

**SIMONE ODÍLIA FERNANDES DINIZ**

**EMPREGO DA CEFTIZOXIMA MARCADA COM  
TECNÍCIO-99m NA DIFERENCIAÇÃO DE PROCESSOS  
INFLAMATÓRIOS ASSÉPTICOS DE SÉPTICOS EM  
MODELOS EXPERIMENTAIS**

Belo Horizonte - MG

2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**SIMONE ODÍLIA FERNANDES DINIZ**

**EMPREGO DA CEFTIZOXIMA MARCADA COM  
TECNÍCIO-99m NA DIFERENCIAÇÃO DE PROCESSOS  
INFLAMATÓRIOS ASSÉPTICOS DE SÉPTICOS EM  
MODELOS EXPERIMENTAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso

Belo Horizonte - MG

2008

---

---

Aos meus pais, José Levy e Vera, pelo amor incondicional,  
dignidade e exemplo de vida.

Aos meus irmãos pelo carinho e apoio constante.

---

---

A DEUS que sempre nos enche de esperança, garra e vontade de vencer mesmo diante dos momentos difíceis.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso, pela amizade, confiança, ensinamentos, otimismo, paciência e dedicação demonstrados durante a realização deste trabalho, sempre disponível para correções, esclarecimentos e sugestões.

Ao Dr. Josep Martin-Comin, Chefe do Centro de Medicina Nuclear, do Hospital de Bellvitge, Barcelona pela

À Profa. Dra. Cleuza Maria de Faria Rezende, do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Escola de Veterinária/UFMG, pela amizade e valiosa ajuda nos modelos de experimentais.

À Profa. Dra. Rogéria Serakides, do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Escola de Veterinária/UFMG, pela amizade e valiosa ajuda nas análises histológicas.

Ao Dr. Cristiano Ferrari Siqueira e funcionários da Clínica Ecograf, pela amizade, realização das imagens cintilográficas e o fornecimento do tecnécio-99m.

Às amigas e colegas Profa. Dra. Vildete Aparecida Sousa Carmo e Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira, pelo carinho e constante colaboração.

Aos amigos e funcionária do laboratório de Radioisótopos, em especial, Luciene, Maira, Danielle e André, pelo carinho, amizade e auxílio nos experimentos.

Aos bolsistas de iniciação científica: Marina, Bianca, Talita, Luciane, Tatiana, Raphael, Juliana e Sidneia pela ajuda nos trabalhos experimentais.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por todos os ensinamentos prestados e amizade.

---

---

À médica veterinária Maria Adelaide Fernandes e ao funcionário José Batista Viturino, do Biotério da Faculdade de Farmácia/UFMG, pela ajuda e colaboração.

Ao CNPq e FAPEMIG, pelo auxílio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

---

---

***"Para realizarmos grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar."***

**Anatole France**

---

---

## RESUMO

O rendimento de marcação da ceftizoxima com tecnécio-99m ( $^{99m}\text{Tc-CFT}$ ) foi da ordem de 94%, mantendo-se estável por 6 horas. A atividade biológica da  $^{99m}\text{Tc-CFT}$  avaliada por difusão em ágar impregnado com *E. coli* e *S. aureus* mostrou que o antibiótico radiomarcado foi capaz de reconhecer tanto bactéria Gram-positiva quanto Gram-negativa, sugerindo que o antibiótico preservou o amplo espectro de atividade mesmo após a marcação. Estudos *in vitro* realizados com uma membrana de éster de celulose (0,22  $\mu\text{m}$ ) mostraram que a  $^{99m}\text{Tc-CFT}$  apresentou ligação específica para *S. aureus* (11,0 %  $\pm$  2,4). Por outro lado, o mesmo não ocorreu com o  $^{99m}\text{Tc}$ -fitato de sódio (3,7%  $\pm$  0,7) e o  $^{99m}\text{Tc}$ -ácido dietilenotriaminopentacético (0,6%  $\pm$  0,1). O valor médio de ligação da  $^{99m}\text{Tc-CFT}$  com as proteínas plasmáticas foi de 34,0 %  $\pm$  3,0 o que está de acordo com os dados descritos na literatura para a ceftizoxima. Os estudos de biodistribuição da  $^{99m}\text{Tc-CFT}$  mostraram alta captação pelos rins (80%) nos tempos de 1, 2 e 6 horas após a injeção, indicando excreção renal. As análises histológicas dos focos inflamatórios e infecciosos mostraram uma reação inflamatória de intensidade similar. Após 24 horas da indução dos focos inflamatório e infeccioso, no músculo da coxa esquerda de ratos, as imagens cintilográficas mostraram que a  $^{99m}\text{Tc-CFT}$  permaneceu nos focos infecciosos (*E. coli*, *S. aureus*) ao longo de todo experimento. O mesmo não foi observado no foco inflamatório (zimosan). As análises quantitativas das imagens cintilográficas mostraram que a relação alvo/não alvo para os focos infecciosos nos tempos de 2 e 6 horas foi maior do que aquela observada para o grupo de zimosan. Os resultados obtidos 48 horas após a inoculação dos *S. aureus* e zimosan, na cavidade medular da tíbia esquerda de ratos, mostraram que a  $^{99m}\text{Tc-CFT}$  apresentou maior tropismo para o foco infeccioso, quando comparado com o foco inflamatório. A retenção da  $^{99m}\text{Tc-CFT}$  no sítio infeccioso por até 6 horas após a injeção do radiofármaco indica uma ligação específica entre a  $^{99m}\text{Tc-CFT}$  e a bactéria presente no foco infeccioso. O valor médio da relação alvo/não alvo da  $^{99m}\text{Tc-CFT}$  foi significativamente maior na tíbia infectada (2,40  $\pm$  0,22) do que na tíbia inflamada (1,50  $\pm$  0,05) e no grupo controle (1,05  $\pm$  0,04) para todos os tempos investigados. A  $^{99m}\text{Tc-CFT}$  apresentou um alto tropismo e retenção para a região infectada nos modelos experimentais



utilizados. Portanto, os resultados obtidos sugerem que a  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT poderia constituir-se em uma interessante estratégia para identificar focos inflamatórios e infecciosos e, também, diferenciar sítios assépticos de sépticos.

**Palavras-chave:**  $^{99m}\text{Tc}$ tecnécio-ceftizoxima, osteomielite, inflamação, imagens cintilográficas.

---

---

---

---

## ABSTRACT

The labeling yield of ceftizoxime with technetium-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ -CFT) was approximately 94%, remaining stable for six hours. The biological activity of  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT evaluated by diffusion in agar impregnated with *E. coli* and *S. aureus* showed that the radiolabeled antibiotic was capable of recognizing both Gram-negative and Gram-positive bacteria, suggesting that the antibiotic preserved its broad spectrum of activity even after labeling. *In vitro* studies performed with a cellulose ester membrane (0.22  $\mu\text{m}$ ) showed that  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT presented specific binding to *S. aureus* (11.0%  $\pm$  2.4). In contrast, the same did not occur with the  $^{99m}\text{Tc}$ -sodium phytate (3.7%  $\pm$  0.7) and  $^{99m}\text{Tc}$ -diethylenetriaminepentaacetic acid (0.6%  $\pm$  0.1). The average binding of  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT to plasma proteins was 34.0%  $\pm$  3.0, this value is an agreement with results described in the literature for ceftizoxime. The biodistribution studies of  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT showed a high uptake by the kidney (80%) at 1, 2, and 6 hours after the injection, indicating renal excretion. The histological analysis of inflammatory and infectious foci showed an inflammatory reaction of similar intensity. Twenty-four hours after the induction of the inflammatory and infectious foci in the left thigh muscle of rats, scintigraphic images showed that the  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT remained in the foci induced by *E. coli* and *S. aureus* throughout the entire experiment. The same result not was observed in the inflammatory foci (zymosan). Quantitative analysis of the scintigraphic images showed that the target/non target ratio for infectious foci (*E. coli*, *S. aureus*) at 2 and 6 h was higher than that observed for the zymosan group. The results obtained 48 hours after inoculation of *S. aureus* and zymosan in the medullary cavity of the left tibia of rats showed that  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT presented higher tropism to infectious foci, when compared with the inflammatory focus. The retention of  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT at the infectious foci for up to six hours after the injection of the radiopharmaceutical indicate a specific bond between  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT and the bacteria present at the infectious focus. The average value of the target/non target ratio of  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT was significantly higher in the infected (2.40  $\pm$  0.22) than in the inflamed tibia (1.50  $\pm$  0.05) and the control group (1.05  $\pm$  0.04) for all of the investigated times. The  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT presented a high tropism and retention for an infected region in the experimental models used. Thereby, the results obtained suggesting that the

---

---

$^{99m}\text{Tc}$ -CFT could constitute an interesting strategy to identify inflammatory and infectious foci and also to distinguish aseptic from septic foci.

**Keywords:**  $^{99m}\text{Tc}$ Technetium-ceftizoxime, osteomyelitis, inflammation, scintigraphic imaging.

---

---

## LISTA DE FIGURAS

1	Componentes da resposta inflamatória.....	20
2	Gerador de molibdênio-99/tecnécio-99m.....	26
3	Gama-câmara.....	27
4	Estrutura química da ciprofloxacina.....	36
5	Estrutura química da ceftizoxima.....	40
6	Gama-câmara para animais.....	55
7	Regiões de Interesse (ROIs).....	55
8	Halos de inibição em placas de ágar impregnadas com <i>S. aureus</i> (A) e <i>E. coli</i> (B) 1 - <sup>99m</sup> Tc-CFT 2 - CFT original 3 - CFT + reagentes.....	59
9	Diâmetros dos halos de inibição de <i>S. aureus</i> (A) e <i>E. coli</i> (B).....	61
10	Ensaio de ligação <i>in vitro</i> da <sup>99m</sup> Tc-CFT, <sup>99m</sup> Tc-fitato de sódio e <sup>99m</sup> Tc-DTPA com <i>S. aureus</i> .....	62
11	Imagens cintilográficas (visão anterior) obtidas 1 hora após a injeção de pertecnetato de sódio (Na <sup>99m</sup> TcO <sub>4</sub> ), tecnécio-99m hidrolisado ( <sup>99m</sup> TcO <sub>2</sub> ) e <sup>99m</sup> Tc-CFT em ratos.....	64
12	Estudos de biodistribuição da <sup>99m</sup> Tc-CFT 1, 2 e 6 horas após a injeção.....	65
13	Fotomicrografias de músculo, da coxa de ratos, 24 horas após a injeção, H&E eosina, Bar = 38,9 μm. A) músculo controle (salina). Fibras musculares íntegras e justapostas envoltas por endomísio sem alterações degenerativas ou inflamatórias. B) Músculo com zimosan (processo inflamatório). Infiltrado inflamatório constituído predominantemente por pícitos não envolto por cápsula fibrosa. C) Músculo com <i>S. aureus</i> . Infiltrado inflamatório constituído predominantemente por pícitos não envolto por cápsula fibrosa.....	66
14	Imagens cintilográficas (visão anterior) de ratos 0,5; 1; 2 e 6 horas após injeção da <sup>99m</sup> Tc-CFT em modelo de inflamação/infecção no músculo da coxa (n=5). A - inflamação (zimosan). B - infecção ( <i>E. coli</i> ). C - infecção ( <i>S. aureus</i> ).....	68
15	Relação alvo/não-alvo em modelos de inflamação asséptica (zimosan) e inflamação séptica ( <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> ) no músculo da coxa 0,5; 1; 2 e 6 horas após injeção de <sup>99m</sup> Tc-CFT.....	70
16	Relação alvo/não-alvo em um modelo de infecção ( <i>S. aureus</i> ), no músculo da coxa de ratos, utilizando <sup>99m</sup> Tc-CFT e <sup>99m</sup> Tc-fitato de sódio.....	71
17	Fotomicrografias de tibia de ratos 48 horas após a injeção intra-óssea. A) Grupo tratado com salina. Presença de material eosinofílico, acelular e amorfo por entre tecido mielóide normal e trabéculas ósseas intactas e sem reação inflamatória. HE, Bar = 96 μm. B) Grupo tratado com zimosan. Processo inflamatório associado a trabéculas ósseas necróticas (setas). HE, Bar = 48 μm. C) Grupo tratado com <i>S. aureus</i> . Processo inflamatório predominantemente neutrófilico de permeio a trabéculas ósseas necróticas e focos de hemorragia (setas). HE, Bar = 48μm.....	73

---

---

18	Imagens cintilográficas (visão anterior) de ratos 1, 2, 4 e 6 h após a injeção de $^{99m}\text{Tc}$ -CFT (n=5). A - osteomielite ( <i>S. aureus</i> ). B - inflamação (zimosan). C - controle (salina).....	75
19	Relação alvo/não alvo em modelos experimentais de infecção/inflamação e salina 1, 2, 4 e 6 horas após a injeção da $^{99m}\text{Tc}$ -CFT.....	76

---

---

---

---

## LISTA DE TABELAS

1	Percentual de pureza radioquímica da $^{99m}\text{Tc}$ -CFT.....	57
2	Estabilidade da $^{99m}\text{Tc}$ -CFT.....	58
3	Estabilidade dos reagentes liofilizados acondicionados em freezer a $-25^{\circ}\text{C}$ e $-70^{\circ}\text{C}$ .....	59
4	Percentual de ligação da $^{99m}\text{Tc}$ -CFT com as frações solúveis e insolúveis do plasma.....	63

---

---

---



---

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

TC	- tomografia computadorizada
US	- ultra-sonografia
RNM	- ressonância nuclear magnética
MDP	- metilenodifosfonato
$^{67}\text{Ga}$	- gálio-67
HMPAO	- hexametilpropileno amino oxima
keV	- quilo elétron-volt
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	- tecnécio-99m meta-estável
$^{99}\text{Mo}$	- molibdênio-99
$^{98}\text{Mo}$	- molibdênio-98
$^{99}\text{Tc}$	- tecnécio-99
$^{99}\text{Ru}$	- rutênio-99
$T_{1/2}$	- tempo para eliminar metade da concentração do radionuclídeo
$\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$	- pertecnetato de sódio
IPEN	- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
CNEN	- Comissão Nacional de Energia Nuclear
PEG	- polietilenoglicol
IgG	- imunoglobulina G
IgM	- imunoglobulina M
$^{111}\text{In}$	- índio-111
<i>E. coli</i>	- <i>Escherichia coli</i>
IL-8	- interleucina - 8
IL-1	- interleucina - 1
IL-2	- interleucina - 2
HYNIC	- hidrazinonicotinamida
$^{18}\text{F}$ -FDG	- flúor-18-fluordesoxiglicose
PET	- tomografia por emissão de pósitron
HDP	- hidroximetilenodifosfonato
OMS	- Organização Mundial de Saúde
MBq	- Megabequerel
CCD	- Cromatografia de camada delgada
$^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$	- tecnécio-99m livre
PR	- pureza radioquímica
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CFT	- ceftizoxima marcada com tecnécio-99m
<i>S. aureus</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i>
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA	- ácido dietilenotriaminopentacético marcado com tecnécio-99m
FS-P	- fração solúvel do plasma
FI-P	- fração insolúvel do plasma
cpm	- contagem por minuto
v/v	- volume por volume
UFC	- unidade formadora de colônia
ROIs	- radioatividade nas regiões de interesse
d.p.	- desvio padrão
ANOVA	- Análise de variância

---



---

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>13</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>14</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Inflamação/infecção.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1.1 Aspectos Fisiopatológicos da Inflamação/Infecção.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1.2 Infecções osteoarticulares.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1.2.1 Osteomielite.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1.3 Próteses articulares.....</b>	<b>23</b>
<b>2.2 Medicina Nuclear/ Farmácia Nuclear.....</b>	<b>24</b>
<b>2.3 Tecnécio-99m.....</b>	<b>25</b>
<b>2.4 Diagnóstico de processos inflamatórios/infeciosos.....</b>	<b>27</b>
<b>2.4.1 Radiotraçadores não específicos.....</b>	<b>28</b>
<b>2.4.1.1 Citrato de Gálio-67.....</b>	<b>28</b>
<b>2.4.1.2 Lipossomas radiomarcados.....</b>	<b>29</b>
<b>2.4.2 Radiotraçadores específicos.....</b>	<b>30</b>
<b>2.4.2.1 Anticorpos monoclonais anti-granulócitos radiomarcados.....</b>	<b>30</b>
<b>2.4.2.2 Peptídeos quimiotáticos radiomarcados.....</b>	<b>31</b>
<b>2.4.2.3 Citocinas.....</b>	<b>32</b>
<b>2.4.2.4 <sup>18</sup>F-fluordesoxiglicose (<sup>18</sup>F-FDG).....</b>	<b>33</b>
<b>2.4.2.5 Leucócitos autólogos radiomarcados.....</b>	<b>34</b>
<b>2.4.2.6 Antibióticos radiomarcados.....</b>	<b>35</b>
<b>2.5 O papel da Medicina Nuclear no diagnóstico de     inflamação/infecção no sistema osteoarticular.....</b>	<b>41</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>45</b>
<b>4 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>46</b>
<b>5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>47</b>
<b>6 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>
<b>6.1 Material.....</b>	<b>47</b>
<b>6.1.1 Reagentes.....</b>	<b>47</b>
<b>6.2 Métodos.....</b>	<b>48</b>
<b>6.2.1 Preparação dos reagentes.....</b>	<b>48</b>
<b>6.2.2 Procedimento de Marcação.....</b>	<b>48</b>
<b>6.2.3 Pureza Radioquímica (PR).....</b>	<b>49</b>
<b>6.2.4 Estabilidade de marcação.....</b>	<b>49</b>
<b>6.2.5 Estabilidade dos reagentes liofilizados após acondicionamento       em freezer.....</b>	<b>50</b>



---

---

6.2.6 Ensaio de ligação <i>in vitro</i> da $^{99m}\text{Tc}$ -CFT com <i>S. aureus</i> .....	50
6.2.7 Atividade biológica.....	50
6.2.8 Determinação do percentual de ligação da $^{99m}\text{Tc}$ -CFT com as proteínas plasmáticas.....	51
6.2.9 Experimentação animal.....	52
6.2.9.1 Estudos de biodistribuição.....	52
6.2.9.2 Modelo de inflamação asséptico/séptico no músculo da coxa de ratos.....	52
6.2.9.3 Modelo de inflamação asséptico/séptico na tíbia de ratos.....	53
6.2.9.4 Estudos histopatológicos.....	53
6.2.9.5 Imagens cintilográficas.....	54
6.2.10 Análise estatística.....	55
<b>7 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
7.1 Pureza Radioquímica (PR).....	56
7.2 Estabilidade da $^{99m}\text{Tc}$ -ceftizoxima.....	57
7.3 Avaliação da estabilidade dos reagentes liofilizados, por meio da pureza radioquímica, após acondicionamento em freezer.....	58
7.4 Atividade biológica.....	59
7.5 Ensaio de ligação <i>in vitro</i> da $^{99m}\text{Tc}$ -CFT.....	61
7.6 Determinação do percentual de ligação da $^{99m}\text{Tc}$ -CFT com as proteínas plasmáticas.....	62
7.7 Estudos de biodistribuição.....	63
7.8 Estudos histopatológicos no músculo da coxa de ratos.....	65
7.9 Imagens cintilográficas obtidas com $^{99m}\text{Tc}$ -CFT em modelos de inflamação, asséptica e séptica, no músculo da coxa de ratos.....	67
7.10 Biodistribuição do $^{99m}\text{Tc}$ -fitato de sódio e da $^{99m}\text{Tc}$ -CFT em um modelo de infecção induzido por <i>S. aureus</i> no músculo da coxa de ratos.....	71
7.11 Estudos histopatológicos na tíbia de ratos.....	72
7.12 Biodistribuição da $^{99m}\text{Tc}$ -CFT em modelo de inflamação séptica, induzido por <i>S. aureus</i> na tíbia de ratos.....	74
<b>8 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>79</b>
8.1 Conclusões.....	79
8.2 Perspectivas.....	80
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXO A - Patente.....</b>	<b>91</b>

---

---

---

---

## 1 INTRODUÇÃO

O diagnóstico precoce e a localização dos processos inflamatórios e infecciosos são de fundamental importância para a escolha da melhor conduta terapêutica, reduzindo com isto a morbidade e a mortalidade, o tempo de hospitalização e o custo total do tratamento dessas doenças. Os métodos convencionais de imagem como tomografia computadorizada (TC), ultra-sonografia (US) e ressonância nuclear magnética (RNM) não são capazes de fazer o diagnóstico precoce, pois se baseiam em alterações anatômicas importantes nos tecidos ou órgãos, muitas vezes ausentes na fase inicial dos processos inflamatórios e infecciosos (THRALL e ZIESSMAN, 2003; DUMAREY et al., 2006; EL-MAGHRABY et al., 2006).

Ao contrário das técnicas descritas anteriormente, a imagem cintilográfica que se baseia em alterações funcionais fisiológicas ou bioquímicas dos tecidos, constitui um excelente método não invasivo de exploração do corpo inteiro, permitindo tanto a localização quanto à determinação do número de focos inflamatórios e infecciosos, de maneira precoce, em todas as partes do corpo (CORSTENS et al., 1999; BOERMAN et al., 2001; RENNEN et al., 2005).

Atualmente, os principais radiotraçadores utilizados para o diagnóstico das osteomielites (infecção óssea) são o metilenodifosfonato-tecnécio-99m ( $^{99m}\text{Tc-MDP}$ ), citrato de gálio-67 ( $^{67}\text{Ga-Citrato}$ ) e os leucócitos marcados com tecnécio-99m-Hexametilpropileno amino oxima (HMPAO). Entretanto, o  $^{99m}\text{Tc-MDP}$  apresenta baixa especificidade, o  $^{67}\text{Ga-citrato}$  tem como desvantagem proporcionar ao paciente alta dose de exposição à radiação, enquanto que o  $^{99m}\text{Tc-HMPAO-leucócitos}$  exige um tempo longo de preparação e oferece risco ao manipulador de contaminação com doenças infecto-contagiosas. Além disso, esses radiofármacos não são capazes de diferenciar processo inflamatório de infeccioso (EL-MAGHRABY et al., 2006; PALESTRO et al., 2007<sub>a</sub>). Assim, o desenvolvimento de radiofármacos que possam diferenciar focos inflamatórios de infecciosos de forma rápida, com alta sensibilidade e especificidade constitui um dos principais objetivos nas recentes pesquisas em medicina nuclear. Entre esses novos radiofármacos destacam-se os antibióticos radiomarcados.

