

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

**ESTABILIZACION DE HEXAMETAZIMA MARCADA
CON TECNECIO 99-METAESTABLE (^{99m}Tc) CON CLORURO DE COBALTO
HEXAHIDRATADO PARA LA MARCACION DE LEUCOCITOS**



Para Optar al Título de

QUIMICA FARMACEUTICA

Guatemala, octubre de 1996

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD
Biblioteca

DE GUATEMALA
1996

DW
Op
TL1737D

**JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

DECANO: LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR

SECRETARIO: LIC. FEDERICO NAVE HERRERA

VOCAL I: MIGUEL ANGEL HERRERA GALVEZ

VOCAL II: LIC. GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN

VOCAL III: LIC. RODRIGO HERRERA SAN JOSE

VOCAL IV: Br. ANA MARIA RODAS CARDONA

VOCAL V: Br. HAYRO OSWALDO GARCIA GARCIA

ACTO QUE DEDICO

- A DIOS Por todas su bendiciones y haberme permitido alcanzar ésta meta.
- A MIS PADRES ALFREDO OLIVA VELIZ
ANGELA PALENCIA SANABRIA
Por el apoyo que me han brindado.
- A MI HERMANO HECTOR ALFREDO OLIVA PALENCIA
- A MIS AMIGOS BRENDA TELLO, ROCIO ARREAGA, ANA BEATRIZ
CORDERO, RICARDO AJQUIJAY, CLAUDIA LAU,
INGRID BAUTISTA, EDGAR ESTRADA, VILMA DE
LEON, SERGIO HERNANDEZ, JULIO
CHINCHILLA, JULIO MONTENEGRO.
- A MIS COMPAÑEROS DE TRABAJO BLANCA ROSA ROMERO, PEDRO REINA.
- A MI PATRIA GUATEMALA
- A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
- A LA FACULTAD DE CCQQ Y FARMACIA

AGRADECIMIENTOS

- A LICDA. DIANA FREYRE DE NAVE
Por el apoyo y asesoría brindados para la realización de este trabajo.
- A LICDA. CLAUDIA QUINTERO
Por toda su colaboración y ayuda.
- A DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y RADIOFARMACIA DE LA
DIRECCION GENERAL DE ENERGIA NUCLEAR
- A DEPARTAMENTO DE MEDICINA NUCLEAR DEL HOSPITAL GENERAL SAN
JUAN DE DIOS

Por su valiosa colaboración

INDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCION.....	2
3. ANTECEDENTES.....	3
4. JUSTIFICACIONES.....	20
5. OBJETIVOS.....	21
6. HIPOTESIS.....	22
7. MATERIALES Y METODOS.....	23
8. RESULTADOS.....	31
9. DISCUSION DE RESULTADOS.....	33
10. CONCLUSIONES.....	35
11. RECOMENDACIONES.....	36
12. BIBLIOGRAFIA.....	37
13. ANEXOS.....	44

1. RESUMEN

En el presente estudio se trabajó con hexametilpropilen amino oxima (HM-PAO), radiofármaco de marcación leucocitaria marcándolo con ^{99m}Tc recién adquirido de la segunda elución de un generador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, añadiendo cloruro de cobalto hexahidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en concentraciones de $0\mu\text{g/ml}$, $100\mu\text{g/ml}$ y $200\mu\text{g/ml}$, como agente estabilizante con el objeto de establecer si prolonga la vida útil de éste costoso radiofármaco por más de 5 minutos. Para ello se realizó la determinación de la pureza radioquímica a los 5, 60, 120 y 180 minutos luego de la marcación y se efectuó el marcaje de leucocitos con control de calidad de las células luego de la marcación comparadas contra un control.

Los resultados obtenidos para la pureza radioquímica fueron analizados por medio de análisis de varianza (ANDEVA), la prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD) y comparaciones múltiples por medio de la prueba de Scheffé. Encontrándose que el mejor tratamiento es en el que se agregaron $100\mu\text{g/ml}$ de cloruro de cobalto hexahidratado al ^{99m}Tc -HM-PAO dado que prolonga la estabilidad del radiofármaco luego de la marcación a un tiempo de 60 minutos.

Los resultados de marcación leucocitaria se analizaron por medio de análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba de la mínima diferencia significativa de Fisher (LSD). Concluyendo que el agregado de cloruro de cobalto hexahidratado no afecta el porcentaje de marcación celular, lo que indica que puede ser utilizado para realizar estudios centellográficos.

El control de calidad efectuado a los leucocitos marcados indicó que la adición de cloruro de cobalto hexahidratado al ^{99m}Tc -HM-PAO no altera su morfología y función, demostrándose que tanto la viabilidad como la forma se conservan en más de un 90%.

2. INTRODUCCION

La hexametilpropilenaminoxima (HM-PAO), es el derivado más lipofílico de la aminoxima y es ampliamente utilizado para la marcación de leucocitos y estudios de perfusión regional cerebral, reportándose excelentes resultados frente a otros radiofármacos. No obstante, existen desventajas en el uso de éste radiofármaco, como baja estabilidad después de reconstituido el set con ^{99m}Tc y su elevado costo.

Por ello se han buscado métodos para aumentar la estabilidad y aprovechar al máximo el radiofármaco reconstituido, se han reportado resultados satisfactorios al agregar cloruro de cobalto hexahidratado al ^{99m}Tc -HM-PAO (1).

En el presente estudio se usaron sets de HM-PAO producidos comercialmente, marcados con ^{99m}Tc recién adquirido de la segunda elución de un generador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$. Se estudiaron tres tratamientos, agregando cloruro de cobalto hexahidratado en concentraciones de $0\mu\text{g/ml}$, $100\mu\text{g/ml}$ y $200\mu\text{g/ml}$ al ^{99m}Tc -HM-PAO y por medio de extracción por solventes se obtuvo el porcentaje de marcación a 5, 60, 120 y 180 minutos luego de la marcación y posteriormente se marcó la capa leucocitaria previamente separada de muestras sanguíneas obtenidas de donadores voluntarios sanos, efectuando control del porcentaje de marcación de dichos leucocitos, viabilidad y observación de características morfológicas después de marcados.

3. ANTECEDENTES

3.1 HISTORIA DE RADIONUCLIDOS USADOS EN MARCACION CELULAR

Varios autores han usado la marcación de fagocitos para detectar focos inflamatorios en casos de infección.

El criterio de una buena técnica de marcación es el siguiente: (a) alta eficiencia de marcación; (b) alta estabilidad (actividad permanente mostrada sobre las células marcadas); (c) alta especificidad celular (solo fagocitos polimorfonucleares deben mostrar marcación), y (d) viabilidad normal, especialmente luego de la quimiotaxis celular (2).

La medicina nuclear ha buscado el trazador ideal, para ello se han realizado numerosos estudios, siendo pocos los radionúclidos que cumplen con las condiciones necesarias para ser usados en la marcación leucocitaria.

3.1.1 Marcación con ^{51}Cr

Es uno de los primeros radionúclidos empleados con éxito en la marcación de leucocitos. Las características in vivo de los linfocitos de células animales han sido estudiadas inicialmente por la marcación de médula ósea con adenosina, uridina o timidina tritiadas y luego por marcación directa con ^{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 9 horas después de la reinyección. Gilleppe, Barth y colaboradores estudiaron la migración de linfocitos periféricos marcados con ^{51}Cr . Pero debido a las pobres características radiactivas del ^{51}Cr , su largo período de semidesintegración, mayor irradiación de paciente, baja eficiencia de marcación, imágenes de baja resolución y fotones de baja energía inadecuados para la cámara gamma, McAffe y colaboradores, Bagwe y otros investigadores designan al ^{51}Cr de poca elección para marcación de

leucocitos en diagnóstico de Medicina Nuclear (3- 7).

3.1.2 Marcación con ^{67}Ga

Desde los años sesenta el ^{67}Ga -citrato fué el radionúclido de elección para el rastreo corporal, para la localización de enfermedades inflamatorias. El ^{67}Ga se concentra en lesiones inflamatorias con una sensibilidad de 92% y especificidad de 89% (5).

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 concluyeron 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 presenta un bajo porcentaje de marcación (66%) (3,5,8-11).

3.1.3 Marcación con ^{111}In

Las 67 horas del período de semidesintegración del ^{111}In y la energía de sus fotones gamma (173 kev, 89% y 247 kev, 94%), lo hace un buen radionúclido para técnicas centellográficas (3).

La gammagrafía con leucocitos ^{111}In (L-In) es un método reconocido de bajo riesgo por la FDA (Oficina de Administración de Drogas y Alimentos), usado desde 1976 en forma rutinaria para el diagnóstico y localización de procesos infecciosos e inflamatorios en cuya fisiopatología exista infiltración leucocitaria (12, 13).

McAfee y Thakur ensayaron varias sustancias, unas solubles y otras de naturaleza particular para marcar neutrófilos. Los trazadores en forma de partículas

presentaban algunos problemas y el mayor de ellos fué la dificultad de separar las partículas radiactivas libres de aquellas células con partículas marcadas adheridas a la superficie. Los trazadores solubles sin embargo, permitían fácilmente la separación del trazador libre mediante centrifugación y posterior resuspensión de las células marcadas. De los agentes solubles probados, 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 de que ocurriera el marcaje intracelular (12,13).

Un quelato con el que no ocurrió este fenómeno y marcó las células eficientemente fué el ^{111}In -oxina. La oxina u 8-hidroxiquinoleína, es un ligante lipofílico bidentado quelante de iones metálicos bi o trivalentes incluyendo al ^{111}In .

La oxina forma complejos 3:1 con el ^{111}In que tiene una carga neta nula. La dosis letal media en animales es 67 mg/kg de peso. La dosis máxima de oxina que se inyecta en humanos con leucocitos marcados es inferior a 150 μg . Esto significa un factor de seguridad de aproximadamente 3×10^4 (3,5,14,15).

La oxina forma un complejo soluble en lípidos con el ^{111}In , que penetra en forma rápida la membrana celular. La unión intracelular del complejo es estable in vivo más de 24 horas. 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 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 glóbulos blancos es de 75 a 80% y la viabilidad de estas células al usar la prueba de azul de tripan es de 80 a 90% (3,14-19).

La troponolona o 2-hidroxi-2,4,6-cicloheptatrieno-1 es un quelato lipofílico y forma complejos 3:1 con el ^{111}In , con una marcación celular indiscriminada. McAfee y colaboradores encontraron una actividad similar al ^{111}In -oxina. Peters y colaboradores, concluyeron que después de la inyección de células marcadas, la rápida y transitoria acumulación de neutrófilos marcados en el pulmón es menor con tropolona que con oxina. Además se obtiene un porcentaje de marcación de 50-80% en una mezcla de leucocitos y la dosis letal media en ratas es de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso (3,15,18,20).

Otro quelato lipofílico para marcar leucocitos con ^{111}In es el 1-óxido-2-mercaptopiridina, estable en solución acuosa hasta por una semana. Este compuesto inicialmente fué propuesto por Thakur y Barry para marcar plaquetas, obteniendo un porcentaje de marcación de 82% al utilizarlos para marcar neutrófilos pero la experiencia en el uso de este quelato es poca (3,21).

3.1.4 Marcación con $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

El $^{99\text{m}}\text{Tc}$ fué introducido en el uso clínico por Harper y col. en 1964 y desde entonces ha alcanzado gran difusión y hoy día es el radionúclido más utilizado en la preparación de radiofármacos para diagnóstico (22).

