

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**MARCACIÓN DE ERITROCITOS AUTÓLOGOS in vitro**  
**CON CITRATO-<sup>99</sup>mTc Y SU CONTROL DE CALIDAD**

**INFORME DE TESIS**

Presentado por

**Ana Esther Barrientos Medrano**

Para optar al título de

**Químico Biólogo**

Guatemala, Mayo de 1995

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

MARCACIÓN DE ERITROCITOS AUTÓLOGOS in vivo  
CON CITRATO- $^{59}\text{Fe}$  Y SU CONTROL DE CALIDAD

INFORME DE TESIS

Presentado por

Ana Esther Barrientos Medrano

Para optar al título de

Químico Biólogo

Guatemala, Mayo de 1995

DL  
OU  
T(9653)

**JUNTA DIRECTIVA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

DECANO	Lic. Jorge Rodolfo Perez Folgar
SECRETARIA	Licda. Eleonora Gaitán Izaguirre
VOCAL I	Lic. Miguel Angel Herrera Gálvez
VOCAL II	Lic. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
VOCAL III	Lic. Miguel Orlando Garza Sagastume
VOCAL IV	Br. Jorge Luis Galindo Arévalo
VOCAL V	Br. Edgar Antonio García Del Pozo

Doc 1000

JUNTA DIRECTIVA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

Lic. Jorge Roberto Perez Folgar	DECANO
Licda. Eleonora Galán Izaguirre	SECRETARIA
Lic. Miguel Angel Herrera Gálvez	VOCAL I
Lic. Gerardo Leonel Arroyo Catalán	VOCAL II
Lic. Miguel Orlando Garza Sasturama	VOCAL III
Dr. Jorge Luis Galindo Arévalo	VOCAL IV
Dr. Edgar Antonio Garcia Del Pozo	VOCAL V

**DEDICO ESTA TESIS**

**A DIOS**

Que me dio la vida y me permitió alcanzar esta meta.  
Salmo 139:13,14.

**A MIS PADRES**

Guillermo Enrique Barrientos  
Blanca Lidia Medrano de Barrientos

**A MI ABUELITA**

Berta de Monterroso

**A MIS TIOS**

Adolfo Barrientos, Gilma de Araos, Olivia Medrano,  
Alicia Barrientos.

**A MI NOVIO**

Hector Daniel Higueros Girón

**A MI AMIGO Y CONSEJERO**

Lic. Francisco Paz

**A MIS PRIMOS**

**AL PROGRAMA DE BECAS AL MERITO PARA LA EDUCACION SUPERIOR  
PATROCINADO POR LA AGENCIA PARA EL DESARROLLO INTERNACIONAL**

**A MIS MAESTROS**

Licda. Diana Freire de Nave, Lic. Federico Nave,  
Licda. María del Carmen Bran, Licda. Rosa María de  
Menéndez.

**A MIS AMIGAS Y AMIGOS**

Silvia, Anjeanette, Carmen Rosa, Maria Elena, Rosita,  
Carlos Alberto, Ismael.



#### **AGRADECIMIENTO**

A la Direccion General de Energia Nuclear del Ministerio de Energia y Minas por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo de Tesis.

De manera especial a la Licenciada Diana Freire de Nave y al Licenciado Federico Nave por todas sus enseñanzas, apoyo y asesoria.





## ÍNDICE

	PÁGINA
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
III. ANTECEDENTES	4
IV. JUSTIFICACIONES	20
V. OBJETIVOS	21
VI. HIPÓTESIS	22
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	23
VIII. RESULTADOS	31
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	33
X. CONCLUSIONES	35
XI. RECOMENDACIONES	36
XII. REFERENCIAS	37
XIII. ANEXOS	40



## RESUMEN

Existen diferentes medios y métodos para realizar análisis en pacientes, sin embargo los que se basan en el empleo de radiofármacos pueden efectuarse utilizando métodos incruentos, no invasivos y sin inducir modificaciones fisiológicas, obteniéndose además alta sensibilidad y especificidad.

Los análisis utilizando eritrocitos radiomarcados tienen gran cantidad de aplicaciones diagnósticas por lo que se han realizado innumerables trabajos en la búsqueda de mejores métodos. En Guatemala actualmente se utiliza el método de marcación in vivo/in vitro con  $^{99m}\text{Tc}$ , que representa molestias al paciente. Se ha observado que la naturaleza química del fármaco con el que debe combinarse el elemento radiactivo y las concentraciones en las que se utilice son determinantes en la marcación. El propósito de este estudio fue estandarizar un método de marcación de eritrocitos autólogos in vitro con citrato- $^{99m}\text{Tc}$  que disminuya el número de punciones venosas al paciente, permita la obtención de porcentajes de marcación superiores a 90% y reduzca la manipulación de los eritrocitos.

Se produjo un fármaco con citrato estañoso liofilizado, al cual se realizó control para demostrar sus ventajas para ser usado en radiomarcación de eritrocitos. Se probó el método con varias diluciones del fármaco inicial encontrándose una que permite mayores porcentajes de marcación. Después de varias repeticiones de la marcación con dicha dilución se demostró estadísticamente que el método de marcación in vitro con citrato- $^{99m}\text{Tc}$  permite obtener porcentajes de marcación mayores a 90%, sin producir daño morfológico significativo a los eritrocitos.

## II. INTRODUCCIÓN

La Medicina Nuclear es una ciencia dedicada al tratamiento y principalmente diagnóstico de enfermedades humanas utilizando isótopos radiactivos. Una de las ramas de la Medicina Nuclear, la Hematología Nuclear, se dedica a la marcación de componentes sanguíneos. La marcación de eritrocitos se ha realizado introduciendo en el torrente sanguíneo un radiofármaco que está constituido por un fármaco específico y un radionucleido que emite radiación generalmente de tipo gamma y permite obtener imágenes para el estudio de la función o estructura de órganos internos, a través de un detector de centelleo.

Desde que Towell Richards sugirió que por sus características el Tecnecio podía ser utilizado en Medicina nuclear y se diseñaron los generadores de Molibdeno-Tecnecio, es el Tecnecio 99 metaestable ( $^{99m}\text{Tc}$ ) uno de los radionucleidos más utilizados.

La marcación de eritrocitos tiene gran cantidad de aplicaciones diagnósticas por lo cual se han realizado innumerables trabajos en la búsqueda de mejores técnicas y métodos.

En la mayoría de las técnicas de marcación de eritrocitos con tecnecio se utiliza estaño como agente reductor del tecnecio. Sin embargo el estaño se ha utilizado junto con otras moléculas

tales como el glucoheptonato, pirofosfato o citrato, para permitir la permanencia del estaño dentro del eritrocito antes de que se oxide. Tomando en cuenta el mecanismo de la marcación in vitro de los eritrocitos con  $^{99m}\text{Tc}$  se ha considerado que los bajos rendimientos de marcación se deben a proporciones inadecuadas de los fármacos utilizados y a la naturaleza química de los mismos.

En el presente trabajo se demostró que utilizando la técnica de marcación de eritrocitos autólogos in vitro con citrato- $^{99m}\text{Tc}$  se obtienen porcentajes de marcación mayores al 90%. Para ello se produjeron juegos de reactivos de citrato estañoso, realizando control de pureza radioquímica a los fármacos producidos. Se realizaron marcaciones variando la concentración de ion estañoso para encontrar aquella concentración que permitiera obtener el porcentaje más alto de marcación. Con la mejor concentración de ion estañoso se realizaron marcaciones a 20 muestras a las que finalmente se realizaron control de calidad morfológico de eritrocitos.

### III. ANTECEDENTES

#### A. Consideraciones generales

Los primeros pasos en el desarrollo científico de la Medicina Nuclear fueron dados al descubrirse los rayos Roentgen en 1895 experimentando con tubos de rayos catódicos y con los trabajos del físico francés Henry Becquerel al descubrir, en 1886, la emisión de partículas subatómicas procedentes del uranio.

Al estudiar el poder ionizante de la nueva radiación descubierta por Becquerel, Ernest Rutherford demostró la existencia de tres tipos de emisiones a las que llamó rayos alfa, beta y gamma. Se demostró que la desintegración de los isótopos radiactivos produce partículas energéticas y radiación electromagnética, procesos que se acompañan de alteraciones nucleares(1).

Muchos procesos de emisión alfa y beta dejan un núcleo en un estado excitado, el que luego vuelve al estado fundamental con liberación de rayos gamma (fotones). El espectro de emisión de estos rayos gamma es característico de cada núcleo y es útil para la identificación de los radioisótopos. Como consecuencia de su interacción con la materia, los rayos gamma pierden energía a través de tres mecanismos diferentes, de los cuales el que predomina es el que depende de la energía del fotón gamma(2,3).

## 1. Generadores

Los reactores nucleares son básicamente grandes instalaciones especiales que usan uranio que actúa como combustible fisionable y cuya reacción en cadena es autosustentable y puede ocurrir de manera controlada(4).

En Guatemala no se cuenta con reactores nucleares, por esta razón se utiliza generadores. Un generador" consta de un radionucleido padre de período de semidesintegración relativamente largo, el cual al desintegrarse promueve la aparición de un radionucleido hijo de período de semidesintegración corto (anexo A). Un sistema generador para ser considerado de utilidad, debe presentar ciertas propiedades básicas(4):

- a. Producir un isótopo hijo con alta pureza radioquímica y radionucleídica.
- b. Seguro y fácil de manipular.
- c. Adecuado para la preparación de radiofármacos.
- d. Estéril y libre de pirógenos.
- e. Capaz de permitir separaciones múltiples.
- f. El radionucleido hijo debe tener un período de semidesintegración menor de 24 horas.

## 2. Generador de $^{99}\text{Mo}$ - $^{99\text{m}}\text{Tc}$

La mayoría de los generadores de  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99\text{m}}\text{Tc}$  está basado en una columna cromatográfica en la cual el  $^{99}\text{Mo}$  se encuentra adsorbido a una columna de alúmina. Debido a la emisión de partículas beta, el  $^{99}\text{Mo}$  decae a su hijo  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (anexo A). La separación del  $^{99\text{m}}\text{Tc}$

del radionucleido padre se realiza por simple elución con solución salina isotónica, estéril y apirógena a través de la columna, obteniéndose el tecnecio en forma de pertecneciato de sodio. El elemento padre permanece en el generador. La elución puede realizarse varias veces al día y utilizarse el nuevo elemento con fines diagnósticos. Generalmente los generadores conocidos en la práctica como "vacas", son estériles y por ello el eluido que se obtiene puede utilizarse inmediatamente (3,5,6).

