

I. RESUMEN

En la búsqueda de sustancias sedimentantes empleadas en la técnica de marcación de leucocitos, técnica perteneciente a la rama de la medicina nuclear y utilizada para el diagnóstico de procesos infecciosos de difícil acceso con técnicas convencionales, se hacía necesario encontrar sustancias alternativas capaces de sustituir al Hespán al 6% utilizado comúnmente como agente sedimentantes en dicha técnica.

El estudio se realizó en el Laboratorio de Medicina Nuclear del Hospital General San Juan de Dios de la ciudad de Guatemala, utilizando la sangre de 10 donadores voluntarios sanos, para evaluar la capacidad sedimentante del Dextrán al 6% y la Metilcelulosa al 1% en comparación con el Hespán al 6% utilizado actualmente en el proceso de marcación de leucocitos. Todas las pruebas se corrieron *in vitro*, y se midieron las variables de Marcación Leucocitaria, Viabilidad celular y recuperación leucocitaria.

Utilizando un análisis de varianza multifactorial, no se encontró diferencia significativa entre el Hespán al 6%, el Dextrán al 6% y la Metilcelulosa al 1% cuando se consideraron las variables de marcación leucocitaria, y viabilidad celular; pero si, cuando se incorporó la variable recuperación leucocitaria, donde la Metilcelulosa al 1% obtuvo valores mas bajos.

Por ser el Dextrán al 6% la sustancia que no presentó diferencia significativa al considerar las tres variables en relación al patrón Hespán al 6%, se le recomienda como un posible sedimentante alternativo en el proceso.

II. INTRODUCCION

A pesar de la actual disponibilidad de un gran número de diferentes antibióticos, los procesos infecciosos aún pueden alcanzar índices de mortalidad de hasta el 100%. La instauración de una terapia pronta y correcta sobre el foco séptico, reduce considerablemente este índice, por lo que se hace indispensable la búsqueda de procedimientos que detecten la localización del proceso morboso lo mas tempranamente posible. De las células blancas o leucocitos contenidos en la sangre, los neutrófilos o polimorfonucleares, son considerados como la primera línea de defensa del organismo en el combate de los procesos infecciosos; por diapedesis, estas células atraviesan la pared de los capilares y en muy poco tiempo llega al sitio de la infección para fagocitar a la bacteria ofensiva. Posteriormente a la llegada de los neutrófilos, hacen su arribo los Monocitos o macrófagos, encargados de fagocitar las partículas grandes y dar inicio a la respuesta inmune del huésped.

En base a la actividad de estas células blancas, la Medicina Nuclear desarrolló la técnica complementaria de Marcación de Leucocitos con el isótopo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ para ayudar en el diagnóstico temprano de los procesos inflamatorios que involucran a estas células; es reconocida por la administración de drogas y alimentos FDA (por sus siglas en inglés) como de gran exactitud y bajo riesgo. La técnica de marcación, en su etapa de separación de leucocitos, combina simultáneamente la sedimentación por gravedad, con agentes sedimentantes y sedimentación simple. Estos agentes sedimentantes tienen por objeto separar los eritrocitos y plaquetas que son fuente de contaminación, para obtener la población mixta de leucocitos necesaria para su marcación posterior. Un paso clave en la metodología de esta técnica, lo constituye el empleo del agente sedimentante Hespán al 6% (hidroximetilalmidón) necesario para lograr la separación de los eritrocitos y plaquetas.

Actualmente, el elevado costo del Hespán al 6% y la baja disponibilidad de este agente sedimentante en el país, ha hecho poco accesible la utilización de este método diagnóstico a nivel hospitalario.

Con el objeto de buscar agentes sedimentantes que posean propiedades y características de comportamiento similar al Hespán al 6%, en el presente trabajo se evaluaron el Dextrán al 6% y la Metilcelulosa al 1% como sedimentantes alternativos.

III. ANTECEDENTES

A. Generalidades de la Medicina Nuclear

En la actualidad, la medicina nuclear desempeña una función primordial en el diagnóstico, estadificación, tratamiento, pronóstico y seguimiento de muchas enfermedades. Entre todos los procedimientos diagnósticos y terapéuticos, la medicina nuclear es única, ya que se basa en los mecanismos fisiopatológicos, moleculares, emplea células, moléculas biológicas y medicamentos marcados con radionúclidos para estudiar la fisiopatología de los órganos y sistemas del cuerpo como también para tratar enfermedades.(1,2)

La adquisición de imágenes de dos o tres dimensiones es la base de la medicina nuclear e involucra la grabación de la distribución espacial del radiofármaco dentro del cuerpo humano. La imagen se obtiene por medio de un aparato exploratorio que se llama una cámara gamma. Tales aparatos pueden proveer una imagen de 2D o 3D del cuerpo entero, o de un órgano específico y una distribución cuantitativa del radiofármaco dentro de esa área. La medicina nuclear ha progresado en recientes años al punto donde puede proveer imágenes estáticas y dinámicas de alta resolución tales como el movimiento de la pared del corazón, el vaciamiento de la vesícula biliar, el flujo retrógrado del esófago, y el flujo de sangre en el cerebro. Lo que es de más importancia es que la medicina nuclear provee no solamente imágenes morfológicas sino también información bioquímica y funcional de órganos y procesos específicos, ninguno de los cuales se pueden obtener por medio de ninguna otra técnica. (2,3)

Los radiofármacos son diseñados para que se acumulen en el área u órgano de interés y para que tengan características de radiación y desintegración que permitan fácil detección y cuantificación. Aunque con radiofármacos se usa radioactividad, la exposición del paciente a la radiación es muy baja y típicamente mucho menos de lo requerido por un procedimiento de rayos-x. Los estudios de medicina nuclear se administran con un mínimo de incomodidad e inconveniencia al paciente. Llevan menos riesgo que la mayoría de las

técnicas alternativas tales como biopsias, otros métodos invasivos de investigación y algunos procedimientos radiológicos como visualización con contraste. (4)

Estudios comparativos han sido desarrollados para medir la capacidad diagnóstica de varios isótopos radiactivos marcando leucocitos y gammaglobulinas en el diagnóstico de infecciones óseas y articulares. (5)

Así como también se han realizado otros estudios sobre métodos para el marcaje celular *in vitro* que incluyen leucocitos marcados con $^{111}\text{-In}$ -oxyquinoline y $^{99\text{m}}\text{-Tc}$ -HMPAO que describen y nombran a estos marcadores como estándares de oro para el diagnóstico diferencial de procesos infecciosos, o del dolor resultante de una falla en el proceso de implante de prótesis de cadera. (6)

El uso de la $^{99\text{m}}\text{-Tc}$ -ciprofloxacina demostró jugar un papel importante en el diagnóstico de infecciones originadas en el área de prótesis articulares (7). Recientemente, utilizando ciprofloxacina marcada con $^{99\text{m}}\text{-Tc}$ en pacientes conocidos de presentar infección ósea o sospechosos de padecerla, se encontró que *S. aureus* y *P. aeruginosa* son los patógenos más frecuentemente aislados con un alto índice de sensibilidad y especificidad. (8)

B. Marcación celular en Guatemala

La utilización documentada de células sanguíneas marcadas da inicio en 1,991 con la comparación de las técnicas de marcación de leucocitos en sangre completa y capa leucocitaria, utilizando $\text{Tc-}^{99\text{m}}\text{-SnCl}_2$ y $\text{Tc-}^{99\text{m}}\text{-SnF}_2$ coloidales en sangre fresca de donadores y pacientes con leucocitosis, estudio que demostró que se obtiene un mayor porcentaje de marcación utilizando $\text{Tc-}^{99\text{m}}\text{-SnCl}_2$ ya que su pureza radioquímica es mayor (9).

