoinmune, el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IL-2 reveló linfocitos activados infiltrantes en casos con tiroiditis de Hashimoto y enfermedad de Graves (Chianelli M, 1996). En pacientes con melanoma la $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IL-2 detectó linfocitos que infiltran los tumores y fue observada una correlación positiva entre la acumulación de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IL-2 y el porcentaje de células Natural killer (NK) circulantes (Barone R, 1996).

Estos resultados sugieren que IL-2 radiomarcada puede tener una incidencia importante en el manejo clínico de pacientes con enfermedades autoinmunes y otras condiciones clínicas caracterizadas por infiltración de células mononucleares.

Interleukina-8 (IL-8). La IL-8 radiomarcada con ^{125}I ha sido usada en modelos animales con inflamación aguda y su acumulación en los abscesos ha sido comparada con la que experimenta el ^{67}Ga e ^{111}In -leucocitos. La ^{125}I -IL-8 muestra rápida acumulación en los sitios de inflamación (máxima acumulación a las dos horas), la cual fue mayor a la observada con ^{111}In -leucocitos ([Bleeker-Rovers CP, 2004](#)). En un estudio clínico en 8 pacientes con osteomielitis la IL-8 radiomarcada con ^{131}I detectó eficientemente los focos infecciosos y ningún paciente mostró reacciones adversas (Gross M, 1996). Estos fueron los primeros resultados que demostraron las potencialidades de esta citoquina radiomarcada, para el diagnóstico de infecciones y su uso en humanos.

Citoquinas radiomarcadas: Ventajas y limitaciones. Las citoquinas tienen una función biológica específica *in vivo* especialmente a muy bajas dosis y su uso en los humanos a veces no es posible. Para minimizar los posibles efectos indeseables ellas deben ser radiomarcadas con alta actividad específica, lo cual muchas veces es imposible. Además se debe diseñar una metodología de radiomarcaje cuidadosamente estudiada para impedir que pierdan su capacidad de reconocer a sus receptores específicos, lo cual sucede frecuentemente ([Bleeker-Rovers CP, 2004](#)).

2.6.5 Péptidos quimiotácticos

El N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) es un péptido quimiotáctico bien conocido y estudiado, tiene un peso molecular de 437 daltons (Da) y es producido por bacterias. El fMLP presenta gran afinidad por sus receptores específicos, expresados en la superficie de las membranas de los granulocitos, estimula la quimiotaxis de los granulocitos, regula la expresión de moléculas de adhesión e incrementa la permeabilidad vascular (Roitt, 1994). Es bastante tóxico ya que induce severa granulocitopenia.

En 1981, el uso de un análogo del fMLP radiomarcado fue valorado, pero fue imposible lograr una actividad específica suficientemente alta para evitar granulocitopenia (Zoghbi S, 1981). Posteriormente se describió la síntesis de diferentes análogos del fMLP

marcados con ^{111}In y su uso en modelos de inflamación aguda en ratas (Fischmann A, 1991). En este estudio reportaron acumulación de los análogos de fMLP radiomarcados en los abscesos experimentales con moderados efectos sobre los niveles sanguíneos de neutrófilos. Sin embargo no fueron obtenidas evidencias conclusivas sobre su efectividad para la localización de focos inflamatorios; los abscesos experimentales fueron visualizados a los cinco minutos de inyectado el radiofármaco pero la actividad decreció sustancialmente en el tiempo. En estudios posteriores los análogos de fMLP fueron radiomarcados con ^{99m}Tc para aumentar la actividad específica, el radiofármaco fue purificado por HPLC [Babich J, 1993 ⁽¹⁾]. Se apreció una disminución de la granulocitopenia, con buena acumulación en los abscesos en modelos experimentales de infección aguda en ratas y conejos una hora después de la inyección con baja radiación de fondo. En un estudio comparativo, en abscesos experimentales en conejos, los análogos de fMLP radiomarcados se acumularon con mayor precisión que los leucocitos radiomarcados [Babich J, 1993 ⁽²⁾].

Los resultados obtenidos con estos radiofármacos para la detección de infecciones agudas fueron alentadores. Sin embargo con el paso del tiempo las investigaciones encaminadas a su aplicación clínica no han aportado los resultados esperados fundamentalmente por su potencial toxicidad y disponibilidad.

2.6.6 J001X.

El J001X es poligalactósido acetilado, no pirogénico aislado de las membranas de los proteoglicanos específicamente de una cepa no patogénica de *klebsiella pneumoniae*, se unen a los receptores CD11b expresados sobre los monocitos, las células **NK** y los macrófagos y a los CD14, receptor de polisacáridos expresado sobre los monocitos y macrófagos (Zayas F, 2002). El J001X radiomarcado ha sido usado para la detección de alveolitis e inflamaciones de nodos linfáticos en estudios experimentales de beriliosis crónica en bovinos [Diot P, 1992 ⁽¹⁾], lesiones inflamatorias en cerdos (Perrin E, 1993) y en un modelo de artritis en conejos (Goupille P, 1994). En humanos el J001X ha sido usado para imágenes de sarcoidosis [Diot P, 1992 ⁽²⁾]. Fue concebido como un promisorio agente para la detección de macrófagos infiltrados en lesiones inflamatorias,

pero sus usos clínicos no han tenido aceptación debido a la baja disponibilidad y a lo costoso de su obtención. Además los resultados respecto a la precisión diagnóstica son controversiales.

2.6.7 Análogos de la somatostatina

Los análogos de la somatostatina radiomarcados han sido extensivamente usados para la detección de tumores neuroendocrinos (Kreening E, 1995). Los receptores de la somatostatina (RS) son también expresados sobre el tejido linfático (Reubi J, 1993).

La hiperexpresión de los RS ha sido reportada en células intestinales con colitis ulcerativa activa y enfermedad de Crohn's. Fueron también identificados *in vitro* en pacientes con artritis reumatoidea [Van Hegen P, 1994 ⁽¹⁾].

Estudios en pacientes con sarcoidosis activa, los RS fueron encontrados *in vitro* en múltiples granulomas; los receptores, fueron predominantemente localizados en las áreas que contenían células epiteliales, no asociadas con linfocitos. No se observaron RS en pacientes tratados con esteroides exitosamente, quienes mostraron una completa esclerosis de las lesiones granulomatosas. Observaciones similares fueron reportadas para pacientes con tuberculosis [Van Hagen P, 1994 ⁽¹⁾].

Se han obtenido resultados contrastantes en la enfermedad de Graves. Algunos estudios han reportado la acumulación de ¹¹¹In-pentetreotide en la tiroides y en el espacio retro-orbital en pacientes con exoftalmos (Díaz M, 1993; Postema P, 1995). Sin embargo, otras investigaciones confirmaron la acumulación en la tiroides del octreotide radiomarcado pero no en el espacio retro-orbital (Eberhardt J, 1993, Bohuslavizki K, 1995). Este fenómeno debe estar relacionado con la muestra de pacientes seleccionada ya que en las primeras fases de la enfermedad de Graves es cuando ocurre una infiltración activa; en la fase tardía de la enfermedad, hay actividad fibroblástica con la consecuente fibrosis en la región retro-orbital y la consecuente expresión nula de receptores de la somatostatina (Bahn R, 1993, Hursley J, 1994).

Estudios en modelos de inflamaciones agudas, en animales de experimentación, revelaron que ^{111}In -octetide no es apropiado para la detección de abscesos (Oyen W, 1994), ya que fue evidenciada baja acumulación y poca retención en el tiempo.

2.6.8 Sustancia P

La sustancia P es un péptido neuroendocrino que juega un importante papel en el control de los receptores de algunos tumores de origen epitelial. La hiperexpresión de los receptores para la sustancia P también es observada en las células endoteliales de los focos inflamatorios (Reubi J, 1995). La referida sustancia radiomarcada con ^{111}In ha sido utilizada para la detección de tumores neuroendocrinos e inflamaciones en modelos animales (Breeman W, 1996). En estudios con pacientes portadores de enfermedades inmunológicas se ha reportado que la ^{111}In -sustancia P permite la visualización del timo y los sitios inflamados en varios cuadros clínicos y tipos de enfermedades (Van Hagen M, 1996).

2.6.9 Defensinas

Término utilizado para designar una variedad de péptidos catiónicos antimicrobianos endógenos que protegen contra ataques microbianos y contribuyen a la resistencia natural ante la infección (Dass SS, 2002 y Lupetti A, 2003). Son pequeños péptidos que contienen entre 8 y 35 residuos de aminoácidos; sintetizados por varios tipos de células de mamíferos, sobre todo por los precursores de los neutrófilos en la médula ósea. Constituyen del 5 al 7% del total de las proteínas en los neutrófilos y están presentes en altas concentraciones en los gránulos azucosos y en las vacuolas fagocíticas; por lo que también son llamados péptidos neutrofilicos humanos, de los que existen cuatro tipos (PNH 1-4) (Dass SS, 2002). Poseen un amplio espectro de acción antimicrobiana contra bacterias, hongos y virus (Welling MM, 2000 ⁽¹⁾). Teóricamente las cargas catiónicas facilitan su unión a varios microorganismos (Renner HJJM, 2001).

Se categorizan de acuerdo a la clase estructural principal en: (Larinka M, 2003)

. Péptidos lineales que adoptan una estructura α helicoidal.

- . Péptidos con puentes disulfuro.
- . Péptidos ricos en grupos aminos.

Son liberados dentro del fagosoma, donde contribuyen a la muerte citotóxica oxígeno independiente de los microorganismos fagocitados. Actúan por inserción en el interior de la membrana celular de la célula diana, donde forman canales iónicos y provocan que la membrana celular microbiana se vuelva permeable y el microorganismo muera. Pero este “ mecanismo asesino ” no es específico para los microorganismos por lo que las células normales también pueden ser destruidas si el tratamiento no es cuidadosamente controlado y confinado a las vacuolas fagocíticas dentro de los neutrófilos (Dass SS, 2002; Britton KE, 2000). La concentración plasmática de los PNH se eleva a niveles muy altos en las infecciones. Las prodefensinas circulan en el plasma como formas libres en contraste, las defensinas 1-3 se unen a la α_2 macroglobulina, a la albúmina y a las inmunoglobulinas (Dass SS, 2002).

Dentro de este grupo se encuentra un grupo de radiofármacos de ^{99m}Tc derivados de la Ubiquidina (UBI) y sus variantes son UBI 29-41, UBI 18-35 y UBI 31-38. Estudios en animales de experimentación y en humanos permitieron la detección de lesiones infecciosas (Zayas F. 2002; Welling MM, 2002; Ferro G, 2003; Meléndez L, 2003; Katar M, 2005). Son preferidos por algunos investigadores ya que pueden ser sintetizados y porque no producen efectos adversos desde el punto de vista inmunológico (Dass SS, 2002). Su principal desventaja es lo costoso que resulta el proceso de síntesis.

2.6.10 [^{18}F] fluor-2-desoxi-D-glucosa (FDG)

Formada por dos componentes; la 2-desoxiglucosa, que es un análogo de la glucosa y el radionúclido ^{18}F . Este elemento es un producto con $T_{1/2\text{F}}$ de 110 minutos, emisor de positrones con recorrido de 2.4 milímetros (mm) en agua, que produce, por aniquilación con los electrones, 2 cuantos gamma de 511 keV que viajan en un ángulo de 180° uno de otro. Se administra por vía endovenosa, se distribuye por el pool vascular y es captado por las células inflamatorias con requerimientos metabólicos incrementados, mediante el mecanismo de transporte facilitado que utiliza la glucosa (proteínas GLUT 1-7), de esta forma se inicia la vía glicolítica con la fosforilación por la enzima exoquinasa, y se forma

la 2-FDG-fosfato, que carece de grupo hidroxilo en C₂ y no puede continuar la vía por no poder actuar la fosfoglucosa isomerasa. Por tanto, a diferencia de la glucosa, no puede abandonar la célula una vez que es captada por ella (atrapamiento metabólico) (Chacko TK, 2003; Stumpe KDM, 2000). Puede utilizarse para la obtención de imágenes gammagráficas de células con alta actividad glicolítica como las tumorales malignas y las inflamatorias, por lo que no debe esperarse una alta especificidad (Renner HJMM, 2001; Chacko TK, 2003; Peñuelas I, 2001; Borrego I, 2002; Grupo PET SEMN, 2002). La técnica se encarece al ser el ¹⁸F un producto de ciclotrón. No está disponible en todos los países, ni homogéneamente dentro de muchos países. Su elevado costo limita la generalización para el diagnóstico de infecciones. Se ha utilizado en diversos tipos de procesos inflamatorios-infecciosos; en los procesos infecciosos del esqueleto axial ha mostrado mayor sensibilidad que los leucocitos marcados con ¹¹¹In, pues no se acumula en la médula ósea (Stumpe KDM, 2000; Meller J, 2002; Palmedo H, 2001) y en la detección de las osteomielitis crónicas es superior a los leucocitos marcados porque no solo se acumula en los tejidos con infiltrado de polimorfonucleares, sino también en las inflamaciones crónicas [Meller J, 2002; Winter F de, 2001 ⁽¹⁾]. La captación por los focos infecciosos es afectada por los niveles de glucosa sérica (Renner HJMM, 2001).

El uso de ¹⁸F-FDG con cámara de coincidencia demostró ser superior a los leucocitos marcados en los estudios de las osteomielitis crónicas (Meller J, 2002). Presenta mejor exactitud diagnóstica en las infecciones de las artroplastias totales de columna (ATC) que en las artroplastias totales de rodilla (ATR) (Larinka M, 2003) además existen evidencias de captación no patológica mantenida después de colocada una ATC (Zhuang H, 2002). Se sugiere que puede diferenciarse entre sinovitis, aflojamiento aséptico y séptico en la ATC y ATR según la localización y la extensión del incremento del metabolismo de la glucosa alrededor del implante (Chacko TK, 2003).

En la actualidad, fundamentalmente se aplica en los pacientes con VIH/SIDA que presentan sospechas de infecciones torácicas o del sistema nervioso central, y en los pacientes con FOD (Lorenzen, 2001; Oyen WJC, 2003; Bucosmbe, 2003).

La mayor resolución espacial del sistema Tomografía por Emisión de Positrones (conocido en lengua inglesa como PET) permite obtener imágenes más específicas, a lo

que se suma la rápida acumulación en el sitio de infección, son sus mayores ventajas (Renner HJJM, 2001; Kalikle T, 2000). Su valor añadido radica en el alto valor predictivo negativo (Bischof A, 2002). En el 2002 se introdujo la ^{18}F -fluroetil-L-tirosina (^{18}F FET) en lugar de la ^{18}F FDG para los estudios de PET (Kaim AH, 2002).

2.6.11 Antibióticos radiomarcados

2.6.11.1 Tetraciclinas

El uso de antibióticos radiomarcados se remonta a la década de los 70's cuando un grupo de investigadores sintetizaron la tetraciclina radiomarcada con ^{131}I (TET- ^{131}I) (Chaucey DM, 1976). Se alcanzó una pureza máxima de 85% y una estabilidad del marcaje de 72 horas almacenada a cuatro grados Celsius. En estudios experimentales en ratas con abscesos inoculados (*Staphilococcus aureus*), donde se comparó al ^{67}Ga y la ^{131}I -TET para detectar abscesos se demostró que la concentración del ^{67}Ga fue significativamente mayor tanto a las 24 como a las 72 horas de administrados los radiofármacos (Chaucey DM, 1976). Su aplicación clínica en el estudio de procesos inflamatorios no tuvo aceptación y fue más útil en estudios de tumores.

En la década de los 80's se sintetizó la pirrolidino-metil tetraciclina radiomarcada con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ [$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -PMT] ([Shafiq YF](#), 1988). Este radiofármaco presenta una gran afinidad por tumores ([Shiozaki T](#), 2003); este hallazgo motivó que su uso en la detección de inflamaciones no haya tenido una gran aceptación en la comunidad médica.

La tetraciclina también fue radiomarcada con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -TET), donde se pudo obtener un rendimiento de marcaje solo del 50% a pH neutro ([Ibañez-Zurriaga A](#), 1986). Este resultado invalida el radiofármaco para su uso clínico.

2.6.11.2 Quinolonas

Se han obtenido alentadores resultados sobre el uso de las quinolonas radiomarcadas con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y con ^{18}F . Ellas pueden ser detectadas en el sitio de inflamación con alta precisión aún antes de que se produzca alguna migración de leucocitos al sitio inflamado (Vinjamuri S, 1996).

¹⁸F-fleroxacina: La biodistribución de este radiofármaco se caracteriza por presentar una gran concentración en varios órganos periféricos (Fischman AJ, 1992). En todos los modelos de infección estudiados, en varias especies de animales, se observó que no existen diferencias significativas entre la acumulación en las lesiones musculares infectadas con Escherichia Coli (EC) y las regiones anatómicas contralaterales, sanas (Fischman AJ, 1992), lo que limita considerablemente su uso aún en la detección de inflamaciones estériles.

¹⁸F-trovafloxacina: Presenta una biodistribución desfavorable para su uso en el diagnóstico *in vivo* de inflamaciones puesto que se acumula significativamente en riñones, hígado, pulmones y sangre. En modelos de infección con EC se constató que existen concentraciones en la zona lesionada similares a la de los tejidos sanos, esto significa que su uso *in vivo* en este sentido no sería adecuado (Fischman AJ, 1997)

^{99m}Tc-Ciprofloxacina: En busca del radiofármaco de elección para el diagnóstico específico de infecciones, es que se desarrolla la ^{99m}Tc-ciprofloxacina o ^{99m}Tc-Infección, como se le conoce comúnmente, que se fija únicamente en los sitios donde hay bacterias vivas según Britton KE, 1997. El nombre químico del principio activo es, ácido-3-quinolinecarboxílico, 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil); su estructura química y peso molecular son (C₁₇H₁₈FN₃O₃) y 331.35 g/mol respectivamente. Presenta una biodisponibilidad de un 69%; es metabolizado en el hígado por el Citocromo P450 1A2, su excreción es fundamentalmente renal. Este antibiótico penetra a las bacterias por difusión pasiva e inhibe la topoisomerasa II (ADN girasa enzimática), la cual actúa en el superenrollamiento negativo de las cadenas de ADN y de esa forma se inhibe la replicación celular (Mandell GL, 1996), por tanto marcando el antibiótico con un radioisótopo, podría comportarse como su especie nativa y unirse selectivamente sobre las bacterias vivas y de esta manera aportar imágenes gammagráficas de sitios infecciosos activos (Britton KE, 1997).

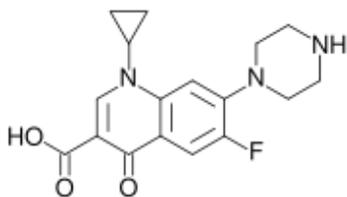


Figura 1. Estructura molecular de la ciprofloxacina (1-ciclopropil-7-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-8-piperazina-1-quinolona-3-ácido carboxilo).

Observando la estructura molecular del antibiótico se puede apreciar que presenta varios grupos reducidos con potencialidades para formar enlaces de coordinación. En orden de prioridad presenta un grupo amino secundario, dos grupos carbonilos y un grupo hidroxilo, los cuales pueden formar radiocomplejos con el ^{99m}Tc , sin comprometer la actividad biológica del fármaco.

No obstante la controversial eficiencia de este radiofármaco dada fundamentalmente, por su pureza y por su elevada biodistribución hepática, renal y en médula ósea (Vinjamuri S, 1996; Briton KE, 1997; Hall AV, 1998), su aplicación clínica ha seguido en aumento. Se ha demostrado que el antibiótico marcado con ^{99m}Tc (^{99m}Tc -ciprofloxacina) posee ventajas sobre las células blancas de la sangre marcadas con el mismo radioisótopo (^{99m}Tc -HMPAO-WBC) para los mismos fines, dicho radiofármaco ha presentado mayor especificidad por infecciones bacterianas, su preparación es más sencilla, rápida, menos costosa y menos riesgosa para el paciente, además proporciona imágenes gammagráficas de mejor calidad. La influencia del método de preparación es significativamente incidente sobre la calidad del producto. Se ha demostrado que preparando el radiofármaco con reductores como ácido formamidin sulfónico (AFS) o estaño (II) hidratado e incubando a temperatura ambiente o utilizando dos variantes para aplicar calor a las soluciones, los productos mostraron diferentes propiedades químicas y biológicas. ^{99m}Tc -ciprofloxacina preparada usando AFS y aplicando calor con microwave mostró las más atractivas propiedades (Oh J, 2002).

En un estudio más reciente se ha reportado que no existen diferencias significativas en cuanto al rendimiento de marcaje a temperatura ambiente o incubando a altas temperaturas (aproximadamente 100°C), utilizando la misma cantidad de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. No obstante recomiendan purificar a través de filtro $0,22\mu\text{m}$, para reducir la cantidad de coloides de un 17% a un 7,2% (Lima JET, 2004); esta observación confirma que existen impurezas marcadas en la solución del radiofármaco que pudieran ser eliminadas ajustando la formulación para economizar el procedimiento y hacerlo más eficiente y generalizable.

Mediante el uso del polímero redox $\alpha(\beta)$ -Alanina -N, N-diacetato sobre una matrix de dextrano como reductor se obtuvieron marcajes de ciprofloxacina con ^{99m}Tc , superiores a 95% y con adecuada estabilidad (Kleisner I, 2002).

Utilizando tartrato estanoso en una relación antibiótico/reductor de 4mg/500 μg y 400MBq del radioisótopo e incubada a 60°C, se reportó una deficiente eficiencia de marcaje de 81 \pm 4% la cual mejoró significativamente al ser purificada en columnas C18 obteniéndose rendimientos de pureza superiores a 95%, esta variante encarece la obtención de dicho producto (Siaens RH, 2004).

Ensayos *in vitro* de afinidad de la ^{99m}Tc -ciprofloxacina por bacterias vivas han mostrado que no existen diferencias significativas en cuanto al enlazamiento, entre el radiofármaco preparado utilizando AFS como reductor y calor respecto al producto utilizando $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a temperatura ambiente. Es significativamente disminuida la unión del radiofármaco a los microorganismos cuando se utiliza $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ como reductor y calor (Oh J, 2002). El calentamiento en condiciones muy ácidas provoca cambios en las propiedades biológicas de los antibióticos causados por la formación de sales polares, lo que perjudica considerablemente la unión a bacterias. Cuando se marca en medio neutral y a temperatura ambiente suele mejorar el enlazamiento a bacterias *in vitro* (Hooper DC, 1987). La conservación de la actividad farmacológica marcando a TA está sustentada por reportes recientes, en los que se afirman que a la referida temperatura y con 100 μg del reductor se conserva la afinidad biológica con eficiencia (Sierra JM, 2008). Utilizando tartrato estanoso como reductor, mostró un enlazamiento no específico a Staphilococcus aureus (SA) y Cándida Albicans (CA) de solo el 3% y 6% respectivamente (Siaens RH, 2004).

Un estudio de biodistribución en ratas Sprague-Dawley machos mostró gran acumulación radiactiva en hígado y bazo, la actividad en sangre se mantuvo entre 0,415 y 0,704% de la dosis inyectada a las cuatro horas de dicha inyección, característico de productos del calentamiento para optimizar la reacción, lo que cambia significativamente cuando se procede a marcar a temperatura ambiente (TA), donde la actividad varió entre 0,18 y 0,20%. No obstante, los fármacos incubados a dicha temperatura, presentan mayor acumulación en riñones, lo que requiere de un análisis consensual a la hora de escoger la

técnica de radiomarcaje (Oh J, 2002). En general el producto ^{99m}Tc -ciprofloxacina obtenido por diferentes métodos y no purificadas arrojarán diferentes patrones de biodistribución, debido a los productos de la desintegración molecular de la quinolona. Pero una vez purificados; los resultados son similares, la actividad renal aumentada sugiere que es la principal vía de eliminación. Como un resultado significativo se ha reportado que los productos de la descomposición de la molécula durante el proceso de preparación, son los que pueden causar las altas acumulaciones en hígado, el bazo y los riñones.

La biodistribución y la dosimetría interna en humanos del antibiótico radiomarcado con ^{99m}Tc según el método del AFS incubando a 100°C y purificado, manifiesta una rápida excreción urinaria con baja acumulación en pulmones, médula ósea, cerebro e hígado con baja excreción a través de este órgano. Aproximadamente el 60% de la dosis inyectada es recobrada en la orina a las 24 horas de comenzado el estudio. Los tiempos de residencia son marcadamente mayores en intestino delgado, intestino grueso, vejiga e hígado en casi todos los sujetos estudiados. La mayor dosis absorbida es recibida por la vejiga, la tiroides, intestinos delgado y grueso, así como en el útero, resultados acordes con los tiempos de residencia. La biodistribución y la dosimetría son adecuadas para su utilización en estudios tomográficos en busca de lesiones profundas [Winter F de, 2001 ⁽¹⁾]. A pesar de que se han ejecutado muchos estudios clínicos en el campo del diagnóstico gammagráfico con ^{99m}Tc -ciprofloxacina (2mg/paciente), no han sido reportados eventos adversos.

^{18}F -Ciprofloxacina: Este radiofármaco ha sido evaluado recientemente tanto en experimentos *in vitro* con EC, como *in vivo* en pacientes con infecciones de tejidos blandos de las extremidades inferiores. Las acumulaciones en los islotes de bacterias *in vitro* son rápidas siendo, similar en islotes sensibles al antibiótico que a los resistentes. En los estudios *in vivo* se constató que la acumulación del radiofármaco se aprecia incrementada inmediatamente después de la inyección, dicha acumulación desaparece a medida que va pasando el tiempo, lo que sugiere que la penetración inicial sigue la ruta de la permeabilidad vascular y no por afinidad a los microorganismos ([Langer O, 2005](#)).

^{99m}Tc-Enrofloxacin: Se ha demostrado que se logra un porcentaje de radiomarcaje similar al de la ^{99m}Tc-ciprofloxacina (>90%), presentan una estabilidad similar en suero humano y en soluciones con exceso de cisteínas. La biodistribución muestra que se acumula selectivamente en la lesión infectada una hora después de inyectada y que no existen diferencias significativas en cuanto a su acumulación en los sitios inflamados respecto a la ^{99m}Tc-ciprofloxacina, pero desarrolla una acumulación mayor en tejidos sanos (Siaens RH, 2004).