### 3. Detectores

La detección de radiactividad está basada en la interacción química o física de la radiación con la materia. Los sistemas de detección física son los mas comunes y están clasificados en líquidos, sólidos y gaseosos de acuerdo al medio en el cual tiene lugar la interacción. Los detectores de tipo gaseoso son los utilizados con mayor frecuencia. Estos detectores operan con el principio general de que un gas ionizado en el interior de una cámara cargada eléctricamente tiene la habilidad de alterar el potencial eléctrico entre dos electrodos. Dentro de este grupo están los detectores mas antiguos y tienen una gran importancia dentro de la Medicina Nuclear (5). Los tres tipos mas comunes son:

- a. Cámaras de ionización, las cuales son usadas para dosimetría personal y monitores de laboratorio. La mayor aplicación se encuentra en la física médica, donde son usadas para medir intensidades o dosis acumulativas de radiación que por tener una cámara de ionización de gran volumen tienen el espacio



suficiente para introducir frascos o jeringas de 50 a 100 ml. Estos son usados para determinar la actividad que se administrará a los pacientes (5).

b. Contadores proporcionales, los cuales son utilizados para medida de partículas cargadas (5).

c. Tubos Geiger-Müller, estos se utilizan para análisis de radiación en el ambiente. Cualquier tipo de evento ionizante produce millones de iones, consecuentemente los detectores que operan en esa región son adecuados para medir todos los tipos de radiación ionizante y para la detección de radiación de bajo nivel como ocurre en los laboratorios donde se trabaja con radioisótopos (5).

Los sistemas de detección física pueden también clasificarse de acuerdo al tipo de impulso generado y de acuerdo a la naturaleza del fenómeno físico producido. Esta última clasificación incluye detectores de excitación y detectores de ionización, siendo mas comúnmente utilizados los detectores de excitación. Los mas conocidos de estos detectores son los detectores de centelleo cuyo fundamento es la propiedad que tienen ciertos cristales que al ser excitados por una radiación incidente y retornar a su nivel fundamental de energía, emiten fotones de luz visible. Estos fotones pueden ser detectados y registrados por circuitos electrónicos. Este fenómeno puede utilizarse en la formación de imágenes por tubos receptores de televisión (5).

## 2. Radiofármacos:

La Organización Mundial de la Salud ha definido como radiofármaco a toda sustancia radiactiva que por su forma farmacéutica, cantidad y calidad de radiación emitida puede usarse en el diagnóstico y/o tratamiento de las enfermedades de los seres vivientes, cualquiera que sea la vía de administración(1).

Los radiofármacos pueden definirse también como trazadores metabólicos compuestos de dos partes: Un radionucleido que generalmente es emisor de rayos gamma y un fármaco cuya función es localizarse en un órgano específico y participar en la función fisiológica del mismo para emitir una radiación que sea percibida por un detector de centelleo(7, 8).

Una de las razones por las que se ha aumentado el empleo de radiofármacos es que a través de ellos puede realizarse análisis utilizando métodos incruentos, no invasivos y sin efectuar modificaciones fisiológicas. Además los radiofármacos proveen alta sensibilidad y especificidad (10).

Los trazadores mas ampliamente utilizados son el  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  e  $^{111}\text{In}$ , los cuales idealmente deben tener las siguientes características (10):

- a. No alterar la función ni la vida media de las células.
- b. No ser eluido ni reutilizado después de una destrucción fisiopatológica de las células.
- c. Ser preferiblemente emisor de rayos gamma con una energía apropiada para el conteo centelleográfico y con una vida media de acuerdo al parámetro a ser estudiado.

La formulación de las sustancias radiactivas para su uso en medicina se ha simplificado a medida que se ha facilitado la obtención comercial de los radionucleidos de corto periodo de semidesintegración. Actualmente la marcación de la sustancia se lleva a cabo en el momento en que ésta se necesita y en la misma Radiofarmacia hospitalaria (1).

### C. Aspectos históricos

A principios del presente siglo no sólo se conocían las tres principales formas de emisiones radiactivas, sino que se descubrieron varios elementos radiactivos nuevos como Torio, Radio y Polonio, principalmente como resultado de los trabajos realizados por María y Pierre Curié en 1889 (1).

El Tecnecio fue descubierto por Emilio Segre en una placa de Molibdeno que había sido usada como deflector en un ciclotrón en el Laboratorio de Radiación de la Universidad de Berkly, California, Estados Unidos. Dicha placa había estado expuesta a irradiación con deuterones por varios meses. En Junio de 1937, junto con Carlo Pierrer, informó en la revista Nature que la placa mostraba radiactividad debida a isótopos de numero atómico 43. Después de la Segunda Guerra mundial dicho elemento fue bautizado con el nombre de Tecnecio, del griego Technetos que significa artificial. Este fue el primer elemento químico preparado artificialmente. En julio de 1938 Emilio Segre y Glen A. Seaborg aislaron  $^{99}\text{Tc}$  y el isómero nuclear metaestable, con periodo de semidesintegración de 6 horas y con una emisión gamma de 140 kev,

$^{99m}\text{Tc}(11)$ .

### Historia de la Radiofarmacia

La radiofarmacia es una rama de la ciencia que estudia los aspectos químicos, farmacológicos, bioquímicos y fisiológicos de las sustancias radiactivas que son utilizadas como trazadores metabólicos(4).

Estos compuestos radiactivos o radiofármacos son marcados principalmente con radionucleidos emisores gamma y son utilizados primeramente como agentes diagnósticos. El uso de un radionucleido con óptimas características nucleares es considerado fundamental en el desenvolvimiento de cualquier radiofármaco y el elemento considerado ideal es el Tecnecio. En la reunión anual de la Sociedad Nuclear Americana de 1958, Walter Tucler informo sobre las características de un generador de Tecnecio a partir del Molibdeno, llamado generador de  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99m}\text{Tc}$  y la facilidad de obtener  $^{99m}\text{Tc}$  a nivel de laboratorio no especializado. Dos años mas tarde Towel Richards sugirió que debido a sus características el  $^{99m}\text{Tc}$  podía ser utilizado en medicina nuclear(5,11).

Desde 1913 Frederick Proescher empezó a utilizar inyecciones intravenosas de Radio para la terapia de diversas enfermedades y aparentemente fue el primero en darle ese uso. Wickham y Degrais utilizaron también inyecciones de Radio por vía intravenosa para tratamiento de artritis, neuritis y otras enfermedades pobremente definidas. Sin embargo en estos pacientes lo que se logro fue contribuir a la inducción de leucemia y cáncer (12).

En los años 20 se hicieron los primeros intentos para usar radioisótopos de la naturaleza. En 1926 Blumgart, Yens y Weiss efectuaron los primeros estudios de circulación sanguínea en humanos por administración de Radio. En 1928, Lomhult uso Bismuto radiactivo en la terapia de sífilis (13 - 15).

En 1934, Havesy y colaboradores emplearon por primera vez el principio de dilución isotópica para la determinación del volumen total de agua en el cuerpo humano. En este mismo año, F. Joliot e I. Curie produjeron el primer radionucleido artificial con aparatos que ahora parecen mas que simples(4,12).

Aproximadamente en 1936 los productos de ciclotrones llegaron a ser útiles (4).

Otra importante aplicación de la medicina nuclear fue iniciada en 1938 por el doctor John Lawrence, quien empleó el  $^{32}\text{P}$  para tratar leucemia mieloide (16).

Los isótopos reactores producidos en ciclotrones llegaron a ser de gran valor en 1946. En ese mismo año se obtuvo el primer éxito en la terapia de cáncer de Tiroides con  $^{131}\text{I}$  (12).

Después de los años 50 se introdujo nuevos radionucleidos con propiedades elementales y radiactivas de especial valor para fines médicos(13).

En 1951 se empezaron a utilizar en medicina nuclear los generadores de radioisótopos o "vacas de laboratorio" (4).

## 2. Medicina Nuclear en Guatemala

En Guatemala la Medicina Nuclear se inicio 1962 con la creación de la Unidad de Medicina Nuclear del Hospital Roosevelt, en la que se realizo estudios de la fisiopatología de la glándula tiroides usando  $^{131}\text{I}$  para evaluar la captación del radionucleido por dicha glándula y evaluar su estructura y morfología glandular (4).

Los generadores de  $^{131}\text{I}$  fueron utilizados por primera vez en 1970 en Guatemala. En esa época no se elaboraban los radiofármacos, sino se compraban juegos de reactivos comerciales, que posteriormente se marcaban (1).

En 1972 se empezó a utilizar  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  como agente radiodiagnóstico (17).

El Hospital General San Juan de Dios (HGSJD) inició sus actividades en el área de Radiofarmacia Hospitalaria en febrero de 1984, en un convenio de cooperación con la Dirección General de Energía Nuclear (DGEN). En ese mismo año se recibió asistencia del Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) para realizar preparación y control de calidad de radio fármacos en nuestro país. En ese mismo periodo se logró la capacitación de tres profesionales en el exterior y se recibió una donación de equipo. En 1986 se inició en dicho hospital el uso de imágenes, pero fue hasta 1989 cuando se emplearon por primera vez los métodos centelleográficos para el diagnóstico de infarto agudo de miocardio (1,17).

Las nuevas instalaciones de la DGEN incluyeron el área destinada a la Radiofarmacia centralizada; en la cual se realiza actualmente la producción de los diferentes radiofármacos

liofilizados para marcar con  $^{99m}\text{Tc}$  y juegos de reactivos para la marcación de células sanguíneas, distribuyéndolos a la Radiofarmacia Hospitalaria HGSJD, Radiofarmacia Hospitalaria del Hospital Roosevelt y a un centro privado de diagnóstico. La Radiofarmacia Centralizada no sólo produce los radiofármacos, sino es la encargada del control de calidad, distribución, síntesis de sales básicas, validación de procesos, actividades de investigación y asesoría profesional. Las instalaciones incluyen un área aséptica, área de lavado y preparación de material, laboratorios de investigación, de ensayos biológicos y radiactivos, así como un bioterio (17).

Las dos Radiofarmacias Hospitalarias de los hospitales Roosevelt y HGSJD se encuentran en los departamentos de Medicina Nuclear y en ambas se marcan Radiofármacos con  $^{99m}\text{Tc}$  y se administran dosis diagnósticas y terapéuticas de  $^{131}\text{I}$ . La marcación de células sanguíneas se realiza únicamente en la Radiofarmacia de HGSJD. En ambas radiofarmacias existen áreas de elución, radiomarcación, instrumentación y desechos radiactivos (17).

#### **4. Marcación radioisotópica de eritrocitos**

Los eritrocitos radiomarcados (ERM) ocupan actualmente un lugar destacado en el campo de la medicina nuclear. Utilizando ERM pueden realizarse estudios de cinética, funcionalismo y localización sitios de hemorragia gastrointestinal y determinación de masa total de eritrocitos (13 - 20).

Los ERM son útiles en la detección de focos de hemoptisis y presencia de sangre en vías biliares, aunque en este último caso

debe confirmarse por otras técnicas(21).