Los radiofármacos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ constituyen casi el 80% de los que se utilizan para diagnóstico en Medicina Nuclear.

Este radionúclido ocupa un lugar tan importante en el uso clínico gracias a sus características físicas, como su período de desintegración de 6 horas y la ausencia de radiación beta, lo que permite administrar dosis altas sin causar gran irradiación al paciente. Su energía gamma de

140 kev es la ideal para la gamma cámara. A estas ventajas se suma la facilidad de obtenerlo a partir de un generador en forma estéril y libre de pirógenos (22).

Sus propiedades químicas le permiten combinarse con otros elementos en una gran variedad de radiofármacos, aunque a pesar del avance de estos últimos años todavía queda mucho por aclarar en las reacciones químicas en tan bajas concentraciones (22).

Además, con el ^{99m}Tc las imágenes son obtenidas de 2 a 4 horas, en contraste con las 18 a 24 horas necesarias para el ^{111}In (23).

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, el marcaje de leucocitos con ^{99m}Tc ha sido desde hace muchos años uno de los objetivos más perseguidos dadas las ventajas que ofrece sobre el ^{111}In : (a) menor dosis de radiación al paciente; (b) disponibilidad; (c) calidad de imágenes, y (d) coste, fundamentalmente (19,22,24).

El generador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ se eluye con solución fisiológica que extrae el ^{99m}Tc como pertecneciato de sodio ($^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$) en una concentración de 10^{-9} moles. El ión pernectato obtenido en el eluido es la forma más estable del tecnecio en solución. La reconstitución de radiofármacos con tecnecio requiere, generalmente, una reducción del pernectato (valencia +7) a estados más bajos (+1 a +4).

Después de la reducción del pernectato, el radionúclido puede formar gran variedad de complejos (23).

Al utilizar este radionúclido en marcación celular, los mecanismos para que esta ocurra se clasifican en tres categorías generales:

- (a) Reducción intracelular del $^{99m}\text{TcO}_4^-$ con Sn^{+2} ,
- (b) Fagocitosis de partículas marcadas con ^{99m}Tc

para neutrófilos y monocitos,

- (c) Agentes quelantes liposolubles que penetran la membrana de lípidos de los leucocitos,

De estos métodos, el segundo y tercero no requieren de la separación de los demás elementos sanguíneos (24-28).

3.1.5 Radiofármacos de ^{99m}Tc

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

Empleando fluoruro de estaño en la fagocitosis de partículas se logran porcentajes de marcación de leucocitos en sangre completa de aproximadamente 45% y de leucocitos en capa leucocitaria de aproximadamente 55%, con una viabilidad leucocitaria de 95% (3,25-28).

El pirofosfato usando el método de preestannización muestra un porcentaje de marcación de 30-35% y buena viabilidad, aunque se encontró actividad abdominal difusa. Entre los principales leucocitos estudiados estan los leucocitos polimorfonucleares (25).

El coloide del cloruro de estaño ha sido ampliamente estudiado por los investigadores. Entre ellos estan los estudios de permeabilidad de membrana por Glenn y col., el estudio de correlación entre la cantidad de estaño y el porcentaje de marcación hecho por Bagwe y col. El porcentaje de marcación obtenido para leucocitos en sangre completa es de aproximadamente 80% y el porcentaje de recuperación en capa leucocitaria es de aproximadamente 87%, con una viabilidad de leucocitos de 95% (7,28,29,30,31).

Empleando marcación de neutrófilos con sulfuro coloidal, se obtuvo una actividad en la recirculación menor, lo cual provocó imágenes difusas. El rendimiento de marcación fué de aproximadamente 81% siendo para granulocitos de 42% y para monocitos de 39% (5,32).

Marcus y col. desarrollaron un método de marcación de leucocitos utilizando un set de albúmina coloidal, del 20 al 30% del coloide marcado quedó dentro de la célula. Las infecciones agudas se visualizaron en 30 minutos y las infecciones crónicas en horas. El porcentaje de marcación obtenido fué de 60 a 90% (33).

Otros compuestos utilizados para marcación de leucocitos son Metilendifosfonato (MDP), citrato, oxina, tropolonato, ácido dihidrobenzoico, glucoheptonato.

En muchos países las marcaciones con estos compuestos han sido deficientes, pero en las experiencias registradas en Guatemala se han registrado buenos resultados con el fluoruro y con el coloide del cloruro de estaño (3,25,28,34).

3.2 HEXAMETIL PROPILEN AMINO OXIMA (HM-PAO)

La HM-PAO es una sustancia lipofílica que forma un complejo neutro con ^{99m}Tc después de la reducción con el ión Sn^{+2} . La Oficina de adopción de nombres de Estados Unidos, por sus siglas en inglés USAN, emplea el término "hexametazima" para esta sustancia. HM-PAO existe en dos estereoisómeros, d,l-HM-PAO y meso-HM-PAO. Se utiliza en estudios de perfusión cerebral y marcación leucocitaria, siendo la marcación más alta con la forma isomérica d,l que con la meso, y la primera debe ser separada de la meso por repetida cristalización antes de formar el complejo con $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (4,35,36).

Cristalografía de rayos X del complejo muestra que el Tc^{5+} tiene grupos de coordinación con un grupo oxo en el extremo superior y cuatro átomos de nitrógeno en las

esquinas de una pirámide. La pérdida de hidrógenos de dos grupos amino y un grupo oxima en el ligando, resulta en un complejo neutro, (estructura de $^{99m}\text{Tc-HM-PAO}$ en anexo No. 1) (35).

Sets comerciales dispensados en una dosis pueden obtenerse de MediPhysics/an Amersham Company con el nombre comercial de Ceretec[®]. El set esta como un liofilizado de una mezcla de hexametazima (d,l-HM-PAO puro) y cloruro de estaño. La adición de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ a los viales del set tiene una excelente marcación del 80% $^{99m}\text{Tc-HM-PAO}$. Existen restricciones en la calidad del $^{99m}\text{TcO}_4^-$ usado, el cual no debe de ser de más de 2 horas después de la elución del generador que ha sido eluido en las pasadas 24 horas (35).

El $^{99m}\text{Tc-HM-PAO}$ es el primer agente de ^{99m}Tc aprobado por la FDA (Oficina de Administración de Drogas y Alimentos), para imágenes de perfusión cerebral. El agente se ha extendido para el uso en rutinas clínicas en medicina nuclear. No solo es un agente lipofílico capaz de penetrar la barrera hematoencefálica intacta, sino que también muestra una alta inestabilidad in vivo. Reacciona en segundos después de la inyección intravenosa probablemente con el glutatión celular y es atrapado dentro del cerebro; así, cumple los criterios básicos para usarse como agente de imágenes de perfusión cerebral. La pobre estabilidad in vitro del núcleo del tecnecio, frecuentemente hace que este sea poco confiable, pero la inestabilidad es el mayor mecanismo responsable de la retención cerebral (3,36).

El valor clínico de la medición del flujo sanguíneo regional cerebral (rCBF) ha sido ampliamente reconocido.

Las variaciones locales de la circulación se han asociado con muchas enfermedades cerebrales como golpes, tumores, epilepsia y demencia (37).

El complejo primario $^{99m}\text{Tc-HM-PAO}$ es formado después de la adición del $^{99m}\text{TcO}_4^-$, el set es lipofílico y se

mezcla con la sangre de la barrera cerebral. Sin embargo este rendimiento baja con el tiempo, ya que el complejo secundario menos lipofílico se forma en mayor cantidad y muestra menor captación cerebral. Como resultado la marcación ^{99m}Tc -HM-PAO debe ser usada en los 30 minutos después de la preparación. También es necesario un estricto control usando cromatografía en capa fina para averiguar la eficiencia de la marcación (mayor de 80%) (35,38).

En los trabajos recientes con relación a la marcación de leucocitos se usan quelatos lipofílicos, pero de los agentes utilizados los mejores resultados fueron obtenidos con HM-PAO utilizado inicialmente en estudios de flujo sanguíneo cerebral (13).

El mecanismo de la técnica es similar al mecanismo que ocurre al usar el método de marcación con ^{111}In -oxina. La HM-PAO es un complejo neutro lipofílico que reduce al TcO_4^- por el estaño presente y unido al ^{99m}Tc pasa fácilmente al interior de las células (12).

La estabilidad de las células in vitro 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 debido probablemente a una rápida conversión del quelato lipofílico a productos hidrofílicos en presencia de glutatión. Sin embargo se observa una elución precoz del trazador (aproximadamente 10%), probablemente debida a una pequeña fracción unida a la membrana y fácilmente liberada por centrifugación y lavado (13,39).

Al añadir in vitro una fracción mixta de leucocitos se logra un marcaje casi selectivo o específico que solo precisa la separación de la fracción mixta, reportándose una mayor afinidad en la marcación de granulocitos (51%), en menor cantidad a los mononucleares y plaquetas (46%) y una pequeña cantidad se fija a los hematies (2.9%)

(13,39). La cinética in vivo y la biodistribución de los leucocitos muestra que la recuperación a los 45 minutos de inyección es del 37-40% y su período de semidesintegración en sangre es de 6 horas (39).

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 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. Continúa apareciendo en hígado, bazo y vejiga. La vesícula biliar aparece en un 10% de pacientes. A esta eliminación biliar se debe la actividad presente en el 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 (39).

La existencia de actividad a nivel del intestino y vías biliares 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. Esto 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 (39).

En la marcación de leucocitos con HM-PAO 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 (12,13,39-44).

Según Roddie y col. la sensibilidad de HM-PAO para la detección de focos inflamatorios es de 100% con especificidad del 95% (39,40).

El examen con leucocitos marcados con Ceretec[®] puede asistir en el manejo de individuos con sospechas o certeza de Enfermedad Inflamatoria Intestinal. El examen provee información sobre la presencia de enfermedad activa, la extensión y actividad de la enfermedad y también puede diferenciarse entre Enfermedad de Crohn's y Colitis Ulcerativa (45).

Otras aplicaciones de la marcación leucocitaria con Ceretec[®] son: (a) detección de infecciones abdominales, pudiendo determinarse si hay presencia de infección, particularmente cuando el ultrasonido o CT han identificado fluido colectado posiblemente séptico. La imagen funcional puede proveer información adicional y complementaria sobre la presencia, sitio y severidad de el foco infeccioso (46); (b) detección de infecciones en injertos vasculares. La infección por injerto vascular prostético es asociada con un alto rango de mortalidad y morbilidad. Como las consecuencias de infección del injerto pueden ser fatales, es importante establecer un correcto diagnóstico confiable y así puede iniciarse prontamente un período temprano de terapia (47); (c) detección de infección ortopédica. Información sobre la localización y extensión de ésta infección puede ser importante en la decisión entre un manejo conservador o acceso a cirugía del paciente (48).

No se han especificado contraindicaciones respecto al empleo de Ceretec[®]. Sin embargo, la administración de ^{99m}Tc-hexametazima no es recomendada durante el embarazo, excepto cuando el juicio médico indique la necesidad del

estudio. La lactancia debe discontinuarse después de su administración. Han sido reportados muy pocos casos de reacciones de hipersensibilidad, posiblemente de naturaleza anafiláctica, luego de la inyección intravenosa de leucocitos marcados con ^{99m}Tc preparado usando ^{99m}Tc -hexametazima. Es necesario hacer notar que los materiales usados en la separación celular talvéz causen las reacciones de hipersensibilidad. Es esencial que las células sean lavadas y esten libres de agentes sedimentantes antes de la reinyección al paciente (49).