^{99m}Tc-ceftizoxima (^{99m}Tc-CFT): La ^{99m}Tc-CFT ha sido evaluada recientemente en modelos en animales con ratas a las que se les inoculó una lesión inflamatoria con SA. Los resultados muestran que la acumulación del radiofármaco en las inflamaciones infectadas fueron significativamente mayor que en las lesiones no infectadas (2.4±0.22 vs 1.5±0.05 respectivamente). En modelos de osteomielitis se aprecia altas acumulaciones del radiofármaco en las bacterias por lo que constituye un agente promisorio para la diferenciación entre inflamaciones infectadas de las no infectadas ([Diniz SO](#), 2008).

2.6.11.3 Microesferas de izoniacida marcadas con ^{99m}Tc (^{99m}Tc-INH)

La izoniacida es una droga de primera línea para el tratamiento de la tuberculosis. La optimización del marcaje de las microesferas de izoniacida con ^{99m}Tc, fue realizada probando varias concentraciones de estaño (25-200 µg) y varios valores de pH (5-7.5). Finalmente se optimizó obteniendo 96% de pureza radioquímica con 60 µg del reductor y a un pH de 7.5 ([Samad A](#), 2008). La biocinética muestra un rápido aclaramiento de la sangre y altas acumulaciones en el hígado, intestino, pulmones y riñones. La eficiencia en la terapia antituberculosa es consistente con la acumulación pulmonar ([Samad A](#), 2008). Este radiofármaco tiene como inconveniente que presenta buena afinidad por varios tipos de células tumorales como las células tumorales del Sarcoma 180 ([Yamada N](#), 1987). Este fenómeno compromete la especificidad diagnóstica del radiofármaco en lesiones infecciosas.

2.6.11.4 Ethambutol.

Es un agente anti mycobacterium empleado contra la tuberculosis, su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis del ácido micólico. Ha sido radiomarcado con ^{99m}Tc y probado exitosamente en animales (Dass SS, 2003).

2.6.11.5 Fluconazol.

Inhibe la síntesis del ergosterol; radiomarcado con ^{99m}Tc ha distinguido las infecciones por CA en estudios en ratones (Lupetti A, 2002).

2.7 Estado actual del conocimiento del problema de investigación.

Desde principios de la década de los 90's un grupo de investigadores en nuestro país comenzó a trabajar en la búsqueda de un radiofármaco para el diagnóstico de inflamaciones que pudiera ser diseñado en forma de kit o al menos optimizar una técnica de producción a nivel hospitalario, en aras de facilitar su generalización a todos los servicios de medicina nuclear de Cuba. En tal sentido se dio a conocer la optimización de un kit para el marcaje de IgG policlonal humana con ^{99m}Tc , el cual procuraba marcajes superiores a 95% de pureza, adecuadas relación lesión/fondo y estabilidad de la marca (Hernández A, 1995; Perera A, 1999). Un estudio clínico, dirigido al diagnóstico de infecciones óseas demostró buenos resultados de sensibilidad pero limitada especificidad, resultados similares a los reportados internacionalmente por lo que su aplicación clínica generalizada no progresó y se decidió probar con otras alternativas (Renner HJMJ, 2001; Marrero, 2003). En busca de la opción más asequible para nuestro sistema de salud y que al mismo tiempo fuera un producto con alentadoras cualidades para el diagnóstico de inflamaciones, se decidió diseñar una formulación modificada de ^{99m}Tc -ciprofloxacina como el radiofármaco más prometedor según Britton KE y colaboradores (1997). Así fue como desde 1998 se comenzó a trabajar en la obtención de una formulación de ^{99m}Tc -ciprofloxacina. En el año 2000 se publicaron los primeros resultados basados en la utilización de un método cromatográfico de exclusión molecular para calcular la concentración de radiocoloides presentes (Zayas F, 2000). En este trabajo se reportaron los primeros resultados de radiomarcaje positivos, es decir una pureza superior a 90%.

En el año 2002 el Centro de Investigaciones Clínicas (CIC), conjuntamente con el Centro de Isótopos iniciaron la ejecución de un proyecto ramal financiado por la Agencia de

Energía Nuclear de Cuba (**PRN/1-2/1-2002.CIC**) cuyo objetivo principal era obtener una formulación generalizable que presentaba como novedad la obtención de una formulación de ^{99m}Tc -ciprofloxacina, mediante la aplicación de pequeñas cantidades de SnF_2 como reductor del metal radiactivo. Los primeros resultados fueron alentadores debido a que se obtuvo una pureza del radiofármaco superior a 90% y una estabilidad superior a las cuatro horas. Los estudios de biodistribución confirmaron que el producto era biocinéticamente adecuado, los primeros reportes fueron publicados en el 2005 en la Revista Española de Medicina Nuclear y en la Revista CNIC de Ciencias Biológicas [Hernández A, 2005 ⁽¹⁾ y ⁽²⁾].

Como otra alternativa a explotar, actualmente se está incursionado en el desarrollo de una formulación para obtener ^{99m}Tc -UBI 29-41 y en un ensayo clínico basado en el uso de ^{99m}Tc -UBI-29-41 para el diagnóstico de sepsis músculo-esquelética, dicha investigación clínica se está ejecutando con un radiofármaco comercial, con el objetivo de valorar su eficacia. Los primeros resultados clínicos han sido publicados recientemente en la Revista Española de Medicina Nuclear (Hernández A, 2008).

En el año 2007 se publicó que entre las enfermedades de mayor incidencia en la población cubana se registraron algunas infecciosas graves como son la tuberculosis total, la meningitis meningocócica, SIDA, Meningoencefalitis bacteriana y Streptococo pneumoniae con incidencias que oscilan entre 74 y 754 casos por año (Anuario Estadístico de Salud, MINSAP, Cuba, 2007).

Entre las patologías infecciosas más frecuentes en nuestro país se encuentran las osteoarticulares, las cuales tienen un importante impacto social y económico, dado que constituyen el 4.21% del total de ingresos en los hospitales ortopédicos del país, donde una cama en una sala de cirugía séptica cuesta 28.00\$ diarios con un promedio de estadía de 175 días (Marrero LO, 2006). Debido a la no disposición de la técnica gammagráfica para el diagnóstico temprano actualmente muchos de estos casos son diagnosticados después que se ha producido un daño óseo considerable, con una decalcificación comprendida entre el 30 y el 50%, lo que provoca una complicación, ya que en muchos casos los daños son irreversibles, lo cual provoca que muchos pacientes queden mutilados o con secuelas que limitan sus funciones motoras (Marrero LO, 2006).

Capítulo III. MATERIALES Y METODOS

3.1 Radiomarcajes

3.1.1 Formación del radiocomplejo por vía directa. Formulación 1 (F1)

Solución A: Se tomaron 20 miligramos (mg) de ciprofloxacina deshidratada (Bayer, Alemania), y se disolvieron en 10 mililitros (mL) de solución de cloruro de sodio al 0.9% (NaCl 0.9%) nitrogenada, (Hemoderivados, IMEFA, Cuba).

Solución B: Se pesaron 10 mg de fluoruro de estaño (SnF_2), (SIGMA, Inglaterra) que se disolvieron en 200 microlitros (μL) de ácido clorhídrico (HCL) 0,01 N (Merck, Inglaterra) y se agitaron vigorosamente a temperatura ambiente. Posteriormente en una probeta se ajustó el volumen a 10 mL con agua estéril para inyección, con atmósfera de nitrógeno, quedando una concentración de 1 mg/ml.

Procedimiento: Sólo se varió la masa del reductor y la temperatura de incubación, el resto de los componentes y la metodología se mantuvieron sin variación, es decir se utilizaron 2 mg del antibiótico y 370 megabequerel (MBq) de ^{99m}Tc (Solanki KK, 1993; Lima GET, 2004; Oh SJ, 2002). En un frasco estéril se añadió 1,0 mL de solución A, a esta se añadieron volúmenes entre 0,005 a 0,07 mL (5 a 70 μg) de solución B y una actividad total de 370 MBq de ^{99m}Tc procedente de un generador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (CIS Biointernational, Francia) en un volumen no mayor a 2 ml, el pH se ajustó a 3,3-3,5 utilizando HCL 0,001N y PBS 0,1M (Oh SJ, 2002; Lima GET, 2004). Para cada concentración de reductor se testaron 10 muestras, cinco de ellas se incubaron a temperatura ambiente (TA), por 30 minutos, y las cinco restantes en un baño de agua hirviendo (BAH) durante 10 minutos.

3.1.2 Formación del radiocomplejo por vía indirecta. Formulación 2 (F2).

Síntesis del conjugado (HYNIC) -Ciprofloxacina:

Solución 1: Se pesaron en una balanza analítica (Saltorius, Alemania) 1,30 mg de HYNIC-BOC (SIGMA, Inglaterra). Se disolvieron en 100 µl de dimetilformamida (DMF) (SIGMA, Inglaterra).

Solución 2: Se pesaron 2 mg de o-(7-azabenzotriazolil)-1, 1, 3, 3 tetrametiluronio hexafluorofosfato) (HATU) (MERK, Inglaterra). Se disolvieron en 100µl de DMF (SIGMA, Inglaterra).

Solución 3: Se tomaron 10µl de di-isopropiletilamina. Se disolvieron en 300 µl de DMF (SIGMA, Inglaterra).

Procedimiento para la síntesis del conjugado: En un vial limpio se mezclaron 80 µl de la Solución 1, 50 µl de la Solución 2 y 50 µl de la Solución 3, la mezcla de reacción se dejó reaccionar por 15 minutos a temperatura ambiente. En otro vial se colocó 1 mg de Ciprofloxacina en polvo (Bayer, Alemania) a la cual se le adicionó 5 µl de HCL 0,1N (MERCK, Inglaterra) y después 20 µl de DMF (SIGMA, Inglaterra). A este vial se le agregó 70 µl de la mezcla de reacción. Esta mezcla se dejó reaccionar por 90 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente a esto la reacción se detuvo con la adición de 1 ml de agua.

Se activó una minicolumna Sep-Pak C18 con 5 ml de alcohol etílico, 5 ml de agua y 5 ml de aire y posteriormente se purificó el conjugado a través de dicha columna, se colectaron las fracciones de mayor concentración del conjugado en acetonitrilo al 50% y al 100% las que se mezclaron obteniéndose un volumen total de 3 ml.

La pureza del conjugado se verificó por cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) realizado con un equipo Waters (MA, USA) y el software empleado fue el Millennium dicho equipo contó con detectores de radiactividad y UV-fotodiodo en línea. El método empleado fue YMC ODS-AQ S5 con columnas (5µm, 4.6x250mm). El sistema de gradientes en fase reversa mantuvo un flujo de 1ml/min en las siguientes condiciones:

Se emplearon dos solventes A y B cuya composición fue la siguiente:

Solvente A: agua 100%

Solvente B: acetonitrilo 100%.

El gradiente inicia con 100% del solvente A por un tiempo de tres minutos, cambia al 50% del solvente A por 10 minutos, posteriormente cambia a 30% del solvente A por tres minutos y finalmente regresa a 100% del solvente A por cuatro minutos. Se empleó una longitud de onda de 280nm. La bomba funcionó con una presión menor a 2700 psi. Las muestras fueron disueltas en agua grado inyectable.

Marcaje del conjugado: Para marcar el conjugado con ^{99m}Tc , se pesaron 60 mg de tricina y se disolvieron en 1,5 ml de buffer fosfato 0,2 N a un pH de 4,2. Se empleó una solución recién preparada de cloruro de estaño ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), para la cual se pesaron 10 mg y se disolvió en 10 μl de HCL concentrado, una vez disuelto se enrazó a un volumen final de 10 ml con agua para inyección nitrogenada. Finalmente, se probaron tres formulaciones donde solo se modificó la cantidad de reductor. Para cada una de ellas se tomaron 0,5 ml de Ciprofloxacina-HYNIC (0.25 mg Ciprofloxacina-HYNIC), 1 ml de la solución de tricina (40 mg), 0.5 ml de TcO_4^- y 50, 100 y 150 μl de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y se colocaron en viales a los que se les colocaron retapas (Qu T, 2001; Decristoforo C, 2002; Leslie WD, 2003; Meléndez L, 2003).

3.2 Controles de calidad del radio marcaje

3.2.1 Cromatografía en TLC sílica gel para cálculo de pureza de ^{99m}Tc -ciprofloxacina

Como fase estacionaria se emplearon tiras de 0.5 x 8 cm de papel TLC, estas se dividieron en ocho porciones de 1 cm cada una. Como fase móvil se utilizó una solución compuesta por los solventes diclorometano (CH_2Cl_2), metanol (CH_3OH), hidróxido de amonio (NH_3OH 25 %) y acetonitrilo CH_3CN con una relación molar de (2:2:1:0,5), todos de MERCK (Inglaterra)

Metodología: Se aplicó una muestra de la solución a 1 cm del borde inferior con una micropipeta y se dejó correr el solvente por capilaridad hasta el frente (8 cm). Posteriormente se procedió a secar el papel, se cortaron las ocho porciones, se contó la

radiactividad de cada una en un contador de pozo Nuclear Enterprise (NE SR8, USA), dicho contador fue calibrado centrando el fotopico en 140 keV y con una ventana energética de 20% manteniendo la misma geometría. La condición de parada del conteo se calibró por tiempo (10 segundos).

Rf de radiocoloides, ^{99m}Tc -Ciprofloxacina y ^{99m}Tc libre = 0; 0,7 y 1 respectivamente.

Ecuación:

$$^{99m}\text{Tc-ciprofloxacina} = \frac{\text{cpm fracción 7}}{\text{cpm totales}} \times 100$$

cpm: cuentas por minutos

3.2.2 Cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) fase reversa.

Se realizó empleando la metodología de fase reversa en un equipo Waters, Milford, (MA, USA), con dos detectores en línea, un detector de radiactividad y otro de UV-fotodiodo para medir la absorbancia. El software utilizado fue el Millenium. Se utilizó el método de fase reversa con una columna YMC ODS-AQ S5 (5 μm , 4.6 x 250 mm) y un flujo de 1ml/min usando agua al 100% (solvente A) y acetonitrilo al 100% (solvente B). El gradiente comienza al 100% con A por 3 minutos, cambiando a 50% de A por 10 minutos, posteriormente a 30% de A por 3 minutos y finalmente 100% de A por 4 minutos.

Cálculo de la pureza:

En los radiocromatogramas obtenidos se determinó en cada caso el tiempo de retención y el área bajo los picos para determinar el porcentaje de cada especie radiactiva representada en el gráfico mediante la expresión:

$$\% \text{ de } ^{99m}\text{Tc-ciprofloxacina} = \frac{\text{Área bajo el pico del antibiótico}}{\Sigma \text{Área de todos los picos}} \times 100$$

Se reportaron los valores medios \pm desviación estándar, del porcentaje de pureza

3.3 Evaluación de la estabilidad de la marca

3.3.1 En solución inyectable

Transcurridos 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300 y 1440 minutos, después de radiomarcado el fármaco se realizó el análisis de pureza radioquímica, utilizando los métodos del epígrafe 3.2. El comportamiento de la pureza se valoró calculando los valores medios para cada tiempo y cada método, construyendo gráficos de porcentaje de pureza vs tiempo y calculando si se observaron diferencias significativas entre los valores obtenidos para ambos métodos.

3.3.2 Reto contra cisteína

Se realizaron ensayos de competencia en presencia del aminoácido cisteína (quelatante fuerte) a diferentes concentraciones: 10 μM , 100 μM , 640 μM y 64 mM, con el objetivo de valorar la estabilidad en plasma y tejidos [Hnatowich DJ, 1993 ⁽¹⁾, Siaens RH, 2004]. Se mezclaron 0,33 ml de solución de radiofármaco con 0,67 ml de cada una de las soluciones de cisteína. Las relaciones molares que serán testadas son 1:4, 1:40, 1:300 y 1:30000 respectivamente. Fueron escogidas las dos primeras porque está reportado que la concentración de cisteína libre en los tejidos oscila en un rango entre 10 y 100 μM y en el plasma es aproximadamente 10 μM , lo cual representa una relación 1:4 y 1:40 respectivamente. De esta forma es posible valorar certeramente el rango en que una posible transquelación *in vivo* puede ocurrir. Las otras dos relaciones se seleccionaron de un estudio previo [Aebi S, 1991; Cooper AJL, 1983; Hnatowich DJ, 1993 ⁽²⁾].

El porcentaje de transquelación se determinó por cromatografía en papel ascendente, empleando tiras de papel Whatman No 1, de 1 x 12 cm, como fase móvil PBS 0.1M (pH7.2-7.4)

La ^{99m}Tc -Ciprofloxacina, la ^{99m}Tc -HYNIC-Tricina-Ciprofloxacina y el ^{99m}Tc -Coloide tienen un $R_f=0$ mientras que la ^{99m}Tc -Cisteína y el TcO_4^- libre migran con un $R_f\sim 1$.

3.3.3 En suero humano

Un volumen de 100 μL de ^{99m}Tc -ciprofloxacina o ^{99m}Tc -HYNIC-Tricina-Ciprofloxacina se incubaron a una temperatura de 37°C con un mL de suero humano fresco al 20% (Oh SJ, 2002). La estabilidad radiofarmacéutica fue determinada tomando muestras de 10 μL durante ocho horas y aplicando los métodos de control de calidad descritos en el epígrafe 3.2.

3.4 Comportamiento de la eficiencia de marcaje de F1 y F2 almacenados en congelación durante un período de tiempo

La pureza radioquímica de los fármacos congelados fue estudiada hasta que la misma descendió por debajo de 90%. Para esto se utilizaron los métodos descritos en el epígrafe 3.2.

3.5 Control de esterilidad

Se incubaron $200\mu\text{g}/37\text{MBq}$ de ^{99m}Tc -ciprofloxacina en un volumen de 0,5 ml en medio fluido de tioglicolato para verificar el crecimiento de microorganismos aerobios y anaerobios, dicha incubación se produjo a una temperatura entre $30\text{-}35^\circ\text{C}$ por 7-14 días. El experimento se reprodujo 10 veces según el método descrito en el manual Control de Calidad de Radiofármacos ARCAL XV, 1999.

3.6 Control de pirógenos

Se utilizó el método *in-vivo*, donde se aplicó una dosis proporcional a la que se debe aplicar al humano ($0,14\text{ mCi/kg}$), por vía endovenosa en 16 conejos, 8 para cada formulación. Se tomó la temperatura corporal de los animales por la vía rectal, a los 30, 120 y 180 minutos después de la aplicación, según el método descrito en el manual Control de calidad de Radiofármacos ARCAL XV, 1999.

3.7 Farmacocinética, biodistribución y estimación de la dosimetría interna en humanos.

3.7.1 Farmacocinética y biodistribución en ratas Wistar sanas.

Se estudió en ratas Wistar machos con pesos promedio de $200,00 \pm 2,10$ g, las mediciones se realizaron a los 2, 10, 15, 20, 30, 240, 360, 1440 minutos, después de la inyección endovenosa de una actividad específica de 185 KBq de $^{99m}\text{Tc}/\mu\text{g}$ de ciprofloxacina y una cantidad total antibiótico/actividad de $200 \mu\text{g}/37\text{MBq}$, aproximadamente por cada rata. En cada punto se realizaron extracciones de sangre sin anticoagulante directamente del corazón y se sacrificaron los animales, los órganos extraídos fueron el hígado, el bazo, los riñones, los pulmones, el corazón, los músculos, los intestinos delgado y grueso, el hueso (fémur), las articulaciones de las rodillas, como posibles órganos fuentes, dichos órganos fueron limpiados, desangrados y pesados. Se calculó, el porcentaje de la dosis total por gramos de tejido en cada punto de medición y el porcentaje de eliminación por orina.

A los animales que serán estudiados durante 24 horas se les colectó toda la orina excretada para el cálculo del porcentaje de radiactividad total eliminada por esta vía. Para precisar cuáles especies radiactivas estaban presentes en la orina excretada cuatro horas después de la inyección, se procedió a coleccionar muestras de cinco ratas por cada radiofármaco (F1 y F2), las cuales se purificaron a través de columnas Sep-Pak C18 (Waters Corporation, USA), fase reversa, las que fueron activadas como se indicó en el epígrafe 3.1.2. La purificación de las muestras se realizó con acetonitrilo/agua aplicando primeramente 5 ml de agua, posteriormente 10 ml de acetonitrilo al 20%, después 2 ml de acetonitrilo al 100% y finalmente 2 ml de acetonitrilo al 50%. Durante toda la corrida se coleccionaron muestras de 0,5 ml a las cuales se les midió la radiactividad en cpm, en un contador NE SR8, Inglaterra. Con el objetivo de precisar a qué longitud de onda (ultravioleta) correspondió la mayor absorbancia en los picos de máxima radiactividad, se aplicó un rango de longitudes de onda desde 100 hasta 400 nanómetros (nm), para lo cual se utilizó un espectrofotómetro Ultrospec III, Pharmacia, Suecia.

Los parámetros farmacocinéticos en sangre, se ajustaron a un modelo biexponencial, por el método de regresión no lineal Gauss-Newton (Levenberg y Hartley), empleando el programa Origin V6.0, en concordancia con la ecuación general:

$C(t) = A_1 e^{-\alpha t} + A_2 e^{-\beta t}$ donde, $C(t)$: concentración del fármaco en el plasma en el tiempo t (proporcional a la velocidad de conteos medida), α y β : son las constantes de disposición de las fases del modelo bicompartimental, A_1 y A_2 : Coeficientes, determinados respectivamente por los interceptos de las fases de la función biexponencial.

Para los cálculos de tiempo medios de incorporación ($T_{1/2\alpha}$) y de eliminación ($T_{1/2\beta}$) se utilizaron las expresiones $T_{1/2\alpha} = \ln 2 / \alpha$ y $T_{1/2\beta} = \ln 2 / \beta$ respectivamente (Gibaldi M., 1984; Fernández E, 1988; Khorasheh F, 1999).

Otros parámetros farmacocinéticos que también fueron calculados (Gibaldi M., 1984; Fernández E, 1988):

Concentración máxima:

$$C_o = \sum_{i=1}^n A_i$$

Área bajo la curva desde el tiempo $t = 0$ hasta ∞ según:

$$AUC = \int_0^{\infty} C(t) dt = \int_0^{\infty} \sum_{i=1}^n A_i e^{-\lambda_i t} dt = \sum_{i=1}^n A_i / \lambda_i$$

Volumen de distribución en el estado estacionario:

$$V_{SS} = \frac{A_1 \times \beta^2 + A_2 \times \alpha^2}{(A_1 \times \beta + A_2 \times \alpha)^2} \times D$$

Aclaramiento total:

$$CL = \frac{\text{Dosis}}{AUC}$$

Tiempo medio efectivo (Bernier DR, 1993).

$$1/T_{1/2 \text{ efectivo}} = 1/T_{1/2 \text{ fisico}} + 1/T_{1/2 \text{ biológico}}$$

Para determinar el modelo más apropiado, que describa el comportamiento cinético del radiofármaco en suero se tuvieron en cuenta los criterios de Akaike (Akaike H, 1976), el cual plantea que en la medida que sus coeficientes sean menores mejor será el ajuste del modelo seleccionado a los datos experimentales. Además, se tuvo en cuenta el valor del coeficiente de correlación (r), ya que en la medida en que r^2 se aproxime más a 1, será mayor la relación funcional entre las variables dependientes y la independiente.

3.7.2 Estimación de la biodistribución y la dosimetría interna en humanos

La biodistribución y la dosimetría en humanos fueron calculadas extrapolando los datos obtenidos en la biodistribución en ratas. En este método fueron usados los datos de los órganos del animal reportados como porcentaje de dosis inyectada por gramo (g) de tejido y el peso del cuerpo completo, además se utilizaron los pesos totales de los órganos y del cuerpo completo del humano promedio, el cálculo del %DI en el humano se efectuó mediante la expresión:

$$(\%DI)_{\text{humano}} = \{(\%DI/g)_{\text{animal}} \times (\text{kg CT})_{\text{animal}}\} \times (\text{g órgano/kg CT})_{\text{humano}}$$

Donde kg CT son los valores medios del peso total del cuerpo en kilogramos, tanto del animal como del humano. Mediante el método de extrapolación es posible convertir el porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido en el animal a las mismas unidades en el humano (Kirschner A, 1975).

La actividad en el tiempo de los órganos fuente fue representada por funciones monoexponenciales, aplicando regresión no lineal y el método flexible del polihedro integrándose las curvas obtenidas para obtener las actividades acumulativas y así facilitar el cálculo de los tiempos de residencia en cada órgano, el cual fue necesario para los cálculos dosimétricos.

Cálculo de tiempo de residencia (τ) en cada órgano fuente (Loevinger R, 1988; Stabin MG, 1994 y 2003).

$$\tau = \frac{\tilde{A}}{A_0}$$

(\tilde{A}) Actividad acumulativa

$$\tilde{A}(0, \infty) = \int_0^{\infty} A(t) dt$$

(A_0) Actividad total inyectada

$A(t)$: actividad vs tiempo en el órgano fuente.

La media de la dosis absorbida en miligray por megabecquerels (mGy/MBq) o rad por milicuries (rad/mCi) del cuerpo total y de varios órganos blanco fue calculada teniendo en cuenta los tiempos de residencia y los valores de Snyder (S) el cual representa la dosis promedio que recibe un órgano blanco por unidad de la actividad acumulada en un órgano fuente de acuerdo con la metodología de la Medical Internal Radiation Dosis (MIRD), también se tuvo en cuenta la corrección por decaimiento físico del radionúclido (Loevinger R, 1976 y 1988; Snyder WS 1975 y 1978).

La expresión utilizada para realizar dicho cálculo fue:

$$D = [\tau] \times [S] \times [Wf]$$

Donde Wf es un factor de ponderación, el cual se calcula mediante la expresión:

CT: cuerpo total.

$$Wf = (\text{peso CT/peso órgano})_{\text{humano}} \times (\text{peso tejido/ peso CT})_{\text{animal}}$$

3.8 Ensayos de actividad biológica

3.8.1 In vitro

Bacterias: Los cultivos de bacterias (*Staphilococcus aureus* ATCC 6538) utilizadas para el ensayo in vitro fueron preservados en congelación a -80°C y antes de su utilización

fueron incubadas en baño de agua a 37°C toda la noche, posteriormente fueron lavados con buffer fosfato sódico PBS 0,1 M y pH 7,5 y dispensado a concentraciones de 8×10^{10} Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/ml.