---

---

---

Dentre estes, a ciprofloxacina marcada com tecnécio-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ -Infecton) tem sido utilizada no diagnóstico diferencial entre inflamação e infecção. Entretanto, devido aos resultados contraditórios obtidos com esse radiofármaco existem restrições quanto ao emprego desse agente na diferenciação de processos assépticos de sépticos. Sabe-se pela literatura que o  $^{99m}\text{Tc}$ -Infecton apresenta captação inespecífica em focos inflamatórios assépticos, contribuindo desta forma pelos casos falso-positivos. A provável explicação para este fato deve-se segundo Larikka et al. (2002<sub>a,b</sub>) ao maior tempo de circulação desse antibiótico, meia-vida biológica de 4,5 horas, o que poderia contribuir para uma variedade de interações antes da ligação propriamente dita entre a bactéria e o antibiótico. Neste contexto, a ceftizoxima devido às características tais como amplo espectro, meia vida biológica de 1,7 horas e rápida depuração sanguínea aparece como um antibiótico capaz de ser marcado com tecnécio-99m e, provavelmente, ser utilizado para a obtenção de imagens cintilográficas que poderiam ser úteis no diagnóstico precoce e diferencial de processos inflamatórios assépticos de sépticos. Desta forma, a proposta deste trabalho foi avaliar a capacidade da ceftizoxima marcada com tecnécio-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ -CFT) de identificar focos inflamatórios e infecciosos e, também, diferenciar sítios assépticos de sépticos.

---

---

---

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Inflamação/infecção

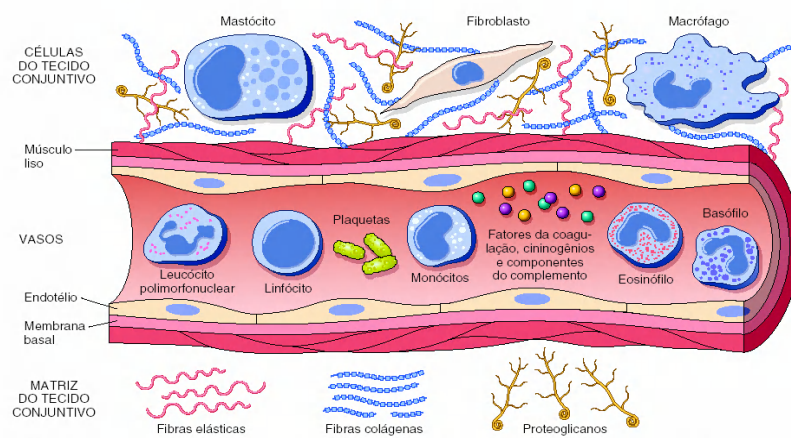
#### 2.1.1 Aspectos fisiopatológicos da inflamação/infecção

A inflamação é uma das principais reações defensivas do organismo. É uma reação dos tecidos vascularizados a um agente agressor caracterizada pela saída de líquidos e de células do sangue para o interstício. A infecção é definida pela invasão e multiplicação de microrganismos nos tecidos. As lesões celulares podem ser causadas por agentes químicos, radiações ionizantes, microrganismos, temperaturas extremas, traumas, partículas estranhas, privação de oxigênio ou nutrientes. Pode ocorrer infecção sem inflamação, por exemplo, nos pacientes imunodeprimidos. Por outro lado, pode ocorrer inflamação sem infecção quando a lesão do tecido não está associada à invasão de microrganismos, mas provocada por outro estímulo (PEREIRA e BOGLIOLO, 2000; MITCHELL e COTRAN, 2003).

A resposta inflamatória consiste de dois componentes principais, uma reação vascular e uma reação celular. Muitos tecidos e células estão envolvidos nessas reações, incluindo o fluido e as proteínas do plasma, as células circulantes, os vasos sanguíneos e os componentes celulares e extracelulares do tecido conjuntivo. As células circulantes incluem os neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e plaquetas. As células do tecido conjuntivo são os mastócitos, fibroblastos e macrófagos. Os constituintes da matriz extracelular compreendem as proteínas fibrosas (colágeno e elastina), glicoproteínas de adesão e proteoglicanos, Figura 1 (MITCHELL e COTRAN, 2003).

---

---



**Figura 1.** Componentes da resposta inflamatória  
 Fonte: MITCHELL e COTRAN (2003)

Após uma agressão tecidual, ocorre a liberação de mediadores químicos (citocinas, histamina, prostaglandinas e leucotrienos) que levam a uma vasodilatação local com aumento do fluxo sanguíneo (eritema). Subseqüentemente, a microcirculação torna-se mais permeável resultando no movimento de um fluido rico em proteínas para os tecidos extracelulares (edema), ocasionando uma hemoconcentração local tornando o sangue mais viscoso e a circulação mais lenta (estase). Com a estase instalada, os eventos celulares têm início com os leucócitos (principalmente neutrófilos) deixando a região central dos vasos sanguíneos e se acumulando ao longo da superfície do endotélio vascular, processo chamado de marginação. Em seguida, os leucócitos então se aderem ao endotélio deslocando-se sobre sua superfície (fenômeno de rolamento) e finalmente migram através da membrana celular, por emissão de pseudópodos, para o tecido intersticial (diapedese) em direção ao estímulo quimiotático (WEINER e THAKUR, 1999; MITCHELL e COTRAN, 2003).

Os agentes quimiotáticos são liberados no interstício e se difundem criando um gradiente de concentração que diminui em direção ao vaso, orientando os movimentos dos leucócitos à região agredida. Os leucócitos fixam-se ao agente inflamatório envolvendo-o por pseudópodos até ser incluído dentro de uma vesícula ou fagossomo que se une ao lisossoma, permitindo a passagem de enzimas digestivas e agentes bactericidas para o interior do fagossomo, possibilitando,

---

---

assim, a destruição do agente inflamatório (MITCHELL e COTRAN, 2003). Cessada a ação do agente, ocorre redução da liberação dos mediadores, a microcirculação recupera o estado hemodinâmico original e as células exsudadas juntamente com o líquido voltam à circulação sangüínea, geralmente pelos vasos linfáticos. Se há necrose, o tecido destruído é fagocitado e logo depois surgem os fenômenos de cicatrização ou de regeneração dependendo da extensão da lesão e do órgão acometido (WEINER e THAKUR, 1999; PEREIRA e BOGLIOLO, 2000).

Os sinais e sintomas clássicos da inflamação são eritema (rubor), edema (tumor), calor, dor e perda da função. A inflamação se divide em aguda e crônica. A inflamação aguda é caracterizada por uma duração relativamente curta (minutos, algumas horas ou poucos dias), exsudação dos fluidos e proteínas do plasma (opsoninas, anticorpos e fatores do complemento) com migração de leucócitos predominantemente de neutrófilos (CHIANELLI et al., 1997; PEREIRA e BOGLIOLO, 2000).

A inflamação crônica é definida como uma inflamação de longa duração (semanas, meses e/ou anos), a qual pode ser precedida de uma fase aguda. Essa longa atividade pode derivar da persistência de infecção microbiana no foco, exposição prolongada a agentes tóxicos e doenças autoimunes. A inflamação crônica está associada histologicamente com a presença de células mononucleares (linfócitos, monócitos e macrófagos), proliferação de vasos sangüíneos, fibrose e necrose de tecidos (PEREIRA e BOGLIOLO, 2000).

### **2.1.2 Infecções osteoarticulares**

Como foram mencionados anteriormente, os processos inflamatórios podem ser assépticos ou sépticos. Dentre os processos sépticos osteoarticulares, destacam-se a osteomielite, artrite séptica e infecção de prótese. A osteomielite é uma infecção por microrganismos que invadem os ossos. Os microrganismos penetram no osso a partir de um foco de infecção, traumatismo ou por um ferimento penetrante. Os fagócitos tentam conter as infecções e, durante o processo, liberam enzimas que lisam o osso. O pus espalha-se para dentro de canais vasculares, elevando a pressão intra-óssea e prejudicando o fluxo de sangue. À medida que a infecção não

---

---

---

tratada torna-se crônica, a necrose isquêmica do osso resulta na separação de grandes fragmentos desvascularizados (seqüestros). Na artrite séptica, a invasão bacteriana ocorre no espaço articular. Tanto a osteomielite quanto a artrite séptica causam destruição irreversível e seqüelas devastadoras sobre os ossos e as articulações, muitas vezes difíceis ou impossíveis de serem tratadas. As seqüelas são definitivas e comprometem o paciente para o resto da vida, tanto no aspecto funcional como psicológico. As infecções osteoarticulares são potencialmente curáveis, desde que precocemente diagnosticadas e adequadamente tratadas (MAGUIRE, 1998; XAVIER, 2003).

### **2.1.2.1 Osteomielite**

A osteomielite é uma infecção de propagação muito rápida e que põe em risco a vida do paciente. Três vias de infecção que alcançam o tecido ósseo definem as principais formas de osteomielites: 1) disseminação hematogênica; 2) contaminação após traumatismo cirúrgico e não cirúrgico e 3) disseminação a partir de tecido contínuo infectado. As osteomielites se dividem em aguda, sub-aguda e crônica. A osteomielite aguda engloba as infecções recentes dos ossos. Ocorre principalmente em crianças e, na maioria das vezes, é de origem hematogênica. Em adultos, a osteomielite geralmente é uma infecção sub-aguda ou crônica que se desenvolve em consequência de uma lesão óssea ou de partes moles adjacentes (MAGUIRE, 1998; GOLDMAN e BENNETT, 2001; XAVIER, 2003; ARIAS e FARTO, 2005).

Os microorganismos mais freqüentemente isolados na osteomielite bacteriana estão relacionados à faixa etária do paciente ou ao contexto clínico. O *Staphylococcus aureus* é o agente mais comum na osteomielite hematogênica aguda. Os *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* são mais comuns em pacientes com osteomielite crônica. (MALAMITSI, et al., 2003; ARIAS e FARTO, 2005).

As principais manifestações clínicas das osteomielites de uma maneira geral são dor localizada e febre. As osteomielites são difíceis de serem diagnosticadas, assim como o próprio conceito de cura, podendo ocorrer prolongados intervalos assintomáticos nas osteomielites crônicas. O diagnóstico da osteomielite baseia-se

---

---

principalmente nos achados clínicos, os dados da história clínica, exame físico e exames laboratoriais (proteína C reativa e velocidade de hemossedimentação). A biopsia do local é o método definitivo para se chegar ao diagnóstico. Entretanto, é um método invasivo e muitas vezes contra indicado. O diagnóstico precoce é muito importante, uma vez que em 15-30% dos pacientes adultos que apresentam osteomielite aguda desenvolvem osteomielite crônica. A localização mais freqüente é a tíbia e a incidência de osteomielite pós-cirúrgica oscila entre 1 a 3% (SAPIENZA et al., 2000; WOLF et al., 2001; XAVIER, 2003; EL-MAGHRABY et al., 2006).

Em geral, o tratamento envolve a avaliação da extensão do processo infeccioso, a identificação da etiologia, antibioticoterapia e, quando necessário, a retirada de espaços-mortos e estabilização óssea. A osteomielite aguda é curável com terapia antimicrobiana adequada e debridamento (excisão de tecido) cirúrgico, se necessário. O tratamento deve ser administrado durante quatro a seis semanas. Uma terapia inadequada da osteomielite aguda resulta em infecção recidivante de evolução para osteomielite crônica. Caso não tenha resultado o tratamento, a ressecção radical é o mais indicado (GOLDMAN e BENNETT, 2001; XAVIER, 2003).

### **2.1.3 Próteses articulares**

As principais manifestações clínicas de infecções de próteses articulares são dor articular e febre. A melhor abordagem terapêutica consiste na administração parenteral de antibióticos, além da remoção cirúrgica da prótese (XAVIER, 2003).

As próteses articulares merecem um tratamento especial dentro dos transtornos osteoarticulares. O diagnóstico diferencial entre afrouxamento de prótese e infecção é de grande importância, uma vez que a conduta terapêutica é diferenciada. A dor ocasionada em próteses de joelho e de quadril pode ser devida à infecção ou ao afrouxamento asséptico da prótese. O diagnóstico diferencial entre as duas prováveis causas tem sido de difícil execução pelos métodos convencionais. A principal causa de infecção de prótese é a contaminação durante o implante protético, cujo principal microrganismo é o estafilococo. Este patógeno é também a causa mais comum de infecção após trauma e, de infecções crônicas após

---



---

---

artroplastia de joelho (LARIKKA et al., 2002<sub>a,b</sub>). A artroplastia total de joelho (ATJ) é uma cirurgia de grande porte e sujeita a complicações pós-operatórias, sendo a infecção a mais temida, pois o tratamento é difícil e prolongado. As infecções superficiais devem ser tratadas agressivamente, evitando-se progressão para uma infecção profunda, que colocaria em risco a prótese, o membro e até a vida do paciente. No Instituto de Ortopedia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, a incidência de infecções nas ATJ tem se mantido em torno de 3% nos últimos 3 anos. Na Literatura internacional a incidência varia de 1 a 5% (LIMA et al., 2004; D'ELIA et al., 2007).

## **2.2 Medicina Nuclear/ Farmácia Nuclear**

A Medicina Nuclear é uma especialidade médica que se utiliza de métodos cintilográficos para o diagnóstico de diversas doenças, sendo aplicada em todas as modalidades clínicas como nos diagnósticos de inflamação e infecção. A Farmácia Nuclear é o ramo da ciência que estuda os aspectos da química, farmacologia, bioquímica e fisiologia de compostos radioativos denominados Radiofármacos que são utilizados em Medicina Nuclear, para fins de diagnóstico e tratamento de diversas doenças (THRALL e ZIESSMAN, 2003).

Os radiofármacos são marcados principalmente com radionuclídeos emissores de fótons gama ( $\gamma$ ) com energia compreendida entre 100 e 200 KeV (quilo elétron-volts). Após a sua administração, os radiofármacos se distribuem por afinidade nos tecidos e a radiação emitida é detectada por meio de uma câmara de cintilação (gama-câmara). Desta forma, a cinética e a distribuição destes radiotraçadores são determinadas e acompanhadas ao mesmo tempo no organismo (SAMPSON, 1990; THRALL e ZIESSMAN, 2003).

O radiofármaco ideal para imagens de inflamação/infecção deve apresentar as seguintes características: alta disponibilidade; ausência de toxicidade e não induzir resposta imunológica; permitir o diagnóstico precoce e rápido; acumular de forma eficiente e com boa retenção no foco inflamatório/infeccioso; diferenciar processo inflamatório asséptico de um séptico (infecção); apresentar rápida depuração sangüínea; fornecer baixas doses de radiação; baixo custo; fácil preparação e não

---

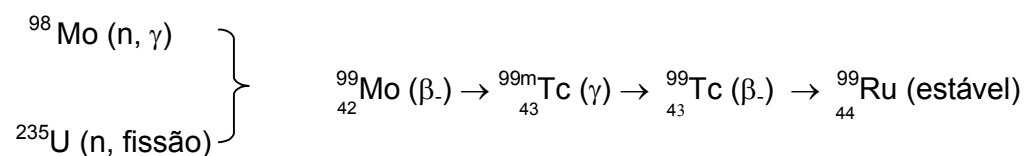
---

oferecer riscos para o manipulador (CORSTENS e VAN DER MEER, 1999; BOERMAN et al., 2001; RENNEN et al., 2005).

### 2.3 Tecnécio-99m

O isótopo radioativo tecnécio-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ) foi descoberto por Perrier e Segrè (1937), num cíclon, na Universidade da Califórnia, em Berkeley (JONES, 1995). Segundo Lever et al. (1985), o tecnécio foi o primeiro elemento produzido pelo homem e, por isso mesmo, seu nome derivou-se da palavra grega *technetos* que significa artificial. Atualmente, são conhecidos 21 isótopos do tecnécio com massa atômica variando de 90 a 110, sendo todos radioativos.

O isótopo metaestável tecnécio ( $^{99m}\text{Tc}$ ) é originado da desintegração de um elemento radioativo o molibdênio-99 ( $^{99}\text{Mo}$ ), isótopo este proveniente da fissão nuclear do urânio e do bombardeamento do  $^{98}\text{Mo}$  (estável) por nêutrons em um reator nuclear (THRALL e ZIESSMAN, 2003); esquematicamente escreve-se:



O tecnécio-99m é produzido por um gerador que foi desenvolvido pela primeira vez por Tucker et al. (1958), consistindo de uma coluna de vidro onde o radionuclídeo  $^{99}\text{Mo}$ , denominado de *pai*, com o tempo de meia-vida física ( $T_{1/2}$ ) de 66 h, encontra-se fortemente adsorvido em uma resina de alumina (Figura 2). Por um processo de desintegração radioativa com emissão de radiação  $\beta^-$ , o  $^{99}\text{Mo}$  sofre transmutação e dá origem aos átomos de tecnécio-99m, denominado de radionuclídeo *filho*. Esses átomos são eluídos do gerador com uma solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v), na forma de pertecnetato de sódio ( $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ ), na concentração de  $10^{-6}$  a  $10^{-8}$  M. Nesta forma, o  $^{99m}\text{Tc}$  encontra-se com o estado de oxidação +7, portanto, quimicamente não reativo. Para torná-lo reativo, no momento da preparação do produto marcado, há necessidade de acrescentar na reação um agente redutor

como a finalidade de reduzir o  $^{99m}\text{Tc}$  para os estados de oxidação mais estáveis como +4, +3 e +5. Vários agentes redutores são utilizados como o cloreto estanoso ( $\text{SnCl}_2$ ), borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), ditionito de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) e o ácido formamidino sulfônico,  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$  (BANERJJE et al., 2001).



**Figura 2.** Gerador de molibdênio-99/tecnécio-99m  
Fonte: IPEN/CNEN-SP

Sandler et al. (1996) descreveram que o  $^{99m}\text{Tc}$  possui as melhores características para a aquisição das imagens cintilográficas, devido ao tempo de meia-vida ( $T_{1/2}$ ) curto de 6,02 horas, a ausência de emissão beta e a emissão de fótons  $\gamma$  de 140 keV. A faixa de energia emitida pelo  $^{99m}\text{Tc}$  enquadra-se perfeitamente com a eficiência dos detectores de iodeto de sódio das câmaras cintilográficas atuais (Figura 3), isso confere uma boa penetração tecidual e fácil colimação (THRALL e ZIESSMAN, 2003). Estas características, além da disponibilidade e do baixo custo fizeram com que o  $^{99m}\text{Tc}$  se tornasse o isótopo radioativo mais utilizado em Medicina Nuclear, com aproximadamente 80% das marcações dos radiofármacos. Atualmente, este isótopo tem sido também amplamente empregado em trabalhos de pesquisas que envolvem a presença de radiotraçadores (DEWANJEE, 1990; SAHA, 1998).

Como elemento de número atômico 43, o  $^{99m}\text{Tc}$  é um metal de transição do grupo VIIB da tabela periódica, portanto, a química é dominada pela formação de complexos metais-doadores. Sendo um metal deficiente em elétrons o  $^{99m}\text{Tc}$  reage

principalmente com grupos funcionais capazes de doar elétrons como aminas, amidas, oximas, tióis, sulfidrilas, isonitrilas, etc (DEWANJEE, 1990).



**Figura 3.** Gama-câmara

#### **2.4 Diagnóstico de processos inflamatórios/infecciosos**

A identificação precoce e a localização da inflamação/infecção são importantes para selecionar a melhor conduta terapêutica. A maioria dos métodos disponíveis para estabelecer o diagnóstico diferencial entre processos inflamatórios e infecciosos consiste em análises microbiológicas de amostras coletadas no local da lesão. Os métodos convencionais de imagem radiológica, tais como ultra-sonografia (US), tomografia computadorizada (TC) e ressonância nuclear magnética (RNM) não são capazes de fazer este diagnóstico diferencial. Além disso, estas técnicas baseiam-se em alterações anatômicas importantes nos tecidos ou órgãos e não fornecem imagem de corpo inteiro, apenas regional (THRALL e ZIESSMAN, 2003; EL-MAGHRABY et al., 2006).

Ao contrário das técnicas convencionais de imagens, as cintilografias obtidas em Medicina Nuclear baseiam-se em alterações funcionais, fisiológicas e/ou bioquímicas, decorrentes dos processos inflamatórios e infecciosos (BOERMAN et al., 2001; CORSTENS e VAN DER MEER, 1999). Os radiofármacos chegam até o local da inflamação devido ao aumento do fluxo sanguíneo local, aumento da permeabilidade vascular e influxo de células sanguíneas. Portanto, estes radiotraçadores permitem visualizar focos de inflamação/infecção, em todas as partes do organismo, na fase inicial, quando alterações morfológicas ainda não estão presentes. Além disto, consiste em um excelente método não invasivo de

exploração de corpo inteiro (RENNEN et al., 2005). Para que o foco de inflamação/infecção possa ser diagnosticado por imagem cintilográfica é necessário que a quantidade de radioatividade, presente no foco, esteja acima da radiação de fundo dos tecidos normais. Em geral, deve-se apresentar uma relação alvo (foco)/não alvo de pelo menos 1,5. Portanto, no mínimo 50% de radioatividade a mais no foco (PHILLIPS, 1999). No diagnóstico de inflamação/infecção, o acúmulo e a retenção dos radiofármacos no foco podem ocorrer por radiotraçadores específicos e não específicos.

#### **2.4.1 Radiotraçadores não específicos**

Os radiotraçadores não específicos acumulam-se nos processos de inflamação/infecção devido ao aumento do suprimento sangüíneo, da permeabilidade vascular e do extravasamento de proteínas. Altos níveis sangüíneos desses agentes são necessários para que ocorra a difusão para o tecido alvo. Como o acúmulo desses radiotraçadores deve-se às características comuns entre os processos de inflamação/infecção, os mesmos não conseguem diferenciar focos asséptico de séptico (RENNEN et al., 2001<sub>b</sub>). Dentre estes radiotraçadores podem ser destacados:

##### **2.4.1.1 Citrato de Gálio-67**

O  $^{67}\text{Ga}$ -Citrato é utilizado em imagens de inflamação/infecção desde a sua descoberta em 1971. O mecanismo de captação baseia-se na ligação do  $^{67}\text{Ga}$ -Citrato com a transferrina circulante. Este complexo extravasa para o local da infecção devido ao aumento da permeabilidade vascular e do fluxo sangüíneo, ligando-se a lactoferrina excretada *in situ* pelos neutrófilos permitindo a sua localização. O agente é excretado parcialmente pelos rins (15% a 25%), especialmente durante as primeiras 24 horas após a injeção. A depuração do corpo total é lento, com meia-vida biológica de 25 dias (WEINER, 1990; THRALL e ZIESSMAN, 2003). O  $^{67}\text{Ga}$ -Citrato apresenta uma captação fisiológica pelo fígado, baço, glândulas salivares, ossos, medula óssea. Embora este agente apresente alta sensibilidade para as fases aguda e crônica, existem desvantagens que limitam a

aplicação clínica como o tempo de meia-vida física longo ( $t_{1/2} = 78$  horas) e emissões de radiações gama variando de 93 a 394 KeV. Os fótons de menor energia resultam em alta percentagem de espalhamento, enquanto que os fótons de alta energia são de difícil colimação pelas câmaras cintilográficas. Deve-se considerar, também, a baixa especificidade da técnica, o que limita o seu emprego apenas nos processos de inflamação/infecção localizados principalmente nos pulmões e na coluna vertebral. Dentre outras desvantagens destacam-se, também, a pouca disponibilidade desse isótopo e o tempo longo para a realização de imagens de 48 e/ou 72 horas (BECKER, 1995; CORSTSENS et al., 1993; THRALL e ZIESSMAN, 2003).