En el año 1,992, se evaluó la marcación de plaquetas utilizando cuatro diferentes radiofármacos a base de $\text{Tc-}^{99\text{m}}$ para emplearlos en el diagnóstico de trombosis: Glucoheptonato de calcio, Pirofosfato de sodio, Citrato de sodio y Sal trisódica cálcica de

ácido dietilenotriaminopentacético, midiendo los parámetros de biodistribución y eficacia de marcación. El estudio concluyó que de los cuatro radiofármacos, el glucoheptonato presenta mayor porcentaje de marcación y biodistribución (10).

Posteriormente, en 1,995, se realizó el marcaje radioisotópico de leucocitos con Tc-^{99m}-Hexametilpropilenaminoxima y Tc-^{99m}-glucoheptonato con el fin de evaluar con cual de los dos radiofármacos se obtenía mayor porcentaje de marcación, alta viabilidad y funcionalidad de los leucocitos. El estudio concluyó que la eficacia de marcación, la viabilidad y la recuperación leucocitaria fue mayor con Tc-^{99m}-Hexametilpropilenaminoxima (11).

En 1,996, otro estudio evaluó la estabilización de hexametazima marcada con Tc-^{99m} con cloruro de cobalto hexahidratado, para la marcación de leucocitos. El estudio concluyó que al agregar 100ug/ml de cloruro de cobalto hexahidratado a la hexametazima marcada con Tc-^{99m} se prolonga la estabilidad del fármaco y no se afecta el porcentaje de marcación ni la morfología de los leucocitos(12).

C. Generalidades del marcaje celular

La utilización de células sanguíneas marcadas se remonta a 1,940, cuando Hahn y Hevesey midieron el volumen sanguíneo de un conejo marcando los eritrocitos del animal con ³²P. Desde entonces, se han descrito multitud de investigaciones clínicas y experimentales en las que, la utilización de células sanguíneas marcadas, ha sido el tema fundamental

La utilización de radioisótopos ha sido clave para alcanzar el conocimiento básico que hoy se tiene de la cinética y de la fisiología de los componentes celulares de la sangre, y el desarrollo posterior de las técnicas de marcaje celular con radionúclidos gamma emisores, conjuntamente con los avances en la adquisición de imágenes por gammacámara, ha hecho posible que la utilización de células sanguíneas marcadas se pueda convertir en una herramienta habitual de diagnóstico (13).

1. Marcaje inespecífico *in vivo*

Los primeros trabajos con elementos sanguíneos radiomarcados, fueron dirigidos a marcar las células *in vivo* para determinar el origen de la formación celular, su cinética y el tiempo de supervivencia intravascular. Los trazadores utilizados fueron de dos tipos:

a. Marcadores del DNA o de tipo cohorte:

El ^{32}P en forma de fosfato sódico y el ^{14}C presentes en diferentes precursores del ácido nucleico como la adenina y la guanina se utilizan para el marcaje de células precursoras presentes en diferentes tejidos. La radioactividad llega a ser parte integral del DNA durante la maduración del ciclo celular. Con este proceso se producen células marcadas de la misma edad.

b. Marcadores de la célula circulante o al azar:

El trazador utilizado es el ^{32}P -diisopropilfluorofosfato (DFP-32), éste es diluido en aceite y se administra por vía intramuscular, la radioactividad aparece en la sangre en unos 90 minutos. Aproximadamente un 30% de la radioactividad administrada se asocia a las proteínas plasmáticas y a las esterasas de las membranas de eritrocitos, leucocitos y plaquetas.

2. Marcaje inespecífico *in vitro*

Ante la falta de un trazador *in vivo* que fuese emisor gamma y que marcara exclusivamente un determinado tipo celular, las investigaciones se dirigieron a explorar la posibilidad de marcar las células sanguíneas *in vitro*.

Para este tipo de marcaje es muy importante conseguir un concentrado de las células que se van a marcar en las que se cumplan las siguientes condiciones:

a. Mantenimiento de la esterilidad

b. Mantenimiento de la funcionalidad, dependiendo del tipo de estudio a que se destinen las células.

- c. Mantenimiento de la viabilidad, entendida como la capacidad de tener una cinética de desaparición normal.
- d. Pureza del concentrado, sobre todo para estudios cinéticos.

Para la obtención de un concentrado celular adecuado, hay que tener en cuenta las características físicas de cada tipo de célula y su concentración en la sangre (13-18).

3. Agente radioactivo ideal para marcación celular

Este agente debe de cumplir los siguientes criterios para poder ser utilizado como tal:

- a. Marcar células *in vivo*
- b. Ser selectivo
- c. No eluirse de las células después de marcadas ni ser reusado por el organismo después de la destrucción celular
- d. Causar el menor daño posible a las células
- e. Emitir radiación gamma para poder ser detectado externamente
- f. Tener vida media suficientemente corta, para minimizar la dosis de radiación al paciente (13).

D. Marcación de leucocitos

1. Leucocitos y respuesta inflamatoria

El hombre adulto tiene aproximadamente 7,000 glóbulos blancos por mm^3 de sangre. Estos comprenden: a los neutrófilos polimorfonucleares, eosinófilos, linfocitos, monocitos y basófilos. La vida media de estos está limitada al tiempo necesario para su transporte, desde los sitios de producción en la médula ósea o tejido linfoide, hacia las zonas del organismo donde son requeridos. El rango de vida media de los polimorfonucleares una vez liberados es normalmente de 6 a 8 horas en sangre circulante y de 2 a 3 días en los

tejidos. Cuando una infección seria se produce, este período se acorta a sólo unas horas ya que los polimorfonucleares acuden rápidamente al área dañada.

Los polimorfonucleares y los monocitos, son las células principalmente involucradas en la respuesta inflamatoria a contra los microorganismos invasores. Esta respuesta puede ser el resultado de un daño localizado provocado por un estímulo nocivo, o por uno aparentemente inocuo. El primer caso se observa cuando hay infección bacteriana o muerte tisular y la reacción inflamatoria incluirá el arribo de leucocitos y otras células al lugar donde sobrevive la microcirculación. En el segundo caso, la reacción se caracteriza por el hecho de que la respuesta inflamatoria por sí misma es la causa del daño tisular. Probablemente la causa más importante de inflamación es la invasión bacteriana de los tejidos, sin embargo, otros tipos de agresión como las de índole térmica, química o traumática inducen a un cuadro similar al de la reacción inflamatoria.

La reacción inflamatoria se caracteriza por una respuesta vascular asociada a una fase fluida y a una fase celular. Después del daño tisular, grandes cantidades de histamina, bradiquina y serotonina son liberadas por el tejido a los fluidos circulantes. Estas sustancias provocan un aumento localizado del flujo sanguíneo y de la permeabilidad capilar lo que causa que grandes cantidades de líquido y proteínas se introduzcan en los tejidos y produzcan un edema local, esto constituye la fase fluida. La presencia del fibrinógeno en el líquido, lleva a la formación de un coágulo que sirve de barrera al área afectada que demora la diseminación de las bacterias y productos tóxicos. La fase celular de la respuesta inflamatoria comprende tres períodos: El primero involucra la actividad fagocítica de los macrófagos preexistentes en el tejido aunque su número es limitado; el segundo se caracteriza por su neutrofilia, referida algunas veces como leucocitosis. En este período hay un gran aumento del número de neutrófilos circulantes, estimulados por la liberación de sustancias químicas en el tejido inflamado. El número de neutrófilos en sangre puede llegar a 15,000 o 20,000 por mm^3 , a las pocas horas de instalada la inflamación; los neutrófilos migran al área dañada y entran en el tejido por diapédesis a través de las paredes de los capilares. Las toxinas bacterianas y productos celulares atraen a los neutrófilos (quimiotáxis) hacen que éstos se adhieran al tejido inflamado donde

ejercen su actividad fagocítica engullendo a las bacterias y restos celulares. El tercer período comprende una respuesta más lenta pero prolongada frente a la infección; en él, los monocitos liberados por la médula migran hacia la zona dañada y en un período de 8 a 12 horas provocan una edematización liberándose cantidades crecientes de lisosomas, que son gránulos que contienen enzimas hidrolíticas que se encuentran contenidas en su citoplasma; estos monocitos maduros actúan como macrófagos eficientes y con movimientos ameboidales se dirigen al área inflamada para engullir y digerir las bacterias y productos celulares. Los leucocitos eventualmente mueren y se depositan en la zona en forma de pus, formándose un absceso; un absceso es pues, un área localizada de pus y de tejido destruido formado por la respuesta inflamatoria; usualmente contiene bacterias patógenas y si no es tratado puede poner en peligro la vida del paciente o llevar a largos períodos de enfermedad y hospitalización.

