

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

Informe de tesis

MARCAJE RADIOISOTOPICO DE LEUCOCITOS CON
 ^{99m}Tc -HEXAMETILPROPILENAMINOXIMA Y ^{99m}Tc -GLUCOHEPTONATO



presentado por:

SERGIO ROBERTO HERNANDEZ MARTINEZ

Para optar al título de

QUIMICO FARMACEUTICO

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

Guatemala, Noviembre de 1.995

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS
DE GUATEMALA



FACULTAD DE CC. QQ. Y FARMACIA

Edificio "T-12"

Ciudad Universitaria, zona 12
Guatemala, Centroamérica

JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

DECANO	LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR
SECRETARIA	LICDA. ELEONORA GAITAN IZAGUIRRE
VOCAL I	LIC. MIGUEL ANGEL HERRERA GALVEZ
VOCAL II	LIC. GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN
VOCAL III	LIC. MIGUEL ORLANDO GARZA SAGASTUME
VOCAL IV	BR. ANA MARIA RODAS CARDONA
VOCAL V	BR. HAYRO OSHALDO GARCIA GARCIA

/y bdeo.

DJ.
06
7 (704)

DEDICATORIA

A DIOS: Fuente de Poder y Sabiduría

A MARIA: Virgen inmaculada y misericorde

A MIS PADRES: Víctor Abel Hernández Pérez
Ely Margarita Martínez Morales
Por el amor, apoyo y dedicación que siempre me brindan.

A MIS HERMANOS: Víctor, Ricardo y Ely, con mucho cariño.

A MI FAMILIA: Especialmente a mi abuela Antonia, a mi tía Telma y mi abuelo Juan.

A MI NOVIA: Karen Girón, por su gran ayuda y comprensión en todo momento.

A MIS CATEDRATICOS: Por todas sus enseñanzas

A MIS AMIGOS

AGRADECIMIENTO

- A la Licda. Celestina Portillo por sus consejos, apoyo y asesoría en la realización de esta investigación.
- A la Licda. Diana Freire por sus enseñanzas, ayuda y cooperación brindada.
- A la Dirección General de Energía Nuclear, Departamento de Medicina Nuclear, en especial:

Dr. Eduardo Chajón

Personal técnico y profesional

- A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC, especialmente a: Lic. Federico Nave, por su ayuda estadística y Lic. Rolando López por su amistad.
- A todos los donadores y personas que de una u otra forma, colaboraron en la realización de esta investigación.

INDICE

	Página
1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Antecedentes	5
4. Justificaciones	15
5. Objetivos	16
6. Hipótesis	17
7. Materiales y métodos	18
8. Resultados	28
9. Discusión de resultados	30
10. Conclusiones	33
11. Recomendaciones	34
12. Referencias	35
13. Anexos	44

1. RESUMEN

La marcación de leucocitos con ^{99m}Tc se utiliza como una técnica exploratoria en el diagnóstico de procesos infecciosos, ya que presenta características radionucleídicas y dosimétricas óptimas y se fija en forma rápida y específica en las lesiones sépticas.

El presente trabajo evaluó la marcación de leucocitos con ^{99m}Tc , se usó como vehículo lipofílico hexametilpropilenoamina (HMFAO (CERETEC[®])) y como vehículo hidrofílico Glucoheptonato de Calcio (GH).

Se utilizó una población mixta de leucocitos obtenida de 20 muestras de 10 donadores normales (5,000-10,000 leucocitos/ c^3), se separó la capa leucocitaria por medio del método de sedimentación por gravedad, se usó como anticoagulante ACD 6 ml y como agente sedimentante hidroxietil almidón (HESPAAN 6%) 6 ml. Para marcar con GH se incluyó en la técnica de separación de los leucocitos, la hemólisis hipotónica de los eritrocitos que están como contaminantes, no así el HMFAO porque dicha contaminación no interfiere, debido a que este compuesto tiene mayor afinidad por los leucocitos que por los eritrocitos y plaquetas. Para marcar el HMFAO se utilizó ^{99m}Tc de generadores nuevos y recién eluidos para evitar su inestabilidad.

Al comparar los resultados se observó que la eficiencia de marcación para el HMFAO fue de 81.27 ± 4.13 y para el GH de 80.03 ± 7.09 , la viabilidad leucocitaria para HMFAO fue de 97.72 ± 1.65 mientras que para el GH al final de la marcación fue de $94.82 \pm$

1.95, y una recuperación leucocitaria para HMPAO de 85.1 ± 1.90 y para el GH de 78.97 ± 3.96 .

Se realizó una tinción de células con Wright en cada marcación y se observó intacta la membrana de los leucocitos con el HMPAO mientras que con GH la membrana estaba parcialmente destruida en la mayoría de células.

Por último se realizó un control microbiológico con caldo BHI y ninguna de las muestras analizadas presentó contaminación.

Con base a los resultados obtenidos se concluye que no existe diferencia significativa en el porcentaje de marcación con ambos radiofármacos ($p= 0.6784$); si existe diferencia significativa en la recuperación leucocitaria ($p= 0.0006$), sin embargo con ambos radiofármacos se cumple con el mínimo recomendado, GH ($p= 0.001$) y HMPAO ($p= 0.001$); existe diferencia significativa en la viabilidad leucocitaria entre la marcación con GH comparada con HMPAO ($p= 0.0019$).

Se recomienda instaurar la marcación de leucocitos con ^{99m}Tc -HMPAO en el Departamento de Medicina Nuclear del Hospital General San Juan de Dios, para ser utilizados en pacientes que presenten cuadros de procesos infecciosos localizados.

2. INTRODUCCION

La incidencia de procesos infecciosos en el país es alta lo que provoca altos índices de mortalidad, para evitarlo debe detectarse en forma rápida y precisa el foco que ocasiona sepsis y no siempre resulta fácil. En ocasiones la clínica o los antecedentes orientan hacia una localización determinada pero otras veces debe recurrirse a diversas técnicas de exploración complementarias. La Medicina Nuclear proporciona una técnica exploratoria complementaria a dicho diagnóstico, mediante la inmunocentellografía a través de leucocitos marcados, que es un método exacto para el diagnóstico de infecciones localizadas, abscesos y lesiones inflamatorias, en cuyo proceso exista infiltración leucocitaria.

Los radionúclidos de ^{51}Cr y ^{67}Ga fueron los primeros en ser utilizados para marcar leucocitos, sin embargo desde la marcación realizada en 1976 por McAfee y Thakur, los leucocitos marcados con ^{111}In -oxina son utilizados con éxito en los centros de Medicina Nuclear para el diagnóstico y localización de procesos infecciosos. No obstante, la marcación de leucocitos con radiofármacos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ es un objetivo muy perseguido debido a las ventajas que este radioisótopo presenta sobre el ^{111}In : a) menor dosis de radiación al paciente, b) fácil disponibilidad, c) alta calidad de las imágenes y d) menor costo.

De las marcaciones de leucocitos reportadas en la literatura con radiofármacos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$, pocas presentan porcentajes de marcación aceptables, viabilidad y respuesta a estímulos

quimiotácticos. Además la mayor parte de radiofármacos se incorporan a los distintos tipos de células sanguíneas indiscriminadamente, lo que obliga a una separación previa de los leucocitos del resto de elementos celulares sanguíneos.

En el presente trabajo se realizó una comparación entre dos radiofármacos, hexametilpropilenoaminóxima y glucoheptonato de calcio, para evaluar con cual se obtiene mayor porcentaje de marcación, alta viabilidad y funcionalidad de los leucocitos después de ser marcados con ^{99m}Tc .

3. ANTECEDENTES

La marcación de leucocitos es ampliamente utilizada en la detección de procesos infecciosos, entre los radionúclidos usados con anterioridad se encuentran: ^{51}Cr , ^{67}Ga , ^{111}In y actualmente se utilizan los compuestos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

3.1 Marcación con $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Aproximadamente el 90% de los radiofármacos utilizados con fines diagnósticos son compuestos marcados con $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Su importancia se debe principalmente a las siguientes causas:

- a) La ausencia de emisión de partículas (emisor gamma puro).
- b) Su corto periodo de semidesintegración (6 horas), lo que permite administrar altas dosis sin causar mayor irradiación al paciente.
- c) Su fácil detección, debido a la energía de 140 Kev de sus fotones, ideal para la detección por la gamma cámara.
- d) La disponibilidad a partir del $^{99\text{Mo}}$. (Generador $^{99\text{Mo}} / ^{99\text{m}}\text{Tc}$).
- e) Fácil incorporación a muchos compuestos.
- f) Fácil producción y disponibilidad a bajo costo.
- g) Con el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ las imágenes son obtenidas de 2 a 4 horas en contraste con las 18 a 24 horas con ^{111}In (1, 2).

Aunque el desarrollo del método ^{111}In -oxina para radiomarcación de leucocitos implica un progreso en la utilización de técnicas para detección y localización de abscesos, la marcación de leucocitos con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ es ampliamente utilizada debido a la mayor disponibilidad del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (1, 2).

El generador se eluye con solución fisiológica que extrae el ^{99m}Tc como pertechnetato de sodio ($^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$) en una concentración de 10^{-2} moles. El ión pertechnetato obtenido en el eluido es la forma más estable del tecnecio en solución. La preparación de radiofármacos con tecnecio requiere generalmente la reducción del pertechnetato (valencia +7) a estados más bajos (+1 a +4). Después de la reducción del pertechnetato, el radionúclido puede formar gran variedad de complejos (1).

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

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

De estos métodos, el segundo y el tercero no requieren de la separación de los demás elementos sanguíneos (3).

3.1.1 Radiofármacos de ^{99m}Tc

Desde las marcaciones hechas por McAffe y Thakur hay muchas sustancias utilizadas para la marcación de leucocitos con ^{99m}Tc , pero realmente son pocos los compuestos que presentan buenos porcentajes de marcación, viabilidad de leucocitos, capacidad de brindar imágenes de buena calidad y estabilidad de la marcación.

Con fluoruro de estaño en la fagocitosis de partículas, se encuentran porcentajes de marcación de leucocitos en sangre

completa de aproximadamente 45% y de leucocitos en capa leucocitaria aproximadamente 55%, con una viabilidad leucocitaria de 95% (4, 5, 6, 7, 8).

El pirofosfato usando el método de preestanzación muestra un porcentaje de marcación de 30-50% y buena viabilidad, aunque se encontró actividad abdominal difusa. Entre los principales leucocitos estudiados están los leucocitos polimorfonucleares (5, 9, 10, 11).

El coloide del cloruro de estaño ha sido ampliamente estudiado por los investigadores. Entre ellos están los estudios de permeabilidad de membranas hecho por Glenn y cols., el estudio de correlación entre la cantidad de estaño y el porcentaje de marcación hecho por Bagwe y cols.. El porcentaje de marcación obtenido para leucocitos en sangre completa es de 80% con porcentaje de recuperación leucocitaria del 87% y viabilidad de leucocitos del 95% (8, 12, 13, 14, 15).

Se ha efectuado la marcación de neutrófilos con sulfuro coloidal, pero la actividad en la recirculación fue menor comparada con la actividad mostrada en el hígado y pulmón, provocando imágenes difusas. El rendimiento de marcación fue del 81%, lo que corresponde a un 42% para granulocitos y 38% para los monocitos (16, 17).

Marcus y cols. desarrollaron un método de marcación de leucocitos con un kit de albúmina coloidal, el 20 del 30 por ciento del coloide marcado quedó dentro de la célula. Las infecciones

agudas se visualizaron en 30 minutos y las crónicas en horas. El porcentaje de marcación obtenido es de 60-90% (18).

Otros compuestos utilizados para marcación de leucocitos son MDP, citrato, tropolonato, oxina, ácido dihidrobenzoico. En muchos países las marcaciones con todos estos compuestos han sido deficientes, pero en las registradas en Guatemala muestran buenos resultados con el fluoruro y con el coloide del cloruro de estaño (4, 5, 8, 19).