#### **2.4.1.2 Lipossomas radiomarcados**

Os lipossomas são pequenas vesículas esféricas constituídas por bicamadas fosfolípídicas que encerram em seu interior uma fase aquosa, semelhante às membranas biológicas (FRÉZARD, 1999). Os lipossomas podem ser marcados com vários radionuclídeos como gálio-67, índio-111 e tecnécio-99m (GOINS et al., 1993; AWASTHI et al., 1998).

Os primeiros lipossomas radiomarcados apresentavam uma rápida depuração da circulação para os órgãos ricos em células fagocíticas como o fígado, baço e medula óssea. Com a finalidade de aumentar o tempo de circulação destas nanoestruturas, alterações químicas na superfície dos lipossomas foram introduzidas por vários pesquisadores. Dentre estas destacam-se a ligação de PEG (polietilenoglicol) aos fosfolípidos, reduzindo o processo de fagocitose pelo sistema mononuclear fagocítico. Dessa forma, aumenta-se o tempo de circulação dos mesmos permitindo a sua captação pelos focos de inflamação (DAMS et al., 2000). Entretanto, estudos pré-clínicos mostraram vários efeitos colaterais após a injeção de lipossomas radiomarcados. Dentre estes, podem ser destacados a hipertensão, dor de estômago, aumento da frequência cardíaca, dor no peito e eritema. Diante disto, a utilização do  $^{99m}\text{Tc}$ -lipossoma para diagnóstico de processos inflamatórios/infecciosos ficou comprometida. Além disto, este agente não foi capaz de fazer o diagnóstico diferencial entre inflamação asséptica e séptica (ALLEN e

HANSEN, 1991; BROUWERS et al., 2000; MOGHIMI e SZEENI, 2003). Trabalhos recentes realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Radioisótopos da Universidade Federal de Minas Gerais mostraram que os lipossomas radiomarcados com  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO podem se tornar em um método alternativo para o diagnóstico de inflamação e infecção (CARMO et al., 2008<sub>ab</sub>). Entretanto, este agente a exemplo de outros citados anteriormente não é capaz de distinguir inflamação de infecção.

## **2.4.2 Radiotraçadores específicos**

Os processos específicos de captação incluem interações entre os radiofármacos e o alvo, como por exemplo, a ligação ao receptor e a ligação antígeno-anticorpo (RENNEN et al., 2001<sub>b</sub>).

### **2.4.2.1 Anticorpos monoclonais anti-granulócitos radiomarcados**

Os anticorpos monoclonais ligam-se a antígenos de superfície presentes no granulócitos (NCA, CD15, CD66 e CD67). Os principais anticorpos anti-granulócitos utilizados para imagens de infecção são: anti-NCA-95 IgG (BW250/183), anti-SSEA-1 IgM (Fanolesomab: NeutroSpec) e o fragmento anti-NCA-90 (sulesomab: LeukoScan®). Os isótopos mais utilizados nas marcações são o tecnécio-99m e o iodo-123 (RENNEN et al., 2001<sub>b</sub>). Estudos em pacientes mostraram, 4 horas após a injeção, uma captação dos anticorpos radiomarcados na medula óssea (55%), fígado (10%), baço (5%) e o restante distribuído na circulação (30%) (CHIANELLI et al., 1997). Resultados semelhantes também têm sido obtidos em pacientes com suspeita de infecções ósseas, utilizando o LeukoScan® (GRATZ et al., 2003). Esses fragmentos possuem uma melhor penetração nos tecidos inflamados e são menos imunogênicos. Em um estudo comparativo do LeukoScan® com  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO-Leucócitos autólogos, em 21 pacientes com osteomielite demonstrou uma sensibilidade de 90%, especificidade de 84,6% e acurácia de 87,9%, enquanto que os leucócitos radiomarcados foram de 83,9%; 76,5% e 81,3%, respectivamente (BECKER et al., 1996). Outro estudo realizado em pacientes com suspeita de infecção óssea mostrou uma sensibilidade da ordem de 85% e especificidade de

---

75% (RUBELLO et al., 2004). Entretanto, o alto custo aliado a possíveis reações alérgicas tem limitado o emprego de anticorpos radiomarcados em diagnóstico de inflamação e infecção. Este radiotraçador também não diferencia inflamação de infecção (BECKER et al., 1994; CHIANELLI et al., 1997).

#### **2.4.2.2 Peptídeos quimiotáticos radiomarcados**

São peptídeos com alta afinidade por receptores de granulócitos. Um dos primeiros peptídeos que foram testados para imagens de infecção foi o peptídeo quimiotático formyl-Met-Leu-Phe. Este tripeptídeo produzido por bactérias, liga-se com alta afinidade à receptores de granulócitos e monócitos (RENNEN et al., 2001<sub>b</sub>). Zoghbi et al. (1981) investigando as características *in vivo* do tripeptídeo marcado verificaram que, mesmo em baixas doses, esses agentes induziam granulocitopenia transitória.

Fischman et al. (1991) descreveram a síntese de 04 peptídeos quimiotáticos análogos do DTPA (ácido dietilenotriaminopentacético) marcados com  $^{111}\text{In}$ . Todos os peptídeos mantiveram sua atividade biológica e afinidade ao receptor. Os peptídeos testados, em ratos com infecção de *E. coli*, foram capazes de localizar o foco 1 h após a injeção. Em um estudo comparativo, utilizando coelhos com infecção de *E. coli*, foi demonstrado que a localização da infecção usando o tripeptídeo marcado com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  foi superior aos leucócitos marcados com  $^{111}\text{In}$  (BABICH et al., 1993). Embora apresente uma alta atividade específica, o método ainda possui um efeito sobre a contagem dos leucócitos periféricos, mesmo em concentrações da ordem de 10 ng/Kg. Portanto, estes efeitos são vistos como empecilho na utilização clínica (FISCHMAN et al., 1993). Krause et al. (2007) realizaram um estudo comparativo entre o peptídeo quimiotático  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -P1827DS e a interleucina-8 (IL-8) marcada com tecnécio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IL-8), utilizando o modelo de infecção com *E. coli*. Os resultados mostraram que o peptídeo foi capaz de visualizar o abscesso nos animais, mas a captação da infecção e a biodistribuição não foram superiores àquelas encontradas com a  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IL-8.

---



### 2.4.2.3 Citocinas

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular (< 20.000 dáltons) apresentando rápida depuração sangüínea, interação com células que expressam receptores específicos de superfície com alta afinidade de ligação. As citocinas não provocam reações alérgicas e são facilmente disponíveis pelas técnicas de DNA recombinante. Embora as citocinas radiomarcadas tenham potencial para os estudos fisiopatológicos de várias doenças, somente algumas podem ser utilizadas no diagnóstico de inflamação/Infecção (RENNEN et al., 2001<sub>b</sub>). As interleucinas mais utilizadas são interleucina-1, interleucina-2 e interleucina-8.

#### Interleucina-1 (IL-1)

A interleucina-1 liga-se a receptores expressos em granulócitos, monócitos e linfócitos com alta afinidade. Van Der Laken et al. (1995) mostraram, em ratos com infecção de *S. aureus*, uma captação específica da IL-1 marcada com <sup>123</sup>I no foco de infecção. Entretanto, outros pesquisadores verificaram que a IL-1 mesmo quando administrada em doses baixas (10 ng/Kg) ocasionou efeitos adversos como hipotensão e cefaléia. Portanto, a sua utilização clínica ficou prejudicada (BARRERA et al., 2000).

#### Interleucina-2 (IL-2)

A interleucina-2 liga-se a receptores expressos em linfócitos T ativados. Este infiltrado de linfócitos é característico de inflamação crônica. Signore et al. (1992) mostraram, em um modelo de ratos com diabetes mellitus auto-imune, que a infiltração linfocítica no pâncreas pôde ser visualizada 1 hora após a injeção da IL-2 marcada com Iodo-123. Estudos com pacientes portadores de inflamação crônica como doença de Crohn, doença de Graves, tireoidite de Hashimoto, doença celíaca e outras doenças autoimunes mostraram captação da <sup>99m</sup>Tc-IL-2 nos sítios do infiltrado linfocítico. Entretanto, o alto custo restringe o seu emprego nos diagnósticos de inflamação e infecção (CHIANELLI et al., 1997; SIGNORE et al., 2000).

### Interleucina-8 (IL-8)

A interleucina-8 é uma pequena proteína (8,5 KDa) que se liga a receptores de neutrófilos com alta afinidade (RENNEN et al., 2001<sub>b</sub>). Hay et al. (1997) utilizando a IL-8 marcada com iodo, em modelos de ratos com inflamação estéril (carragenina), observaram um pico de captação entre 1 e 3 horas após a injeção e um declínio logo após este período. Rennen et al. (2001<sub>a</sub>) desenvolveram uma preparação de <sup>99m</sup>Tc-IL-8 utilizando o HYNIC (hidrazinonicotinamida) como um quelante intermediário. Estes pesquisadores observaram alta captação da <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-IL-8 no foco de *E. coli*, em modelos experimentais de coelhos, quando comparados com as preparações marcadas com iodo. Outros pesquisadores acharam resultados semelhantes utilizando outros modelos experimentais como infecções intramusculares e osteomielite (GRATZ et al., 2001; RENNEN et al., 2003). Bleeker-Rovers et al. (2007) avaliaram 20 pacientes com suspeita de infecção em várias regiões do corpo utilizando <sup>99m</sup>Tc-IL-8. As imagens cintilográficas foram realizadas 4 horas após a injeção. Todas as infecções foram confirmadas por análise histológica e cultura. A cintilografia com <sup>99m</sup>Tc-IL-8 identificou 10 dos 12 pacientes com infecção com 2 casos de falso-negativos. Como foi mencionado anteriormente para IL-2, o alto custo também é um fator de restrição para o emprego da IL-8.

#### 2.4.2.4 <sup>18</sup>F-fluordesoxiglicose (<sup>18</sup>F-FDG)

O flúor-18-fluordesoxiglicose (<sup>18</sup>F-FDG) acumula-se, *in vivo*, em tumores malignos principalmente pelo aumento do metabolismo da glicose. As imagens de infecção utilizando a tomografia por emissão de pósitron (PET) baseiam-se no fato de que granulócitos e macrófagos presentes nesses focos utilizam a glicose como fonte de energia (ZHUANG e ALAVI, 2002). O <sup>18</sup>F-FDG-PET tem sido estudado em uma variedade de lesões bacterianas, infecções em tecidos moles e infecções ósseas. A sensibilidade e especificidade do FDG-PET geralmente excedem a 90% e possui excelente resolução espacial e rápida acumulação no foco (GUHLMANN et al., 1998; STUMPE e STROBEL, 2006; KUMAR et al., 2008). Entretanto, a especificidade fica comprometida uma vez que a captação do <sup>18</sup>F-FDG ocorre em todas as células que apresentam uma atividade glicolítica aumentada. Além do

---

mais, a captação do  $^{18}\text{F}$ -FDG é influenciada pela concentração de glicose no soro e por certas condições patológicas tais como a diabetes mellitus (RENNEN et al., 2001<sub>b</sub>; DUMAREY et al., 2006). Ressalta-se também que, o alto custo das instalações para a produção do isótopo radioativo flúor-18 e a necessidade de tomógrafos ultra-modernos para a geração de imagens têm limitado a utilização dessa técnica.

#### **2.4.2.5 Leucócitos autólogos radiomarcados**

Mcafee e Thakur (1976) desenvolveram a primeira técnica de marcação de leucócitos autólogos com o isótopo radioativo  $^{111}\text{In}$ . Para tanto, estes pesquisadores utilizaram a oxina como quelante lipofílico para introduzir o radionuclídeo no interior da célula ( $^{111}\text{In}$ -leucócitos). Entretanto, o  $^{111}\text{In}$  é pouco disponível, possui alta energia de radiação (173 e 247 KeV) e apresenta tempo de meia-vida relativamente longo (2,8 dias) para procedimentos de diagnóstico.

Peters et al. (1986) desenvolveram uma técnica de marcação de leucócitos utilizando o quelante HMPAO (hexametilpropileno amino oxima), o que permitiu uma eficiente marcação de leucócitos com tecnécio-99m. O complexo  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO, por ser lipofílico, tem a propriedade de penetrar no interior dos leucócitos marcando-os. Os  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO-leucócitos autólogos são considerados “padrão ouro” na Medicina Nuclear para diagnóstico de inflamação/infecção (BECKER, 1995). Após a injeção intravenosa dos leucócitos marcados há uma captação fisiológica pelo pulmão, fígado e baço. As imagens das regiões de interesse são realizadas 30 e 120 minutos após a injeção (CARDOSO et al., 2002; MARTIN-COMIN et al., 2002). O mecanismo de captação dos leucócitos é por quimiotaxia, portanto, representa um indicador específico para infiltração leucocítica, mas não para infecção.

Para avaliar processos inflamatórios e infecciosos do trato urinário são utilizados preferencialmente leucócitos marcados com  $^{111}\text{In}$ , pois, estes apresentam eliminação somente pelo intestino. Ao contrário, para investigar enfermidades inflamatórias intestinais e do tecido ósseo utilizam-se leucócitos marcados com

---

---

---

$^{99m}\text{Tc}$  por apresentar eliminação preferencialmente pelo trato urinário (RENNEN et al., 2001<sub>b</sub>). As principais indicações dos leucócitos radiomarcados são as doenças inflamatórias do intestino, infecções intestinais, osteomielites, prótese articular, doenças renais, infecções pulmonares e febre de origem desconhecida (BECKER, 2002).

Cardoso et al. (2002) utilizando um método modificado de marcação de leucócitos, com tecnécio-99m, encontraram uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 100% em pacientes portadores de doenças inflamatórias do intestino. Empregando o método convencional estes mesmos autores encontraram 95,6% e 100% para sensibilidade e especificidade, respectivamente.

A preparação de leucócitos radiomarcados requer equipamentos especializados, pessoal treinado e várias etapas no procedimento de marcação com um tempo relativamente longo (3 horas). Este método apresenta riscos para o manipulador devido ao manuseio de sangue, potencialmente contaminado, podendo levar a transmissão de doenças tais como hepatite, síndrome da imunodeficiência adquirida (sida), entre outras. Desta forma, várias pesquisas estão sendo realizadas no sentido de desenvolver métodos alternativos que não ofereçam riscos (ELMAGHRABY et al., 2006; PALESTRO et al., 2007<sub>a</sub>). Apesar dos leucócitos radiomarcados serem considerados referência, este agente de diagnóstico também não diferencia inflamação de infecção (SAMPSON, 1996). Portanto, existe por parte de vários grupos de pesquisa a preocupação em desenvolver um radiofármaco capaz de distinguir inflamação de infecção, sem a necessidade de manuseio de sangue. Neste contexto, estudos recentes têm mostrado a possibilidade de se utilizar antibióticos radiomarcados para este fim.

#### **2.4.2.6 Antibióticos radiomarcados**

Uma nova proposta para o diagnóstico diferencial entre inflamação e infecção baseia-se no uso de antibióticos radiomarcados. Estes antibióticos são captados pelos focos infecciosos e são, freqüentemente, metabolizados pelos microrganismos. Portanto, a quantidade da radioatividade medida no foco será proporcional ao número de microrganismos presentes. Alguns requisitos são

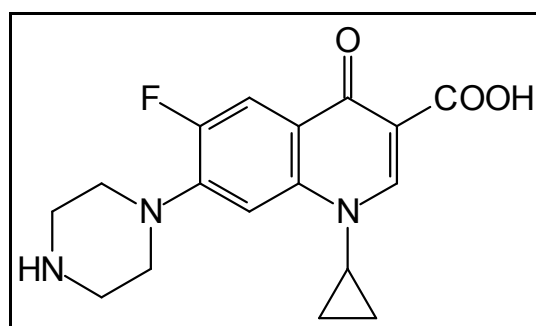
---

---

propostos para a marcação de antibióticos tais como: a) as estruturas químicas devem apresentar grupos doadores de elétrons (-COOH, -OH, -NH<sub>2</sub> e -SH<sub>2</sub>), facilitando a marcação com <sup>99m</sup>Tc, b) solubilidade em água, c) estabilidade em pH fisiológico, d) alta disponibilidade, e) possuir amplo espectro de ação e finalmente poder ser administrado por via intravenosa (ARIAS e FARTO, 2005). Antibióticos têm sido marcados com tecnécio-99m como a ciprofloxacina e ceftizoxima.

### Ciprofloxacina

A ciprofloxacina foi desenvolvida por pesquisadores do laboratório Bayer, Alemanha, sendo introduzida por Wise et al. (1983) e possui peso molecular de 331,34. A ciprofloxacina apresenta meia-vida plasmática de 3,5 a 4,5 horas, sendo que 70% da dose injetada é eliminada dentro de 24 horas. A ciprofloxacina é uma fluoroquinolona (Figura 4), agente antimicrobiano, que impede a divisão da bactéria ligando-se a DNA-girase, levando ao rompimento das mesmas. O DNA é formado por duas cadeias de nucleotídeos em espiral. Este espiralamento é controlado por ação da enzima DNA-girase ou topoisomerase II. Esta enzima, por ocasião da divisão celular, provoca uma incisão nas cadeias do DNA separando-as para a replicação (BRITTON et al., 1997; PHYSICIANS, 2000; TAVARES, 2002).



**Figura 4.** Estrutura química da ciprofloxacina

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que a ciprofloxacina marcada com tecnécio-99m (Infecton) liga-se com uma grande variedade de bactérias Gram-

---

positiva e Gram-negativa e não é captado por neutrófilos ou macrófagos presentes no foco de infecção (VINJAMURI et al., 1996; HALL et al., 1998).

As imagens geradas com o emprego do  $^{99m}\text{Tc}$ -Infecton mostraram alta captação fisiológica pelos rins e moderada captação pelo fígado e baço. Não houve captação pela medula óssea, ossos, músculos ou tecidos moles. Imagens recentes, realizadas 1 hora após a injeção do  $^{99m}\text{Tc}$ -Infecton, mostraram alta atividade no pool sangüíneo que diminuiu com as imagens tardias. A vesícula biliar pode ser ocasionalmente vista e alguma atividade no intestino pode ocorrer em imagens tardias (HALL et al., 1998).

Vários estudos clínicos têm mostrado alta precisão do  $^{99m}\text{Tc}$ -Infecton em infecções bacterianas. Britton et al. (1997) avaliaram 61 pacientes com suspeita de infecção esquelética. As imagens foram realizadas 1 e 4 horas após a injeção. Amostras microbiológicas da lesão foram coletadas para definir o diagnóstico de infecção. Imagens utilizando leucócitos marcados com tecnécio-99m também foram realizadas em alguns pacientes. As imagens com  $^{99m}\text{Tc}$ -Infecton mostraram um aumento de atividade ao redor da periferia do abscesso, o qual continha bactéria viva. As imagens com  $^{99m}\text{Tc}$ -leucócitos-HMPAO mostraram uma captação focal. O  $^{99m}\text{Tc}$ -Infecton registrou uma sensibilidade de 89%, especificidade de 91% e acurácia de 90%.

O  $^{99m}\text{Tc}$ -Infecton apresenta a vantagem de não manipular o sangue e também pelo fato de apresentar uma estabilidade de marcação de 8 horas. Deve-se considerar também que o emprego de  $^{99m}\text{Tc}$ -Infecton independe do estado clínico do paciente, podendo ser usado até em casos de leucopenia ao contrário dos leucócitos marcados. O  $^{99m}\text{Tc}$ -Infecton pode ser usado na detecção de infecções das partes espinhais e proximais dos membros, pois não é captado pela medula óssea, em contraste com outros agentes de uso corrente na clínica. Esta característica pode ser muito útil na avaliação de próteses ortopédicas (SONMEZOGLU et al., 2001).

Yapar et al. (2001) comparando  $^{99m}\text{Tc}$ -Infecton com  $^{67}\text{Ga}$  e  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP (metilenodifosfonato), em 22 pacientes com suspeita de infecção ortopédica, mostraram que o  $^{99m}\text{Tc}$ -Infecton apresentou sensibilidade, especificidade e acurácia

---

---

de 85%, 92% e 88%, respectivamente. Por outro lado, os resultados obtidos com  $^{99m}\text{Tc-MDP}/^{67}\text{Ga-Citrato}$  apresentaram sensibilidade, especificidade e acurácia de 78%, 100% e 90%, respectivamente. As imagens foram realizadas com 1 e 4 horas após a injeção.

Sonmezoglu et al. (2001) avaliaram 56 sítios, com suspeita de infecções ortopédicas crônicas, utilizando  $^{99m}\text{Tc-Infecton}$  e  $^{99m}\text{Tc-HMPAO-leucócitos}$ . Análises bioquímicas, técnicas radiológicas, dados clínicos e microbiológicos contribuíram para determinar a presença ou ausência de infecção. As imagens cintilográficas foram realizadas com 1 e 4 horas após a injeção. Os resultados com  $^{99m}\text{Tc-Infecton}$  foram os seguintes: 30 verdadeiro-positivos (VP), 4 falso-positivos (FP), 20 verdadeiro-negativos (VN) e 2 falso-negativos (FN). Os resultados com  $^{99m}\text{Tc-HMPAO-leucócitos}$  foram 20, 1, 23 e 12, respectivamente. Os valores com  $^{99m}\text{Tc-Infecton}$  mostraram uma sensibilidade de 94%, uma especificidade de 83% e acurácia de 89%, enquanto que, as imagens com  $^{99m}\text{Tc-HMPAO-leucócitos}$  apresentaram 63%, 96% e 77%, respectivamente. Diferenças entre os dois agentes foram estatisticamente significativas. Houve concordância entre as imagens do  $^{99m}\text{Tc-HMPAO-Leucócitos}$  e  $^{99m}\text{Tc-Infecton}$  em 43 dos 56 sítios de infecção (77%).