Metodología del ensayo: Se mezclaron 0.1 ml de una solución de Buffer Fosfato de Sodio (PBS) 0,1 M, conteniendo 3 MBq de ^{99m}Tc -ciprofloxacina obtenida de cada uno de los métodos de preparación. Posteriormente fue adicionado 0,8 ml de una solución al 50% v/v de ácido acético al 0.01M en PBS conteniendo aproximadamente 8×10^{10} bacterias SA (ATCC 6538) vivas. Las mezclas fueron incubadas por 5, 30, 240 y 360 minutos a cuatro °C, pasado dicho tiempo las mezclas se centrifugaron a 2000 rpm a 4°C. Los sobrenadantes fueron separados y los pellets de bacterias fueron resuspendidos en un mililitro de PBS frío y recentrifugado. Los sobrenadantes fueron separados nuevamente y se midió la radiactividad en los pellets de bacterias con un contador de pozo NE, SR8 (Inglaterra), con condiciones de medición para ^{99m}Tc , con una ventada de 20% y el fotopico centrado en 140keV, el alto voltaje calibrado en 801 voltios. La relación de radiactividad en las bacterias fue expresada en porcentaje de la radiactividad total de ^{99m}Tc aplicada [Welling MM, 2000 ⁽¹⁾].

3.8.2 *In vivo*

Todos los animales fueron manipulados bajo la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales, de acuerdo a las instrucciones del Internacional Animal Care Comité (ARCA No. 0112/2000). Todos los procesos invasivos se condujeron bajo ligera anestesia de fenobarbital sódico (40 mg/Kg).

Para valorar la actividad biológica *in vivo* se crearon modelos de inflamación estéril e infección en ratas Wistar.

Ensayo de inducción de inflamación estéril: Se utilizó un pool de bacterias Gram negativas (*Klebsiella Neumoniae*, sp) en solución salina en una concentración de 8×10^{10} UFC/ml, dicha solución fue calentada a 100°C por dos horas y posteriormente dispensada en alícuotas de 1 ml en viales estériles, estas soluciones fueron sometidas a varios ciclos de congelación. La verificación de la muerte celular se realizó por cultivos.

Finalmente 0,2 ml de dichas soluciones fueron inyectadas por vía intramuscular en los muslos de las patas traseras izquierdas de 40 ratas Wistar machos con peso promedio de 200g.

Ensayo de inducción de infección: Se utilizaron cepas de microorganismos patógenos de SA ATCC 6538 y EC ATCC 10536. Inmediatamente después de aplicada la inoculación de bacterias muertas a las ratas, a 20 de ellas se les aplicó por vía intramuscular en el muslo de la pata trasera derecha un volumen de 0,2 mL de caldo de cultivo de SA y a las 20 restantes 0,4 mL de caldo de cultivo de EC con una concentración 8×10^{10} unidades formadoras de colonias (UFC) por ml, de ambas bacterias (Kleisner I, 2002). Una vez comprobada la formación el foco séptico por examen físico, 24 horas post inoculación, los animales se dividieron en cuatro grupos de a 10 donde se aplicó una actividad específica de 185 KBq/g tanto de ^{99m}Tc -Ciprofloxacina, como de ^{99m}Tc -Tricina-HYNIC-Ciprofloxacina. Con cada radiofármaco fueron inyectadas diez ratas de cada grupo, aplicándose una dosis de 200 $\mu\text{g}/200\text{g}$. De esta manera, se pudo comprobar si el fármaco conservaba su actividad biológica aun después de radiomarcado por cualquiera de las dos vías. El patrón de conservación de la actividad biológica nos muestra marcada acumulación de radiactividad en la zona infectada y altos valores de relación cpm en la zona infectada vs cpm en la pata contralateral en el tiempo, relación (cpm infección / cpm inflamación estéril).

Metodología de adquisición de imágenes gammagráficas: Fueron realizadas en una cámara gamma Sopa Medical DS7, (Francia) con una matriz de 256 x 256 píxeles, con un colimador de tipo pinhole, el pico centrado en 140keV con una ventana de un 20% y la parada será por la acumulación de 70kc/imagen a los 60, 120, 240, 1080 minutos.

El cálculo de la relación infección / inflamación estéril, se realizó creando zonas de interés sobre cada región anatómica inoculada, en los distintos tiempos de adquisición preestablecido, para obtener los cpm acumulados. Los resultados fueron reflejados en gráficos relacionando los valores de relación cpm infección vs cpm inflamación estéril en los distintos tiempos de medición (Martins PA, 2001).

Para verificar la presencia de bacterias vivas en la infección provocada, los músculos inoculados fueron extraídos, embebidos en parafina, laminados en secciones de 5 micrometros (μm) y teñidos con hematoxilina-eosina. Los cortes fueron examinados mediante un microscopio de luz Zeiss (Ferro G, 2003).

3.9 Toxicología aguda y tolerancia local endovenosa.

Se utilizaron 60 ratones albinos de la raza OF1, 30 de cada sexo y con pesos entre 24 y 30 gramos, todos procedentes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), con su correspondiente certificado de calidad.

Se realizaron estudios de toxicología aguda y tolerancia local endovenosa a las 24 horas y a los 7 y 14 días de la inoculación, se midieron las siguientes variables: signos clínicos, ganancia en peso, reacciones eritematosas y reacción edematosa.

Las dosis utilizadas se seleccionaron teniendo en cuenta que al humano se administran $28,57\mu\text{g}/\text{kg}$ para un estudio diagnóstico con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ciprofloxacina, por lo que extrapolando al peso promedio de los ratones, la dosis serían de $0,56\mu\text{g}/\text{kg}$ (X) y la otra excedía 50 veces la misma; es decir, $28\mu\text{g}/\text{kg}$ (50X). Se utilizó una solución de cloruro de sodio al 0.9% como placebo por ser la solución base del radiofármaco, el cual fue administrado por la vía endovenosa, en un volumen que no excedía los $16,6\mu\text{l}/\text{g}$ de peso corporal. Se utilizaron 20 ratones para la observación de 24 horas, donde se incluyeron cinco de cada sexo en cada nivel de dosis y 40 para la de los 14 días, los que se distribuyeron en cinco de cada sexo para cada nivel de dosis X, 50X e igualmente para Placebo y Sin tratamiento, los cuales fueron incluidos para comparar con los grupos tratados. Todas las inyecciones se administraron en bolo, en las mismas proporciones y en el mismo tiempo que el placebo.

Las condiciones de alojamiento, aclimatación y cuarentena fueron predeterminadas de acuerdo a lo descrito por la guía para el cuidado de animales de laboratorio y para la cuarentena [Procedimiento Normalizativo de Trabajo con Animales del CIEB No. 000 y 011 (PNT/ANI/000 y 011)].

El peso de los animales se encontraba en el entorno recomendado. Se siguió la metodología propuesta para este tipo de ensayo por la guía para el cálculo del peso corporal de los ratones, es decir se cumplió con la condición de que todos los animales debían estar dentro de $\pm 20\%$ del peso promedio (PNT/ANI/009).

Pesada de los animales:

A los animales que correspondían al ensayo de las 24 horas se les realizó una sola pesada para poder dosificarlos de acuerdo al peso corporal. A los ratones de los 14 días se les realizaron tres pesadas separadas por siete días entre una y otra de acuerdo a los procedimientos de laboratorio (PNT/ANI/009). El suministro de agua y comida fue ad libitum y según los PNT establecidos para los mismos (PNT/ANI/005 y PNT/TEC/006).

Administración del medicamento objeto de estudio:

El radiofármaco se administró como dosis única por una vena de la cola (PNT/TEC/014).

Los animales fueron elegidos al azar y enjaulados de acuerdo a las orientaciones internacionales.

Sacrificio de los animales:

Se realizó de la forma que infligiera el menor dolor o malestar posible y siempre sobre la base de las tres ERRES (PNT/ANI/010).

A las 24 horas después de la administración fueron sacrificados los cuatro grupos de cinco animales, los cuales correspondían a las dosis X y 50X y de ambos sexos. El otro sacrificio se realizó a los 14 días de la inoculación (grupos X, 50X, placebo y sin tratamiento).

Observaciones:

Los ratones se observaron varias veces durante el primer día buscando signos clínicos significativos, y antes del sacrificio a las 24 horas; por otra parte se realizó una observación para el ensayo de los 14 días. De los grupos sacrificados a las 24 horas, fueron observadas sus colas momentos antes de la administración, a las seis y a las 24 horas después de ésta y de aparecer algún daño se clasificaba y se registraba en los

modelos correspondientes, según la escala de graduación para las observaciones macroscópicas en el modelo de la vena de la cola del ratón (Anexo 1)

A los grupos que fueron sacrificados a los 14 días (grupos X, 50X, placebo y sin tratamiento), se les observaban las colas diariamente, se clasificaban los daños según los criterios establecidos (Anexo 1) y se anotaron las observaciones en los registros correspondientes al igual que los que se sacrificaron a las 24 horas. Inmediatamente después de la última observación se procedió a ejecutar el sacrificio.

Toma de muestra:

Se tomaron muestras de piel y tejido subcutáneo de la cola en tres secciones, del punto de inoculación y dos alejadas a 1 cm de éste. Las muestras se fijaron en formalina al 10% neutral y buferada para el procesamiento y coloración con hematoxilina y eosina para su posterior examen al microscopio óptico (PNT/TEC/0600 al 0622). Las observaciones histológicas se clasificaron según los criterios de graduación de hallazgos histopatológicos (Anexo 2)

3.10 Análisis de los resultados

Marcaje y estabilidad de la marca: Se utilizó el sistema Excel 2007 sobre Windows, las muestras se reportaron como media y desviación estandar (promedio \pm ds) con un nivel de significación $\alpha=0,05$. Para el análisis de diferencias entre medias se utilizó la prueba t de student, de dos colas.

Ensayo in vitro: Para el análisis de la dependencia de los valores de porcentajes de unión de ^{99m}Tc -ciprofloxacina al pellet de bacterias vivas en el análisis in vitro de actividad biológica (variables dependientes) se utilizó un análisis de varianza de simple entrada (ANOVA).

Modelo animal: La relación de acumulación (cpm área infectada / cpm en área inflamada estéril) se analizó calculando el promedio, desviación estándar y desviación relativa. Comparación de varianzas y medias.

Para todas las pruebas se tomó como significativo un valor de $\alpha \leq 0,05$.

Se utilizaron sistemas manuales y computarizados (SPSS para Windows v10, 0 y Excel 2007).

Biodistribución y farmacocinética: Se estimaron los parámetros que caracterizan el patrón biocinético del producto, los cuales influyen directamente en la calidad del estudio gammagráfico y en la magnitud de la dosis de radiación depositada en el cuerpo. Siempre que fue posible se realizaron comparaciones con resultados de reportes anteriores mediante una prueba de comparación de medias (t-student) con un nivel de significación de $\alpha=0,05$. Se utilizaron los software MIRD dosis, Origin v6.0 edición profesional y Excel 2007.

Toxicología aguda y la tolerancia local endovenosa

Signos clínicos: Se establecieron los resultados de las observaciones clínicas de los animales que fueron sacrificados a las 24 horas y a los 14 días.

Tolerancia local: A las 24 horas y 14 días se evaluó el efecto de irritación producido por la sustancia de ensayo, en sus dos concentraciones, de forma macroscópica y se comparó con las producidas en los animales tomados como control sin tratamiento y los tratados con placebo (NaCl 0.9%) obteniéndose el índice de irritación. De igual manera se procedió con los resultados obtenidos desde el punto de vista microscópico, de lo cual igualmente se obtuvo el índice de irritación.

Cálculo del peso corporal a las 24 horas: Se procesaron estadísticamente los pesos obtenidos para los animales al inicio del ensayo, que se habían tomado para calcular la dosis exacta de acuerdo a este, se calculó la media y la desviación estándar.

Cálculo del peso corporal a los 14 días: Para este ensayo se tomaron tres pesadas, al inicio a los 7 y a los 14 días. Los pesos corporales de los ratones fueron contrastados estadísticamente utilizando un análisis de varianza y la posterior aplicación de una prueba de Student Newman Keuls ($p=0.05$) (Hayes W, 1989).

Histopatología: A las 24 horas y 14 días se revisaron los órganos internos de los animales que se sometieron a este ensayo, corazón, pulmones, riñones, estómago, bazo y cerebro.

Tolerancia local:

Ensayos macroscópicos y microscópicos: Las colas se sometieron a estudios histopatológicos, y se determinó tanto para las diferentes concentraciones de radiofármaco como para el placebo y las colas sin tratamiento. El índice de irritación de las mismas se calculó sumando los resultados presentados por los animales según los factores asignados, dividiéndolos por el número de animales totales, para obtener así un promedio por grupo de ensayo.

Capítulo IV. RESULTADOS

4.1 Radiomarcajes

4.1.1 Radiomarcaje por vía directa, formulación 1 (F1)

En la tabla I se puede apreciar que los valores de pureza superiores se pudieron alcanzar utilizando 20 μ g de SnF₂ tanto cuando se incubó a 100 °C (97,20 \pm 0,94 %) como a TA (92,13 \pm 1,06 %), utilizando 100 °C, se obtuvo una pureza significativamente superior ($p < 0,05$), estos hallazgos concuerdan con los rendimientos logrados hasta el momento con otros reductores, pero utilizando entre 100 y 400 μ g de SnCl₂.2H₂O, AFS y polímeros redox (Kleisner I, 2002; Lima JET, 2004; Oh SJ, 2002; Solanki KK, 1993).

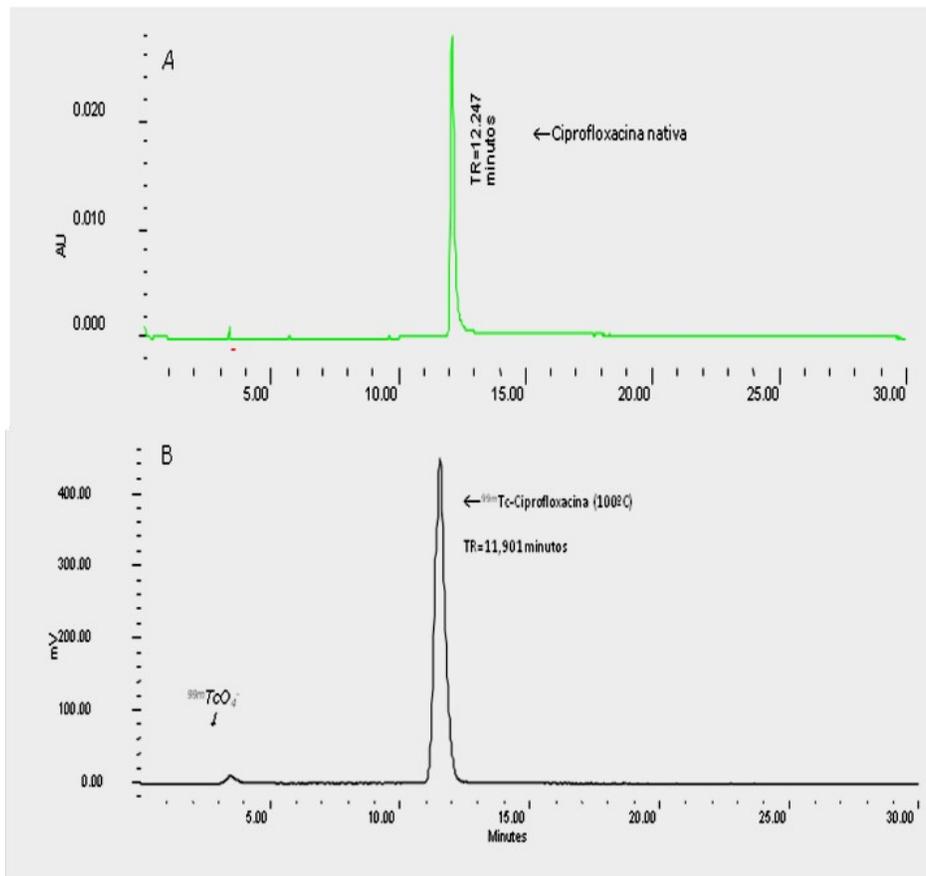


Figura 2. Cromatogramas en HPLC fase reversa de la formulación sin marcar (A) y ^{99m}Tc -Ciprofloxacina obtenida según F1 a 100°C (B).

4.1.2 Radiomarcaje por vía indirecta, formulación 2 (F2).

La mayor pureza radioquímica obtenida al utilizar la vía indirecta se obtuvo con 100µg del reductor SnCl₂.2H₂O, dicho rendimiento cumple con las normas de calidad establecidas (>90%), lo cual se muestra en la tabla II. Esta constituye una novedosa estrategia de marcaje del antibiótico, sustentada por la introducción de un quelatante bifuncional, donde el radionúclido sería enlazado indirectamente a la molécula.

Tabla II. Radiomarcaje del conjugado HYNIC-ciprofloxacina con ^{99m}Tc. Pureza radioquímica dependiente de la masa del reductor, expresado en % promedio ± ds (n=20).

Cantidades de SnCl ₂ . 2H ₂ O (µg)	^{99m} Tc-Tricina-HYNIC-Ciprofloxacina	TcO ₄ ⁻ sin reaccionar	Coloides
50	89,20±1,30	7,20±1,06	3,60±1,25
100	94,67±1,77	4,33±0,34	1,00±0,89
150	92,08±1,63	1,92±0,98	6,01±1,75

Las diferencias entre los valores promedio se calculó mediante la prueba t de student con un nivel de significación de $\alpha < 0,05$.

En correspondencia a los resultados obtenidos en el marcaje indirecto, ilustrados en la tabla II, la óptima formulación 2 (F2) corresponde a:

Componente----- Masa (mg)

HYNIC-Ciprofloxacina----- 0.25

Cloruro estanoso (SnCl₂)----- 0.1

N-tris (hidroximetil) metilglicina (Tricina)----- 40.0

Cloruro de Sodio 0.9% (NaCl 0.9%)----- 5.00

En la figura 3B se observa el cromatograma obtenido de la solución del conjugado donde se puede apreciar un pico único que representa el radio conjugado ^{99m}Tc -Tricina-HYNIC-Ciprofloxacina con 12 minutos de tiempo de retención.

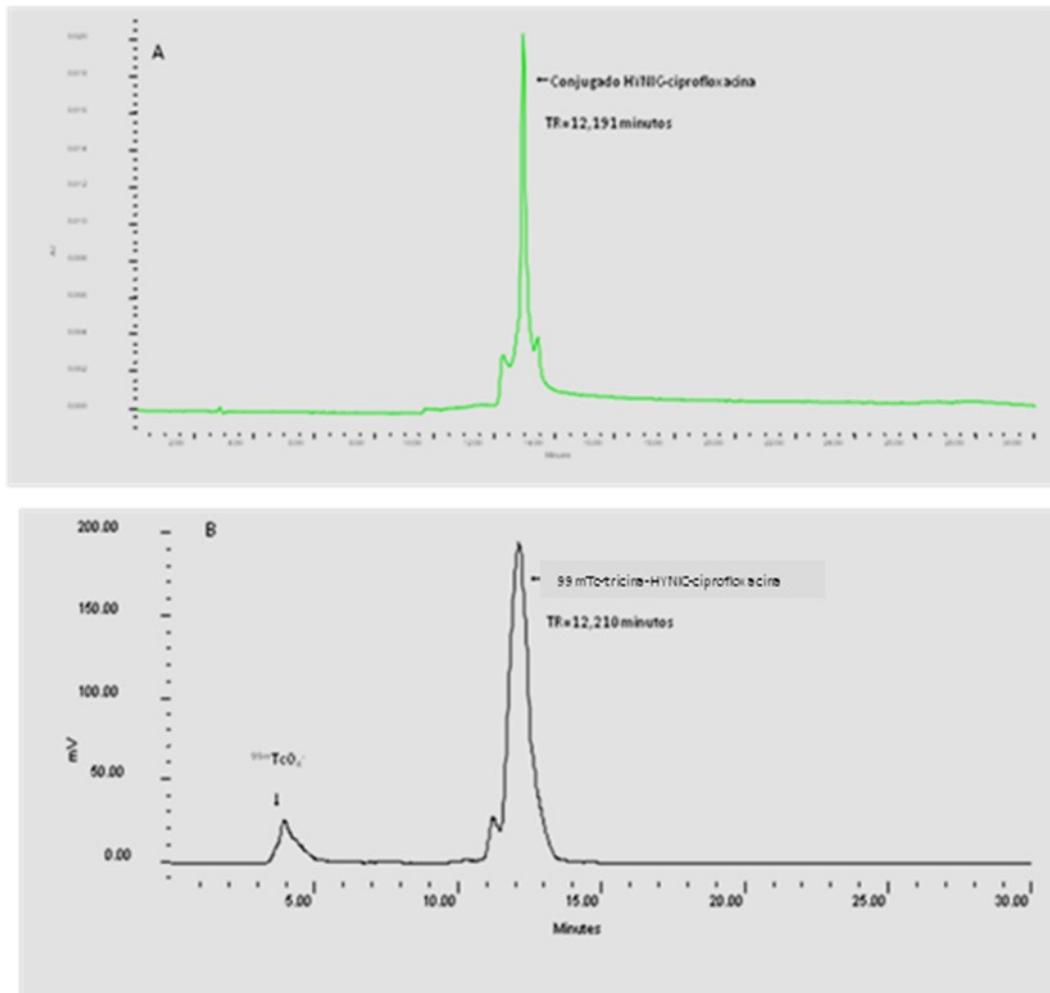


Figura 3. Cromatograma en HPLC fase reversa del conjugado HYNIC-ciprofloxacina frío (A) y del complejo ^{99m}Tc -Tricina-HYNIC-Ciprofloxacina (B).

4.2 Evaluación de la estabilidad del radiomarcaje

4.2.1 En solución inyectable

Al estudiar la estabilidad de ambas formulaciones en la solución inyectable, como se muestra en la figura 4, se pudo confirmar que pasadas 5 horas F1 mantuvo un porcentaje de disociación significativamente superior a F2, siendo de $3,16 \pm 0,29$ % y de $2,53 \pm 0,40$ %, respectivamente a las seis horas, ya pasado este tiempo se pudo apreciar un aumento del deterioro ambos complejos y la diferencia en cuanto a esto aumentó considerablemente con una mayor disociación de F1 ($p < 0,05$ todo el tiempo).

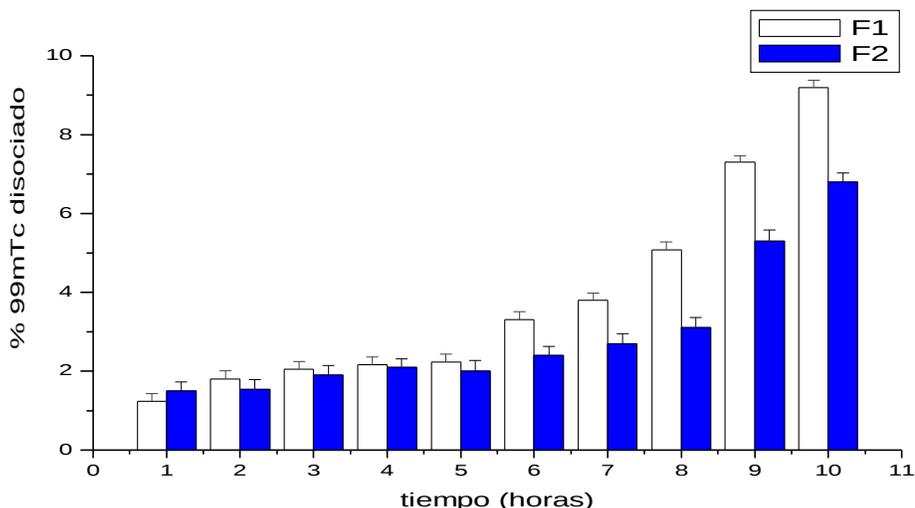


Figura 4. Evaluación de la estabilidad del radiomarcaje de F1 y F2 en solución inyectable durante 10 horas ($n=20$).

4.2.2 Reto contra cisteína

Durante las cinco horas posteriores a la administración del radiofármaco F1, este puede sufrir una pérdida de marcaje por disociación del radiocomplejo entre $4,01 \pm 0,70$ y $22,40 \pm 0,54$ %, en suero y líquidos intersticiales mientras que F2 se disociará entre $3,77 \pm 0,04$ y $8,20 \pm 0,44$ %, tal como se describe en la tabla III. Es evidente que F2 mantiene una mayor estabilidad, en todos los puntos la mayor estabilidad de F2 está caracterizada

por una significativa diferencia entre valores medios de porcentajes de disociación, respecto a F1 ($p < 0,05$ t-student).

Tabla III. Evaluación de la estabilidad del marcaje de F1 y F2 en soluciones de cisteína (quelatante fuerte) a diferentes concentraciones, expresados en promedio de porcentaje de disociación $\pm ds$ (n=20).

Concentración de cisteína	64 mM		0.64 mM		0.1 mM		0,01mM	
Formulaciones	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2
1 hora	59,60 \pm 2,07	54,40 \pm 3,20	27,40 \pm 2,70	17,01 \pm 0,71	10,38 \pm 0,90	8,06 \pm 0,09	4,01 \pm 0,70	3,80 \pm 1,09
3 horas	78,40 \pm 0,89	61,40 \pm 0,89	29,01 \pm 0,70	17,46 \pm 3,74	10,60 \pm 0,54	7,36 \pm 0,45	9,18 \pm 0,46	3,77 \pm 0,04
5 horas	90,20 \pm 0,44	66,80 \pm 1,09	33,60 \pm 1,51	18,60 \pm 0,23	22,40 \pm 0,54	8,20 \pm 0,44	10,60 \pm 0,54	4,26 \pm 0,15

Las diferencias entre los valores promedio se calculó mediante la prueba t de student con un nivel de significación de $\alpha < 0,05$.

4.2.3 En suero humano

Ambas formulaciones mantienen una pureza superior a 90% en suero humano a 37 °C durante las cinco horas de estudio, no obstante se aprecia una estabilidad significativamente superior para F2 en todos los puntos de medición ($p < 0,05$), constatado estadísticamente a través de un test de diferencias entre medias, mostrándose en la figura 5.

