

^{99m}Tc -CIPROFLOXACINA: SU PUREZA RADIOQUÍMICA, BIODISTRIBUCIÓN E IMPLICANCIAS EN PROTECCIÓN RADIOLÓGICA

L. R. Calcagni¹, V. M. Sanz¹, S. Rozanskas³, L. H. Illanes², y C. Y. Chain¹

¹Cátedra de Técnicas en Radioanálisis - Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. cc67. 1900. La Plata, Buenos Aires, Argentina. yamil.chain@gmail.com

²Cátedra de Física de la Medicina Nuclear - Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. cc67. 1900. La Plata, Buenos Aires, Argentina. lh.illanes@gmail.com

³CIMED-Alta Complejidad Médica. 5 N° 416 e/40 y 41. 1900- La Plata, Buenos Aires, Argentina.

RESUMEN

La ciprofloxacina marcada con ^{99m}Tc es uno de los radiofármacos más utilizados en nuestro medio para la detección de procesos infecciosos. Este antibiótico está disponible como un liofilizado para su posterior marcación radiactiva con ^{99m}Tc en los Servicios de Medicina Nuclear. Su utilización ha sido impulsada por su bajo costo en comparación con otros radiofármacos como el citrato de ^{67}Ga , o los antibióticos marcados con ^{111}In , destinados al mismo propósito diagnóstico. Sin embargo, pese a su abundante utilización, persisten controversias sobre su rendimiento diagnóstico, su sensibilidad y especificidad.

En la práctica médica se observa que las imágenes obtenidas con dicho radiofármaco evidencian, en muchos casos, una falta de selectividad en la localización de la marca radiactiva que conlleva dificultades en la realización de un diagnóstico adecuado. Entre las posibles causas de la falta de selectividad pueden contarse mecanismos de localización inespecíficos así como malas marcaciones del fármaco. Aún con estas limitaciones, su uso sigue siendo la opción más plausible para muchos especialistas.

El objetivo de este trabajo es evaluar conjuntamente la pureza radioquímica de preparaciones de ^{99m}Tc -ciprofloxacina (mediante cromatografía de adsorción) y la biodistribución del radiofármaco (a través del análisis semicuantitativo de los centellogramas) tratando de establecer una relación entre ellas. Los resultados se analizarán en función de la protección radiológica del paciente.

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones bacterianas son una de las causas principales de mortalidad y morbilidad a nivel mundial. Para colaborar en el diagnóstico y establecer la necesidad o no de un tratamiento antimicrobiano, en determinados contextos clínicos se recomienda el uso de estudios de medicina nuclear en pacientes que presentan fiebre con causas desconocidas o infecciones bacterianas. Algunos de los primeros métodos usados para detectar infecciones presentaban una sensibilidad relativamente buena pero poca especificidad, tal es el caso de las imágenes obtenidas con ^{67}Ga -citrato [1]. Otro método gammagráfico que se empleó extensamente para detectar procesos infecciosos (exclusivamente localizados en el hueso) fue el muy generalizado centellograma óseo con ^{99m}Tc -metildifosfonato (^{99m}Tc -MDP). Este radiofármaco marca con altísima sensibilidad cualquier evento que acelere el recambio óseo. Desde una fractura hasta una metástasis, cualquier noxa, y por supuesto una infección, aceleran el metabolismo óseo y son detectadas por un centellograma con ^{99m}Tc -MDP. Pero la hiperactividad del ^{99m}Tc -MDP, extremadamente sensible, es muy inespecífica. Marcará sí, una infección en el hueso, pero no podrá distinguirla de un mero proceso inflamatorio, ni podrá diferenciar el proceso infeccioso activo del proceso de curación, en que el recambio

óseo permanece acelerado. La gammagrafía con ^{99m}Tc -ciprofloxacina ha demostrado actualmente ser de utilidad para diferenciar entre esos tipos de condiciones patológicas.

El marcaje de antibióticos permite obtener un radiofármaco de alta especificidad diagnóstica selectivo del proceso infeccioso, que presenta imagen positiva ante infección y negativa en procesos inflamatorios. El radiofármaco ^{99m}Tc -ciprofloxacina fue el primer trazador que se diseñó para diferenciar infección de inflamación estéril, por su unión a bacterias vivas [2].