La trombosis venosa profunda es un problema diagnóstico que requiere resolución precoz ya que en muchas ocasiones son causa de tromboembolismo pulmonar que puede resultar letal. Generalmente menos del 50% de pacientes con este padecimiento presentan manifestaciones clínicas y en menos del 25% el diagnóstico clínico es correcto (22).

Los coloides de tecnecio son los trazadores más usados en la obtención de imágenes esplénicas, sin embargo en situaciones como bazos ectópicos o accesorios, malformaciones, lesiones espacio-ocupantes, traumatismo, etc. las imágenes pueden quedar mal delimitadas y en estos casos son de gran utilidad las imágenes gammagráficas mediante el uso de ERM (21).

#### 4.1 Marcación in vitro de eritrocitos con $^{99m}\text{Tc}$

Los primeros trabajos de marcación in vitro de eritrocitos fueron realizados por Fisher y Haubold en 1968, obteniendo aparentemente buen rendimiento en la marcación. Posterior a estos trabajos, Weinstein utilizó la técnica descrita por Fischer pero encontró dificultades en la marcación. Burdine y Schwart realizaron trabajos similares concluyendo que no es posible realizar una marcación irreversible de eritrocitos por simple adición de pertecneciato ( $\text{TcO}_4^-$ ) (21).

Berger y Johanssen estudiaron el efecto de agentes reductores en el proceso de marcación y a partir de entonces se empezaron a obtener mejores resultados (21).

Entre los años 59 y 61 se empezó a obtener rendimientos mayores al 95% utilizando un método llamado "pre-estañizado". Este



método consiste en incubar los eritrocitos con  $\text{Sn}^{+2}$  y posteriormente adicionar el pertecneciato que difunde libremente al interior de la célula donde permanece al ser reducido por el estaño (21).

También en ese tiempo se trató de introducir un método de incubación previa con pertecneciato y posterior adición de estaño pero cayó en desuso debido a la laboriosidad de la técnica y al escaso rendimiento de marcación. Hubo avance en el método de "pre-estañizado" con la utilización de juegos de reactivos liofilizados utilizando sustancias como glucoheptonato, citrato o pirofosfato estañoso, actuando el estaño como agente reductor del pertecneciato. Con estos juegos de reactivos se logró marcaciones mas cómodas y rendimientos superiores (21).

Los métodos de marcación con pirofosfato de sodio con estaño son los mas utilizados en la actualidad, pero la concentración de estaño, volumen de sangre, incubación y número de lavados con solución salina son críticos en la obtención de buenos rendimientos. También tiene importancia el anticoagulante, considerándose el ACD (ácido citrato dextrosa) anticoagulante de elección (21).

## 2. Marcación in vivo de eritrocitos con $^{99\text{m}}\text{Tc}$

En 1974 se publicó un trabajo sobre la alteración de la distribución tisular del pertecneciato tras la administración de  $\text{Sn}^{+2}$ . Posterior a esto se estudió los efectos de la administración previa de complejos de estaño en la distribución in vivo del pertecneciato lo cual fue el punto de partida de la marcación de eritrocitos in vivo (21).

Basándose en estas observaciones, Pavel propuso una técnica

en la que se inyectaba pertecneciato 30 minutos después de haber administrado una cantidad determinada de estaño. La ventaja de esta técnica era que no necesitaba de los repetidos lavados y centrifugaciones de la técnica in vitro (21).

Debido a la toxicidad potencial del estaño, Hamilton estableció la concentración mínima que permite una marcación satisfactoria (21).

Varios autores han encontrado anormalidades en la técnica in vivo, así como mejores imágenes con la técnica in vitro. Esquerre logro mejorar la técnica in vivo con la administración simultanea de perclorato y estaño. En todas las técnicas in vivo se ha logrado un rendimiento del 70 al 85% (21).

#### 4.3 Marcación in vivo/in vitro de eritrocitos con $^{99m}\text{Tc}$

Debido al escaso rendimiento de marcación y la pobre calidad de las imágenes obtenidas con el método in vivo, Callahan introdujo una modificación combinando los dos métodos anteriores (21).

Este método consiste en la obtención de sangre del paciente que ha sido previamente estañizada in vivo empleando como radiofármacos pirofosfato de sodio, cloruro de estaño o glucoheptonato. El procedimiento consiste en la incorporación de  $\text{Sn}^{+2}$  dentro de la célula. Se extrae la muestra de sangre, se le agrega soluciones de hipoclorito de sodio o agua oxigenada como agentes oxidantes, los que permiten que el estaño extracelular se oxide. Se adiciona después un agente quelante como el EDTA, que elimina el  $\text{Sn}^{+3}$  extracelular. Finalmente se adiciona el pertecneciato de sodio que ingresa a la célula, allí

es reducido por estaño y queda unido a proteínas, específicamente a cadenas beta de la globina (3,11,21,23).

#### 4. Mecanismos de transporte, fijación, estabilidad y elución del trazador.

Según Dewanjee, cuando se administra de 2 a 4 mg de pirofosfato estañoso, un 30 a 40% del estaño se localiza en hueso, un 40 a 50% se excreta por vía renal y solamente de 5 a un 8% se localiza en los eritrocitos y permanece unido a la globina por largo período de tiempo. Al administrar el pertecneciato éste penetra en los eritrocitos utilizando la vía de difusión de los canales aniónicos y después de ser reducido intracelularmente por el estaño, se une a la hemoglobina (24).

La distribución relativa del tecnecio en los componentes del eritrocito según Rehani, es la siguiente: Aproximadamente un 95% en la hemoglobina (19% en la fracción Hemo y 76% en la globina) y 5% en la membrana (4.4% en las proteínas y 0.5% en lípidos) (24).

El mecanismo exacto de fijación in vitro del  $^{99m}\text{Tc}$  a los eritrocitos no es del todo conocido, sin embargo Srivastava en sus estudios concluye lo siguiente (25):

- a. El ion estañoso penetra en el interior de los eritrocitos y se une fundamentalmente a la hemoglobina.
- b. El pertecneciato difunde libremente hacia fuera y hacia dentro del eritrocito.
- c. En el interior del eritrocito el pertecneciato reducido por el estaño se une a la hemoglobina.

- d. El estaño oxidado, así como el tecnecio reducido no son transportados a través de la membrana del eritrocito.
- e. El estaño extracelular reduce prematuramente el pertecnecio inhibiendo la entrada de tecnecio y causando bajos rendimientos de marcación.
- f. El eritrocito retiene el estaño por largos períodos de tiempo.

Según Callahan el transporte del pertecnecio al interior del eritrocito es inhibido después de incubación a bajas temperaturas, lo que indica que el proceso necesita una alta energía de activación. El transporte es también disminuido por dos bien conocidos inhibidores del sistema de transporte aniónico de la proteína de banda tres y no es afectado por inhibición del sistema de cotransporte de Na/K/Cl. De sus resultados ha concluido que es la proteína de banda tres la transportadora del pertecnecio. Esta proteína es uno de los componentes del sistema de membrana del eritrocito y su función es la unión del citoesqueleto (26,27,28).

En general los fármacos antiarrítmicos, diuréticos, hipotensores y beta bloqueantes pueden afectar la marcación de eritrocitos con tecnecio. Por otro lado, se ha observado pobre calidad de imágenes cardíacas, con intensa actividad renal y vesical en enfermos que han recibido contrastes yodados previo a la marcación eritrocitaria(21).

## E. Técnicas actuales en la marcación de eritrocitos

### IV. JUSTIFICACIONES

Actualmente en el HGSJD se utiliza la técnica in vivo/in vitro en la cual se inyecta al paciente pirofosfato de estaño y después de veinte minutos se le extrae sangre a la que se le agrega peróxido de hidrógeno, EDTA y finalmente el pertecneciato de sodio (3).

En el año de 1993 se realizó un trabajo de investigación en Guatemala en el que se pretendía encontrar la mejor concentración de pirofosfato de sodio y estaño para obtener marcación superior al 90%, sin embargo no se logró superar dicho porcentaje de marcación con ninguna de las concentraciones (22).

La técnica in vitro propuesta por Brookhaven National Laboratory Procedure consiste en la adición directa de la sangre a un tubo conteniendo citrato estañoso, citrato de sodio, dextrosa y cloruro de sodio. Adición posterior de EDTA, separación de una porción de eritrocitos y finalmente adición de pertecneciato de sodio (30).

Con la técnica anterior se ha reportado marcaciones de 98%, mientras que con técnicas in vivo han sido de 60 a 90% y con la técnica in vivo/in vitro han sido superiores a 95% (3,30).

#### IV. JUSTIFICACIONES

Desde hace algunos años, en el Departamento de Medicina Nuclear del Hospital General San Juan de Dios se han empleado técnicas para la marcación de eritrocitos autólogos con el fin de realizar evaluaciones centelleográficas del sistema venoso profundo, bazo, etcétera.

Inicialmente se utilizó la técnica de marcación in vitro, pero implicaba alto grado de manipulación de los eritrocitos y probabilidad de contaminación. Posteriormente se introdujo la técnica de marcación in vivo/in vitro. En esta se inyecta al paciente cloruro estañoso o pirofosfato estañoso, estañizándose los eritrocitos. Se toma una muestra de sangre, pre-estannizada, se marca con  $^{99m}\text{Tc}$  y es readministrada al paciente.

Las dos técnicas anteriores a pesar de permitir un buen porcentaje de marcación eritrocitaria y por lo tanto una adecuada imagen centelleográfica, representan mayores molestias al paciente, pero hasta el momento no se cuenta en Guatemala con una técnica in vitro que permita adecuados porcentajes de marcación. En este trabajo se encontró una concentración de citrato estañoso que permitió estandarizar una técnica de marcación in vitro con citrato estañoso y  $^{99m}\text{Tc}$ , con lo cual se persigue disminuir la manipulación de eritrocitos, disminuir el número de punciones venosas a los pacientes; así como lograr un porcentaje de marcación mayor al 90%.

#### IV. OBJETIVOS

##### A. General:

Estandarizar la técnica de marcación de eritrocitos in vitro con citrato-<sup>99m</sup>Tc.

##### B. Específicos:

1. Producir los juegos de reactivos de citrato estañoso liofilizado para la estandarización de la técnica in vitro.
2. Realizar control de pureza radioquímica al fármaco producido.
3. Encontrar la concentración de estaño que permita el mayor porcentaje de marcación.
4. Establecer un método in vitro que permita obtener un porcentaje de marcación mayor al 90%.
5. Realizar un control de calidad morfológico a los eritrocitos marcados.

#### IV. OBJETIVOS

- A. General:  
Estandarizar la técnica de marcación de eritrocitos *in vitro* con citrato-<sup>99m</sup>Tc.

#### V. HIPÓTESIS

- B. Específicas:
1. Producir los juegos de reactivos de citrato estañoso Utilizando la técnica de marcación de eritrocitos *in vitro* con <sup>99m</sup>Tc-citrato estañoso se obtienen porcentajes de marcación mayores al 90%.
  2. Realizar control de pureza radiométrica de los eritrocitos producidos.
  3. Encontrar la concentración de estaño que permita el mayor porcentaje de marcación.
  4. Establecer un método *in vitro* que permita obtener un porcentaje de marcación mayor al 90%.
  5. Realizar un control de calidad morfológico a los eritrocitos marcados.



## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Universo de trabajo:

Sangre extraída de donadores sanos, de ambos sexos, con hematocrito normal.

### B. Medios:

#### 1. Recursos humanos

**Autor:** Ana Esther Barrientos Medrano

**Asesores:** Licda. Diana Freire de Nave

Lic. Federico Nave Herrera

#### 2. Recursos institucionales

Laboratorio de Radiofarmacia Centralizada de la Dirección General de Energía Nuclear del Ministerio de Energía y Minas y Radiofarmacia Hospitalaria del Hospital General San Juan de Dios.

#### 3. Recursos físicos

##### a. Equipo

- Centrífuga
- Balanza analítica
- Plancha agitadora
- Campana de flujo laminar horizontal
- Microscopio
- Potenciómetro

- Incubadora
- Baño de María
- Calibrador de dosis (detector de tipo gaseoso)
- Contador de centelleo tipo pozo con detector de NaI
- Geiger Müller
- Blindajes plomados
- Refrigerador
- Radiocromatógrafo
- Cubas cromatográficas
- Selladora
- Liofilizadora
- Generador de  $^{99}\text{Mo}$  -  $^{99\text{m}}\text{Tc}$

#### b. Reactivos

- Eluido de Pertecneciato de sodio
- Citrato de sodio
- Cloruro estañoso
- EDTA pH 7, al 4.4%
- Peróxido de hidrógeno de 20 volúmenes
- Solución salina 0.85%, estéril y apirógena
- Agua tridestilada estéril y apirógena
- Acetona
- Metanol al 85%
- Etanol al 70%
- Nitrógeno gaseoso
- Heparina
- Dextrosa
- Cloruro de sodio

- Colorante de Wright

**c. Materiales**

- Jeringas de 5cc.

- Aguja 21 x 1 1/2 plg.

- Algodón

- Viales tipo penicilina, transparentes

- Tapones de goma simples

- Tapones de goma para liofilizar

- Tubos vacutainer

- Portaviales plomados

- Pipetas plásticas

- Pipetas volumétricas

- Pipetas pasteur

- Tubos plásticos de 5 y 10 cc para centrifuga

- Tubos de ensayo de 16 x 100 (10 ml)

- Gradillas para tubos de ensayo

- Guantes

- Gabacha plomada

- Dosímetro y portapelícula

- Mortero y pistilo

- Papel cromatográfico tipo ITLC-sg (Cromatografía instantánea en capa fina impregnada con sílica gel).

**C. Procedimiento:**

**1. Preparación de los juegos de reactivos**

a. Citrato-estaño

Solución A: 200 mg de citrato de sodio se disolvieron en 40 ml de NaCl al 0.85% y se nitrogenó la solución.

Solución B: 12 mg de SnCl<sub>2</sub> se disolvieron en 10 ml de HCl 0.1 N y se nitrogenó dicha solución por 10 minutos. Se agregó lentamente solución B a la solución A, llevando hasta pH 6 con NaOH 2 N.

En 10 ml de agua tridestilada estéril se disolvieron 330 mg de dextrosa y se unió con A y B.

b. EDTA

Fue utilizada la sal dipotásica del ácido etilendiaminotetracético, la cual se preparó agregando 2.205 g en 50 ml de agua destilada y ajustando a Ph 7; obteniéndose concentración 4.4%.

c. Peróxido de hidrógeno

Con solución salina estéril y apirógena se preparó una dilución 1:10 de peróxido de hidrógeno de 20 volúmenes.

2. Marcación in vitro de los eritrocitos

a. Se determinó el porcentaje de hematocrito de los donadores, seleccionando solo aquellos con un porcentaje de 42 a 50 en hombres y 40 a 48 en mujeres.

b. Por punción venosa se extrajeron 4 ml de sangre, utilizando jeringa heparinizada.

c. La sangre fue vertida en un tubo vacutainer conteniendo 2.0 µg de citrato de estaño, 3.7 mg de citrato de sodio,

5.5 mg de dextrosa y 0.11 mg de cloruro de sodio (fármaco) o la dilución correspondiente, siendo las diluciones utilizadas:

1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:25, 1:30, 1:40.

d. Suavemente se mezcló e incubó en una plancha agitadora por 5 minutos.

e. Se agregó 0.3 ml de peróxido de hidrógeno mezclando suavemente, a continuación se agregó 1 ml de EDTA al 4.4% mezclando cinco veces por inversión.

f. Aproximadamente 2 mCi (milicurios) de pertecneciato de sodio fueron agregados.

g. Utilizando plancha agitadora se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente (anexo B y C).

### 3. Control de calidad

#### a. Pureza radioquímica de Citrato-<sup>99m</sup>Tc

Este control se utilizó para determinar el porcentaje de marcación del citrato-estaño con el tecnecio. Se disolvió el liofilizado de citrato-estaño con 1 ml de pertecneciato de sodio con una actividad entre 3 y 5 mCi. Utilizando un vortex se agitó durante 20 minutos y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos, tiempo en el que se logró la reacción completa del citrato-estaño con el pertecneciato.

Se realizó una cromatografía en capa fina instantánea, con la cual se separó el complejo citrato-estaño-tecnecio ( $R_f = 1$ ) del tecnecio libre ( $R_f = 0$ ) debido a

sus afinidades diferenciales hacia la fase estacionaria y a la fase móvil; siendo la primera microfibras de vidrio impregnadas con sílica gel y la segunda solución salina 0.85%.

La cromatografía se corrió y posteriormente se leyó en el radiocromatógrafo el cual realizó un histograma, del que se obtuvo el porcentaje de marcación.

De la misma manera se realizó una segunda cromatografía con acetona como fase móvil y fibras de vidrio impregnadas con sílica gel como fase estacionaria. En este caso se separó tanto el tecnecio libre ( $R_f = 1$ ), como el complejo citrato-estaño-tecnecio ( $R_f = 0$ ) de posibles quelatos que se hayan formado durante la reacción.

#### b. Control de la marcación de los eritrocitos

i. La sangre marcada se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos y el sobrenadante fue transferido a otro tubo.

ii. Se midió la actividad en el sobrenadante y en los eritrocitos utilizando un calibrador de dosis.

iii. El porcentaje de marcación se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de marcación} = \frac{\text{A G R} + \text{A S}}{\text{A G R}} \times 100$$

A G R : Actividad en los glóbulos rojos  
A S : Actividad en el sobrenadante

**c. Control de calidad de células marcadas**

De cada una de las muestras de sangre utilizadas, se realizó un frote sanguíneo antes y otro después de la marcación y se tiñeron con coloración de Wright. Posteriormente se observaron microscópicamente todos los frotos contando el número de crenocitos por mil eritrocitos.

**D. Diseño experimental:**

Con la dilución del fármaco que permitió obtener el mayor porcentaje de marcación se realizó la marcación con un número de 20 muestras ( $\alpha = 0.05$ ). Los datos así obtenidos se analizaron utilizando una prueba de hipótesis binomial, donde:

$$H_0: p < q$$

$$H_a: p \leq q$$

**p= probabilidad de éxito**

**q= probabilidad de fracaso**

**Exito= porcentaje de marcación mayor que 90**

**Fracaso= porcentaje de marcación menor que 90**

De acuerdo a la tabla para prueba de hipótesis binomial (cuando  $H_0: p = q$ ), con un número por conveniencia de 20 repeticiones se espera un máximo de 5 fracasos para aún rechazar  $H_0$ .

Se realizó un control de calidad de las células marcadas, comparando el número de crenocitos por mil eritrocitos en las muestras sin marcar con el número de crenocitos por mil eritrocitos en las muestras marcadas. Para lo anterior se utilizó un diseño pareado y el análisis estadístico fue "t" de Student para diferencias pareadas.

D. Diseño experimental:

Con la dilución del fármaco que permitió obtener el mayor porcentaje de marcación se realizó la marcación con un número de 20 muestras ( $\alpha = 0.05$ ). Los datos así obtenidos se analizaron utilizando una prueba de hipótesis binomial, donde:

$$H_0: p < p$$

$$H_1: p \geq p$$

$p$  = probabilidad de éxito

$p$  = probabilidad de fracaso

Éxito = porcentaje de marcación mayor que 90

Fracaso = porcentaje de marcación menor que 90

De acuerdo a la tabla para prueba de hipótesis binomial (cuando  $H_0: p = p$ ), con un número por conveniencia de 20 repeticiones se espera un máximo de 5 fracasos para aún rechazar  $H_0$ .



## VIII. RESULTADOS

Se realizó la producción de los juegos de reactivos. Posterior a la producción del fármaco se realizaron las pruebas de pureza radioquímica en las que se obtuvo un porcentaje de pureza de 98.39% y 98.03% con acetona y solución salina respectivamente (Gráficas No. 1 y 2). Con este control de calidad se comprobó la aptitud del fármaco para reaccionar adecuadamente con el tecnecio y por lo tanto para probar el método de marcación.

Con el fármaco inicial o control se obtuvo un porcentaje de marcación muy abajo del porcentaje necesario para aceptar el método. Se realizaron marcaciones con diferentes diluciones del fármaco observándose un marcado ascenso en el porcentaje de marcación al aumentar la dilución hasta llegar a 1:20. En la dilución 1:25 el porcentaje de marcación disminuyó ligeramente observándose un porcentaje aproximadamente igual en las diluciones posteriores (Tabla No. 1, Gráfica No. 3).

La dilución 1:20 del fármaco fue utilizada para realizar la marcación de las 20 muestras de sangre con el método de marcación in vitro. En todas las repeticiones del método se obtuvo un porcentaje de marcación mayor al 90% (Tabla No. 2). De acuerdo a la tabla de hipótesis binomial se rechaza la hipótesis nula ya que el número de fracasos fue cero ( $p < 0.000001$ ).

El control de calidad morfológico de los eritrocitos mostró que no se produce alteración celular al utilizar el método de marcación in vitro (Tabla No. 3, Gráfica No. 4).

El número de crenocitos por mil eritrocitos para las muestras

antes y después de la marcación no es significativamente diferente pues el valor de t calculado es menor que el valor de t tabulado ( $p = 0.05$ ).

Se realizó la producción de los juegos de reactivos. Posteriormente a la producción del fármaco se realizaron las pruebas de pureza radiométrica en las que se obtuvo un porcentaje de pureza de 98.33% y 98.03% con acetona y solución salina respectivamente (Gráficas No. 1 y 2). Con este control de calidad se comprobó la aptitud del fármaco para reaccionar adecuadamente con el tecnecio y por lo tanto para probar el método de marcación.