Aplicando exámenes de toxicidad en ratas y conejos, no se encontraron efectos relacionados con el tratamiento. Las observaciones fueron hechas sobre el peso, signos clínicos, consumo de comida y agua, hematología, química sanguínea, oftalmología y análisis de orina (50).

Otro estudio de toxicidad realizado en ratas, reporta la ausencia de mortalidad o signos de toxicidad aplicando dosis equivalentes a 875 tiempos la dosis humana máxima (37).

Sin embargo, este radiofármaco presenta severas limitaciones en su uso, como alto costo, dificultad de obtener rendimientos de marcación superiores al 60% y extremada inestabilidad in vitro tras la adición del tecnecio al vial, lo cual conlleva un incremento del ^{99m}Tc -HM-PAO secundario hidrofílico y sobre todo un incremento del $^{99m}\text{TcO}_4^-$ a expensas del ^{99m}Tc -HM-PAO lipofílico reduciendo el porcentaje lipofílico para uso, por lo que requiere ser administrado en los primeros 30 minutos de reconstituido el vial, al respecto otro estudio indica que no es aconsejable utilizar el trazador 5-10 minutos después de la preparación (13,39,51,52).

El descenso del porcentaje de marcación de ^{99m}Tc -HM-PAO en función del tiempo limita la disponibilidad del radiofármaco una vez ha sido marcado. Esto podría obviarse por la adición de algún estabilizador (13).

Según Hung y col. la descomposición del ^{99m}Tc se acelera por el exceso de estaño (o defecto de agente quelante) o el pH elevado (mayor de 9), siendo además la forma d,l más inestable que la forma meso en solución acuosa (39).

Se han realizado numerosas investigaciones para encontrar agentes que actúen como estabilizantes del ^{99m}Tc -HM-PAO. La adición de Acido Gentísico a los sets reconstituidos muestra una efectiva estabilización del complejo. El Acido Gentísico actúa como antioxidante y como barredor de los radicales libres. Sin embargo, estos efectos son altamente dependientes del pH y fueron encontradas dificultades inesperadas al intentar incluir agentes buffer en las preparaciones (1, 53).

Una alternativa planteada, usando agentes quelantes débiles como pirofosfato de sodio puede extender la vida media aproximadamente a 2 h posiblemente por formación de complejos con Sn(II) y reduciendo su interacción con el complejo primario. La adición de etanol también se ha usado para mejorar la estabilidad in vitro a temperatura ambiente y altas temperaturas de almacenaje. La oxidación del exceso de Sn(II) usando solución diluida de hipoclorito es un medio sugerido para la estabilización de la preparación (1).

Otros trabajos que plantean la adición de iones metálicos que podrían formar complejos con HM-PAO también encontraron algún éxito. Los efectos de la adición de Fe(II), Zn(II), Cd(II), Mn(II), Ni(II) y Co(II) han sido estudiados. Co(II) obtuvo los mejores resultados (1).

La calidad del tecnecio utilizado en la marcación es fundamental a la hora de preparar el radiofármaco, de lo cual Neirinckx recomienda para obtener buenos rendimientos de marcación y aumentar la estabilidad, no marcar con más de 30mCi de tecnecio, no utilizar eluidos de generadores que no se hayan eluido en las pasadas 24 horas y no

utilizar el tecnecio luego de 2 horas de elución (50).

3.3 CLORURO DE COBALTO HEXAHIDRATADO ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

Se trata de cristales prismáticos monocíclicos de color rosado a rojo. Estructura reportada: $[\text{CoCl}_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Punto de fusión: 87°C , densidad: 1.924 (48,49).

El cloruro de cobalto hexahidratado es soluble en agua, alcohol, acetona, eter y glicerol. El pH de una solución 0.2M es 4.6. La solución acuosa rojo-rosada se torna azul al calentamiento o al agregar ácido clorhídrico o sulfúrico (54,55).

Dosis letal media en ratones: 200 mg/kg.

Toxicidad humana: alta concentración de cloruro de cobalto deprime la producción de eritrocitos. Puede causar la muerte en niños. Otros efectos incluyen enrojecimiento cutáneo, manchas en el pecho, dermatitis, náuseas y vómitos, depresión nerviosa, hiperplasia tiroidea, mixedema, congestión cardiaca, debilitamiento (54,55).

Usos: tinta invisible, indicador de agua y humedad, indicador de temperatura en molienda, preparación de catalíticos, estabilizador de espuma de cerveza, absorbente para gas venenoso y amonio y manufactura de cianocobalamina (54,55).

Un estudio reporta excelentes resultados empleando cloruro de cobalto hexahidratado como agente estabilizador del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HM-PAO. El mecanismo de acción del cloruro de cobalto como estabilizador del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HM-PAO es incierto. Sin embargo existe la hipótesis que los complejos de Co(III) , formados en solución por la reacción de O_2 con Co(II) , proveniente del CoCl_2 agregado, son posibles responsables de la oxidación del Sn(II) a Sn(IV) , el Sn se

encuentra incorporado al liofilizado de HM-PAO en forma de SnCl_2 , su función es actuar como agente reductor del $^{99\text{m}}\text{TcONa}$ formando $^{99\text{m}}\text{Tc}^{+5}$ para luego unirse al HM-PAO; ésta reacción origina la formación de radicales libres, que favorecen la inestabilidad del complejo, y se cree que una o más de las especies de Co(II) o Co(III) actúan con estos radicales libres (1).

3.4 CONTROL DE CALIDAD DE LEUCOCITOS MARCADOS

3.4.1 RECUENTO CELULAR

METODO DE LA RESISTENCIA ELECTRICA

El recuento celular es la determinación del número de células sanguíneas (hematias, leucocitos, plaquetas y eventualmente reticulocitos) por unidad de volumen sanguíneo. El recuento de hematias, plaquetas y leucocitos puede ser realizado mediante métodos ópticos con cámara cuentaglobulos (hematocitómetro) y microscopio óptico (MO) o mediante métodos electrónicos. Actualmente existen en el comercio instrumentos automáticos capaces de realizar los recuentos celulares mediante procedimientos electrónicos.

El método de la Resistencia Eléctrica, fué descrito primeramente por Coulter en 1956. Se fundamenta en el hecho de que las células son malas conductoras de la electricidad, al contrario de lo que sucede con los líquidos dilutores, tales como la solución salina fisiológica, que conducen bien la corriente eléctrica.

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

constante, pero cuando una célula sanguínea atraviesa el orificio, se produce un aumento de aquella y un cambio de potencial entre los electrodos, que permanece mientras la célula atraviesa el orificio (56).

3.4.2 VALORACION DE LA VIABILIDAD CELULAR

METODO DEL AZUL DE TRIPAN

El principio de éste método consiste en que las células muertas, debido a que carecen de membrana celular funcionando, permiten la difusión pasiva de colorantes vitales, como el azul de Tripán, desde el exterior hasta el citoplasma (56).

3.4.3 OBSERVACION MORFOLOGICA DE LEUCOCITOS MARCADOS

3.4.3.1 REALIZACION DEL FROTIS SANGUINEO

La técnica de realización del frotis debe ser impecable procurando que éste no sea excesivamente fino ni excesivamente grueso. Con ello se conseguirá una distribución adecuada de las células en diferentes áreas del frotis, cuyo conocimiento es fundamental tanto para la observación de la morfología eritrocitaria como para la realización de la fórmula leucocitaria o recuento diferencial de leucocitos.

Existen tres procedimientos para realizar el frotis sanguíneo: (a) método de los dos portaobjetos; (b) método de los dos cubreobjetos, y (c) método automático mediante extensor de frotis por centrifugación (Spinner) (56).

3.4.3.2 TINCION DEL FROTIS SANGUINEO

El frotis sanguíneo, una vez seco, se somete a un proceso de fijación y posteriormente a una tinción mediante un colorante adecuado. En la mayoría de laboratorios los colorantes más empleados para la tinción hematológica se basan en el de Romanowsky, constituido

fundamentalmente por la mezcla de eosina y azul de metileno.

El colorante de Romanowsky fué empleado por vez primera por este autor para teñir el núcleo del parásito de la malaria o paludismo. Para ello se basó en la idea de Ehrlich del llamado "teñido neutro", es decir, dejar que un colorante básico reaccione con otro ácido para dar lugar a un compuesto con nuevas propiedades.

Dentro del grupo de colorantes tipo Romanowsky, los más utilizados son el de Giemsa, el de May-Grunwald-Giemsa y el de Wright (56).

4. JUSTIFICACION

Actualmente en la radiofarmacia hospitalaria del Hospital General San Juan de Dios se están marcando glóbulos blancos con HM-PAO marcado con ^{99m}Tc . A pesar de ser el radiofármaco de elección en la marcación de leucocitos éste presenta inconvenientes tales como su alto costo y su baja estabilidad después de marcado, lo que limita su uso.

Con el presente estudio se pretende comprobar la efectividad del Cloruro de Cobalto Hexahidratado como estabilizante del HM-PAO marcado con ^{99m}Tc , empleando diferentes concentraciones de Cloruro de Cobalto y determinando su porcentaje de marcación a diferentes tiempos.

De obtenerse buenos resultados ésta será una buena alternativa para implementarla en la radiofarmacia hospitalaria, para aumentar el rendimiento del uso de sets de HM-PAO, lo que redundará en una considerable disminución de costos.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer si el uso de cloruro de cobalto hexahidratado constituye una alternativa viable para aumentar el tiempo de estabilidad del $^{99m}\text{Tc-HM-PAO}$, para la marcación de leucocitos.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

5.2.1 Determinar la concentración óptima de cloruro de cobalto hexahidratado necesaria para lograr una mayor estabilidad del $^{99m}\text{Tc-HM-PAO}$.

5.2.2 Determinar el porcentaje de marcación de los leucocitos con el $^{99m}\text{Tc-HM-PAO}$ estabilizado con cloruro de cobalto hexahidratado.

5.2.3 Elaborar las pruebas de control de calidad en la marcación de leucocitos para verificar si el proceso de marcación no altera su morfología y función.

6. HIPOTESIS

- 6.1 La adición de cloruro de cobalto hexahidratado a la solución de $^{99m}\text{Tc-HM-PAO}$, hace a este radiofármaco, estable por más de cinco minutos.
- 6.2 La adición de cloruro de cobalto hexahidratado al $^{99m}\text{Tc-HM-PAO}$, no disminuye el porcentaje de marcación de leucocitos, se mantiene mayor al 90%.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 UNIVERSO DE TRABAJO

Set liofilizado de HM-PAO marca Ceretec®.

7.2 MEDIOS

7.2.1 RECURSOS HUMANOS

Investigadora: Rosa María Oliva Palencia,

Asesora: Licda. Diana Freire de Nave,

Coasesora: Licda. Claudia Quintero.

7.2.2 RECURSOS INSTITUCIONALES

El presente trabajo se realizó en Radiofarmacia Hospitalaria del Departamento de Medicina Nuclear del Hospital General San Juan de Dios. Contando con la colaboración del personal profesional y técnico de dicho departamento.