La localización de un absceso es a menudo un problema clínico de difícil solución. Como un absceso es por definición acumulación de leucocitos, es lógico que dichas células marcadas con un radionúclido gamma emisor pueda ser detectado externamente y producir una imagen del mismo siempre que durante el proceso de marcación no se afecten las funciones celulares normales (13,16-21).

2. Marcación con ^{99m}Tc

La marcación de leucocitos ha sido ampliamente utilizada con radionúclidos tales como: ^{51}Cr , ^{67}Ga , ^{111}In y actualmente se utilizan los compuestos de ^{99m}Tc . La importancia del uso de compuestos marcados con ^{99m}Tc radica en sus características deseables:

- a. Ausencia de emisión de partículas
- b. Corto período de desintegración (6 horas), lo que permite administrar altas dosis sin causar mayor irradiación al paciente.
- c. Fácil detección, debido a la energía de 140keV de sus fotones, ideal para la detección por la gammacámara.
- d. La disponibilidad a partir del ^{99}Mo .

- e. Fácil incorporación a muchos compuestos.
- f. Fácil producción y disponibilidad a bajo costo.
- g. Con el ^{99m}Tc las imágenes son obtenidas de 2 a 4 horas después de su reinyección en el organismo (24-27).

3. Métodos de marcación de leucocitos con ^{99m}Tc

Los métodos para marcación de leucocitos se encuentran en tres categorías generales:

- a. Reducción intracelular del $^{99m}\text{TcO}_4$ con estaño (glucoheptonato).
- b. Fagocitosis de partículas marcadas con ^{99m}Tc para neutrófilos y monocitos (coloides).
- c. Agentes quelantes liposolubles que penetran la membrana de lípidos de los leucocitos (28,29).

Leucocitos marcados con ^{99m}Tc -Glucoheptonato

Existen diferentes procedimientos para marcar leucocitos que utilizan como paso esencial un compuesto que sea compatible con estaño. De estos compuestos de Sn^{+2} utilizados en estudios individuales y grupales en la marcación de leucocitos, el glucoheptonato es el más efectivo debido a:

- i. La cantidad de Sn^{+2} utilizada es menor, el contenido intracelular es mayor penetra fácilmente a la célula.
- ii. Hay menor cantidad de estaño extracelular y la oxidación o lavado es más fácil y efectivo.
- iii. El kit liofilizado es simple de formular y usar.
- iv. Se obtiene buena eficiencia de marcación.
- v. La estabilidad *in vitro* es alta (28,30).

En la marcación con glucoheptonato el factor de mayor importancia en el rendimiento de marcación y la viabilidad, dependen de la cuidadosa manipulación durante todo el proceso. La técnica de preestannización implica más etapas, por lo tanto mayor manipulación, con el consiguiente problema de mayor contaminación. Es también importante mencionar que el glucoheptonato es transportado en mejor forma dentro de la célula y que ésta unión es irreversible.

4. Obtención del concentrado leucocitario

Debido a que muchos agentes radioactivos para marcar células no son selectivos, es totalmente necesaria la separación de los leucocitos de lo demás elementos sanguíneos, haciéndose indispensable además conservar su viabilidad posterior a la separación.

Durante el proceso de separación debe a toda costa eliminarse la contaminación del botón leucocitario con eritrocitos y plaquetas, esto debido a que la relación en cuanto a la concentración de eritrocitos sobre los leucocitos es de 1,000:1. Con respecto a las plaquetas, por su tamaño tan pequeño y densidad son más fácilmente separadas.

La presencia de pequeñas cantidades de eritrocitos y plaquetas no es un inconveniente serio en las exploraciones de imagen. Por otro lado, el mayor diámetro de los leucocitos en comparación con las otras células, aumenta la probabilidad de que un trazador lipofílico atraviese su membrana más fácilmente, no así en el caso de sustancias hidrofílicas con mayor afinidad por los eritrocitos y plaquetas (15,31).

a. Métodos de separación de Leucocitos

Existen diversos métodos de separación de leucocitos y estos varían de acuerdo al uso que se le dé al concentrado de células obtenido; por ejemplo, pueden prepararse células purificadas de polimorfonucleares de los linfocitos, mediante sedimentación convencional por gradientes de densidad y otras técnicas más complejas (19,32).

Para fines de este estudio, se mencionarán las metodologías más comunes de obtención de poblaciones mixtas de leucocitos. Entre éstas metodologías se pueden mencionar:

i. Centrifugación simple:

Es una técnica en la cual se extrae la sangre con el anticoagulante heparina (100 unidades / 50 cc de sangre) y anticoagulante ácido citrato dextrosa ACD (5 cc / 40 cc de sangre) y se centrifuga a muy bajas revoluciones, produciéndose una capa blanca de leucocitos por encima de los eritrocitos. Este método de obtener un concentrado leucocitario es rápido pero el rendimiento es muy bajo y la contaminación eritrocítica es muy alta (33).

ii. Sedimentación por gravedad:

Es la técnica habitual para la obtención de una población mixta de leucocitos, es una técnica simple con una manipulación mínima de células. La sangre se extrae con un anticoagulante; entre los más utilizados se encuentran: heparina (100 unidades / 50 cc de sangre) o ácido citrato dextrosa ACD (5 cc / 40 cc de sangre). Utilizando heparina, se obtienen menores agregados plaquetarios, sin embargo, con el ACD, los leucocitos se adhieren menos a las paredes del material plástico utilizado y presentan una menor tendencia a agregarse entre ellos. La jeringa con el anticoagulante y la sangre convenientemente mezclados, es puesta en posición vertical, con la aguja hacia arriba y se deja que los eritrocitos sedimenten. De esta forma, la separación de la capa hemática dura entre 60 y 120 minutos dependiendo de la velocidad de sedimentación eritrocítica del paciente (33,34,35). Para acelerar este proceso, pueden usarse agentes que ayuden a la agregación de los eritrocitos favoreciendo su sedimentación, proceso llevado a cabo *in vitro*. El agente sedimentante más utilizado es el Hidroxi-etil-almidón al 6%, también llamado Hespán, utilizándose una parte de Hespán por 5-8 partes de sangre; este es un reactivo aprobado por la FDA, no está asociado a reacciones alérgicas y es rápidamente eliminado del organismo después de su inyección intravenosa; otro agente que se utiliza es la Metilcelulosa al 2% en solución salina, una parte de

Metilcelulosa por 10 partes de sangre (36,37). Una vez se tiene bien definida la capa hemática, el sobrenadante, plasma rico en leucocitos y plaquetas (PRLP) se separa fácilmente hacia un tubo tipo FALCON de polipropileno. Este contendrá alrededor de un 70% de los leucocitos iniciales presentes en la sangre extraída, así como la mayor parte de las plaquetas y de 1 a 2 hematíes por leucocito. Para disminuir la concentración de hematíes del PRLP, se puede utilizar solución salina hipotónica o cloruro amónico. Varios estudios indican, sin embargo, que los granulocitos humanos son muy sensibles a variaciones bruscas de la osmolaridad, por lo que puede verse afectada su viabilidad cuando se exponen a más de 30 segundos a soluciones hipotónicas (35,36,37). Thakur y Cols encontraron que cuando se utilizaban leucocitos marcados a los que se les había sometido a un shock hipotónico, había una disminución de la vida media de los mismos, así como un aumento de la captación hepática. Estos datos indican que las células dañadas son extraídas por el sistema retículoendotelial. Las plaquetas son más pequeñas y menos densas que los leucocitos, por lo tanto es relativamente fácil reducir su contaminación mediante centrifugación; las plaquetas se mantienen suspendidas, mientras los leucocitos se depositan en el fondo del tubo (31,39).