Con el fármaco inicial o control se obtuvo un porcentaje de marcación muy alto del porcentaje necesario para aceptar el método. Se realizaron marcaciones con diferentes diluciones del fármaco observándose un marcado ascenso en el porcentaje de marcación al aumentar la dilución hasta llegar a 1:20. En la dilución 1:25 el porcentaje de marcación disminuyó ligeramente observándose un porcentaje aproximadamente igual en las diluciones posteriores (Tabla No. 1, Gráfica No. 3).

La dilución 1:20 del fármaco fue utilizada para realizar la marcación de las 20 muestras de sangre con el método de marcación *in vivo*. En todas las repeticiones del método se obtuvo un porcentaje de marcación mayor al 90% (Tabla No. 2). De acuerdo a la tabla de hipótesis binomial se rechaza la hipótesis nula ya que el número de éxitos fue cero ( $p > 0.00001$ ).

El control de calidad morfológico de los eritrocitos mostró que no se produce alteración celular al utilizar el método de marcación *in vivo* (Tabla No. 3, Gráfica No. 4).

El número de eritrocitos por mil eritrocitos para las muestras

## IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las pruebas de pureza radioquímica indicaron que el porcentaje de actividad de tecnecio reducido respecto a la actividad total presente en el radiofármaco fue aceptable según el normativo de ALASBIMN (31,32).

La cromatografía corrida con solución salina permitió la separación del complejo citrato-estaño-tecnecio y el pertecneciato libre, que migraron hacia el frente, de posibles impurezas radioquímicas (quelatos, óxidos), ya que las impurezas quedan retenidas en el origen. En la cromatografía corrida con acetona como fase móvil el complejo citrato-estaño-tecnecio queda en el origen por su afinidad mayor a la fase estacionaria y el pertecneciato migra hacia el frente con la fase móvil. Los porcentajes de 98.03% y 98.39% con solución salina y acetona respectivamente indican que la reacción del fármaco con el pertecneciato fue casi completa y la cantidad de pertecneciato libre no fue significativa (33).

La formulación del fármaco fue hecha en base a los datos reportados por Phan, Ling y Wasnick sin embargo con el fármaco inicial se obtuvo un porcentaje de marcación mucho mas bajo al requerido para aceptar el método. Con cada una de las diluciones se observó un incremento progresivo del porcentaje de marcación hasta obtener el mejor porcentaje con la dilución 1:20 que equivaldría a 0.1 mg de citrato estañoso, 0.185 mg de citrato de sodio y 0.055 mg de cloruro de sodio. Entonces se observa que al realizar la técnica de marcación in vitro son necesarias pequeñas cantidades de citrato estañoso para que ingrese a los eritrocitos

y los pequeños volúmenes que quedan en el plasma puedan ser oxidados por  $H_2O_2$  y secuestrados por EDTA. Con lo anterior casi todo el estaño reducido queda dentro de los eritrocitos. Al adicionar el pertecneciato a la muestra es mínima la cantidad que es reducida en el plasma y mas de 90% es el que permanece dentro de los eritrocitos. En diluciones mayores a 1:20 se observó un descenso muy ligero del porcentaje quizá debido a que disminuye la cantidad de estaño disponible para reducir el pertecneciato (30).

Con las 20 repeticiones de la marcación se demostró que la presente modificación del método de marcación de eritrocitos autólogos in vitro con  $^{99m}Tc$  permite obtener porcentajes de marcación superiores a 90%. Los porcentajes estuvieron comprendidos en un rango de  $96.62 \pm 0.57$  lo cual es superior a los porcentajes obtenidos con el método in vivo/in vitro que es utilizado actualmente en Guatemala (3, 17).

Todos los frotos realizados antes y después de la marcación de las muestras sanguíneas fueron examinados. Debido a que este método de marcación in vitro reduce la manipulación de los eritrocitos no se produce daño significativo a dichas células. Sin embargo en cada etapa del método desde la toma de muestra se manipuló suavemente las muestras y se utilizó un agitador de tipo péndulo. Al realizar el análisis estadístico se demostró que no hay diferencia significativa en el número de crenocitos antes y después de la marcación.

## X. CONCLUSIONES

- A. Con el fármaco producido se obtuvieron porcentajes de pureza radioquímica superiores a los necesarios para ser aceptados según el normativo de ALASBIMN.
- B. Con las concentraciones del fármaco inicial se obtienen porcentajes inferiores a las necesarias para la obtención de buenas imágenes centelleográficas.
- C. La dilución 1:20 del fármaco inicial permite los mejores porcentajes de marcación con el método in vitro.
- D. La modificación del método de marcación de eritrocitos autólogos in vitro con  $^{99m}\text{Tc}$ -citrato estañoso permite obtener porcentajes de marcación superiores a los obtenidos con el método utilizado actualmente en Guatemala.
- E. Con la modificación del método de marcación y con manipulación y agitación suave no se producen alteraciones morfológicas significativas en los eritrocitos.

## X. CONCLUSIONES

A. Con el fármaco producido se obtuvieron porcentajes de pureza radiométrica superiores a los necesarios para ser aceptados según el normativo de ALABAMA.

## RECOMENDACIONES

A. Se recomienda evaluar en pacientes la efectividad del presente método de marcación utilizando examen centelleográfico.

B. Implantar el método de marcación de eritrocitos autólogos in vitro con  $^{99m}\text{Tc}$ -citrato estañoso en el Hospital General San Juan De Dios.

C. Realizar cada etapa del método manipulando suavemente las muestras y utilizando agitador de tipo péndulo.

E. Con la modificación del método de marcación y con manipulación y agitación suave no se producen alteraciones morfológicas significativas en los eritrocitos.

## IX. REFERENCIAS

1. Padilla C. Utilidad de la Gammagrafia Cardíaca en pacientes con duda diagnóstica de infarto agudo de miocardio. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Médicas), 1992. 79p.
2. Skoog D.A. Análisis Instrumental. 2 ed. México: McGraw-Hill, 1989. 806p.
3. Quintero C. Modificación de la marcación de eritrocitos autólogos con  $^{99m}\text{Tc}$  para la evaluación centelleográfica del sistema venoso profundo. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1992. 48p.
4. Portillo C. Control de Calidad de los Radiofármacos fabricados en el laboratorio de Radiofarmacia del Hospital General San Juan de Dios. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1987. 73p.
5. Goncalves AF, Herbert JC. Medicina Nuclear. Río de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 1979. 312p.
6. Kawada T, et al. Hospital Radiopharmacy training program. Am J Hosp Pharm 1975;32:587-589.
7. Saha G. Fundamental of Nuclear Pharmacy, 2ed. New York:Springer Verlag Inc., 1986. VIII + 287p.
8. Maisai M. Medicina Nuclear; Aspectos Clínicos. Barcelona:Doyma, 1983. 125p.
9. Fischer J, Wolf R. Medicina Nuclear en la Hematología. Fischer J, Leon A. Trad. Alemania: Hoechst, 1967. 137p..
10. Srivastava Sc, et al. Current State of the art of blood cell labeling. J Nucl Med.1986;18:475-476p.
11. Arteaga de Murphy C. El tecnecio en la medicina nuclear. México: Sociedad Mexicana de Medicina Nuclear, 1989. 397p.
12. Tubis M, Wolf W. Radiopharmacy. USA: Wiley Interscience. 1986. 911p.
13. de Castiglidi G et al. Control de calidad de Radiofármacos usados en medicina nuclear. Act Bioq Clin Lat 1982;16(2):307-310
14. Subramian G et al. Radiopharmaceutical. Soc of Nucl Med Inc 1975;485:95-96.
15. León A. Radiofármacos de  $^{99m}\text{Tc}$ : Primer curso regional de producción y control de radiofármacos. Centro de Investigaciones Nucleares de Uruguay 1983;85:14-16.

16. Masjhur JS. Nuclear Haematology. Handbook of Nuclear Medical Practice un Developing Countries. Viena: 1991. 764p.
17. Freire DY. Presentación del estado actual de la Radiofarmacia en Guatemala. Primera Reunión de Coordinación Arcal XV, Producción y control de Radiofármacos. Cartagena Colombia. Oct,1993.
18. Schelbert H. Cardiovascular III. Miocardial Metabolism, ischemia and tomographic imaging. J Nucl Med.1981;22:10.
19. Wahl R, Lee M. Increased Genital Uptake of  $^{99m}\text{Tc}$  RBC; a potencial Cause of false-positive studies for gastrointestinal bleeding. Eur Nucl Med. 1984;9:245-246.
20. Lender K.  $^{99m}\text{Tc}$  Labeled Red Blod Cells for the Measurement of Red Cell Mass in Newborn Infants. J. Nucl Med. 1980;21:637-640.
21. Gil MC. Marcación de Células. Seminario de Marcación de Células. Programa Arcal XV. Producción y Control de Radiofármacos OIEA. Comisión Chilena de Energía Nuclear. Sept 1993.
22. Herring A, et al. Estandarización de un método para la marcación de eritrocitos autólogos in vitro con pirofosfato de sodio y estaño. Guatemala: Universidad de San Carlos (trabajo de investigación. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1993. 54p.
23. Patel M, et al. Labeling of red blood cells with  $^{99m}\text{Tc}$  after oral administration of  $\text{SnCl}_2$ ; concise communication. J Nucl Med 1979;5:877-881.
24. Thrall J. et al. Clinical comparison of cardiac blood visualization with  $^{99m}\text{Tc}$  human serum albumin. J Nucl Med 1985;26:1408-1411.
25. Brite D. Radionuclide activity in gallbladder. J Nucl Med 1985;26:1408-1411.
26. Heidendart G, et al. Reproducibility of ejection fraction measurements by gated equilibrium blood pool scintigraphy. J Nucl Med 1983;8:467-470.
27. Darnell J, Lodish H, Baltimore D. Molecular Cell Biology. New York: Scientific American Books, 1986. XXXV+1187p.
28. Lehninger AL. Bioquímica: las bases moleculares de la estructura y función celular, 2 ed. Calvet F, Bozal J. trad. Barcelona: Ed Omega S.A. 1981. XXIII+117p.
29. Callahan RJ, Rabito CA. Radiolabeling of Erythrocytes with Technetium-99m: Role of Band-3 Protein in the Transport of Pertechnetate Across ther Cell Membrane. J Nucl Med 1990;31:2004-2010.
30. Phan T, Ling M, Wasnich R. Practical Nuclear Pharmacy, 3ed. Hawaii:Banyan Press. 160p.



31. CIEN-ALASBIMN, ed. Manual de controles radiofarmacéuticos. Washington: Secretaría general, Organización de los Estados Americanos, Doc.Tec.No.9. 1982. 115 p.

32. Kristensen K, The Quality of radiopharmaceuticals: A review of corrent problem XIII International. Annual Muting Society of Nucl Med Denmark 1975;15:134-136.

33. Vivian A et al, Procedure Manual Radiochemical purity if radiopharmaceuticals using Gelman sprachrom (ITLC) cromatography. Ann Arbor MI Gelman Sciences 1977;3:56.