7.3 MATERIALES Y EQUIPO

7.3.1 MATERIALES

- espátulas
- pipetas de vidrio de Thoma para dilución de glóbulos blancos
- portaobjetos
- cubreobjetos
- pipetas plásticas estériles de 1 ml
- agujas y mariposas de 19G
- micropipetas
- filtro bacteriológico de 0.22 micrómetros
- jeringas tipo insulina
- jeringas plásticas de 3, 5, 10 y 60 ml.
- tubos plásticos cónicos con tapadera de rosca de 50 ml FALCON
- papel para cromatografía ITLC-SG
- papel para cromatografía Whatman No. 1
- guantes
- tijeras

- gavacha plomada
- algodón
- cristalería en general
- contenedores plomados
- pinzas
- frascos multidosis
- cajas de petri
- dosímetro de película personal
- papel filtro
- papel pH

7.3.2 EQUIPO

- balanza analítica
- calibrador de dosis DELUXE ISOTOPE II
- contador de centelleo tipo pozo con detector de NaI
- centrífuga
- campana de flujo laminar horizontal
- incubadora
- microscopio de luz
- potenciómetro
- refrigerador
- cámara de Neubauer
- cámara cromatográfica
- horno
- agitador tipo péndulo

7.3.3 REACTIVOS

- set de HM-PAO marca Ceretec[®]
- solución salina 0.9%
- cloroformo
- solución de cloruro de cobalto hexahidratado
- anticoagulante Acido-Citrato-Dextrosa (ACD)
- azul de Tripán
- colorante Wright

- líquido diluyente para conteo de glóbulos blancos
- agua destilada estéril
- hidroxietilalmidón (HESPAN) 6%-DUPONT
- solución de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ de segunda elución, de un generador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ marca Amersham
- solución de acetonitrilo/agua 50%

7.4 PROCEDIMIENTO

7.4.1 PREPARACION DEL HM-PAO- ^{99m}Tc

- 7.4.1.1 Marcar un vial de Ceretec[®] con 5 ml de ^{99m}Tc aprox. 60mCi, de la segunda elución de un generador Amersham.
- 7.4.1.2 Añadir 1ml de Ceretec[®] - ^{99m}Tc a cada muestra:
- Tratamiento 1: Ceretec[®]+ 1 ml de solución salina.
Volumen final 2ml.
- Tratamiento 2: Ceretec[®]+ 100ug/1ml de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.
Volumen final 2ml.
- Tratamiento 3: Ceretec[®]+ 200ug/1ml de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.
Volumen final 2ml.
- 7.4.1.3 Usar 1 ml de cada muestra para el marcaje celular
- 7.4.1.4 Usar los 1.5 ml restantes para estabilidad, empleando el método de extracción por solventes, a los 5, 60, 120 y 180 minutos.

7.4.2 MARCAJE DE LEUCOCITOS ^{99m}Tc -HM-PAO

- 7.4.2.1 Extraer 50ml de sangre, agregar 6.5 ml de anticoagulante Acido-Citrato-Dextrosa (ACD).
Utilizar 5 ml para hemograma.
- 7.4.2.2 Añadir 6 ml de hespan y sedimentar por una hora.
- 7.4.2.3 Recuperar el preparado rico en leucocitos (PRL).
Utilizar 0.5ml para hemograma.
Centrifugar 5 minutos a 200 gravedades.
- 7.4.2.4 Separar el sobrenadante y resuspender el botón leucocitario en 3 ml de solución salina 0.9%.
- 7.4.2.5 Separar 3 muestras de 1 ml cada una.

- 7.4.2.6 A cada muestra añadir 1.5 ml de $^{99m}\text{Tc-HM-PAO}$.
Aproximadamente 15mCi.
- 7.4.2.7 30 minutos de incubación a temperatura ambiente.
- 7.4.2.8 Centrifugar, separar el botón leucocitario y sobrenadante. Calcular el porcentaje de marcación (% marcación):

$$\% \text{ marcación} = \frac{\text{actividad leucocitaria}}{\text{act. sobrenadante} + \text{act. leucocitaria}} \times 100$$

- 7.4.2.9 Lavar con 10ml de solución salina. Centrifugar y volver a calcular la eficacia de marcaje.
- 7.4.2.10 Resuspender el botón leucocitario en 4 ml de solución salina.
Tomar 0.5ml para hemograma y pruebas de morfología y viabilidad.

7.5 PUREZA RADIOQUIMICA: EXTRACCION POR SOLVENTES

- 7.5.1 En tubos de ensayo que contengan 1 ml de cloroformo y 1ml de solución salina 0.9% añadir 100ml de $^{99m}\text{Tc-HM-PAO}$ -cloruro de cobalto hexahidratado.
- 7.5.2 Esta mezcla se tapa y agita durante aproximadamente 1 minuto, dejar en reposo por 1 minuto para permitir la separación de fases.
- 7.5.3 La capa superior o fase acuosa (solución salina 0.9%), se transfiere con una pipeta a otro tubo y las actividades de cada uno son leídas en un calibrador de dosis.
- 7.5.4 La fracción presente de $^{99m}\text{Tc-HM-PAO}$ se calcula como la actividad de la capa inferior o fase orgánica dividida la actividad total de las capas. Mientras el tecnecio libre, el tecnecio reducido y el complejo secundario $^{99m}\text{Tc-HM-PAO}$

quedan en la fase acuosa, el $^{99m}\text{Tc-HM-PAO}$ por ser lipofílico se extrae con el cloroformo (fase orgánica).

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

7.6 VALORACION DE LA VIABILIDAD CELULAR: METODO DEL AZUL DE TRIPAN

A 50 μl de suspensión celular agregar 20 μl de Azul de Tripán 0.4% y 30 μl de solución salina 0.9%. Montar en la cámara de Neubauer para valorar el porcentaje de células muertas. Observar al microscopio de luz.

Los resultados serán reportados como porcentaje (%) de viabilidad:

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

Porcentaje de viabilidad aceptable \geq 90%

7.7 MORFOLOGIA

Se hicieron frotis de las muestras sanguíneas por el método de los dos portaobjetos, antes y después de la marcación con $^{99m}\text{Tc-HM-PAO}$. Observándose las placas teñidas con colorante de Wright al microscopio de luz.

Alteraciones celulares como degranulación o rompimiento de la membrana deben ser \leq al 10%.

7.7.1 Método de los dos Portaobjetos: consiste en la extensión de una gota de sangre sobre un portaobjetos empleando para ello el anto esmerilado de otro

portaobjetos de iguales dimensiones, siguiendo la metodología siguiente:

- Colocar una pequeña gota de sangre de no más de 3mm de diámetro sobre la superficie de un portaobjetos a 2cm aproximadamente de uno de sus extremos.
- Colocar el canto de otro portaobjetos esmerilado por la parte anterior a la gota de sangre sobre la superficie del primer portaobjetos, formando un ángulo de aproximadamente 45°, desplazando suavemente hacia atrás hasta que alcance la gota de sangre.
- Esperar a que por capilaridad toda la sangre se distribuya uniformemente. Es aconsejable que la sangre no llegue a los lados del portaobjetos sobre el que se realiza la extensión.
- Deslizar suavemente y a velocidad moderada un portaobjetos sobre el otro en sentido longitudinal, hasta que la gota de sangre quede bien extendida sobre la superficie del primer portaobjetos. El grosor del frotis sanguíneo se puede variar según sea el ángulo que forman entre si ambos portaobjetos. Así, si es superior a 45°, la extensión obtenida será gruesa y corta; por el contrario, si es inferior a 45°, será larga y fina.
- Secado del frotis a temperatura ambiente y en posición horizontal.

7.7.2 Tinción del Frotis Sanguíneo: Tinción de Wright

- Fijar las extensiones de sangre añadiendo sobre las mismas el volumen de colorante sin diluir durante 1 minuto.
- Añadir al colorante dos o tres volúmenes de agua destilada tampón o PBS (pH 6.8), procurando no desparramar la mezcla por fuera del portaobjetos.
- Mezclar bien la solución colorante con el diluyente y esperar 10 minutos.

- Lavar bien el frotis con abundante agua destilada y finalmente dejarlo secar al aire. Una vez seco, la preparación está lista para ser observada al microscopio.

7.8 ANALISIS ESTADISTICO

Se trabajó con tres tipos de tratamiento, variando para cada uno la concentración de cloruro de cobalto hexahidratado (0µg/ml, 100µg/ml y 200µg/ml), adicionada al ^{99m}Tc-HAM-PAO, estudiando su estabilidad a cuatro tiempos fijos (5, 60, 120 y 180 minutos).

Al analizar los resultados se consideraron dos factores, adición de cloruro de cobalto hexahidratado en tres concentraciones diferentes y cuatro tiempos fijos, con siete niveles constituidos por las variaciones de los dos factores.

El presente estudio se dividió en dos partes, Determinación de la Pureza Radioquímica y Marcación Leucocitaria.

Para la Determinación de la Pureza Radioquímica se hizo un diseño factorial de 3X4 con bloques al azar, constituidos por los frascos reconstituidos de HM-PAO determinando si existía diferencia en la estabilidad del ^{99m}Tc-HM-PAO al agregar cloruro de cobalto hexahidratado luego de transcurridos determinados intervalos de tiempo. Con un nivel de confianza de 2.63 ($\alpha=0.05$ y $\beta=0.25$), y un límite de error igual a 2 desviaciones estandar, que indicó que debían hacerse un mínimo de 4 repeticiones.

Los resultados de pureza radioquímica obtenidos utilizando el método de extracción por solventes se analizaron por:

- Analisis de varianza (ANDEVA),
- Prueba Fisher o de Mínima Diferencia Significadiva (LSD)
- Comparaciones multiples por medio de la Prueba de Scheffee.

La Prueba de Fisher y la Prueba de Scheffé se realizaron dado que existía diferencia significativa en el ANDEVA.

Los resultados de la marcación leucocitaria ^{99m}Tc se analizaron de la siguiente forma:

1. Para el porcentaje de marcación y viabilidad leucocitaria donde se obtuvo una respuesta cuantitativa:

- Análisis de varianza (ANDEVA),
- Comparaciones múltiples por medio de la prueba de la Mínima Diferencia Significativa de Fisher (LSD),

2. Para los resultados de morfología donde se obtuvo una respuesta cualitativa, debido a que todos los datos obtenidos cumplían con el rango de aceptabilidad ($\leq 90\%$), no fue necesario realizar análisis estadístico.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

8. RESULTADOS

8.1 PUREZA RADIOQUIMICA

Para la determinación de la pureza radioquímica, debido a limitaciones en la disponibilidad del HM-PAO (Cerotec[®]), se realizaron tres de las cuatro pruebas requeridas lo que no afecta el análisis estadístico de los resultados.

Los resultados obtenidos de la pureza radioquímica al utilizar diferentes concentraciones de cloruro de cobalto hexahidratado para comprobar si se obtenía mayor estabilidad del ^{99m}Tc-HM-PAO a través del tiempo de marcación (5, 60, 120 y 180 min), se presentan en las Tablas No. 1, 2 y 3.

En la Tabla No. 1 se expresan los resultados obtenidos con los diferentes tratamientos, 0µg/ml, 100µg/ml y 200µg/ml de cloruro de cobalto hexahidratado, a través del tiempo de marcación, 5, 60, 120 y 180 minutos.

En la Tabla No. 2 se analizó mediante la prueba de Fisher (LSD) si existía diferencia significativa entre el usar o no cloruro de cobalto hexahidratado como estabilizante (p=0.0001).

En la Tabla No. 3 utilizando la prueba de Fisher (LSD) se efectuaron las comparaciones para determinar si hay diferencia significativa entre los tiempos de marcación (p=0.0001).