5. Agentes sedimentantes eritrocíticos

Empleando una técnica de separación de leucocitos que combine simultáneamente la sedimentación por gravedad con agentes sedimentantes y la centrifugación simple, se produce una técnica eficiente que da como resultado la obtención de un alto porcentaje de leucocitos viables, para ser marcados con ^{99m}Tc y éstos ser utilizados en el diagnóstico de abscesos u otros procesos infecciosos.

Los agentes sedimentantes son Dextrán y Metilcelulosa

a. Metilcelulosa

i. Generalidades:

La metilcelulosa (etermetílico de celulosa) o Methocel, es un complejo que contiene de 27.5 a 31.5% de grupos metoxi. Se separa haciendo reaccionar cloruro de metilo o sulfato de dimetilo sobre celulosa; así formado, se coagula agregando metanol u otro agente apropiado y se centrifuga. Como la celulosa tiene tres grupos hidroxilo por cada residuo de glucosa, pueden existir varias metilcelulosas que varían en cuanto a solubilidad y viscosidad. Los tipos útiles para aplicación farmacéutica contienen uno a dos radicales metoxi por cada residuo de glucosa (40,41).

ii. Características:

Es un polvo fibroso o gránulo blanco, las suspensiones acuosas son neutras al tornasol y estables a los álcalis fuertes y ácidos débiles. Es insoluble al éter, alcohol y cloroformo, soluble en ácido acético glacial y en una mezcla de partes iguales de alcohol y cloroformo. Al contacto con el agua aumenta su volumen produciendo una solución coloidal viscosa clara a opalescente, insoluble en agua caliente y en solución salina saturada. Su uso principalmente es como agente dispersante, espesante, emulsificante y de revestimiento. Es utilizado en una relación de una parte de metilcelulosa por 10 partes de sangre, posee la característica de tener una viscosidad de 2% en solución acuosa a 25 grados centígrados (40-43).

b. Dextrán:

i. Generalidades:

(C₆H₁₀O₅)_n, polímero de la glucosa, con un peso molecular de 40,000.g/mol. Se prepara por acción del bacilo *Leuconostoc mesenteroides* B512 sobre la sacarosa. El dextrán crudo, de alto peso molecular, se hidroliza y fracciona a modo de obtener una fracción de un peso molecular medio de 40,000 g/mol por técnicas de dispersión de luz y de un peso molecular de 60,000 a 90,000 para obtener grado industrial y grado clínico.

Los substitivos del plasma pueden clasificarse en varios grupos, entre los cuales se encuentran los dextranos, que son polisacáridos polímeros de la glucosa; éstos se obtienen por hidrólisis parcial de la misma hasta ser transformada en polisacárido de bajo peso molecular. Las soluciones substitutivas del plasma se administran por vía intra venosa, de manera que no se considera la absorción; en cuanto a su destino y excreción; por su alto peso molecular, éstas sustancias tienen tendencias a permanecer en la circulación, por lo que los dextranos de menor peso molecular son eliminados más rápida y eficazmente. El dextrano 70 se excreta lentamente por el riñón, un 33% en 24 horas y un total del 93% en 10 días, mientras que una pequeña porción se metaboliza. Para el dextrano 40 la eliminación es más rápida; el 70% en 24 horas y el resto en 6 días (40-43).

ii. Características del Dextrán:

Es un polvo blanco, amorfo, inodoro e insípido; su solución acuosa al 10% con 5% de glucosa se oscurece levemente luego de un período de almacenamiento prolongado. Al igual que otras soluciones que contienen glucosa, el oscurecimiento se acelera al aumentar la temperatura ambiental; es completamente soluble en agua y dimetilsulfóxido e insoluble en alcoholes y éteres. Se utiliza como solución isotónica para preparar bombas o mejorar el flujo sanguíneo en intervenciones quirúrgicas que implican bypass cardiopulmonar. Tiene la propiedad de disminuir

la viscosidad de la sangre y el mejorar el flujo sanguíneo. Los dextranos disminuyen la actividad plaquetaria (44).

6. Gammagrafía con leucocitos marcados con Tc^{-99m}

La gammagrafía con leucocitos radiomarcados, es una técnica que explota el comportamiento migratorio natural de los leucocitos, para obtener una imagen de la respuesta inflamatoria. Los leucocitos del paciente son separados de la sangre completa para obtener un concentrado mixto de leucocitos, luego éstos son radiomarcados con un isótopo gamma emisor, Tc^{-99m} . Los leucocitos marcados son reinyectados al paciente y su distribución dentro del cuerpo es representada por imágenes vistas a través de una gammacámara. Los sitios de infección o de inflamación activa aparecen como áreas de captación anormal. Las imágenes obtenidas aportan información importante sobre la migración de los leucocitos que no puede ser proporcionada por imágenes puramente anatómicas (45-47).

7. Protocolo general de marcación de leucocitos

La separación y radiomarcación de los leucocitos, debe llevarse a cabo en campana bacteriológica o de flujo laminar creando condiciones asépticas durante todo el proceso.

- a. Preparación del paciente
- b. Obtención de la muestra: Extraer 51ml de sangre completa del paciente con una jeringa de 60ml conteniendo 9 ml de Acido citrato dextrosa (ACD) como anticoagulante. Agitar, separar 5 ml para hemograma inicial y viabilidad celular inicial.
- c. Agregar 2 ml de Hespan a la jeringa con la sangre. Mezclar suavemente.
- d. Dejar sedimentar por una hora en posición vertical.
- e. Llevar a cabo procedimiento de separación de los leucocitos de la sangre completa. (Existen diferentes métodos dependiendo del radiofármaco a utilizar).

- f. Llevar a cabo el procedimiento de marcación de los leucocitos. (Existen diferentes métodos dependiendo del radiofármaco a utilizar).
- g. Llevar a cabo controles de viabilidad y conteos celulares finales para obtener porcentajes de marcación y viabilidad finales.
- h. Reinyectar los leucocitos marcados al paciente.
- i. Llevar a cabo gammagrafía a los 30 minutos, 2, 4 y 24 horas respectivamente (46).

En el presente estudio no se llevó a cabo la gammagrafía, solamente la separación y marcación de leucocitos obtenidos de donadores sanos, por lo que las condiciones asépticas tampoco fueron tomadas en cuenta.

IV. JUSTIFICACION

La mortalidad provocada por procesos infecciosos no tratados puede llegar al 100%, lo que realza la importancia de encontrar una técnica exploratoria que visualice los focos infecciosos lo antes posible, para lograr un diagnóstico rápido y preceder a su tratamiento, reduciendo así el índice de mortalidad.

La marcación de leucocitos es una técnica exploratoria que permite rastrear el movimiento de las células tratadas y su concentración en un área anatómica determinada, permitiendo así, ubicar el foco infeccioso (inclusive antes de la formación del absceso), en casos de invasión por gérmenes patógenos o resaltar áreas anatómicas que se han perdido por procedimientos quirúrgicos, traumatismos, etc.

La medicina Nuclear es una especialidad cuya finalidad es el diagnóstico y tratamiento de diversas patologías, y es así como ha encontrado una técnica exploratoria complementaria denominada Marcación de leucocitos con ^{99m}Tc , la cual ubica el foco infeccioso antes de la formación del absceso, es aplicable a pacientes donde se han perdido las referencias anatómicas normales por cirugía, traumatismos, o dolencias previas.

La marcación de leucocitos con ^{99m}Tc emplea un agente sedimentante de glóbulos rojos y plaquetas, denominado Hespán (hidroxietilalmidón). La disponibilidad de este reactivo en el país es baja por su elevado costo, esto hace que la utilización del método a nivel hospitalario sea poco accesible; por lo tanto se estudiarán sustancias similares a este agente en cuanto a su función sedimentante de células y que además presenten un costo accesible para el montaje del método; las sustancias elegidas fueron Dextrán al 6% y Metilcelulosa al 1%.