3.1.1.1 ^{99m}Tc -Glucoheptonato

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

- a) La cantidad de Sn^{+2} utilizada es menor, el contenido intracelular es mayor y penetra fácilmente a la célula.
- b) Hay menor cantidad de estaño extracelular, además la oxidación o lavado es más fácil y efectiva.
- c) El kit liofilizado es simple de formular y usar.
- d) Se obtiene buena eficiencia de marcación.
- e) La estabilidad in vitro es alta (20).

Además Srivastava y cols. han demostrado fácilmente que de todos los quelatos de estaño usados comúnmente (cloruro, pirofosfato, fluoruro), el glucoheptonato es transportado en mejor

forma dentro de la célula y que ésta unión es irreversible (21, 22).

Los resultados obtenidos en marcaciones al utilizar glucoheptonato muestran que la marcación es muy efectiva, encontrándose una estabilidad in vitro de aproximadamente 90% con una eficiencia de marcación del 90%, mientras que el estudio con azul de tripán la viabilidad resultante fue mayor del 90%. La sensibilidad de los leucocitos marcados con glucoheptonato para la evaluación de enfermedad inflamatoria crónica intestinal es del 93.3% con especificidad del 86.7% (3, 23, 24).

En la marcación con glucoheptonato el factor de mayor importancia en el rendimiento de marcación y la viabilidad, dependen de la cuidadosa manipulación durante todo el proceso, hecho que se demuestra al analizar las marcaciones realizadas por diferentes operadores. La técnica de preestannización implica más etapas, por lo tanto mayor manipulación, con el consiguiente problema de mayor contaminación (25).

3.1.1.2 ^{99m}Tc-HMPAO

En trabajos recientes con relación a la marcación de leucocitos se usan quelatos lipofílicos, pero de los agentes utilizados los mejores resultados fueron obtenidos con la hexametilpropilenaminoxima (HMPAO) utilizada inicialmente para estudios de flujo sanguíneo cerebral. El HMPAO es el derivado más lipofílico del PAO (propilenaminoxima) (26).

El mecanismo de la técnica es similar al mecanismo ocurrido al usar el método de marcación con ¹¹¹In-oxina. El HMPAO es un

complejo neutro lipofílico que reduce al TcO_4^- por el estaño presente y unido al ^{99m}Tc pasa fácilmente al interior de la célula (27).

La estabilidad de las células in vitro nos indica que el trazador se une fuertemente al núcleo y mitocondrias. Una vez depositada la mayor fracción del quelato es retenida en el sitio original, esto probablemente debido a una rápida conversión del quelato lipofílico a productos hidrofílicos en presencia de glutatión y lavado (26, 28).

Al añadir in vitro a una fracción mixta de leucocitos se logra un marcaje casi selectivo o específico que solo precisa la separación de la fracción mixta, al añadirlo in vitro marca con mayor afinidad a los granulocitos 51%, en menor cantidad a los mononucleares y plaquetas 46% y una pequeña cantidad se fija a los hematíes 2.9% (26, 27).

La cinética in vivo y la biodistribución de los leucocitos muestra que la recuperación a los 45 minutos de la inyección es del 37-40% y su período de semidesintegración en sangre es de 6 horas (27).

Durante la primera hora postinyección aparece actividad pulmonar y hepática, siendo más captantes el bazo y la médula ósea. También se visualiza <pool> vascular y actividad en vejiga urinaria de todos los pacientes. Esta se debe a la eliminación renal de un complejo hidrofílico eluido de las células, que se aclara rápidamente de la sangre. Con éste no aparece actividad tiroidea y hasta en un 4% de pacientes puede visualizarse la vesícula biliar

debido a la eliminación del complejo primario lipofílico o de un metabolito secundario. A las 4 horas la actividad pulmonar es mínima y se visualiza intensamente la médula ósea. Luego aparece hígado, bazo y vejiga. La vesícula biliar aparece en 10% de pacientes. A esta eliminación biliar se debe la actividad presente en colon, escasa pero visible. A las 24 horas, la distribución es la misma, excepto que la actividad intestinal es más acusada y aparece en todos los casos (27).

La existencia de actividad a nivel de intestino y vías urinarias puede producir dificultad en la interpretación de las imágenes abdominales, sobre todo en los controles de 24 horas. Como solución se recomienda la práctica de controles gammagráficos antes de las 3-4 horas, momento en el que empieza a visualizarse el intestino. Eso es obligatorio cuando se trata de estudiar la enfermedad inflamatoria intestinal. Los abscesos abdominales producen imágenes positivas entre los 30 minutos y las 3 horas de inyección en muchos de los casos (27).

En la marcación de leucocitos con HMPAO se han conseguido eficiencias de marcación entre el 50 a 60% y el estudio de viabilidad in vitro con azul de tripán muestra un resultado superior al 90% tanto en los marcajes con solución salina como en un 50% de plasma (25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32).

Según Roddie y cols. la sensibilidad de HMPAO para la detección de focos inflamatorios es de 100% con especificidad del 95% (27, 33).

No obstante, las ventajas que presenta la técnica de marcación con HMPAO para marcar leucocitos, este radiofármaco tiene severas limitaciones.

Entre las limitaciones que presenta son el alto costo, dificultad de obtener rendimientos de marcación superiores al 60% y su extremada inestabilidad in vitro tras la adición del ^{99m}Tc al vial, lo cual conlleva un incremento progresivo del ^{99m}Tc -HMPAO secundario hidrofílico y sobre todo un incremento del $^{99m}\text{TcO}_4^-$ a expensas del ^{99m}Tc -HMPAO lipofílico reduciendo el porcentaje lipofílico para uso, por lo que requiere ser administrado en los primeros 30 minutos de reconstituido el vial (28, 34, 35).

Según Hung y cols. la descomposición del ^{99m}Tc se acelera por el exceso de ión estaño (o defecto de agente quelante) y el pH elevado (>9) siendo además la forma d,l más inestable que la forma meso en solución acuosa (28).

La cantidad del tecnecio utilizado en el marcaje es fundamental a la hora de preparar el radiofármaco a lo cual Neirinckx recomienda, para obtener buenos rendimientos de marcación y aumentar la estabilidad, no marcar con más de 30 mCi de tecnecio, no utilizar eluidos de generadores que no se hayan eluido en las 24 horas previas y no utilizar el tecnecio transcurridas 2 horas después de su elución (36).

Gil y cols. concluyeron que la elección de la técnica de marcación con ^{99m}Tc -Glucoheptonato comparada con ^{99m}Tc -HMPAO, sólo depende del costo e infraestructura disponible (25).

3.2 Aplicaciones Clínicas

La localización de focos o abscesos infecciosos es a menudo un problema clínico, al cual los radiotrazadores son el método ideal para el diagnóstico in vivo. Desde la marcación de leucocitos realizada por McAffe y Thakur con ^{111}In , se utilizan de forma rutinaria en los centros de Medicina Nuclear para el diagnóstico de procesos infecciosos e inflamatorios (4, 16, 37).

Como un absceso es una acumulación focal de leucocitos, estos ya marcados se ubican en el foco de infección y muestran de esta forma el absceso oculto. Por lo tanto la marcación de leucocitos con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ es desde hace años un objetivo buscado dadas las ventajas de este radionúclido sobre el ^{111}In . Además los leucocitos marcados son utilizados principalmente en centellografía de lesiones infecciosas y abscesos (1, 2, 3, 30, 38).

Está reportado en la literatura la utilización de los $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -leucocitos en la evaluación de enfermedad inflamatoria crónica intestinal, que se caracteriza por cambios inflamatorios de la mucosa intestinal donde los leucocitos marcados se depositan, aplicándose además en infecciones osteomusculares mostrando alta sensibilidad (24).

El uso de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -leucocitos ofrece un método sensitivo y específico en imágenes para ubicar en el injerto vascular, la localización y extensión de la infección, que es una complicación seria después de realizar la cirugía (39, 40).

Un estudio con leucocitos marcados con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ puede ser de gran utilidad para diferenciar la enfermedad de Crohn de pequeña o gran

extensión de otras entidades parecidas tales como colitis ulcerativa o enfermedad inflamatoria intestinal crónica (41, 42, 43).

La combinación de estudios gammagráficos con ^{99m}Tc -leucocitos y ^{99m}Tc -Metilendifosfonato (^{99m}Tc -MDP) son útiles para el diagnóstico de infección ósea con sensibilidad del 80.9% y especificidad de 93.7%. Además son de utilidad los primeros en el manejo de pacientes con sospecha de infección ortopédica (44, 45).

La gammagrafía con ^{99m}Tc -leucocitos por su elevada sensibilidad y especificidad es el procedimiento de elección para diagnosticar infección de prótesis vascular, además de permitir detectar la presencia de lesiones inflamatorias extraprotésicas (46, 47).

Se estudió la biodistribución de HMPAO en dos cerdos con transplante de riñon y páncreas cada uno. En el transplante renal se observó un marcado acúmulo del compuesto, sugestivo del rechazo, confirmado posteriormente por el estudio histológico. Además se detectó captación en el páncreas injertado desde la primera hora de haber administrado los linfocitos, que correspondió con un rechazo en el orden histológico. En un paciente con transplante cardíaco y con biopsia endomiocárdica no se encontró captación (48).

Por último, se ha puesto de manifiesto con el uso de los ^{99m}Tc -leucocitos, infecciones de partes blandas, colitis isquémicas, hematomas infectados y abscesos pélvicos (46).

4. JUSTIFICACION

Debido a la alta incidencia de procesos infecciosos en el país y a su difícil localización mediante técnicas de diagnóstico comunes, tales como ultrasonido, rayos X convencionales, se hace necesaria la marcación de leucocitos como técnica de radioinmunodiagnóstico, debido a su alta sensibilidad y especificidad para la detección de muchos tipos de procesos inflamatorios e infecciosos.

La importancia que tiene el ^{99m}Tc para marcación de leucocitos se debe principalmente a la menor irradiación del paciente, fácil detección por la cámara gamma, bajo costo y su fácil disponibilidad.

Los radiofármacos disponibles para el marcaje de leucocitos in vitro, son capaces de incorporarse a diferentes tipos de células indiscriminadamente, lo que obliga a una separación previa de los leucocitos del resto de células sanguíneas, sin embargo es necesario obtener una población mixta de leucocitos para ser marcados con Glucoheptonato y HMPAO y visualizar así focos infecciosos de diferente patología.

5. OBJETIVOS

5.1 GENERAL

Evaluar la marcación de leucocitos con ^{99m}Tc -Glucuheptonato y ^{99m}Tc -Hexametilpropilenaminoxima.

5.2 ESPECIFICOS

Determinar la eficiencia de marcación de leucocitos con Glucoheptonato y Hexametilpropilenaminoxima.

Comparar la viabilidad y recuperación leucocitaria de los leucocitos en ambas técnicas.

Establecer una técnica valida y precisa que sea utilizada en el Departamento de Medicina Nuclear del Hospital General San Juan de Dios en pacientes que presenten cuadros de procesos infecciosos localizados.

6. HIPOTESIS

El marcaje radioisotópico de leucocitos con ^{99m}Tc -HMPAO es equivalente al marcaje con ^{99m}Tc -Glucoheptonato.

6. HIPOTESIS

El marcaje radioisotópico de leucocitos con ^{99m}Tc -HMPAO es equivalente al marcaje con ^{99m}Tc -Glucoheptonato.

7.0 MATERIALES Y METODOS

7.1 Universo de trabajo

Para comparar la marcación de leucocitos con GH y HMPAO se utilizó una población mixta de leucocitos obtenidos de sangre fresca de donadores.

Se trabajó con 10 pacientes a quienes se les extrajo 90 ml de sangre. Se usaron 45 ml de sangre para cada marcación (se hizo 10 marcaciones con cada radiofármaco) y se realizó un total de 20 muestras.

7.2 Medios

7.2.1 Recursos Humanos

Autor: Br. Sergio Roberto Hernández Martínez

Asesor: Licda. Maria Celestina Fortillo de Palma

7.2.2 Recursos Materiales

El material y equipo que se utilizó, fue proporcionado por el Laboratorio de Radiofarmacia de la Dirección General de Energía Nuclear (DGEN) y el Departamento de Medicina Nuclear del Hospital General San Juan de Dios (HGSJD).