En la Tabla No. 4 se reportan los resultados obtenidos al utilizar la Prueba de Scheffe y realizar comparaciones de la pureza radioquímica entre los tres tratamientos (0µg/ml, 100µg/ml y 200µg/ml de CoCl₂.6H₂O) y en todos los tiempos (5, 60, 120 y 180 minutos).

8.2 MARCACION DE LEUCOCITOS

Los promedios de la marcación de leucocitos empleando ^{99m}Tc-HM-PAO se presentan en la Tabla No. 5. Los porcentajes obtenidos están en el rango de 60 a 70%.

8.3 CONTROL DE CALIDAD

Los ensayos de viabilidad de los leucocitos marcados y control se muestran en la Tabla No. 6 observandose que la viabilidad de los mismos es mayor al 90% en todos los casos.

Con respecto a la evaluación morfológica de los glóbulos blancos marcados y control, al realizar frotos celulares teñidos con la coloración de Wright se pudo observar microscópicamente que la morfología celular se mantiene en más del 90% de las células tal y como se expresa en la Tabla No. 7.

9. DISCUSION DE RESULTADOS

9.1 PUREZA RADIOQUIMICA

Al efectuar las comparaciones con la prueba de Fisher (LSD) de los porcentajes de marcación del $^{99m}\text{Tc-HM-PAO}$ obtenidos entre los diferentes tratamientos, ($0\mu\text{g/ml}$, $100\mu\text{g/ml}$ y $200\mu\text{g/ml}$ de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), se comprobó que todos los resultados presentan diferencia significativa entre sí. En la Gráfica No. 1 en las cajas de Tuckey se observa que se obtiene mejor porcentaje de marcación empleando $100\mu\text{g/ml}$ de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Los resultados obtenidos al emplear la prueba de Fisher (LSD) para establecer si hay diferencia significativa con una $p=0.0001$ entre los tiempos después de la marcación, muestran que todos poseen una diferencia estadísticamente significativa entre sí, comprobándose que en todos los casos a los 5 minutos postmarcación se obtienen porcentajes de marcación arriba del 90%, seguido de un 78 a 90% obtenido a los 60 minutos lo cual es aceptable para su uso en marcación celular, como se expresa en la Gráfica No. 2.

Al realizar las comparaciones de la pureza radioquímica entre los tres tratamientos ($0\mu\text{g/ml}$, $100\mu\text{g/ml}$ y $200\mu\text{g/ml}$ de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en todos los tiempos (5, 60, 120 y 180 minutos) se llega a la conclusión de que sin emplear cloruro de cobalto hexahidratado y empleando $200\mu\text{g/ml}$ se obtienen buenos porcentajes de marcación solamente a los 5 minutos, y empleando $100\mu\text{g/ml}$ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ se obtienen buenos porcentajes de marcación a los 5 y 60 minutos después de marcado ya que los porcentajes se mantienen arriba del 90% lo que demuestra que el cloruro de cobalto hexahidratado si prolonga la estabilidad del $^{99m}\text{Tc-HM-PAO}$ hasta 60 minutos.

9.2 PORCENTAJE DE MARCACION

Con respecto al porcentaje de marcación de los leucocitos, con los tres tratamientos se muestra que no existe diferencia estadísticamente significativa entre ellos, lo que indica que

el cloruro de cobalto hexahidratado no afecta a los glóbulos blancos como se observa en la Gráfica No. 3. Los porcentajes de marcación se mantienen entre 60 y 70% lo cual indica que pueden emplearse para realizar estudios centellográficos siempre y cuando se descarte el sobrenadante de las células que es donde queda el ^{99m}Tc-HM-PAO que no se incorporó a las mismas y que puede ocasionar interferencias en el diagnóstico por imágenes. Se aconseja resuspender éste botón celular con solución salina estéril apirógena o con el plasma del paciente.

Los resultados de los porcentajes de marcación leucocitaria fueron bajos, probablemente debido a falta de entrenamiento en la manipulación de células ya que se ha demostrado que para obtener mejores resultados se necesita mayor tiempo de experiencia en marcación celular así como el uso de material descartable ya que cualquier formación de burbujas o residuos que queden en los recipientes afectan el porcentaje de marcación celular. En el presente estudio no se empleó material descartable por tratarse del ensayo de una nueva técnica y para no aumentar los costos de la investigación. Al emplearla en pacientes debe usarse material descartable.

9.3 CONTROL DE CALIDAD

Al efectuar las pruebas de control de calidad en la marcación de leucocitos para verificar si el proceso de marcación no altera su morfología y función se demostró con el presente estudio que tanto la viabilidad como la forma celular no se altera en más del 90% de los leucocitos tanto del grupo control como los sometidos al proceso de marcación.

10. CONCLUSIONES

- 10.1 La adición de cloruro de cobalto hexahidratado al HM-PAO reconstituido con ^{99m}Tc proporciona al radiofármaco una mayor estabilidad, siempre y cuando se emplee el tratamiento de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, lo cual prolongará su estabilidad hasta 60 minutos luego de la marcación, aumentando su rendimiento.
- 10.2 Se comprobó estadísticamente que la adición de cloruro de cobalto hexahidratado al ^{99m}Tc -HM-PAO no influye en los porcentajes de marcación leucocitaria, ya que se obtienen porcentajes similares agregando o no cloruro de cobalto hexahidratado.
- 10.3 Al analizar los resultados del control de calidad que incluyeron los porcentajes de viabilidad leucocitaria y de leucocitos con morfología normal se concluye que no existe diferencia entre los distintos tratamientos ya que todos los resultados obtenidos fueron superiores al rango de aceptabilidad ($\geq 90\%$).

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Se aconseja hacer estudios de toxicidad del cloruro de cobalto hexahidratado para determinar si puede ser administrado en humanos.
- 11.2 Realizar marcaciones de leucocitos con el ^{99m}Tc -HM-PAO-100 $\mu\text{g/ml}$ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a los 60 minutos después de marcado ya que en la presente investigación únicamente se analizó a los 5 minutos después de la marcación con ^{99m}Tc .
- 11.3 Implementar el uso de éste tipo de estabilizantes a nivel de radiofarmacias hospitalarias ya que de esa manera se esta aumentando el rendimiento de estos radiofármacos modernos cuyo costo es oneroso.
- 11.4 Es recomendable que un profesional con experiencia realice todo el proceso de marcación celular para disminuir la probabilidad de error humano.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Weisner SP, et al. A Method for Stabilising Technetium-^{99m} Exametazime Prepared from a Comercial Kit. Eur J Med. 1993; 20:661-666.
2. Linhart N. et al. ^{99m}Tc Labelled Human Leukocytes. Acta haemat. 1980;63:71-80.
3. McAffe JG, Subramanian G, Gange G. Technique of Leukocyte Harvesting and Labeling. Sem Nucl Med. 1984;XIV:83-103.
4. Scott JL, Davidson JG, Marino J. Leucocyte Labeling with ⁵¹Cromium III: The Kinetics of Normal Lymphocytes. Blood. 1972;40:276-281.
5. Froelich JW, Swanson D. Imaging of Inflammatory Processes with Labelled Cells. Sem Nucl Med. 1984;14:128-140.
6. Gillespie GV, Barth RF, Gobuty A. Survival of Radiochromium Labeled Leucocytes. Blood. 1963;22:718-732.
7. Bagwe BA, Sharma SM. One Accumulation of ^{99m}Tc-Labeled Leukocytes. J Nucl Med. 1975;17:313-317.
8. Anghilery LJ, et al. Gallium-67. Accumulation by Tumors: Role of Cell Membrane Permeability. J Nucl Med. 1980;29:663-668.
9. Tsam MT. Studies on Gallium. Accumulation in Inflammatory Lesions. III. Roles of Polymorphonuclear Leukocytes and Bacteria. J Nucl Med. 1978;19:492-495.

10. Gelrud LG, Arseneau JC, Milder MS. The Kinetics of ⁶⁷Gallium Incorporation into inflammatory Lesions: Experimental and Clinical Studies. J Nucl Med. 1974;83:489-495.
11. Cloutier RJ, Watson EE, Mayes RL. Summary of Current Radiation Dose Estimate to Humans From ⁶⁶Ga, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga and ⁷²Ga-Citrate: MIRD Dose Estimate. J Nucl Med. 1973;14:753-756.
12. Lomeña F. Leucocitos Marcados en Detección de Lesiones Infecciosas. Rev Esp Med Nucl. 1989;8:19-32.
13. Moragas M, et al. Leucocitos ^{99m}Tc-HM-PAO: Técnica de Marcaje, Control de Calidad y Resultados Preliminares in vivo. Rev Esp Med Nucl. 1989;8:9-18.
14. Portillo MC. Marcación Leucocitaria, Memorias del Curso de Radiofarmacia Hospitalaria 8 al 26 de noviembre. Guatemala: DGEN. 1993.
15. McAffe JG, Thakur MC. Survey of Radioactive Agents for in vitro Labeling of Phagocytic Leucocytes. I. Soluble Agents. J Nucl Med. 1976;17:480-487.
16. Steffel FG, Rao SA. A Rapid and Simple Methods with Indium-111-oxine. J Nucl Med Technol. 1987;15:61-65.
17. Fawwaz RA, et al. A Rapid and Simple Methods with Indium-111-oxine. J Nucl Med Technol. 1987;15:61-65.
18. Burke JET, Toath S, Ackery D. The Comparison of 8-hidroxiquinoleine, Tropolone an Acetylacetone as Mediators in the Labeling of Polymorphonuclear leucocytes

- with indium-111: A functional Study. Eur J Nucl Med. 1982;7:73-76.
19. Becker W, et al. Thre-phase white Blood Cell Scan: Diagnostic Validity in Abdominal Inflammatory Disease. J Nucl Med. 1986;27:1109-1115.
 20. Peters AM, Saverymottu S, Reavy MJ. Imaging of Inflammation with Indium-111-tropolonate Labelled Leucocytes. J Nucl Med. 1983;24:39-44.
 21. Thakur ML, Barry MJ. Preparation and Evaluation of a New-111-In Agent for Efficient Labeling of Human Platelets in Plasma. Fourth International Symposium on Radiopharmaceutical Chemistry. Kernforschungsanlage Julich GmbH. 1982;23:140-142.
 22. Suarez AHF de, Mitta AEA. Metodos de Preparación de Radioifármacos del Tc-99m e In-113m en Hospitales. Acta Bioquim Clin Latinoam. 1992;XXVI:335-338.
 23. Domenech T, Quinquer JS. Imágenes en Medicina Nuclear. Diagnóstico Morfológico y Funcional. España: Internacional de Ediciones y Publicaciones S.A., 1990. 179 p. (p. 6-7).
 24. Srivastava SC, Straub RF, Modesto RR. A Stannous Glucoheptonate kit Method for ^{99m}Tc Labeling of Leukocytes and Plateles. J Labeled Compounds Radiopharm. 1989;16:38-40.
 25. Kelbaek H, Fogh J. Technetium-99m of Polymorphonuclear Leukocytes: Preparation with two Different Stannous Agents. J Nucl Med. 1985;26:68-71.