V. OBJETIVOS

A. General

Evaluar dos diferentes agentes sedimentantes de células sanguíneas que puedan ser utilizados en la técnica de marcación de leucocitos con $^{99m}\text{-Tc}$.

B. Específicos

1. Modificar la técnica de marcación de leucocitos con $^{99m}\text{-Tc}$, en cuanto a su agente sedimentante de glóbulos rojos y plaquetas.
2. Estandarizar la capacidad sedimentante del Hespán como agente control.
3. Comparar la capacidad sedimentante del Dextrán al 6% y la Metilcelulosa al 1%, contra el agente sedimentante control, Hespán al 6%.
4. Determinar la capacidad sedimentante del Dextrán al 6% y de la Metilcelulosa la 1% .
5. Montar la técnica de marcación de leucocitos con $^{99m}\text{-Tc}$ en el Hospital General San Juan de Dios y/u Hospital Roosevelt de Guatemala.

VI. HIPOTESIS

El Dextrán al 6% y la Metilcelulosa al 1% poseen igual capacidad sedimentante de glóbulos rojos y plaquetas que el Hespán al 6%.

VII. MATERIALES Y METODOS

A. Universo de trabajo

10 Donadores sanos de sangre completa.

Reactivos Hespán, Dextrán, y Metilcelulosa como agentes sedimentantes.

Para familiarizarse con el método, primero se procedió a la estandarización del Hespán para medir su capacidad sedimentante como agente control. Para ello se utilizaron muestras de sangre que fueron recolectadas con el fin de alcanzar la destreza suficiente del método en general.

B. Muestra

Población mixta de leucocitos.

C. Recursos

1. Humanos

Br. Ileana Fumagalli Ruiz (Tesista)

Licda. María Celestina Portillo de Palma (Asesora)

Licda. Julia Mendoza (Colaboradora)

10 Donadores sanos de sangre

Personal Laboratorio RIA y Radiofarmacia Hospitalaria, Departamento Medicina Nuclear Hospital General San Juan de Dios

2. Institucionales

Laboratorio Radiofarmacia Hospitalaria del Departamento de Medicina Nuclear, Hospital General San Juan de Dios y Hospital Roosevelt de Guatemala.

Laboratorio Clínico, Area de Hematología, Hospital General San Juan de Dios.

3. Físicos

a. Materiales:

Jeringas plásticas de 3, 5, 10 y 60 ml

Jeringas para Tuberculina

Mariposas y agujas de 19G

Guantes descartables

Tijeras

Algodón

Masking Tape

Portaobjetos

Pipetas serológicas y Tips

Placas serológicas

Tubos plásticos de tapón de rosca de 50ml Falcon y Corning

Tubos de vidrio de 10ml

Pinzas

Contenedores plomados

Papel para cromatografía ITLC-SG

Gabacha plomada

Bata de laboratorio

Gradillas

b. Equipo

Calibrador de dosis Deluxe Isotope II

Cámara cromatográfica

Centrifuga IEC HN-SN

Microscopio

Refrigerador

Contador celular Coulter
Contador de Pozo ORTEC
Cámara de Neubauer
Balanza Semianalítica Ohaus
Liofilizadora Labconco
Campana de Flujo Laminar
Autoclave
Selladora de viales
Agitador
Potenciómetro (Fisher)

c. Reactivos

Solución Salina 0.9 %
Solución Salina 5%
Agua Tridestilada Estéril
Anticoagulante Acido Citrato Dextrosa (ACD) (Anexo 2)
Azúl de Tripán (Anexo 2)
Colorante de Wright
Hidroxietilalmidón 6% Sigma
Metilcelulosa 1%
Dextrán 6%
Kit de Glucoheptonato
Solución de pertecneciato de sodio recién eluído
Generador de $^{99}\text{Mo} / ^{99\text{m}}\text{Tc}$ Amersham

D. Procedimientos

1. Preparación del kit de glucoheptonato $\text{AC} / \text{sncl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
Solución A: Se pesó 1g de GHAc y se disolvió en 40ml de agua destilada estéril.
Solución B: Se pesaron 0.0160g de $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, se le agregó 1gota de HCl concentrado y se llevó a 10ml con agua destilada estéril.

- a. Se medieron 1.644ml de la solución B y se le agregó a la solución A.
- b. Se llevó la solución A a 50ml con agua destilada estéril.
- c. Se verificó que el Ph se encontrara entre 5.3 y 6.
- d. Se filtró y fraccionó en alícuotas de 1ml en viales color ambar.
- e. Se liofilizaron todas las alícuotas.

2. Evaluación de la pureza radioquímica (% PR) del glucoheptonato

A fin de precisar la calidad de marcación, al finalizada la elaboración del glucoheptonato, se sometió a un control cromatográfico. El método que se empleó fue el de cromatografía ascendente, en capa delgada con tiras de ITLC- SG, para corridas rápidas de 5 minutos. El disolvente empleado fue acetona o metiletilcetona para determinar cantidad de ^{99m}Tc libre. El radiocromatograma se efectuó usando un contador de pozo gamma. (37).

Los resultados se calcularon de la siguiente manera:

$$\%PR = \frac{Ar}{Ar + Ar1} \times 100$$

Ar = Actividad neta del radiofármaco (considerar el fondo del cromatograma).

Ar1 = Actividad neta de la impureza (considerar el fondo del cromatograma) (38).

3. Separación del leucocitos y marcación con glucoheptonato

- a. Se extrajeron 95ml de sangre completa por donador.
- b. De cada muestra se depositaron 30 ml de sangre en 3 jeringas diferentes de 60ml de capacidad conteniendo 7.5 ml de anticoagulante ACD y cada una se

rotuló como 1, 2 y 3 respectivamente. Los 5ml restantes se utilizaron para el Hemograma.

- c. Se agitaron las tres jeringas ligeramente.
- d. A la jeringa 1 se le agregaron 6ml Hespan 6% (Patrón) y se agitó ligeramente.
- e. A la jeringa 2 se le agregaron 3ml de Metilcelulosa 1% y se agitó ligeramente.
- f. A la jeringa 3 se le agregaron 6ml de Dextrán al 6% y se agitó ligeramente.
- g. Las tres jeringas se dejaron sedimentar por 1 hora en un ángulo de 90 grados.
- h. Con una mariposa de 19G se trasvasó el plasma rico en leucocitos y plaquetas (PRLP) y glóbulos rojos contaminantes de cada jeringa a tubos plásticos de fondo cónico. Se midió el volumen de cada PRLP y se tomaron alícuotas de 3ml para hemograma y viabilidad inicial. Se rotularon 1,2 y 3 respectivamente.
- i. Los tubos 1, 2 y 3 se centrifugaron durante 10 minutos a 180G (1,000 rpm) y se descartó el sobrenadante.
- j. Los glóbulos rojos contaminantes de cada tubo se lisaron por hemólisis hipotónica con 6ml de agua tridestilada estéril. El botón leucocitario se separó suavemente (sin introducir aire) con una pipeta plástica y sin agitar.
- k. La isotonicidad del medio de cada tubo se recuperó rápidamente con 2ml de Solución Salina al 5% y 10ml de Solución Salina al 0.9%, agitando suavemente.
- l. Se centrifugó por 10 minutos a 180G (1,000 rpm) y se descartó el sobrenadante.
- m. El kit de glucoheptonato se reconstituyó con 10ml de Solución Salina al 0.9%.
- n. El botón leucocitario de cada tubo se resuspendió con 2ml del kit de glucoheptonato y se llevó a un volumen de 5ml con Solución Salina 0.9% y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente.