Larikka et al. (2002<sub>a</sub>) compararam as imagens do  $^{99m}\text{Tc-Infecton}$  com  $^{99m}\text{Tc-HMPAO-leucócitos}$  e com imagens ósseas trifásicas do  $^{99m}\text{Tc-HDP}$  (hidroximetilenodifosfonato). Trinta pacientes sintomáticos com suspeita de infecção de prótese de quadril foram investigados. Destes, apenas 08 foram confirmados com infecção por análises microbiológicas e achados clínicos. Em 13 (59%) dos 22 pacientes não portadores de infecção, imagens realizadas com  $^{99m}\text{Tc-Infecton}$  mostraram captação não específica nos tempos de 1 e 4 horas. Nas imagens de 24 horas, houve captação do  $^{99m}\text{Tc-Infecton}$  apenas para 1 paciente dos 13 investigados. Os autores sugeriram que a ciprofloxacina por apresentar baixo peso molecular, baixa taxa de ligação à proteína plasmática (20-40%) e meia-vida biológica de 4,5 horas, poderia contribuir para maior interação deste antibiótico com outros fatores antes de se ligar com as bactérias. Desta forma, os pesquisadores justificaram a captação inespecífica observada nas imagens de 1 e 4 horas. As imagens dos  $^{99m}\text{Tc-HMPAO-leucócitos}/^{99m}\text{Tc-HDP}$  identificaram 5 dos 8 pacientes infectados, não houve achados de falso-positivo.

---

---

---

Larikka et al. (2002<sub>b</sub>) avaliaram o uso do  $^{99m}\text{Tc}$ -Infecton em 16 pacientes sintomáticos com suspeita de infecção de prótese de joelho. As imagens foram obtidas 1, 4 e 24 horas após a injeção do antibiótico. Os resultados mostraram uma sensibilidade de 86%, especificidade de 78%, valores preditivos positivos de 75%, valores preditivos negativos de 88% e acurácia de 81%. Os autores observaram uma captação inespecífica em focos não infecciosos, em imagens de 5 pacientes obtidas 1 e 4 horas após a injeção do  $^{99m}\text{Tc}$ -Infecton. Realizando imagens de 24 horas esta captação desaparecia. Em outros dois pacientes a captação do  $^{99m}\text{Tc}$ -Infecton manteve-se positiva em todos os tempos investigados. Em 07 pacientes com infecção confirmada (análises microbiológicas) apenas 04 apresentaram imagens positivas para os três tempos investigados.

Sarda et al. (2003) avaliaram 27 pacientes com suspeita de infecção osteoarticular e doenças osteoarticulares assépticas, utilizando  $^{99m}\text{Tc}$ -Infecton. Dados clínicos, análises histológicas e avaliações radiológicas auxiliaram no diagnóstico. As imagens cintilográficas foram realizadas 1, 4 e 24 horas após a injeção. Os resultados mostraram 11 verdadeiro-positivos (VP), 2 verdadeiro-negativos (VN) e 3 falso-positivos (FP) no grupo com infecção osteoarticular. A sensibilidade e especificidade foram de 100% e 40%, respectivamente. No grupo de pacientes que não apresentaram infecção os resultados foram: 4 verdadeiro-negativos (VN) e 7 falso-positivos (FP). Os pesquisadores concluíram que a captação do  $^{99m}\text{Tc}$ -Infecton não foi capaz de diferenciar doenças osteoarticulares sépticas de assépticas. Em virtude desses resultados existe por parte da comunidade científica alguma resistência em utilizar o  $^{99m}\text{Tc}$ -Infecton como agente de diagnóstico de infecção (DUMAREY et al., 2002; PALESTRO et al., 2006). Uma nova proposta seria a utilização da ceftizoxima marcada com tecnécio-99m.

### **Ceftizoxima**

A ceftizoxima (CFT) é uma cefalosporina de terceira geração de amplo espectro, com atividade e estabilidade às beta-lactamases (penicilinas e cefalosporinas). A ceftizoxima foi sintetizada pelo Laboratório Fujisawa, Japão, sendo introduzida por Kamimura et al. (1979) sob a sigla FK-749 e possui peso molecular de 382,40. É apresentada sob a forma de ceftizoxima sódica (Cefizox®) contendo 1000 mg e

---

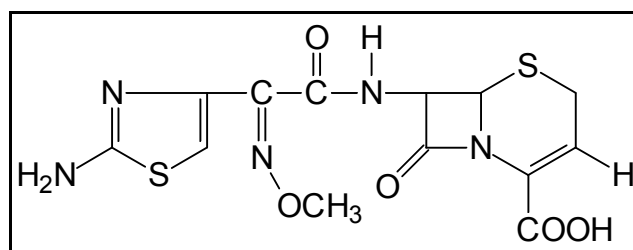
---



2000 mg de ceftizoxima, sendo administrada por via intramuscular ou intravenosa. Apresenta meia-vida plasmática de 1,7 horas, sendo eliminada quase totalmente dentro de 24 horas após a administração. É indicada em infecções respiratórias, urinárias, ginecológicas, cavidade abdominal (trato gastrointestinal, peritonites e vias biliares), osteoarticulares, da pele e dos tecidos moles. É contra-indicada em pacientes que apresentam hipersensibilidade as cefalosporinas e penicilinas (PHYSICIANS, 2000; TAVARES, 2002; SWEETMAN, 2005).

A parede celular das bactérias é responsável pela rigidez, manutenção da hipertonicidade do meio interno e divisão binária. O constituinte fundamental da estrutura desta parede é o peptidoglicano que é um polímero mucocomplexo rígido. Substâncias que interferem na síntese deste elemento causarão um efeito destrutivo sobre a bactéria. A ceftizoxima se une à parede celular bacteriana inibindo a síntese de peptidoglicano e, conseqüentemente, inibindo a síntese da parede celular levando a morte bacteriana (TAVARES, 2002).

A ceftizoxima é sensível à luz, solúvel em água e estável a altas temperaturas. Após administração a excreção ocorre por filtração glomerular e secreção tubular (SWEETMAN, 2005). Este antibiótico possui vários grupos funcionais (doadores de elétrons) tais como amida, amina e sulfetos, o que permite a ligação com átomos de tecnécio-99m (Figura 5).



**Figura 5.** Estrutura química da ceftizoxima

Gomes Barreto et al. (2000) marcaram pela primeira vez a ceftizoxima com  $^{99m}\text{Tc}$  ( $^{99m}\text{Tc}$ -CFT) e obtiveram um rendimento de marcação de  $94,9\% \pm 2,4$  com estabilidade de 6 horas. A atividade biológica da  $^{99m}\text{Tc}$ -ceftizoxima foi atenuada em

---

17% quando comparada com a ceftizoxima não marcada. Estudos de biodistribuição da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT mostraram eliminação renal importante e captação deste agente em foco de infecção por *E. coli* em músculo da coxa de ratos (GOMES BARRETO et al., 2005).

Recentemente, quinolonas como esparfloxacina e enroflaxacina foram marcadas com  $^{99m}\text{Tc}$ . Entretanto, o potencial da  $^{99m}\text{Tc}$ -Esparfloxacina na prática clínica é incerto, devido aos efeitos cardiotóxicos desta nova quinolona. Por outro lado, estudos *in vitro* realizados com enroflaxacina não mostraram uma ligação preferencial deste fármaco com bactérias vivas. Observou-se também que a enroflaxacina não apresentou a capacidade de discriminar abscessos infecciosos de inflamatórios em ratos (WAREHAM et al., 2005).

## **2.5 O papel da Medicina Nuclear no diagnóstico de inflamação/infecção no sistema osteoarticular**

Os principais exames utilizados para o diagnóstico das osteomielites compreendem a radiografia simples, a cintilografia trifásica óssea (fase arterial, tissular e óssea), cintilografia com  $^{67}\text{Ga}$ -Citrato e  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO-leucócitos (EL-MAGHRABY et al., 2006; PALESTRO et al., 2007<sub>a</sub>). A especificidade da avaliação radiológica é reduzida na presença de alterações prévias do osso. Relatos da literatura mostram que a radiologia convencional apresenta uma sensibilidade em torno de 60% e uma especificidade próxima de 70%, para osteomielites aguda e crônica. Além disto, a destruição óssea pela osteomielite pode não ser observada até a segunda semana após o início da infecção (SAPIENZA et al., 2000). Entre os exames de medicina nuclear, a cintilografia óssea utilizando metilenodifosfonato (MDP) marcado com tecnécio-99m é o método de escolha no diagnóstico de osteomielite aguda, em pacientes sem doença óssea prévia e com osso radiologicamente normal, assim como na avaliação de infecção de prótese de joelho e quadril (CORSTENS e VAN DER MEER, 1999). A captação dos difosfonatos na cintilografia óssea deve-se principalmente à adsorção destes pela superfície de cristais no componente mineral ósseo. Desta forma, como a osteomielite é caracterizada por aumento da remodelação óssea, o diagnóstico é realizado pela hiper captação do radiofármaco

---

---

( $^{99m}\text{Tc}$ -MDP) no local. É uma técnica com alta sensibilidade (90%), mas pouco específica (18 a 25%), portanto, insuficiente para confirmar o diagnóstico de osteomielite em algumas situações clínicas. Muitas vezes não é possível diferenciar a osteomielite das infecções de partes moles, gota, doenças articulares degenerativas, alterações pós-operatórias, fraturas anteriores, reações inflamatórias não infecciosas e fraturas de estresse. Em muitos casos, a cintilografia óssea é positiva apesar da ausência de comprometimento ósseo ou articular (ARIAS e FARTO, 2005).

Nos casos de osteomielite crônica ou osteomielite aguda em osso com lesões prévias, a imagem com ausência de captação de radioatividade descarta um processo infeccioso, enquanto que a imagem positiva (com captação de radioatividade) indica a persistência da lesão e obriga a realizar outras provas com a finalidade de obter diagnósticos mais seguros. Nestes casos, há necessidade de realizar imagens com nanocolóides marcados com tecnécio-99m. Quando a suspeita se concentra na coluna vertebral é indicada também uma cintilografia com  $^{67}\text{Ga}$ -Citrato, mas este radiotraçador também não permite diferenciar processos inflamatórios de infecciosos. O  $^{67}\text{Ga}$ -Citrato apresenta uma especificidade de 73%, portanto, bem superior ao  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP. Nestes casos, os leucócitos marcados com tecnécio-99m têm sido utilizados nos países desenvolvidos como "padrão ouro" para o diagnóstico de infecção no tecido ósseo (VINJAMURI et al., 1996; WEINER e THAKUR, 1999).

Farto (2001) realizou um estudo na Espanha, no ano de 1999, em 89 Centros de Medicina Nuclear. O pesquisador verificou que 70,92% das cintilografias realizadas foram para descartar um processo infeccioso e 29,07% para descartar processos inflamatórios. Dentre os processos infecciosos a principal indicação foi infecção de prótese óssea seguida de osteomielite. O radiofármaco mais frequentemente utilizado foi o  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO-leucócitos.

Wolf et al. (2001) avaliaram 324 pacientes, com suspeita de osteomielites (aguda, crônica e subaguda). Os métodos de diagnóstico utilizados foram cintilografia óssea com  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP e  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO-leucócitos. A infecção foi confirmada com base nos achados cirúrgicos, bacteriológicos e histológicos. Os  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO-leucócitos

---

---

---

apresentaram uma sensibilidade e especificidade de 97,7% e 96,8%, respectivamente.

Larikka et al. (2001) estudaram 30 pacientes sintomáticos que haviam sido submetidos à cirurgia de prótese total de joelho. Os métodos de diagnóstico utilizados foram cintilografia óssea com  $^{99m}\text{Tc}$ -HDP e  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO-Leucócitos. Dados clínicos e análises microbiológicas contribuíram para determinar a presença ou ausência de infecção. As imagens dos leucócitos marcados foram realizadas com 2, 4 e 24 horas após a injeção. Os resultados das imagens de 2 e 4 horas mostraram uma sensibilidade e especificidade de 87,5% e 77%, respectivamente. As imagens de 24 horas apresentaram uma sensibilidade de 100% e especificidade de 82%. Todas as imagens ósseas utilizando o  $^{99m}\text{Tc}$ -HDP apresentaram alta sensibilidade de 100% e baixa especificidade variando de 5% a 23%.

Wolf et al. (2003) avaliaram 67 pacientes, com suspeita de infecções de prótese de quadril, joelho e ombro. Os pesquisadores utilizaram os  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO-leucócitos e cintilografia óssea com  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP. O diagnóstico de infecção foi confirmado pelos achados clínicos, análises microbiológicas e biópsia. Os resultados mostraram valores verdadeiro-positivos de 43%, falso-positivo 0%, verdadeiro-negativos de 23% e falso-negativo de 1%. Somente 23 pacientes apresentaram cintilografia óssea anormal, das quais apenas 14 apresentaram captação positiva com os leucócitos marcados.

Simonsen et al. (2007) fazendo um estudo retrospectivo de 76 casos com suspeita clínica de infecção de prótese de quadril, utilizando leucócitos marcados com  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO e com  $^{111}\text{In}$ -Oxina e imagens cintilográficas obtidas com 1, 3 e 22 horas após a injeção, verificaram 51 casos negativos e 25 positivos. Os resultados mostraram 81% dos casos verdadeiro-positivos, 94% verdadeiro-negativos, 6% falso-positivos e 19% falso-negativos. A infecção foi confirmada por cultura bacteriológica e achados histopatológicos, resultando em sensibilidade de 81%, especificidade de 94% e acurácia de 90%.

---

---

Palestro (2007<sub>b</sub>) reafirma que as imagens cintilográficas obtidas com leucócitos marcados permanecem como padrão ouro para a maioria das infecções em indivíduos imunocompetentes, mesmo considerando as limitações da técnica utilizada na preparação dos leucócitos radiomarcados.

Entretanto, todos estes procedimentos descritos acima não são capazes de fazer um diagnóstico diferencial entre inflamação asséptica e séptica no sistema ósseo. Outra grande dificuldade também é distinguir um afrouxamento asséptico de infecção, em prótese de joelho e quadril. Portanto, o uso de antibiótico radiomarcado poderá trazer informações valiosas no sentido de contribuir para a elucidação destes casos.

---

### 3 JUSTIFICATIVA

Nos países subdesenvolvidos, as doenças infecciosas constituem a primeira causa de morte e são responsáveis pelas freqüentes consultas médicas. Pelos dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) ocorrem a cada ano 17 milhões de óbitos, os quais poderiam ser evitados com o diagnóstico precoce e tratamento eficaz (ZABRANSKY, 1997). Por esta razão, há uma busca constante de métodos sensíveis e específicos que contribuam no diagnóstico dessas doenças com a maior precocidade possível.

As respostas do organismo aos processos de inflamação/infecção são muito similares. Por esta razão, a sua distinção é muito importante na conduta terapêutica, uma vez que o tratamento é diferenciado. Uma precoce diferenciação destes processos permitirá o tratamento adequado, contribuindo para maior eficácia do tratamento. As técnicas de imagens como a tomografia computadorizada (TC), ressonância nuclear magnética (RNM) e ultra-sonografia (US) baseiam-se em mudanças anatômicas, estas por muitas vezes discretas para serem detectadas nos estágios iniciais de um processo de inflamação/infecção (BOERMAN et al., 2001). Por outro lado, as cintilografias se baseiam em alterações fisiológicas e bioquímicas permitindo o diagnóstico precoce das doenças com uma única exploração não invasiva.

Atualmente, os leucócitos autólogos marcados com  $^{99m}\text{Tc}$  são considerados padrão ouro no diagnóstico de inflamação/infecção. Entretanto, este método requer a manipulação de sangue potencialmente contaminado podendo levar a transmissão de várias doenças tais como hepatite, síndrome de imunodeficiência adquirida, entre outras. Além disto, a preparação é laboriosa, necessita de pessoal especializado e requer aproximadamente 3 horas para o preparo dos leucócitos. Outro aspecto que também deve ser considerado é que os leucócitos marcados não são capazes de distinguir inflamação asséptica de séptica. O desenvolvimento de novos radiofármacos que não necessitem do manuseio de sangue e que possam diferenciar processos inflamatórios de infecciosos, apresentando alta sensibilidade e especificidade tem sido objeto de recentes pesquisas. Neste contexto, uma

---

perspectiva nova é o emprego de antibióticos radiomarcados. Atualmente, o emprego de antibióticos radiomarcados ( $^{99m}\text{Tc}$ -Infecton) se restringe a alguns Centros de Pesquisa da Europa. Entretanto, os resultados obtidos têm sido contraditórios, pouco reprodutivos, o que tem gerado por parte da comunidade científica resistência em aceitá-lo como um agente de diagnóstico confiável. Isto, possivelmente, deve-se ao fato de que alguns trabalhos têm relatado uma captação inespecífica do  $^{99m}\text{Tc}$ -Infecton em focos inflamatórios, comprovadamente assépticos. A ceftizoxima apresenta meia-vida plasmática de 1,7 horas, enquanto que o  $^{99m}\text{Tc}$ -Infecton apresenta um tempo de meia-vida de 4,5 horas. Ao contrário do  $^{99m}\text{Tc}$ -Infecton, a ceftizoxima apresenta uma depuração mais rápida do organismo, o que diminui o pool circulante facilitando a captação específica pelo foco infeccioso, em detrimento da não específica. Portanto, considerando os critérios para a obtenção de um radiofármaco ideal, pode-se dizer que a ceftizoxima atende melhor as características exigidas para este fim.

#### **4 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a capacidade da ceftizoxima marcada com tecnécio-99m de identificar focos inflamatórios e infecciosos e, também, de diferenciar processos inflamatórios assépticos de sépticos em modelos experimentais em ratos.

---

---

## 5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Dentro dos padrões de qualidade, prescritos na literatura para os radiofármacos, realizar o procedimento de marcação da ceftizoxima com tecnécio-99m;
- Por meio de imagens cintilográficas, obtidas após a injeção intravenosa da  $^{99m}\text{Tc}$ -ceftizoxima, identificar focos inflamatórios assépticos e sépticos e, também, investigar a biodistribuição do antibiótico radiomarcado;
- Analisar quantitativamente as imagens cintilográficas, por meio da determinação da contagem de radioatividade nas regiões de interesse (ROI), obtendo valores da relação alvo/não alvo para os processos inflamatórios/infecciosos induzidos no músculo da coxa e tíbia de ratos.

## 6 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1 Material

#### 6.1.1 Reagentes

A ceftizoxima (Cefizox® 1000 IV) foi obtida pelo Laboratório Smith Kline & French S.A. O ditonito de Sódio foi adquirido da Merck (Alemanha) e o zimosan da Sigma Chemical Company (EUA). O tecnécio-99m foi obtido de um gerador de molibdênio-99 (IPEN/Brasil). Os solventes utilizados foram de grau analítico e as demais substâncias químicas disponíveis foram de grau reagente e foram utilizadas sem purificação adicional.

---

---



---

## 6.2 Métodos

### 6.2.1 Preparação dos reagentes

Foram preparadas 02 (duas) soluções:

Solução A - 62,5 mg da ceftizoxima comercial (Cefizox® 1000 IV) foram diluídos em 25 mL de salina estéril (2,5 mg/mL). Solução B - 150,00 mg do agente redutor ditionito de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) foram diluídos em 25 mL de uma solução de bicarbonato de sódio 0,5%, p/v (6,0 mg/mL). O conteúdo da solução B foi incorporado na solução A e o pH foi ajustado para 7. Em seguida, a solução foi filtrada em membrana de éster de celulose de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore, EUA). Alíquotas de 1,0 mL foram fracionadas em frascos de vidro e congeladas em nitrogênio líquido. Após o congelamento, as alíquotas foram liofilizadas (Termo ModulyoD 115, EUA) por um ciclo de 18 horas e os frascos fechados a vácuo. Todo este procedimento foi realizado dentro de uma sala asséptica (classe 10.000) equipada com capela de fluxo laminar, classe 100 (Veco VLFS12 - Brasil) e unidade de ventilação (Veco UV600 - Brasil). Em seguida, as amostras foram acondicionadas em freezer  $-25^\circ\text{C}$  e  $-70^\circ\text{C}$  (Nuare 6382, EUA).

### 6.2.2 Procedimento de Marcação:

Os reagentes liofilizados, citados anteriormente, foram reconstituídos com 1,0 mL de uma solução de pertecnetato de sódio ( $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ), contendo uma atividade que variou de 37 a 370 MBq. O pH foi ajustado para 7 e, em seguida, a solução foi incubada por 10 min, em banho fervente ( $100^\circ\text{C}$ ) e, posteriormente, foi resfriada em água corrente por 5 min. Após o resfriamento, a solução foi filtrada em membrana de éster de celulose de 0,22  $\mu\text{m}$  e recolhida em um frasco a vácuo (DINIZ et al., 2005). Finalizado o procedimento de marcação, a  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ceftizoxima foi submetida a uma série de controles.

---

### 6.2.3 Pureza Radioquímica (PR):

Para a determinação da PR foram utilizados dois sistemas de cromatografia em camada delgada (CCD), com sílica gel (SG), como descrito a seguir (DINIZ et al., 2005).

1- Cromatografia ascendente: suporte CCD–SG60/solvente salina

Alíquotas de 3,0 µL do antibiótico marcado foi aplicado no segmento 3 de uma tira de CCD (10 cm x 1 cm) (Merck, Alemanha) e colocado em uma cuba cromatográfica contendo solução salina como solvente. Com este método foi determinado o percentual de radioatividade relativa ao  $^{99m}\text{Tc}$  hidrolisado ( $\text{TcO}_2$ ) que permaneceu no ponto de aplicação. A ceftizoxima marcada com  $^{99m}\text{Tc}$  migrou para a parte superior da fita.