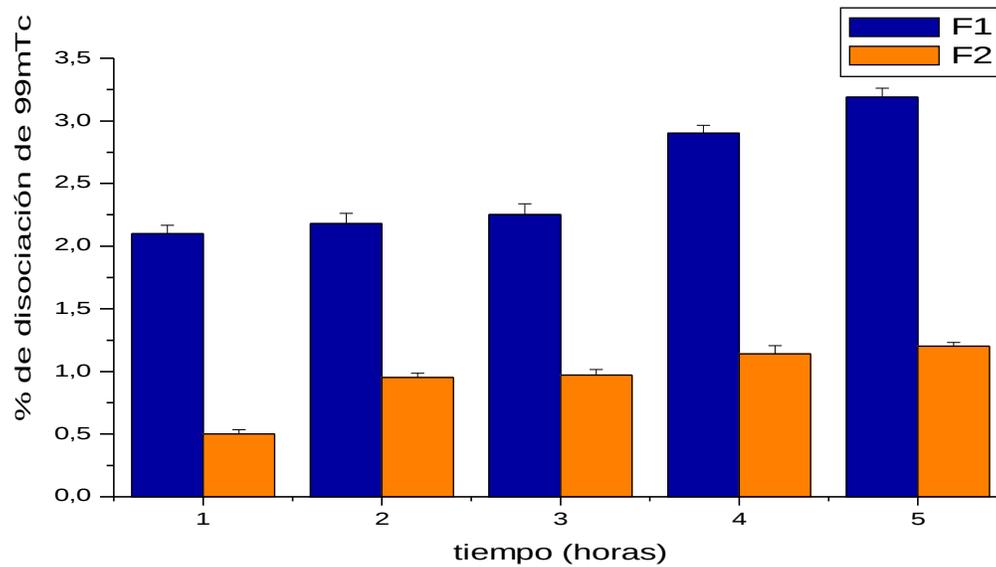


Figura 5. Evaluación de la estabilidad del radiomarcaje de F1 y F2 en suero humano (n=20).

4.3 Comportamiento de la eficiencia de marcate de F1 y F2 almacenados en congelación durante un período de tiempo

La figura 6 denota que los marcajes de los kits almacenados a temperatura de -20°C rindieron purzas radioquímicas superiores a 90% por un tiempo de 5 semanas.

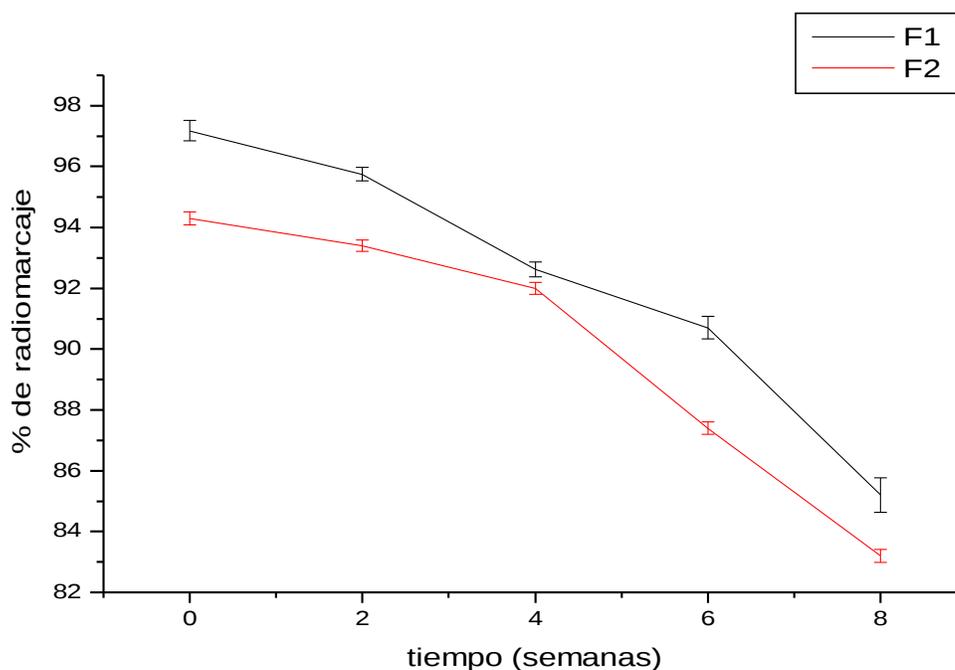


Figura 6. Estabilidad de los juegos de reactivos F1 y F2 almacenados en congelación (n=20).

4.4 Control microbiológico

Se pudo constatar que se emplearon buenas prácticas radiofarmacéuticas en lo referente a la seguridad biológica ya que en los medios de cultivo no se observaron crecimientos de bacterias, ni a los 7, ni a los 14 días en ninguno de los experimentos realizados (n=20)

4.5 Control de pirógenos

En el estudio de pirógenos no se detectaron aumentos de la temperatura corporal en ninguno de los animales estudiados, ni a los 30, 120 ni a los 180 minutos después de las aplicaciones (n=20).

4.6 Biodistribución y farmacocinética en ratas sanas

4.6.1 Biodistribución

Después de la inyección de una cantidad total de F1 y F2 (masa antibiótico/actividad de 200µg/37MBq) aproximadamente (37 MBq/rata) fue observada la biodistribución de radiactividad en los órganos a diferentes tiempos. En la tabla IV se observa que los mayores porcentajes de acumulación coinciden en el hígado y los riñones durante todo el tiempo de estudio, tanto para F1 como para F2. La acumulación de F2 en los órganos blancos mencionados fue significativamente mayor ($p < 0,05$).

Tabla IV. Tabla que representa la biodistribución de F1y F2 por órgano en ratas Wistar durante 24 horas, expresada en porcentaje promedio de la dosis inyectada por gramo de tejido (%DI/g) (n=5 por cada punto de medición).

Las diferencias entre los valores promedio de acumulación de cada radiofármaco, en cada órganos, se calculó

Organo		2 min	10min	15 min	20 min	30 min	1h	4 h	6h	24h
Hígado	F1	0,63±0,13	1,30±0,12	1,75±0,21	0,74±0,09	0,56±0,01	0,29±0,05	0,26±0,07	0,20±0,09	0,090±0,004
	F2	0,66±0,12	1,37±0,10	1,85±0,09	0,78±0,02	0,59±0,02	0,30±0,01	0,27±0,09	0,21±0,07	0,087±0,006
Bazo	F1	13,13±0,92	0,26±0,11	0,24±0,08	0,070±0,001	0,12±0,01	0,77±0,09	0,070±0,001	0,040±0,002	0,050±0,002
	F2	14,44±0,86	0,28±0,12	0,26±0,07	0,080±0,001	0,130±0,001	0,84±0,01	0,080±0,007	0,040±0,006	0,050±0,008
Riñones	F1	4,38±0,61	14,19±1,10	7,99±0,97	5,29±0,25	6,66±0,02	9,28±0,10	7,07±0,69	5,11±0,41	2,39±0,83
	F2	4,81±0,74	15,60±1,07	8,78±0,20	5,81±0,12	7,32±0,07	10,20±0,14	7,77±0,70	5,62±0,35	2,620±0,076
Pulmón	F1	0,94±0,07	0,68±0,06	0,39±0,07	0,13±0,02	0,24±0,03	0,36±0,02	0,090±0,002	0,040±0,002	0,0030±0,0001
	F2	0,96±0,10	0,70±0,09	0,43±0,10	0,13±0,01	0,25±0,07	0,37±0,06	0,090±0,004	0,040±0,005	0,03±0,08
Corazón	F1	11,82±0,30	0,38±0,12	0,16±0,03	0,07±0,01	0,12±0,02	0,13±0,02	0,030±0,001	0,020±0,001	0,010±0,001
	F2	12,41±0,22	0,40±0,14	0,17±0,06	0,070±0,001	0,13±0,04	0,14±0,06	0,030±0,002	0,020±0,003	0,010±0,005
Músculo	F1	11,77±1,38	0,13±0,03	0,076±0,011	0,03±0,01	0,05±0,01	0,06±0,01	0,010±0,001	0,010±0,001	0,010±0,005
	F2	11,54±1,05	0,12±0,09	0,074±0,070	0,029±0,001	0,049±0,002	0,058±0,003	0,010±0,001	0,010±0,001	0,010±0,001
Intestín o Delgado	F1	0,0001±0,0001	0,0005±0,0001	0,0013±0,0001	0,08±0,01	0,10±0,01	1,01±0,01	0,26±0,03	0,11±0,05	0,0080±0,0002
	F2	0,00001±0,00001	0,000049±0,000003	0,00012±0,00002	0,078±0,003	0,098±0,001	1,00±0,01	0,25±0,07	0,11±0,07	0,008±0,001
Intestín o Grueso	F1	0,00010±0,00010	0,0002±0,0001	0,0011±0,0001	0,03±0,01	0,091±0,002	2,03±0,01	3,68±0,02	1,45±0,02	0,020±0,001
	F2	0,00010±0,00013	0,0002±0,0001	0,0010±0,0001	0,029±0,001	0,090±0,001	2,00±0,04	3,60±0,09	1,42±0,01	0,020±0,001
Fémur	F1	0,18±0,03	0,35±0,11	0,20±0,02	0,16±0,07	0,12±0,03	0,24±0,02	0,070±0,002	0,050±0,002	0,08±0,01
	F2	0,17±0,07	0,33±0,10	0,19 ± 0,13	0,15±0,02	0,10±0,03	0,22±0,09	0,066±0,007	0,047±0,051	0,076±0,010
Rodilla	F1	0,26±0,07	0,55±0,09	0,21±0,02	0,11±0,04	0,18±0,02	0,18±0,04	0,060±0,004	0,030±0,001	0,050±0,002
	F2	0,24±0,08	0,52±0,07	0,19±0,01	0,10±0,01	0,17±0,04	0,17±0,06	0,057±0,002	0,030±0,003	0,040±0,003

mediante la prueba t de student con un nivel de significación de $\alpha < 0,05$.

4.6.2 Farmacocinética

En las figuras 7 y 8 se puede apreciar que la cinética en sangre de F1 y F2 respectivamente, donde se constata una rápida fase de distribución para ambos radiofármacos, así como una fase de eliminación rápida para F1 pero para F2 está decrece con cierta lentitud (Tabla V), con bajos niveles de concentración, durante aproximadamente 16 horas. Teniendo en cuenta esto, se puede inferir que ello favorece la adquisición de la imagen rápidamente, sin exceso de radiactividad que pudiera empobrecer la calidad de la gammagrafía. Estos resultados permiten asegurar que será posible la realización de estudios en un tiempo relativamente corto con ambos radiofármacos, pues se garantiza una mejoría en la relación lesión/fondo y una rápida biodistribución.

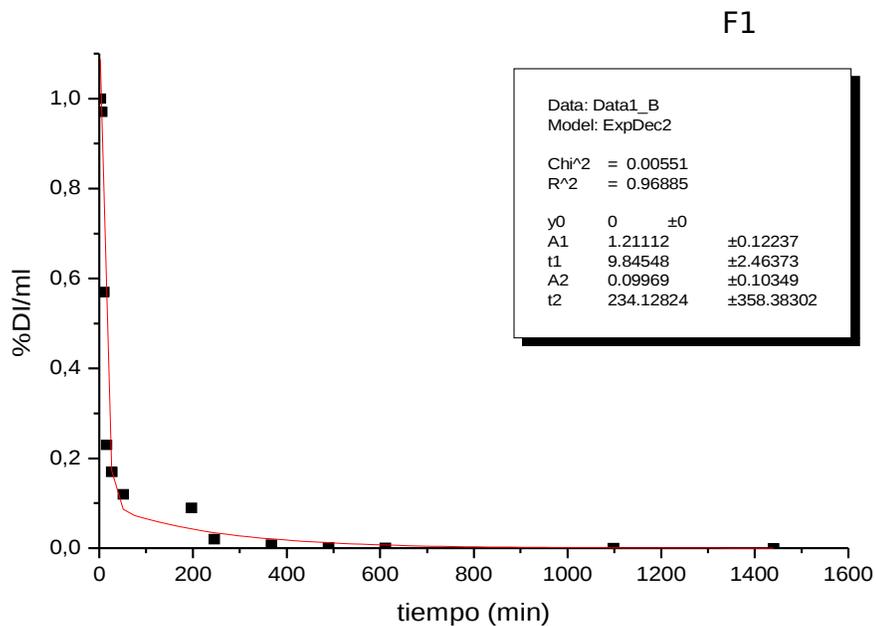


Figura 7. Farmacocinética de F1 en sangre (n=5).

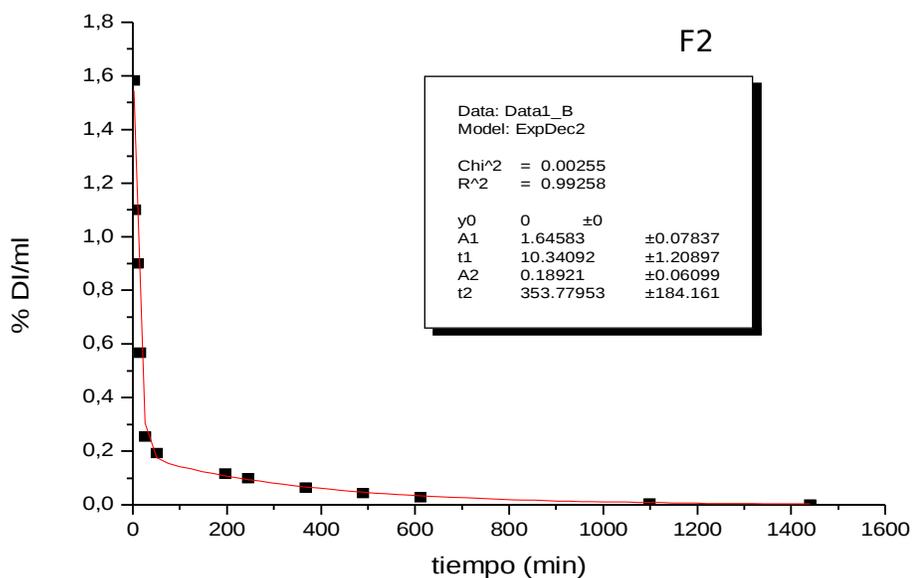


Figura 8. Cinética de F2 en sangre (n=5).

En la tabla V, es posible constatar que la principal ruta de eliminación de ambos radiofármacos es la renal, por la cual se desecha un $42,19 \pm 0,44$ de F1 y un $41,010 \pm 0,0470\%$ de F2, durante seis horas, F1 presentó un porcentaje de eliminación por esta vía, significativamente superior a F2 ($p=0,003$). Estos porcentajes son marcadamente superiores, a los del fármaco nativo, el cual es de 75% en 24 horas (Diccionario de Especialidades Farmacéutica, 1995). En la figura 9 se ilustran dos radiocromatogramas de muestras de orina excretada a la cinco horas de la inyección de 2 de las ratas objeto de estudio, donde se puede apreciar que entre los compuesto radiactivos el antibiótico radiomarcado presenta un porcentaje significativamente mayor en lo que probablemente influyan también, sus cuatro metabolitos. Se calcularon los porcentajes de cada una de las especies presentes en la orina de cinco ratas para cada radiofármaco, los cuales se representan en la tabla VI. Los resultados de Co, Cl, (Vss), y T1/2E, todos fueron significativamente superiores para F2 ($p<0,05$). El T1/2E calculado para ambos productos es adecuado ya que es un valor inferior tanto del T1/2F del radionúclido como del T1/2B

de las moléculas en cuestión; además presentan tiempos óptimos para la realización del estudio imagenológico en la cámara gamma (Britton KE, 1997).

Tabla V. Representativa de la comparación entre los resultados de todos los parámetros farmacocinéticos calculados para F1 y F2.

Parámetros medidos	Valores medios \pm SD		Probabilidad asociada con <i>t</i> de student
	F1	F2	
Co(%DI/ml)	1,301 \pm 0,007	1,830 \pm 0,007	2,87237E-14
AUC (%DI/ml/h)	51,47 \pm 0,13	124,38 \pm 0,03	5,19649E-13
Vss (ml)	166, 40 \pm 0,89	128,01 \pm 0,70	3,41967E-12
CL (ml/h)	0,430 \pm 0,009	0,280 \pm 0,009	4,39945E-09
T1/2 α (h)	0,1601 \pm 0,0005	0,1701 \pm 0,0007	5,10508E-09
T1/2 β (h)	3,9001 \pm 0,0071	5,8801 \pm 0,0007	4,15E-14
Excreción urinaria (% DI/6 h)	42,19 \pm 0,44	41,010 \pm 0,047	0,003
T1/2 E (h)	2,440 \pm 0,007	3,07 \pm 0,12	0,00027

Las diferencias entre los valores promedio se calculó mediante la prueba *t* de student con un nivel de significación de $\alpha < 0,05$.

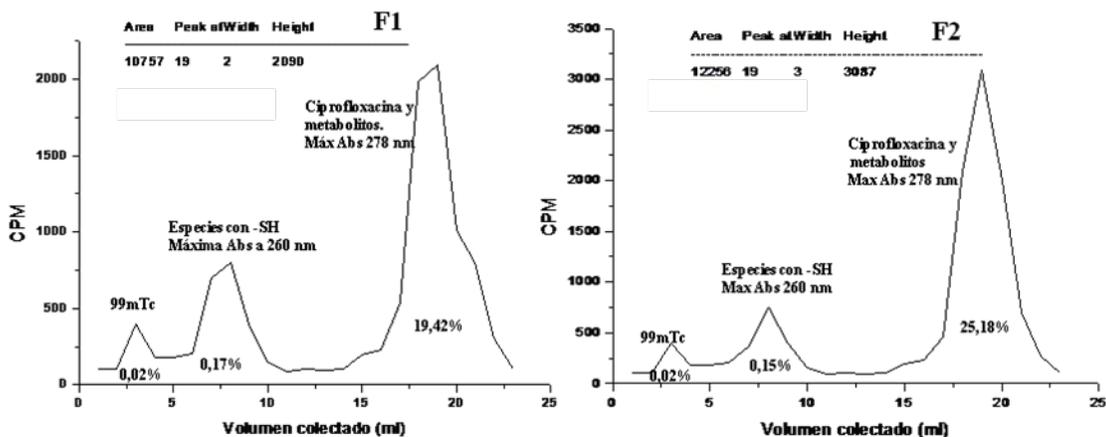


Figura 9. Radiocromatogramas en Sep-Pak C18, de orina excretada a las 4 horas de la inyección de F1 y F2 a dos ratas Wistar sanas, una con cada radiofármaco.

Tabla VI. Comparación entre los porcentajes de las principales especies radiactivas presentes en la orina de las ratas, pasadas 4 horas de la inyección de F1 y F2 (n=5).

	Porcentajes de especies con grupo -SH	Porcentaje de Ciprofloxacina y sus metabolitos	Porcentaje de ^{99m} Tc libre
F1	0,181±0,002	19,1110±0,0007	0,0193±0,0005
F2	0,151±0,004	24,61±0,40	0,0198±0,0008
P	7,52332E-06	5,81037E-06	0,39541092

Las diferencias entre los valores promedio se calculó mediante la prueba t de student con un nivel de significación de $\alpha < 0,05$.

4.6.3 Estimación de la biodistribución en humanos.

En la tabla VII se puede apreciar la preestimación de la biodistribución en humanos tanto para F1 como para F2 durante 24 horas, en la que se puede constatar que los órganos que manifiestan mayor captación de ambos radiocompuestos son los riñones, igualmente se aprecia una acumulación aumentada en hígado, pero inferior a la reportada en un estudio anterior donde se evaluó un producto marcado por vía directa (Winter de F, 2002).

Tabla VII. Estimación de la biodistribución de F1 y F2, en los principales órganos fuente de humanos a partir de los datos obtenidos de la biodistribución en los animales, expresados en promedios del porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido (%DI/g) (n=5).

Las diferencias entre los valores promedio de acumulación de cada radiofármaco, en cada órgano, se calculó

Órgano		2 min	10min	15 min	20 min	30 min	1h	4 h	6h	24h
Hígado	F1	2,701±0,013	5,571±0,012	7,50±0,29	3,17±0,05	2,40±0,04	1,24±0,21	1,55±0,07	1,20±0,09	0,53±0,04
	F2	2,860±0,008	5,901±0,007	7,951±0,002	3,36±0,004	2,541±0,001	1,31±0,07	1,60±0,06	1,27±0,08	0,561±0,007
Bazo	F1	10,50±0,92	0,20±0,11	0,20±0,08	0,05±0,01	0,09±0,01	0,61±0,19	0,05±0,01	0,03±0,02	0,04±0,02
	F2	11,550±0,009	0,22±0,08	0,22±0,07	0,05±0,07	0,10±0,08	0,67±0,04	0,05±0,02	0,03±0,01	0,04±0,01
Riñones	F1	2,62±0,61	8,51±1,10	4,79±0,97	3,17±1,25	3,99±1,20	5,56±0,10	4,24±0,69	3,06±0,41	1,43±0,83
	F2	2,90±0,09	9,36±0,07	5,26±0,10	3,48±0,08	4,381±0,078	6,110±0,009	4,66±0,01	3,360±0,008	1,57±0,08
Pulmón	F1	2,06±0,07	1,49±0,06	0,86±0,07	0,28±0,03	0,52±0,03	0,79±0,02	0,19±0,02	0,08±0,02	0,06±0,01
	F2	2,120±0,009	1,53±0,03	0,88±0,02	0,29±0,05	0,53±0,02	0,81±0,07	0,19±0,01	0,08±0,08	0,06±0,07
Corazón	F1	14,18±0,30	0,45±0,12	0,19±0,03	0,08±0,03	0,14±0,02	0,15±0,02	0,03±0,01	0,02±0,01	0,01±0,01
	F2	15,00±0,07	0,47±0,07	0,20±0,05	0,08±0,02	0,15±0,04	0,16±0,03	0,03±0,01	0,02±0,01	0,01±0,07

mediante la prueba t de student con un nivel de significación de $\alpha < 0,05$.

4.6.4 Estimación de la dosimetría interna en humanos.

En la tabla VIII se aprecian las dosis de radiación absorbidas en los principales órganos blancos aportadas por la biodistribución de F1 y F2. Es posible apreciar que el hígado y los riñones son los órganos que reciben las mayores dosis de radiación. En el caso de los riñones el valor de la dosis absorbida supera el de los restantes órganos debido a que la vía renal es la principal ruta de eliminación del radiofármaco y sus metabolitos radiactivos. La significativa dosis en el hígado responde al hecho de que en el referido órgano se metabolizan ambos radiocompuestos. Las dosis absorbidas en todos los órganos estudiados, son significativamente superiores para F2 ($p < 0,05$ en todas las comparaciones). No obstante vale destacar que todos los valores son inferiores al mínimo permisible para un estudio de medicina nuclear los cuales deben estar en un rango de 1-10 mSv por órgano (Nuclear Medicine Technology and Techniques, 1997).

Tabla VIII. Tabla que representa una estimación de las dosis absorbidas en algunos órganos blancos en el hombre (n=5).

	τ promedio entre ambos sexos(horas)		Dosis absorbida mGy/MBq valores medios \pm ds		Diferencia entre las dosis adsorbidas.
	F1	F2	F1	F2	Probabilidad asociada con t de student
Hígado	0,19 \pm 0,07	0,20 \pm 0,12	5,76E-03 \pm 8,37E-06	6,30E-03 \pm 4,0E-04	0,032
Bazo	0,019 \pm 0,051	0,02 \pm 0,01	1,98E-03 \pm 8,94E-05	2,17E-03 \pm 4,47E-07	1,17E-14
Riñones	0,48 \pm 0,03	0,52 \pm 0,02	1,16E-02 \pm 4,41E-05	1,27E-02 \pm 1,11E-04	2,11E-16
Pulmón	0,027 \pm 0,150	0,027 \pm 0,020	9,50E-04 \pm 5,48E-05	9,78E-04 \pm 7,07E-05	1,94E-28
Corazón	0,012 \pm 0,080	1,06 \pm 0,10	3,65E-04 \pm 5,05E-05	3,82E-04 \pm 1,34E-02	8,44E-06

Las diferencias entre los valores promedio de dosis absorbidas de cada radiofármaco, en cada órgano blanco, se calculó mediante la prueba t de student con un nivel de significación de $\alpha < 0,05$.

4.7 Ensayos de actividad biológica

4.7.1 *In vitro*

En el estudio *in vitro* de unión a bacterias vivas es posible constatar una insuficiente unión de F2 a los microorganismos patógenos, caracterizado por una diferencia significativa con respecto a F1 en todos los puntos de medición ($p < 0,05$). A las seis horas se evidenció que F2 manifiesta una unión a bacterias significativamente inferior (19,59 \pm 0,01) con respecto a F1 (35,2 \pm 0,008%), como se representa en la figura 10.

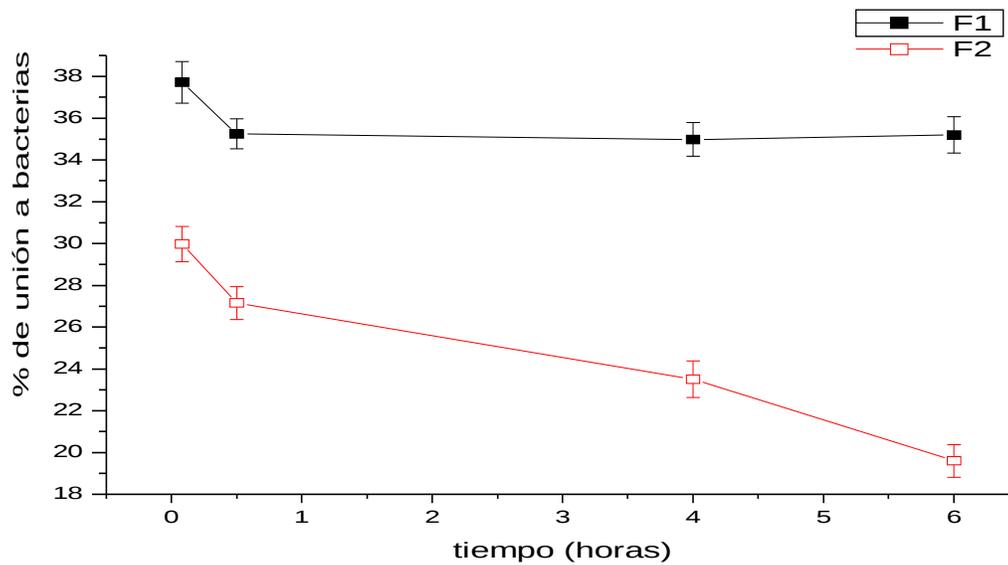


Figura 10. Afinidad de F1 y F2 por bacterias vivas *in vitro* donde se representa en porcentaje de unión a los microorganismos en función del tiempo (n=20).

4.7.2 *In vivo*

En la figura 11 la escala de colores representa la actividad que se detecta en las diferentes regiones. El máximo de radiactividad acumulada corresponde al blanco, luego van en orden descendente el magenta, el rojo, hasta llegar al negro en las zonas donde el porcentaje de captación puede considerarse nulo.

La relación de conteos en el muslo derecho vs región contralateral se muestran en la figura 12. Se tomaron muestras de ambos muslos de todos los animales, independientemente que se observara captación o no en las imágenes gammagráficas y se enviaron al laboratorio de anatomía patológica. En todos los casos se confirmaron las lesiones desde el punto de vista histopatológico. Los resultados están en concordancia con los reportados en la literatura.