El radiofármaco ^{99m}Tc -ciprofloxacina se prepara en el Servicio de Medicina Nuclear, a partir de la reconstitución con ^{99m}Tc -pertenecniato estéril y apirógeno de un polvo liofilizado comercial que contiene la molécula a marcar y los reactivos necesarios para que la radiomarcación ocurra con alto rendimiento (reductores, antioxidantes, buffers) así como bactericidas u otros agregados. El reductor que se incluye en los kits locales es cloruro estannoso, del cual se señala como principal desventaja que acarrea la formación de especies coloidales de ^{99m}Tc [3,4]. Si bien en otros países se realiza, luego de la reconstitución, una filtración de la preparación a través de poros de $0,22\ \mu\text{m}$ [3], en nuestro país los kits comerciales [5,6] no incluyen ni recomiendan una filtración del producto como paso final de la síntesis.

Antes de la administración del radiofármaco al paciente, se debe controlar la pureza radioquímica de la preparación. Es necesario que dicho parámetro sea mayor al 90 %, caso contrario no debe utilizarse el kit y debe descartarse la preparación [5,6]. Se ha reportado un control de pureza radioquímica que implica la realización de una cromatografía ascendente en capa delgada utilizando como fase estacionaria sílica gel y como fase móvil la mezcla de solventes diclorometano (CH_2Cl_2), metanol (CH_3OH), hidróxido de amonio (NH_4OH) al 25 % y acetonitrilo (CH_3CN) en una relación 2:2:1:0,5 v/v que logra la migración del radiofármaco ^{99m}Tc -ciprofloxacina más allá del punto de siembra ($R_f = 0,7$) [7]. La polaridad de dicho solvente de corrida es compatible con la migración del “tecnecio libre” con el frente de solvente y la retención de los coloides de tecnecio (altamente polares) en el punto de siembra, logrando separar totalmente a la especie deseada de sus impurezas radioquímicas.

Los kits disponibles en la Argentina para preparar ^{99m}Tc -ciprofloxacina recomiendan controlar la pureza radioquímica a través de la realización de una cromatografía ascendente en capa delgada utilizando como fase estacionaria sílica gel y como fase móvil metiletilcetona [5, 6]. En los prospectos se especifica que en este sistema las especies ^{99m}Tc -coloides y ^{99m}Tc -ciprofloxacina quedan retenidas en el punto de siembra mientras que el ^{99m}Tc -pertenecniato (“tecnecio libre”) migra con el frente de solvente. En otras palabras, con la corrida cromatográfica recomendada por los fabricantes sólo podría ponerse de manifiesto la existencia de impurezas radioquímicas de “tecnecio libre”, ya que los radiocoloides y ^{99m}Tc -ciprofloxacina no logran separarse. Controles de calidad previos utilizando dicho solvente evidenciaron la ausencia de “tecnecio libre” en las preparaciones de ^{99m}Tc -ciprofloxacina [8].

La captación normal de este radiofármaco es en riñones y vejiga, moderada captación en hígado y bazo y negativa en hueso. El principio activo del fármaco 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 e inhibe la replicación celular. Por lo tanto, el antibiótico marcado con un radioisótopo podría comportarse, en principio, como su especie nativa y unirse selectivamente sobre las bacterias vivas y de esta manera aportar imágenes gammagráficas de sitios infecciosos activos [9].

Entre los parámetros que pueden cuantificarse en una imagen de Medicina Nuclear pueden mencionarse la relación lesión/fondo y la radiactividad localizada en un área de interés respecto a las cuentas totales. Respecto al primer punto, cabe recordar que las imágenes obtenidas en medicina nuclear son expresión de un fenómeno estadístico, la radioactividad de ciertos radioisótopos. Cuanto mayor sea la relación “blanco/fondo” o “lesión/fondo”, mejor será la estadística y más significativas las posibilidades diagnósticas de la imagen. Cuanto más específica sea la radiomarcación del liofilizado, más ceñida estará la biodistribución al fenómeno que pretendemos evidenciar optimizando de esa manera la relación lesión/fondo.