7.2.2.1 Equipo

- calibrador de dosis DELUXE ISOTOPE CALIBRATOR II
- agitador tipo Vortex MAXIMIX 1
- Contador de células Coulter Counter
- centrifuga IEC HN-SII
- campana de flujo laminar horizontal EBL
- incubadora PRECISION II

- microscopio de luz
- refrigerador
- cámara de Neubauer
- cámara cromatográfica
- contador de pozo ORTEC

7.2.2.2 Reactivos

- kit de Glucoheptonato (anexo 4) (DGEN)
- Kit de HMPAO (Ceretek^{ME}) - AMERSHAM
- Anticoagulante Acido-Citrato-Dextrosa (ACD) (DGEN)
- Azul de Tripán (DGEN)
- Colorante Wriqth (DGEN)
- Solución salina 0.9% (RUIFARMA)
- Solución salina 5.0% (RUIFARMA)
- Agua destilada estéril (RUIFARMA)
- Caldo EHI (infusión cerebro-corazón) (HGSJD)
- Hidroxietilalmidón (HESPAN) 6% - DUPONT
- Acetona (MERCK)
- Cloroformo (MERCK)
- Solución de pertecneciato de sodio recién eluido
- Generador de ^{99m}Mo / ^{99m}Tc - AMERSHAM

7.2.2.3 Materiales

- portaobjetos
- cubreobjetos
- pipetas plásticas estériles de 1 ml

- pipeta automática de 200 ul y tips
- agujas y mariposas de 19G
- jeringas tipo tuberculina
- jeringas plásticas de 3 ml, 5 ml, 10 ml y 60 ml
- tubos plásticos cónicos con tapadera de rosca de 50 mililitros (Falcon)
- papel para cromatografía ITLC-SG
- guantes
- tijeras
- gavachas de plomo
- cristalería en general
- contenedores plomados
- pinzas
- frascos multidosis
- placas con pozos para incubación
- tubos de ensayo
- bata de laboratorio

7.3 Procedimiento

7.3.1 Separación de leucocitos y marcación con Glucoheptonato

- a. Se extrajo 45 ml de sangre en una jeringa de 60 ml con mariposa de 19½ G que contenía 6 ml de ACD y 6 ml de HESPAN; luego sedimentó durante 60 minutos, en un ángulo de 90°.
- b. Con otra mariposa de 19½ G, se trasvasó el plasma rico en leucocitos y plaquetas (PRLP) y glóbulos rojos contaminantes a un

- tubo Falcon. Se muestreó para realizar hemograma y viabilidad control.
- c. Se centrifugó durante 10 minutos a 180 G (1,000 rpm) y descartó el sobrenadante.
- d. Se lisó los glóbulos rojos contaminantes, por hemólisis hipotónica con 9 ml de agua destilada estéril. Se resuspendió las células suavemente (sin introducir aire) con la pipeta plástica sin agitar por más de 10 segundos. Se muestreó para prueba de viabilidad.
- e. La isotonicidad del medio se recuperó al agregar 2 ml de solución salina al 5% y 10 ml de solución salina al 0.9% y se agitó suavemente.
- f. Se centrifugó durante 10 minutos a 180 G (1,000 rpm) y descartó el sobrenadante.
- g. Se reconstituyó el kit de Glucoheptonato con 10 ml de solución salina al 0.9%.
- h. El concentrado leucocitario se resuspendió con 2 ml del kit y llevó a volumen de 5 ml con solución salina 0.9% e incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- i. Se centrifugó durante 8 minutos a 180 G (1,000 rpm) y descartó el sobrenadante.
- j. Se resuspendió el concentrado leucocitario en 3 ml de pertechnetato de sodio, 10 a 15 mCi (555 - 734 MBq) y llevó a volumen de 5 ml con sol. salina 0.9%, luego se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente y agitó ocasionalmente.

k. Se centrifugó durante 8 minutos a 180 G (1,000 rpm). Se midió la actividad en las células y en el sobrenadante y determinó el porcentaje de marcación (^{99m}Tc - leucocitos). Se muestreó para realizar control de viabilidad final y porcentaje de recuperación leucocitaria (3).

7.3.2 Separación de Leucocitos y marcación con HM-PAO

a. Se extrajo 45 ml de sangre en una jeringa de 60 ml con mariposa de 19½ G que contenía 6 ml de ACD y 6 ml de HESPAN. Se dejó sedimentar durante 60 minutos, en un ángulo de 90°.

b. Se utilizó otra mariposa de 19½ G para trasvasar el plasma rico en leucocitos y plaquetas (PRLP) y glóbulos rojos contaminantes a un tubo Falcon. Se muestreó para realizar hemograma y viabilidad control.

c. Se centrifugó durante 5 minutos a 250 G (1,300 rpm) y descartó el sobrenadante.

d. El contenido de un vial de HMFAO (CERETEC^{MR}) se disolvió con 2 ml de pertecneciato de sodio, 10 a 15 mCi (555 - 734 MBq), sin introducir aire.

e. Se resuspendió el concentrado leucocitario (c) con 1 ml de ^{99m}Tc -HMFAO e incubó 10 a 15 minutos a temperatura ambiente y agitó ocasionalmente.

f. Se añadió 5 ml de solución salina 0.9% y centrifugó 5 minutos a 180 G (1,300 rpm).

g. Se midió la actividad en las células y en el sobrenadante y determinó el porcentaje de marcación (% de ^{99m}Tc - leucocitos). Se

muestreó para realizar control de viabilidad final y porcentaje de recuperación leucocitaria (3).

7.3.3 Pureza Radioquímica de Glucoheptonato

7.3.3.1 Cromatografía ITLC-SG

Se colocó el solvente adecuado en la cámara cromatográfica hasta llegar a una altura de 1 cm del fondo del recipiente, se tapó y dejó saturar la cámara. El soporte se cortó en tiras de aproximadamente 1.5 cm de ancho por 12 cm de largo, se trazó una línea discontinua con lápiz de grafito a 1.5 cm de uno de los extremos (punto de aplicación) y otra a 9.5 cm de la línea que marca dicho punto.

Se aplicó la muestra en la línea de origen (sin tocar la superficie con el aplicador). El área de la misma fue lo menor posible (máximo diámetro 0.5 cm). Se colocó la tira cromatográfica y cuidó que el borde inferior estuviera sumergido en el solvente (sin tocar el punto de aplicación) y se esperó hasta que la muestra llegó a la parte superior para extraer la tira cromatográfica del recipiente.

El cromatograma se midió por el siguiente procedimiento:

Se cortó la tira en porciones de 1 cm, se inició desde 0.5 cm por debajo de la línea de aplicación de la muestra y se midió cada uno de los segmentos en un contador de centelleo sólido de yoduro de sodio (NaI) (8).

7.3.3.1.1 Sistema cromatográfico para ^{99m}Tc -Glucoheptonato

SOPORTE	SOLVENTE	Rfo	Rf1
ITLC-SG	NaCl	TcO ₂ , TcS ₂ , Tc oxidado, coloides o hidróxidos.	^{99m}Tc - Gluco TcO ₄ ⁻ libre
ITLC-SG	Acetona	^{99m}Tc -Gluco, Tc oxidado, coloides o hidróxidos.	TcO ₄ ⁻

Los resultados se calcularon de la siguiente forma:

$$\% \text{ PR} = \frac{\text{Ar}}{\text{Ar} + \text{A}_{11}} \times 100$$

Ar: Actividad neta (considerar el Background del cromatograma) del Radiofármaco.

A₁₁: Actividad neta (considerar el Background del cromatograma) de la impureza (49).

7.3.4 Pureza Radioquímica para HM-PAO

A un tubo de ensayo que contenía 1 ml de cloroformo y 1 ml de solución salina 0.9%, se añadió 100 µl de ^{99m}Tc -HMFAO. Esta mezcla se tapó y agitó aproximadamente un minuto en agitador tipo Vortex, se dejó reposar por un minuto para permitir la separación de fases.

La capa superior o fase acuosa (solución salina 0.9%) se transfirió con una pipeta a otro tubo y las actividades de cada tubo fueron medidas en un calibrador de dosis.

7.3.3.1.1 Sistema cromatográfico para ^{99m}Tc -Glucosheptonato

SOPORTE	SOLVENTE	Rfo	Rf1
ITLC-SG	NaCl	TcO ₂ , TcSn ₂ , Tc oxidado, coloides o hidróxidos.	^{99m}Tc - Gluco TcO ₄ ⁻ libre
ITLC-SG	Acetona	^{99m}Tc -Gluco, Tc oxidado, coloides o hidróxidos.	TcO ₄ ⁻

Los resultados se calcularon de la siguiente forma:

$$\% \text{ PR} = \frac{\text{Ar}}{\text{Ar} + \text{Ar}_1} \times 100$$

Ar: Actividad neta (considerar el Background del cromatograma) del Radiofármaco.

Ar₁: Actividad neta (considerar el Background del cromatograma) de la impureza (49).

7.3.4 Pureza Radioquímica para HM-PAO

A un tubo de ensayo que contenía 1 ml de cloroformo y 1 ml de solución salina 0.9%, se añadió 100 µl de ^{99m}Tc -HMPAO. Esta mezcla se tapó y agitó aproximadamente un minuto en agitador tipo Vortex, se dejó reposar por un minuto para permitir la separación de fases.

La capa superior o fase acuosa (solución salina 0.9%) se transfirió con una pipeta a otro tubo y las actividades de cada tubo fueron medidas en un calibrador de dosis.

La fracción lipofílica del ^{99m}Tc -HMPAO queda en la fase clorofórmica (fase orgánica). Mientras que el ^{99m}Tc libre, el ^{99m}Tc reducido-hidrolizado y la fracción hidrofílica del ^{99m}Tc -HMPAO quedan en la fase acuosa (50).

Fase orgánica

$$\% \text{ } ^{99m}\text{Tc-d,1-HMPAO} = \frac{\text{-----}}{\text{fase orgánica} + \text{fase acuosa}} \times 100$$

7.3.5 Control de Calidad de los leucocitos marcados con ^{99m}Tc

7.3.5.1 Porcentaje de marcación:

Act. en células

$$\% \text{ } ^{99m}\text{Tc-leucocitos: } \frac{\text{-----}}{\text{Act. en células} + \text{Act. en sobrenadante}} \quad (8)$$

7.3.5.2 Recuento de Leucocitos:

Este recuento muestra el número de leucocitos que hay en un milímetro cúbico de sangre. El método de la resistencia eléctrica del Coulter Counter fue utilizado para el recuento leucocitario y se fundamenta en el hecho que las células son malas conductoras de la electricidad, al contrario de lo que sucede con los líquidos, tales como la solución fisiológica, que conducen bien la corriente eléctrica (52).

7.3.5.3 Determinación de la viabilidad con Azul de Tripán:

En un pozo de la placa escavada se depositó 20 μl de azul de tripán, 50 μl de suspensión celular y 130 μl de solución salina 0.9% y se agitó suavemente para homogenizar. Se dejó reposar a temperatura ambiente. Se depositó una muestra en la cámara de

Neubauer y se observó al microscopio. Se contó las células vivas y muertas (aquellas que se tiñen de azul).

No. de células vivas

Porcentaje de viabilidad: _____ X 100

No. total de células

Menos del 4% de los leucocitos debieron estar coloreados, lo que indica que el 96% restantes son viables (53).

7.3.5.4 Porcentaje de Recuperación Leucocitaria:

Este control nos indicó la cantidad de leucocitos presentes en la muestra final y para este control se realizó el mismo proceso que para el recuento leucocitario. Se recomienda que su valor no sea menor del 70% (44).

7.3.5.5 Control de Esterilidad

Para descartar contaminación en el proceso, la muestra se colocó en caldo BHI en una proporción de 1:5 e incubó a 37°C por 7 días. La turbidez o formación de algún coágulo indicó la presencia de microorganismos en la muestra (54).

7.3.5.6 Frote Sanguíneo

Se realizó una tinción de las muestras con Wright al final de cada marcación para comparar la integridad de la membrana celular.