BOYAMA .X

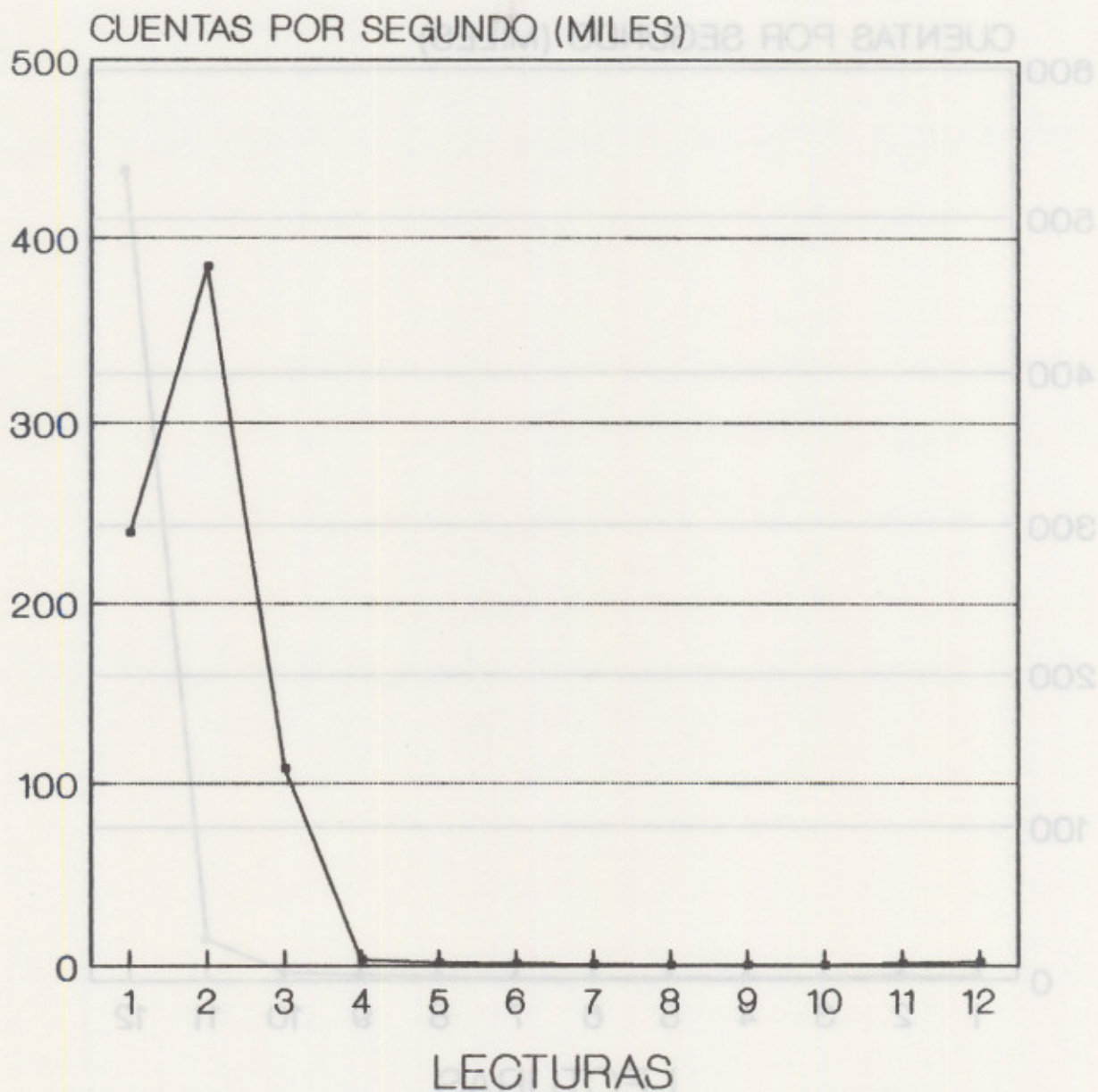
31. CIRN-ALABRINI, ed. Manual de controles radiofarmacéuticos. Washington: Secretaría General, Organización de los Estados Americanos, Doc.Tec.No.9. 1982. 112 p.

32. Kristensen K. The Quality of radiopharmaceuticals: A review of current problem XIII International. Annual Meeting Society of Nucl Med Denmark 1975;15:134-136.

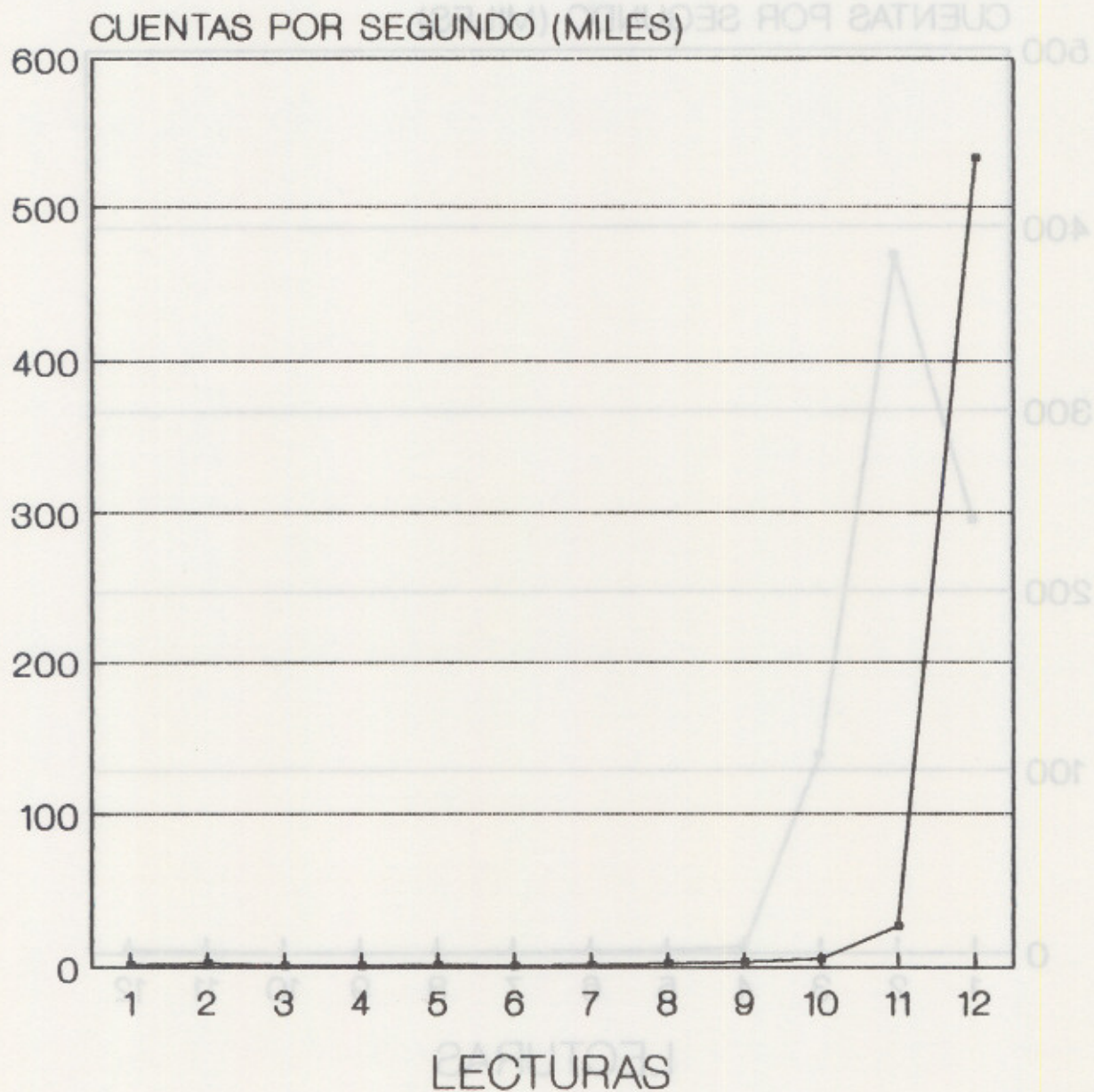
33. Vivian A et al. Procedures Manual Radiochemical purity of radiopharmaceuticals using Gelman apparatus (ITLC) chromatography. Ann Arbor MI Gelman Sciences 1977;3:26.

**X. ANEXOS**

GRAFICA No. 1  
CONTROL DE PUREZA RADIOQUIMICA  
CROMATOGRAFIA ITLC - ACETONA



## GRAFICA No. 2 CONTROL DE PUREZA RADIOQUIMICA CROMATOGRAFIA ITLC-SOLUCION SALINA



GRÁFICA No. 3

TABLA No. 1

**PORCENTAJES DE MARCACIÓN  
OBTENIDOS CON LAS DIFERENTES DILUCIONES DEL FÁRMACO INICIAL**

NUMERO DE MUESTRA	DILUCIÓN	PORCENTAJE DE MARCACIÓN
1	CONTROL	42.60
2	1:2	62.55
3	1:5	90.67
4	1:10	93.45
5	1:20	95.44
6	1:25	92.22
7	1:30	92.99
8	1:40	93.14