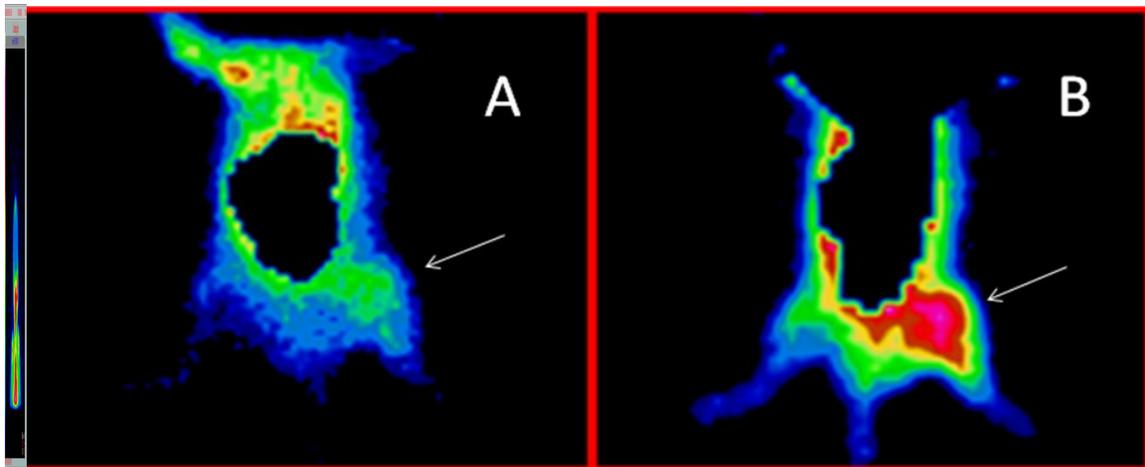


Figura 11. Imágenes gammagráficas representativas de la biodistribución de F1 en ratas, tomadas 24 horas después de la administración del radiofármaco (n=5). A. Modelo de infección con EC. B. Modelo de infección con SA. Las flechas indican la zona donde se inocularon los microorganismos vivos. .

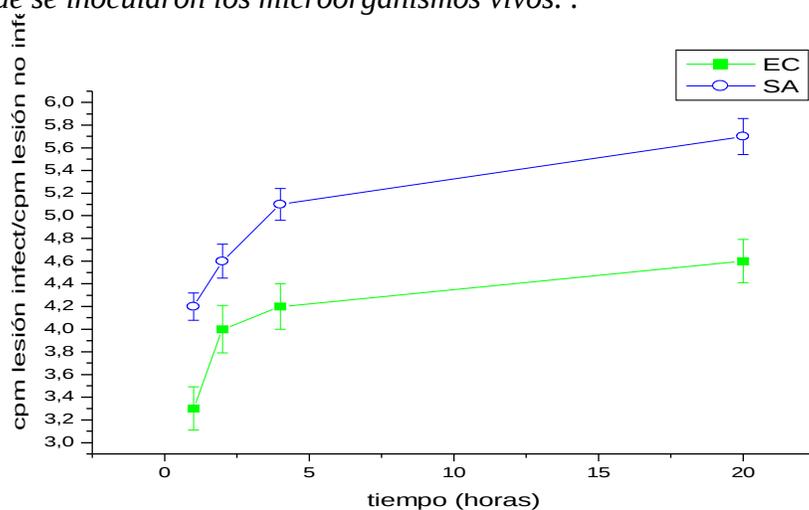


Figura 12. Evaluación de la relación entre las cuentas por minuto (cpm) en la inflamación infectada/cpm en la inflamación no infectada para F1.

En las figuras 13 y 14, se aprecia baja relación lesión/fondo en los modelos de infección con EC y SA analizados con la formulación F2. Este hallazgo coincide con los resultados del ensayo *in vitro* presentados en la figura 9, donde se observó baja afinidad de dicho radiocomplejo por SA. Este resultado indujo a tomar la decisión de continuar la investigación solo con el producto F1.

El examen de fragmentos de músculos infectados evidencia la pérdida parcial de estrías musculares. El edema formado separó las fibras musculares, lo que probablemente facilitó el exudado de los leucocitos polimorfonucleares observados en la muestra. Se observaron signos de necrosis musculares en las áreas de mayor concentración de leucocitos. Los músculos inflamados estériles, mostraron edema, pero en menor proporción que en los infectados. La presencia de leucocitos exudados fue prominente en los músculos infectados; en las lesiones inflamatorias no infectadas no se observó necrosis. Los resultados confirman que los procesos de inflamación e infección fueron exitosamente inducidos en las ratas. La presencia de necrosis muscular evidencia un daño producido por las bacterias inoculadas.

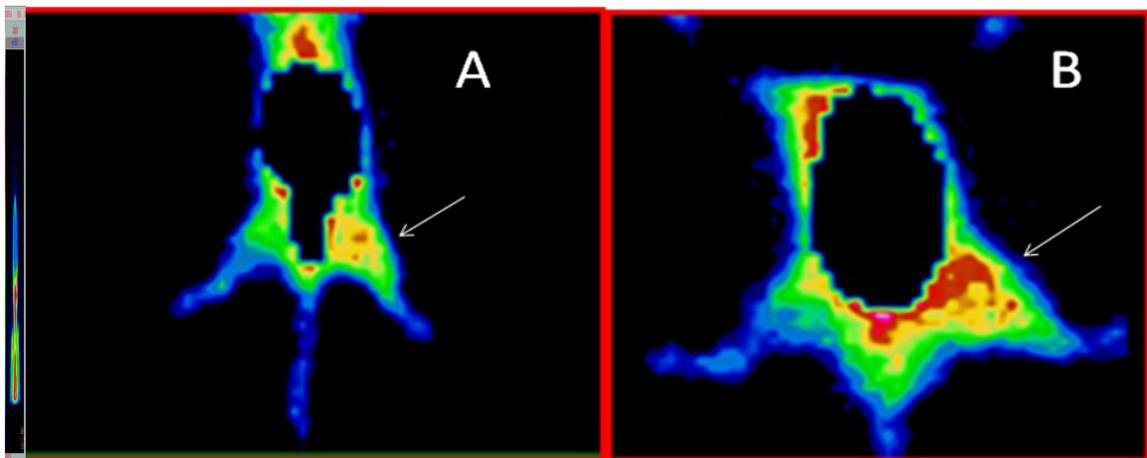


Figura 13. Imágenes gammagráfica representativas de la biodistribución de F2 en ratas, tomadas 24 horas después de la administración del radiofármaco. A. Modelo de infección con EC. B. Modelo de infección con SA. Las flechas indican el área anatómica donde se inocularon las bacterias vivas (n=5).

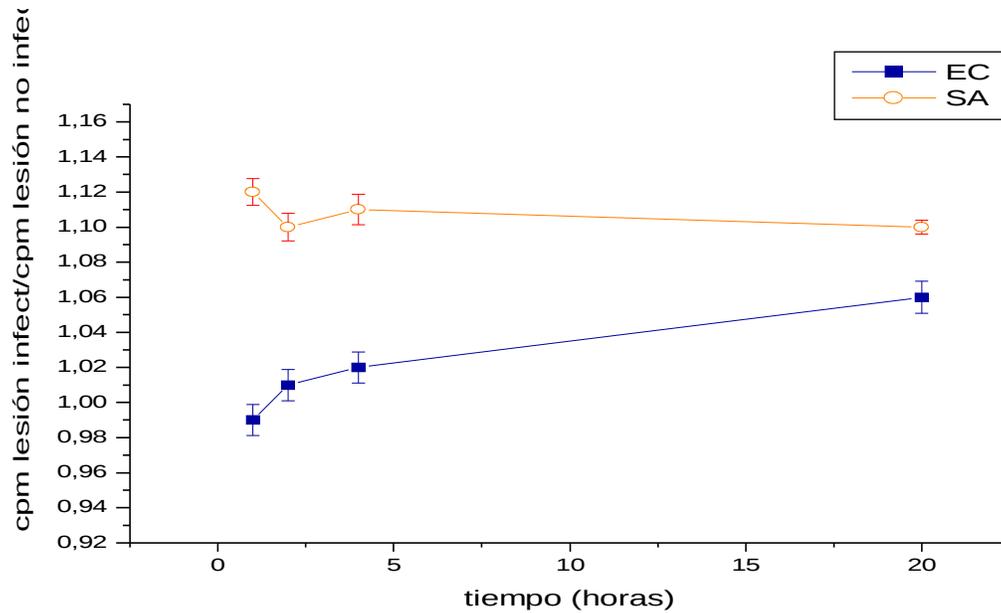


Figura 14. Relación entre las cpm en la lesión infectada/cpm en la lesión no infectada para F2.

4.8 Toxicología aguda y tolerancia local endovenosa

En las tablas IX y X se aprecia que no se presentaron signos clínicos de toxicidad en los animales tratados. Ni a las 24 horas ni a los 14 días. Este resultado sugiere que F1 es seguro desde el punto de vista clínico.

Tabla IX. Observaciones de los signos clínicos durante 24 horas.

Signos Clínicos	Machos (X)		Hembras (X)		Machos (50X)		Hembras (50X)	
	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
Ojos	0	0	0	0	0	0	0	0
Mucosa	0	0	0	0	0	0	0	0
Sistema Respiratorio	0	0	0	0	0	0	0	0
Sistema circulatorio	0	0	0	0	0	0	0	0
Sistema autónomo	0	0	0	0	0	0	0	0
Sistema nervioso central	0	0	0	0	0	0	0	0
Mudanza de pelo	0	0	0	0	0	0	0	0
Temblores	0	0	0	0	0	0	0	0
Convulsiones	0	0	0	0	0	0	0	0
Salivación	0	0	0	0	0	0	0	0
Piel	0	0	0	0	0	0	0	0
Sedación	0	0	0	0	0	0	0	0
Somnolencia	0	0	0	0	0	0	0	0
Muerte	0	0	0	0	0	0	0	0
Otros	0	0	0	0	0	0	0	0

Nota: En el cuadro se anota el número de animales con la afección.

Tabla X. Observación de los signos clínicos durante 14 días.

Signos Clínicos con X, 50X, Placebo, Sin tratamiento	Días													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Ojos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mucosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sistema Respiratorio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sistema circulatorio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sistema autónomo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sistema nervioso central	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mudanza de pelo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Temblores	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Convulsiones	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Salivación	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Piel	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sedación	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Somnolencia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muerte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Otros	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

En el cuadro se anota el número de animales con la afección, según el día que apareció el evento y se indica además el grupo al que pertenecen.

En la tabla XI se puede apreciar que las observaciones macroscópicas del sitio de inoculación y zonas aledañas, no indicaron eritema ni edema, por lo que el índice de irritación fue de 0,0.

Tabla XI. Resultados de la evaluación macroscópica de la cola del ratón después de la inyección.

Grupo	Grado				
	0	1	2	3	4
24 horas					
X (hembras)	0	0	0	0	0
X (machos)	0	0	0	0	0
50X (hembras)	0	0	0	0	0
50X (machos)	0	0	0	0	0
14 días					
Placebo (machos)	0	0	0	0	0
Placebo (hembras)	0	0	0	0	0
Sin tratamiento (machos)	0	0	0	0	0
Sin tratamiento (hembras)	0	0	0	0	0
X (machos)	0	0	0	0	0
X (hembras)	0	0	0	0	0
50X (machos)	0	0	0	0	0
50X (hembras)	0	0	0	0	0

0=Normal, 1=Ligero enrojecimiento, 2= Rojo sin inflamación pero que envuelve del 25 al 100% de la cola, 3= Rojo profundo a púrpura con inflamación discernible, 4= Purpura pronunciado e inflamación.

En el peso de los ratones eliminados a las 24 horas no se apreciaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos, ni entre sexo, lo que sugiere que el radiofármaco no influye en este aspecto, los valores obtenidos son representados en la tabla XII.

Tabla XII. Comportamiento del peso corporal (gramos) de los ratones en el ensayo de tolerancia local endovenosa (24 horas)

Grupo	Peso (gramos)	Grupo	Peso (gramos)
X (machos)		X (hembras)	
1	29,7	1	28,5
2	25,5	2	28,5
3	30,0	3	33,7
4	32,8	4	34,1
5	30,3	5	28,6
promedio ± ds	30,86±4,01 a	promedio ± ds	30,68±2,94 a
50X (machos)		50X (hembras)	
1	29,6	1	30,4
2	25,2	2	33,5
3	29,8	3	33,3
4	32,6	4	34,6
5	30,25	5	31,0
promedio ± ds	29,49±2,68 b	promedio ± ds	33,96±2,33 b

Las diferencias entre los valores promedio de a y b, se calculó mediante la prueba t de student con un nivel de significación de $\alpha < 0,05$.

Prácticamente no se observaron diferencias entre los tratados con el radiofármaco y los controles tratados con solución de NaCl 0,9%. Cuando se emplea ANOVA y la prueba de Student Neuman Keuls ($p < 0,05$). Se puede observar en la tabla XIII que en todos los casos hay ganancia en peso, este hecho no es debido a una incidencia específica del fármaco ya que se observa una homogeneidad en todos los grupos en el tiempo, lo cual se asocia al crecimiento natural de los animales.

Tabla XIII. Variaciones en el peso corporal de los animales de los grupos 50X, Placebo y sin tratamiento, sacrificados a los 14 días de haber sido inoculados con el radiofármaco.

Grupo	1 día	7 días	14 días
-------	-------	--------	---------

50X (machos)	23,80± 0,88	27,80±1,48	30,98±1,29
50X (hembras)	23,45± 1,23	27,62±1,06	31,00±1,34
Placebo (machos)	24,50±1.0	27,30±1,30	29,92±2,39
Placebo (hembras)	24,00±0,97	26,67±1,23	30,00±2,12
Sin tratamiento (machos)	23,68±1,19	26,96±1,65	29,16±1,61
Sin tratamiento (hembras)	24,01±1,23	27,12±1,54	30,01±1,54

Las diferencias entre los valores promedio según sexo, tipo de tratamiento y momento de la observación, se calcularon mediante la prueba t de student con un nivel de significación de $\alpha < 0,05$.

El estudio microscópico de los órganos seleccionados, a las 24 horas y a los 14 días, no mostraron alteraciones, ni en el grupo de las dosis X, ni en el de 50X.

Debe hacerse notar, como se muestra en las tablas XIV y XV, que en los casos donde existió pérdida endotelial sin inflamación ni signos de trombosis la misma era debida al efecto traumático de la inoculación.

Tabla XIV. Resultados microscópicos en el sitio de inoculación del producto (24 horas de observación)

Grupo	Perdida endotelial	Inflamación perivascolar	Trombosis
X (machos)			
1	0	0	0
2	2	2	0
3	0	2	0
4	0	0	0

5	0	3	0
X (hembras)			
1	0	0	0
2	3	2	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	2	0
50X (machos)			
1	0	0	0
2	0	1	0
3	0	1	0
4	2	0	0
5	2	2	1
50X (hembras)			
1	0	0	0
2	1	1	0
3	3	0	0
4	0	2	0
5	2	2	0

Tabla XV. Resultados microscópicos en el sitio de inoculación del radiofármaco (14 días)

Grupo	Pérdida endotelial		Inflamación perivascular		Trombosis	
	machos	hembras	machos	hembras	machos	hembras
50X						
1	0	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	1	0	0	0	0

Sin tratamiento						
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	1	0	0
5	0	0	0	0	0	0
Placebo						
1	0	0	0	0	0	0
2	1	0	1	0	0	0
3	0	0	0	1	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	3	0	0	0

En la tabla XVI se exponen los resultados del estudio de tolerancia local endovenosa, los resultados del análisis histológico mostraron que los índices de irritación local estaban entre 0 y 1, por lo que se puede inferir que existió una buena tolerancia endovenosa de F1.

Tabla XVI. Evaluación del índice de irritación en el ensayo de tolerancia local endovenosa, tanto para el grupo de 24 horas como para el grupo de 14 días.

Grupo	Índice 24 horas	Índice 14 días
X machos	0,60	-
X hembras	0,47	-
50X machos	0,60	0,066

50X hembras	0,73	0,12
Placebo (NaCl 0,9%) machos	-	0,33
Placebo (NaCl 0,9%) hembras	-	0,0
Sin tratamiento (machos)	-	0,0
Sin tratamiento (hembras)	-	0,0

Índice de irritación < 1: El fármaco no causa irritación en el punto de inyección, ni en zonas aledañas.

- no se realizó observación

Capítulo V. DISCUSION

Desde la década de los años 90s en que se introdujo en la práctica clínica la ^{99m}Tc-Ciprofloxacina, para el diagnóstico gammagráfico de procesos infecciosos, el radiofármaco ha tenido gran demanda y su uso se ha ido generalizando en varios países del mundo. Sin embargo, la expectativa de sus creadores, de imponerlo como el radiofármaco de elección para la detección de las mencionadas dolencias ha tenido una discreta aceptación, debido fundamentalmente a su variada biodistribución, la cual está en función de la presencia o no de impurezas en la solución inyectable y esto a su vez depende del método de marcaje utilizado (SJ Oh, 2002). Se ha planteado que su afinidad por bacterias vivas es limitada, por lo que su eficacia diagnóstica, está en discusión (Dumarey N, 2002). Pero teniendo en cuenta que es un fármaco con probada eficiencia en

la terapia, es posible que la insuficiente precisión para el diagnóstico específico de inflamaciones sépticas, que algunos autores plantean (Dumarey N, 2002), se deba igualmente a una baja pureza o a una manifiesta disminución de la actividad biológica causada por el proceso de marcación.

En la presente investigación, se han optimizado dos metodologías para el marcaje de la ciprofloxacina con ^{99m}Tc , en las cuales se aplicaron elementos novedosos, que modifican los métodos ya conocidos. En una de ellas se diseñó la formación de complejos entre los grupos reducidos de la molécula de antibiótico y el ^{99m}Tc , es por ello que se le denominó radiomarcaje directo, donde se utilizó el SnF_2 como reductor, al producto final optimizado se le llamó F1; los rendimientos de marcaje obtenidos, sin purificación previa, son adecuados para su uso, tanto al incubar la reacción en BAH como a TA, los cuales fueron de $97,20 \pm 0,94$ % y $92,13 \pm 1,06$ % respectivamente, estos resultados se ilustran en la tabla I. Esto constituye una experiencia nueva en el radiomarcaje de la ciprofloxacina, ya que nunca antes se había utilizado SnF_2 como reductor del radiometal y más aún teniendo en cuenta que la pureza obtenida está acorde con las reportadas por varios grupos de trabajo que utilizaron entre 100 y 400 μg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, AFS y polímeros redox (Kleisner I, 2002; Lima JET, 2004; Oh SJ, 2002; Solanki KK, 1993). Se constató que cuando se marcó a TA los resultados demostraron una importante cantidad de tecnecio libre, comparado con la obtenida mediante el método de calor, la diferencia es estadísticamente significativa caracterizada por una $p = 2,4857\text{E}-05$, aplicando la prueba t-student, lo que impone determinar que la metodología de incubación a alta temperatura debe ser la de elección. Estos resultados contradicen lo planteado por Lima JET y colaboradores en el 2004, quienes llegaron a la conclusión de que los resultados son similares independientemente de la temperatura de incubación que se utilice, los valores inferiores de pureza encontrados a TA, en el presente trabajo, se explican teniendo en cuenta la baja concentración del reductor (aproximadamente $10 \mu\text{g}/\text{ml}$) y a la disminución de la cinética de la reacción de acomplejamiento a dicha temperatura (Solanki KK, 1993). No obstante, un $92,13 \pm 1,06$ % de rendimiento a TA, no significa un resultado deficiente, puesto que en las normas aprobadas por el Organismo Internacional de la Energía Atómica (OIEA) se exige una pureza superior a 90% para todos los

radiofármacos de uso humano marcados con ^{99m}Tc (OIEA-ARCAL XV 1999: pp. 21). Generalmente cuando se utiliza $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en la formulación la pureza adecuada es alcanzada solo cuando se purifica a través de minicolumnas Sep-pak C18 o Filtros miliporos de $0,2 \mu\text{m}$, con el propósito de eliminar ciertas especies coloidales como son los óxidos e hidróxidos de Sn^{2+} $\{[\text{Sn}_3(\text{OH})_4]^{4+}$, $[\text{Sn}_2(\text{OH})_2]^{2+}$ y $\text{Sn}_2\text{O}^{2+}\}$, compuestos que se forman en soluciones acuosas a pH mayores de 4,5 lo cuales tienden a formar radiocoloides con el ^{99m}Tc [Jones AG, 1982 (1) y (2)] y son fagocitadas por las células reticuloendoteliales [Jones AG, 1982 (2)]. Estos productos; de administrarse sin previa purificación, provocan una biodistribución desfavorable para los estudios gammagráficos ya que se acumulan considerablemente en el hígado, en el bazo y en la médula ósea, lo que a su vez reduce la posibilidad de visualización de lesiones infecciosas en la región abdominal y en columna vertebral. Sería preciso eliminar dichas moléculas de la solución, para obtener imágenes de calidad, pero este procedimiento encarece considerablemente el proceso dado que habría que utilizar una minicolumna Sep-Pak C18 o un filtro miliporos para cada paciente. Afortunadamente el radiomarcaje directo utilizando SnF_2 e incubando a altas temperaturas, propuesto en el presente trabajo, rinde una adecuada pureza sin previa purificación, lo que redonda en un proceso más económico y eficiente.

Los valores de pureza radiofarmacéutica obtenidos mediante la metodología de marcaje indirecto de la ciprofloxacina, introduciendo un quelatante bifuncional (F2) se muestran en la tabla II, donde el rendimiento optimo fue de $94,67 \pm 1,77\%$, significativamente inferior al obtenido con F1 incubando en BAH, este resultado es inédito, pues no existen reportes respecto al marcaje indirecto de la molécula en cuestión. Al observar los resultados de estudios anteriores, donde se utilizó la vía directa, este valor de pureza de F2 resulta significativamente inferior, pero es adecuado para su uso *in vivo*. Además cumplió con las expectativas propuestas a la hora de diseñar la investigación, basada en la conjugación del HYNIC por enlace peptídico al grupo amino secundario de la molécula de antibiótico y posteriormente estabilizar el radiocomplejo con tricina (Qu T, 2001; Decristoforo C, 2002; Leslie WD, 2003; Meléndez L, 2003). Las impurezas que

predominaron en F1 son los radiocoloides, mientras que en F2 primó el pertecnetato libre, todas en cantidades aceptables.

La evaluación de la estabilidad de la marca en la solución inyectable resulta particularmente importante para precisar el tiempo de garantía de calidad en cuanto a la pureza radiofarmacéutica del preparado. En la figura 4 se evidencia que F1, mantuvo un porcentaje de disociación significativamente superior al que manifestó F2 pasadas cinco horas, los cuales fueron de $3.16 \pm 0.29\%$ y $2.53 \pm 0.40\%$ respectivamente a las seis horas. Pasado este tiempo se pudo apreciar un aumento del deterioro de ambos radiocomplejos. Independientemente de la diferencias, estos resultados son alentadores para el futuro uso *in vivo* de ambos productos, en lo referente a la estabilidad en solución inyectable, lo que gravita favorablemente en el tiempo de aprovechamiento del producto. Dicho tiempo es superior al que lograron por Lima JET y colaboradores en 2004, lo cual no es sorprendente teniendo en cuenta que los referidos autores utilizaron un pH de 6, lo que favoreció la disociación del complejo por formación de cloruro básico y óxido de Sn (II) hidratado [Jones AG, 1982 (1) y (2)]. También hay que tener en cuenta que la sal de fluoruro (SnF_2) le confiere mayor estabilidad al reductor Sn^{2+} , siendo menos vulnerable que el $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a sufrir los procesos de oxidación e hidrólisis antes mencionados. Ambos radiofármacos investigados presentan una estabilidad en solución inyectable, similar a la reportada por Kleisner I y colaboradores en el 2002; lo que seguramente se debe, a la estricta regulación del pH, sugerida por los referidos investigadores; que además se controló meticulosamente pues se plantea que a pH entre 3,0-4,5 se conserva la actividad antimicrobiana de la ciprofloxacina (Kleisner I, 2002).

En la tabla III, es posible observar el efecto que produce la cisteína sobre los productos evaluados debido a su poder quelante, caracterizado por la presencia de un grupo tiol (-SH) en su estructura, el cual es un potente ligando donador de electrones para formar complejos de coordinación con metales reducidos. Teniendo en cuenta que este fármaco tiene una amplia distribución corporal, el presente estudio permite establecer una aproximación de la estabilidad endógena del complejo frente a aminoácidos y péptidos presentes en muchos líquidos corporales y que presentan el grupo tiol en su estructura, entre los que se encuentran en mayor proporción la cisteína y el glutatión intersticiales,

los que están en un rango entre 10 y 100 μM y en el plasma esta es de 10 μM aproximadamente ((Lehninger AL, 1981; Hnatowich, 1993), el estudio permitió suponer que durante las cinco horas posteriores a la administración del radiofármaco F1, éste sufrirá una pérdida de marcaje por disociación del complejo entre 4,01 \pm 0,70 y 22,40 \pm 0,54%, mientras que F2 se disociará entre 3,77 \pm 0,04 y 8,20 \pm 0,44%, la diferencia entre los valores promedios es estadísticamente significativa para todos los puntos de análisis ($p < 0,05$), favorable al radiocomplejo obtenido por la vía indirecta.

La evaluación de la estabilidad de los radiocomplejos en suero humano, permite establecer una estimación del comportamiento *in vivo* de los radiofármacos. En este sentido ambos radiocomplejos mantuvieron niveles de pureza en suero humano, a 37°C, superiores a 90% por un tiempo de cinco horas como se observa en la figura 5. No obstante F2 se comportó más estable que F1, encontrándose una diferencia estadísticamente significativa entre las purezas de ambos, con una $p < 0,05$ todo el tiempo, debido a que sufrió menores porcentajes de disociación del marcaje en todos los puntos de medición. Este resultado permite suponer que en la circulación sistémica la pureza radioquímica mantendrá su valor por encima del límite aceptable por un tiempo suficiente, lo cual permitirá completar satisfactoriamente, la ejecución del estudio.