7.4 Análisis Estadístico

A los resultados obtenidos en el control del porcentaje de marcación se les realizó la prueba de la T-pareada. Con una $p=0.05$ para evidenciar si hubo o no diferencia significativa entre ambas marcaciones.

En los controles de viabilidad y recuperación leucocitaria los resultados obtenidos fueron analizados por medio de una T-pareada, $p=0.05$ para evidenciar la diferencia significativa entre ambas marcaciones y también se les realizó la prueba de Hipótesis Binomial, $p=0.5$.

8. RESULTADOS

8.1 PUREZA RADIOQUIMICA DE LOS RADIOFARMACOS

La pureza radioquímica del GH se determinó por el método de cromatografía en capa fina (ITLC-SG) y se utilizó como solventes el NaCl y Acetona. Para medir la radiación se utilizó un contador de centelleo sólido de yoduro de sodio (NaI).

Los resultados de la pureza radioquímica son los siguientes:

RADIOFARMACO	NaCl	ACETONA
GLUCOHEPTONATO	93.20%	98.66%

La pureza radioquímica del HMPAO se determinó por el método de extracción por solventes, para ello se utilizó solución salina y cloroformo, posteriormente se contó las fracciones por separado en el calibrador de dosis Isotope Deluxe II.

Los resultados de la pureza radioquímica son los siguientes:

RADIOFARMACO	CLOROFORMO/SALINA
HEXAMETILPROPILENAMINOXIMA	MEDIA: 90.70%

8.2 CONTROL DE CALIDAD DE LOS LEUCOCITOS MARCADOS

Se trabajó con 10 pacientes a los cuales se les realizó hematología completa (tabla no. 1) y se determinó que presentaban un recuento leucocitario normal (5,000-10,000 leucocitos/mm³).

Se evaluó el porcentaje de marcación para el GH y el HMPAO, y se obtuvo un porcentaje de marcación de leucocitos de 81.27% para el HMPAO y para el GH un 80.03% (tabla no. 2) y se determinó que no hay diferencia significativa ($p= 0.6784$).

Se encontró que existe diferencia significativa entre ambos radiofármacos en la viabilidad leucocitaria ($p= 0.0019$), se obtuvo para el HMPAO un porcentaje de viabilidad de 97.82%, el mejor, mientras que para el GH se obtuvo un porcentaje de 94.82%. En la prueba de Hipótesis Binomial, el HMPAO cumple con el requisito de viabilidad ($p=0.011$) mientras que el GH no cumple con el requisito de viabilidad ($p=0.623$) (tabla no. 3).

Se observa diferencia significativa entre los dos radiofármacos en cuanto a recuperación leucocitaria ($p= 0.0006$), el HMPAO obtuvo un mayor porcentaje con 85.10% en comparación con el GH que presentaba un 78.97% de porcentaje. (tabla no. 4). Sin embargo, el aspecto de mayor importancia es que ambas técnicas de marcación cumplen con el mínimo recomendado GH ($p= 0.001$) y HMPAO ($p= 0.001$) y presentan un porcentaje de recuperación mayor del 70% recomendado para lograr una marcación de leucocitos adecuada. Se realizó una tinción del frote para cada técnica de marcación, se observó intacta la membrana de los leucocitos con HMPAO, mientras que con GH la membrana de los leucocitos estaba parcialmente destruidos en la mayoría de las células.

Por último se realizó el control microbiológico con caldo BHI y se incubó durante 7 días a 37°C. Ninguna de las muestras de cada marcación presentó contaminación.

9.0 DISCUSION DE RESULTADOS

La pureza radioquímica de ambos radiofármacos muestra que son de alta calidad, ya que el HMPAO presentó un 90.70% lo que superó el 85.0%, mientras que el GH presentó 98.65% que superó el 90.0%, ambos límites establecidos por el normativo de la Sociedad Latinoamericana de Biología y Medicina Nuclear (ALASBIMN).

(gráfica no. 1).

No existe diferencia significativa en el porcentaje de marcación de leucocitos entre en HMPAO con 81.27 ± 4.13 , comparado con el GH con 80.03 ± 7.09 , y se confirmó al efectuar la prueba de T-pareada ($p= 0.6784$) (gráfica no. 2 y no. 3).

En la marcación de leucocitos con GH, los resultados tienen mayor variación comparado con HMPAO, lo que indica que en la anterior hay menor precisión, con mayor probabilidad de cometer errores durante el procedimiento.

Al realizar el control de viabilidad leucocitaria se analizaron varias muestras durante el proceso de marcación, los resultados muestran para el HMPAO un porcentaje de $97.72\% \pm 1.65$ realizado al final de la marcación y para el GH un porcentaje de 96.58% después de realizar el paso de hemólisis hipotónica y $94.82\% \pm 1.95$ al final de la marcación, el control para ambos fue del 99.6% . Al realizar la prueba de T-pareada se observa que existe diferencia significativa en la viabilidad leucocitaria entre ambas técnicas de marcación ($p= 0.0019$). La prueba de la Hipótesis Binomial indica que la marcación con HMPAO cumple con el requisito de viabilidad ($p=0.011$) mientras que el GH no cumple con el

requisito de viabilidad leucocitaria ($p=0.623$) (gráficas no. 4 y no. 5).

Es necesario efectuar la hemólisis hipotónica para reducir la contaminación eritrocítica (y así evitar que el ^{99m}Tc -GH penetre a los eritrocitos, lo que provoca la disminución de radiofármaco disponible para los leucocitos), esto se logra al efectuar un cambio brusco de la presión osmótica y con conocimiento que la membrana de los eritrocitos es menos resistente que la de los leucocitos. El bajo porcentaje de viabilidad leucocitaria que muestra el GH puede deberse a que no se tuvo el suficiente cuidado en la manipulación de los leucocitos en este proceso de hemólisis hipotónica, lo que dañó considerablemente la membrana celular de muchos leucocitos.

En la marcación con el HMPAO la viabilidad leucocitaria se mantiene alta, debido a que no se realiza un proceso de hemólisis hipotónica, ya que el HMPAO tiene mayor afinidad por los leucocitos que por los demás elementos sanguíneos.

Al realizar la recuperación leucocitaria el HMPAO presenta un $85.10\% \pm 1.90$ mientras que con GH es de $78.97\% \pm 3.96$, al realizar la prueba de T-pareada, podemos evidenciar que hay diferencia significativa entre ambas marcaciones ($p=0.0006$). Sin embargo al realizar la prueba de la Hipótesis Binomial, se observa que ambos radiofármacos cumplen con los requisitos de recuperación leucocitaria, HMPAO ($p=0.001$) y GH ($p=0.001$). (gráfica no. 6 y no. 7).

Aunque el GH presenta una menor recuperación leucocitaria, lo más importante a analizar es que ambos radiofármacos cumplen con lo expuesto en la literatura; que para una marcación de leucocitos adecuada, el porcentaje de recuperación leucocitaria debe ser superior al 70%. Esto debido a que al reinyectarlos se necesitan suficientes leucocitos marcados presentes en el lugar del proceso infeccioso para establecer el diagnóstico.

Se realizó una tinción de las muestras con Wright al final de la marcación y observó la integridad de las membranas en la marcación con HMPAO y con GH, notando claramente que con este último, muchos de los leucocitos se encontraban destruidos. Este resultado puede deberse a que durante el proceso de hemólisis hipotónica a que son sometidos los eritrocitos, los leucocitos quedan sensibilizados, disminuye su tiempo de vida, lo que da por resultado la destrucción de éstos en menor tiempo que los leucocitos marcados con HMPAO.

El control microbiológico no presentó contaminación, esto indica que durante el proceso se cumplió con la asepsia necesaria.

10.0 CONCLUSIONES

- 10.1 Ambas técnicas de marcación son estables, ya que presentan altos porcentajes de marcación.
- 10.2 Al utilizar ^{99m}Tc -Glucoheptonato hay mayor posibilidad de dañar los leucocitos durante su manipulación, lo que disminuye significativamente la viabilidad leucocitaria.
- 10.3 Ambas marcaciones presentan recuperaciones leucocitarias superiores al mínimo recomendado, lo que indica que hay suficientes leucocitos para localizarse en el sitio de infección.
- 10.4 La marcación de leucocitos con ^{99m}Tc -HMPAO es la más adecuada para ser utilizada en pacientes que presenten cuadros de procesos infecciosos localizados.
- 10.5 La inestabilidad y alto costo del HMPAO son factores que limitan el uso de éste radiofármaco, debido al presupuesto del Departamento de Medicina Nuclear del Hospital General San Juan de Dios.

11.0 RECOMENDACIONES

- 11.1 Al marcar leucocitos con ^{99m}Tc -Glucoheptonato se debe tener cuidado de no dañarlos durante su manipulación, especialmente durante la hemólisis.
- 11.2 Para evitar la inestabilidad del HMPAO, se debe utilizar ^{99m}Tc recién eluido y de generadores nuevos.
- 11.3 Para aumentar el porcentaje de viabilidad en la marcación con GH estudiar la posibilidad de eliminar el paso de la hemólisis hipotónica de eritrocitos contaminantes.
- 11.4 Instaurar la marcación de leucocitos con ^{99m}Tc -HMPAO en el Departamento de Medicina Nuclear del Hospital General San Juan de Dios, para ser utilizada en pacientes que presenten cuadros de procesos infecciosos localizados.

12. REFERENCIAS

- 12.1 Domenech T, Quinquer JS. Imágenes en Medicina Nuclear, Diagnóstico Morfológico y Funcional. España: Internacional de Ediciones y Publicaciones S.A. 1990. 179pp (p 6-7).
- 12.2 De Suárez AHF, Mitta AEA. Métodos de preparación de radiofármacos del Tc-99m e In-113m en hospitales. Acta Bio Clin Latin. 1992;25:335-338.
- 12.3 Srivastava SC, Straub RF, Modesto RR. A stannous glucoheptonate kit method for ^{99m}Tc labeling of leukocytes and platelets. J Labeled Compounds Radiopharm. 1989;16:38-40.
- 12.4 McAaffe JG, Subramanian G, Gagne G. Technique of leukocyte harvesting and labeling. Sem Nucl Med. 1984; 15:83-103.
- 12.5 Kelbaek H, Fogh J. Technetium-99m of polymorphonuclear leukocytes: Preparation with two different stannous agents. J Nucl Med. 1985;26:68-71.
- 12.6 Schroth HJ, Oberhausen E, Berberich R. Cell Labelling with colloidal substances in whole blood. Eur J Nucl Med. 1981;6:469-472.
- 12.7 Hanna RW, Lomas FE. Identification of factors affecting technetium-99m leucocyte labelling by phagocytic engulfment and development of an optimal technique. Eur J Nucl Med. 1986;12:159-162.

- 12.8 Gutierrez AL, Freire DY. Comparación de la marcación de leucocitos con coloides de Tc-99m en sangre completa y capa leucocitaria como un método de radioinmudiagnóstico. Guatemala, USAC, (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Quimicas y Farmacia) 1,991. 50p.
- 12.9 Linhart CN, et al. "In Vivo" Kinetics of technetium-99m labeled leukocytes in dogs and the effects of abscess. Biomedicine. 1980;32:133-139.
- 12.10 Uchida T, et al. Use of technetium-99m as radioactive label to study migratory patterns of leukocytes. J Nucl Med. 1979;20:1197-1200.
- 12.11 Linhart CN, et al. ^{99m}Tc labelled human leukocytes. Acta Haematology. 1980;63:71-80.
- 12.12 Bagwe BA, Sharma SM. One acumulation of ^{99m}Tc-labelled leukocytes. J Nucl Med. 1975;17:313-317.
- 12.13 Glenn HJ, et al. Leukocyte labeling with technetium-99m. Inter J Nucl Med Biol. 1976;3:9-15.
- 12.14 Uchida T, Kariyone I. Organ distribution of the ^{99m}Tc labelled white cells. Act Haemat Jap. 1973;36:78-81.
- 12.15 Uchida T, Vincent P. In vitro study of leukocytes labeling with technetium-99m. J Nucl Med. 1976;117:730-736.
- 12.16 Froelich JW, Swanson D. Imaging of inflamatory processes with labeled leukocytes. Blood. 1963;22:718-732.