26. Schroth HJ, Oberhausen E, Berberich R. Cell Labelling with Colloidal Sustances in Whole Blood. Eur J Nucl Med. 1981;6:469-472.
27. Hanna RW, Lomas FE. Identification of Factors Affecting Technetium-99m Leukocyte Labelling by Phagocytic Engulfmen and Development of an Optimal Technique. Eur J Nucl Med. 1986;12:159-162.
28. Gutierrez AL. Comparación de la Marcación de Leucocitos con Coloides de Tc-99m en Sangre Completa y Capa Leucocitaria como un Método de Radioinmunodiagnóstico. Guatemala, USAC (Tesis de Graducación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1991. 50p.
29. Glen HJ, et al. Leukocyte Labeling with Technetium-99m. Inter J Nucl Med Biol. 1976;3:9-15.
30. Uchida T, Kariyone I. Organ Distribution of the ^{99m}Tc Labelled White Cells. Act Haemat Jap. 1973;36:78-81.
31. Uchida T, Vincent P. In vitro Studies of Leukocyte Labelling with Technetium-99m. J Nucl Med. 1976;117:730-736.
32. English DK, Andersen BR. Labeling of Phagocytes from Human Blood with ^{99m}Tc-Sulphur Colloid. J Nucl Med. 1975;16:5-10.
33. 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.

34. Sundrehagen E. A New Technique for Formulation of ^{99m}Tc Labelled Blood Leukocytes and Plateles. Appl Radial Isot. 1984;35:356-366.
35. Gopal B. Fundamentals of Nuclear Pharmacy. 3a. ed. USA: Springer-Verlazz, 1992. (p. 239-230).
36. Kung HF, et al. Synthesis and Biodistribution of Neutral Lipid-Soluble Tc-99m Complexes that Cross the Blood-Brain Barrier. J Nucl Med. 1984;25:326-332.
37. Sharp PF, et al. Technetium-99m HM-PAO Stereoisomers as Potential Agents for Imaginy Regional Cerebral Blood Flow: Human Volunter Studies. J Nucl Med. 1986;27:171-177.
38. Ramamoorthy N, et al. Studies on Some Aspects of the Inestability of the Tc-Hexametil Propylene Amineoxime (Tc-HM-PAO). Nucl Med Biol. 1991;20:307-310.
39. Hung JC, et al. Kinetic Analysis of Technetium-99m d,l-HM-PAO. Descomposition in Aqueus Media. J Nucl Med. 1988;29:1568-1576.
40. Gil MC, et al. Marcaciones Celulares con ^{99m}Tc : Experiencia Chileno-argentina. Rev Esp Med Nucl. 1992;XI:101.
41. Srivastava SC, Straub RF. Blood Cell Labeling with ^{99m}Tc : Progress and Perspectives. Sem Nucl Med. 1990;XX:41-45.
42. Vanlic NR, et al. Labeling of Leukocytes with ^{99m}Tc -HM-PAO for Scintigraphy of Inflammatory Lesions and Abscesses. Nucl Med Biol. 1992;19:25-26.

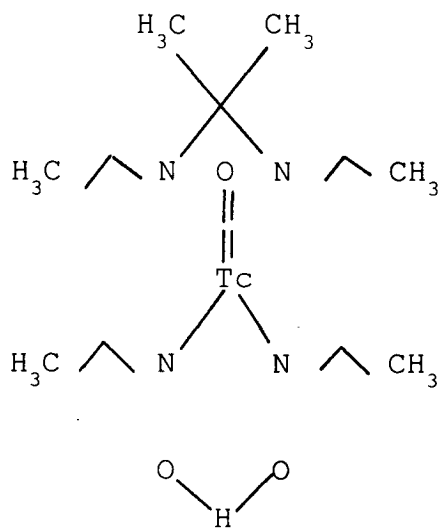
43. Vas R, et al. Modificaciones Introducidas en la Marcación de Leucocitos con ^{99m}Tc -HM-PAO para Detecciones de Focos Infecciosos. Rev Esp Med Nucl. 1992;XI:101.
44. Huguet M, et al. Afinidad del HM-PAO ^{99m}Tc por los Elementos Celulares de la Sangre (ECS). Rev Esp Med Nucl. 1992;XI:60.
45. Lannato E, et al. Technetium-99m hexamethyl propylene amine oxine leucocytes in the assessment of disease activity in inflammatory bowel disease. Eur J Nucl Med. 1992;19:14-18.
46. Mortelmans, et al. Clinical usefulness of Technetium 99m-HM-PAO labelled white blood cell imaging in abscesses. Clin Nuc Med. 1989;14:127.
47. Vorne, et al. ^{99m}Tc -leucocyte Scintigraphy in prosthetic vascular graft infections. Nucl Med. 1989;28:95-99.
48. Moragas, et al. ^{99m}Tc -HMPAO leucocyte scintigraphy in the diagnosis of bone infection. Nucl Med Comm. 1991;12:417-427.
49. Amersham International. Clinical Applications of Cetetec[®] labelled leucocyte imaging-and abstract collection: Technetium-99m Exametazine Agent for in vitro ^{99m}Tc leucocyte labelling. United Kingdom: Buckinghamshire, 1993 (p. 16) Information.
50. Neirincks RD, et al. Technetium-99m d,l-HM-PAO: A New Radiopharmaceutical for SPECT Imaging of Regional Cerebral Blood Perfusion. J Nucl Med. 1987;28:191-202.

51. Rezende MEX, Moraes DW, Rockmann L., Estabilizaco do ^{99m}Tc-HM-PAO. Rev Esp Med Nucl. 1992;XI:128.
52. Rockman TMB, Moraes DW, Coelho JC., Pureza Radioquímica do ^{99m}Tc-HM-PAO. Rev Esp Med Nucl. 1992;XI:128.
53. Neirinckx RD, et al., Technetium-99m d,l-HM-PAO a New Radiopharmaceutical for Spect Imaging of Regional Cerebral Blood Perfusion. J Nucl Med. 1987;28:191-202.
54. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 14a. ed. USA: Arlington Virginia, 1984. (p. 165-166).
55. Merck and Co. Inc. The Merck Index. 11a. ed. USA: Rahway NJ, 1989. (p. 189).

13. A N E X O S

ANEXO No. 1

Estructura química de ^{99m}Tc -HM-PAO



ANEXO No. 2

Preparación de la Solución de Cloruro de Cobalto
Hexahidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)

Concentración 200mg/ml

1. Pesar 50 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
2. Transferirlo a un balón aforado de 250 ml.
3. Aforar con solución salina 0.9%.

TABLA No. 1

PUREZA RADIOQUIMICA

Porcentaje de Marcación empleando los diferentes tratamientos
a través del tiempo.

	Tiempo	5min	60min	120min	180min	Totales
T r a t a m i e n t o	0µg/ml CoCl ₂ ·6H ₂ O	3 92.650	3 78.577	3 71.200	3 70.437	12 78.216
	100µg/ml CoCl ₂ ·6H ₂ O	3 94.443	3 91.670	3 88.290	3 81.133	12 88.884
	200µg/ml CoCl ₂ ·6H ₂ O	3 93.973	3 88.423	3 79.163	3 70.240	12 82.950
	Totales	9 93.689	9 86.226	9 79.551	9 73.937	36 83.350

TABLA No. 2

PUREZA RADIOQUIMICA

Diferencia significativa ($p=0.0001$) entre los tratamientos (sin $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $100\mu\text{g/ml}$ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -Co100-, $200\mu\text{g/ml}$ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -Co200-).

Comparaciones	Prueba de Fisher (LSD)			
	($y_i - y_j$)		LSD	
Sin Co-Co100	10.668	>	2.88	Dif significativa ($p=0.00001$)
Sin Co-Co200	4.734	>	2.88	Dif significativa ($p=0.00001$)
Co100-Co200	5.934	>	2.88	Dif significativa ($p=0.00001$)

Todos los tratamientos presentan diferencia significativa entre sí.

El tratamiento con $100\mu\text{g/ml}$ de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ muestra mayor actividad.

TABLA No. 3
PUREZA RADIOQUIMICA

Diferencia significativa ($p=0.0001$) entre los tiempos de
marcación (5, 60, 120 y 180 minutos)

Comparaciones		Prueba de Fisher (LSD)		
Tiempo (min)	($y_i - y_j$)		LSD	
5- 60	7.466	>	3.32	Dif significativa ($p=0.0001$)
5-120	14.138	>	3.32	Dif significativa ($p=0.0001$)
5-180	19.752	>	3.32	Dif significativa ($p=0.0001$)
60-120	6.672	>	3.32	Dif significativa ($p=0.0001$)
60-180	12.286	>	3.32	Dif significativa ($p=0.0001$)
120-180	5.614	>	3.32	Dif significativa ($p=0.0001$)

Todos los tiempos presentan diferencia significativa entre sí.
A los 5 minutos se encuentra mayor actividad.

TABLA No. 3.1

VALORES DE "p" DE LA PRUEBA DE SCHEFFE PARA COMPARACIONES PAREADAS

		TRATAMIENTOS										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
T R A T A M I E N T O S	2	0.0010										
	3	0.0001	0.3570									
	4	0.0001	0.2250	0.0000								
	5	0.0000	0.0001	0.0001	0.0001							
	6	0.0000	0.0040	0.0001	0.0001	0.9990						
	7	0.9380	0.0720	0.0001	0.0001	0.6720	0.9910					
	8	0.0150	0.9990	0.0600	0.0320	0.0030	0.0360	0.4020				
	9	0.0000	0.0001	0.0001	0.0001	0.0000	0.0000	0.7310	0.0050			
	10	0.9500	0.0640	0.0001	0.0001	0.6580	0.9930	0.0000	0.3740	0.7590		
	11	0.0003	0.0000	0.2520	0.1510	0.0001	0.0060	0.1130	0.0000	0.0010	0.1020	
	12	0.0001	0.1980	0.0000	0.0000	0.0001	0.0001	0.0001	0.0270	0.0001	0.0001	0.1310

TRATAMIENTOS:

HM-PA0-99mTc con el agregado de

Tratamiento 1: 0ug/ml de cloruro de cobalto hexahidratado a los 5 minutos
 Tratamiento 2: 0ug/ml de cloruro de cobalto hexahidratado a los 60 minutos
 Tratamiento 3: 0ug/ml de cloruro de cobalto hexahidratado a los 120 minutos
 Tratamiento 4: 0ug/ml de cloruro de cobalto hexahidratado a los 180 minutos

Tratamiento 5: 100ug/ml de cloruro de cobalto hexahidratado a los 5 minutos
 Tratamiento 6: 100ug/ml de cloruro de cobalto hexahidratado a los 60 minutos
 Tratamiento 7: 100ug/ml de cloruro de cobalto hexahidratado a los 120 minutos
 Tratamiento 8: 100ug/ml de cloruro de cobalto hexahidratado a los 180 minutos

Tratamiento 9: 200ug/ml de cloruro de cobalto hexahidratado a los 5 minutos
 Tratamiento 10: 200ug/ml de cloruro de cobalto hexahidratado a los 60 minutos
 Tratamiento 11: 200ug/ml de cloruro de cobalto hexahidratado a los 120 minutos
 Tratamiento 12: 200ug/ml de cloruro de cobalto hexahidratado a los 180 minutos

TABLA No. 4
MARCACION CELULAR

Tratamiento	Tiempo de marcacion con ^{99m} Tc-HM-PAO-CoCl ₂ ·6H ₂ O	x marcación	Desviación estandar (SD)	Error estandar
0µg/ml CoCl ₂ ·6H ₂ O	5 minutos	60.326	9.415	4.211
100µg/ml CoCl ₂ ·6H ₂ O	5 minutos	64.994	5.159	2.307
200µg/ml CoCl ₂ ·6H ₂ O	5 minutos	68.600	6.656	2.977

TABLA No. 5

VIABILIDAD

PORCENTAJE DE VIABILIDAD LEUCOCITARIA (%)