GRAFICA No. 3

# PORCENTAJES DE MARCACION DILUCIONES DEL FARMACO INICIAL

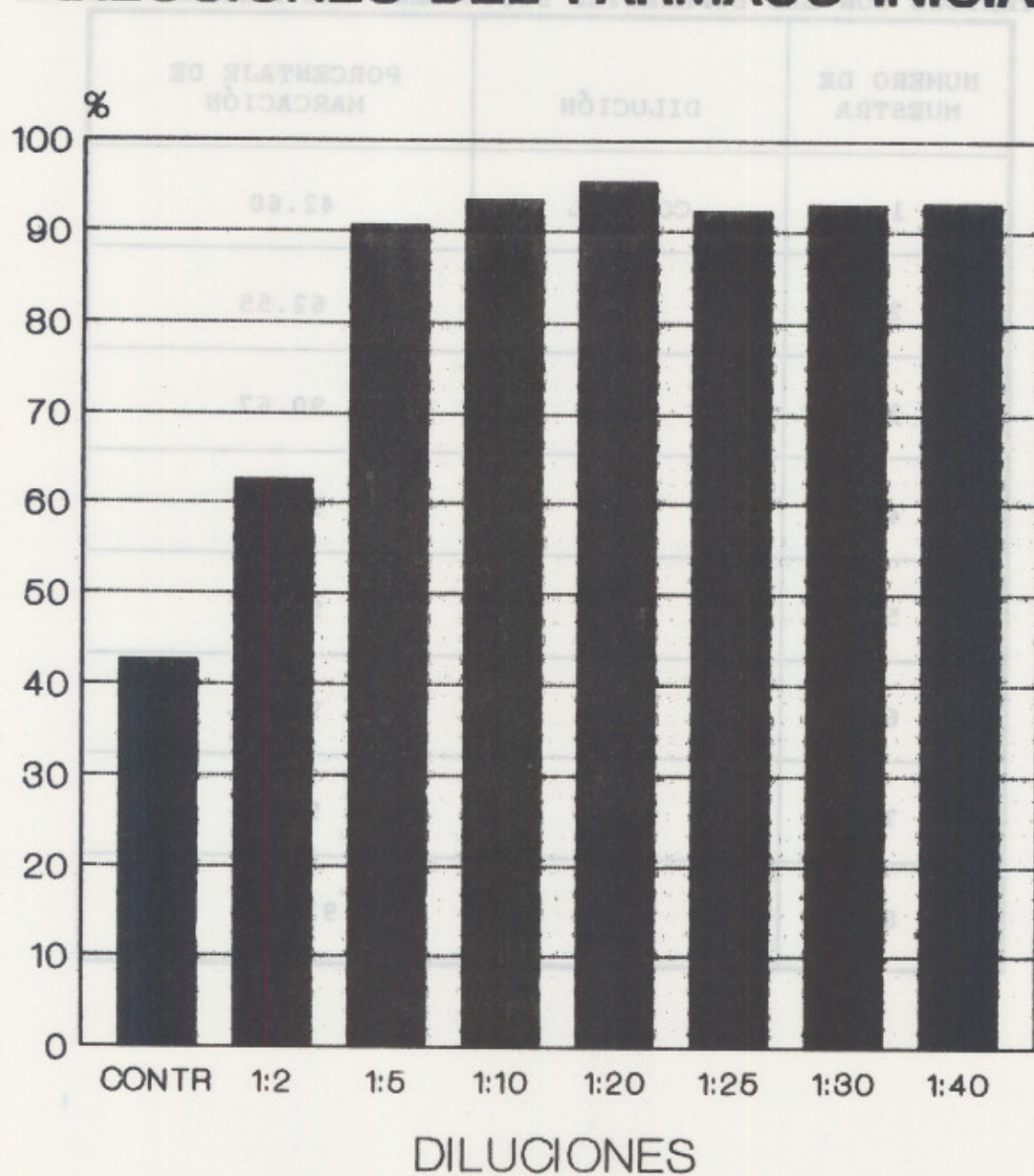


Tabla No. 2

PORCENTAJES DE MARCACIÓN DE ERITROCITOS  
MÉTODO *in vitro* CON CITRATO-<sup>59</sup>Tc

NUMERO DE MUESTRA	PORCENTAJE DE MARCACIÓN	NUMERO DE MUESTRA	PORCENTAJE DE MARCACIÓN
1	96.15	11	96.63
2	96.15	12	96.46
3	96.72	13	96.29
4	97.05	14	95.37
5	96.46	15	96.33
6	96.81	16	96.40
7	96.54	17	97.02
8	95.62	18	97.07
9	97.64	19	97.08
10	97.38	20	97.29

$$\bar{x} = 96.62 \pm 0.57$$

**TABLA No. 3**

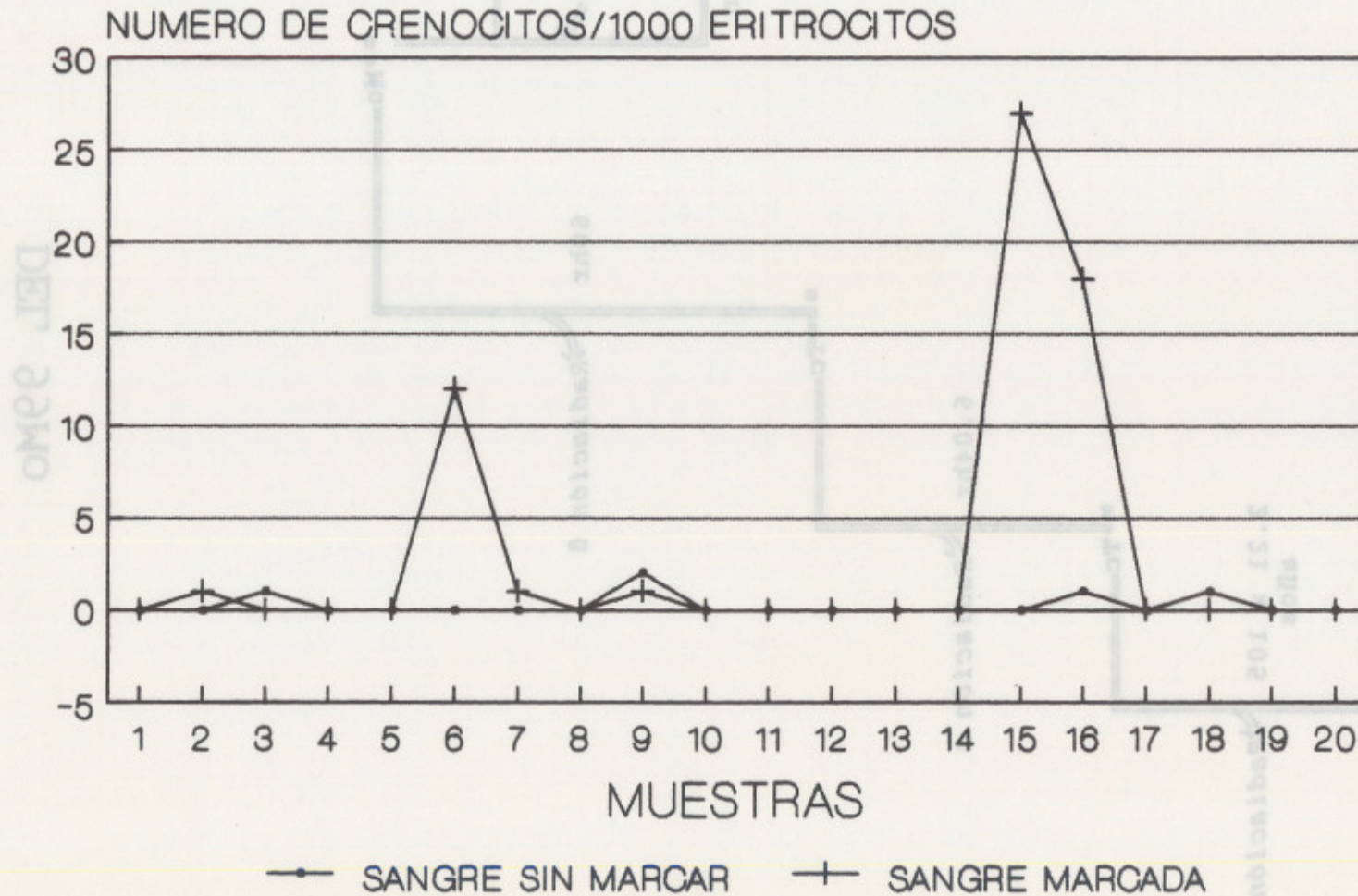
**NUMERO DE CRENOCITOS POR MIL ERITROCITOS  
EN MUESTRAS DE SANGRE ANTES Y DESPUES DE LA MARCACIÓN**

No. DE MUESTRA	SANGRE SIN MARCAR	SANGRE MARCADA
1	0	0
2	0	1
3	1	0
4	0	0
5	0	0
6	0	12
7	0	1
8	0	0
9	2	1
10	0	0
11	0	0
12	0	0
13	0	0
14	0	0
15	0	27
16	1	18
17	0	0
18	1	0
19	0	0
20	0	0