Como se presumió F2 se mostró más estable que F1 en solución inyectable, en suero humano y en reto contra cisteína, lo cual se explica, teniendo en cuenta que en la formación del radiocomplejo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tricina-HYNIC-Ciprofloxacina intervienen cinco grupos aminos primarios y un grupo hidroxilo, los cuales le confieren alta estabilidad al radiocompuesto (Decristoforo S, 2002). El complejo F1 no se ha podido caracterizar estructuralmente, ni existen reportes bibliográficos al respecto pero teóricamente existen varias posibilidades de formación del radiocomplejo, dado que presenta varios grupos proclives a la formación de enlaces de coordinación con el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ reducido, pero ninguna variante presenta un complejo más fuerte que el producido por F2. Estos resultados permiten ratificar que, aunque la ciprofloxacina manifiesta una amplia distribución en los líquidos intersticiales, en la primera hora de inyectada, ambos productos pueden ser usados en la clínica sin esperar una pérdida considerable de pureza radiofarmacéutica

durante el tiempo necesario para llegar a las células patógenas y penetrar a su interior por difusión pasiva (Devillers A, 1998). Es decir una pureza superior a 70%, por más de cinco horas es suficiente para que ocurra la internalización del radiofármaco en las lesiones infecciosas, debido a que el tiempo medio biológico del antibiótico en sangre es de cuatro horas (Devillers A, 1998) y que un estudio gammagráfico puede ser realizado completamente en el mismo tiempo; estos resultados de disociación de radiomarcaje no sugiere invalidación del uso de ninguno de los dos productos para su uso *in vivo* [Britton KE, 1997; Winter de F, 2001 ⁽¹⁾].

Tal como se mostró en la figura 6, los rendimientos de los radiomarcajes a diferentes tiempos después de que los fármacos se almacenaron en congelación a -20 °C, fueron superiores a 90% por un tiempo de cinco semanas. Este resultado permite valorar positivamente la opción de preparar lotes pequeños a escala de laboratorio para cubrir la demanda de un departamento de medicina nuclear sin necesidad de importar los costosos kits comerciales, esta modalidad de autoabastecimiento ha sido promovida por el OIEA en los últimos años (CRP E13030 2004-2008). No obstante, se impone valorar la posibilidad de liofilizar la formulación en aras de alargar el tiempo de estabilidad, de garantizar las buenas prácticas de manufactura y al mismo tiempo proceder producciones a gran escala para su comercialización.

Los controles microbiológicos de ambas formulaciones (F1 y F2) no mostraron resultados positivos de crecimientos microbianos, ni a los 7, ni a los 14 días en ninguno de los experimentos realizados. Tampoco en los análisis de pirógenos se detectaron aumentos de la temperatura corporal en ninguno de los animales estudiados a los 30, 120 y 180 minutos, según estos resultados, fue posible confirmar que se emplearon buenas prácticas de manufactura en los procesos de preparación y que por tanto estos cumplen con las primicias de las buenas prácticas farmacéuticas que garantizan la seguridad de los radiofármacos inyectables (TEC-DOC, 1992).

En la tabla V se exponen los resultados de los parámetros farmacocinéticos calculados para F1 y F2 en ratas Wistar sanas, donde se puede constatar una predominante eliminación de radiactividad por vía renal, la cual fue de $42,19 \pm 0,44\%$ para F1 y de

41,010±0,047%, para F2, durante las primeras seis horas posteriores a la administración de los radiofármacos, donde F1 mostró un porcentaje significativamente superior al que manifestó F2 ($p=0,003$). Estos valores son superiores al reportado para la molécula nativa y sus metabolitos (oxiciprofloxacina, sulfociprofloxacina, desmetilenciprofloxacina y formiciprofloxacina), el cual es del 75% en 24 horas (Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, 1995). Además, es sabido, que parte del ^{99m}Tc es captado por moléculas endógenas portadoras de grupos tiol, como cisteína las cuales se eliminan fundamentalmente por la orina, este fenómeno fue corroborado en el estudio de estabilidad en soluciones del aminoácido. Adicionalmente, una parte del ^{99m}Tc es transferido al glutatión, molécula endógena en forma de tripéptido que interviene en el metabolismo celular (Lehninger AL, 1981), el cual forma enlaces fuertes con el ^{99m}Tc , debido a la presencia del grupo tiol en su estructura. La figura 9, muestra los resultados de un estudio cromatográfico de fase reversa en columna Sep-Pak C18, donde se aplicó orina radiactiva de ratas Wistar, inyectadas con ambos radiofármacos y colectadas cuatro horas después de la administración. Dicho estudio, permitió observar que las áreas bajo los picos de máxima radiactividad correspondieron al 19,1110±0,0007% para F1 y al 24,61±0,40% para F2. Las muestras colectadas correspondientes a la máxima radiactividad manifestaron la máxima absorbancia a 278 nm en ambos casos, lo que permitió verificar que corresponden a la ciprofloxacina intacta y a sus metabolitos. También fue posible calcular las áreas bajo los picos de actividades menores donde se constató que un pico con un área 0,181±0,002% para F1 y otro con un área 0,151±0,004% para F2 corresponden a especies endógenas con grupos tioles en sus estructuras puesto que se observó una absorbancia máxima a 260 nm. Esta radiactividad puede corresponder a que existe una cierta cantidad de ^{99m}Tc unido a cisteína y a glutatión, los cuales se encuentran en cantidades no despreciables en los líquidos corporales (Hnatowich, 1993), además estos resultados concuerdan con el estudio de estabilidad en cisteína, donde F1 sufrió una disociación del marcaje significativamente mayor. Estas observaciones permiten aseverar que los componentes que se encuentran en mayor proporción en la orina radiactiva son el fármaco intacto y sus metabolitos ya que las proporciones de dichas especies, tanto para F1 como para F2 muestran una diferencia

estadísticamente significativa ($p < 0,05$), respecto al porcentaje de ^{99m}Tc unido a moléculas endógenas que se comportan como quelantes fuertes.

El producto F1, manifestó una cinética más rápida que F2, caracterizada por los resultados del cálculo de $T_{1/2E}$, los cuales fueron de $2,440 \pm 0,007$ y $3,07 \pm 0,12$ horas respectivamente, ambos tiempo cumplen con las normas establecidas para los radiofármacos de ^{99m}Tc , donde se plantea que el mismo debe ser cuantitativamente similar o menor que la menor de las dos variables que se tienen en cuenta para el cálculo ($T_{1/2 F}$ y $T_{1/2 B}$), esto garantiza una dosis de irradiación mínima al paciente y una rápida cinética fisiológica del agente trazador (Bernier DR, 1993). El hecho de que el $T_{1/2E}$ sea mucho menor para F1, con una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,00027$), se debe a que F2 es una estructura química más grande y compleja, caracterizada por el enlazamiento del HYNIC y de dos moléculas de tricina al antibiótico, además que presenta un mayor porcentaje de enlazamiento a proteínas plasmáticas (Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, 1995). Está establecido además, que la utilización de grupos quelantes bifuncionales y de estabilizantes para la conformación de los enlaces de coordinación entre los grupos donantes de electrones y el ^{99m}Tc reducido, a pesar de que le aportan mayor hidrosolubilidad a los radioconjugados, también le confieren al producto final una farmacocinética más lenta, así como un V_{ss} menor (Qu T, 2001 y Decristoforo C, 2002).

Otros autores han reportado que utilizando 1 mg de AFS y alta temperatura de incubación se logra reducir la acumulación renal por un tiempo de cuatro horas, tiempo reportado como óptimo para la adquisición de un estudio clínico (Oh SJ, 2002; Winter de F, 2001⁽¹⁾). No obstante, en los estudios de biodistribución en animales ejecutados en el presente estudio, se constató una marcada acumulación renal en todos los puntos de medición, tanto para F1 como para F2, este comportamiento se puede considerar normal debido a que está demostrado que el mayor porcentaje; tanto del fármaco nativo como de sus metabolitos es eliminado por esta vía, datos presentados en las tablas IV y VI. Dicha eliminación comienza desde el mismo momento de la inyección al compartimiento sistémico (Britton KE, 1997; Winter de F, 2001⁽¹⁾; Kleisner I, 2002). La actividad hepática es significativamente inferior para F1 respecto a la observada para F2 en todos

los puntos de análisis durante las 24 horas de estudio, lo cual se debe a que F1 sigue una cinética más cercana a la de la molécula nativa, ya que no presenta especies químicas adicionales para conformar el radiocompuesto, lo cual provoca mayor acumulación hepática (Decristoforo C, 2002). No obstante, las acumulaciones hepáticas, tanto de F1 como de F2 son menores que las encontradas en reportes anteriores, donde no purifican las soluciones de los radiofármacos, en los cuales se cuantificaron especies radiactivas coloidales que muestra acumulación hepática por fagocitosis y no precisamente porque esto se deba totalmente a la acumulación normal del antibiótico radiomarcado, dado que esta es su principal ruta metabólica. Las disminuidas acumulaciones de F1 y F2 en el hígado y en el bazo, constituyen un resultado alentador, en lo referente a que, de ser así en los humanos, las exploraciones gammagráficas en la región abdominal producirán imágenes con buena relación lesión/región contralateral (cpm), lo cual permitirá un diagnóstico más eficiente.

De los datos aportados por la biodistribución en ratas, se calcularon curvas de % DI/g en el tiempo para cada órgano fuente, con el objetivo de hacer una estimación de la dosimetría interna en órganos blanco de humanos normales. Dicho análisis permitió constatar que los mayores tiempos de residencia fueron encontrados en los riñones y el hígado siendo estos de $0,48 \pm 0,03$ y $0,19 \pm 0,07$ horas respectivamente para F1 y de $0,52 \pm 0,02$ y $0,20 \pm 0,12$ horas respectivamente para F2, datos expuestos en las tablas VII y VIII. Los resultados permitieron apreciar que los tiempos de residencia en ambos órganos, fueron significativamente mayores para F2, lo cual sugiere que el metabolismo y la eliminación del radioconjugado obtenido por la vía indirecta son más lentos que para la molécula de ciprofloxacina marcada directamente (Mandell GL, 1996). Sin embargo, tanto en la investigación de Winter F de, 2001 ⁽²⁾, como en la presente, la mayor concentración de actividad se encuentra en los riñones y por tanto el mayor tiempo de residencia [Winter F de, 2001 ⁽²⁾], lo cual está relacionado a que la vía principal de eliminación es la renal. Las mayores dosis aportadas por F1 y F2 se reportan en hígado, las cuales fueron de $5,76E-03 \pm 8,37E-06$ y $6,30E-03 \pm 4,0E-04$ respectivamente y para riñones, siendo estas de $1,16E-02 \pm 4,41E-05$ y $1,27E-02 \pm 1,11E-04$ respectivamente, dosis que en el caso de los riñones son marcadamente superiores a $2,68E-03 \pm 0,48E-03$

mGy/MBq reportada por Winter F de, 2001 ⁽²⁾ para la ciprofloxacina marcada por vía directa con AFS como reductor.

No obstante, las dosis absorbidas por los órganos blancos estudiados tanto con F1 como con F2, cumplen con los estándares internacionales, puesto que para un procedimiento de medicina nuclear, en órganos y tejidos, la mencionada dosis debe estar entre 1 y 10 mGy, que es un nivel muy por debajo de los niveles límites en que los tejidos del cuerpo sufren daño directo y provocarían la muerte celular. A este tipo de daño radiactivo se lo denomina efecto determinista (Nuclear Medicine Technology and Techniques, 1997).

El gráfico de la figura 10 muestra la eficacia biológica de ambas formulaciones, donde se evidenció que F2 manifiesta una unión a bacterias *in vitro* significativamente inferior ($19,59 \pm 0,01$) con respecto a F1 ($35,201 \pm 0,008\%$) a las seis horas. Este último mostró un comportamiento similar al publicado por Oh SJ, 2002, los cuales marcaron a TA pero utilizaron mucha mayor cantidad de reductor ($100 \mu\text{g}$ de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y significativamente superior al resultado obtenido por Sierra JM, 2008, cuando marcaron a TA y con $100 \mu\text{g}$ de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, obteniendo un enlazamiento de $22 \pm 3,2\%$ por $35,25 \pm 0,07\%$ de F1 a los 30 minutos. Todas las comparaciones de medias reportaron diferencias significativas ($p < 0,05$). La causa de la deficiente fijación del radiofármaco F2 a las bacterias en el estudio *in vitro* se explica mediante el aumento de la hidrosolubilidad que le confieren las moléculas de tricina al radiocomplejo (Decistoforo S 2002 y Melendez Alaford L 2003), lo que a su vez limita la penetración al interior de las bacterias, debido a la disminución de la liposolubilidad que sufre el radioconjugado. Este resultado del estudio *in vitro* con F2, se pudo corroborar en los estudio *in vivo*, mostrado en las figuras 13 y 14, donde se apreció una disminuida captación del radiofármaco en los músculos infectados, en donde se constató por análisis microbiológicos, una abundante presencia de bacterias vivas. Dicha captación fue similar a la observada en el modelo de inflamación estéril; esto ratifica una disminución de la capacidad de penetración del radiofármaco F2 al interior de las bacterias. Aunque no se han publicado trabajos similares con ciprofloxacina estas consideraciones constatan que F2 presenta baja afinidad por bacterias tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo* (Decristoforo S, 2002; Oh SJ, 2002). Las ligeras acumulaciones observadas y cuantificadas en las zonas

inflamada estériles e infectadas son debidas fundamentalmente a la penetración facilitada por la permeabilidad vascular que se produce en los procesos inflamatorios, para facilitar la exudación de moléculas plasmáticas a la zona lesionada por diapédesis, teniendo en cuenta que ambos son procesos inflamatorios agudos con solo 24 horas de inducidos (Chianelli M, 1997).

Atendiendo al insuficiente comportamiento biológico *in vitro*, de F2 en cuanto al reconocimiento de los microorganismos vivos, se puede deducir que el mismo no será útil para la detección específica de procesos infecciosos a través de las imágenes gammagráficas. Esta afirmación obedece a que en el ensayo *in vitro* no media la acumulación por permeabilidad vascular y sí el mecanismo biológico de penetración pasiva al interior de la célula patógena. Es por esta razón que se descarta la posibilidad de que F2 facilite la diferenciación entre una inflamación infectada de una estéril, no obstante pudiera ser evaluado para su utilización en el diagnóstico gammagráfico de inflamaciones en general, ya que mostró buena acumulación en las inflamaciones inducidas. Este resultado constituye un aporte al conocimiento del radiomarcaje de ciprofloxacina con ^{99m}Tc y la influencia del método sobre su actividad biológica.

Al inyectar F1 a los ratones objetos del estudio toxicológico, no fue observado prácticamente ningún signo de toxicidad. No se apreciaron signos clínicos ni efectos irritantes. Al observar macroscópicamente los órganos seleccionados, se comprobó que estos no fueron afectados; además, no se alteró la ganancia en peso de los animales. En el estudio histopatológico de las porciones de las colas donde se aplicaron las inyecciones del radiofármaco, se pudo observar que se produce una irritación similar a la ocasionada en los casos en que se administró cloruro de sodio al 0,9%, por lo que se concluyó que no produce irritación local apreciable. Es preciso señalar que aunque se aplicó una dosis 50X esta es apenas el 50% de lo que se administra a un humano adulto en una sola aplicación endovenosa para terapia, por lo que es poco probable que aparezcan daños irritantes, teniendo en cuenta además, que no se reporta alto grado de toxicidad para ninguno de los productos en la formulación F1.

Es posible asegurar que aplicando 50 veces la dosis en el humano para diagnóstico, la cual contiene 0,028 mg/kg de ciprofloxacina, 0,28 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de SnF_2 , 142 $\mu\text{Ci}/\text{kg}$ de ^{99m}Tc y

3.8 µg/kg de NaCl al 0,9% para un individuo de 70kg, el producto no provoca reacciones tóxicas apreciables. El radiofármaco es igualmente bien tolerado ya que no produce afectaciones en el sitio de inoculación ni desde el punto de vista macroscópico ni microscópico, los hallazgos sugieren que los componentes utilizados para modificar la formulación no provocan reacciones tóxicas y por tanto se puede asegurar que le confieren seguridad para el paciente, pero es precisa su evaluación toxicológica a dosis en repetición, ya que los pacientes que resulten positivos de un proceso infeccioso necesitarán de un seguimiento evolutivo y por tanto varios estudios gammagráficos hasta su completo reestablecimiento.

Los alentadores resultados alcanzados en la evaluación preclínica de F1, sugieren que este es lo suficientemente eficiente y seguro, como para ser evaluado clínicamente mediante un ensayo fase I-II.

Capítulo VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

- 1- Las metodologías de radiomarcaje evaluadas permitieron la optimización de dos formulaciones (F1 y F2) las cuales rindieron purezas radioquímicas superiores a 90%. Los productos finales son estériles y apirogénicos lo que sugiere que la metodología y los materiales utilizados, cumplen con las normas de calidad requeridas.
- 2- F2 mostró una estabilidad significativamente mayor que F1 en la solución inyectable, en suero humano y en soluciones de cisteína. No obstante F1 mantiene un porcentaje de marcaje adecuado durante un tiempo suficiente, lo que no limita su uso *in vivo*. Ambas formulaciones almacenadas en congelación rinden purezas radiofarmacéuticas superiores a 90% por un tiempo de cinco semanas.
- 3- Ambos radiofármacos mostraron patrones de biodistribución favorables para la realización de estudios gammagráficos, caracterizados por una cinética en sangre rápida, así como por una disminuida biodistribución en órganos abdominales y torácicos, lo que permite suponer que son adecuados para realizar exploraciones a esos niveles. Ambos productos son seguros desde el punto de vista radiológico puesto que las dosis absorbidas no superan los 10 mGy para ninguno de los órganos blanco.
- 4- F1 se une más eficientemente a bacterias vivas, tanto en experimentos *in vitro*

como *in vivo*; la pobre afinidad de F2 por los microorganismos vivos, compromete su capacidad para la diferenciación entre una inflamación infectada y una estéril. No obstante F2 pudiera ser evaluado para el diagnóstico de inflamaciones en general.

- 5- El producto F1 sugiere seguridad desde el punto de vista clínico ya que no provocó signos de toxicidad en los animales estudiados.

6.2 Recomendaciones

- 1- Evaluar la toxicología a dosis en repetición, ya que es preciso el seguimiento evolutivo de los pacientes a través de la técnica gammagráfica.
- 2- Solicitar la licencia para la ejecución de un ensayo clínico fase I-II.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aebi S, Assereto R, Lauterburg BH. High dose intravenous glutathione in man. Pharmacokinetics and effects of cysteine in plasma and urine. Eur J Clinical Invest 1991; 21: 103-10.
- Akaike H. Statistical criteria for selecting a pharmaceutical model. Math Sci 1976; 14: 5-11.
- Andreopoulos D, Kasi LP, Kim EE, Diaz M, Yang DJ, Asimacopoulos PJ. Detection of acute postoperative mediastinitis in mice using ^{99m}Tc -liposomes. Invest Radiol 2002; 37: 435-39.
- Anuario Estadístico. Dirección Nacional de Estadísticas. Ministerio de Salud Pública, Cuba, 2007.
- Babich J, Graham W, Barrow S. Technetium-99m-labeled peptides: Comparison with indium-111-labeled white blood cells for localizing acute bacterial infection in the rabbit. J Nucl Med 1993; 34: 2176-84 ⁽²⁾.
- Babich J, Solomon H, Pike M. Technetium-99m-labelled hydrazino nicotinamide derivatized chemotactic peptide analogs for imaging focal sites of bacterial infection. J Nucl Med 1993; 34: 1964-74 ⁽¹⁾.
- Bahn R, Heufelder A. Pathogenesis of Graves' ophthalmopathy. N Eng J Med 1993; 329: 1468-75.
- Baldas J, Bonnyman J, Pojer PM, William GA. The influence of reducing agent on the composition of ^{99m}Tc complexes: implications of ^{99m}Tc -radiopharmaceuticals preparation. Eur. J. Nucl. Med 1982; 7: 187-189.

- Ballinger JR, Gulenchyn KY, Anisen MN. Technetium-99m spieperone dithiocarbamate: a potential radiopharmaceutical for dopamine receptor imaging with spect. *Appl. Radiat. Isot.* 1989; 40: 459-547.
- Barone R, Chianelli M, Bottoni U. In-vivo detection of lymphocytic infiltration in melanoma using 99mTc-IL2. *Eur J Nucl Med* 1996; 23: 1217.
- Basic Radiation Safety Standards. 3rd Edition, Pub: Mosby. 1997.
- Baun R, Hentel A, Bosslet K. First use of Tc-99m labeled monoclonal antibody directed against the T cell receptor for immunoscintigraphic detection of transplant rejection (abstract). *Eur J Nucl Med* 1990; 16: S163.
- Becker W. The contribution of nuclear medicine to the patient with infection. *Eur J Nucl Med* 1995; 22: 1195-211.
- Becker W, Emmrich F, Horneff G. Imaging rheumatoid arthritis specifically with technetium-99m CD4-specific (T-helper lymphocytes) antibodies. *Eur J Nucl Med* 1990; 17: 156-59.
- Becker W, Goldenberg G, Wolf F. The use of monoclonal antibodies and antibody fragments in the imaging of infectious lesions. *Sem Nucl Med* 1994; 24: 1-13 ⁽¹⁾.
- Becker W, Schomann E, Fischbach W, Borner WB, Grunner K. Comparison of 99mTc-HMPAO and In-111-oxine labeled granulocytes in man: First clinical results. *Nucl Med Commun* 1988; 9: 435-47.
- Bellen J, Bannister K, Russ G. Radioiodination and in-vitro activity of a monoclonal antibody to human ICAM-1: Potential use in allograft rejection (abstract). *Eur J Nucl Med* 1994; 21: S26.
- Bernier DR, Langan JK, Christian PE. *Nuclear Medicine Technology and Techniques* 1993. 3ra edición. Editorial Mosby.
- Bhatti M, Chapman P, Jamar F. Immunolocalization of active inflammatory bowel disease (IBD) using a monoclonal antibody against E-selectin. *J Nucl Med* 1996; 37 (suppl. 5): 114P.
- Bischof Delaloye A. Progress in the diagnosis and treatment of disease by nuclear medicine and molecular imaging. *Eur J Nucl Med* 2002; 29: 139-59.
- Bleeker.-Rovers CP, [Boerman OC](#), [Rennen HJ](#), [Corstens FH](#), [Oyen WJ](#). Radiolabeled compounds in diagnosis of infectious and inflammatory disease [Curr Pharm Des.](#) 2004;

10(24):2935-50.

- Boerman O, Storn G, Oyen W. Sterically stabilised liposomes labelled with indium-111 to image focal infection. *J Nucl Med* 1995; 36: 1639-44.

- Borrego Dorado I, Vázquez Albertino R. Una propuesta para el uso racional de la PET en oncología. *Rev Esp Med Nuclear* 2002; 21: 163-73.

- Borman T, Johnson R, Sherman F. Gallium scintigraphy for the diagnosis of septic arthritis and osteomyelitis in children. *J Pediatr Orthop* 1986; 6: 317-35.

- Bosslet K, Auerbach B, Hoffken H, Joseph K. Frequency and relevance of the human anti-mouse immunoglobulin (HAMA) response in immunoscintigraphy. *Nuklearmedizin* 1989; 28: 149-159.

- Bohuslavizki K, Oberwohrmann SO, Brenner W. 111-In-octreotide imaging in patients with long-standing Graves' ophthalmopathy. *Nucl Med Commun* 1995; 16: 912-16.

- Breeman W, Van Hagen M, Visser H. In-vitro and in-vivo studies of substance P receptor expression in rats with the new analog (indium-111-DTPA-Arg1) substance P. *J Nucl Med* 1996; 37: 108-17.

- Britton KE, Vinjamuri S, Hall AV, Solanki KK, Bomanji J, Das S. Clinical evaluation of technetium-99m infecton for the localisation of bacterial infection. *Eur J Nucl Med* 1997; 24: 553-556.

- Britton KE, Wareham D, Solanki KK, Das SS. Imaging of bacterial infections with ^{99m}Tc-labeled human neutrophil peptide-1 (letter) *J Nucl Med* 2000; 41: 2099-100.

- Brouwers AH, Jong DJ de, Dams ETM, Oyen WJ, Boerman OC, Laverman P, et al. Tc-99m-PEG-liposomes for the evaluation of colitis in Crohn's disease. *J Drug Targeting* 2000; 8: 225-33.

- Bucosmbe J, Miller R, Lui D, Ell P. Combined ⁶⁷Ga citrate and ^{99m}Tc-immunoglobulin imaging in human immunodeficiency virus-positive patients with fever of undetermined origin. *Nucl med Commun* 1991; 12: 583-92.

- Buscombe J, Oyen W, Miller R. Indium-111 labelled human polyclonal immunoglobulin: Identifying focal infection in patients positive for human immunodeficiency virus (HIV). *J Nucl Med* 1993; 34: 1621-25.

- Bucosmbe J, Signore A. FDG-PET in infectious and inflammatory disease. *Against. Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003; 30: 1571-73.

- Calame W, Feistma AIJ, Ensing GJ, Arndt JW, Furth R van, Pauwels EKJ. Binding of ^{99m}Tc -labeled polyclonal immunoglobulin to bacteria as a mechanism for Scintigraphy detection of infection. *Eur J Nucl Med* 1991; 18: 396-400.
- Carreras Delgado JL, Lapeña Gutierrez L, Asencio del Barrio C. Tomografía por emisión de positrones (PET) en oncología. Castro-Beiras JM. *Avances en Medicina Nuclear y calidad científico-técnica*. Madrid: Conserjería de Sanidad, 2002: 509-34.
- Catafau A, Lomeña F, Ricart M. Indium-111-labeled platelets in monitoring human pancreatic transplants. *J Nucl Med* 1989; 30: 470-75.
- Chacko TK, Zhuang H, Nakhoda KZ, Moussavain B, Alavi A. Applications of fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the diagnosis of infection. *Nucl Med Commun* 2003; 24: 615-24.
- Chapman P, Jamar F, Haskard D, Peters A. Imaging arthritis: Comparison between In-111-anti-E-selectin monoclonal antibody and Tc-99m and In-111-human immunoglobulin (abstract). *J Nucl Med* 1996; 37 (suppl. 5): 128P.
- Chauncey DM, Halpen SE, Hagan PL, Alazraki NP. Preparation and stability of 131-tetracycline. [Int J Appl Radiat Isot.](#) 1976; 27:615-20.
- Chianelli M, Mather S, Procaccini E. In-vivo detection of lymphocytes infiltration in thyroid autoimmune disease. *Eur J Nucl Med* 1996; 23: 1055.
- Chianelli M, Mather SJ, Martin-Comin J and Signore A. Radiopharmaceuticals for the study of inflammatory processes: A review. *Nuclear Medicine Communication*, 1997; 18: 437-55.
- Cindas A, Gokce-Kustal Y, Kith PO, Caner B. Scintigraphy evaluation of synovial inflammation in rheumatoid arthritis with (99m) technetium-labeled human polyclonal immunoglobulin G. *Rheumatol Int* 2001; 20: 71-7.
- Claessens R, Koenders E, Boerman O. Dissociation of indium-111-labelled diethylene triamine penta-acetic acid conjugated non-specific polyclonal human immunoglobulin G in inflammatory foci. *Eur J Nucl Med* 1995; 22: 212-19.
- Cooper AJL. Biochemistry of sulfur contain amino acids. *Rev Biochem* 1983; 52: 187-222.
- Corstens FHM, Van der Meer JWM. Nuclear medicine's role in infection and

inflammation. *Lancet* 1999; 354: 765-70.