El análisis convencional de las imágenes, supone comparar el área donde se sospecha una captación anormal del radiofármaco, con una zona homóloga, que se presupone normal. En la práctica cotidiana, se considera suficiente la observación visual. Si se desea precisar el hallazgo, se documenta el contraste mediante fórmulas que vinculan la cantidad de cuentas detectada en las respectivas áreas de interés (ROI) y la expresan como porcentaje. La más habitual es:

$$\text{Cuentas en la lesión} - \text{Cuentas fondo} / \text{Cuentas en la lesión} + \text{Cuentas fondo} \quad (1)$$

Para esto basta con adquirir una vista del área sospechosa y de un área contralateral comparativa. Sin embargo, dado que en el presente trabajo se intentará evaluar la biodistribución, todos los estudios incluyeron barridos de cuerpo entero, además de la vista planar de la región sospechosa de infección.

En este trabajo 1) se preparó ^{99m}Tc -ciprofloxacina a partir de liofilizados comerciales, siguiendo las instrucciones del fabricante 2) se filtró el radiofármaco preparado a través de poros de $0,22 \mu\text{m}$, 3) se evaluó la pureza radioquímica de las preparaciones filtradas y sin filtrar mediante cromatografía en capa delgada utilizando como fase estacionaria sílica gel y como fase móvil la mezcla diclorometano, metanol, hidróxido de amonio al 25 % y acetonitrilo en una relación 2:2:1:0,5 v/v y como fase móvil metiletilcetona, 4) se obtuvieron centellogramas de cuerpo entero y de zonas sospechadas de infección, 5) se cuantificó la marca radiactiva localizada en la lesión y respecto al área contralateral y se calculó el “contraste” entre ellas, 6) se confrontaron las cuentas totales acumuladas en todo el cuerpo, con las reunidas en el área de la eventual lesión y 7) se interpretaron los hallazgos en función de la protección radiológica del paciente.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Preparación de ^{99m}Tc -ciprofloxacina y filtración

El radiofármaco se preparó según las indicaciones del fabricante, por reconstitución del polvo liofilizado con una solución estéril y apirógena de ^{99m}Tc - perteceneiato de sodio de aproximadamente 15 mCi. Luego de la reconstitución el radiofármaco fue filtrado a través de un filtro de jeringa estéril, de $0,22 \mu\text{m}$ de tamaño de poro.

2.2. Determinación de la pureza radioquímica

La pureza radioquímica de cinco preparaciones de ^{99m}Tc -ciprofloxacina se determinó por cromatografía ascendente en capa delgada. Como fase estacionaria se emplearon tiras de gel de sílice (SiO_2) ("Merck" 5554 de Silicagel 60 con Indicador F254 sobre aluminio) de una longitud de 13 cm. Como fase móvil se utilizó una solución compuesta por los solventes diclorometano, metanol, hidróxido de amonio al 25 % y acetonitrilo en una relación 2:2:1:0,5. En dicho sistema, la relación de frentes para las posibles especies químicas de la preparación radiofarmacéutica son [10] R_f ^{99m}Tc - coloides= 0, R_f ^{99m}Tc - ciprofloxacina = 0,7 y R_f de ^{99m}Tc - pertechnetato ("tecnecio libre)= 1.

2.1.1 Procedimiento

En la tira cromatográfica se marcaron con lápiz, antes de la corrida, el punto de siembra, el frente de solvente y tres líneas de corte (que definirán, luego de la corrida, cuatro fracciones de distintos rangos de R_f). El esquema de dichas marcas se muestra en la Figura 1.

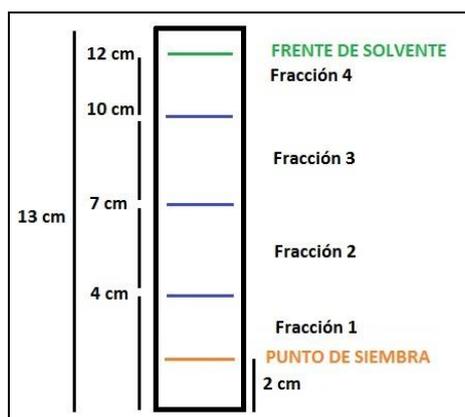


Figura 1. Esquema de la tira cromatográfica utilizada en la corrida con fase móvil CH_2Cl_2 : CH_3OH : NH_4OH 25 %: CH_3CN (2:2:1:0,5).

Considerando los R_f , la asociación entre las distintas fracciones de la tira cromatográfica y las especies que en ellas se retienen es la siguiente:

Fracción 1: ^{99m}Tc - coloides

Fracción 3: ^{99m}Tc - ciprofloxacina

Fracción 4: ^{99m}Tc - libre.