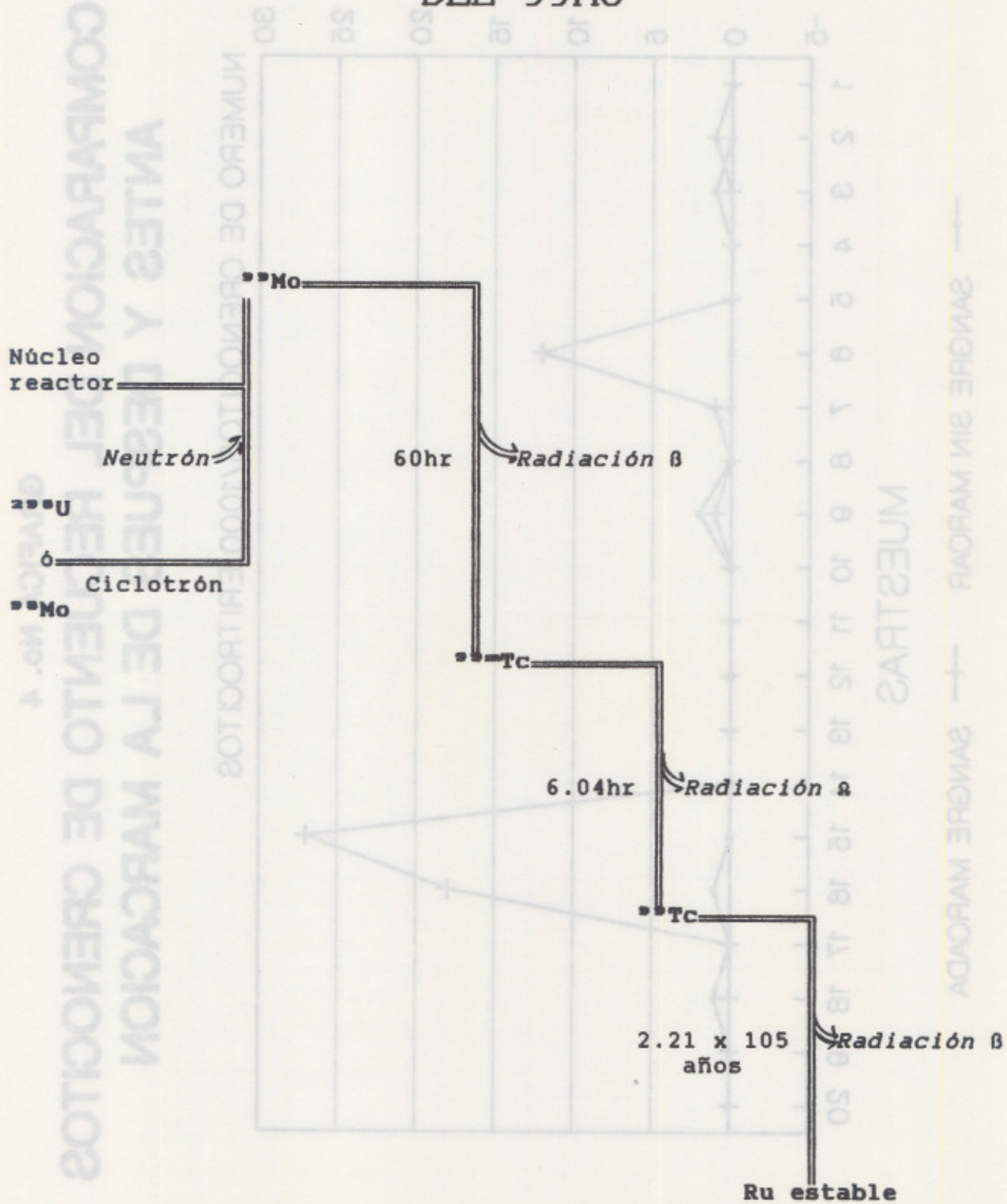
GRAFICA No. 4

# COMPARACION DEL RECUENTO DE CRENOCITOS ANTES Y DESPUES DE LA MARCACION



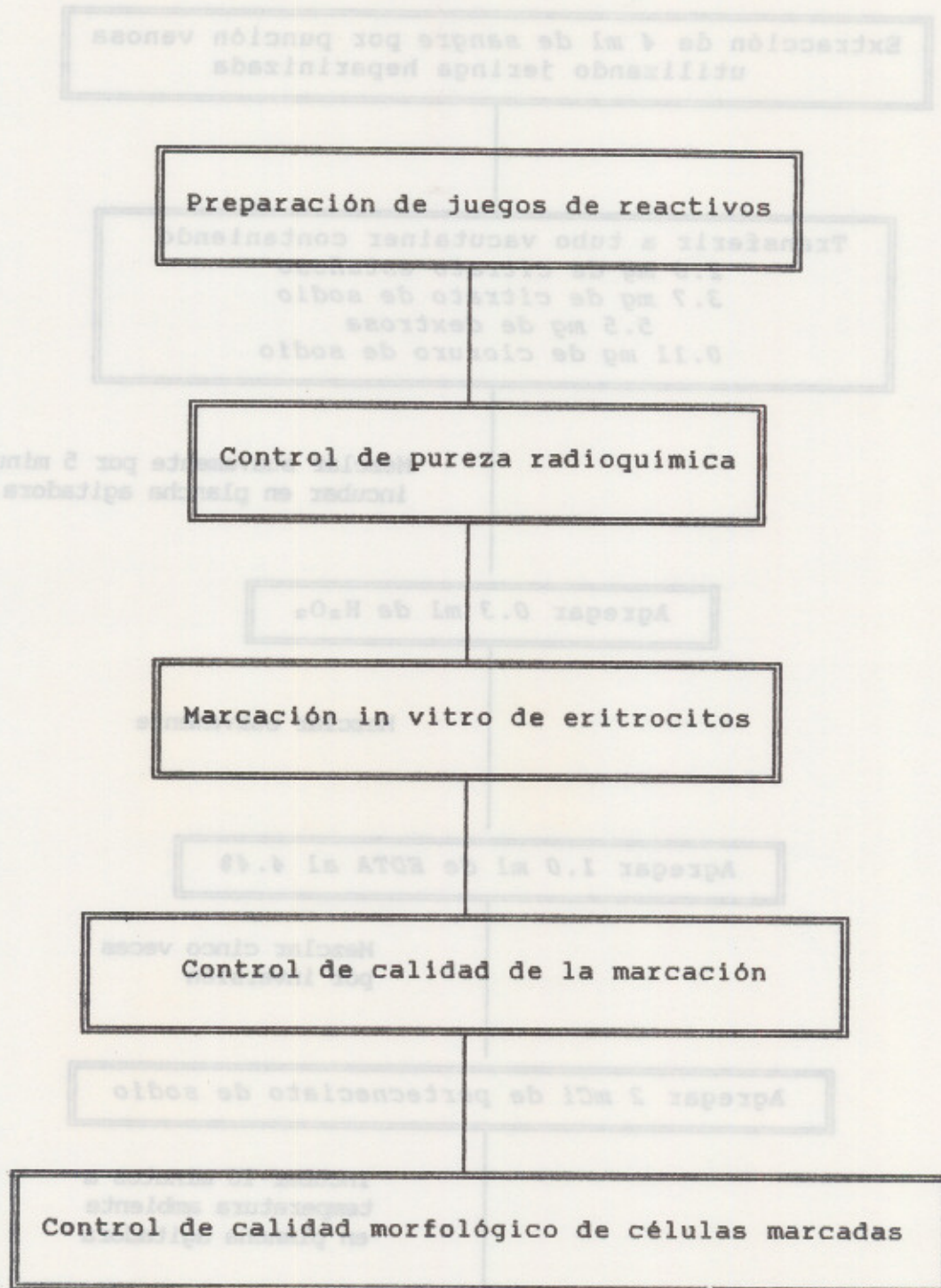
# B. DIAGRAMA DE SÍNTESIS Y DECAIMIENTO

## DEL $^{99}\text{Mo}$

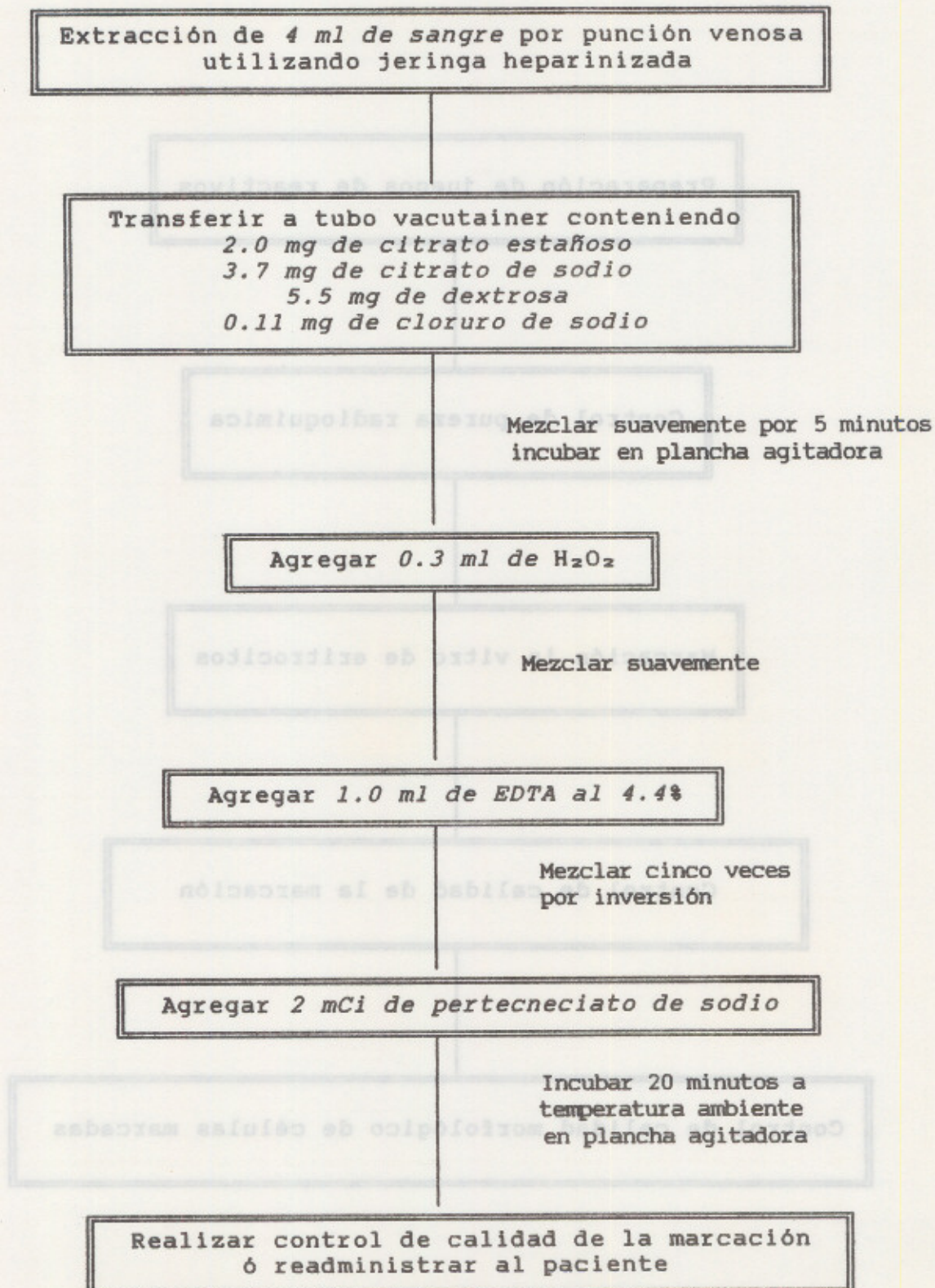


D. MÉTODO DE MARCACIÓN DE ERITROCITOS  
AUTÓLOGOS *in vitro* CON CITRATO- $^{59}\text{Fe}$

### C. PROCEDIMIENTO



## D. MÉTODO DE MARCACIÓN DE ERITROCITOS AUTOLOGOS *in vitro* CON CITRATO-<sup>99m</sup>Tc



## E. HOJA DE RESULTADOS

### Marcación de eritrocitos autólogos in vitro con citrato-99mTc

Número de donador	Ht	Radiactividad en el sobrenadante (mCi)	Radiactividad en los eritrocitos (mCi)	Porcentaje de marcación
1	40	0.08	2.00	96.15
2	40	0.09	2.25	96.15
3	45	0.08	2.36	96.72
4	39	0.06	1.98	97.05
5	43	0.08	2.18	96.46
6	45	0.050	1.52	96.81
7	42	0.11	3.07	96.54
8	46	0.13	2.84	95.62
9	50	0.057	2.36	97.64
10	41	0.064	2.38	97.38
11	44	0.080	2.30	96.63
12	43	0.081	2.21	96.46
13	41	0.095	2.47	96.29
14	48	0.113	2.33	95.37
15	42	0.104	2.73	96.33
16	40	0.078	2.09	96.4
17	39	0.062	2.02	97.02
18	47	0.050	1.67	97.07
19	45	0.055	1.83	97.08
20	42	0.070	2.52	97.29

# E. HOJA DE RESULTADOS

Marcesión de extracción sulfópica  
 la villa con citrato-25%  
 1954

Número de donador	HC	Radioactividad sobreabundante (mCi)	Radioactividad en los extracciones (mCi)	Porcentaje de marcesión
1	40	0.08	2.00	98.15
2	40	0.09	2.15	98.15
3	42	0.08	2.38	98.72
4	39	0.08	1.98	97.05
5	43	0.08	2.18	98.48
6	42	0.050	1.52	98.81
7	42	0.11	2.07	98.84
8	46	0.12	2.84	98.82
9	50	0.057	2.38	97.64
10	41	0.064	2.38	97.38
11	44	0.080	2.30	98.62
12	43	0.081	2.21	98.48
13	41	0.092	2.47	98.29
14	46	0.112	2.32	98.37
15	42	0.104	2.72	98.32
16	40	0.078	2.09	98.4
17	39	0.082	2.02	97.02
18	47	0.050	1.87	97.07
19	42	0.052	1.82	97.08
20	42	0.070	2.52	97.28

1954  
 Laboratorio Central