2- Cromatografia ascendente: suporte CCD–SG60/solvente metiletilcetona (MEC)

Alíquotas de 3,0 µL do antibiótico marcado foi aplicado, como citado anteriormente, em seguida a tira de CCD foi colocada em uma cuba contendo a metiletilcetona como solvente. Desta forma, foi determinado o percentual de radioatividade relativo ao tecnécio livre ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ), que migrou para a parte superior da fita. A ceftizoxima marcada com tecnécio-99m permaneceu no ponto de aplicação. A radioatividade das cromatografias foi contada em um calibrador de dose (Capintec CRC.15R, EUA). A PR foi determinada da seguinte forma:

$$\% \text{ PR} = \frac{\text{atividade da } ^{99m}\text{Tc-CFT } (\mu\text{Ci})}{\text{atividade total } \mu\text{Ci } (^{99m}\text{TcO}_2 + ^{99m}\text{TcO}_4 + ^{99m}\text{Tc-CFT})}$$

### 6.2.4 Estabilidade de marcação

Após a marcação da ceftizoxima com  $^{99m}\text{Tc}$  ( $^{99m}\text{Tc-CFT}$ ), a estabilidade de marcação do antibiótico foi avaliada pela determinação da PR nos tempos de 1, 2 e 6 horas após a marcação (n=5).

### 6.2.5 Estabilidade dos reagentes liofilizados após acondicionamento em freezer

A estabilidade dos reagentes liofilizados foi avaliada pela determinação da Pureza radioquímica (PR) nos tempos de 14, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias após o acondicionamento em freezer a  $-25^{\circ}\text{C}$  e  $-70^{\circ}\text{C}$  ( $n=5$ ).

### 6.2.6 Ensaio de ligação *in vitro* da $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CFT com *S. aureus*

A ceftizoxima marcada (370 MBq) foi incubado a  $37^{\circ}\text{C}$ , sob agitação, por 20 minutos com *S. aureus* ( $10^8$  UFC/0,2 mL). A suspensão foi filtrada por meio de um suporte contendo uma membrana de éster de celulose de  $0,22\ \mu\text{m}$  (Millipore, EUA). O filtrado foi recolhido em um frasco a vácuo. O sistema de filtro (suporte + membrana) foi então lavado com 2,5 mL de salina estéril, sendo que este volume foi também recolhido no mesmo frasco que continha o filtrado. Em seguida, o filtrado e o sistema de filtro foram contados separadamente em um calibrador de dose (Capintec CRC.15R, EUA). O percentual de ligação do antibiótico marcado com o *S. aureus* foi determinado pela seguinte equação:

$$\% \text{ ligação} = \frac{\text{atividade do sistema de filtro } (\mu\text{Ci})}{\sum \text{atividade do sistema de filtro } (\mu\text{Ci}) + \text{atividade filtrado } (\mu\text{Ci})} \times 100$$

Este mesmo procedimento foi realizado também com os radiofármacos  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -fitato de sódio e o  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA (ácido dietilenotriaminopentacético), de acordo com procedimento descrito por TSOPELAS et al. 2003.

### 6.2.7 Atividade biológica

A atividade antimicrobiana do antibiótico foi determinada, conforme descrito por Gomes Barreto et al. (2000), pelo método de difusão de discos em placas de ágar, impregnado com as seguintes cepas de bactérias, gentilmente fornecidas pelo

Laboratório de Controle Biológico da Faculdade de Farmácia/UFMG: *Staphylococcus aureus* – ATCC 6538-P (Gram-positiva) e *Escherichia coli* – ATCC 8739 (Gram-negativa).

Para cada placa de petri foram utilizados 03 discos:

Disco 1 - 25 µg/10µL de <sup>99m</sup>Tc-ceftizoxima;

Disco 2 - 25 µg/10µL de ceftizoxima original;

Disco 3 - 25 µg/10µL de ceftizoxima + reagentes da reação de marcação com ausência do tecnécio-99m.

A atividade biológica foi avaliada pela medida do diâmetro dos halos de inibição (mm) obtidos nas placas após 24 horas de incubação a 37<sup>0</sup>C.

#### **6.2.8 Determinação do percentual de ligação da <sup>99m</sup>Tc-CFT com as proteínas plasmáticas**

Uma amostra de sangue (3,0 mL) de ratos foi incubada, por 60 minutos, a temperatura ambiente com 1,0 mL do antibiótico marcado com <sup>99m</sup>Tc (370 MBq). Após a incubação esta preparação foi centrifugada em 740 g por 10 minutos (Centrífuga BABY II - 206R, FANEM, Brasil) e o plasma (P) e as células sangüíneas (CS) foram separados. Alíquotas de 20 µL do P foram precipitadas com 1,0 mL de solução de ácido tricloroacético a 5% (p/v). A fração solúvel (FS) e a fração insolúvel (FI) do plasma foram separadas (OLIVEIRA et al., 2000). Em seguida, as frações foram contadas em um calibrador de dose (Capintec CRC.15R, EUA). A porcentagem da radioatividade presente na fração insolúvel do plasma (FI-P) foi calculada pela seguinte equação:

$$\% \text{ radioatividade na FI-P} = \frac{\text{Atividade FI-P } (\mu\text{Ci})}{\text{Atividade FI-P} + \text{Atividade FS-P } (\mu\text{Ci})} \times 100$$

### 6.2.9 Experimentação animal

Os ratos machos Wistar foram fornecidos pelo biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG e mantidos no laboratório de Radioisótopos da Faculdade de Farmácia/UFMG durante os experimentos, tendo livre acesso à água e ração. Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais e estando de acordo com o guia para o cuidado e uso de animais de laboratório recomendado pelo Institute of Laboratory Animal Resources.

#### 6.2.9.1 Estudos de biodistribuição

Foram utilizados ratos machos, linhagem Wistar, pesando entre 230-250 gramas (Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais). Alíquotas de 0,1 mL de  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT (3,7 MBq) foram injetadas na veia da cauda dos animais. Após os tempos de 1, 2 e 6 horas, os animais foram sacrificados e o fígado, baço, estômago, rins e pulmões foram retirados, pesados e a radioatividade foi determinada em um contador de poço (ANSR - Abbott, EUA). Os resultados foram expressos como porcentagem de atividade por grama de tecido (%cpm/g), determinados pela seguinte equação:

$$\% \text{ cpm/g} = \frac{\text{cpm/g órgão}}{\sum \text{cpm/g dos órgãos}} \times 100$$

#### 6.2.9.2 Modelo de inflamação asséptico/séptico no músculo da coxa de ratos

Foram utilizados em todos os experimentos ratos machos, linhagem Wistar, pesando entre 230-250 gramas (Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais). Durante os procedimentos, os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina (5 mg/Kg) e cetamina (40 mg/Kg) por injeção intraperitoneal e as coxas foram desinfetadas com uma solução de iodo a 1% (p/v).

---

---

A indução do processo inflamatório asséptico foi realizada pela injeção direta de 0,2 mL de zimosan 5% (p/v) no músculo da coxa esquerda dos animais (n=5), enquanto que, no músculo da coxa direita foram injetados 0,2 mL de salina estéril, que foi utilizado como controle (GOMES BARRETO et al., 2005). Os processos inflamatórios sépticos foram induzidos pela injeção direta (0,2 mL) de *E. coli* (ATCC 10536) e *S. aureus* (ATCC 6538-P) em grupos distintos de animais. Alíquotas contendo  $10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC) foram injetadas no músculo da coxa esquerda dos ratos (n=5). No músculo da coxa direita foram injetados 0,2 mL de salina estéril, como controle (DINIZ et al., 2005).

### **6.2.9.3 Modelo de inflamação asséptico/séptico na tíbia de ratos**

Os animais foram anestesiados e preparados conforme descrição no item anterior. O foco inflamatório asséptico foi induzido pela inoculação direta de 0,2 mL de zimosan 5% (p/v), *Saccharomyces cerevisiae*, dentro da cavidade medular da tíbia esquerda (n=5). A osteomielite (foco séptico) foi induzida pela inoculação direta de 0,2 mL de *S. aureus* (ATCC 6538-P) dentro da cavidade medular da tíbia esquerda sem esclerosantes (n=5). No animais do grupo controle (n=5), 0,2 mL de salina estéril foi injetada dentro da cavidade medular da tíbia esquerda (GRATZ et al., 2001).

### **6.2.9.4 Estudos histopatológicos**

#### **Modelo de inflamação asséptico/séptico no músculo da coxa**

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e amostras dos músculos das coxas esquerdas foram coletadas e fixadas em formalina a 10% (v/v), desidratados em soluções crescentes de álcool, embebidos e incluídos em parafina. Secções histológicas de 5 $\mu$ m foram coradas pela hematoxilina-eosina (H&E) e analisadas por microscopia óptica (Olympus AX70 microscope, Alemanha).

---

---

---

## **Modelo de inflamação asséptico/séptico na tíbia**

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e toda a tíbia esquerda foi retirada e fixada em formalina 10% (v/v) seguida de desmineralização em solução de ácido fórmico 10%, em pH 4,5, sob vácuo moderado por 14 dias. O tempo de desmineralização foi controlado por raios-X. Após a desmineralização, a tíbia foi seccionada longitudinalmente, lavada em água corrente por 24 horas, desidratada em soluções crescentes de álcool e embebida em parafina. Secções histológicas de 5µm foram coradas pela hematoxilina-eosina (H&E) e analisadas por microscopia óptica (Olympus AX70 microscope, Alemanha). As amostras histológicas foram obtidas de todos os animais.

### **6.2.9.5 Imagens cintilográficas**

#### **Imagens cintilográficas dos animais com focos inflamatórios asséptico/séptico no músculo da coxa**

Após 24 horas da indução dos focos assépticos e sépticos, 0,1 mL da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT (37 MBq) foi injetada na veia da cauda dos animais. As imagens estáticas planares de 0,5; 1; 2 e 6 horas após a injeção foram adquiridas na posição anterior em uma gama-câmara (Vertex Plus, Adac Laboratórios, Holanda) equipada com um colimador de baixa energia. Foram obtidas imagens estáticas planares (5 minutos) usando uma matriz 64X64 pixels. As imagens foram analisadas determinado-se a radioatividade nas regiões de interesse (ROIs) pelo delineamento em torno da área inflamada/infectada (alvo) e da área contralateral (não alvo), Figura 7.

Em outro grupo de animais, 24 horas após a indução do foco de *E. coli*, alíquota de 0,1 mL contendo o radiofármaco  $^{99m}\text{Tc}$ -fitato de sódio (37 MBq) foi injetada na veia da cauda dos animais. As imagens estáticas planares também foram adquiridas nos tempos de 0,5; 1; 2 e 6 horas e o mesmo procedimento foi realizado.

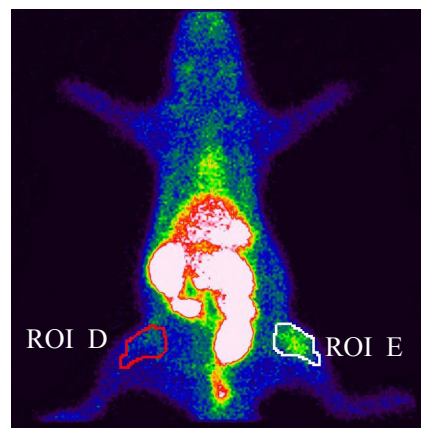
---

## Imagens cintilográficas dos animais com focos inflamatórios asséptico/séptico na tíbia

Após 48 horas da indução dos focos assépticos e sépticos, 55 MBq da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT (0,1 mL) foram injetados na veia da cauda dos animais ( $n = 5$ ). Nos tempos de 1, 2, 4 e 6 horas após a injeção os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina (7,5 mg/Kg) e cetamina (60 mg/Kg), colocados em decúbito dorsal sob uma gama-câmara equipada com um colimador de baixa energia. Foram obtidas imagens estáticas planares (5 minutos) usando uma matriz de 256X256 pixels (Nuclide™ TH 22, Mediso, Hungria, Figura 6). As imagens foram analisadas determinado-se a radioatividade nas regiões de interesse (ROIs) pelo delineamento em torno da tíbia esquerda infectada/inflamada (alvo). Estes ROIS foram automaticamente copiados para a tíbia direita contralateral (não alvo). A relação alvo/não alvo foi calculada usando a contagem total. O mesmo procedimento foi realizado com os animais inoculados com salina estéril.



**Figura 6.** Gama-câmara para animais  
Fonte: Lab. de Radioisótopos/UFMG



**Figura 7.** Regiões de Interesse (ROIs)

### 6.2.10 Análise estatística

Todos os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (d.p.). Os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) *one-way* e corrigidos pelo teste de comparação múltipla de Tukey usando o programa Prism 4 (GraphPad Software, Inc., EUA) Para todas as análises adotou-se o intervalo de



confiança de 95%, sendo que as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1 Pureza Radioquímica (PR)

Os dados da Tabela 1 mostram um percentual médio de pureza radioquímica da CFT marcada com tecnécio-99m da ordem de 94% e, conseqüentemente, um teor aproximado de 6% de impurezas radioquímicas. Gomes Barreto et al. (2000) trabalhando com uma solução de ceftizoxima, preparada no momento da marcação, obtiveram resultados semelhantes cujos valores variaram de 90,5 a 95,8%. A pureza radioquímica tem como finalidade determinar o percentual de átomos radioativos ( $^{99m}\text{Tc}$ ), presente na reação, que efetivamente incorporaram nas moléculas do antibiótico (ceftizoxima). No processo de marcação, impurezas radioquímicas podem ser formadas devido à degradação do produto por radiólise, presença de oxigênio, mudanças de pH, temperatura e exposição à luz. As principais impurezas são o tecnécio-99m livre ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) e o tecnécio-99m coloidal ou hidrolisado ( $\text{TcO}_2$ ). A presença destas impurezas é indesejável já que apresentam uma cinética diferente do radiofármaco, dificultando a interpretação das imagens e expondo o paciente a uma dose de radiação desnecessária (SAMPSON, 1996). De acordo com a literatura o teor de pureza radioquímica aceitável para um radiofármaco pode variar de 90 a 98% (THE UNITED, 2005). Desta forma, os dados obtidos mostram que a pureza radioquímica da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT encontra-se dentro dos padrões estabelecidos de qualidade e, portanto, atende a este requisito tão importante na preparação dos radiofármacos.

**Tabela 1.** Percentual de pureza radioquímica da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT

Experimentos	% marcação
1	94,00
2	93,52
3	91,76
4	95,68
5	93,48
Média $\pm$ d.p.	93,68 $\pm$ 1,40*

\*Os valores representam a média  $\pm$  d.p., n=5.

## 7.2 Estabilidade da $^{99m}\text{Tc}$ -ceftizoxima

A Tabela 2 mostra a estabilidade da ceftrizoxima marcada com tecnécio-99m nos tempos de 1, 2 e 6 horas após a marcação. Observa-se que, os resultados da PR do antibiótico marcado não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos diversos tempos investigados, independentemente das condições prévias de estocagem do antibiótico liofilizado ( $-25^{\circ}\text{C}$  e  $-70^{\circ}\text{C}$ ). Devido à manutenção do percentual de pureza radioquímica pode-se deduzir que existe estabilidade da ligação dos átomos de tecnécio-99m com a estrutura química da ceftrizoxima. Isto é de fundamental importância, pois sugere comportamento estável da ligação entre os átomos de tecnécio-99m e a estrutura do antibiótico, consistindo em importante premissa para o emprego deste radiotraçador em estudos *in vivo*. Sabe-se pela literatura que a estabilidade do composto marcado é um dos principais problemas na química de marcação, devendo ser estável *in vitro* e *in vivo* (SAHA, 1998).

**Tabela 2.** Estabilidade da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT

Tempo após a marcação (h)	Pureza Radioquímica (%)	
	Vácuo (-25°C)	Vácuo (-70°C)
1	92,85±1,37	91,89±1,88
2	94,52±2,21	95,62±2,58
6	93,19±2,31	93,55±1,79

Os valores representam a média  $\pm$  d.p. (n=5). Não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os valores (Teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

### 7.3 Avaliação da estabilidade dos reagentes liofilizados, por meio da pureza radioquímica, após acondicionamento em freezer

Observa-se pela tabela 3 que, o tempo de acondicionamento e a temperatura de estocagem não interferiram estatisticamente no percentual de pureza radioquímica. A temperatura de estocagem pode afetar a estabilidade dos radiofármacos após a marcação, podendo gerar altos níveis de impurezas radioquímicas comprometendo o diagnóstico (SAMPSON, 1996). Desta forma, os dados obtidos mostram que a PR da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT não foi alterada após o acondicionamento em freezer a -25°C e -70°C, podendo ser acondicionada por um período de até 6 meses sem comprometer a estabilidade do antibiótico. Esses dados abrem a perspectiva da produção, em escala, dos reagentes liofilizados com a finalidade de serem utilizados nos exames de Medicina Nuclear. De uma maneira geral, os reagentes utilizados para a obtenção dos radiofármacos apresentam estabilidade em torno de 6 meses (INSTITUTO, 2008). Assim os dados obtidos sugerem que, os reagentes preparados para a obtenção do radiofármaco ( $^{99m}\text{Tc}$ -CFT) atendem ao critério de estabilidade.

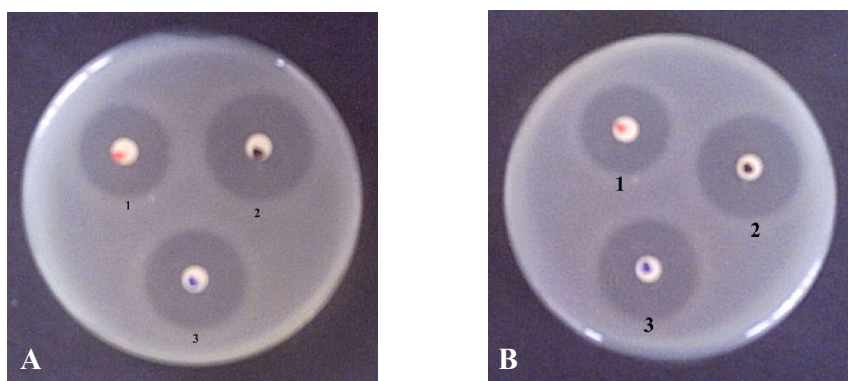
**Tabela 3.** Estabilidade dos reagentes liofilizados acondicionados em freezer a  $-25^{\circ}\text{C}$  e  $-70^{\circ}\text{C}$

Tempo de acondicionamento (dias)	Pureza Radioquímica (%)	
	Vácuo ( $-25^{\circ}\text{C}$ )	Vácuo ( $-70^{\circ}\text{C}$ )
14	91,45±1,34	91,55±1,56
30	90,15±2,59	90,10±2,32
60	91,63±1,99	94,75±2,89
90	92,32±1,97	93,05±0,59
120	93,52±0,89	92,99±0,71
150	93,67±1,15	93,96±3,65
180	95,90±0,15	93,13±1,86

Os valores representam a média  $\pm$  d.p. (n=5). Não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os valores (Teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

#### 7.4 Atividade biológica

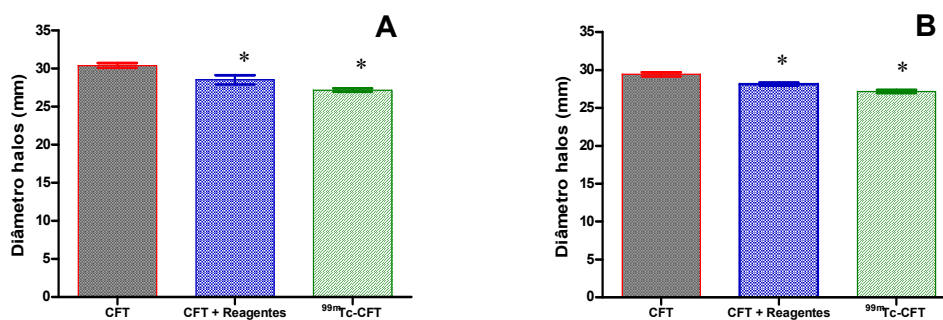
A Figura 8A mostra uma ligeira atenuação da atividade biológica (halo de inibição) da  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CFT para uma cultura de *S. aureus*, quando comparado com a CFT original e CFT + reagentes. O mesmo foi observado quando se utilizou uma cultura de *E. coli* (Figura 8B).



**Figura 8.** Halos de inibição em placas de ágar impregnadas com *S. aureus* (A) e *E. coli* (B). 1 -  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CFT 2 - CFT original 3 - CFT + reagentes

Os dados da Figura 9A mostram os valores dos diâmetros dos halos de inibição para *S. aureus*. Estes valores correspondem a  $30,40 \pm 0,33$ ;  $28,52 \pm 0,61$  e  $27,16 \pm 0,23$  para CFT, CFT + reagentes e  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT, respectivamente. A Figura 9B mostra os valores dos halos para *E. coli* que correspondem a  $29,43 \pm 0,26$ ;  $28,22 \pm 0,13$  e  $27,17 \pm 0,20$  para CFT, CFT + reagentes e  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT, respectivamente.

Dentro da proposta de preparação da CFT marcada, uma das características considerada essencial é a manutenção da atividade biológica. Os testes *in vitro* mostraram halos de inibição da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT de  $27,16 \pm 0,23$  e  $27,17 \pm 0,20$  para *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente. Isto mostra que o antibiótico marcado apesar da atenuação observada, ainda foi capaz de reconhecer tanto bactérias Gram-positiva quanto Gram-negativa, sugerindo que mesmo após a marcação o antibiótico mantém as suas características de amplo espectro. Esses dados mostram uma atenuação da atividade biológica da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT em relação à CFT da ordem de 10% para *S. aureus* (Figura 9A). Por outro lado, observou-se uma redução de 7,7% quando se utilizou cultura de *E. coli* (Figura 9B). Gomes Barreto et al. (2000) trabalhando com uma solução de  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT, preparada no momento do uso, observaram uma redução da atividade biológica de 17% em uma cultura de *E. coli*. Os dados obtidos neste trabalho sugerem que as condições de preparação dos reagentes como, por exemplo, a liofilização pode ter contribuído para maior preservação da atividade biológica da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT. Provavelmente, a atenuação do halo de inibição da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT tanto para *S. aureus* quanto para *E. coli* não foi exclusivamente devido à ligação dos átomos de tecnécio-99m com a molécula do antibiótico. Este fato torna-se evidente quando se observa que a simples presença dos reagentes juntamente com a CFT (CFT + Reagentes), com ausência de reação de marcação, foi capaz de reduzir a atividade biológica da ceftizoxima.