- 12.17 English DK, Andersen BR. Labeling of phagocytes from human blood with ^{99m}Tc -sulphur colloid. *J Nucl Med.* 1975;16:5-10.
- 12.18 Marcus CS, Kuperus JH, Butler JA. Phagocytic labeling of leukocytes with ^{99m}Tc -albumin colloid for nuclear imaging. *Nucl Med Biol.* 1988;15:673-682.
- 12.19 Sundrehagen E. A new technique for formation of ^{99m}Tc labelled blood leukocytes and platelets. *Appl Radiat Isot.* 1984;35:356-366.
- 12.20 Straub FR, et al. Stannous Glucoheptonate: an effective tinning agent for ^{99m}Tc labelling of blood cells. Presented at the 33rd Annual Meeting Society of Nuclear Medicine. Washington D.C. 1986; June: 22-25.
- 12.21 Srivastava SC, et al. Optimization and evaluation of the in vivo method for labeling RBC in whole blood with ^{99m}Tc . *J Nucl Med.* 1984;25:128.
- 12.22 Srivastava SC, Straub RF, Richards P. Mechanistic aspects of the technetium-99m tin RBC labeling reactions. *J Label Compd Radiopharm.* 1984;21:1055.
- 12.23 Gil MC, Straub RF, Srivastava SC. A new kit method for efficient labeling of leukocytes and platelets with Tc-^{99m} . *J Nucl Med.* 1986;27:946.
- 12.24 Orellana P, et al. Leucocitos ^{99m}Tc -glucoheptonato en la evaluación de enfermedad inflamatoria crónica intestinal (EICI). Informe preliminar. *Rev Esp Med Nucl.* 1992;11:55.

- 12.25 Gil MC, et al. Marcaciones celulares con ^{99m}Tc : Experiencia Chileno-Argentina. Rev Esp Med Nucl. 1992;11:101.
- 12.26 Moragas M, et al. Leucocitos ^{99m}Tc -HMPAO: Técnica de marcaje, control de calidad y resultados preliminares in vivo. Rev Esp Med Nucl. 1989;8:9-18.
- 12.27 Lomeña F. Leucocitos marcados en la detección de lesiones infecciosas. Rev Esp Med Nucl. 1989;8:19-32.
- 12.28 Hung JC, et al. Kinetic Analysis of technetium-99m d,l HMPAO Decomposition in aqueous media. J Nucl Med. 1988;29:1568-1576.
- 12.29 Srivastava SC, Straub RF. Blood cell labeling with ^{99m}Tc : Progress and perspectives. Sem Nucl Med. 1990;20:41-45.
- 12.30 Vanlic NR, et al. Labeling of leukocytes with ^{99m}Tc -HMPAO for scintigraphy of Inflammatory lesions and abscess. Nucl Med Biol. 1992;19:25-26.
- 12.31 Vaz R, et al. Modificaciones introducidas en la marcación de leucocitos con ^{99m}Tc -HMPAO para detecciones de focos infecciones. Rev Esp Med Nucl. 1992;11:101.
- 12.32 Huguet M, et al. Afinidad del ^{99m}Tc -HMPAO por los elementos celulares de la sangre (ECS). Rev Esp Med Nucl. 1992;11:60.
- 12.33 Roddie ME, et al. Inflammation imaging with ^{99m}Tc -HMPAO labeled leukocytes. Radiology. 1988;166:767-772.
- 12.34 Rezende MEX, Moraes IW, Rockmann L. Estabilizacáo do ^{99m}Tc -HMPAO. Rev Esp Med Nucl. 1992;11:128.

- 12.35 Rockmann TMB, Moraes IW, Coelho JC. Pureza Radioquímica do ^{99m}Tc -HMPAO. Rev Esp Med Nucl. 1992;11:128.
- 12.36 Neirinckx RD, et al. «Technetium-99m d,l HMPAO: A new radiopharmaceutical for spect imaging of regional cerebral blood perfusion». J Nucl Med. 1987;28:191-202.
- 12.37 McAfee JG, Thakur ML. Survey of radioactive agents for in vitro labeling of phagocytic leucocytes. I soluble agents. J Nucl Med. 1976; 17:480-487.
- 12.38 Olea E, et al. Utilidad de los leucocitos marcados con Tc-99m glucoheptonato en la detección de procesos abdominales. Nucleotécnica. 1993;24:88.
- 12.39 Insall RL, et al. New isotopic technique for detecting posthetic arterial graft infection: ^{99m}Tc -hexametazine labelled leucocyte imaging. Br J Surg. 1990;77:1295-1298.
- 12.40 Vorne M, et al. ^{99m}Tc -leucocyte scintigraphy in prosthetic vascular graft infections. Nucl Med. 1989;28:95-99.
- 12.41 Scholmerich J, et al. Scintigraphy assessment of bowel involvement and disease activity in Crohn's Disease using technetium 99m-hexamethylpropylene-amine oxine as leucocyte label. Gastroenterology 1988;95:1287-1293.
- 12.42 Weldon MJ, et al. Technetium HMPAO white cell scanning can distinguish between Crohn's and ulcerative colitis. Gut. 1992; Suppl.32:2,567.

- 12.43 Weldon MJ, et al. Comparison of Tc-99m HMPAO white cell scanning with barium cardiology in the assessment of small bowel Crohn's disease. Gut. 1992.Suppl.33:2,548.
- 12.44 Moragas M, et al. Gammagrafía con ^{99m}Tc -HMPAO leucocitos y ^{99m}Tc -MDP en el diagnóstico de infección ósea. Rev Esp Med Nucl. 1990;9:40.
- 12.45 Moragas M, et al. ^{99m}Tc -HMPAO leucocyte scintigraphy in the diagnosis of bone infection. Nucl Med Comm. 1991;12:417-427.
- 12.46 Pratts E, et al. Diagnóstico de prótesis vascular mediante leucocitos-HMPAO- ^{99m}Tc . Rev Esp Med Nucl. 1992;11:56.
- 12.47 Banzo J, et al. La gammagrafía con leucocitos HMPAO- ^{99m}Tc en el diagnóstico de prótesis vasculares infectadas. Rev Esp Med Nucl. 1990;9:49.
- 12.48 Herrera AM, et al. Experiencia inicial en el marcaje de linfocitos autologos con ^{99m}Tc -d,l-HMPAO en el diagnóstico de rechazo de trasplante de órganos y otras aplicaciones clínicas. Rev Esp Med Nucl. 1992;11:100-101.
- 12.49 Portillo MC, Rodríguez SR. Comparación de dos métodos de producción de radiofármacos y evaluación de su calidad. Guatemala, USAC, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1987. 111 p.
- 12.50 Ramamoorthy N, Pillai MRA, Troutner DE. Studies on some aspects of the instability of Tc-hexamethylpropylene amineoxime (Tc-HMPAO). Nucl Med Biol. 1993;20:307-310.

- 12.51 Portillo MC. Memorias del Curso de Radiofarmacia Hospitalaria, 8 al 26 de Noviembre de 1993, Guatemala.
- 12.52 Vives JL, Aguilar JL. Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología. Ediciones Científicas y Técnicas S.A. Masson - Salvat Ediciones. 1984.
- 12.53 Gil MC. Prácticas de Laboratorio, Marcación de Células Sanguíneas. Comisión Chilena de Energía Nuclear. Santiago de Chile, 1990.
- 12.54 Hanna R, et al. Radiochemistry and biostability of autologous leukocyte labelled with: ^{99m}Tc -stannous colloid in whole blood. *J Nucl Med.* 1984;9:216-219.
- 12.55 Robbins SL, Ramzi SC, Vinay K. Patología Estructural y Funcional. 4a ed España: Edit. Interamericana. Vols.2, vol 1, 1987 (p 35-69).
- 12.56 Platt WL. Atlas de Hematología en color. 2a ed. López M, trad. España: Jims S.A. 1982 (p.2-87).
- 12.57 Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest.* 1986;21:7-89.
- 12.58 Boyum A. Separation of blood leukocytes, granulocytes and lymphocytes. *Tissue Antigens.* 1974;4:269-274.
- 12.59 Goedemans WT, Hardeman HR. Clumping of labeled leukocyte suspension. A simple measure for Avoiding it. *Nucl Med Biol.* 1988;15:339-342.
- 12.60 Roy AJ, Franklin A, Simmons WB. A method for separation of granulocytes from normal human blood using hidroxyethylstarch. *Prepar Biochem.* 1971;1:197-203.

- 12.61 Scott JL, Davidson JG, Marino J. Leucocyte labeling with ^{51}Cr Chromium III. The kinetics of normal lymphocytes. Blood. 1972;40:276-281.
- 12.62 Gillespie GV, Barth RF, Gobutov A. Survival of Radiochromium labeled leucocytes. Blood. 1963;22:718-732.
- 12.63 Angilery LJ, et al. Gallium-67. Accumulation by tumors: Role of cell membrane permeability. J Nucl Med. 1988;29:663-668.
- 12.64 Tsam MF. Studies on Gallium. Accumulation in Inflammatory lesions III. Role of polymorphonuclear leukocytes and bacteria. J Nucl Med. 1978;19:492-495.
- 12.65 Gelrud LG, Arseneau JC, Milder MS. The kinetics of ^{67}Ga Gallium incorporation into inflammatory lesions: experimental and clinical studies. J Nucl Med. 1974;83:489-495.
- 12.66 Cloutier RJ, Watson EE, Mayes RL. Summary of current radiation dose estimate to humans from ^{68}Ga , ^{67}Ga , ^{69}Ga and ^{72}Ga -citrate. MIRD dose estimate. J Nucl Med. 1973;14:753-756.
- 12.67 Steffel FG, Rao SA. A rapid and simple methods with Indium-111-oxime. J Nucl Technol. 1987;15:61-65.
- 12.68 Fawwaz RA, et al. Biodistribution of radiolabeled lymphocytes. Radiology. 1985;154:483-486.
- 12.69 Burke JET, Roath S, Ackery D. The comparison of 8-hydroxyquinoline, tropolone and acetylacetonone as mediators in the labeling of polymorphonuclear leucocytes

- with Indium-111. A functional study. Eur J Nucl Med. 1982;7:73-76.
- 12.70 Becker W, et al. The-phase white blood cell scan: Diagnostic validity in abdominal inflammatory disease. J Nucl Med. 1986;27:1109-1115.
- 12.71 Peters AM, Saverymottu S, Reavy MJ. Imaging of inflammation with Indium-111-tropolonate labelled leucocytes. J Nucl Med. 1983;24:39-44.
- 12.72 Thakur ML, Barry MJ. Preparation and evaluation of a new-111-Indium agent for efficient labeling of human platelets in plasma. Fourth International Symposium on Radiopharmaceutical Chemistry, August 23-27, 1987.

13.0 ANEXOS

ANEXO 1

ACD:	ácido-citrato-dextrosa
Agujas 19½ G:	agujas de 19½ gauge
BHI:	infusión cerebro-corazón
⁵¹ Cr:	Cromo-51
DL50:	Dosis letal media
G:	gravidades
⁶⁷ Ga:	Galio-67
GH:	Glucuheptonato de Calcio
HESPAN:	Hidroxietyl almidón
HMPAO:	Hexametilpropilenaminoxima
¹¹¹ In:	Indio-111
ITLC-SG:	Instant thin layer chromatography
KeV:	Kiloelectronvolt
MBq:	Megabequerelios
mCi:	Millicuries
MDF:	Sal cálcica trisódica del ácido metilendifosfónico
PRL:	Plasma rico en Leucocitos
PRLP:	Plasma rico en Leucocitos y Plaquetas
rpm:	revoluciones por minuto
^{99m} Tc:	Tecnecio-99 metaestable
ug:	microgramos

ANEXO 2

1. Concepto de inflamación

La inflamación purulenta o supurada se caracteriza por la producción de gran cantidad de pus o exudado purulento. Ciertos microorganismos (por ejemplo, los estafilococos) producen este tipo de supuración localizada y por ello se denominan bacterias piógenas (productoras de pus). Un ejemplo frecuente de inflamación supurada es la apendicitis aguda (1).