- Costa D, Lui D, Ell P. White cells radiolabelled with ^{111}In and $^{99\text{m}}\text{Tc}$: A study of relative sensitivity and in-vivo viability. *Nucl Med Commun* 1988; 9: 725-31.

- Dams ET, Oyen WJ, Boerman O, Store G, Laverman P, Kok PJ, et al. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -PEG liposomes for scintigraphy detection of infection and inflammation: clinical evaluation. *J Nucl Med* 2000; 41: 622-30.

- Dass SS, Hall AV, Wareham DW, Britton KE. Infection imaging with radiopharmaceuticals in the 21 st century. *Brazilian Arch Biol Techn* 2002; 45: 25-37.

- Dass SS, Britton KE. Bacterial infection imaging. *World J Nucl Med* 2003; 2: 173-9.

- De Bois MHW, Arndt JAW, Van der Velde EA. Tc-99m-human immunoglobulin: A reliable method to detect joint activity in rheumatoid. *J Rheumatol* 1992; 19: 1371-76.

- Decristoforo S, Mather SJ. The influence of chelator on the pharmacokinetics of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labelled peptides. *Q J Nucl Med* 2002; 46: 195-205.

- Devillers A, Moisan A, Hennion F, Garin E, Poirier JY, Bourguet P. Contribution of technetium-99m hexamethylpropylene amine oxime labelled leukocyte scintigraphy to the diagnosis of diabetic foot infection. *Eur J Nucl Med* 1998; 25: 132-8.

- Díaz M, Bockisch A, Kahaly G, Hahn K. Preliminary results of somatostatina receptor scintigraphy in endocrine ophthalmopathy (abstract). *Eur J Nucl Med* 1993; 20: 844.

- Diccionario de especialidades farmacéuticas. Editorial PLM, SA; Edición 41, México DF, 1995; p 556.

- [Diniz SO](#), [Rezende CM](#), [Serakides R](#), [Ferreira RL](#), [Ribeiro TG](#), [Martin-Comin J](#), [Cardoso VN](#). Scintigraphy imaging using technetium-99m-labeled ceftizoxime in an experimental model of acute osteomyelitis in rats. [Nucl Med Commun](#). 2008 Sep; 29:830-6.

- Diot P, La Pape A, Nolibe D, Noemier G, Revillar JP, Lasfargues G. Scintigraphy with J001X a Klebsiella membrana glycolipid, for the early diagnosis of chronic berylliosis: results from an experimental model. *Br J Ind Med* 1992; 49: 359-64⁽¹⁾.

- Diot P, La Marié E, Baulieu JL, Pascal S, Vaillant L, Revillard JR, et al. Scintigraphy with J001 macrophage targeting glycopeptide. A new approach for sarcoidosis imaging. *Chest* 1992; 102: 670-6⁽²⁾.

- Duman Y, Burak Z, Ercan M. Clinical evaluation of metastases of malignant melanoma

imagin with ^{99m}Tc -glutathione and ^{99m}Tc -anti-melanoma antibody: A comparative study. Nucl Med Commun 1995; 16: 927-935.

- Dumarey N, Blocklet D, Appelboom T, Tant L, Schoutens A. Infecton is not specific for bacterial osteo-articular infective pathology. Eur J Nucl Med 2002; 29: 530-535.

- Eberhardt J, Oberwohrmann SO, Clausen M. Accumulation of ^{111}In -Octreotide in the orbital and thyroid regions of patients with Graves' disease and with exophthalmos (abstract). Eur J Nucl Med 1993; 20: 844.

- Edwards C, Hayes R. Tumor scanning with ^{67}Ga -citrate. J Nucl Med 1969; 10: 103-5

- EL Esper I, Blondet C, Moullart V, Saidi L, Havet E, Mertl P et al. The usefulness of ^{99m}Tc sulfur colloid bone marrow scintigraphy combinet with ^{111}In leucocyte scintigraphy in prosthetic joint infection. Nucl Med Commun 2004; 25: 171-5.

- Ercan M, Unlenen E, Atkas A. ^{99m}Tc -glutathione for imagin inflammatoy lesions. Nucl Med Commun 1994; 15: 533-539.

Fernandez E. Biofarmacia 1988; Tomo I: 81

- Ferro G, Arteaga C, Pedraza M, Melende L, Zhang YM, Rusckowski M, et al. In Vitro and in vivo assessment of ^{99m}Tc -UBI specificity for bacteria. Nucl Med Biol 2003; 30: 597-603.

- Fischer B, Packard B, Read E. Tumor localization of adoptively transferred indium-111 labeled tumor infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma. J Clin Oncol 1989; 7: 250-61.

- Fischman AJ, Babich JW, Strauss H. A ticket to ride: Peptide radiopharmaceuticals. J Nucl Med 1993; 34: 2253-2262.

- [Fischman AJ](#), [Babich JW](#), [Alpert NM](#), [Vincent J](#), [Wilkinson RA](#), [Callahan RJ](#), [Correia JA](#), [Rubin RH](#). Pharmacokinetic of ^{18}F -labeled trovafloxacin in normal and Echerichia coli-infected rats and rabbits studies with positron emission tomography. Clin Microbiol Infect. 1997; 3: 63-72.

- [Fischman AJ](#), [Livni E](#), [Babich J](#), [Alpert NM](#), [Liu YY](#), [Thom E](#), [Cleeland R](#), [Prosser BL](#), [Callahan RJ](#), [Correia JA](#). Pharmacokinetics of ^{18}F -labeled fleroxacin in rabbits with Escherichia coli infection, studie with positron emission tomography. [Antimicrob Agents Chemother](#). 1992; 36: 2286-92.

- Fischman AJ, Pike M, Kroon D. Imaging focal sites of bacterial infection in rats with

- indium-111-labelled chemotactic peptide analogs. *J Nucl Med* 1991; 32: 483-491.
- Fischman AJ, Rubin RH, White J. Localization of Fc and Fab fragments of nonspecific polyclonal IgG at focal sites of inflammation. *J Nucl Med* 1990; 31: 1199-1205.
 - Frick M, Loken M, Goldberg M, Simmons R. Use of ^{99m}Tc-sulphur colloid in evaluation of renal transplant complications. *J Nucl Med* 1976; 17: 181-83.
 - Fritzberg AR, Lyster DM, Dolphin DH. Evaluation of formamidin sulfonic acid and other reducing agents for use for the preparation of ^{99m}Tc labeled radiopharmaceuticals. *J Nucl Med* 1977; 18: 553-557.
 - Gallina D, Pelletier D, Doherty P. 111-Indium-labelled lymphocytes do not image or label the pancreas of BB/W rats. *Diabetologia* 1985; 28:143-47.
 - Gavilondo Cowley JV (ed). *Anticuerpos monoclonales: teoría y práctica*. La Habana: Elfos Scientiae; 1995.
 - Gemmel F, Dumarey N and Palestro CJ. Non-invasive imaging of complicated osteomyelitis. The Added valued of scintigraphic techniques. *Current Radiopharmaceuticals* 2008; 1: 73-86.
 - Gibaldi M. *Pharmacokinetics*, Marcel Decker, New York, 1984.
 - Goldenberg D, Sharkey R, Udem S. Immunoscintigraphy of Pneumocystic carinii pneumonia in AIDS patients. *J Nucl Med* 1994; 35: 1028-1034.
 - Goupille P, Valat J, Le Pape A. Imaging of synovitis in rheumatoid arthritis with radionuclide tracer. *J Rheumatol* 1994; 21: 1975-75.
 - Gratz S, Rennen HJ, Boerman OC, Oyen WJ, Mast P, Behr TM, et al. ^{99m}Tc-HMPAO-labelled autologous leukocytes for imaging infection. *J Nucl Med* 2002; 43: 918-24.
 - Griffith K, Read E, Carrasquillo J. In vivo distribution of adoptively transferred 111-indium-labelled TIL and PBL in patients with metastatic melanoma. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 1709-15.
 - Gross M, Shapiro B, Skinner R. Scintigraphy of osteomyelitis in man with human recombinant interleukin-8. *J Nucl Med* 1996; 37 (suppl. 5): 25P.
 - Grupo PET de la SEMN. Tomografía por emisión de positrones (PET) miocárdica con fluorodesoxiglucosa-¹⁸F. *Rev Esp Med Nuclear* 2002; 21: 301-3.
 - Hall AV, Solanki KK, Vinjamuri S, Britton KE, Das S. Evaluation of the efficacy of ^{99m}Tc-infecton, a novel agent for detecting sites of infection. *J. Clin. Pathol* 1998; 51:

215-219.

- Halpern S, Hagan P. Gallium-67-citrate imaging in neoplastic and inflammatory disease. In: Freeman LM, Weisman H, eds. Nuclear medicine annual. New York: Raven Press, 1980: 219-65.
- Hayes W. Principles and Methods of toxicology, Statistic for toxicologist. 1989.
- Hazra D, Britton K, Lahiri V. Immunotechnological trends in radioimmunotargeting: From magic bullet to smart bomb. Nucl Med Commun 1995; 16: 66-75.
- Hernández A. Inmunoglobulina G policlonal humana marcada con ^{99m}Tc para el diagnóstico de infecciones. Tesis de Grado, IFAL 1995.
- Hernández Cairo A, Perera Pintado A, Prats Capote A, Batista Cuellar JF, Torres Aroche LA, Marrero Reverón LO, Valdivia Álvarez Y. Nueva formulación para marcar ciprofloxacina con ^{99m}Tc . Rev Esp Med Nuclear 2005; 24 (5): 364-5 ⁽¹⁾.
- Hernández A, Perera A, Alberti A, Valdivia Y, Alberdi L, Prats A et al. Marcaje de ciprofloxacina con ^{99m}Tc para el diagnóstico de infección activa. Revista CENIC Ciencias Biológicas, Número Especial 2005; Vol 36 ⁽²⁾.
- Hernández Cairo A, Casacó Santana C, Batista Cuellar JF, Prats Capote A, Coca Pérez M y Pérez Valdés M. Imagen de sépsis asociada a una histiocitosis X. Rev Esp Med Nucl 2008; 27 (3): 204-5.
- Hnatowich DJ, Virzi F, Ruskowski M. Investigation of avidin and biotin for imaging investigation. J Nucl Med 1987; 28: 1294-1302.
- Hnatowich DJ, Mardirossian G, Rusckowski M. Pharmacokinetics of the FO23C5 antibody fragment labeled with ^{99m}Tc and ^{111}In - a comparison in patients. Nucl Med Commun 1993 ⁽¹⁾; 14: 52-63.
- Hnatowich DJ, Mardirossian G, Ruskowski M, Fogarasi M, Virzi F. and Winnard P. Directly and Indirectly Technetium-99m-Labeled Antibodies- A Comparison of In Vitro And Animal In Vivo Properties. J Nucl Med 1993 ⁽²⁾; 34:109-119.
- Hnatowich DJ. Is technetium-99m the radioisotope of choice for radioimmunoscintigraphy? J Nucl Med 1994; 38 (Suppl 1): 22-32.
- Hooper DC, Wolfon JS, Ng EY, Schwartz MN. Mechanism of action of and resistance to ciprofloxacin. Am J Med 1987; 82 (Suppl 4A): 12-20.

- Hursley J. Orbitopathy after treatment of Graves' disease. J Nucl Med 1994; 35: 918-920.
- IAEA-TECDOC 649: Preparation of kits for Tc-99m radiopharmaceuticals. I.A.E.A, Vienna 1992.
- [Ibañez A](#), [Garcia R](#), [Farga A](#), [Galvez J](#). 99mTc-tetracycline radiopharmaceutical: physical chemistry study related to the preparation and reaction products and thermodynamic stability. Int Rad Appl Anstrum B. 1986; 13: 611-5.
- Inoue Y, Ohtake T, Homma Y, Yoshikawa K, Nishikawa J, Sasaki Y. Evaluation of glomerular filtration rate by camera-based method in both children and adults. J Nucl Med. 1998 Oct; 39 (10): 1784-8.
- Instructions of Internacional Animal Care Comité (ARCA) No. 0112. 2000.
- Jamar F, Chapman PY, Harrison AA, Binns RM, Haskard DO, Peters AM. Inflammation arthritis: imaging of endothelial cell activation with an In-111 labeled F(ab')₂ fragment of anti E-selectin monoclonal antibody. Radiology 1995; 194: 843-50.
- Jamar F, Chapman PT, Manocourt DH, Glass DM, Haskard DO, Peters AM. A comparison between ¹¹¹In-anti-E-selectin mAb and ^{99m}Tc-labeled human non-specific immunoglobulin in radionuclide imaging of rheumatoid arthritis. Br J Radiol 1997; 70: 473-81.
- Jones AG, Orvig C, Trop HS, Davison A, Davis MA. A survey of reducing agents for the synthesis of tetraphenylarsonium oxotechnetiumbis (ethanedithiolate) from (^{99m}Tc) pertechnetate in aqueous solution. J Nucl Med 1980; 21: 279-281.
- Jones AG, Davison A. The Chemistry of Tc (I), (II), (III), (IV). Int Appl Radiat Isot. 1982 (1); 33: 867.
- Jones AG, Davison A. The relevance of basic technetium chemistry to nuclear medicine. J Nucl Med 1982 (2); 23: 1041
- Kaim AH, Weber B, Kurrer MO, Westera G, Schweitzer A, Gottschalk J, et al. ¹⁸F-FDG and ¹⁸F-FET uptake in experimental soft tissue infection. Eur J Nucl Med 2002; 29: 648-54.
- Kao C, Wang S, Liao S, Lin W, Hsu C. Usefulness of gallium-67-citrate scans in patients with acute disseminated tuberculosis and comparison with chest x-rays. J Nucl Med 1993; 34: 1918-21.

- Kaldany A, Hill T, Wentworth S. Trapping of peripheral blood lymphocytes in the pancreas of patients with acute-onset insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 1982; 31: 463-66.
- Kalikle T, Schmitz A, Risse JH, Arens S, Keller E, Hansis M, et al. Fluorine-18 fluorodeoxyglucose PET in infectious bone diseases: results of histologically confirmed cases. *Eur J Nucl Med* 2000; 27: 524-28.
- Katar MS, Qaisar A, Irfanullah J, Iqbal J, Khan B, Jehangir M, et al. Antimicrobial peptide ^{99m}Tc-Ubiquicidin 29-41 as human infection-imaging agent: clinical trial. *J Nucl Med* 2005; 46: 567-573.
- Keelan E, Chapman P, Binns R, Peters A, Haskard D. Imaging vascular endothelial activation: An approach using radiolabeled monoclonal antibodies against the endothelial cell adhesion molecule E-selectin. *J Nucl Med* 1994; 35: 276-81 ⁽¹⁾.
- Khaw B, Strauss H, Narula J. Magic bullets: From muskets to smart bombs!!! *J Nucl Med* 1993; 34: 2264-68.
- Khorasheh F, Mahbod Ahmadi A, Gerayeli A. Application of direct Search Optimization for Pharmacokinetic Parameter Estimation. *J Pharm Pharmaceutics Sci.* 1999; 3: 92-98.
- Kinner R, Becker W, Schwab J. Comparison on ^{99m}Tc-labelled specific murine anti-CD4 monoclonal antibodies and nonspecific human immunoglobulins for imaging inflamed joints in rheumatoid arthritis. *Nucl Med Commun* 1993; 14: 667-75.
- Kirschner A, Ice R, Beirwaltes W. Radiation dosimetry ¹³¹I-19-iodocholesterol: The pitfalls of using tissue concentration data: The author's reply. *J Nucl Med* 1975; 16: 248-49.
- Kleisner I, Komerek P, Komarkova I, Konopkova M. A new technique of ^{99m}Tc-ciprofloxacin kit preparation. *Nuklearmedizin* 2002; 41: 224-9.
- Klejin ED, Oyen W, Claessens R, Corstens F, Van der Meer J. Scintigraphy with In-111-labelled human polyclonal immunoglobulin G (In-111-IgG) in patients with fever of unknown origin (FUO) (abstract). *Nucl Med Commun* 1992; 13:626.
- Klett R, Kordelle J, Stahl U, Khalisi A, Puille M, Steiner D, et al. Immunoscintigraphy of septic loosening of knee endoprosthesis: a retrospective evaluation of the antigranulocyte antibody BM 250/183. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003; 30: 1463-6.

- Krenning E, Kwekkeboom D, Pauwels S, Kvols L, Reubi J. Somatostatin receptor scintigraphy. In: Freeman LM, Weissman H, eds. Nuclear Medicine annual. New York: Raven Press, 1995: 1-50.
- [Langer O](#), [Brunner M](#), [Zeitlinger M](#), [Ziegler S](#), [Müller U](#), [Dobrozemsky G](#), [Lackner E](#), [Joukhadar C](#), [Mitterhauser M](#), [Wadsak W](#), [Minar E](#), [Dudczak R](#), [Kletter K](#), [Müller M](#). In vitro and in vivo evaluation of (18F) ciprofloxacin for the imaging of bacterial infections with PET. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2005;32:151-2.
- Larcos G, Mc Larty A, Mc Gregor C. Evaluation of 99m-Tc nonspecific polyclonal IgG in the detection of rejection in a single lung transplant canine model. Nucl Med Commun 1993; 14:64-69.
- Larikka MJ, Ahonen AK, Junila JA, Niemelä O, Hämäläinen MM, Syrjälä HP. Improved method for detecting knee replacement infections based in extended combined ^{99m}Tc-white blood cell and bone imaging. Nucl Med Comm 2001 ⁽¹⁾; 22: 1145-50.
- Larinka M. Diagnosis of orthopaedic prosthesis infections with radionuclide techniques; clinical application of various imaging methods. Disponible en URL: <http://herkules oulu.fi/isbn14272315/> Acta Universitatis Ouluensis Medica 2003.
- Lavender J, Goldman J, Arnot R, Thakur M. Kinetic of indium-111-labeled lymphocytes in normal subjects and in patients with Hodgkin's disease. Br Med J 1977; 2:797-799.
- Lavender JP, Lhowe J, Bukere JR. Gallium citrate scanning in neoplastic and inflammatory lesions. Br J Radiol 1971; 44: 361-6.
- Laverman P, Zalipsky S, Oyen WJ, Dams ET, Storm G, Mullah N et al. Improved imaging of infection by avidin induced clearance of 99mTc-biotin-PEG liposomes. J Nucl Med 2000, 41: 912-18.
- Lazzeri E, Manca M, Molea N, Marchetti S, Consoli V, Bodei L, et al. Clinical validation of the avidin / indium-111 biotin approach for imaging infection inflammation in orthopaedic patients. Eur J Nucl Med 1999; 26: 606-14.
- Lazzeri E, Pauwels EKJ, Erba PA, Volterrani D, Manca M, Bodei L, et al. Clinical feasibility of two-step streptavidin/111In-biotin scintigraphy in patients with suspected vertebral osteomyelitis. Eur J Nucl Mol Imaging 2004; 31: 1505-11.
- Lehninger AL. Transporte activo a través de membranas. En: Lehninger AL (Editor),

Bioquímica. Edición Revolucionaria 1981: 789-816.

- Lentle B, Celler A. An Introduction to Nuclear Medicine. En Leslie WD, Greenberg ID: Vademecum of Nuclear Medicine. Georgetown, Texas: Landes bioscience 2003; (Chapter 1): 1-15.

- Leslie WD, Plourde P. Inflammatory disorders. En: Leslie WD, Greenberg ID: Vademecum of Nuclear Medicine. Georgetown, Texas: Landes bioscience 2003; (Chapter 12): 233-59.

- Lima JET, Maliska C, Goncalves MRB, Lima RC, Corbo R. The radio-labelling of Ciprofloxacin with technetium-99m. World J Nucl Med 2004; 3: 284-289.

- Liberatore M, Clemente M, Iurilli A. Scintigraphic evaluation of disease activity in rheumatoid arthritis: A comparison of technetium-99m human non-specific immunoglobulins, leucocytes and albumin nanocolloid. Eur J Nucl Med 1992; 19: 853-57.

- Loevinger R and Berman M. Revised. Society of Nuclear Medicine of New York 1976; MIRDP Pamphlet No. 1

- Loevinger R, Budinger TF and Watson EE. MIRDP Primer for Absorbed Dose Calculations. Society of Nuclear Medicine of New York; 1988.

- Lomeña F, Píera C. Clinical application of radiolabelled platelets: Kidney and pancreas transplantation. In: Martín-Comin J, Thakur ML, Píera C, Roca M, Lomeña F, eds. Radiolabelled blood elements: Recent advances in techniques and applications. New York: Plenum Press, 1994: 335-38.

- Lorenzen J, Buchert R, Bohuslavizki KH. Value of FDG PET in patients with fever of unknown origin. Nucl Med Commun 2001; 22: 779-83.

- Love C, Palestro CJ. ^{99m}Tc-fanolesomab. I Drugs 2003; 6: 1079-85.

- Love C, Palestro CJ. Radionuclide imaging of infection. J Nucl Technol 2004; 32: 47-57.

- Lupetti A, Welling MM, Mazzi U, Nibbering PH, Pauwels EKJ. Technetium-99m labeled fluconazole and antimicrobial peptides for imaging of *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* infections. Eur J Nucl Med 2002; 29: 674-79.

- Lupetti A, Pauwels EKJ, Nibbering PH, Welling MM. ^{99m}Tc-antimicrobial peptides: promising candidates for infection imaging. J Q Nucl Med 2003; 47: 238-45.

- Mairal L, Lima PD, Martín-Comin J. Simultaneous administration of ^{111}In -human immunoglobulin and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO labelled leucocytes in inflammatory bowel disease. *Eur J Nucl Med* 1995; 22: 664-70.
- Mandell GL, Petri WA. Fármacos antimicrobianos- In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG. Goodman and Gilman- as Bases Farmacológicas de la terapéutica 9 ed. Mexico: McGrawhell 1996: 777-89).
- Marcus C, Thakur M, Huynh T. Imaging rheumatic joint disease with anti-T lymphocyte antibody OKT-3. *Nucl Med Commun* 1994; 15: 824-30.
- Marrero Riverón LO, Alvarez Cambras R, Perera Pintado A, Yera Pérez J, Nicolas Ferrer R, Roché Egües HE et al. Inmunogammagrafía con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IgG policlonal humana inespecífica en el diagnostico de la sépsis ósteo articular. *Rev Cubana Ortop Traumatol* 2003; 17: 7-13.
- Marrero LO. Evaluación de las infecciones bacterianas osteoarticulares con la formulación cubana de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ciprofloxacinas. Tesis de doctorado. Instituto Superior de Ciencias Médicas. Facultad de Medicina " Finlay-Albarrán", 2006.
- Martín-Comín J, Ricart Brulles Y. Medicina Nuclear en el estudio de la inflamación y de la infección. Castro-Beiras JM. Avances en Medicina Nuclear y calidad científico-técnica. Madrid: Conserjería de Sanidad, 2002: 459-79.
- Martins PA, Faintuch BL, Pereira NPS. Optimization of labeling ciprofloxacin with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ and biodistribution in normal and infected rats. *J Nucl Med* 2001; 42: 264._
- Massengill S, Pena D, Drane W, Fennell R, Richard G. Technetium-99m sulfur colloid accumulation as a predictor of acute renal transplant rejection. *Transplantation* 1992; 54: 969-973.
- Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLOS Medicine* [onlinejournal], 2006, 3(11):e442 (<http://medicine.plosjournals.org/perlserv/?request=get-document&doi=10.1371/journal.pmed.0030442>, accessed 29 March 2008).
- Mazzoni G, Lee S, Tomer A, Gittes R. Indium-labeled presensitised T cells for the disgnosis of graft rejection. *J Surg Res* 1992; 52: 85-88.

- McAfee J, Gagne G, Subramanian G, Schneider R. The localization of indium-111-leucocytes, gallium 67, policlonal IgG and other radioactive agents in acute focal inflammatory lesions. *J Nucl Med* 1991; 32: 2126-31.
- Meléndez L, Ramírez F de M, Ferro G, Arteaga C, Pedraza M, Hnatowich DJ. Lys and Arg in UBI: a specific site for stable Tc-99m complex? *Nucl Med Biol* 2003; 30: 605-15.
- Meller J, Kösten G, Liersch T, Siefker U, Lehmann K, Meyer I, et al. Chronic bacterial osteomyelitis: prospective comparison of ¹⁸F-FDG imaging with a dual-head coincidence camera and ¹¹¹In-labeled autologous leukocyte Scintigraphy. *Eur J Nucl Med* 2002; 29: 53-60.
- Morgan J, Williams L, Howard C. Technetium-labelled liposome imaging for deep seated infection. *Br J Radiol* 1985; 58: 35-39.
- Morrel E, Tompkins R, Fischmann A. Autoradiography method for quantization of radiolabelled proteins in tissues using indium-111 *J Nucl Med* 1989; 30: 1538-45.
- Nassander U, Storm G, Peeters P, Crommelin D. Liposomes. In: Chasin M, Langer R, eds. *Biodegradable polymers as drug delivery systems*. New York: Marcel Dekker, 1990: 261-338.
- Nicola N, ed. *Guidebook to cytokines and cytokines receptors*. Oxford: Oxford University Press, 1994.
- Nijhof MW, Oyen WJ, Kampen A van, Claessens RA, Meer JW van der, Corstens FHM. Evaluation of infections of the locomotors system with indium-111-labeled human IgG scintigraphy. *J Nucl Med* 1997; 38:1300-5.
- Normas y procedimientos para el control de calidad de radiofármacos. ARCAL XV. Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) 1999.
- *Nuclear Medicine Technology and Techniques* 1997. 3rd Edition. Pub: Mosby
- Oh SJ, Ryu J S, Shin JW, Yoon EJ, Cheon HJH, Lee HK et al. Synthesis of ^{99m}Tc-ciprofloxacin by different methods and its biodistribution. *Applied Radiation and Isotopes* 57 (2002) 193-200.
- OIEA-ARCAL XV. *Manual de protocolos de calidad de radiofármacos*. Organismo Internacional de Energía Atómica, 1999; pp 20-21.