- o. Se centrifugó durante 8 minutos a 180G (1,000 rpm) y se descartó el sobrenadante de cada tubo.
- p. El botón leucocitario de cada tubo se resuspendió en pertecnecio de sodio recién eluido, 3 a 7 mCi y se llevó a un volumen de 5ml con Solución Salina 0.9%, luego se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente y se agitó ocasionalmente.
- q. Se midió la actividad de las soluciones de cada tubo, se tomaron alicuotas de 1ml para hemograma (porcentaje de recuperación leucocitaria), viabilidad final y se centrifugó por 8 minutos a 180G (1,000 rpm).
- r. Se midió la actividad del botón leucocitario y del sobrenadante.
- s. El porcentaje de marcación para cada tubo se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Marcación} = \frac{\text{actividad leucocitaria}}{\text{act. Sobrenadante} + \text{act. Leucocitaria}} \times 100$$

4. Recuento leucocitario

Este recuento celular es la determinación del número de células (leucocitos) por unidad de volumen sanguíneo (mm^3). Se empleó el método de la resistencia eléctrica del Coulter Counter el cual se fundamenta en el hecho de que las células son malas conductoras de la electricidad, al contrario de lo que sucede con los líquidos, tales como la solución fisiológica, que conducen bien la corriente eléctrica (12).

Para realizar el recuento, la sangre es diluida (1/50,000) y mediante un sistema de aspiración por vacío se hace pasar a través de un orificio. La resistencia eléctrica (RE) del líquido que pasa a través del orificio se mide mediante dos electrodos situados a ambos lados del mismo. Mientras pasa el diluyente, la RE es mínima y constante, pero cuando una célula sanguínea atraviesa el orificio, se produce un

aumento de aquella y un cambio de potencial entre los electrodos, que permanece mientras la célula atraviesa el orificio.

5. Determinación de la viabilidad con azul de tripán

El principio de éste método consiste en que las células muertas, debido a que carecen de membrana celular funcional, permiten la difusión pasiva de este colorante, desde el exterior hasta el citoplasma (39).

A 50ul de suspensión celular se le agregaron 20ul de Azul de tripán al 0.4% y 30ul de solución salina 0.9%. Se montó en la cámara de Neubauer para valorar el porcentaje de células muertas. Se observó en el microscopio de luz.

Los resultados se reportaron como porcentaje de viabilidad.

$$\% \text{ de Viabilidad} = \frac{\text{número de células vivas}}{\text{número total de células}} \times 100$$

Porcentaje de viabilidad aceptable debe ser mayor o igual a 90%

VIII. RESULTADOS

El comportamiento en la totalidad de la población muestreada de los tres agentes sedimentantes evaluados, en relación a las tres variables consideradas, se presenta en el Tabla No. 1

Tabla 1

Comportamiento del Hespán al 6%, Dextrán al 6% y Metilcelulosa al 1%, como agentes sedimentantes en relación a la marcación leucocitaria, viabilidad celular y porcentaje de recuperación leucocitaria (n=10).

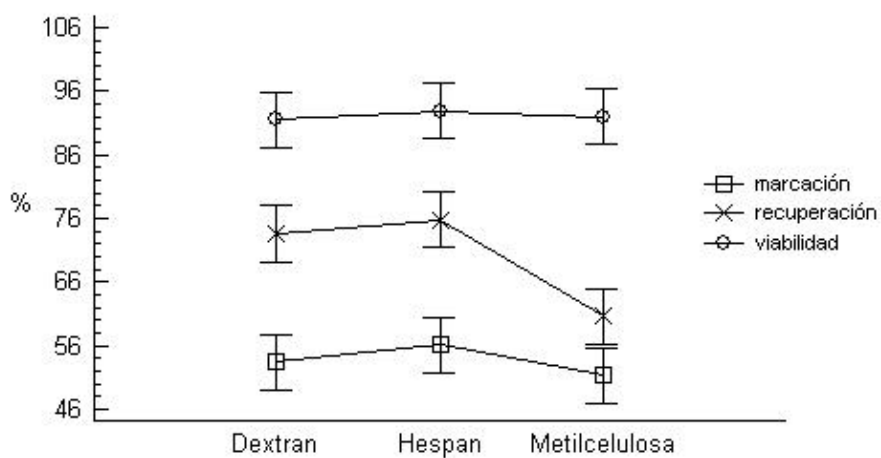
Donadores	HESPAN 6%			DEXTRAN 6%			METILCELULOSA 1%		
	% Marc.	% Viab.	% Rec.	% Marc	% Viab.	% Rec.	% Marc.	% Viab.	% Rec.
1	58	90	58	57	89	57	45	89	47
2	55	88	74	41	90	66	45	93	64
3	50	96	70	55	94	73	50	93	65
4	51	94	74	52	94	70	55	93	66
5	58	95	73	57	90	60	57	90	60
6	53	92	95	53	91	94	51	94	70
7	58	92	73	52	90	74	45	87	53
8	61	93	80	54	91	84	56	92	61
9	57	94	81	55	92	80	55	94	63
10	60	95	80	58	94	78	54	95	57
Medias	56.1	92.9	75.8	53.4	91.5	73.6	51.3	92.0	60.6

Fuente: Datos experimentales

No se encontró diferencia significativa entre el Hespán al 6%, el Dextrán al 6% y la Metilcelulosa al 1% cuando se consideraron las variables de marcación leucocitaria y viabilidad celular; pero sí, cuando se incorporó la variable recuperación leucocitaria, donde la Metilcelulosa al 1% fue diferente. (F=0.001,gl=4.2)

Gráfica 1

Medias de marcación, recuperación y viabilidad para Dextrán al 6%, Sepan al 6% y Metilcelulosa al 1%.



Fuente: Datos Experimentales

Las medias de las tres variables consideradas se presentan en la tabla 2

Tabla 2

Medias del porcentaje de marcación leucocitaria, porcentaje de viabilidad celular y porcentaje de recuperación celular de los tres sedimentantes evaluados.

	HESPAN 6%			DEXTRAN 6%			METILCELULOSA 1%		
	% Mar.	% Via.	% Rec	% Mar.	% Via.	% Rec	% Mar.	% Via.	% Rec
Medias	56.1	92.9	75.8	53.4	91.5	73.6	51.3	92.0	60.6

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La marcación de leucocitos en el estudio se llevó a cabo con ^{99m}Tc -Glucoheptonato. El factor más importante a tomar en cuenta con éste radiofármaco es la manipulación cuidadosa de las células durante todo el proceso, ya que durante éste, debe efectuarse una hemólisis hipotónica para reducir la contaminación eritrocítica y así evitar que el ^{99m}Tc -Glucoheptonato penetre a los eritrocitos, lo que provoca la disminución de radiofármaco disponible para los leucocitos. En el estudio realizado se utilizó ^{99m}Tc -Glucoheptonato donado por el Ministerio de Energía y Minas.

El porcentaje de marcación aceptable para realizar estudios centellográficos debe ser igual o mayor al 60%. A excepción de las muestras de los donadores 8 y 10 del grupo testigo, todas las demás, tanto en el grupo testigo como en los del Dextrán al 6% y la Metilcelulosa al 1%, dieron resultados inferiores (Tabla No1); sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los tres tratamientos (gráfica No1). Esto podría sugerir que, más que una menor interferencia del Hespán al 6% sobre las células a ser marcadas, los resultados pudieron haber sido influidos sobre todo por el isótopo marcador ^{99m}Tc - Glucoheptonato, y en menor escala a la falta de experiencia en la manipulación cuidadosa de las células. Hernández. S. Portillo, concluyó que la eficacia de marcación, la viabilidad y la recuperación leucocitaria fue mayor cuando se utilizó Tc-99mm Hexametilpropilenoaminóxima en comparación con el ^{99m}Tc -Glucoheptonato.(3). Las medias de los porcentajes de marcación del Hespán al 6%, Dextrán al 6% y Metilcelulosa al 1%, fueron 56.1%, 53.4% y 51.3% respectivamente.