Un absceso es otro ejemplo de inflamación supurada localizada. Los abscesos son acúmulos localizados de pus producidos por supuración limitada en un tejido, órgano o espacio cerrado. Se producen por la implantación profunda de las bacterias piógenas en los tejidos. El absceso comienza como un acúmulo local de leucocitos en un espacio creado por la necrosis cualitativa de las células originales del tejido (1).

2. Características de la inflamación

El acúmulo de leucocitos es el rasgo más importante de la reacción inflamatoria. Los leucocitos fagocitan y degradan las bacterias, inmunocomplejos y restos celulares necróticos y sus enzimas lisosómicas contribuyen de otras formas en la respuesta inflamatoria. El número normal de leucocitos en sangre periférica es de 5,000 a 10,000 células/mm³ (1, 2).

El recuento leucocitario suele ascender en procesos infecciosos de 15,000 a 20,000 células/mm³, pero a veces puede llegar a niveles extremadamente altos de 40,000 a 100,000 células/mm³. Además el tipo celular presente en la respuesta

inflamatoria varía según la edad de la lesión y el tipo de estímulo. En la mayoría de los casos de inflamación aguda predominan los neutrófilos las primeras 6 a 24 horas, esto debido a: 1) Los neutrófilos tienen una vida media entre 24-48 horas mientras los monocitos sobreviven más tiempo en los tejidos, 2) La migración de los monocitos se mantiene después de cesada la de los neutrófilos y 3) Los factores quimiotácticos para los neutrófilos y monocitos son activados en momentos diferentes de la reacción. Pero existen tres principales excepciones a este patrón de exudación leucocitaria: En las infecciones producidas por pseudomonas predominan los neutrófilos durante 2 a 4 días; en las infecciones virales los linfocitos son las primeras células en llegar y en algunas reacciones de hipersensibilidad el principal tipo celular son los eosinófilos (1).

La quimiotaxis se define como la migración unidireccional de los glóbulos blancos hacia una atracción o simplemente la locomoción orientada según un gradiente químico. Entre los agentes quimiotácticos están: 1) productos bacterianos, 2) componentes del sistema del complemento y 3) productos de la vía de la lipooxigenasa del metabolismo del ácido araquidónico. Es también importante la presencia de receptores específicos para los agentes quimiotácticos en la membrana celular de los leucocitos, por eso la mayoría de microorganismos son reconocidos debido a que están revestidos de factores séricos denominados opsoninas (1).

3. Obtención del concentrado de leucocitos

Debido a que muchos agentes radioactivos para marcar células no son selectivos, generalmente es necesaria la separación de los leucocitos de los demás elementos sanguíneos y también es necesario conservar su viabilidad. En las técnicas de separación debe evitarse al máximo la contaminación eritrocitaria por su elevada concentración en relación al número de leucocitos (1,000:1), en cambio las plaquetas se separan fácilmente debido al menor tamaño y densidad que presentan, aunque estas pueden formar pequeños agregados que pueden estar presentes en el concentrado leucocitario final. La presencia de pequeñas cantidades de eritrocitos y plaquetas no es un inconveniente serio en las exploraciones de imagen. Por otro lado, el mayor diámetro de los leucocitos, en comparación con las otras células, hace que la probabilidad de que un trazador lipofílico atraviese su membrana sea mucho mayor en este tipo de células, no así en el caso de sustancias hidrofílicas con mayor afinidad por los eritrocitos y plaquetas (4, 51).

Existen dos tipos de separaciones de leucocitos de los demás elementos sanguíneos y estas son:

a. Sedimentación por gravedad

La sedimentación es la técnica habitual para la obtención de una población mínima de las células. La sangre se extrae con un anticoagulante. Los más utilizados son:

- Heparina: 100 unidades / 50 cc de sangre
- A C D: 5 cc / 40 cc de sangre

Con heparina se obtienen menores agregados plaquetarios, sin embargo, con el ACD los leucocitos se adhieren menos a las paredes del material plástico utilizado y presentan menor tendencia a agregarse entre ellos. La jeringa con el anticoagulante y la sangre convenientemente mezclados, son puestos en posición vertical, con la aguja hacia arriba y se deja que los eritrocitos sedimenten. De esta forma, la separación de la capa hemática dura entre 60 a 120 minutos, esto depende de la velocidad de sedimentación eritrocítica del paciente (4, 51, 57, 58, 59)

Para acelerar el proceso de sedimentación puede usarse agentes que ayuden a la agregación de los eritrocitos. El agente de mayor elección es el Hidroxietilalmidón (HES) al 6%, una parte de HES por 5-8 partes de sangre. El HES es un reactivo aprobado por la FDA, no está asociado a reacciones alérgicas y se elimina rápido en el organismo después de la inyección IV, otro agente que se utiliza es la Metilcelulosa (MC) al 2% en solución salina: Una parte de MC por 10 partes de sangre.

Ya definida la capa hemática, el sobrenadante, plasma rico en leucocitos (PRL), se separa fácilmente con un tubo flexible hacia un tubo tipo FALCON de polipropileno. Este contendrá alrededor de un 70% de los leucocitos iniciales presentes en la sangre extraída, así como la mayor parte de las plaquetas y de 1 a 2 hematíes por leucocitos. Para disminuir la contaminación hemática del PRL, algunos investigadores lisan los eritrocitos con solución salina hipotónica o con cloruro amónico. Varios estudios indican sin embargo que los granulocitos humanos son sensibles a

variaciones bruscas de la osmolaridad, por lo que puede verse afectada su viabilidad cuando se exponen más de 30 segundos a soluciones hipotónicas. Thakur y cols. encontraron que al utilizar leucocitos marcados a los que se les sometió a shock hipotónico, había disminución de la vida media de los mismos, así como aumento de la captación hepática. Estos datos indican que las células dañadas son extraídas por el sistema fagocítico mononuclear. Al ser las plaquetas pequeñas y de menor densidad que los leucocitos, es relativamente fácil reducir su contaminación mediante centrifugación: Las plaquetas se mantienen en suspensión, mientras que los leucocitos se depositan en el fondo del tubo (4, 51, 58, 60).

b. Centrifugación simple

La centrifugación simple de la sangre con el anticoagulante a bajas revoluciones produce una capa "blanca" de leucocitos por encima de los hematíes, sin embargo aunque rápido, este método de obtener un concentrado leucocitario proporciona bajos rendimientos, ya que solo un tercio del total de leucocitos es recuperado y la contaminación eritrocítica es alta. Una técnica que combine simultáneamente la sedimentación eritrocítica con la centrifugación simple produce altos porcentajes de recuperación leucocitaria. Así McAffe y cols. al agregar Metilcelulosa al 1% en solución-salina a la sangre anticoagulada y posterior centrifugación a 20G durante 14 minutos, encontraron un rendimiento de leucocitos de casi el 100%. Sin embargo con esta misma metodología se encuentran rendimientos inferiores y con mayor contaminación eritrocítica a la encontrada

usando HES. Para la obtención de diferentes poblaciones leucocitarias, se utilizan técnicas más complejas (4, 51, 60).

4. Radionúclidos para marcación de leucocitos

Hay gran cantidad de radionúclidos usados para marcar leucocitos, sin embargo pocos llenan los requisitos necesarios para lograr una marcación efectiva. De los utilizados existe gran cantidad de trabajos, estudios e investigaciones sobre sus diferentes propiedades.

a. Marcación con ^{51}Cr

De los primeros radionúclidos usados con éxito para marcar leucocitos esta el ^{51}Cr . Las características in vivo de los linfocitos de células animales han sido estudiadas inicialmente al marcar médula ósea con adenosina, uridina o timidina tritiadas y luego por marcación directa con ^{51}Cr -cromato. Al usar ^{51}Cr en sangre de sujetos normales Scott y colaboradores demostraron una rápida caída inicial y luego una elevación en la recirculación de linfocitos de 5 a 8 horas después de la inyección de los leucocitos. Gillespie, Barth y colaboradores estudiaron la migración de linfocitos periféricos marcados con ^{51}Cr . Pero, debido a las pobres características radiactivas del ^{51}Cr , el largo periodo de semidesintegración (27 días), mayor irradiación al paciente, baja eficiencia de marcación, imágenes de baja resolución y fotones de baja energía inadecuados para la cámara gamma, McAffe y cols., Bagwe y muchos investigadores designan al ^{51}Cr de poca elección para marcación de leucocitos en diagnóstico de Medicina Nuclear (4, 12, 16, 61, 62).

b. Marcación con ^{67}Ga

Desde los años sesenta el ^{67}Ga -citrato es el radionúclido de elección en el rastreo corporal, para la localización de enfermedades inflamatorias. El ^{67}Ga se concentra en lesiones inflamatorias, con una sensibilidad del 92% y especificidad del 89% (16).

Anghileri y colaboradores en base a sus resultados sostienen la hipótesis que el incremento de la permeabilidad de células en tumores es la principal causa de acumulación de ^{67}Ga en lesiones inflamatorias. Gelrud y colaboradores al estudiar la cinética de la acumulación del ^{67}Ga en lesiones inflamatorias concluyen que la localización de éste en áreas de inflamación depende de los granulocitos. De cualquier forma el ^{67}Ga también se acumula en ciertos órganos y por lo tanto, no es totalmente específico para inflamación. Además el ^{67}Ga muestra localización normal en el hígado y es excretado principalmente por la vía del tracto gastrointestinal creando imágenes y problemas de ambiente en la evaluación de procesos inflamatorios localizados en la región abdominal y región pélvica, a esto se añade el hecho que la marcación con ^{67}Ga presenta un bajo rendimiento de marcación (66%) (4, 16, 63, 64, 65, 66).

c. Marcación con ^{111}In

Las 67 horas del periodo de semidesintegración del ^{111}In y la energía de sus fotones gamma (137 Kev, 89% y 247 Kev, 94%) lo hace buen radionúclido para técnicas centellográficas (4).

McAfee y Thakur ensayaron muchas sustancias, unas solubles y otras de naturaleza particular para marcar neutrófilos. Los trazadores en forma de partículas presentaban varios problemas y el mayor de ellos fue la dificultad de separar las partículas radiactivas libres, de aquellas células con las partículas marcadas adheridas en su superficie. Los trazadores solubles podían separarse fácilmente del trazador libre mediante simple centrifugación y posteriormente resuspensión de las células marcadas. De los agentes solubles ensayados, solo los quelatos no polares y solubles en lípidos marcaban a las células con altos porcentajes. Sin embargo, la mayor parte de los quelatos lipofílicos salían de las células antes que la marcación ocurriera (37, 51).

Un quelato con el que no ocurrió este fenómeno y que marcó las células en forma eficiente es el ^{111}In -oxina. La oxina u 8-hidroxiquinoleína es un agente ligante lipofílico bidentado quelante de iones metálicos bi o trivalentes incluyendo al ^{111}In (4, 16, 37, 51).

La oxina forma complejos 3:1 con el ^{111}In un complejo soluble en lípidos que penetra fácilmente las membranas celulares. Dentro de la célula, el complejo se disocia debido a la mayor estabilidad de la unión del ^{111}In con las proteínas citoplasmáticas y la unión intracelular del complejo es estable in vivo más de 24 horas, mientras la oxina difunde fuera de la célula. Para marcar leucocitos eficientemente con ^{111}In -oxina las células deben estar libres de plasma, ya que el ^{111}In puede disociarse de la oxina al

tener una mayor afinidad por la transferrina. Las primeras preparaciones de ^{111}In -oxina contenían etanol en su formulación, este alcohol es tóxico para los leucocitos: Concentraciones tan bajas como 0.125% causan cambios estructurales en los neutrófilos. Así mismo, un 2% de etanol disminuye la incorporación de la timidina a los linfocitos. Actualmente puede evitarse el etanol usando ^{111}In -oxina en tampón TRIS acetato, o bien la sal soluble sulfato de oxina en tampón TRIS y HEPES. El rendimiento conseguido para la marcación de células sanguíneas blancas es de 75 a 80% y la viabilidad de estas células al realizar la prueba del azul de tripán es del 80% al 90% (4, 37, 51, 67, 68, 69, 70).