Antes de realizar la corrida, la cuba cromatográfica se llenó con el solvente (hasta una altura aproximada de 1 cm) y se tapó, de modo de saturar la atmósfera (aproximadamente por 20 minutos).

Luego de preparar el radiofármaco de acuerdo a las especificaciones del fabricante y siguiendo las normas de radioprotección, se aplicó con una jeringa una gota de la solución

radiactiva en el punto de siembra. La tira fue entonces colocada en la cuba cromatográfica, la cual se tapó mientras el solvente ascendía por capilaridad. Una vez que el solvente llegó a la línea marcada como “frente de solvente”, la tira se retiró de la cuba, se dejó secar el solvente y se cortó con tijera en las líneas de corte. La actividad en cada una de las fracciones se determinó en un activímetro adecuadamente calibrado.

2.2. Análisis de las imágenes. Evaluación de la Biodistribución del Radiofármaco

Acorde al propósito diagnóstico de los estudios, la cuantificación de la captación de radiactividad luego de la inyección de ^{99m}Tc -ciprofloxacina se realizó, en principio, sobre la vista planar del área solicitada para investigar la posibilidad de una infección; se definieron zonas de interés (ROI) en el sitio presuntamente afectado, y en un área análoga comparable. Conjuntamente, para poder conceptuar cuantitativamente la biodistribución del radiofármaco, sobre las imágenes del barrido corporal, se definieron ROI que abarcaban el cuerpo total, y ROI que se ceñían al área de la lesión.

En este trabajo se presenta el análisis, a modo de ejemplo, de una vista planar de una región sospechosa de infección y de un centellograma de cuerpo entero de un paciente inyectado con ^{99m}Tc - ciprofloxacina.

3. RESULTADOS

3.1. Pureza Radioquímica

En la Figura 2 se muestra el porcentaje de actividad de ^{99m}Tc en las distintas fracciones de la tira cromatográfica, para los controles realizados sobre el radiofármaco sin filtrar (columnas grises) y luego de una filtración a través de poros de $0,22\ \mu\text{m}$ (columnas blancas).

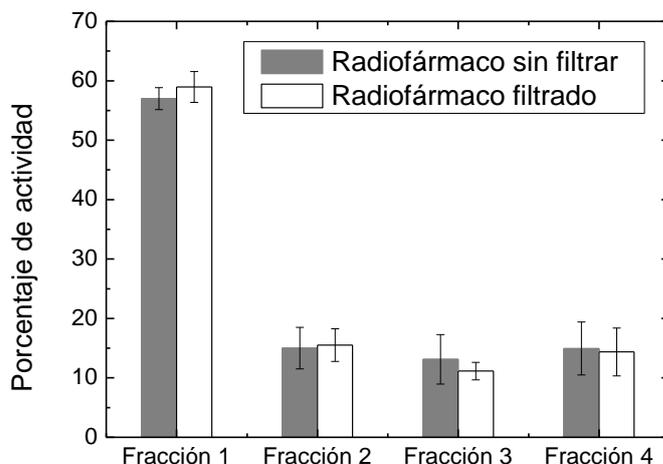


Figura 2. Porcentaje de actividad de ^{99m}Tc en las distintas fracciones de la tira cromatográfica, para el radiofármaco sin filtrar (gris) y filtrado (blanco).

Todas las fracciones de la tira cromatográfica retienen especies de ^{99m}Tc y no se observan diferencias significativas en la actividad de las distintas secciones si se consideran preparaciones sin filtrar o filtradas.

Existe una retención predominante de ^{99m}Tc en la Fracción 1 (alrededor del 58 %) que se asocia sin lugar a dudas a la presencia de ^{99m}Tc - coloides en la preparación. Este hallazgo está de acuerdo con lo reportado para las preparaciones de ^{99m}Tc - ciprofloxacina que utilizan cloruro estannoso como reductor [3,4].

En cuanto a la pureza radioquímica, una interpretación estricta de la retención de ^{99m}Tc en la tira cromatográfica asignaría únicamente a la Fracción 3 la presencia de ^{99m}Tc -ciprofloxacina. Esto resulta en una pureza radioquímica de alrededor de 12 %.