La viabilidad de las células fue evaluada a través de la tinción con azul de tripán, que tiene como principio teñir las células dañadas por la manipulación, que carecen de membrana celular ya que éstas permiten la difusión pasiva del colorante (azul de tripán) hacia el citoplasma de la célula. Las medias de los porcentajes de viabilidad fueron 92.9%, 91.5% y 92.0% para el Hespán, Dextrán y Metilcelulosa respectivamente y no se encontró diferencia estadística significativa. Estos resultados indican que la manipulación de las células durante el proceso fue buena ya que se considera aceptable cuando se presentan valores mayores o iguales al 90%. Se observa que la media más alta la obtuvo la sustancia

patrón Hespán, y que la distribución de los datos fue similar para las dos sustancias como se observa en la gráfica 1, por lo tanto, las dos podrían ser utilizadas indistintamente al evaluar la viabilidad durante la técnica de marcación de leucocitos con ^{99m}Tc -Glucoheptonato.

El porcentaje de recuperación leucocitaria fue obtenido al finalizar el proceso de marcación. Para una marcación de leucocitos adecuada, el porcentaje de recuperación leucocitaria debe ser igual o superior al 60%.

Según los resultados obtenidos existe diferencia estadísticamente significativa entre las tres sustancias, como se observa en la gráfica 1 la distribución de los datos es desigual para la metilcelulosa, esto pudo deberse a que la manipulación de la muestra con esta sustancia fue mas difícil de llevar a cabo, ya que esta sustancia es mas densa y viscosa en comparación con el patrón Hespán y el Dextrán, y por esta razón las celulas quedaban atrapadas en una mezcla densa difícil de separar y manipular. Las medias de recuperación leucocitaria fueron 75.8%, 73.6% y 60.6%, para el Hespán, Dextrán y Metilcelulosa respectivamente.

De acuerdo a estos resultados, es válida la hipótesis presentada en relación a que el Dextrán al 6 % posee igual capacidad sedimentante que el Hespán al 6% cuando se comparan las variables de marcación leucocitaria, viabilidad celular y recuperación leucocitaria; pero solo es parcialmente válida para la Metilcelulosa al 1% que se comportó diferente en relación a la recuperación leucocitaria.

En cuanto al objetivo general del presente trabajo, se logró determinar que el Dextrán al 6%, es un sedimentante de bajo costo capaz de sustituir al Hespán al 6%. En relación a los objetivos específicos que motivaron la investigación, se pudo determinar que al comparar la capacidad sedimentante del Dextrán al 6% y la Metilcelulosa al 1% frente al Hespán al 6% utilizado como control, solo el Dextrán al 6% dio resultados estadísticamente aceptables cuando se compararon las variables de marcación leucocitaria, viabilidad celular y recuperación leucocitaria.

Esto demuestra que si es posible modificar la técnica actual, para disminuir los costos y se espera que sea considerada su aplicación de rutina en el Departamento de Medicina Nuclear del Hospital Roosevelt de Guatemala.

X. CONCLUSIONES

1. No se encontraron diferencias significativas entre el Hespán al 6%, El Dextrán al 6% y la Metilcelulosa al 1% cuando se evaluaron las variables de marcación leucocitaria y viabilidad celular; pero si, cuando se incorporó la variable recuperación leucocitaria donde la Metilcelulosa al % fue diferente.
2. No existe diferencia significativa entre el Hespán al 6% y el Dextrán al 6% en relación a las tres variables consideradas.
3. La Metilcelulosa al 1% es diferente en relación a la variable recuperación Leucocitaria
4. Por sus características sedimentantes demostradas en el presente estudio, el Dextrán al 6% sería el agente a elegir como posible sustituto del Hespán al 6 % utilizado para este fin.

XI. RECOMENDACIONES

1. Por su bajo costo y comportamiento similar, se recomienda el uso del Dextrán al 6% como sustancia sedimentante y como un posible sustituto del Hespán al 6% en pruebas *in vitro* en la técnica de marcación de leucocitos.
2. Evaluar *in vitro*, el comportamiento sedimentante del Dextrán al 6% para medir su efecto de marcación celular con isótopos similares al $^{99m}\text{-Tc}$ - glucoheptonato.
3. Continuar en la búsqueda de alternativas, que hagan posible la implementación diagnóstica de ésta prueba en el Hospital Roosevelt de Guatemala, designado por las autoridades del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social como hospital de referencia a nivel nacional para correr este tipo de estudios a través del Departamento de Medicina Nuclear.

XII. REFERENCIAS

1. Fundora T, *et al.* Aplicación de la medicina nuclear en el Instituto de Hematología e Inmunología. Resultados más relevantes. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 2004;20:2-12.
2. International Symposium on Nuclear Oncology. *World J Nucl Med.* 2003;2:161-164.
3. Powsner E. Applications of nuclear medicine in hematology. En: Bick RL, ed. *Hematology clinical and laboratory practice.* St. Louis: Mosby; 1993, 120.
4. Fundora T, Fernández N, Putinstseva E, Hernández P. Aplicación de los radionuclidos en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades hematológicas. Experiencia de su uso in vivo en el Instituto de Hematología e Inmunología. *Proceedings. International Seminar – First National Workshop “Use and Development of health related industrial isotopes products”.* ISBN 959-7136-06-6. 2000:130-2.
5. Oyen WJG, *et al.* Scintigraphic detection of bone and joint infection with indium-111-labelled nospecific polyclonal human immunoglobulin. *G. J Nucl Med.* 1990;31:403-412.
6. Love C. Palestro CJ. Radionuclide imaging of infection. *J Nucl Med Technol* 2004, 32:47-57.
7. Bhatnagar A, *et al.* Diagnosis and follow of hip prosthesis infection using Tc-99m ciprofloxacin. *Ind J Radiol Imag* 1999;9:19-20.
8. Malamitsi J, *et al.* Infection: a 99m-ciprofloxacin radiopharmaceutical for the detection of bone infection. *Clin Micr Inf.* 2003;9:101-102.

9. Gutiérrez A, Freire D. Comparación de la marcación de leucocitos con coloides de Tc-^{99m} en sangre completa y capa leucocitaria como un método de radioinmunodiagnóstico. Guatemala: Universidad de San Carlos (tesis de graduación Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia)1995.58p.
10. Godoy CC, Portillo MC. Marcación de plaquetas utilizando cuatro radiofármacos con Tc-^{99m}, en diagnóstico de trombosis. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia)1992.49p.
11. Hernández S, Portillo MC. Marcaje radioisotópico de leucocitos con ^{99m}Tc-Hexametilpropilenaminoxima y ^{99m}Tc-Glucoheptonato. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1995.57p.
12. Oliva RM, Freire D. Estabilización de hexametazima marcada con Tecnecio 99-metaestable (^{99m}Tc) con cloruro de cobalto hexahidratado, para la marcación de leucocitos. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1996.43p.
13. Lomeña F. Leucocitos marcados en la detección de lesiones infecciosas. Rev Esp Med Nuclear. 1989;8:19-32.
14. Froelich JW, Swanson D. Imagin of inflatamatory processes with labelled cells. Sem Nucl Med. 1984; 14:128-140.
15. Portillo MC. Marcación leucocitaria, Memorias del curso de Radiofarmacia Hospitalaria del 6 al 26 de noviembre. Guatemala: DGEN. 1993.
16. McAffe JG, Thakur MC. Survey of radioactive agents for *in vitro* labeling of phagocytic leukocytes. J Nucl Med. 1976;17:480-4787.