Tratamiento	A	B	C	D	E
Inicial	100	95	99	99	97
T1	99	98	97	97	97
T2	98	97	97	97	97
T3	97	96	96	96	96

Inicial: botón leucocitario antes del tratamiento con HM-PAO-^{99m}Tc

Tratamiento 1 (T1): botón leucocitario-HM-PAO-^{99m}Tc

Tratamiento 2 (T2): botón leucocitario-HM-PAO-^{99m}Tc-100 µg/ml
CoCl₂·6H₂O

Tratamiento 3 (T3): botón leucocitario-HM-PAO-^{99m}Tc-200 µg/ml
CoCl₂·6H₂O

A, B, C, D, E: muestras de sangre analizadas

TABLA No. 6
MORFOLOGIA CELULAR

PORCENTAJE DE LEUCOCITOS CON MORFOLOGIA NORMAL (%)

Tratamiento	A	B	C	D	E
T1	97	96	98	96	96
T2	93	94	93	95	93
T3	95	93	94	93	95

Tratamiento 1 (T1): botón leucocitario-HM-PAO-^{99m}Tc-HM-PAO

Tratamiento 2 (T2): botón leucocitario-HM-PAO-^{99m}Tc-100µg/ml
CoCl₂·6H₂O

Tratamiento 3 (T3): botón leucocitario-HM-PAO-^{99m}Tc-200µg/ml
CoCl₂·6H₂O

A, B, C, D, E: muestras de sangre analizadas

TABLA No. 7
MORFOLOGIA CELULAR

PORCENTAJE DE LEUCOCITOS CON MORFOLOGIA NORMAL (%)

Tratamiento	A	B	C	D	E
T1	97	96	98	96	96
T2	93	94	93	95	93
T3	95	93	94	93	95

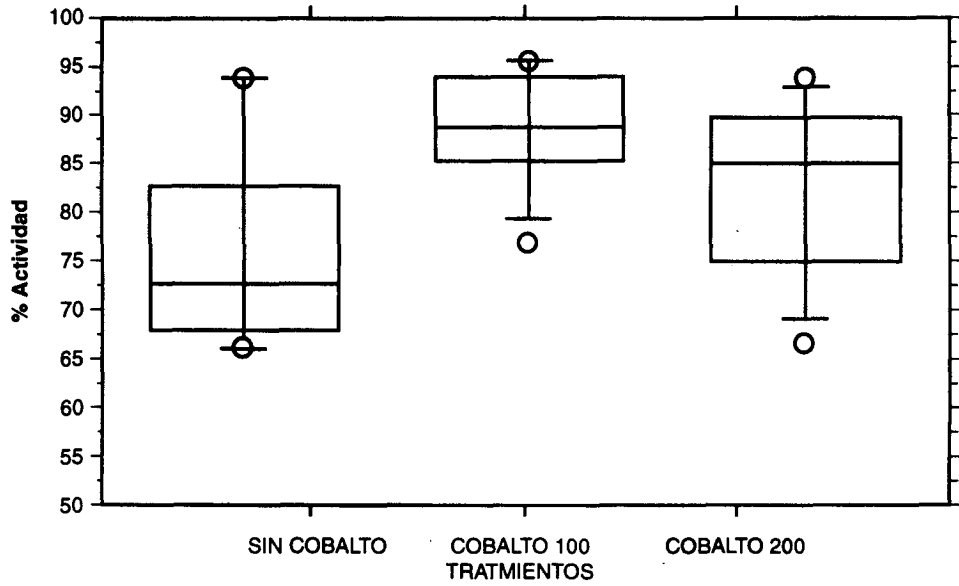
Tratamiento 1 (T1): botón leucocitario-HM-PAO-^{99m}Tc-HM-PAO

Tratamiento 2 (T2): botón leucocitario-HM-PAO-^{99m}Tc-100ug/ml
CoCl₂·6H₂O

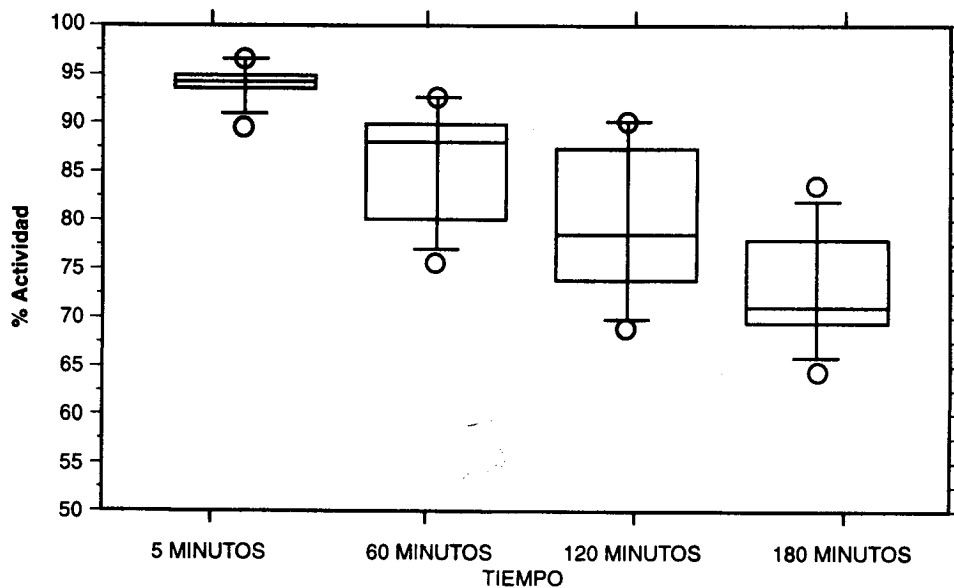
Tratamiento 3 (T3): botón leucocitario-HM-PAO-^{99m}Tc-200ug/ml
CoCl₂·6H₂O

A, B, C, D, E: muestras de sangre analizadas

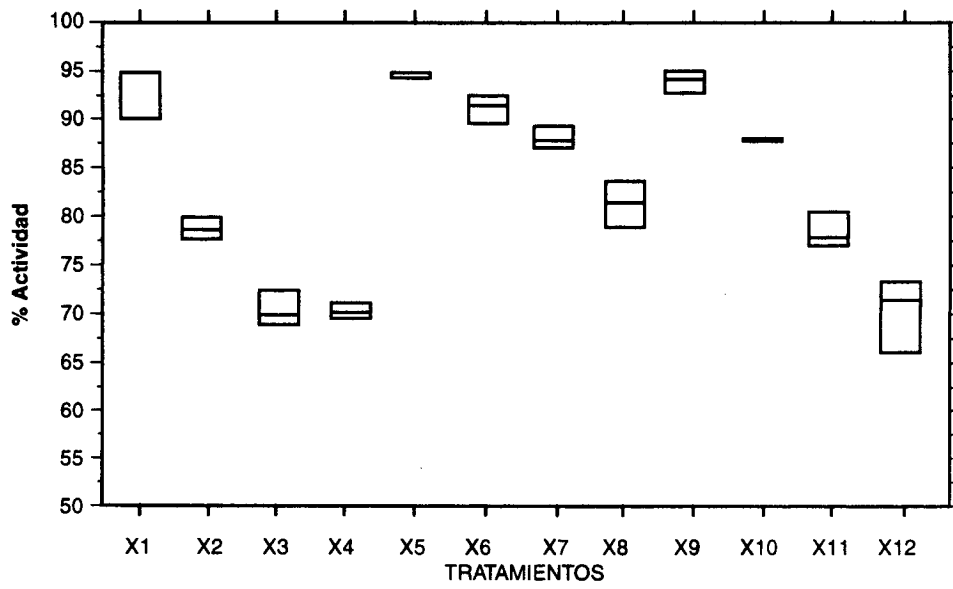
GRAFICA 1
COMPARACION DE LA PUREZA RADIOQUIMICA ENTRE LOS TRES TRATAMIENTOS



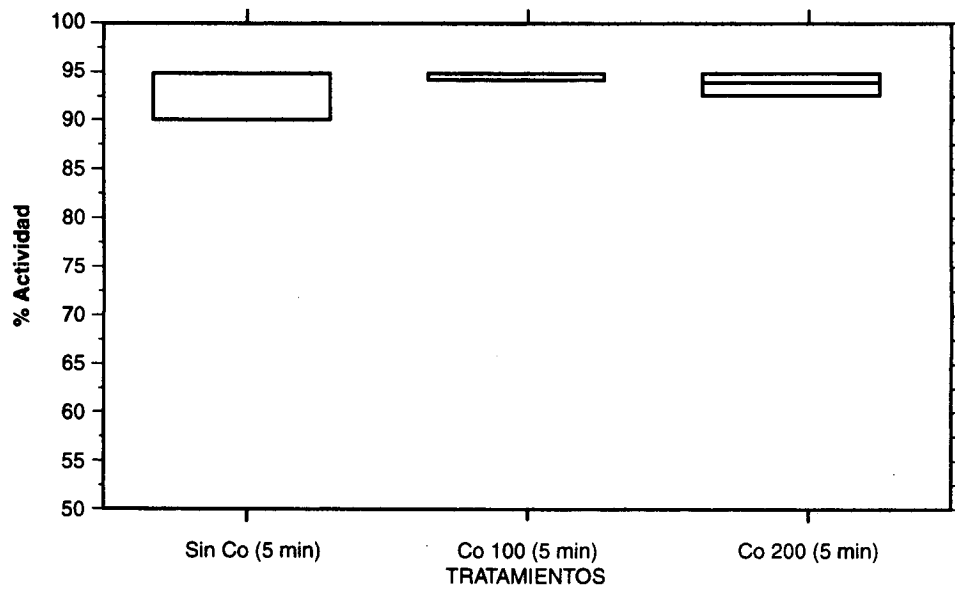
GRAFICA 2
COMPARACION DE LA PUREZA RADIOQUIMICA ENTRE LOS CUATRO TRATAMIENTOS



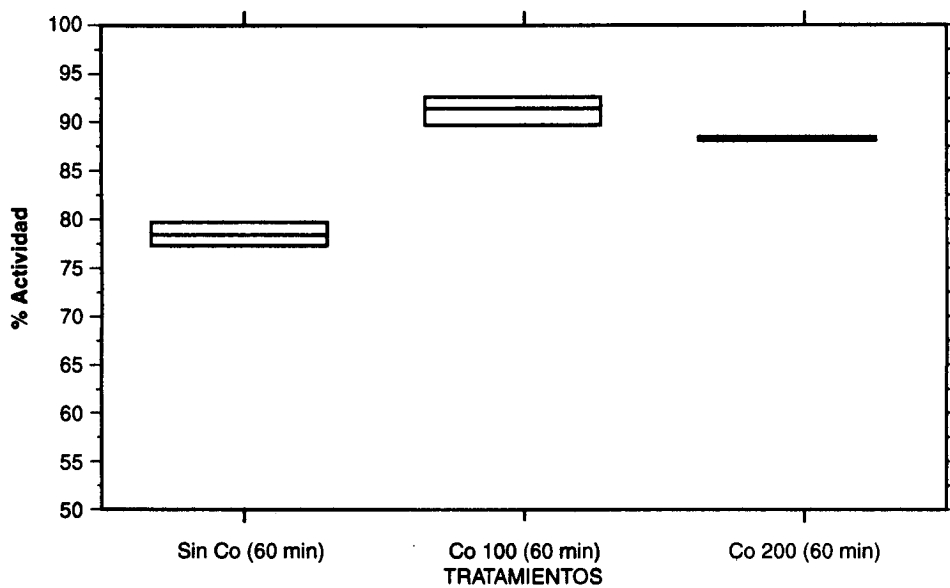
GRAFICA 2.1
COMPARACION DE LA PUREZA RADIOQUIMICA ENTRE LOS TRES TRATAMIENTOS
EN TODOS LOS TIEMPOS



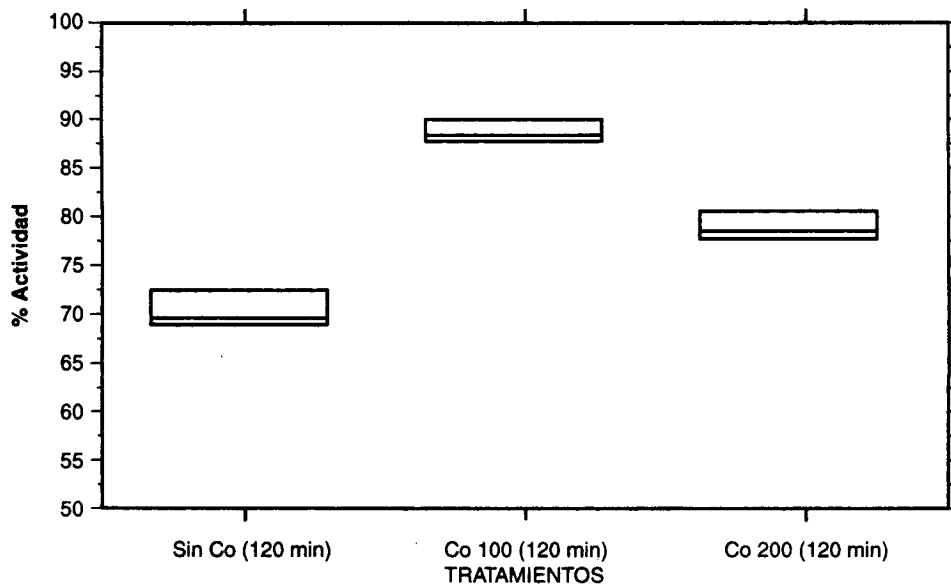
GRAFICA 2.2
COMPARACION DE LA PUREZA RADIOQUIMICA ENTRE LOS TRES TRATAMIENTOS
A LOS 5 MINUTOS



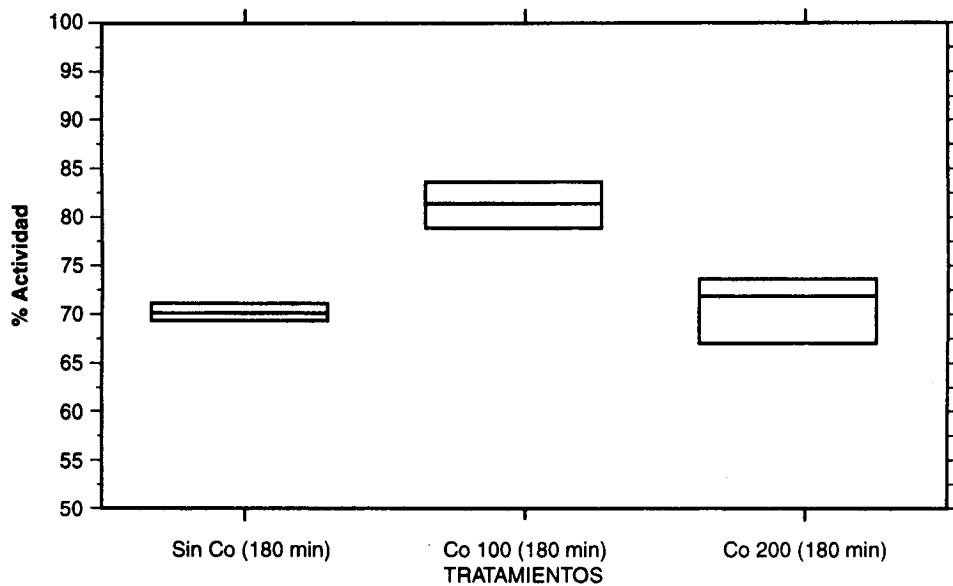
GRAFICA 2.3
COMPARACION DE LA PUREZA RADIOQUIMICA ENTRE LOS TRES TRATAMIENTOS
A LOS 60 MINUTOS



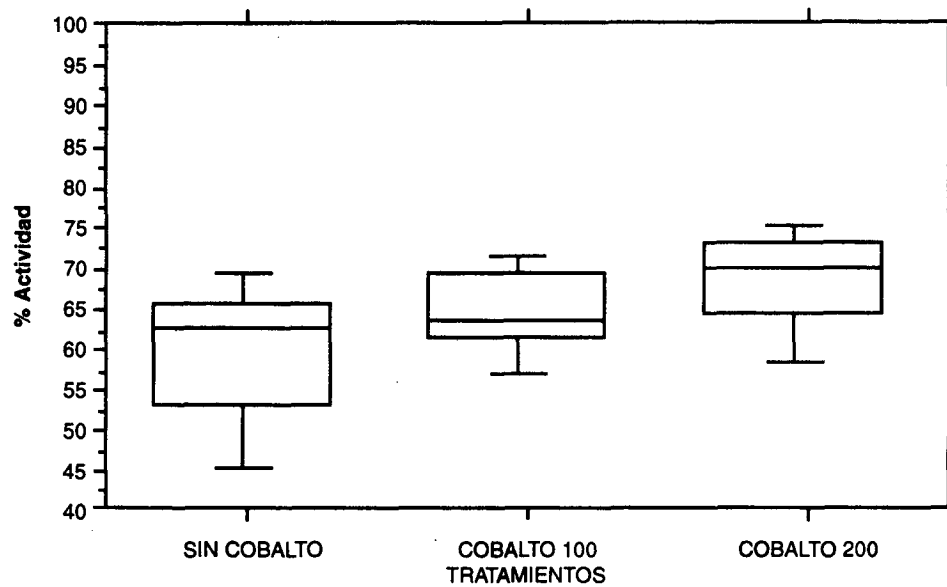
GRAFICA 2.4
COMPARACION DE LA PUREZA RADIOQUIMICA ENTRE LOS TRES TRATAMIENTOS
A LOS 120 MINUTOS



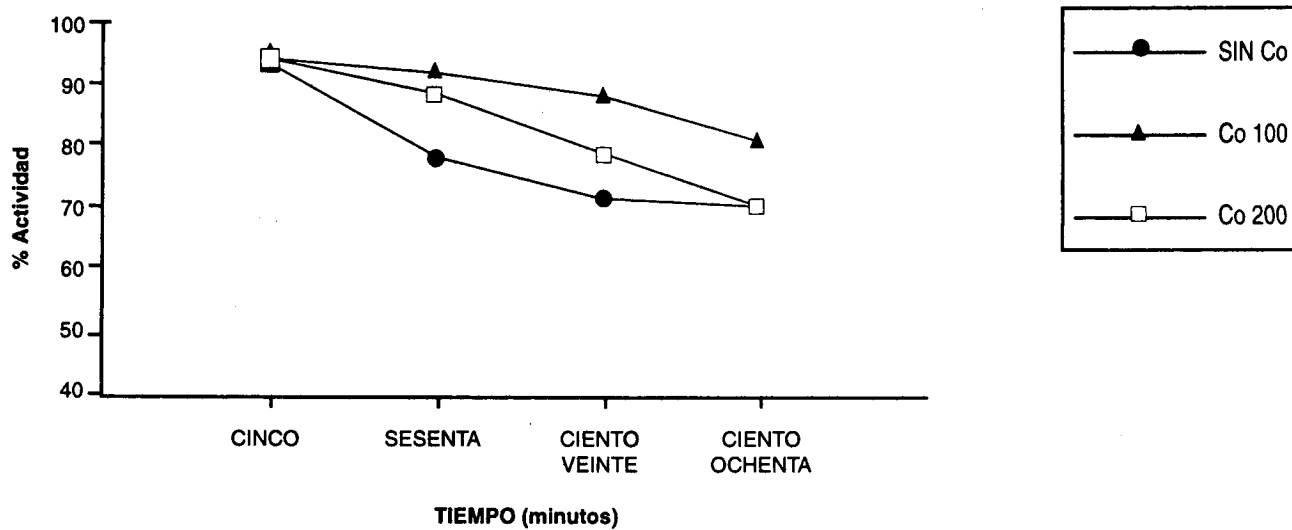
GRAFICA 2.5
COMPARACION DE LA PUREZA RADIOQUIMICA ENTRE LOS TRES TRATAMIENTOS
A LOS 180 MINUTOS

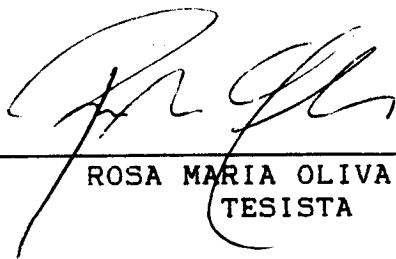


GRAFICA 3
MARCACION DE LEUCOCITOS CON LOS TRES TRATAMIENTOS

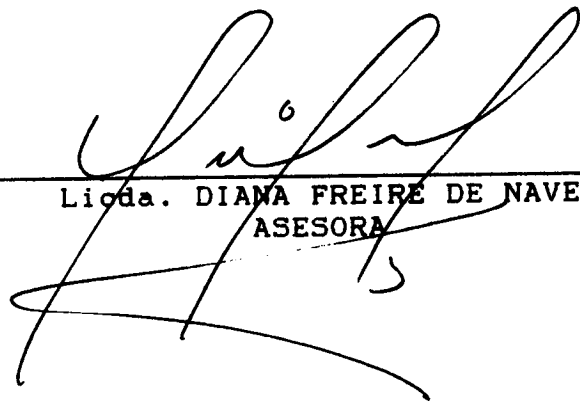


GRAFICA 4
GRAFICO DE INTERACCION ENTRE TRATAMIENTOS Y TIEMPO





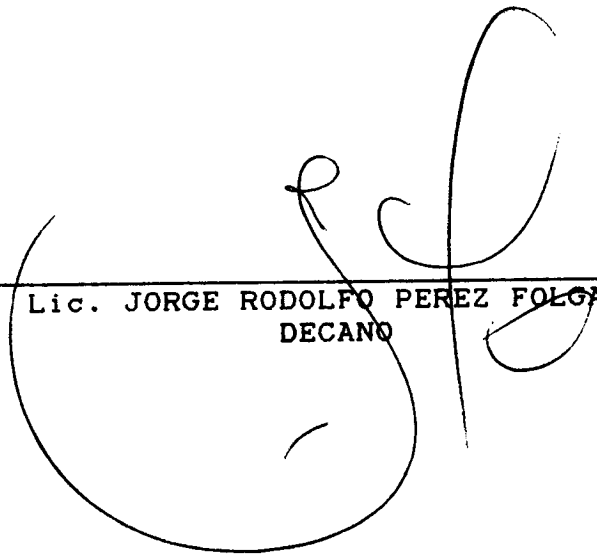
ROSA MARIA OLIVA PALENCIA
TESISTA



Licda. DIANA FREIRE DE NAVE
ASESORA



Licda. BEATRIZ BATRES DE JIMENEZ
DIRECTORA ESCUELA
DE QUIMICA FARMACEUTICA



Lic. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR
DECANO

PROFESORADO DE LA UNIVERSIDAD DE S. J. DE LOS RIOS
Biblioteca