Una interpretación más real de los resultados de la corrida debe reparar en que la actividad de ^{99m}Tc retenida en el resto de las Fracciones (2, 3 y 4) no varía significativamente entre sí, rondando en todos los casos el 14 % de la actividad total. Este hallazgo puede asociarse a una localización difusa de la especie ^{99m}Tc - ciprofloxacina, en cuanto se ha reportado que estas preparaciones no contienen cantidades significativas de ^{99m}Tc - libre [5,6]. Este análisis arroja una pureza radioquímica de alrededor de un 42 %.

3.2. Análisis de las imágenes

En la Figura 3 se muestra una vista planar del extremo distal de miembros inferiores de un paciente inyectado con ^{99m}Tc - ciprofloxacina. En este centellograma la mera observación visual sugiere una hipercaptación anormal en el extremo de la pierna izquierda (resabio de una osteomielitis consecuencia de una fractura expuesta).

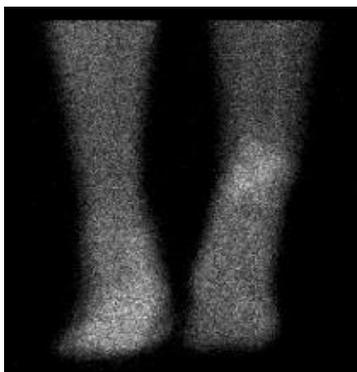


Figura 3. Vista planar del extremo distal de miembros inferiores (área sospechosa de infección).

A fin de precisar el hallazgo se miden las cuentas detectadas en cada zona de interés y se calcula el contraste con la fórmula (1). El resultado se muestra en la Figura 4.



Figura 4. Vista planar del extremo distal de miembros inferiores (área sospechosa de infección). Se indican las cuentas en la "lesión", el "fondo" y las totales acumuladas en el área tras una adquisición de 5 minutos.

De acuerdo a la fórmula (1), el contraste hallado (expresándolo como porcentaje) es de 14%, lo cual puede considerarse significativo y estadísticamente válido.

Sin embargo, al analizar la imagen del barrido corporal total de este mismo estudio (Figura 5), se advierte la biodistribución, donde priman los coloides y especies radiomarcadas que no son la ^{99m}Tc - ciprofloxacina. La actividad se distribuye y concentra en forma preponderante en los lugares predestinados a coloides y partículas, e incluso permanece en el pool sanguíneo (se visualizan notoriamente las cavidades cardíacas, además de hígado bazo y pulmones). Se señala con una flecha la lesión en el extremo distal de la pierna.



Figura 5. Barrido corporal total del mismo paciente.

Del total de cuentas recolectadas en el barrido corporal, (8,710.675) menos del 5% se concentrará en los tejidos objeto del estudio, y escasamente 20.583 cuentas en el área que luego dará origen a la vista planar mostrada más arriba y sobre la que se realizó el diagnóstico. Esta inadecuada biodistribución no impide hacer un diagnóstico. Prolongando el tiempo de adquisición (como se hizo) o aumentando la actividad inyectada al paciente pueden llegar a acumularse las cuentas suficientes como para verificar un contraste aceptable.

Sin embargo, esto trae aparejado el posible cambio en la posición del paciente mientras se realiza el estudio, disminuyendo así la calidad de la imagen. O bien, en el caso del incremento de la actividad inyectada, el aumento de la radioexposición a la que se somete, sin el correlato de un beneficio en el diagnóstico. La imagen sólo pretende mostrar lo que el control de calidad con el solvente adecuado ya anticipa. Como determinan las corridas, se inyectarán junto con el antibiótico marcado, un alto contenido de coloides radiomarcados, que no formarán parte del proceso diagnóstico pretendido y solo contribuyen a la radioexposición

4. CONCLUSIONES

Se controlaron preparaciones de ^{99m}Tc -ciprofloxacina mediante cromatografía de adsorción utilizando como fase estacionaria sílica gel y como fase móvil un solvente capaz de separar la especie deseada de sus impurezas radioquímicas. Los resultados de estos controles fueron analizados tanto de un modo estricto y riguroso como de una forma más real y práctica. En ambos casos la pureza radioquímica se encuentra muy debajo de los límites aceptados internacionalmente como para que un radiofármaco sea considerado como apto para administrar a un paciente.

La pureza radioquímica se ve afectada principalmente por ^{99m}Tc - coloides, en concordancia con lo esperado para preparaciones que incluyen cloruro estannoso como reductor. El hallazgo de que no existen en la preparación cantidades significativas de ^{99m}Tc - libre también está a favor de la presencia de grandes cantidades de Sn^{+2} en el polvo liofilizado.