17. Schrott HJ, Oberhausen E, Beberich R. Cell labelling with colloidal substances in whole blood. *Eur J Nucl Med.* 1981;6:469-472.
18. Linhart NC. *et al.* ^{99m}Tc labelled human leukocytes. *Acta haem.* 1980; 3:9-15.
19. Stites DP, Terr IA. *Inmunología Básica y Clínica.* 7 ed. Manual Moderno, 1993. 1065p.
20. Vives JL, Aguilar JL. *Manual de técnicas de laboratorio en hematología.* Ediciones científicas y técnicas S.A. Masson-Salvat 1994.
21. Henry JB. *Diagnóstico y tratamientos clínicos por el laboratorio.* 9 ed. Masson-Salvat Medicina, 1993. 1509p.
22. English D, Andersen BR. Labeling of phagocytes from human blood with ^{99m}Tc sulfur colloid. *J Nucl Med.* 1975;16:5-10.
23. Thakur ML, *et al.* ^{111}In labeled leukocytes for the localization of abscesses; preparation analyses, tissue distribution and comparison with ^{67}Ga citrate in dogs. *J lab Clin Med.* 1977;89:217-228.
24. Vaz R, *et al.* Modificaciones introducidas en la marcación de leucocitos con ^{99m}Tc -HMPAO para detecciones de focos infecciosos. *Rev Esp Med Nucl.* 1992;11:101
25. Gobar LS, *et al.* Indium-111-leukocyte imaging: a case of peritonitis mimicking inflammatory bowel disease. *J Nucl Med.* 1997;38:1138-1140.
26. Mock BH, English D. Leukocyte labeling with technetium- ^{99m}Tc . Tin colloids. *J Nucl Med.* 1987;28:1471-1477.

27. Charron M, *et al.* Detection of inflammatory bowel disease in pediatric patients with technetium-99m-HMPAO- labelled leukocytes. *J Nucl Med.* 1994;35:451-455.
28. Srivastava SC, *et al.* A stannous glucoheptonate kit method for 99mTc labeling of leukocytes and platelets. *J Labeled Coumpunds Radipharm.* 1989;16:38-40.
29. Domenech T, Quinquer JS. *Imagenes en Medicina Nuclear, Diagnóstico morfológico y funcional.* España: Internacional de Ediciones y publicaciones S.A. 1990. 179p.
30. Straub FR, *et al.* Stannous glucoheptonate: an effective tinning agent for 99mTc labelling of blood cells. Presented at the 33rd Annual Meeting Society of Nuclear Medicine. Washington, DC. 1986;6:22-25
31. McAffe JG, Subramanian G, Gagne G. Technique of leukocyte harvesting and labeling. *Sem Nucl Med.* 1984;15:83-103.
32. Mortelmans A, *et al.* Clinical usefulness of Technetium-99m-HM-PAO labelled white blood cell imaging in abscesses. *Clin Nucl Med.* 1989;14:127.
33. Platt WL. *Atlas de hematología en color.* 2a ed. López M, Trad. España: Jims S.A. 1982. 453p
34. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scan J clin Lab Invest.* 1986;21:7-89.
35. Boyum A. Separation of blood leukocytes, granulocytes and limphocytes. *Tissue Antigens.* 1974;4:269-274.

36. Goedemans WT, Hardeman HR. Clumping of labeled leucocytes suspension. A simple measure for avoiding it. *Nucl Med Biol.* 1988;15:339-342.
37. Roy AJ, Franklin A, Simmons WB. A method for separation of granulocytes from normal human blood using hidroxyethylstarch. *Prepar Biochem.* 1971;1:197-203.
38. Gil MC. Prácticas de laboratorio. Marcación de células sanguíneas. Comisión Chilena de Energía Nuclear. Santiago de Chile, 1990.
39. Denis E, Burton RA. Separation of red blood cells granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuos density gradients of Fycoll-Hypaque. *J Immuno Meth.* 1995;5:249-252.
40. Martindale. Guia completa de consulta farmacoterapeutica. Pharma Editores, Barcelona: 2003. (423-425p, 1046p, 1419p, 2080p).
41. Rowe C, Sheskey PJ, Oven SC. HandBook of Pharmaceutical Excipients. 1 ed. The Pharmaceutical Press. USA:2006. (330p, 335p, 895p).
42. The Merck Index. 13 ed. Merck Research Laboratories of Merck and Co, Inc. Press. USA. 2001. (519p, 834p, 908p).
43. Litter M. Farmacología Experimental y Clínica. 7 ed. Buenos Aires: El Ateneo 1988. (745 -747)
44. Genaro AR, *et al.* Farmacia Práctica de Remington. 20 ed. Argentina: Medica Panamericana, Tomo I, Tomo II. 2003. (2723p).
45. Sociedad Argentina de Radiofarmacia, eds. Radiofarmacia. Buenos Aires, Argentina: 1995;78-99.

46. Portillo MC, Rodríguez SR. Comparación de dos métodos de producción de radriofármacos y evaluación de su calidad. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1987.
47. Moragas M, *et al.* Gammagrafía con ^{99m}Tc -HMPAO leucocitos y ^{99m}Tc -MDP en el diagnóstico de infección ósea. *Rev Esp Med Nucl.* 1990;9:40.
48. Datz FL, *et al.* Procedure guideline for Technetium-99m-HMPAO-labelled leukocyte Scintigraphy for suspected Infection/Inflammation. *J Nucl Med.* 1997;38:987-990.

13. ANEXOS

ANEXO 1

INDICACIONES CLINICAS COMUNES EN LA DETECCION DE INFLAMACION -INFECCION AGUDA CON LA TECNICA DE MARCACION DE LEUCOCITOS.

- a. En la detección de sitios de inflamación – infección aguda en pacientes febriles con o sin signos / síntomas localizados.
 1. Para detectar sitios de inflamación a causa de dolor abdominal.
 2. Para localizar sitios de infección en pacientes con granulocitosis y/o con hemocultivo positivo.

- b. Para detectar y determinar el grado de inflamación en la enfermedad Isquémica del intestino.

- c. Para detectar y dar seguimiento a infecciones musculoesqueléticas como artritis séptica y osteomielitis.
 1. Es mucho más sensible en la detección de osteomielitis aguda comparada con la sensibilidad obtenida en la osteomielitis crónica (48).

INFORMACION PERTINENTE ANTES DE LLEVAR A CABO EL PROCEDIMIENTO

1. Es esencial la coordinación entre el Médico Nuclear y el médico que refiere al paciente. Deben de tenerse a la vista la historia clínica y los resultados de laboratorio clínico del paciente, así como todos los estudios de imagen que se le hayan hecho al paciente para la mejor visualización del foco infeccioso.

2. La técnica de marcación de leucocitos con ^{99m}Tc comparada con la de ^{111}In tiene la ventaja de tener tiempos de imagen más cortos y seguidos, además de que las dosis de radiación absorbidas por el paciente son menores.
3. La marcación de leucocitos con ^{111}In se prefiere en pacientes a los cuales se les sospecha el foco de infección – inflamación en el abdomen/pelvis ya que no hay excreción al tracto gastrointestinal ni urinario como puede ocurrir con la de ^{99m}Tc .
4. La marcación de leucocitos con ^{111}In se prefiere en pacientes a los cuales se les sospecha el foco de infección – inflamación prolongada en los pulmones debida a fallo cardíaco congestivo, shock séptico o fallo renal.
5. La marcación de leucocitos con ^{67}Ga se prefiere en la evaluación y seguimiento actividad linfocítica o bien en procesos de inflamación granulomatosa como tuberculosis o sarcoidosis, especialmente en pacientes inmunocomprometidos.

PRECAUCIONES QUE DEBEN DE TOMARSE EN CUENTA DURANTE EL PROCEDIMIENTO

1. La calidad del procedimiento debe asegurar la identificación correcta de los pacientes como también la de sus muestras durante todo el procedimiento, bajo las normas de bioseguridad y protección radiológicas establecidas.
2. Las células marcadas deben ser reinyectadas al paciente en un tiempo de 1.5 a 2 horas y no mayor de 3 a 4 horas después de obtenida la muestra.
3. Debido al uso de una línea central intravenosa, debe de trabajarse bajo completa esterilidad durante todo el proceso (48).

ANEXO 2

PREPARACION DE REACTIVOS

AZUL DE TRIPAN:

Disolver 0.2 gramos de colorante de Azul de Tripán en 50 mililitros de solución buffer de fosfatos y azida de sodio 3mM. Agitar y guardar en frasco ambar.

ACD (Acido citrato dextrosa)

Disolver en 200 mililitros de agua tridestilada:

4.4 gramos de citrato trisódico

1.6 gramos de ácido citrico

5.0 gramos de dextrosa

Verificar el Ph a 6.0