- Oliva González JP, Borrón Molinos MC, Castro-Beiras JM, Baun RP. Gammagrafía inmunológica. Aplicaciones oncológicas y no oncológicas. Castro-Beiras JM. Avances en Medicina Nuclear y calidad científico-técnica 2002; 733-76.
- Oyen W, Boerman O, Claessens R, van der Meer J, Corstens F. Is somatostatin receptor scintigraphy suited to detection of acute infection disease? Nucl Med Commun 1994; 15: 289-93.
- Oyen W, Claessens R, Van der Meer J, Corstens F. Biodistribution and kinetics of radiolabelled proteins in rats with focal infection J Nucl Med 1992; 33: 338-94.
- Oyen W, Mansi L. FDG PET in infectious and inflammatory disease. Against. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2003; 30: 1568-70.
- Paganelli G, Magnani P, Zito F. Three-step monoclonal tumor targeting in carcinoembryonic antigen positive patients. Cancer Res 1991; 51: 5960-66.
- Palestro CJ, Love C, Tronco GG and Thomas MB. Role of radionuclide imaging in the diagnostic of postoperative infection. Radiographics 2000; 20: 1649-60.
- Palestro CJ, Kipper SL, Weiland FL, Love C, Tomas MB. Osteomyelitis: diagnosis with ^{99m}Tc-labelled antigranulocyte antibodies compared with diagnosis with ¹¹¹In-labelled leukocytes. Initial experience. Radiology 2002; 223: 758-64.
- Palmedo H, Schmitz A, Risse J, Reinhardt MJ, Krause T, Matthies A, et al. Positron emission tomography with fluorine-18 deoxyglucose in the diagnosis of spondylidiscitis. Eur J Nucl Med 2001; 28: 987.
- Peers S, Tran L, Erickson S, Ballinger J, Goodbody A. Imaging a model of colitis with RP128, a Tc-99m-chelates tuftsin antagonist (abstract). J Nucl Med 1995; 36: 114P.
- Peñuelas Sánchez I. Radiofármacos PET. Rev Esp Med Nuclear 2001; 20: 477-98.
- Perera A, Pérez C, Torres MB, Hernández A, Heres FC, Moreira T, Gutierrez A, Gigato A, Hernández I, Alberdi L, Marrero O, Martínez L, Sanfiz JM, Sánchez E, Rodríguez J, Marrero LO, Parra G. A kit of human polyclonal IgG for the diagnosis of infectious processes. Journal of radioanalytical Nuclear Chemistry, Vol. 240. No. 2 (1999) 481-87.
- Perin E, Pittet J, Hofschir D. Scintigraphy potential of J001X acylated poligalactoside for imaging inflammatory lesions in pigs. Nucl Med Biol 1993; 20: 963-71.
- Peters A. The utility of ^{99m}Tc-HMPAO-leucocytes for imaging infection. Sem Nucl

Med 1994; 24: 110-27.

- Pickhardt PJ, Shapiro B. Three phase esquelletal scintigraphy in gouty arthritis. An example of potential diagnostic pitfalls in radiopharmaceutical image of the extremities for infection. Clin Nucl Med 1996; 21: 33-9
- Procedimiento Normalizativo de Trabajo con Animales. No. 000. Guía para el cuidado de animales de laboratorio.
- Procedimiento Normalizativo de Trabajo con Animales. No. 011. Cuarentena.
- Procedimiento Normalizativo de Trabajo con Animales. No. 009. Peso corporal de los ratones.
- Procedimiento Normalizativo de Trabajo con Animales. No. 005. Alimentación de rutina.
- Procedimiento Normalizativo de Trabajo Técnico. No. 006. Suministro de agua manual de rutina.
- Procedimiento Normalizativo de Trabajo Técnico. No. 014. Administración intravenosa en ratón.
- Procedimiento Normalizativo de Trabajo con Animales. No. 010. Eutanasia.
- Procedimiento Normalizativo de Trabajo Técnico. No. 0600 al 0622. Técnicas de Anatomía Patológica.
- Postema P, Wijngaarde R, Vandenbosch W. Follow up in In-111-DTPA-d-Phe-1-octreotide scintigraphy in thyroidal and orbital Graves' disease (abstract). J Nucl Med 1995; 36: 203P.
- Qu T, Wang Y, Zhu Z, Rusckowski M, Hnatowich DJ. Different chelators and different peptides together influence the in vitro and mouse in vivo properties of ^{99m}Tc. Nucl Med Communications 2001; 22: 203-215.
- Renner HJJM, Boerman OC, Oyen WJG, Corstens FHM. Imaging infection/inflammation in the new millennium. Eur J Nucl Med 2001; 28:241-52.
- Resnick D. Osteomielitis, artritis séptica e infección de partes blandas: mecanismos y situaciones. En: Resnick D. Huesos y articulaciones en imágenes. 2^{da} ed. Madrid: Marban; 1998; cap. 59: 649-73.
- Reubi J. Neuropeptide receptors in health and disease: The molecular basic for in-vivo imaging. J Nucl Med 1995; 36: 1825-35.

- Reubi J, Waser B, Horisberger U. In-vitro autoradiography and in-vivo scintigraphy localization of somatostatin receptors in human lymphatic tissue. *Blood* 1993; 82: 2143-2151.
- Roitt I. *Essential immunology*, 8th end. Oxford: Blackwell Scientific, 1994.
- Rubello D, Casara D, Maran A, Avogaro A, Tiengo A, Muzzio PC. Role of antigranulocyte Fab' fragment antibody scintigraphy (LeukoScan) in evaluating bone infection: acquisition protocol, interpretation criteria and clinical results. *Nucl Med Commun* 2004; 25: 39-47.
- Rubin R, Young L, Hansen P. Specific and nonspecific imaging of localized Fisher immunotype 1. *Pseudomonas aeruginosa* infection with radiolabelled monoclonal antibody. *J Nucl Med* 1988; 29: 651-56.
- Rubin R, Fischman A, Needleman M. Radiolabelled, nonspecific, polyclonal human immunoglobulin in the detection of focal inflammation by scintigraphy: Comparison with gallium-67 citrate and technetium-99m-labelled albumin. *J Nucl Med* 1989; 30: 385-89.
- Rusckowski M, Fritz B, Hnatowich DJ. Localization of infection using streptavidin and biotin: An alternative to nonspecific polyclonal immunoglobulin. *J Nucl Med* 1992; 33: 1810-15.
- Rusckowski M, Paganelli G, Hnatowich DJ, Magnani P, Virzi F, Forgarasi M et al. Imaging osteomyelitis with streptavidin and Indium-111-labeled biotin. *J Nucl Med* 1996; 37: 1655-62.
- Ryan PJ. Leukoscan for orthopaedic imaging in clinical practice. *Nucl Med Commun* 2002; 23: 707-14.
- [Samad A](#), [Sultana Y](#), [Khar RK](#), [Aqil M](#), [Kalam MA](#), [Chuttani K](#), [Mishra AK](#). Radiolabeling and evaluation of alginate blend-isoniazid microspheres by 99mTc for the treatment of tuberculosis in rabbit model. [J Drug Target](#). 2008 Jul; 16:509-15.
- Samuel A, Paganelli G, Chiesa R. Detection of prosthetic vascular graft infection using avidin / Indium-111-labeled biotin scintigraphy. *J Nucl Med* 1996; 37: 55-61.
- Saptogino A, Becker W, Wolf F. 99m-Tc-labelled polyclonal human immunoglobulin for localization of inflammatory sites: Early in vitro results. *Nucl Med* 1989; 29: 54-55.
- Saverymuttu S, Peters A, Crofton M. 111-Indium autologous granulocytes in the

detection of inflammatory bowel disease. *Gut* 1985; 26: 955-60.

- Schrijver MD, Streule K, Senekowitsch R, Fridrich R. Scintigraphy of inflammation with nanometer-sized colloidal tracers. *Nucl Med Commun* 1987; 8: 895-908.

- Sciuk J, Brandau W, Vollet B. Comparison of technetium-99m polyclonal immunoglobulin and technetium-99m monoclonal antibodies for imaging chronic osteomyelitis. *Eur J Nucl Med* 1991; 18: 401-07.

- Semenzato G, Zambello R, Pizzolo G. Interlekin-2 receptor expression in health and disease. In: Waxman J, Balkwill F, eds. *Interleukin-2*. Oxford: Blackwell Scientific, 1992: 78-105.

- Shafiq YF, al-Hissoni MH, Jassim MH. The influence of experimental conditions on the preparation of ^{99m}Tc-pyrrolidino-methyl tetracycline (^{99m}Tc-PMT) in the form of an instant kit. *Nuklearmedizin*. 1988 Aug; 27: 154-6.

- Shimizu Y, Newman W, Tanaka Y, Shaw S. Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunology Today* 1992; 13:106-12

- [Shiozaki T](#), [Hayakawa K](#), [Tanikake M](#), [Oida T](#), [Hida S](#), [Yasui H](#), [Urata Y](#), [Tanaka A](#), [Morimoto T](#). Accumulation of ^{99m}Tc-PMT in renal metastasis of hepatic cellular carcinoma. *Ann Nucl Med* 2003; 17: 333-6.

- Siaens RH, Rennen HJ, Boerman OC, Dierckx R and Slegers G. Synthesis and Comparison of ^{99m}Tc-Erofloxacin and ^{99m}Tc-Ciprofloxacin. *Journal of Nuclear Medicine* 2004; 45: 2088-94.

- Siccardi A, Buraggi G, Callegaro L. Immunoscintigraphy of adenocarcinoma by means of radiolabelled F(ab')₂ fragments of an anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibody: A multicenter study. *Cancer Res* 1989; 49: 3095-3103.

- Sierra JM, Rodríguez-Puig D, Soriano A, Mensa J, Piera C, Vila J. Accumulation of ^{99m}Tc-ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* 2008; 52: 2691-92.

- Signore A, Barone R, Procaccini E. In vivo measurement of immunoglobulin accumulation in the pancreas of recent onset type 1 diabetic patients. *Clin Exp Rheumatol* 1996; 14(suppl. 15):S41-S45.

- Signore A, Chianelle M, Ferretti E. Use of ¹²³I interleukin-2 for in-vivo detection of

activated lymphocytes in chronic inflammatory conditions (abstract). *Eur J Nucl Med* 1993; 20: 834 ⁽¹⁾.

- Signore A, Chianelle M, Ferretti E. In vivo imaging of activated lymphocytes in the pancreas of newly diagnosed diabetic patients (abstract). *Diabetologia* 1993; 36: A36 ⁽²⁾.

- Signore A, Chianelli M, Toscano A. A radiopharmaceutical for imaging areas lymphocytic infiltration, 123I-interleukin-2 labelling procedure and animal studies. *Nucl Med Commun* 1992; 13: 713-22.

- Signore A, Parman A, Pozzilli P, Andreani D, Beverley P. Detection of activated lymphocytes in endocrine pancreas of BB/W rats by injection of 123-iodine-labelled interleukin-2: An early sign of Type1 diabetes. *Lancet* 1987; ii: 536-40.

-Signore A, Picarrelli A, Miauri L. 123I-IL-2 for in-vivo detection of activated lymphocytes: A scintigraphy and histological study in coeliac patients (abstract). *Eur J Nucl Med* 1995; 22: 794.

- Signore A, Picarelli A, Chianelli M. 123I-interlekin-2 scintigraphy: A new approach to assess disease activity in autoimmunity. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1996; 9: 139-144.

- Silvester D, Waters S. Dosimetry of radiolabelled white blood cells. *Int J Nucl Biol* 1983; 10: 141-144.

- Snyder WS, Ford MR, Warner GG and Watson SB. "S" absorbed dose per unit cumulated activity for selected radionuclides and organs. Society of Nuclear Medicine of New York 1975; MIRD Pamphlet No. 11.

- Snyder WS, Ford MR, Warner GG and Fisher HL. Estimates of absorbed fractions for monoenergetic photon sources uniformly distributed in various organs of a heterogeneous phantom. In: *Medical Internal Radiation Dose (MIRD)* Society of Nuclear Medicine of New York 1978: 50-67.

- Sohn M, Jones B, Whiting JJ. Distribution of gallium 67 in normal and hipotransferrinemic tumor-bearing mice. *J Nucl Med* 1993; 34: 2135-43.

- Solanki KK, Bonsanji J, Siraj K, Small M, Britton KE. 99mTc-Infecton. A new class of radiopharmaceutical for imaging infection. *J Nucl Med* 1993; 34: 119.

- Spinelli F, Milella M, Sara R. The value of Tc-99m labelled human immunoglobulin scanning in the evaluation of Crohn's disease (abstract). *Eur J Nucl Med* 1990; 16: 436.

- Stabin MG, Siegel JA " Physical models and dose factors for use in internal dose

assessment " Health Physics 2003; 85(3): 294-314.

- Stabin MG. Patient dose from diagnostic and therapeutic radiopharmaceuticals. In: Internal Radiation Dosimetry: Health Physics Society, Summer School (Edited by Raabe OG) 1994: 375-392.

- Streule K, Schrijver MD, Fridrich R. ^{99m}Tc-labelled HSA nanocolloid versus ¹¹¹In oxine-labelled granulocytes in detecting skeletal septic processes. Nucl Med Commun 1988; 9: 56-67.

- Stumpe KDM, Dazzi H, Schaffner A, Schulthenss GK von. Infection imaging using whole body FDG-PET. Eur J Nucl 2000; 27: 822-32.

- Styles C, Schmidt R, Holt S. Detection abscesses with diffusible tracers. Int J Nucl Med Biol 1985; 12: 145-49.

- Sulavik S, Spencer R, Palestro C. Specificity and sensitivity of distinctive chest radiographic and/or ⁶⁷Ga images in the noninvasive diagnosis of sarcoidosis. Chest 1993; 103: 403-09.

- Swift R, Danpure H, Osman S. Imaging of metastatic colorectal cancer with tumour activated killer lymphocytes. Lancet 1991; 337:1511-12.

- Thakur M, Coleman R, Welch M. Indium-111-labeled leukocytes for the localization of abscesses: Preparation, analysis, tissues distribution and comparison with gallium ⁶⁷ citrate in dogs. J Lab Clin Med 1977 ⁽¹⁾; 89: 217-228.

- Thakur M, De Fulvio J, Park C. Evaluation of Tc-^{99m}-labelled proteins for localization of inflammation: Comparison with I-125-TNT and Ga-⁶⁷ citrate (abstract). J Nucl Med 1990; 31:810.

- Thakur M, Marcus C, Henneman P. Imaging inflammatory disease with neutrophil-specific technetium-^{99m}-labeled monoclonal antibody anti-SSEA1. J Nucl Med 1996; 37: 1789-95.

- Thakur M, Marcus CS, Kipper SL, Ahdoot R, Diggles L, Pham HL, et al. Imaging infection with LeuTech[®]. Nucl Med Commun 2001; 22: 513-9.

- Thakur M, McAfee J. The significance of chromosomal aberrations in indium-111-labelled lymphocytes. J Nucl Med 1984; 25: 922-27.

- Thakur M, Segal A, Louis L. Indium-111-labeled cellular blood components: Mechanism of labelling and intracellular location in human neutrophils. J Nucl Med 1977

⁽²⁾; 18: 1022-1026.

- Thedrez P, Paineau J, Jacques Y. Biodistribution of an anti-interleukin 2 receptor monoclonal antibody in rat recipients of a heart allograft, and its use as a rejection marker in gamma scintigraphy. *Transplantation* 1989; 48: 367-371.
- Thierens H, Vral A, Haelst JV. Lymphocyte labelling with technetium -99m-HMPAO: A radiotoxicity study using the micronucleus assay. *J Nucl Med* 1992; 33: 1167-1174.
- Van der Laken C, Boerman O, Oyen W. Different behaviour of radioiodinated human recombinant interleukin-1 and its receptor antagonist in animal model of infection. *Eur J Nucl Med* 1996; 23:1531-35.
- Van Hagen M, Breeman W, Reubi J. Visualization of the thymus by substance P receptor scintigraphy in man. *Eur J Nucl Med* 1996; 23: 1508-13.
- Van Hagen P, Krenning E, Reubi J. Somatostatin analogue scintigraphy in granulomatous disease. *Eur J Nucl Med* 1994; 21: 497-502 ⁽¹⁾.
- Vinjamuri S, Hall AV, Solanki KK, Bomanji J, Siraj Q, O'Shaughnessy E, Das EE, Britton KE. Comparison of ^{99m}Tc infecton imaging with radiolabelled white cell imaging in the evaluation of bacterial infection. *Lancet* 1996; 347: 233-235.
- Wagstaff J, Gibson C, Thatcher N. A method for following human lymphocyte traffic using indium-111 oxine labelling. *Clin Exp Immunol* 1981 ⁽¹⁾; 43: 435-42.
- Wagstaff J, Gibson C, Thatcher N. Human lymphocyte traffic assessed by indium-111 oxine labelling: Clinical observations. *Clin Exp Immunol* 1981⁽²⁾; 43: 443-49.
- Wassie E, Buscombe J, Miller R, Ell P. 67-Ga scintigraphy in HIV antibody positive patients: A review of its clinical usefulness. *Br J Radiol* 1994; 67: 349-52.
- Welling MM, Paulusma-Annema A, Balter HS, Pauwels EK, Nibbering PH. Technetium-99m-labeled antimicrobial peptides discriminate between bacterial infection and sterile inflammation. *Eur J Nucl Med* 2000; 27: 292-301 ⁽¹⁾.
- Welling MM, Monguera S, Lupetti A, Balter HS, Bonetto V, Mazzi U, et al. Radiochemical and biological characteristics of ^{99m}Tc-UBI 29-41 for imaging of bacterial infection. *Nucl Med Biol* 2002; 29: 413-22.
- Weon YC, Yang SO, Choi YY, Shin JW, Ryu JS, Shin MJ, et al. Use of ^{99m}Tc-HMPAO leukocytes scans to evaluate bone infection: incremental value of additional SPECT images. *Clin Nucl Med* 2000; 25: 519-26.

- Wheeler J, Slack N, Duncan A, Palmer H, Harvey R. Tc99m-nanocolloids in inflammatory bowel disease. Nucl Med Commun 1990; 11: 127-33.
- Williams B, O'Sullivan M, Saggi G. Synovial accumulation of technetium labeled liposomes in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 1987; 46: 314-18.
- Winter F de, Wiele C van de, Dumont F, Durme J van, Solanki K, Britton KE, et al. Biodistribution and dosimetry of ^{99m}Tc-ciprofloxacin, a promising agent for the diagnosis of bacterial infection. Eur J Nucl Med 2001; 28: 570-4 ⁽¹⁾.
- Winter F de, Wiele C van de, Vogelaers D, Smet K de Verdonik R, Dierckx RA. Fluorine 18 fluorodeoxyglucose-positron emission tomography: a highly accurate imaging modality for the diagnosis of chronic musculoskeletal infections. J Bone Surg (Am) 2001; 83: 651-60 ⁽²⁾.
- Wolf G, Aigner RM, Schwarz T. Diagnosis of bone infection using ^{99m}Tc-HMPAO-labelled leukocytes. Nucl Med Commun 2001; 22: 1201-6.
- World Health Statistic, World Health Organization, 2008.
- World mortality report 2007 [CD-ROM Edition]. New York, United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division, 2007.
- [Yamada N](#), [Takashima H](#), [Nohara F](#), [Fujinawa T](#), [Matsumura T](#), [Koizumi K](#), [Hisada K](#). Investigation of ^{99m}Tc tumor seeking agents-usefulness of ^{99m}Tc-soniazid. [Radioisotopes](#). 1987 Oct; 36: 505-11.
- Zakhireh B, Thakur M, Maleh H. Indium-111-labeled polymorphonuclear leucocytes: Viability random migration, chemotaxis, bactericidal capacity and ultrastructure. J Nucl Med 1979; 20: 741-47.
- Zayas F, Calzadilla E, Rodríguez ME, Pérez A, Hernández A, Jordan G y Garcia L. Optimización de la recuperación del ^{99m}Tc-ciprofloxacin. Rev Esp Med Nuclear 2000; 19: 92-3.
- Zayas Crespo F. Nuevas moléculas biológicas y calidad de radiofármacos. En: Castro Beiras JM. Avances en Medicina Nuclear y Calidad Científico-Técnica 2002: 25-42.
- Zhuang H, Chaco T, Hickerson M, Stevenson K, Ponzo F, et al. Persistent non-specific FDG uptake on PET imaging following hip arthroplasty. Eur J Nucl Med 2002; 29: 1328-33.

- Zoghbi S, Thakur M, Gottschalk A. Selective cell labelling: A potential radioactive agent for labelling of human neutrophils (abstract). J Nucl Med 1981; 22: 32P.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA DEL AUTOR, RELACIONADA CON EL TEMA:

I. Publicaciones.

1- A kit of human polyclonal IgG for the diagnosis of infectious processes. A. Perera, C. Perez, M.B. Torres, A. Hernández, F.C. Heres, T. Moreira, A. Gutierrez, A. Gigato, I. Hernández, L. Alberti, O. Marrero, L. Martinez, J.M. Sanfiz, E Sánchez, J Rodriguez, L.O. Marrero, G.Parra. Journal of radioanalytical Nuclear Chemistry, Vol. 240. No. 2 (1999) 481-87.

2- Optimización de la recuperación de la ^{99m}Tc -Ciprofloxacina en Sephadex. Rev. Esp. Med. Nuclear 19. 2 (92-93). 2000. F. Zayas, E. Calzadilla, M.E. Rodríguez, A. Pérez. A. Hernández.

- 3- Nueva formulación para marcar ciprofloxacina con ^{99m}Tc . Revista Española de Medicina Nuclear ,2005: 24(5): 364-5. A. Hernández, A. Perera, A. Prats, L.A Torres, J.F. Batista, L.O. Marrero, Y. Valdivia.
- 4- Marcaje de ciprofloxacina con ^{99m}Tc para el diagnostico de infección activa. Abel Hernández, Alejandro Perera, Alejandro Alberti, Yolicé Valdivia, Leidis Alberdi, Anais Prats, Mildrey Morgan, Marcos Coca y Marilyn Pérez. Revista CENIC Ciencias Biológicas. Vol 36 No. Especial, 2005.
- 5- Imagen de sépsis asociada a una histiocitosis X. A. Hernández, C. Casacó, J.F. Batista, A. Prats, MA Coca y M Pérez. Revista Española de Medicina Nuclear 2008; 27 (3): 205-6.
- 6- Biodistribución y Farmacocinética de la ^{99m}Tc -ciprofloxacina obtenida de una formulación modificada. Abel Hernández, Alejandro Perera, Yolicé Valdivia y Anaís Prats. ALASBIMN JOURNAL (Aceptada en Julio de 2009 para publicar en Enero del 2010).

II. Trabajos presentados en eventos.

1. TALLER DE FARMACOLOGIA. "Kit de IgG policlonal humana no específica para el diagnostico in vivo de procesos infecciosos". IFAL, 1996.
2. Introducción de un nuevo radiofármaco en la detección de focos sépticos en hueso. Ortopedia 2000.
3. Evaluación preclínica y primeras experiencias clínicas en Cuba con la ^{99m}Tc ciprofloxacina en el diagnostico de infección activa. International Seminar- First National Workshop " Use and Development of health Related Industrial Isotopes Products" (2000)
4. Detección de sépsis músculo esquelética. Estado Actual. VI Jornada Provincial de Ortopedia, Ciudad de La Habana, 2002

5. Evaluación preclínica de la ^{99m}Tc -ciprofloxacina en el diagnóstico de infección activa. CUBAFARMACIA, 2002
6. ^{99m}Tc -ciprofloxacina para el diagnóstico de infección activa. Second International Seminar. Second National Workshop. Use and development of health related industrial isotope products, 2002.
7. ^{99m}Tc - ciprofloxacina para el diagnóstico de infección activa. XV Forum de ciencia y técnica. Centro de Investigaciones Clínicas, 2003
8. Use of stannous fluoride (II) like reducer for ^{99m}Tc -labelling ciprofloxacina. Pharmacokinetic and biodistribution in animals. International Symposium on Trends in Radiopharmaceuticals (ISTR-2005) Vienna Austria.
9. Marcaje de ciprofloxacina con ^{99m}Tc para el diagnóstico de infección activa. 14 Congreso Científico. CENIC, 2005
10. Marcaje del fragmento 29-41 de la ubiquidina con ^{99m}Tc . Comparación de dos métodos. CENTIS, 2006.

III. Actividades de investigación y desarrollo.

1. Tesis de grado " KIT DIAGNOSTICO DE INMUNOGLOBULINA G POLICLONAL HUMANA NO ESPECIFICA PARA USO IN VIVO " Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL) 1995.
2. Tutor de una tesis de grado. Facultad de Biología. Universidad de la Habana (curso 1999-2000). " Radiomarcaje de la ciprofloxacina con ^{99m}Tc por dos métodos y su empleo en la detección in vivo de focos sépticos "
3. Proyecto Ramal Nuclear: "Ciprofloxacina radiomarcada con ^{99m}Tc por dos métodos diferentes para diagnosticar focos sépticos in vivo a través de imágenes gammagráficas" PRN/1-2/1-2002.CIC.

ANEXOS

Anexo 1

Escala de graduación para el modelo de la vena de la cola del ratón.

Observaciones macroscópicas

Grado	Observación
0	Normal, los cambios que se aprecian son los asociados con el trauma ocasionado por la administración
1	Ligero enrojecimiento, la irritación se limita al área del sitio de administración en la cola
2	Rojo sin inflamación pero que envuelve del 25 al 100% de la cola.

3	Rojo profundo a púrpura con inflamación discernible.
4	Púrpura pronunciado e inflamación

Anexo 2

Escala de graduación de los hallazgos histopatológicos en los animales.

PERDIDA ENDOTELIAL	
Grado	Observación
0	Ninguna
1	Menos del 25%
2	Entre 25-75%
3	Mayor del 75%
INFLAMACION PERIVASCULAR	
Grado	Observación
0	Ninguna
1	Algunos leucocitos perivasculares
2	Colección focal de leucocitos perivasculares

3	Amplias bandas de leucocitos perivasculares
TROMBOSIS VASCULARES	
Grado	Observación
0	Ninguna
1	Pequeños tacos de fibrina
2	Trombos con parcial obstrucción
3	Trombos con completa o casi completa obstrucción.