Si bien se ensayó la filtración de la preparación radiofarmacéutica en pos de mejorar la pureza radioquímica, no se observaron diferencias significativas ni en la cantidad de ^{99m}Tc -coloides ni en la pureza radioquímica del radiofármaco. Este hallazgo parece indicar que las especies coloidales tendrían un tamaño de partícula menor al poro del filtro utilizado. Así mismo, como se sugiere en la bibliografía [4], el pH de la preparación parece ser un factor determinante de la pureza radioquímica. Se propone como posible mejora de este parámetro una acidificación de la solución final a un pH de 2,5.

La comparación de las cuentas recolectadas en el barrido corporal respecto a las localizadas en la zona objeto de estudio es indicativa de la desperdigada biodistribución e ilustrativa de que aún en caso de que el fármaco pudiera cumplir con su finalidad diagnóstica, se somete al paciente a una radioexposición improductiva, a cargo de coloides y especies radiomarcadas que nada aportan al propósito diagnóstico y rescinden la ecuación riesgo beneficio que supone el radiofármaco en condiciones óptimas.

5. REFERENCIAS

1. Britton, K. E., Wareham, D. W., Das, S. S., Solanki, K. K., Amaral, H., Bhatnagar, A., Katamihardja, H. S., Malamitsi, J., Moustafa, H. M., Soroa, V. E., Sundram, F. X., Padhy, A. K., "Imaging bacterial infection with ^{99m}Tc -ciprofloxacin (Infecton)", *Journal of Clinical Pathology*, **55**, pp.817–823 (2002).
2. Parra, C. M., Capecchi, G., Milatich, V., Soler, R. I., "Actualización de los radiofármacos en procesos inflamatorios e infecciosos periprotésicos", *Anuario Fundación Dr. J. R. Villavicencio*, 16, pp.139-143 (2008).
3. Oha, S. J., Ryua, J.S., Shina, J. W., Yoona, E. J., Hab, H. J., Cheona, J. H., Leea, H. K., "Synthesis of ^{99m}Tc -ciprofloxacin by different methods and its biodistribution", *Applied Radiation and Isotopes* **57** pp. 193–200 (2002)
4. Mirshojaei, S. F., Erfani, M., Sadat-Ebrahimi, S. E., Talebi, M. H., Farhad Haj Hassan Abbasi, "Freeze-Dried Cold Kit for Preparation of ^{99m}Tc -Ciprofloxacin As an Infection Imaging Agent", *Iran Journal of Nuclear Medicine*, **18**, pp. 45-51
5. Prospecto Ciprofloxacina Bacon - Radiofarma.
6. Prospecto INFECTION-TEC - Tecnonuclear.
7. Elkady, E. F. y Mahrouse, M. A., "Reversed-Phase Ion-Pair HPLC and TLC-Densitometric Methods for the Simultaneous Determination of Ciprofloxacin Hydrochloride and Metronidazole in Tablets", *Chromatographia*, **73**, pp.297–305 (2011).
8. Moglia, B., Calcagni, L., Funes, F., Paladini, R., Spinolo, C., Rozanskas, S., Illanes, L. y Chain, C., " ^{99m}Tc -ciprofloxacina como herramienta para el diagnóstico de procesos infecciosos: importancia de la pureza radioquímica del radiofármaco", XVIII Congreso de la Asociación Argentina de Biología y Medicina Nuclear, Buenos Aires, (2012).
9. Sampson, C. B., *Textbook of Radiopharmacy*, 4th edition, Pharmaceutical Press, Londres, Inglaterra (2011).
10. Cairo, A. H., "Marcaje de ciprofloxacina con ^{99m}Tc para el diagnóstico de infecciones. Comparación y evaluación preclínica de dos métodos" (2009).
11. De Winter, F., Van de Wiele, C., Dumont, F., Van Durme, J., Solanki, K., Britton, K., Slegers, G., Dierckx, R. A., Thierens, H., "Biodistribution and dosimetry of ^{99m}Tc -ciprofloxacin, a promising agent for the diagnosis of bacterial infection", *Iran Journal of Nuclear Medicine, European Journal of Nuclear Medicine*, **28**, pp. 570–574 (2001)