La tropolona o 2-hidróxi-2,4,6-cicloheptatrieno-1 es un quelato lipofílico que forma complejos 3:1 con el ^{111}In y es un agente que marca células indiscriminadamente. McAffe y cols. encontraron actividad similar al quelato ^{111}In -oxina. Peters y cols. muestran que después de la inyección de las células marcadas, la rápida y transitoria acumulación en el pulmón de neutrófilos marcados es menor con tropolona que con la oxina. Se obtiene además un porcentaje de marcación del 50-80% en una mezcla de leucocitos y la DLco en ratas es de 100 mg por kg de peso (4, 37, 69, 71).

Otro quelato lipofílico para marcar leucocitos con ^{111}In es el 1-óxido-2-mercaptopiridina, inicialmente propuesto por Thakur y Barry para marcación de plaquetas, estable en solución acuosa hasta por una semana, obteniéndose porcentajes del 82% al utilizarlos para marcación de neutrófilos pero su experiencia es poca (4, 72).

ANEXO 3

CONTROL DE CALIDAD DE RADIOFARMACOS

Pureza Radioquímica:

El porcentaje de pureza radioquímica es necesario para evaluar el porcentaje de unión del radiofármaco al radionúclido, el cual debe ser igual o mayor del 90%, al ser el porcentaje menor, el ^{99m}Tc no se une al radiofármaco, este queda en forma libre y se distribuye en otros órganos como tiroides y sistema gastrointestinal, lo que ocasiona deficiencias en las imágenes y dificulta el diagnóstico.

ANEXO 4

Kit de Glucoheptonato AC / SnCl₂ · H₂O

Para 50 frascos.

Reactivos

A (sol) Pesar 1 gramo de GHAc, disolver en 40 ml de agua destilada estéril, calentar si es necesario.

B (sol) Pesar 0.0160 gramos de SnCl₂ · 2H₂O, agregar 1 gota de HCl concentrado y llevar a 10.0 ml con agua destilada y estéril.

Preparación:

1. Medir 1.644 ml de la solución B y agregar a la solución A.
2. Llevar la solución A a 50 ml con agua destilada estéril.
3. Verificar que el pH se encuentre entre 5.3 y 6.
4. Filtrar y fraccionar 1 ml en cada frasco.
5. Liofilizar.

ANEXO 5

COLORANTE AZUL DE TRIPAN

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

TABLA No. 1

VALORES HEMATOLOGICOS NORMALES EN 10 DONADORES

No	G. blancos por mm ³	G. rojos por mm ³	plaquetas por mm ³	Hematocrito %	hemoglobina gr/dl
1	7.700	4.470.000	202.000	37.0	13.5
2	7.500	4.070.000	142.000	35.2	13.0
3	7.000	4.600.000	124.000	43.9	15.0
4	7.000	4.600.000	140.000	45.0	14.0
5	9.700	5.260.000	125.000	44.8	15.6
6	6.500	4.400.000	130.000	39.0	13.0
7	7.000	4.500.000	135.000	42.0	14.0
8	7.000	4.260.000	219.000	38.4	13.2
9	10.000	5.300.000	148.000	40.0	15.0
10	9.500	5.000.000	130.000	39.0	14.3

TABLA No. 2

COMPARACION DE LA EFICIENCIA DE MARCACION DE LEUCOCITOS-^{99m}Tc
CON HMPAO Y GLUCOHEPTONATO

No. Muestra	HMPAO (%)	Glucuheptonato (%)
1	80.0	70.0
2	75.0	87.0
3	81.4	73.0
4	90.9	75.0
5	81.1	75.0
6	81.3	84.5
7	80.0	85.8
8	78.0	85.0
9	81.0	75.0
10	84.0	90.0
	Media: 81.27 ± 4.13	Media: 80.03 ± 7.09

TABLA No. 3
 COMPARACION DE LA VIABILIDAD EN LA MARCACION
 DE LEUCOCITOS-^{99m}Tc CON HMPAO Y GLUCOHEPTONATO

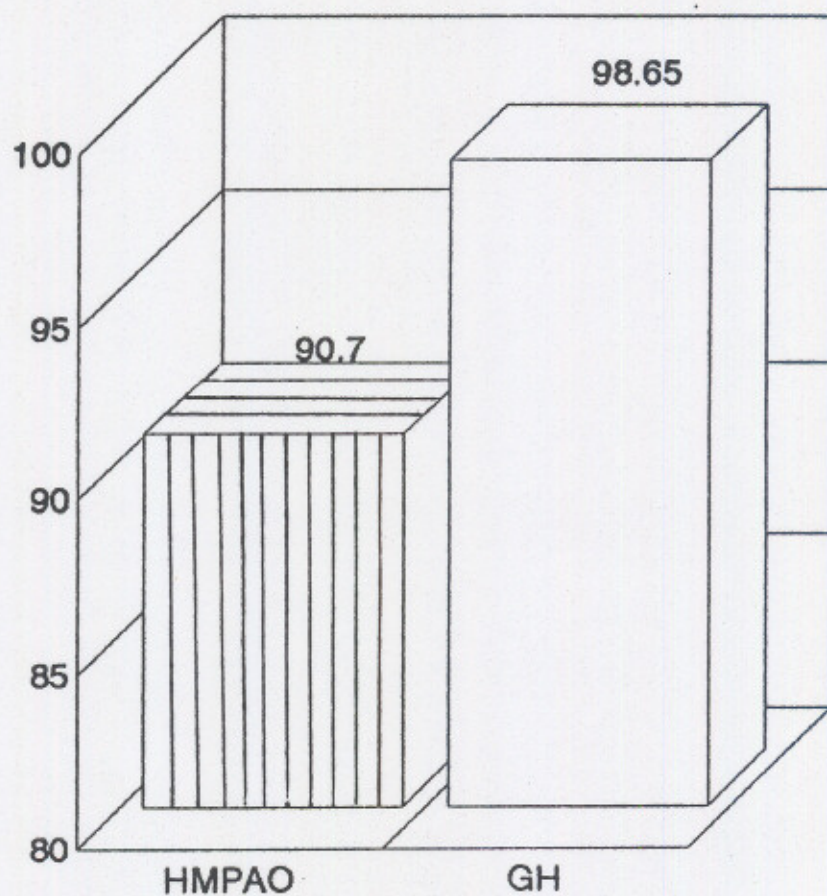
No	CONTROL %	HMPAO %	GH después de la hemólisis %	GH al final de la marcación %
1	100	96.5	96.0	93.0
2	99	96.6	97.2	97.0
3	100	96.4	97.5	96.4
4	100	96.7	96.6	94.8
5	99	98.0	96.0	92.4
6	100	95.2	93.0	92.6
7	99	98.9	96.0	92.7
8	100	99.7	96.6	96.0
9	99	99.8	98.3	96.3
10	100	99.4	98.6	97.0
Media	99.6	97.72 ± 1.65	96.58	94.82 ± 1.95

TABLA No. 4

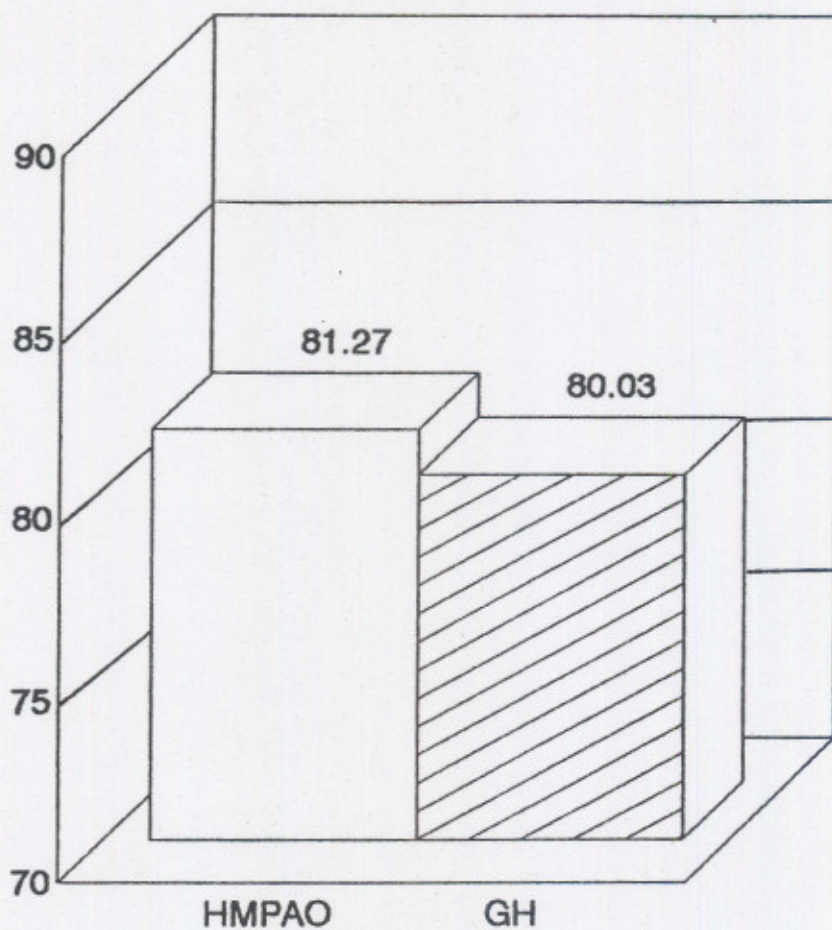
COMPARACION DE LA RECUPERACION LEUCOCITARIA EN LA MARCACION
DE LEUCOCITOS-^{99m}Tc CON HMPAO Y GLUCOHEPTONATO

No. de muestra	HMPAO (%)	Glucuheptonato (%)
1	85.7	77.9
2	84.0	74.6
3	85.7	82.8
4	85.0	80.0
5	82.5	82.5
6	85.3	76.9
7	85.7	78.6
8	84.3	71.4
9	83.3	80.8
10	89.5	84.2
MEDIA:	85.1 ± 1.90	78.97 ± 3.96

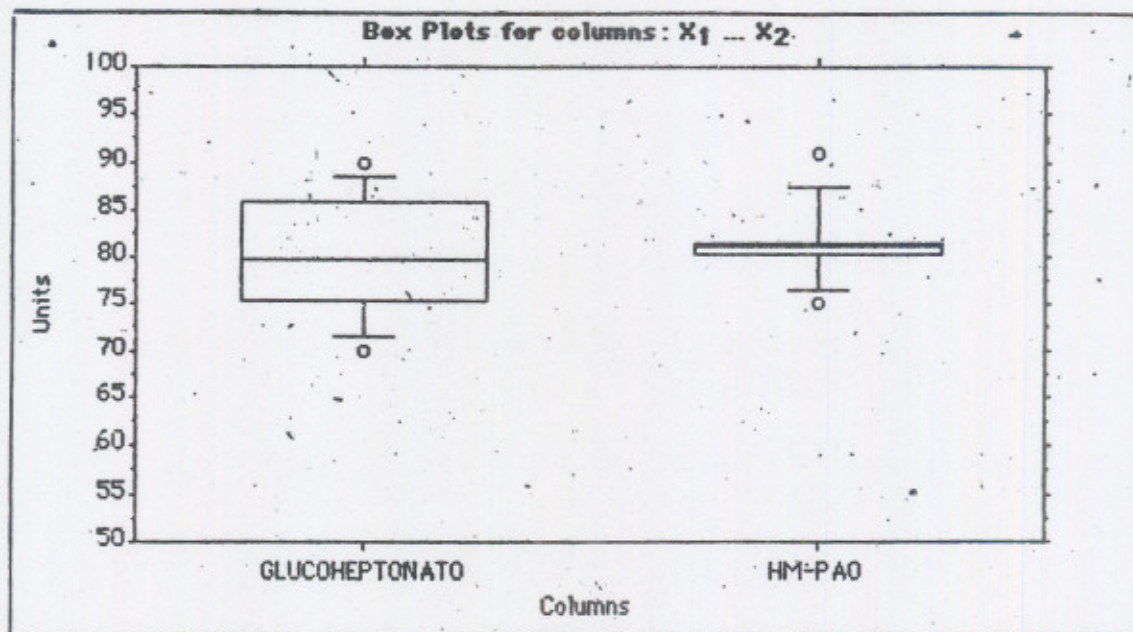
GRAFICA No. 1
PUREZA RADIOQUIMICA
HMPAO Y GLUCOHEPTONATO