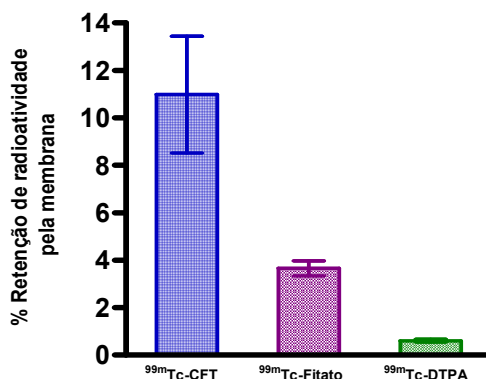
**Figura 9.** Diâmetros dos halos de inibição de *S. aureus* (A) e *E. coli* (B). Cada coluna representa a média  $\pm$  d.p. (n=7). \*Apresenta diferença estatisticamente significativa em relação à CFT (Teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

### 7.5 Ensaio de ligação *in vitro* da <sup>99m</sup>Tc-CFT

Observa-se pela Figura 10 que a <sup>99m</sup>Tc-CFT apresentou um percentual de retenção de radioatividade pela membrana de  $11,0\% \pm 2,4$  com *S. aureus*, enquanto que os valores para o <sup>99m</sup>Tc-fitato de sódio e <sup>99m</sup>Tc-DTPA foram aproximadamente de  $3,7\% \pm 0,7$  e  $0,6\% \pm 0,1$ , respectivamente. Os dados sugerem que mesmo após o processo de marcação, a ceftizoxima mantém a sua capacidade de interagir com o *S. aureus*, indicando ligação específica entre a <sup>99m</sup>Tc-CFT e a bactéria, já que esta fica retida na membrana. Tsopelas et al. (2003) trabalhando com dipeptídeo marcado com tecnécio-99m, com atividade antibacteriana, observaram que  $9,9\% \pm 0,2$  deste ligou-se ao *S. aureus*. Sabe-se pela literatura que o *S. aureus* é responsável pela maioria das infecções ósseas (ARIAS e FARTO, 2005). Portanto, com base nos dados apresentados pode-se pensar na perspectiva de se utilizar a <sup>99m</sup>Tc-CFT para o reconhecimento *in vivo* das infecções do sistema osteoarticular provocadas por *S. aureus*.

Por outro lado, observou-se também que as percentagens de retenção do <sup>99m</sup>Tc-fitato de sódio e do <sup>99m</sup>Tc-DTPA pela membrana de éster de celulose foram significativamente menores, quando comparadas com a <sup>99m</sup>Tc-CFT. No caso específico do <sup>99m</sup>Tc-DTPA, Tsopelas et al. (2003) observaram que o percentual de retenção deste radiofármaco foi da ordem de  $1,5\% \pm 0,2$ . Como foi mencionado acima, neste trabalho observou-se 0,6% de retenção do <sup>99m</sup>Tc-DTPA pela

membrana. Provavelmente, este percentual deve-se a retenção de traços do  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA pela membrana o que poderia ser denominado de ligação inespecífica ao contrário do que aconteceu com a  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT. No caso do  $^{99m}\text{Tc}$ -fitato de sódio observou-se um percentual maior de retenção (3,7%) provavelmente devido ao maior tamanho das partículas, propiciando maior retenção pela membrana (0,22  $\mu$ ). Outro fato que também deve ser ressaltado é que tanto o  $^{99m}\text{Tc}$ -fitato de sódio quanto o  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA são fármacos rotineiramente utilizados em Medicina Nuclear para pesquisa de linfonodo sentinela e cintilografia renal, respectivamente (THRALL e ZIESSMAN, 2003). Portanto, esses radiofármacos não apresentam qualquer indicação para reconhecimento de focos infecciosos o que corrobora para a hipótese de retenção inespecífica pela membrana.



**Figura 10.** Ensaio de ligação *in vitro* da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT,  $^{99m}\text{Tc}$ -fitato de sódio e  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA com *S. aureus*. Cada coluna representa a média  $\pm$  d.p., n=5 (Teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

## 7.6 Determinação do percentual de ligação da $^{99m}\text{Tc}$ -CFT com as proteínas plasmáticas

Observa-se pela Tabela 4 que o percentual médio de ligação da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT com as proteínas plasmáticas foi de 34%. Estes resultados são similares àqueles descritos na literatura (30%) no que diz respeito à ligação da ceftizoxima com as proteínas plasmáticas (SWEETMAN, 2005). Os dados sugerem que a ligação do antibiótico

marcado com as proteínas, do plasma, foi similar à ligação do antibiótico não marcado (original). Portanto, a capacidade de ligação do antibiótico radiomarcado com as proteínas plasmáticas permaneceu inalterada. Quando se propõe a estudar biodistribuição de um fármaco marcado ou não, o comportamento deste frente às proteínas plasmáticas reveste-se de grande importância no que concerne a biodisponibilidade e, por conseguinte, a depuração plasmática (THRALL e ZIESSMAN, 2003). Assim, os dados obtidos sugerem que a  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT deverá apresentar na circulação sanguínea comportamento similar ao apresentado pela CFT original.

**Tabela 4.** Percentual de ligação da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT com as frações solúveis e insolúveis do plasma

Experimentos	Fração Insolúvel FI (%)	Fração Solúvel FS (%)
1	35,00	65,00
2	30,00	70,00
3	32,14	67,86
4	36,36	63,64
5	35,68	64,32
6	37,04	62,96
7	31,91	68,09
Média ± d.p.	34,01 ± 2,64*	65,98 ± 2,66*

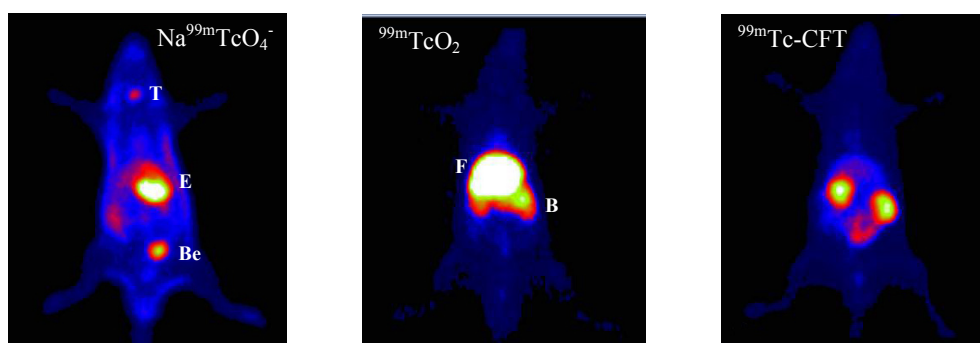
\* Valores expressos como a média ± d.p. (n = 7).

### 7.7 Estudos de biodistribuição

As imagens obtidas com as impurezas radioquímicas ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ,  $^{99m}\text{TcO}_2$ ) e com a  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT (Figura 11) mostraram padrões de imagens totalmente distintos. Verificou-se expressiva captação da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT pelos rins 1 hora após a administração, sugerindo rápida depuração do produto marcado. Este fato encontra-se respaldado pela literatura que mostra rápida e importante depuração renal para a ceftizoxima (SWEETMAN, 2005). Observa-se que, quando o  $\text{TcO}_2$  foi administrado

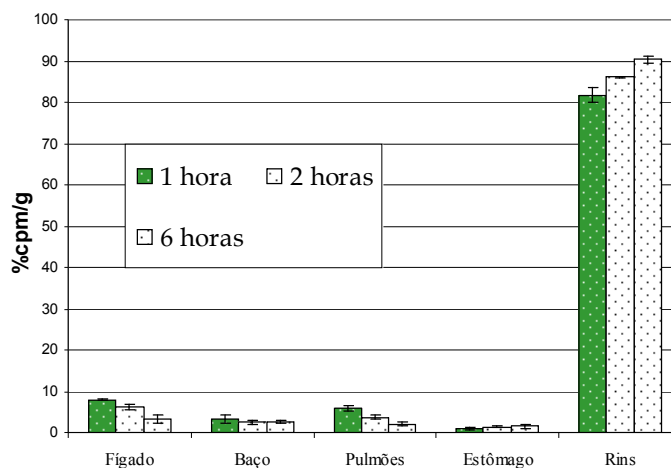


a imagem mostrou alta captação de radioatividade pelo fígado e baço. Por outro lado, quando se utilizou a injeção de  $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  imagens de tireóide, estômago e bexiga foram as que se destacaram. No caso da  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CFT observa-se que, 1 hora após a injeção, tanto o rim direito quanto o esquerdo são nitidamente observados na imagem. Este padrão de imagem sugere baixo teor de impurezas radioquímicas ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  e  $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ ) na preparação da  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CFT o que aliás já tinha sido observado pelo percentual de pureza radioquímica (94%) descrito na Tabela 1.



**Figura 11.** Imagens cintilográficas (visão anterior) obtidas 1 hora após a injeção de pertecnato de sódio ( $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ), tecnécio-99m hidrolisado ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ ) e  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CFT em ratos. T - Tireóide. E - Estômago. Be - Bexiga. F - Fígado. B - Baço. R - Rim.

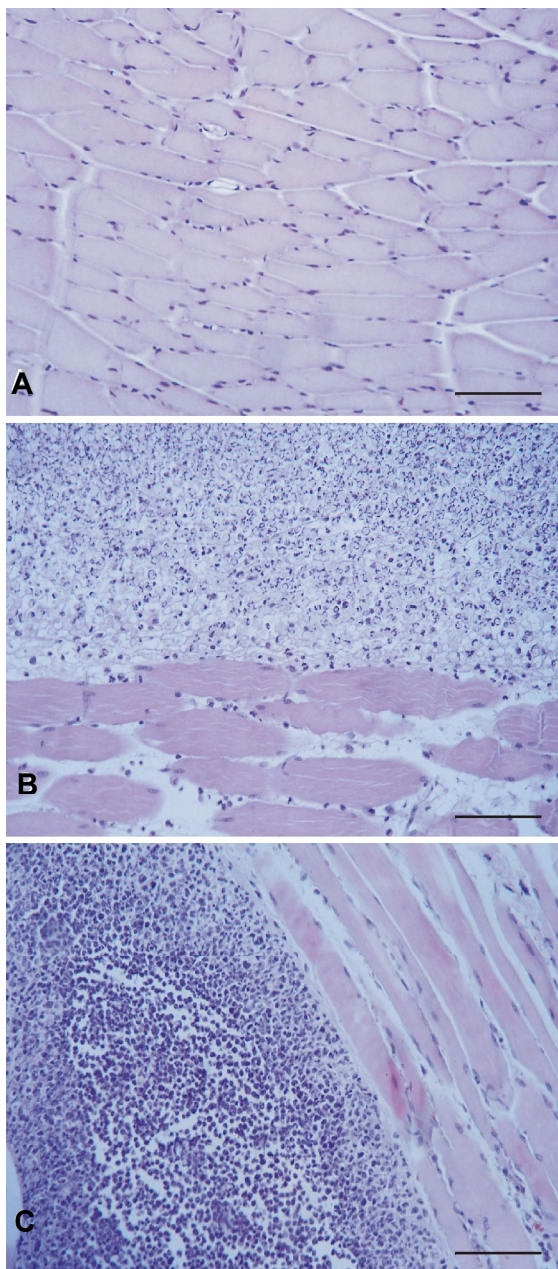
Observa-se pela Figura 12 um percentual de captação inferior a 10% da  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CFT pelo fígado, baço, pulmões e estômago durante todo o experimento. Observa-se também alta captação pelos rins, da ordem de 80%, sugerindo importante eliminação renal já na primeira hora após a administração o que também foi observado na imagem (Figura 11). Em resumo, a Figura 12 e a imagem obtida com a injeção da  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -CFT (Figura 11) são complementares na medida em que mostram importante eliminação renal desse radiofármaco e com padrão de imagem compatível com baixo teor de impurezas radioquímicas. Por outro lado, reforça a idéia de que a marcação com isótopo radioativo não modificou as características da ceftizoxima principalmente no que diz respeito à eliminação renal. Dados da literatura mostram que após a administração da ceftizoxima a excreção ocorre por filtração glomerular e secreção tubular (SWEETMAN, 2005).



**Figura 12.** Estudos de biodistribuição da  $^{99m}\text{Tc-CFT}$  1, 2 e 6 horas após a injeção. Valores expressos como a média  $\pm$  d.p. (n = 7).

### 7.8 Estudos histopatológicos no músculo da coxa de ratos

A coxa controle (contralateral) apresentou fibras musculares íntegras e justapostas envoltas por endomísio sem alterações degenerativas ou inflamatórias (Figura 13A). Enquanto que a coxa com o foco inflamatório (zimosan) mostrou por entre as fibras musculares um intenso infiltrado inflamatório constituído predominantemente por neutrófilos, neutrófilos degenerados (piócitos) e em menor número por linfócitos. Há também afastamento das fibras devido ao acúmulo de fibrina, edema e hemorragia. Em todas as secções histológicas foi observado no meio das fibras acúmulo de piócitos não envolto por cápsula fibrosa (pseudo-abscesso). Focos ocasionais de degeneração hialina das fibras e necrose também foram evidenciados (Figura 13B). Para os animais que foram inoculados com *S. aureus*, alterações musculares semelhantes àquelas descritas para os animais do grupo zimosan foram também observadas (Figura 13C).



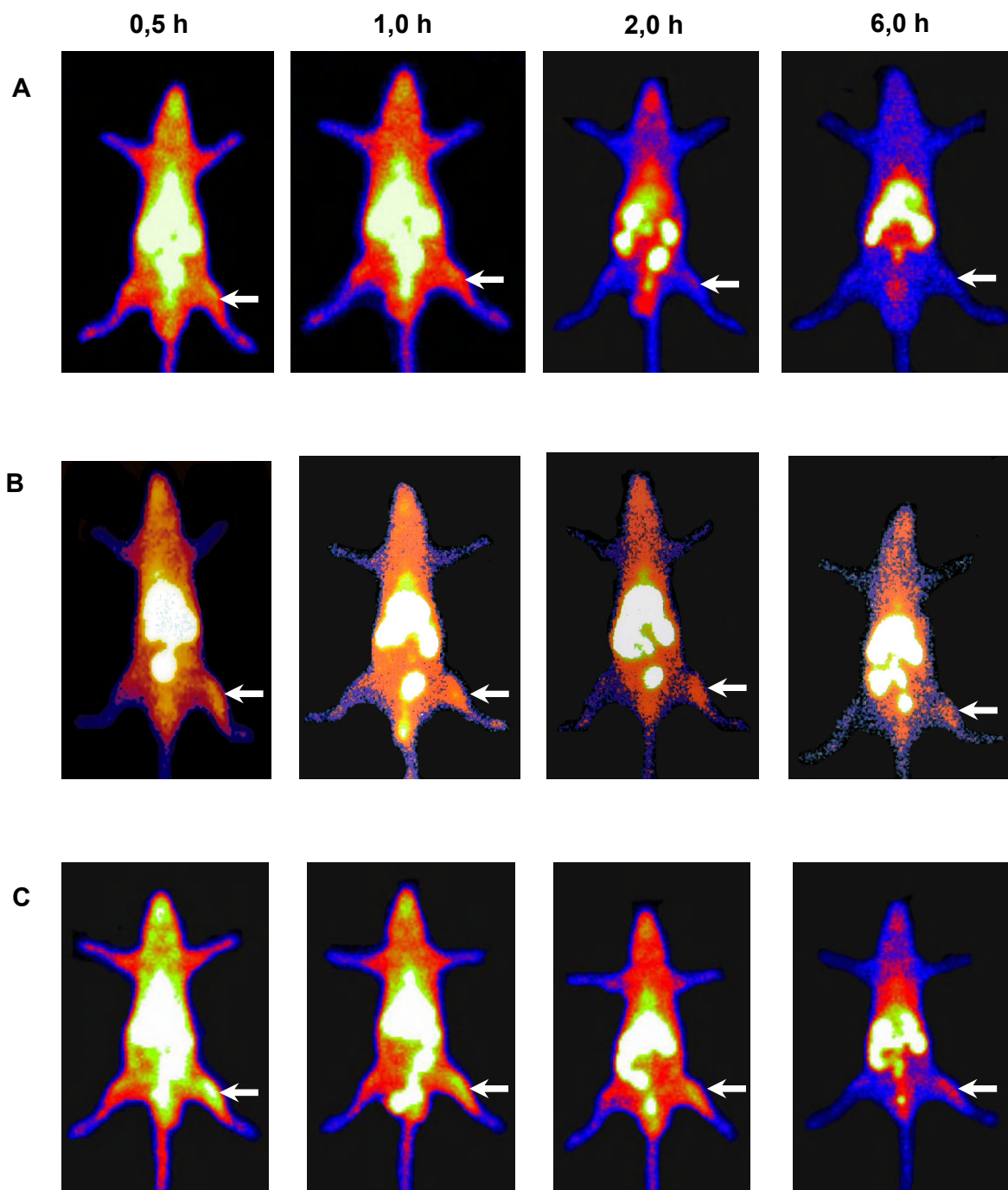
**Figura 13.** Fotomicrografias de músculo, da coxa de ratos, 24 horas após a injeção, H&E eosina, Bar = 38,9  $\mu\text{m}$ . A) músculo controle (salina). Fibras musculares íntegras e justapostas envoltas por endomísio sem alterações degenerativas ou inflamatórias. B) Músculo com zimosan (processo inflamatório). Infiltrado inflamatório constituído predominantemente por píócitos não envolto por cápsula fibrosa. C) Músculo com *S. aureus*. Infiltrado inflamatório constituído predominantemente por píócitos não envolto por cápsula fibrosa.

---

### 7.9 Imagens cintilográficas obtidas com $^{99m}\text{Tc}$ -CFT em modelos de inflamação, asséptica e séptica, no músculo da coxa de ratos

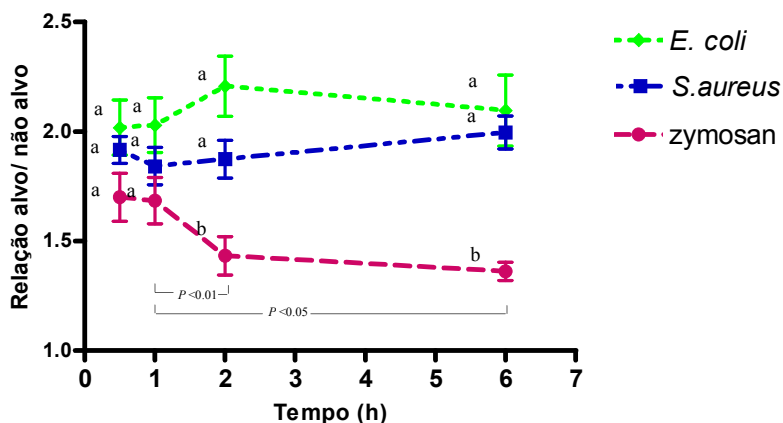
Na Figura 14 as setas indicam os alvos (coxa esquerda) onde estão localizados os focos inflamatórios assépticos (zimosan, Figura 14A) e sépticos *E. coli* (Figura 14B) e *S. aureus* (Figura 14C). A coxa contralateral (direita) representa o controle (salina). Observa-se pelas Figuras 14B e 14C a presença de radioatividade na coxa esquerda (seta) mesmo após 2 e 6 horas da injeção da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT, sugerindo a presença do antibiótico marcado nos focos infecciosos obtidos com a inoculação, no músculo, de *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente. Ao contrário, observa-se ligeira captação de radioatividade, com 2 horas, na coxa esquerda (seta) e ausência de captação 6 horas após a injeção da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT (Figura 14A), indicando que o antibiótico marcado não permaneceu no local onde existia foco inflamatório asséptico induzido por zimosan. Esses dados sugerem a existência de uma interação específica entre a  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT e as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, justificando a captação de radioatividade na coxa esquerda, mesmo após 6 horas da injeção, para ambos os casos. Isto não ocorreu quando a bactéria estava ausente, ou seja, no foco inflamatório asséptico (Figura 14A). Em síntese, esses dados são complementares àqueles descritos para a atividade biológica e ensaio de ligação *in vitro* da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT. Os resultados sugerem que as imagens tardias (2 e 6 horas) após a injeção da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT poderão contribuir para diferenciar focos inflamatórios assépticos de sépticos em algumas regiões de tecidos moles como o músculo. Dados similares, ou seja, a persistente captação da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT pelo foco infeccioso (*E. coli*), em músculo da coxa de ratos, também foi observado por Gomes Barreto et al. (2005). Estes mesmos autores relataram também a diminuição da captação da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT, com o decorrer do tempo, para focos inflamatórios assépticos.

---



**Figura 14.** Imagens cintilográficas (visão ventral) de ratos 0,5; 1; 2 e 6 horas após injeção da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT em modelo de inflamação/infecção no músculo da coxa (n=5). A - inflamação (zimosan). B - infecção (*E. coli*). C - infecção (*S. aureus*). Os focos de inflamação e infecção estão indicados pelas setas.

A Figura 15 mostra a análise quantitativa das imagens cintilográficas em modelos de inflamação asséptica (zimosan) e inflamação séptica (*E. coli* e *S. aureus*). As coxas esquerda e direita foram consideradas alvo e não alvo, respectivamente. Os dados da relação alvo/não alvo mostraram uma diminuição estatisticamente significativa da relação no foco inflamatório asséptico (zimosan) para os tempos de 2h ( $p < 0,01$ ) e 6 horas ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o tempo de 1 hora. Esses dados sugerem uma captação não específica da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT pelo foco asséptico nos tempos de 0,5 e 1 hora, já que com o decorrer do tempo verifica-se uma redução significativa da presença da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT no foco inflamatório. Portanto, os resultados indicam que a  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT foi ao local devido ao aumento do fluxo sangüíneo e da permeabilidade vascular, provocados pela inflamação (zimosan). Provavelmente, devido a estas mesmas características e, também, pela ausência de uma interação específica entre antibiótico e microorganismos a  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT não permaneceu no foco inflamatório. A Figura 15 mostra também que, houve diferença estatisticamente significativa da relação alvo/não alvo do zimosan em relação aos tempos de 2 e 6 horas, quando comparado com os modelos de inflamação séptica (*E. coli* e *S. aureus*). Por outro lado, quando se observa os modelos de infecção por *E. coli* e *S. aureus* verifica-se que a relação alvo/não alvo foi estatisticamente igual durante todo o experimento para ambos. Ao contrário do que foi relatado para o modelo de zimosan, nestes casos pode-se sugerir uma ligação específica entre a  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT e as bactérias, que seria responsável pela retenção do antibiótico radiomarcado nos tempos tardios, ou seja, 2 e 6 horas após a administração.

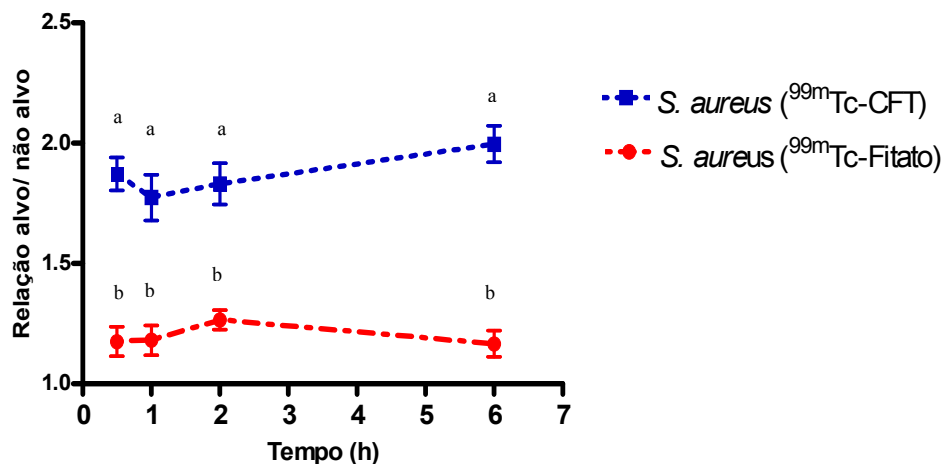


**Figura 15.** Relação alvo/não-alvo em modelos de inflamação asséptica (zimosan) e inflamação séptica (*E. coli* e *S. aureus*) no músculo da coxa 0,5; 1; 2 e 6 horas após injeção de  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT. Os valores representam a média  $\pm$  d.p. ( $n = 5$ ). Letras diferentes (a e b) somente indicam diferença estatisticamente significativa para o mesmo tempo entre os grupos. Os valores de p somente indicam diferença estatisticamente significativa para o grupo de zimosan.

Os resultados mostram também que, os valores da relação alvo/não alvo para os modelos de infecção foram sempre superiores a 1,5, enquanto que, no modelo de inflamação asséptica o valor da relação é superior apenas nos tempos iniciais de 0,5 e 1,0 hora após a injeção da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT. De acordo com Phillips (1999) para que focos de inflamação e infecção sejam diagnosticados por imagens cintilográficas é necessário que a quantidade de radioatividade presente nos focos esteja acima da radiação de fundo dos tecidos normais. Conforme descrito por estes mesmos autores, a relação alvo/não alvo deve apresentar valores no mínimo iguais a 1,5, ou seja, 50% a mais de atividade no alvo em relação a região contralateral (não alvo). Neste contexto, os resultados obtidos indicam que a  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT poderá ser utilizada como agente específico para a identificação de focos infecciosos no músculo. Além disso, os dados sugerem também a  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT como radiofármaco capaz de diferenciar inflamação de infecção.

### 7.10 Biodistribuição do $^{99m}\text{Tc}$ -fitato de sódio e da $^{99m}\text{Tc}$ -CFT em um modelo de infecção induzido por *S. aureus* no músculo da coxa de ratos

A Figura 16 mostra a relação alvo/não alvo em um modelo de infecção (*S. aureus*) utilizando  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT e o radiofármaco  $^{99m}\text{Tc}$ -fitato de sódio. As coxas esquerda e direita foram consideradas alvo e não alvo, respectivamente. Observa-se pela Figura 16 que os valores da relação alvo/não alvo para os animais do grupo  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT foram sempre superiores a 1,5 em todos os tempos investigados, o mesmo não ocorreu para aqueles animais que receberam o  $^{99m}\text{Tc}$ -fitato de sódio. Esses dados revelam mais uma vez a capacidade da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT de reconhecer a bactéria (*S. aureus*) presente no alvo. Este experimento teve como finalidade ressaltar o caráter da especificidade do antibiótico radiomarcado com a bactéria, já que quando se utilizou um agente inespecífico ( $^{99m}\text{Tc}$ -fitato) os valores da relação alvo/não alvo foram ligeiramente superiores a 1,0, sugerindo que a radioatividade presente no foco infeccioso (coxa esquerda) foi praticamente igual aquela presente na coxa direita (controle).

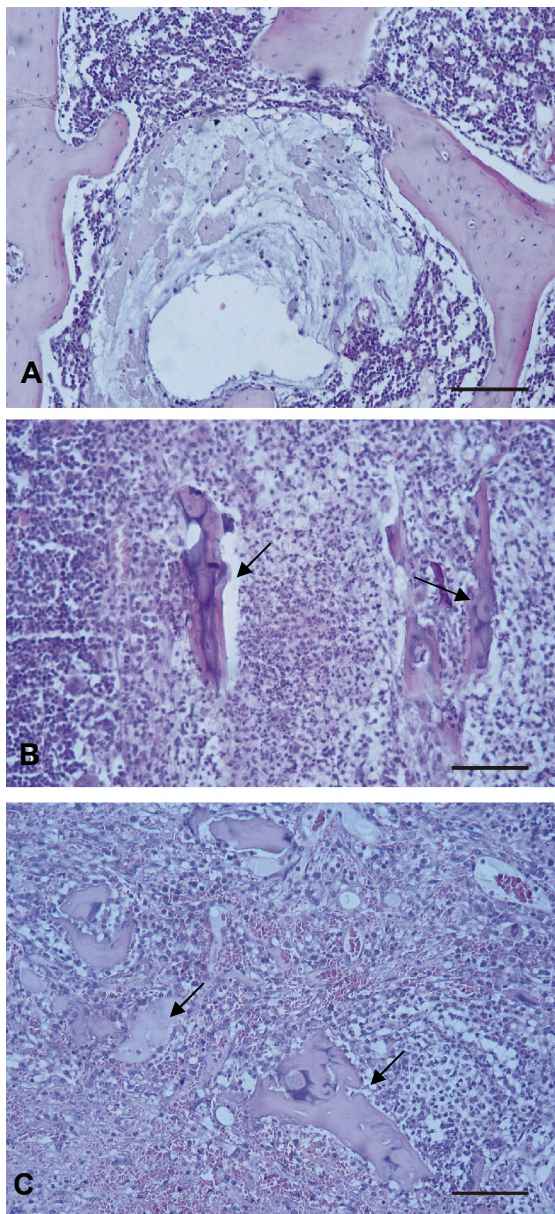


**Figura 16.** Relação alvo/não-alvo em um modelo de infecção (*S. aureus*), no músculo da coxa de ratos, utilizando  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT e  $^{99m}\text{Tc}$ -fitato de sódio. Os valores representam a média  $\pm$  d.p. ( $n = 5$ ). Letras diferentes (a e b) indicam diferença estatisticamente significativa para o mesmo tempo entre os grupos. Letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos investigados para o mesmo grupo.



### 7.11 Estudos histopatológicos na tíbia de ratos

Os animais que receberam salina não apresentaram osteomielite. A única alteração observada inicialmente foi uma perda de continuidade da cartilagem articular e da placa epifisária devido à penetração da agulha com hemorragia focal discreta, alteração evidenciada em todos os demais grupos. Em alguns ossos desse grupo, havia material eosinofílico, acelular e amorfo por entre tecido mielóide normal e trabéculas ósseas intactas e sem reação inflamatória (Figura 17A). Os animais que receberam injeção intra-óssea de zimosan apresentaram osteomielite com intensidade variável entre os animais. Mas de forma geral, o processo inflamatório foi mais evidente na metáfise do que na epífise. Após 48 horas de inoculação, o processo inflamatório era bem evidente constituído por linfócitos, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos, associado à hemorragia e focos de necrose óssea caracterizada pela presença de trabéculas ósseas fragmentadas e com lacunas vazias de osteócitos. A osteoclasia ainda era pouco evidente 48 horas após a injeção de zimosan (Figura 17B). Enquanto que as tíbias dos animais que receberam injeção intra-óssea de *S. aureus* apresentaram osteomielite supurada em todos os animais estudados. Assim como no grupo que recebeu zimosan, o processo inflamatório foi mais proeminente no canal medular da metáfise. Em todos os animais, 48 horas após a injeção de *S. aureus* o processo inflamatório era predominantemente neutrofílico com muitos neutrófilos degenerados (piócitos) de permeio a focos de hemorragia e trabéculas ósseas necróticas (Figura 17C). A necrose óssea e a osteoclasia do grupo tratado com zimosan foram um pouco menos evidentes quando comparados ao grupo tratado com *S. aureus*.



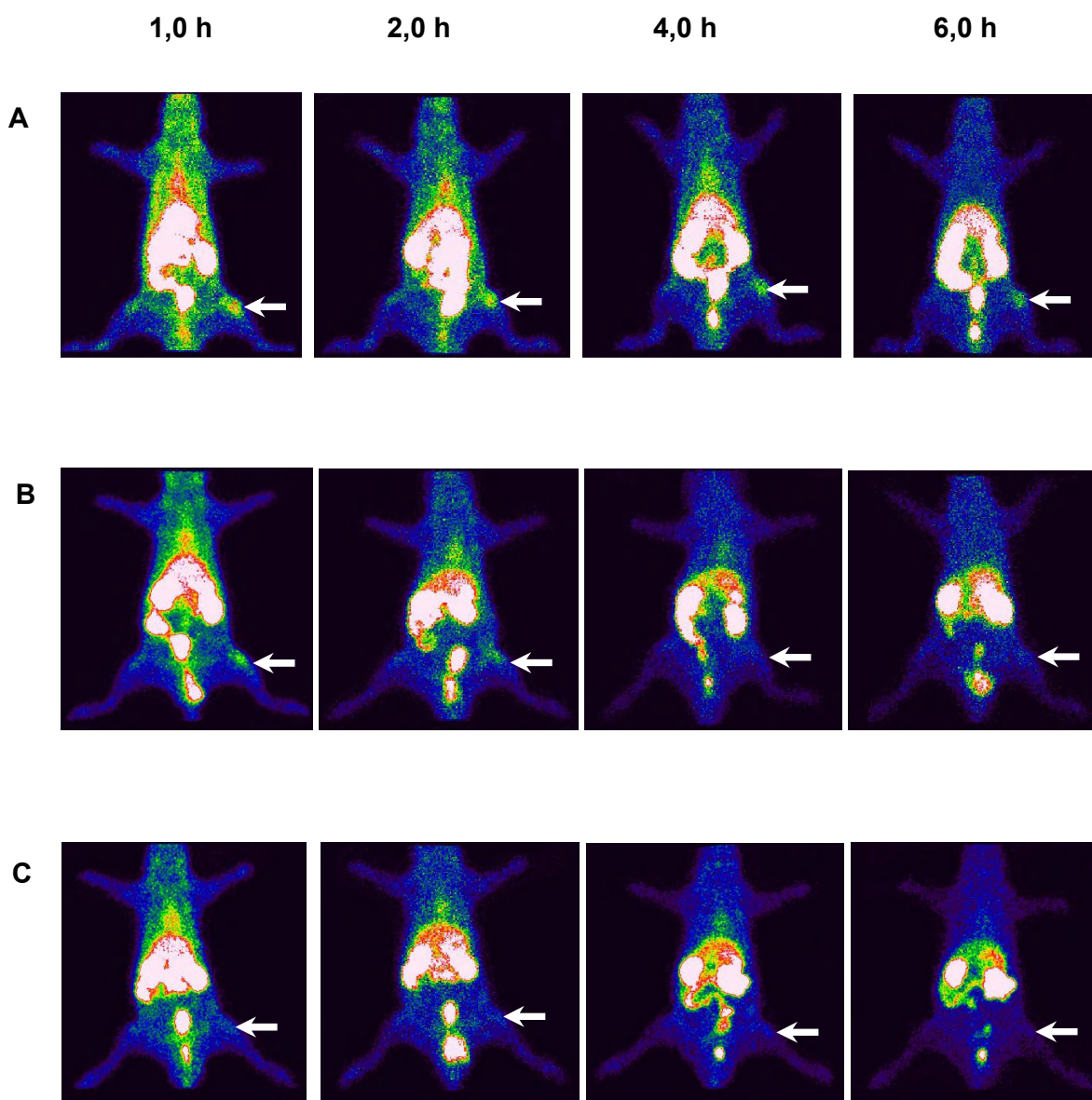
**Figura 17.** Fotomicrografias de tíbia de ratos 48 horas após a injeção intra-óssea. A) Grupo tratado com salina. Presença de material eosinofílico, acelular e amorfo por entre tecido mielóide normal e trabéculas ósseas intactas e sem reação inflamatória. HE, Bar = 96  $\mu$ m. B) Grupo tratado com zimosan. Processo inflamatório associado a trabéculas ósseas necróticas (setas). HE, Bar = 48  $\mu$ m. C) Grupo tratado com *S. aureus*. Processo inflamatório predominantemente neutrófilico de permeio a trabéculas ósseas necróticas e focos de hemorragia (setas). HE, Bar = 48 $\mu$ m.

---

### 7.12 Biodistribuição da $^{99m}\text{Tc}$ -CFT em modelo de inflamação séptica, induzido por *S. aureus* na tíbia de ratos

A  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT apresentou um alto tropismo para o foco de infecção (osteomielite, Figura 18A) quando comparado com o foco inflamatório (Figuras 18B). Os resultados também mostraram que a  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT permaneceu na tíbia esquerda dos ratos com osteomielite durante todo o experimento (Figura 18A). Estes achados indicam uma retenção preferencial da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT no foco infeccioso em relação ao foco inflamatório asséptico induzido por zimosan. Não foi observada retenção da radioatividade na tíbia esquerda (Figura 18B) nas imagens de 4 e 6 horas após a injeção da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT. Quando a  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT foi injetada nos animais inoculados com salina, não foram observadas diferenças entre as imagens das tíbias esquerda e direita (alvo/não alvo), Fig. 18C. Em nenhum dos grupos de animais investigados foi observado captação de radioatividade pela glândula tireóide, indicando que a  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT possui alta estabilidade *in vivo*.

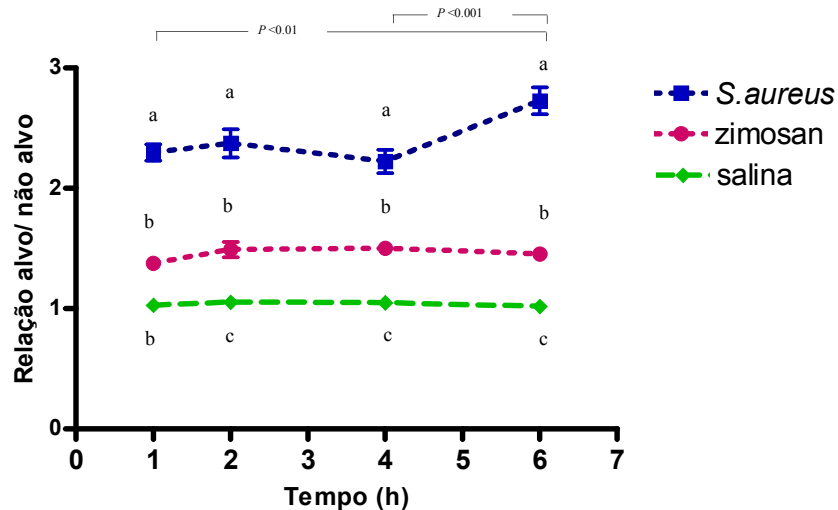
---



**Figura 18.** Imagens cintilográficas (visão ventral) de ratos 1, 2, 4 e 6 h após a injeção de  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT (n=5). A - osteomielite (*S. aureus*). B - inflamação (zimosan). C - controle (salina). Os focos de infecção e inflamação foram indicados pelas setas. A seta na figura 18C indica a localização da injeção da salina.

A análise quantitativa dos dados cintilográficos mostrou valores de alvo/não alvo de  $2,29 \pm 0,07$ ;  $2,37 \pm 0,12$ ;  $2,22 \pm 0,09$  e  $2,73 \pm 0,11$  para 1, 2, 4 e 6 horas, respectivamente, nos animais com osteomielite (Figura 19). Os resultados mostraram aumento significativo da relação de 1 e 6 horas ( $P < 0,01$ ); um aumento também foi observado no período de 4 e 6 horas ( $P < 0,001$ ). Estes dados indicam

que a retenção da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT na tíbia esquerda (osteomielite) ocorreu em tempos tardios. O valor médio obtido da relação alvo/não alvo no grupo de zimosan foi aproximadamente de  $1,50 \pm 0,05$ . Não houve diferença significativa entre os tempos investigados. O valor médio da relação no grupo de salina foi de  $1,05 \pm 0,04$ , não ocorrendo também diferença significativa entre os tempos (Figura 19). Os dados mostraram que os valores da relação alvo/não alvo para *S. aureus* foram estatisticamente maiores do que aqueles para zimosan e salina em todos os tempos investigados. Os dados também mostraram que, a relação alvo/não alvo para o grupo zimosan foi maior do que aquela observada para o grupo de salina, com exceção do primeiro tempo estudado (Figura 19). No caso específico do modelo de infecção (*S. aureus*) o valor médio da relação alvo/não alvo foi maior do que 2,0, indicando que havia 100% mais radioatividade no foco infeccioso (tíbia esquerda) do que na tíbia direita. Com base no trabalho de Phillips et al. (1999) pode-se sugerir que a  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT foi capaz de identificar foco infeccioso no osso (osteomielite) e, também, distingui-lo de um processo inflamatório.



**Figura 19.** Relação alvo/não alvo em modelos experimentais de infecção/inflamação e salina 1, 2, 4 e 6 horas após a injeção da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT. Os valores representam a média  $\pm$  d.p. ( $n = 5$ ). Letras diferentes (a, b e c) indicam diferença estatisticamente significativa para o mesmo tempo entre os grupos. Os valores de p somente indicam diferenças estatisticamente significativas para o grupo de *S. aureus*.

A retenção da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT no foco infeccioso 6 horas após a injeção do radiofármaco está demonstrado na Figura 18. O mesmo não ocorreu para o foco inflamatório (zimosan) ou nos animais que recebeu salina injetada na tibia esquerda. Esses resultados sugerem uma ligação específica existente entre a  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT e a bactéria presente no foco infeccioso, o qual é responsável pela manutenção do radiofármaco na tibia esquerda infectada (osteomielite) durante todo o período. A hipótese que o antibiótico marcado seria encontrado no foco após 6 horas, da injeção, simplesmente devido ao aumento do fluxo sanguíneo e um aumento da permeabilidade vascular provocada pela inflamação do processo infeccioso deve ser descartada, uma vez que, não foi observado captação para o grupo com zimosan. É importante enfatizar que a análise histológica mostrou uma reação inflamatória supurativa no grupo tratado com *S. aureus* e uma reação inflamatória não supurativa no grupo com zimosan, mas com uma intensidade inflamatória similar em ambos os grupos. Benitez et al. (2002) mostraram que a captação da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT provocada por um foco inflamatório asséptico (zimosan) na coxa direita de ratos diminuiu progressivamente 1, 2, 4 e 6 horas após a injeção. Assim, a ligação específica entre o antibiótico e a bactéria presente no foco parece ser responsável pela retenção observada da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT no alvo. Estudos de biodistribuição utilizando a  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT em ratos com infecção induzida por *E. coli* no músculo da coxa também mostraram uma alta captação no foco infeccioso quando comparado com o foco asséptico. Estes mesmos autores também observaram uma alta excreção biliar em todos os animais, indicando uma restrição da aplicação da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT no diagnóstico de infecção na região abdominal (GOMES BARRETO et al., 2005). No presente estudo, usando um modelo de osteomielite as imagens cintilográficas mostraram captação no abdome, assim os resultados obtidos estão de acordo com a literatura. De acordo com os resultados, o uso deste agente de diagnóstico para infecções osteoarticulares de membros inferiores e superiores é uma opção viável. Martin-Comin et al. (2004) apresentaram um caso clínico de fratura da tibia esquerda e as imagens foram obtidas nos tempos de 1, 4 e 24 horas após a injeção da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT. As imagens mostraram uma captação específica deste agente na região. A análise microbiológica mostrou a presença de *S. aureus*, confirmando assim a infecção. As imagens cintilográficas obtidas no modelo de osteomielite apresentaram uma redução da radiação de fundo com o passar do

---

tempo nas regiões torácica e cervical, sugerindo que imagens tardias poderiam contribuir no diagnóstico de osteomielite espinhal nestas áreas.

O antibiótico mais utilizado é a fluoroquinolona chamada Infecton. No entanto, os resultados obtidos são contraditórios e com baixa reprodutibilidade. Este fato tem gerado uma certa resistência por parte da comunidade científica em aceitar este antibiótico como um agente de diagnóstico seguro (LARIKKA et al., 2002<sub>a,b</sub>; DE WINTER et al., 2004). Sarda et al. (2002) mostraram que a <sup>99m</sup>Tc-ciprofloxacina não foi capaz de diferenciar osteomielite e artrite séptica de outras inflamações assépticas. Larikka et al. (2002<sub>a</sub>) sugeriram que, como a ciprofloxacina tem um baixo peso molecular, baixa ligação com proteínas plasmáticas (20-40%) e uma meia-vida biológica de 4,5 horas, poderia interagir com uma variedade de fatores antes da interação com a bactéria, o que justificaria a captação não específica observada nas imagens de 1 e 4 horas. Por outro lado, a ceftizoxima (CFT) tem uma meia-vida de 1,7 horas, sendo totalmente eliminada dentro de 24 horas após a administração. A ceftizoxima é mais rapidamente depurada do organismo do que o Infecton, diminuindo assim o pool circulante e favorecendo a ligação específica pelo foco infeccioso. Os resultados obtidos sugerem que a captação não específica da <sup>99m</sup>Tc-CFT não ocorreu nos tempos de 4 e 6 horas (Figura 17B).

Diante dos resultados apresentados pode-se pensar na preparação do radiofármaco ceftizoxima marcado com tecnécio-99m e, além disso, na possibilidade da utilização desse agente para a obtenção de imagens cintilográficas de focos inflamatórios e infecciosos e, também, para a diferenciação de processos inflamatórios assépticos de sépticos. Neste sentido, acredita-se que os resultados obtidos poderão contribuir para o diagnóstico e, também, para a melhor conduta terapêutica das doenças inflamatórias/infecciosas do sistema osteoarticular.

---

---

---

## 8 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

### 8.1 CONCLUSÕES

A ceftizoxima pode ser marcada com o tecnécio-99m dentro dos padrões descritos para um radiofármaco, sem prejuízo de sua atividade biológica assegurando a capacidade do antibiótico radiomarcado de interagir tanto com bactérias Gram-positiva quanto Gram-negativa.

Estudos de biodistribuição da ceftizoxima marcada com tecnécio-99m mostraram excreção renal importante, condizente com o perfil farmacocinético descrito na literatura para este fármaco.

As análises histológicas dos focos inflamatórios e infecciosos mostraram reação inflamatória de intensidade similar.

As imagens cintilográficas mostraram que a  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT permaneceu, durante todo o tempo dos experimentos, nas regiões onde haviam focos infecciosos localizados tanto na coxa como na tíbia dos ratos. Estes resultados sugerem uma interação específica entre o antibiótico radiomarcado e as bactérias presentes nos focos. As imagens cintilográficas mostraram também que, nos focos inflamatórios localizados na coxa e na tíbia dos ratos não houve retenção da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT.

As análises quantitativas das imagens (alvo/não alvo) revelaram importante tropismo da  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT pelos focos infecciosos, localizados na coxa e na tíbia dos ratos. O mesmo não foi observado para os focos inflamatórios.

Os resultados obtidos sugerem que a  $^{99m}\text{Tc}$ -CFT pode contribuir para o diagnóstico diferencial entre inflamação e infecção.

---

---



## **8.2 PERSPECTIVAS**

Diante desses resultados, pode-se pensar na utilização da ceftizoxima marcada com tecnécio-99m como um radiofármaco capaz de ser utilizado em Medicina Nuclear com a proposta de distinguir inflamação de infecção. Outro aspecto que também deve ser considerado é a dispensação deste agente sob a forma de kits contendo os reagentes liofilizados.

---

---

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, T. M.; HANSEN, C. Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes effect of dose. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1068, p. 133-141, 1991.

ARIAS, M. I. A.; FARTO, J. C. A. Osteomielitis. In: MARTÍN-COMIN, J. (Ed.). *Diagnóstico de la inflamación y de la infección en medicina nuclear*. Barcelona: España, 2005. p. 93-115.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 10520: informação e documentação: citações em documentos: apresentação. Rio de Janeiro, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 14724: informação e documentação: trabalhos acadêmicos: apresentação. Rio de Janeiro, 2005.

AWASTHI, V. et al. Imaging experimental osteomyelitis using radiolabeled liposomes. *J. Nucl. Med.*, v. 39, p. 1089-1094, 1998.

BABICH, J. W.; GRAHAM, W.; BARROW, S. A.; Technetium-<sup>99m</sup> labeled chemotactic peptides: comparison with indium-111-labeled white blood cells for localizing acute bacterial infection in the rabbit. *J. Nucl. Med.*, v. 34, p. 2176-2181, 1993.

BANERJEE, S.; PILLAI, M. R. A.; RAMAMOORTHY, N. Evolution of Tc-99m in diagnostic radiopharmaceuticals. *Semin. Nucl. Med.*, v. 31, p. 260-277, 2001.

BARRERA, P., VAN DER LAKEN, C. J.; BOERMAN, O. C. Localization of <sup>123</sup>I-IL-1ra in affected joints in patients with rheumatic arthritis. *Rheumatology*, v. 39, p. 870-879, 2000.

BECKER, W.; BAIR, J.; BEHN, T. Detection of soft-tissue infections and osteomyelitis using a technetium-<sup>99m</sup> labeled antigranulocyte monoclonal antibody fragment. *J. Nucl. Med.*, v. 35, p. 1436-1443, 1994.

---

---

---

BECKER, W. The contribution of nuclear medicine to the patient with infection. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 22, p. 1195-1211, 1995.

BECKER, W. et al. Rapid imaging of infections with a monoclonal antibody fragment (LeukoScan). *Clin. Orthop. Relat. Res.*, v.329, p.263-272, 1996.

BECKER, W. The choice of the best radiopharmaceutical to image specific clinical situations in patients with infection and inflammation. In: BRAGA, F. J. H. N. (Ed.). *Nuclear medicine in tropical and infectious diseases*. Massachusetts: Kluwer, 2002. p. 174-189.

BENITEZ, A, BARRETO, V. G, ROCA, M, MARTIN-COMIN, J. The use of radiolabelled antibiotics to localize inflammation and infection. In: BRAGA, F. J. H. N. (Ed.). *Nuclear Medicine in Tropical and Infectious Diseases*. Massachusetts: Kluwer, 2002. p. 227-232.

BLEEKER-ROVERS C. P. et al.  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled interleukin 8 for the scintigraphic detection of infection and inflammation: first clinical evaluation. *J. Nucl. Med.*, v. 48, p. 337-343, 2007.

BOERMAN, O. C. et al. Radiopharmaceuticals to image infection and inflammation. *Semin. Nucl. Med.*, v. 31, p. 286-295, 2001.

BRITTON, K. E. et al. Clinical evaluation of technetium- $^{99m}\text{Tc}$ infecton for the localization of bacterial infection. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 24, p. 553-556, 1997.

BROUWERS, A. H. et al. Tc-99m-PEG-liposomes for the evaluation of colitis in Crohn's disease. *J. Drug Target*, v. 8, p. 225-233, 2000.

CARDOSO, V. N. et al. Assessment of inflammatory bowel disease by using two different  $^{99m}\text{Tc}$ -leucocyte labeling methods. *Nucl. Med. Commun.*, v. 23, p. 715-720, 2002.

CARMO, V. A. S. et al. Biodistribution study and identification of inflammation sites using technetium-99m-labeled stealth pH-sensitive liposomes. *Nucl. Med. Commun.*, v. 29, p. 33-38, 2008<sub>a</sub>.

CARMO, V. A. S. et al. Physicochemical characterization and study of *in vitro* interactions of pH-sensitive liposomes with the complement system. *J. Liposome Res.*, v. 18, p. 1-11, 2008<sub>b</sub>.

---

---

CHIANELLI, M. et al. Radiopharmaceuticals for the study of inflammatory processes: a review. *Nucl. Med. Commun.*, v. 18, p. 437-455, 1997.

CORSTENS, F. H. M.; OYEN, W. J. G.; BECKER, W. S. Radioimmunoconjugates in the detection of infection and inflammation. *Semin. Nucl. Med.*, v. 23, p. 148-164, 1993.

CORSTENS, F. H. M.; VAN DER MEER, J. W. M. Nuclear medicine's role in infection and inflammation. *Lancet*, v. 354, p. 765-770, 1999.

DAMS, E. T. et al.  $^{99m}\text{Tc}$ -PEG liposomes for the scintigraphic detection of infection and inflammation: clinical evaluation. *J. Nucl. Med.*, v. 41, p. 622-630, 2000.

D'ELIA, C. O. et al. Tratamento das infecções pós artroplastia total de joelho: resultados com 2 anos de seguimento. *Acta Ortop. Bras.*, v. 15, p. 158-162, 2007.

DEWANJEE, M. K. The chemistry of  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled radiopharmaceuticals. *Semin. Nucl. Med.*, v. 20, p. 5-27, 1990.

DE WINTER, F. et al.  $^{99m}\text{Tc}$ -ciprofloxacin planar and tomographic imaging for the diagnosis of infection in the postoperative spine: experience in 48 patients. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, v. 31, p. 233-239, 2004.

DINIZ, S. O. F. et al.  $^{99m}\text{Tc}$ -ceftizoxime kit preparation. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v. 48, p. 89-96, 2005.

DUMAREY, N. et al. Infection is not specific for bacterial osteo-articular infective pathology. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 29, p. 530-535, 2002.

DUMAREY, N. et al. Imaging infection with  $^{18}\text{F}$ -FDG-labeled leukocyte PET/CT: initial experience in 21 patients. *J. Nucl. Med.*, v. 47, p. 625-632, 2006.

EL-MAGHRABY, T. A. F.; MOUSTAFA, H. M.; PAUWELS, E. K. J. Nuclear medicine methods for evaluation of skeletal infection among other diagnostic modalities. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, v. 50, p. 167-192, 2006.

---

---

FARTO, J. C. A. Estado actual de los estudios de medicina nuclear en procesos infecciosos e inflamatorios en España. *Rev. Esp. Med. Nucl.*, v. 20, p. 353-357, 2001.

FISCHMAN, A. J. et al. Imaging focal sites of bacterial infection in rats with indium-111-labeled chemotactic peptide analogs. *J. Nucl. Med.*, v. 32, p. 483-491, 1991.

FISCHMAN, A. J.; RAUH, D.; SOLOMON, H. In vivo bioactivity and biodistribution of chemotactic peptide analogs in nonhuman primates. *J. Nucl. Med.*, v. 34, p. 2130-2134, 1993.

FRÉZARD, F. Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 32, p. 181-189, 1999.

GOINS, B. et al. Biodistribution and imaging studies of technetium-99m-labeled liposomes in rats with focal infection. *J. Nucl. Med.*, v. 34, p. 2160-2168, 1993.

GOMES BARRETO, V. et al. Marcaje de ceftizoxima con  $^{99m}\text{Tc}$ . *Rev. Esp. Med. Nuclear*, v. 19, p. 479-483, 2000.

GOMES BARRETO, V. et al. Gammagrafía con  $^{99m}\text{Tc}$ -ceftizoxima en ratas normales y en ratas con absceso inducido. *Rev. Esp. Med. Nuclear*, v. 24, p. 312-318, 2005.

GOLDMAN, L.; BENNETT, J. C. *Cecil tratado de medicina interna*. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

GRATZ, S. et al.  $^{99m}\text{Tc}$ -Interleukin-8 for imaging acute osteomyelitis. *J. Nucl. Med.*, v. 42, p. 1257-1264, 2001.

GRATZ, S. et al. LeukoScan for imaging infection in different clinical settings: a retrospective evaluation and extended review of the literature. *Clin. Nucl. Med.*, v. 28, p. 267-276, 2003.

GUHLMANN, A.; BRECHT-KRAUSS, D.; SUGER, G. Chronic osteomyelitis: detection with FDG PET and correlation with histopathologic findings. *Radiology*. v. 206, p. 749-754, 1998.

HALL, A. V. et al. Evaluation of the efficacy of  $^{99m}\text{Tc}$ -Infecton, a novel agent for detecting sites of infection. *J. Clin. Pathol.*, v. 51, p. 215-219, 1998.

---

---

---

HAY, R. V. et al. Scintigraphy of acute inflammatory lesions in rats with radiolabelled recombinant human interleukin-8. *Nucl. Med. Commun.* v. 18, p. 367-378, 1997.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES (IPEN). Radiofarmácia. Disponível em: <<http://www.ipen.br/sitio/?idm=115>>. Acesso em: 30 abr. 2008.

JONES, A. G. Technetium in nuclear medicine. *Radiochim. Acta*, v. 70/71, p. 289-297, 1995.

KAMIMURA, T. et al. Ceftizoxime (FK 749), a new parenteral cephalosporin: *in vitro* and *in vivo* antibacterial activities. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 16, p. 540-548, 1979.

KRAUSE, S. et al. Preclinical evaluation of technetium 99m-labeled P1827DS for infection imaging and comparison with technetium 99m IL-8. *Nucl. Med. Biology*, v. 34, p. 925-932, 2007.

KUMAR, R. et al. Role of modern imaging techniques for diagnosis of infection in the era of  $^{18}\text{F}$ -fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 21, p. 209-224, 2008.

LARIKKA, M. J. et al. Improved method for detecting knee replacement infections based on extended combined  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -white blood cell/bone imaging. *Nucl. Med. Commun.*, v. 22, p. 1145-1150, 2001.

LARIKKA, M. J. et al. Comparison of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ciprofloxacin,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  white blood cell and three-phase bone imaging in the diagnosis of hip prosthesis infections: improved diagnostic accuracy with extended imaging time. *Nucl. Med. Commun.*, v. 23, p. 655-661, 2002<sub>a</sub>.

LARIKKA, M. J. et al.  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ciprofloxacin (Infecton) imaging in the diagnosis of knee prosthesis infections. *Nucl Med. Commun.*, v. 23, p. 167-170, 2002<sub>b</sub>.

LEVER, S. Z. et al. Design, preparation, and biodistribution of a technetium- $^{99\text{m}}$ , triaminedithiol complex to assess regional cerebral blood flow. *J. Nucl. Med.*, v. 26, p. 1287-1294, 1985.

---

---

---

---

LIMA, A. L. L. M. et al. Infecção pós-artroplastia total do joelho: considerações e protocolo de tratamento. *Acta Ortop. Bras.*, v. 12, p. 236-241, 2004.

MAGUIRE, J. H. Osteomielite. In: FAUCI, A. S. et al. (Ed.). *Harrison medicina interna*. 14. ed. Rio de Janeiro: McGraw-hill, 1998. p. 879-883.

MALAMITSI, J. et al. Infecton: a  $^{99m}\text{Tc}$ -ciprofloxacin radiopharmaceutical for the detection of bone infection. *Clin. Microbiol. Infect.*, v. 9, p. 101-109, 2003.

MARTIN-COMIN, J. et al. Hank's balanced salt solution: an alternative resuspension medium to label autologous leukocytes. Experience in inflammatory bowel disease. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v. 45, p. 39-44, 2002.

MARTIN-COMIN, J. et al. Diagnóstico de infección ósea con  $^{99m}\text{Tc}$ -ceftizoxima. *Rev. Esp. Med. Nuclear*, v. 23, p. 357, 2004.

McAFEE, J. G.; TAKUR, M.L. Survey of radioactive agents for the in vitro labeling of phagocytic leucocytes. *J. Nucl. Med.*, v. 17, p. 480-492, 1976.

MITCHELL, R. N.; COTRAN, R. S. Acute and chronic inflammation. In: KUMAR, V.; COTRAN, R. S.; ROBBINS, S. L. *Robbins basic pathology*. 7. ed. Philadelphia: Saunders, 2003. p. 53-59.

MOGHIMI, S. M.; SZEBENI, J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog. Lipid. Res.*, v. 42, p. 463-478, 2003.

OLIVEIRA, J. F. et al. Assessment of the effect of *Maytenus ilicifolia* (espinheira santa) extract on the labeling of red blood cells and plasma proteins with technetium-99m. *J. Ethnopharmacol.*, v. 72, p. 179-184, 2000.

PALESTRO, C. J. et al. Phase II study of  $^{99m}\text{Tc}$ -ciprofloxacin uptake in patients with high suspicion of osteomyelitis. *J. Nucl. Med.*, v. 47, p. 152, 2006.

PALESTRO, C. J.; LOVE, C.; MILLER, T. T. Diagnostic imaging tests and microbial infections. *Cell. Microbiol.*, v. 9, p. 2323-2333, 2007<sub>a</sub>.

---

---

---

---

PALESTRO, C. J. *In vivo* leukocyte labeling: the quest continues. *J. Nucl. Med.*, v. 48, p. 332-334, 2007<sub>b</sub>.

PEREIRA, F. E. L.; BOGLIOLO, L. Inflamações. In: BOGLIOLO, L.; BRASILEIRO FILHO, G. *Bogliolo patologia*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000. Cap. 7, p. 112-147.

PERRIER, C.; SEGRÈ, E. Some chemical properties of element 43. *J. Chem. Phys.*, v. 5, p. 712-716, 1937.

PETERS, A. M.; DANPURE, H. J.; OSMAN, S. Preliminary clinical experience with <sup>99m</sup>Tc-hexamethylpropylene-amineoxine for labelling leucocytes and imaging infection. *Lancet*, v. 2, p. 945-949, 1986.

PHILLIPS, W. T. Delivery of gamma-imaging agents by liposomes. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 37, p. 13-32, 1999.

PHYSICIANS' Desk Reference. 54. ed. Montvale: Medical Economics Company, 2000.

RENNEN, H. J. J. M. et al. Specific and rapid scintigraphic detection of infection with <sup>99m</sup>Tc-labeled interleukin-8. *J. Nucl. Med.*, v. 42, p. 117-123, 2001<sub>a</sub>.

RENNEN, H. J. J. M. et al. Imaging infection/inflammation in the new millennium. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 28, p. 241-252, 2001<sub>b</sub>.

RENNEN H. J. J. M. et al. Kinetics of <sup>99m</sup>Tc-labeled interleukin-8 in experimental inflammation and infection. *J. Nucl. Med.*, v. 44, p. 1502-1509, 2003.

RENNEN, H. J. J. M.; BOERMAN, O. C.; OYEN, W. J. G. Radiomarcadores para el diagnóstico de infecciones e inflamaciones. In: MARTÍN-COMIN, J. (Ed.). *Diagnóstico de la inflamación y de la infección en medicina nuclear*. Barcelona: España, 2005. p. 53-75.

RUBELLO, D. et al. Role of anti-granulocyte fab` fragment antibody scintigraphy (LeukoScan) in evaluating bone infection: acquisition protocol, interpretation criteria and clinical results. *Nucl. Med. Commun.*, v. 25, p. 39-47, 2004.

SAHA, G. B. *Fundamentals of nuclear pharmacy*. 4. ed. New York: Springer, 1998.

---

---



---

SAMPSON, C. B. *Textbook of radiopharmacy: theory and practice*. London: Gordon and Breach Science Publishers, 1990.

SAMPSON, C.B. Complications and difficulties in radiolabelling blood cells: A review. *Nucl. Med. Commun.*, v. 17, p. 648-658, 1996.

SANDLER, M.P. et al. (Ed.). *Begging of nuclear medicine*. In: diagnostic nuclear medicine. 3. ed. Baltimore: Willis & Wilkins, p. 1-7, 1996.

SARDA, L. et al. Evaluation of  $^{99m}\text{Tc}$ -ciprofloxacin scintigraphy in a rabbit model of *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infection. *J. Nucl. Med.*, v. 43, p. 239-245, 2002.

SARDA, L. et al. Inability of  $^{99m}\text{Tc}$ -ciprofloxacin scintigraphy to discriminate between septic and sterile osteoarticular diseases. *J. Nucl. Med.*, v. 44, p. 920-926, 2003.

SAPIENZA, M. T. et al. Avaliação e atividade inflamatória na osteomielite crônica: contribuição da cintilografia com anticorpos policlonais. *Rev. Ass. Med. Brasil.*, v. 46, p. 106-112, 2000.

SIGNORE, A.; CHIANELLI, M.; TOSCANO, A. A radiopharmaceutical for imaging areas of lymphocytic infiltration,  $^{123}\text{I}$ -interleukin-2 labeling procedure and animal studies. *Nucl. Med. Commun.*, v. 13, p. 713-722, 1992.

SIGNORE, A. et al. Imaging active lymphocytic infiltration in coeliac disease with iodine-123-interleukin-2 and the response to diet. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 27, p. 18-24, 2000.

SIMONSEN, L. et al. White blood cell scintigraphy for differentiation of infection and aseptic loosening. *Acta Orthop.*, v. 78, p. 640-647, 2007.

SONMEZOGLU, K. et al. Usefulness of  $^{99m}\text{Tc}$ -Ciprofloxacin (infecton) scan in diagnosis of chronic orthopedic infections: Comparative study with  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO leukocyte scintigraphy. *J. Nucl. Med.*, v. 42, p. 567-574, 2001.

STUMPE, K. D. M.; STROBEL, K.  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET imaging in musculoskeletal infection. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, v. 50, p. 131-142, 2006.

---

---

SWEETMAN, S. C. (Ed.). *Martindale: the complete drug reference*. 34. ed. London: Pharmaceutical Press, 2005.

TAVARES, W. *Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos*. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

THRALL, J. H.; ZIESSMAN, H.A. *Medicina nuclear*. 2. ed. London: Mosby, 2003.

TSOPELAS, C. et al.  $^{99m}\text{Tc}$ -Alafosfalin: an antibiotic peptide infection imaging agent. *Nucl. Med. Biology*, v. 30, p. 169-175, 2003.

TUCKER, W. D. et al. Methods of preparation of some carrier-free radioisotopes involving sorption on alumina. New York: *Brookhaven National Laboratory*, 1958. (USAEC Report BNL-3746).

THE UNITED STATES Pharmacopeia: USP 29: the national formulary: NF 24. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2005.

WAREHAM, D.; MICHAEL, J.; DAS, SATYA. Advances in bacterial specific imaging. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, v. 48, p. 145-152, 2005.

WEINER, R. The role of transferrin and other receptors in the mechanism of  $\text{Ga}^{67}$  localization. *Int. J. Rad. Appl. Instrum. B.*, v. 17, p. 141-149, 1990.

WEINER, R. E.; THAKUR, M. L. Imaging infection/inflammations. *Q. J. Nucl. Med.*, v. 43, p. 2-8, 1999.

WISE, R.; ANDREWS, J. M.; EDWARDS, L. J. In vitro activity of Bay 09867, a new quinolone derivative compared with those of other antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemoth.*, v. 23, p. 559-564, 1983.

WOLF, G.; AIGNER, R. M.; SCHWARZ, T. Diagnosis of bone infection using  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO labelled leukocytes. *Nucl. Med. Commun.*, v. 22, p. 1201-1206, 2001.

WOLF, G. et al. Localization and diagnosis of septic endoprosthesis infection by using  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO labelled leukocytes. *Nucl. Med. Commun.*, v. 24, p. 23-28, 2003.

---

---

---

VAN DER LAKEN, C.; BOERMAN, O.; OYEN, W. Specific targeting of infectious foci with radioiodinated human recombinant interleukin-1 in an experimental model. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 22, p. 1249-1255, 1995.

VINJAMURI, S. et al. Comparison of  $^{99m}\text{Tc}$ -Infecton imaging with radiolabelled white-cell imaging in the evaluation of bacterial infection. *Lancet*, v. 347, p. 233-235, 1996.

YAPAR, Z. et al. The efficacy of  $^{99m}\text{Tc}$  ciprofloxacin (Infecton) imaging in suspected orthopaedic infection: a comparison with sequential bone/gallium imaging. *Eur. J. Nucl. Med.*, v. 28, p. 822-830, 2001.

ZABRANSKY, R. J. Infectious disease prime cause of death world wide. *Clin. Microbiol. News.*, v. 19, p. 7-8, 1997.

ZHUANG, H.; ALAVI, A. 18-Fluorodeoxyglucose positron emission tomographic imaging in the detection and monitoring of infection and inflammation. *Semin. Nucl. Med.*, v. 32, p. 47-59, 2002.

ZOGHBI, S.; THAKUR, M.; GOTTSCHALK, A. Selective cell labeling: a potential radioactive agent for labeling of human neutrophils. *J. Nucl. Med.*, v. 22, p. 32, 1981.

XAVIER, R. Infecções osteoarticulares. In: HEBERT, S. et al. *Ortopedia e traumatologia: princípios e práticas*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed., 2003. Cap. 28, p. 726-743.

---

---

## **ANEXO A - Patente**

DINIZ, S.O.F.; MARTIN-COMIN, J.; CARDOSO, V.N. kit para teste com antibiótico radiomarcado. Depósito em 04 de outubro de 2006, PI 0604132-9.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)