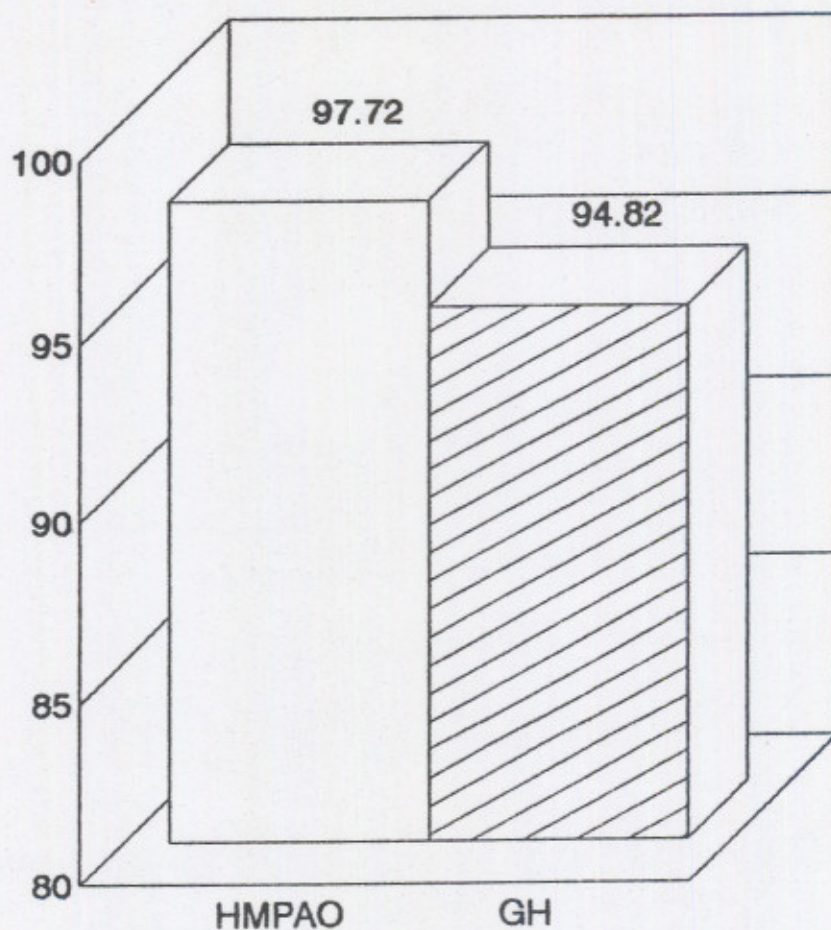
GRAFICA No. 2
PORCENTAJE DE MARCACION
HMPAO Y GLUCOHEPTONATO



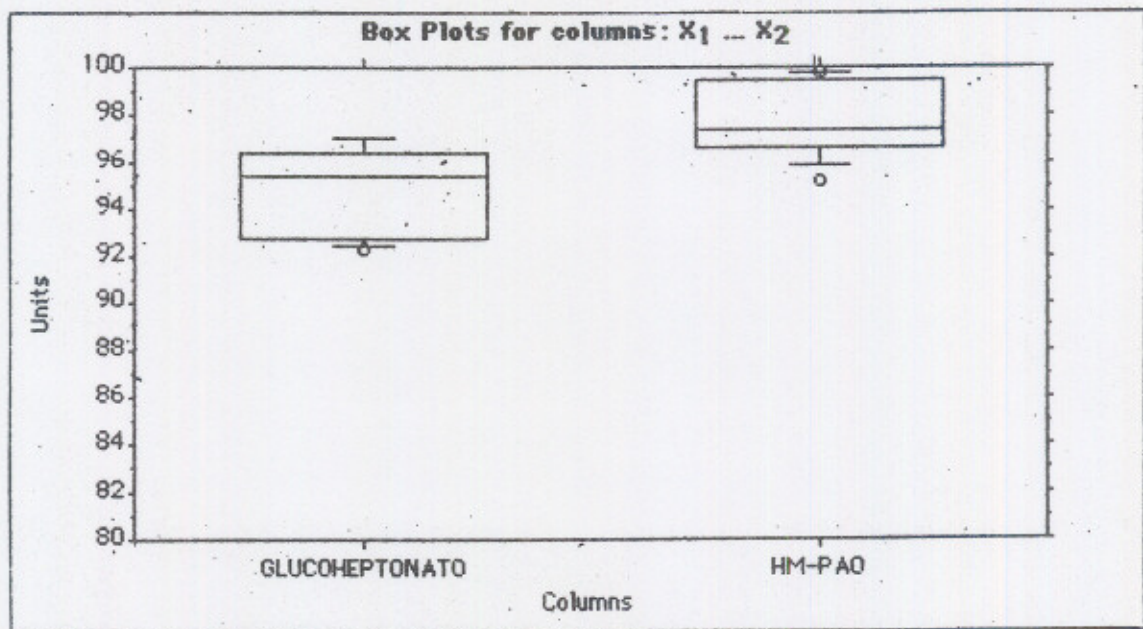
GRAFICA No. 3
PORCENTAJE DE MARCACION
HMPAO Y GLUCOHEPTONATO



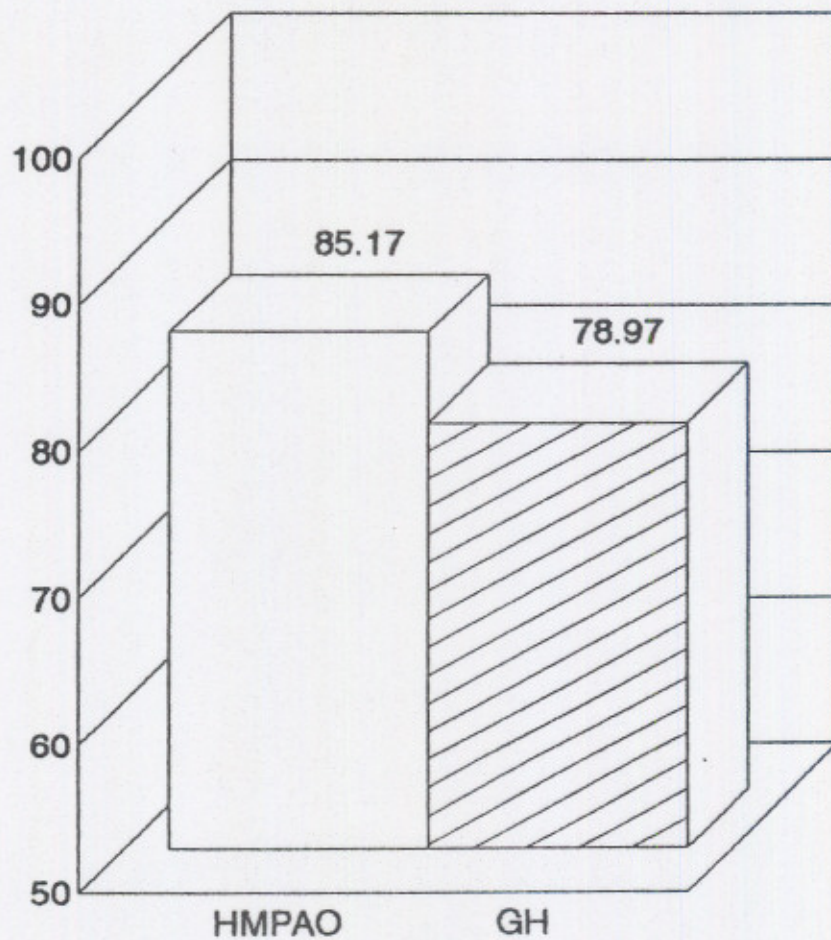
GRAFICA No. 4
VIABILIDAD DE LEUCOCITOS
HMPAO Y GLUCOHEPTONATO



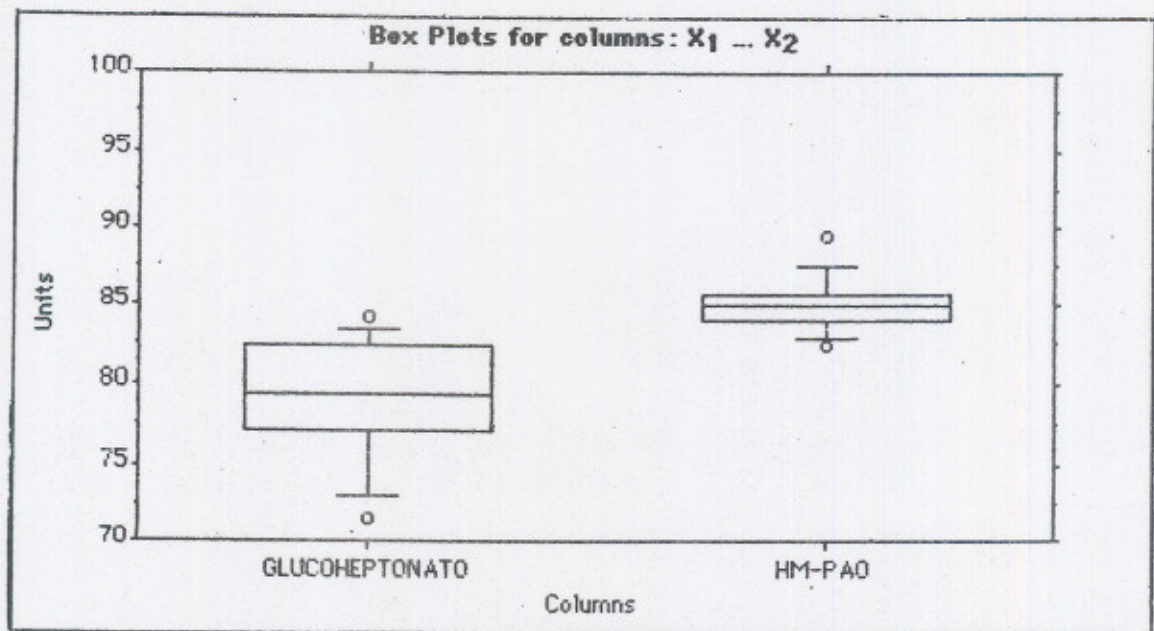
GRAFICA No. 5
VIABILIDAD DE LEUCOCITOS
HMPAO Y GLUCOHEPTONATO

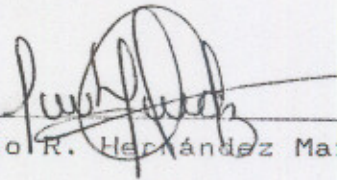


GRAFICA No. 6
RECUPERACION LEUCOCITARIA
HMPAO Y GLUCOHEPTONATO



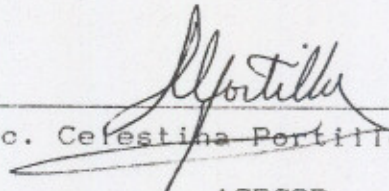
GRAFICA No. 7
RECUPERACION LEUCOCITARIA
HMPAO Y GLUCOHEPTONATO





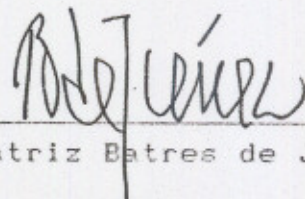
Br. Sergio R. Hernández Martínez

AUTOR



Lic. Celsitina Portillo de Palma

ASESOR



Lic. Beatriz Batres de Jiménez

DIRECTORA
ESCUELA DE QUIMICA FARMACEUTICA



Lic. Jorge Pérez Folgar

DECANO
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA