

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

**FORMULACION DE UN RADIOFARMACO, A BASE
DE MONOFLUOROFOSFATO DE SODIO (MFP)
MARCADO CON TECNECIO-99 META-ESTABLE
(^{99m}Tc) PARA USO DE CENTELLOGRAFIA OSEA**

INFORME FINAL DE TESIS

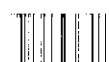
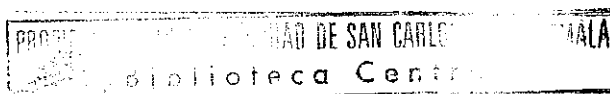
PRESENTADO POR

MARIA GABRIELA SANCHEZ MONTUFAR

PARA OPTAR AL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO

Guatemala, octubre de 1997.



06
T(1804)
C.4

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

DECANO	Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar
SECRETARIO	Lic. Oscar Federico Nave Herrera
VOCAL I	Lic. 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 Y LA VIRGEN MARIA

A MIS PADRES

Julio César Sánchez Mendoza y
Mercedes del Rosario Montufar de Sánchez

A MIS HERMANOS

María Mercedes Sánchez Montufar
Julisa María Sánchez Montufar
Julio Mariano Sánchez Montufar
César Guillermo Sánchez Montufar

A MI SOBRINO

Julio Mariano Sanchez Diaz

A MIS TIAS

Violeta Montufar Dardon
Reina Montufar

A MIS AMIGOS

UNIVERSIDAD DE GUATEMALA
Violeta Montufar Dardon

AGRADECIMIENTOS

- A Dios y la Virgen Maria.
- A mis padres y hermanos.
- A mis amigos.
- A mi asesora: Licda. Diana Freire de Nave
- A la Universidad de San Carlos de Guatemala, en especial a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Al Departamento de Radiofarmacia de la Dirección General de Energía Nuclear.

INDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCION.....	2
3. ANTECEDENTES.....	3
4. JUSTIFICACION.....	14
5. OBJETIVOS.....	15
6. HIPOTESIS.....	16
7. MATERIALES Y METODOS.....	17
8. RESULTADOS.....	23
9. DISCUSION DE RESULTADOS.....	35
10. CONCLUSIONES.....	37
11. RECOMENDACIONES.....	38
12. REFERENCIAS.....	39
13. ANEXOS.....	41

1. RESUMEN

En el presente estudio se formuló un radiofármaco a base de Monofluorofosfato de sodio (MFP) marcado con Tecnecio-99 meta-estable (^{99m}Tc) a pH 5.0, con el objeto de encontrar una alternativa que disminuya el costo y que a la vez proporcione resultados similares en patologías óseas al Metilendifosfonato (MDP). Por su alta sensibilidad el MDP, marcado con ^{99m}Tc es el radiofármaco que presenta mayores ventajas para la exploración ósea.

El MFP y MDP fabricados en la radiofarmacia de la Dirección General de Energía Nuclear fueron sometidos a los controles de calidad necesarios, entre ellos físicos, químicos y radioquímicos. La pureza radioquímica se realizó por medio de cromatografía en capa fina para determinar el porcentaje de unión de los fármacos en el radionucleído; se utilizó dos solventes; el Cloruro de sodio al 0.85 % en donde le promedio del porcentaje de marcación fue 54.65 y con acetona se obtuvo un 94.04 para el MFP. El lote de MDP utilizado reportó un porcentaje de unión de 85.00 con Cloruro de sodio y 98.35 con acetona.

El nuevo radiofármaco se evaluó en un modelo biológico (ratones blancos) para determinar su biodistribución y actividad en hueso, riñón e hígado; mediante una comparación con un grupo control al que se le administró MDP marcado con ^{99m}Tc , radiofármaco que se utiliza actualmente para diagnóstico de centellografía ósea.

Los porcentajes de marcación del MDP y MFP son similares, ya que no existe diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

En la biodistribución de los radiofármacos en hueso, riñón e hígado, sí existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), con excepción de la biodistribución en hueso y riñón del MFP que no existe diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$); se concluye que el MFP no es equivalente al MDP debido a que la biodistribución en hueso y riñón es similar, lo cual no es aconsejable porque puede crear confusión en el momento del diagnóstico, al generarse resultados falsos positivos, o bien, puede marcar poca actividad en hueso y excretar la mayor parte del radiofármaco, esto impide que la matriz ósea aumente su porcentaje de captación.

Por lo anterior se concluye que el MDP es el radiofármaco de elección para diagnósticos de centellografía ósea.

2. INTRODUCCION

El uso de centellografía ósea es muy valioso, especialmente en el diagnóstico de fracturas ocultas contusión, osteomielitis aguda, artritis pirógena aguda, necrosis vascular del hueso y metástasis óseas por cáncer de mama y próstata; esta última es la razón por la que se solicita con mayor frecuencia un centellograma. Además la centellografía ósea tiene un alto grado de sensibilidad en comparación con otras técnicas de radiodiagnóstico, ya que detecta lesiones de hasta 0.5 mm.

El Metilendifosfonato (MDP), marcado con Tecnecio-99 meta-estable (^{99m}Tc), es el radiofármaco que presenta mayores ventajas para la realización de diagnósticos por centellografía ósea, pero su costo es elevado. Si se considera lo anterior, se propone la formulación de un radiofármaco a base de Monofluorofosfato de sodio (MFP), marcado con ^{99m}Tc . Si este generara porcentajes de marcación mayores al 90 %, este producto tendría grandes ventajas, entre ellas se pueden mencionar, alta solubilidad, mínima toxicidad y bajo costo.

3. ANTECEDENTES

GENERALIDADES

La medicina nuclear y la radiofarmacia constituyen una herramienta de mucha utilidad para los médicos clínicos en el diagnóstico de enfermedades. La evolución de esta rama de la Medicina se desarrolla en forma paralela al empleo de sustancias radioactivas en la Biología Humana.

Los radiofarmacos se definen como preparados radioactivos utilizados en Medicina in vitro o in vivo con fines diagnósticos o terapéuticos.

Un radiofarmaco que se utiliza para diagnóstico debe presentar las siguientes características:

- Debe ser estéril, apirógeno y no tóxico.
- Contener un radionucleido.
- Forma química adecuada.

Para elegir el radionucleido debe cumplirse con condiciones básicas como:

- Dosis de radiación por el paciente, debe ser lo más baja posible para evitar cualquier riesgo durante la exploración. Esto se logra con radionucleidos de corto periodo de semidesintegración ($t_{1/2}$), o vida física. La vida media se define como el tiempo requerido para reducir su actividad inicial a la mitad, esta es independiente de condiciones físicas. Para determinar la vida media de un radionucleido, se debe medir su radioactividad a diferentes intervalos de tiempo y graficarlos en papel semilogarítmico (actividad vs tiempo), resultando una línea recta cuya pendiente es igual a la constante de desintegración.
- Las características de la radiación emitida deben ser las adecuadas para poder ser detectadas con el equipo de medición. Debe ser un emisor gamma puro, la energía adecuada debe ser de 100 a 200 kiloelectrón voltios (KeV).

La elección de la forma química también debe cumplir con ciertas condiciones fundamentales:

- La forma química debe incorporarse al compartimiento biológico deseado, donde tiene una adecuada cinética; según permanezca en la circulación por determinado tiempo, fijarse en un tejido o excretarse por alguna vía en particular (1,2).
- Es ideal que sea soluble en agua y que permanezca soluble al mezclarse con fluidos del organismo. La solubilidad en lípidos es importante para la distribución biológica del radiofármaco ya que esta permitirá su difusión a través de la membrana celular y por lo tanto será su fijación al órgano de estudio.
- La carga de un compuesto es un factor determinante en solubilidad. A mayor carga mayor solubilidad en agua. Moléculas no polares se solubilizan en solventes orgánicos y en lípidos.
- Estabilidad in vitro como in vivo. La sustancia química marcada debe ser estable por lo menos el tiempo mínimo para poder realizar el examen. Se prefiere que la estabilidad o vida útil del radiofármaco este determinada por la vida media física del radionucleído.
- La distribución biológica de un radiofármaco permite establecer la utilidad para estudios funcionales y la obtención de una imagen estática. La estabilidad in vivo se afecta al unirse a proteínas del plasma o a otras células después de ser inyectado. Lo ideal es que permanezca como compuesto libre y se una a proteínas o células hasta concentrarse en el órgano blanco.
- La vida media de los radiofármacos es característica de cada uno. Después que el radiofármaco ejecute su función debe desaparecer del organismo a través de las vías de excreción y de decaimiento físico (3,4).

TECNECIO-99 META-ESTABLE (^{99m}Tc)

CARACTERISTICAS FISICAS

- Periodo de semidesintegración de 6.04 horas.
- Decae por transición isomérica en un 86.00 % más o menos.
- Energía de radiación gamma de 140 KeV.
- Se obtiene a partir del producto de fisión de ^{235}U .

CARACTERISTICAS QUIMICAS

El tecnecio es el elemento número 43 de la tabla periódica, es un metal de la segunda serie de transición, perteneciente al grupo VIIB. Se encuentra ubicado entre los elementos manganeso (Mn) y renio (Re) (tercera serie), presenta propiedades comunes especialmente con el Re (5).

Los núclidos del tecnecio son radioactivos, con periodos de semidesintegración desde 5 segundos (^{120}Tc) hasta 2.3×10^5 años (^{97}Tc). La aplicación biomédica del tecnecio se basa en el empleo del isótopo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (6).

Tiene estados de oxidación que van de -1 a +7 y el Dióxido de tecnecio (TcO_2) con valencia +4. Los restantes estados de oxidación son más inestables y difíciles de obtener, presentándose principalmente bajo forma de complejos de coordinación (7).

MARCACION DEL FARMACO CON $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Se eluye el generador de $^{99\text{Mo}}\text{-}^{99\text{m}}\text{Tc}$, se coloca el eluido en un vial estéril con vacío, luego se mide la actividad total del volumen eluido en un calibrador de dosis, retirándose del vial las dosis fraccionadas de actividad adecuada para el estudio (20 a 25 mCi) de $^{99\text{m}}\text{TcTcO}_4$ para estudios óseos en adultos y la dosis se disminuye de acuerdo al peso para los niños. Esta alicuota es agregada al vial que contiene MDP, liofilizado, se mezcla y se deja durante 10 minutos para que se lleve a cabo el proceso de marcación (8).

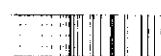
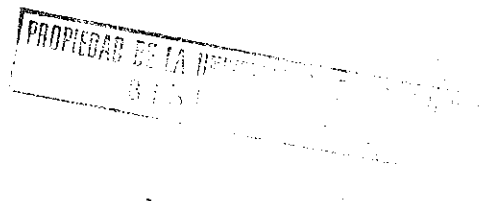
FLUOR

CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS

El flúor es un elemento que en forma pura es un gas de color verde amarillento, se combina con todos los elementos naturales, excepto con el oxígeno y el platino (9). Su peso atómico es 18.9984, no ocurre como flúor molecular (F_2) en la naturaleza (10).

Debido a su fuerte electronegatividad y gran poder de reacción química, el flúor no se encuentra nunca libre en la naturaleza. Su fuente principal es el espatoflúor o calcita (CaF_2).

El flúor es un elemento muy difundido en la naturaleza, compone un 0.065 % del peso de la corteza terrestre. Es un oligoelemento normal e indispensable de la fisiología humana, su falta absoluta es perniciosa para la salud (11).



El flúor posee varias propiedades únicas que han causado que se le llame el super halógeno. Es el elemento más electronegativo y es mucho más reactivo que los más electronegativos que le siguen: oxígeno y cloro. Reacciona con casi todos los elementos de la tabla periódica, incluso con el grupo VIII, llamados gases inertes, hasta que en 1962 se demostró que pueden reaccionar con él. Otra propiedad de este elemento consiste en que es el anión más pequeño que existe con una polarización mínima. Esto causa que presente altos números de coordinación, diferentes estructuras cristalinas y mayores energías de enlace que otros haluros, esto hace a los compuestos de flúor extremadamente reactivos (F_2HF) o muy estables. Estas propiedades indudablemente dificultan su análisis (12).

CARACTERISTICAS FARMACOLOGICAS

Se dice que el flúor es un buscador de tejido duro por encontrarse en mayor proporción (95% del flúor incorporado en el organismo) en huesos y dientes, debido a su afinidad con los minerales que los componen (13).

Generalmente el tejido óseo contiene 50 ppm de este ión. En el esqueleto la mayor concentración de flúor se encuentra en el periostio de los huesos; en el esmalte dentario, donde la mayor proporción está en la superficie, la mayor cantidad de flúor está en forma de HF cuyas moléculas se difunden más rápidamente; de allí que su absorción se lleve a cabo mayormente en el estómago (9). La absorción del flúor es un proceso esencialmente por difusión pasiva, sin la participación de ningún mecanismo activo de transporte (11).

Después de su absorción el flúor se distribuye en los líquidos extracelulares, se metaboliza en el organismo en dos formas: primero, se produce el depósito principalmente en el tejido óseo y dentario; luego se produce la excreción por vía renal. En la primera etapa, la cantidad retenida es influida en primer lugar por la edad y en segundo por la ingesta previa, ya que cuando menor es la demanda existente mayor es la eliminación (9).

Otro factor que hace variar la absorción del flúor, es la presencia de compuestos de calcio, cuya menor solubilidad al combinarse con el flúor iónico formado CaF_2 , disminuye la presencia de iones flúor libres. Iones inorgánicos presentes en agua y en alimentos pueden dificultar la absorción del fluoruro.

El fluoruro se excreta en la orina, la piel descamada, el sudor y las heces. El proceso es muy rápido y una hora después de haberlo ingerido aparece en la orina en cantidades apreciables. Además está comprobado que la velocidad de eliminación de este ión está relacionada con el pH urinario, ya que si este es ácido la eliminación es más lenta que si es alcalino (9). Puede ocurrir también que las variaciones en el contenido del flúor en la orina no se deban a una excesiva ingesta, sino por el contrario, a una falta, pues como el flúor no está unido en forma permanente al hueso, cuando la ingesta disminuye, el flúor es movilizado de los tejidos duros y el nivel urinario permanece alto.

Aproximadamente el 10 % de la excreción diaria de fluoruro se realiza por las heces, y parte de este está constituido por flúor insoluble e inabsorbido (11).

La dosis letal media (LD_{50}) del Fluoruro de sodio, oralmente en ratas es de 0.18 g/kg. En humanos existen síntomas severos de toxicidad por la ingestión de menos de un gramo; muerte de 5 a 10 g. Síntomas sublaterales; náusea, vómito, dolor abdominal, diarrea, estupor, debilidad. Síntomas letales: debilidad muscular, temblores, convulsiones, colapso, disnea, fallo respiratorio y cardíaco, muerte (10).

Indudablemente, la característica más importante que llevó al interés inicial en el MFP como un recurso de flúor, es su baja toxicidad aguda, ya que en esta molécula el flúor se encuentra en forma de ión complejo (12). Los efectos tóxicos del MFP son atribuibles al ión fluoruro liberado por la hidrólisis *in vivo* del compuesto original; el ión MFP parece no jugar ningún papel en este aspecto. La toxicidad aguda del MFP es en alguna medida menor que la del NaF debido a su menor disponibilidad, a corto plazo, de fluoruro en el MFP. En el largo plazo, el MFP produce virtualmente los mismos efectos del cuadro renal y la acumulación esquelética del fluoruro, que produce el NaF (13).

MECANISMO DE ACCION

La tabla siguiente muestra las reacciones que participan en la formación del complejo mineral entre las sales del flúor al entrar en contacto con la hidroxiapatita. Demuestra que aun cuando el producto final y útil es la fluorhidroxiapatita, existen diferentes mecanismos para su formación, y que la complejidad del proceso depende en gran parte de la cantidad de flúor puesta

en contacto con la hidroxiapatita en un determinado lapso, así como también de los compuestos que vehiculizan o transportan al ión fluoruro (13).

Puede notarse también que las concentraciones más bajas y de acción prolongada forman fluorhidroxiapatita solamente, mientras que mayores concentraciones, que actúan más rápidamente, hacen este proceso más complejo, formando Fluoruro de calcio.

Mecanismo de Formación de Fluorhidroxiapatita

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)(\text{O})_2$ Hidroxiapatita	
F (concentración baja) $\Rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2 + 2\text{OH}$ [1]	
Fluoroapatita	
F (concentración alta) $\Rightarrow \text{CaF}_2^+ + 6\text{PO}_4^- + 2\text{OH}$ [2]	
Acido $\Rightarrow 6\text{CaHPO}_4 + 4\text{Ca}^{++} + 2\text{OH}$	[3]
Acido $\Rightarrow 6\text{CaHPO}_4 + 4\text{Ca}^{++} \Rightarrow \text{CaF}_2$	[3]
F^-	
Proceso complementado de la siguiente forma:	
$\text{CaHP}_4 \Rightarrow \text{Ca}^{++} + \text{HPO}_4^- \Rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	[4]
F^- Fluoroapatita	
$\text{CaHPO}_4 \Rightarrow \text{Ca}^{++} \Rightarrow \text{CaF}_2$	[4]
F^-	
$\text{CaF}_2 \Rightarrow \text{Ca}^{++}\text{F}^- \Rightarrow \text{PO}_4^- \Rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}$	[5]
Fluoroapatita	

MONOFLUOROFOSFATO DE SODIO (MFP)

CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS

Soluble en agua hasta 42 % de saturación. El pH de una solución al 2 % es de 7.2. Es estable al diluirlo en soluciones acuosas, excepto en presencia de ácidos metaloides, los cuales pueden reaccionar y producir fluoruros insolubles.

El ácido monofluorofosfórico, precursor, se prepara generalmente por un método que rinde el ácido difluorofosfórico en cantidades equimolares, que después se separa por destilación; el ácido monofluorofosfórico no es volátil. Una mezcla equilibrada de los ácidos ortofosfórico y difluorofosfórico permanece en el MFP después de la destilación de tal forma que el ácido monofluorofosfórico nunca es obtenido en forma pura (12). Aún bajo las mejores condiciones de operación comercial de síntesis, la reacción nunca rinde el 100 % como $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$. Las materias no son completamente libres de impurezas y siempre contienen algunos compuestos gaseosos de fluoruro. La Farmacopea de los Estados Unidos (USP) requiere que el MFP de grado medicamentoso tenga un mínimo de 12.1 % de fluor en el ión complejo y no más de 1.2 % de fluoruro libre. Este 12.1 % de fluor en el PO_3F^- se calcula que al 91.7 % de pureza, el contenido teórico de fluor en el MFP es de 13.2 %.

Las soluciones acuosas de MFP a bajas concentraciones parecen ser estables indefinidamente. Con la presencia de otras sustancias, la solución será neutra o ligeramente básica. Si es agregado un ácido fuerte, o en la presencia de iones metálicos, que provocan fluoruros muy poco solubles, el ión PO_3F^- será lentamente convertido a ortofosfato y fluoruro para la reacción con agua (12).

El MFP comercial siempre tiene algunas decenas de porcentaje de fluor como NaF. Y aún cuando se obtiene la sal libre de iones fluoruro, no se elimina la posibilidad de que en alguna medida ocurra hidrólisis del ión PO_3F^- en contacto con enzimas u otras sustancias en la saliva (12).

Desde los primeros estudios de hidrólisis del MFP, se indicó que ésta ocurre fuertemente en ambos medios, ácidos y alcalinos; sin embargo, las soluciones de MFP a un pH 4.0 a 8.0 son estables (12).

TOXOCIDAD

El valor de la toxicidad aguda y crónica del MFP tiene que ser investigada exclusivamente.

Los valores de LD₅₀ después de una administración oral en las ratas y ratones de MFP es:

- Rata de 200 a 300 g de peso es de 75 mg/kg.
- Ratón de 20 a 40 g de peso es de 93 mg/kg.

El MFP posee una toxicidad muy baja comparada a los otros compuestos fluorados. La toxicidad aguda baja del MFP puede ser atribuida a la baja disponibilidad del ión fluoruro in vivo, por ejemplo: baja absorción en el estómago.

Estudios a largo plazo sobre la toxicidad crónica muestran como el MFP produce daño renal y almacenamiento esquelético.

FACTORES QUE DETERMINAN BIODISTRIBUCION DE LOS RADIOFARMACOS

La unión a proteínas o componentes intracelulares de las células sanguíneas, su lipofilia, el tamaño y carga iónica, la unión a receptores y otras propiedades físicas y químicas determinan la biodistribución de los radiofármacos. La estabilidad de los complejos está asociada directamente con la unión de proteínas. Estudios en ratas demuestran que los fosfatos se fraccionan en dos componentes. El primero es el Dióxido hidratado, el cual no tiene afinidad por el hueso y no es unido a proteínas plasmáticas, por lo cual es excretado por filtración glomerular. El segundo componente es el ^{99m}Tc y se une a las proteínas; es captado por la matriz ósea.

El principal mecanismo de movimiento de trazadores formados desde la sangre al hueso, está dado por una de las características del hueso que es la de ser reservorio de calcio y fósforo, estos penetran por los poros de la pared capilar intravascular mediante difusión pasiva hacia el espacio extravascular y éste al intracelular, la dilución inicial del compuesto es la determinante de la mayor o menor captación del hueso. También participan otros factores como el grado de depuración de estos agentes desde la sangre y los tejidos blancos.

La distribución biológica de un radiofármaco es la característica que permite establecer su utilidad para estudios funcionales u obtención de imagen estática. Su estabilidad in vivo puede verse afectada al unirse a proteínas del plasma o preferentemente, debe permanecer como compuesto libre y unirse a proteínas o células al concentrarse en el órgano blanco (14).

MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL PARA BIODISTRIBUCION EN HUESO

Wessler definió un modelo animal experimental, como un organismo vivo, que puede sufrir un proceso patológico ya sea adquirido o inducido, que en uno o más aspectos puede ser semejante a un fenómeno ocurrido en humanos. Un modelo experimental animal no puede duplicar una enfermedad humana, pero puede poseer una similitud con el proceso de enfermedad.

La fisiología del sistema esquelético no sólo envuelve una función de soporte estático, sino también efectos dinámicos, por ello los mejores modelos animales son: primates y caballos, aunque son más utilizados los ratones y ratas por su bajo costo y alta disponibilidad (15,16).

Las observaciones hechas en animales no siempre pueden trasladarse a humanos, sin embargo pueden obtenerse ciertas ideas generales sobre la captación, almacenamiento y depuración del radiofármaco y se pueden observar los efectos de ciertas intervenciones farmacológicas y físicas.

CONTROL DE CALIDAD DE LOS RADIOFARMACOS

CONTROLES FISICOS

- Características organolépticas: todo radiofármaco inyectable debe ser claro, límpido y libre de partículas visibles, excepto las suspensiones coloidales.
- Tamaño y número de partículas: son importantes en suspensiones coloidales.
- pH: es la forma de expresar concentración del ión hidrógeno de un medio. Todos los radiofármacos deben tener una concentración de hidrógeno adecuada para asegurar su estabilidad. El pH 7.4 es el ideal para la administración del radiofármaco, sin embargo no es crítico y puede variar entre los valores de pH de 1.5 a 6.0, por el alto poder regulador de la sangre para los pequeños volúmenes de radiofármacos que se administran.
- Isotonicidad: es la igualdad entre las presiones osmótica de una solución con respecto a otra, en el caso de un preparado inyectable se debe considerar la isotonicidad en relación al suero sanguíneo, sin embargo es frecuente que un radiofármaco no sea isotónico.
- Fuerza iónica: es importante en la estabilidad del radiofármaco debido que el control de la isotonicidad se mide por determinación de ésta (17).

CONTROLES RADIONUCLEIDOS

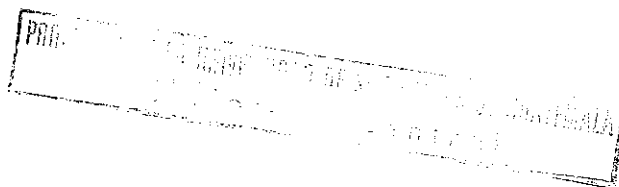
- Calibración de la actividad: se mide generalmente en una cámara de ionización. La cámara debe ser calibrada con un patrón adecuado, de actividad conocida y con las mismas características geométricas del radiofármaco. La estabilidad de la cámara se comprueba con un patrón de Cobalto-60, Cobalto-57 y Cesio-137.

El nivel de confiabilidad con que se asegura la actividad media es del 90 %.

- Pureza radionucleida: es la proporción de la actividad total en relación a la actividad del radionucleido especificado. Las impurezas radionucleidas pueden ser resultado del proceso de producción como: impurezas presentes en el blanco o irradiador, reacciones secundarias producidas por el blanco y productos originados por desintegración radioactiva o por una purificación ineficiente en el proceso de separación del producto de fisión. El control de la pureza radionucleida es importante para asegurar que la biodistribución, es característica del nucleído en cuestión y no influenciada por alguna impureza, y para minimizar la radiación absorbida por el paciente (17,18).

CONTROLES QUIMICOS

- Pureza química: es la fracción de masa total del radiofármaco presente en una forma química establecida. Para radiofármacos se puede determinar cualitativa o cuantitativamente la presencia de productos químicos no radioactivos que no forman parte de su composición. Esta determinación puede hacerse por métodos basados en la interacción de la sustancia con la energía radiante; espectrofotómetro de absorción atómica, colorimetría, pureza radioquímica, análisis por activación. La técnica más usada es la cromatografía en todas sus versiones: en papel, capa fina, líquida, etc (19). En esta pureza influye tanto la preparación como la purificación del radiofármaco y para determinarlo es necesario separar los compuestos radioactivos del sistema utilizando métodos como cromatografía, electroforesis y filtración en gel (20).



CONTROLES MICROBIOLÓGICOS

- **Esterilidad:** es la ausencia de microorganismos viables, condición fundamental de toda preparación para uso parenteral. Para asegurar la esterilidad de un radiofármaco, es necesario aplicar buenas prácticas de manufactura, que incluyen técnicas asépticas a nivel de producción y fraccionamiento de dosis al administrar. Existen varios métodos de esterilización aplicados según la naturaleza de la sustancia: por calor húmedo, calor seco y filtración gamma. Las pruebas de esterilidad se realizan para comprobar la presencia de bacterias y hongos de acuerdo a la Administración de Alimentos y Drogas (FDA). Estas pruebas se realizan por incubación de varias alícuotas de radiofármacos en un medio de tioglicolato de 35 a 37°C, durante 7 a 14 días, en un medio de tripticasa soya durante 48 horas a 37°C y en agar Sabouraud durante 14 días a temperatura ambiente. Generalmente los procesos de esterilización de los radiofármacos hidrosolubles se realizan al final del proceso de fabricación, por filtración de soluciones por una membrana estéril de 0.22 μm a viales estériles en campana de flujo laminar horizontal (20).
- **Toxicidad:** tiene por objeto excluir la posibilidad de que el radiofármaco resulte tóxico para el paciente. Existen por lo menos tres fuentes esenciales de toxicidad: radiotoxicidad, toxicidad química de los compuestos radioactivos y toxicidad de los excipientes. El control se realiza en la etapa previa a la liberación del radiofármaco y generalmente se determina la dosis letal media (17).
- **Pirógenos:** son endotoxinas, producto del metabolismo de los microorganismos gram negativo, son generalmente solubles, termoestables y conducen a una reacción febril que se manifiesta después de ser inyectado. El método oficial de control de pirógenos se basa en la medida de la respuesta febril en conejos después de haberles administrado la sustancia a probar, sin embargo existe otro método *in vitro* denominado Test de lisado de amebocitos de Limulus polyphemus que se fundamenta en precipitación, coagulación de ciertas proteínas del lisado de amebocitos en presencia de endotoxinas.

4. JUSTIFICACION

En los departamentos de medicina nuclear del Hospital General San Juan de Dios, Hospital Roosevelt y centros privados de Guatemala, la centellografía ósea es uno de los estudios más realizados, aproximadamente representa el 40 % del total de los estudios centellográficos en general, debido a que es el procedimiento de elección para radiolocalización de metástasis óseas, osteomielitis y celulitis.

Por su alta sensibilidad, el Metilendifosfonato (MDP), marcado con Tecnecio-99 meta-estable (^{99m}Tc), es el radiofármaco que presenta mayores ventajas para la exploración ósea, su costo es bastante elevado por lo que es importante buscar una nueva fórmula, con el objeto de disminuir costos y que a la vez proporcione resultados similares en el estudio de patologías óseas. Por lo tanto se propone la formulación del Monofluorofosfato de sodio (MFP), marcado con ^{99m}Tc , ya que el costo de esta sal es bajo; se espera obtener resultados equivalentes a los obtenidos con el MDP al compararlos en un modelo biológico.

6. HIPOTESIS

La biodistribución en ratones blancos del radiofármaco Metilendifosfonato (MDP) y Monofluorofosfato de sodio (MFP), marcados con Tecnecio-99 meta-estable (^{99m}Tc) utilizados en centellografía ósea, es equivalente.

7. MATERIALES Y METODOS

UNIVERSO DE TRABAJO

Fórmulas de radiofármacos liofilizados: Metilendifosfonato (MDP) y Monofluorofosfato de sodio (MFP), marcados con Tecnecio-99 meta-estable (^{99m}Tc).

RECURSOS HUMANOS

- Autora: María Gabriela Sánchez Montúfar.
- Asesora: Licda. Diana Freire de Nave.
- Colaboración: personal de apoyo de la radiofarmacia de la Dirección General de Energía Nuclear.

RECURSOS INSTITUCIONALES

Se usó equipo y reactivos de la radiofarmacia de la Dirección General de Energía Nuclear.

MATERIALES

- Gradillas.
- Frascos de borosilicato No. 1.
- Tapones de hule para liofilizar.
- Arandelas de aluminio.
- Tijeras.
- Bandejas.
- Contenedores de plomo.
- Jeringas tipo tuberculina.
- Materiales de disección.
- Pipetas graduadas, tubos de ensayo y beakers.
- Filtros millipore de 0.22 μm .
- Algodón.
- Papel cromatográfico.

- Jaulas para inyección
- Papel pH.
- Destapadora.

EQUIPO

- Balanza analítica.
- Campana de flujo laminar.
- Liofilizadora.
- Autoclave.
- Contenedor de pozo con detector de Yoduro de sodio Ortec 777A.
- Refrigeradora.
- Equipo de cromatografía.
- Selladora manual.
- Horno.
- Incubadora.
- Potenciómetro con electrodo de calomel.
- Agitador magnético.

REACTIVOS

- Generador de ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Amersham.
- Monofluorofosfato de sodio.
- Metilendifosfonato.
- Cloruro estannoso dihidratado.
- Acido clorhídrico.
- Acido ascórbico.
- Hidróxido de sodio.
- Acetona.
- Metanol.

- Agua tridestilada apirógena.
- Solución salina estéril.
- Medios de cultivo: caldo tripticasa seya, caldo tioglicolato y agar sabouraud.

PROCEDIMIENTO

Se formuló el nuevo radiofármaco Monofluorofosfato de sodio, como control se utilizó el Metilendifosfonato liofilizado, producido en la radiofarmacia de la Dirección General de Energía Nuclear.

PREPARACION DE SOLUCIONES

Estas soluciones se prepararon previo a la fabricación del set:

- Solución de Cloruro estannoso al 8 % (p/v): pesar 400 mg de Cloruro estannoso dihidratado, disolverlo en 0.5 ml de ácido clorhídrico, calentar si es necesario para aclarar la solución. Finalmente se debe agregar 5 ml de agua para inyección.
- Solución de Hidróxido de sodio 2N: 2 g de Hidroxido de sodio deben pesarse rápidamente y disolverlo en 25 ml de agua para inyección.

PRODUCCION DEL SET

- Pesar 500 mg de Monofluorofosfato de sodio y 50 mg de ácido ascórbico, disolver en aproximadamente 80 ml de agua para inyección. La solución de Hidróxido de sodio 2N se debe agregar para clarificar la solución, solo si se requiere.
- Medir 0.62 ml de la solución de Cloruro estannoso, agregar gota a gota.
- El pH de la solución debe ajustarse en un rango de 6 a 7, adicionar por goteo la solución de Hidróxido de sodio 2N.
- Aforar el volumen final a 110 ml con agua para inyección.
- La solución filtrada debe ser dispersada en frascos limpios y estériles de 1 ml, esterilizar los tapones de goma.
- Los frascos se transfieren al congelador y son liofilizados por 24 horas.
- Los frascos se deben sellar al vacío o en seco, filtrados con nitrógeno gaseoso.

- Los frascos se deben almacenar en un ambiente de 2 a 10°C, etiquetados.

<p>Set para ^{99m}Tc MFP inyección</p> <p>Código: _____ Lote: _____</p> <p>Expira: _____</p> <p>5 mg de MFP</p> <p>0.5 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$</p> <p>0.5 mg de ácido ascórbico</p> <p>Almacenarse de 2 a 10°C</p>
--

- Los detalles de la historia completa del lote se deben proporcionar en un libro de registros. El lote debe permanecer en cuarentena mientras los exámenes analíticos y biológicos son completados; y posteriormente el lote esta libre para uso humano.

CONTROL DE CALIDAD

FISICOS

- Características organolépticas: color, olor y apariencia.
- Determinación de pH: por medio de un potenciómetro con electrodo de calomel.

QUIMICO Y RADIOQUIMICO

- Pureza radionucleica: determinar en forma cuantitativa y cualitativa la presencia de interferencias por medio de espectrofotometría gamma.
- Pureza radioquímica: determinar por cromatografía en capa fina (soporte), el porcentaje de unión del fármaco con el radionucleido, con solventes de Cloruro de sodio al 0.85 % y acetona. Esperar el tiempo necesario para que migre y seque, se corta la tira en porciones de 1 cm y luego se cuenta la actividad en el detector Ortec.

MICROBIOLOGICO

Seleccionar tres muestras al azar del lote y sembrar medios de cultivo.

- Caldo tripticasa soya para bacterias aeróbias.
- Caldo tioglicolato para bacterias anaeróbias.
- Agar sabouraud para hongos y levaduras.

Efectuar la siembra bajo campana de flujo laminar, colocar con jeringa estéril 2 ó 3 gotas del material en estudio con posterior incubación a 37°C durante 48 hr en el primer medio, en el segundo a 37°C durante 7 a 14 días y a temperatura ambiente (22 a 25°C) durante 14 días el tercero. Determinar visualmente la presencia del crecimiento microbiano el cual se pondrá de manifiesto por medio de turbidez en el primero y segundo medio y por la presencia de colonias fúngicas en el tercero.

DISTRIBUCION BIOLOGICA

Utilizar 20 ratones machos con un peso que oscile entre 20 a 30 g aproximadamente. Inyectar a 10 de ellos con MDP y a los otros 10 con MFP, ambos marcados con ^{99m}Tc . Sacrificar a los animales experimentales tres horas después de la administración del radiofármaco para obtener los órganos apropiados para el estudio: hueso (fémur), riñón e hígado; luego determinar y registrar el peso de cada órgano. Proceder a medir el porcentaje de radioactividad en un detector de centello marca Ortec, en hueso, riñón e hígado. Comparar la distribución de los dos radiofármacos en los órganos.

DISEÑO EXPERIMENTAL

PORCENTAJE DE MARCACION A pH 5.0

Se promedió los porcentajes de marcación del ^{99m}Tc a pH 5.0 en el MFP preparado, se calculó la desviación estándar que existe entre los mismos.

BIODISTRIBUCION EN HUESO

- Tipo de diseño: diseño factorial 2 x 3. Los factores estuvieron constituidos por: radiofármacos (MDP y MFP) y órganos (hueso, riñón e hígado).

Calculo de número de réplicas:

$$H_0: \mu_{MFP} = \mu_{MDP}$$

$$H_a: \mu_{MFP} \neq \mu_{MDP}$$

$$\text{Nivel de confianza (NC): } Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta}$$

α : probabilidad de rechazar H_0 siendo verdadera ($\alpha = 0.05$).

β : probabilidad de aceptar H_0 siendo falsa ($\beta = 0.15$).

$$NC = 2.63 + 1.037 = 3.667$$

Varianza (σ^2): variabilidad de la respuesta.

Límite de error (Δ): distancia mínima entre los dos grupos (promedios) para considerarlos diferentes.

Se trabajó con un límite de error igual a dos veces la desviación standard.

$$n_j = \frac{2NC^2C^{-2}}{40^{-2}} = \frac{2NC^2O^{-2}}{2} = \frac{NC^2}{2}$$

$$n_j = \frac{(3.667)^2}{2} = 7 \text{ ratones para cada tratamiento.}$$

El número de réplicas es de siete pero en esta investigación se utilizó 10 ratones para cada tratamiento.

- Análisis estadístico: los resultados obtenidos fueron analizados mediante análisis de varianza para un diseño factorial 2×3 , se determinó la diferencia significativa entre radiofármacos y órganos. Así mismo se efectuó un análisis de varianza de una vía para cada uno de los radiofármacos. Posteriormente se aplicó la prueba de Fisher (mínima diferencia significativa-LSD) entre cada órgano.

8. RESULTADOS

A los radiofármacos fabricados (MDP y MFP, ambos marcados con ^{99m}Tc), se les realizó controles de calidad: físicos, químicos y radioquímicos. Las características organolépticas presentadas fueron: claro, límpido y libre de partículas visibles. Se determinó el pH con un potenciómetro con electrodo de calomel, para el MDP fue de 6.0 y 5.0 para el MFP.

La pureza radioquímica para determinar el porcentaje de unión del fármaco con el radionucleído se realizó mediante cromatografía en capa fina (soporte), Cloruro de sodio al 0.85 % y acetona (solventes). Se calculó el porcentaje de unión, el porcentaje promedio y la desviación standard (Anexo 1). Los resultados del porcentaje de marcación obtenidos fueron, 85.00 % con Cloruro de sodio y 98.35 % con acetona para el MDP. El MFP marcó 54.65 % con una desviación standard de 22.21 en Cloruro de sodio y 94.04 % con una desviación standard de 9.22 en acetona (Tabla 1).

El proceso de esterilización de los radiofármacos se realizó al final del proceso de fabricación, por filtración de las soluciones por una membrana estéril de 0.22 μm a viales estériles en campana de flujo laminar horizontal.

Para determinar la distribución biológica de los radiofármacos se utilizó 20 ratones machos con pesos que oscilaron entre 21 y 33.1 g. Se inyectó a 10 de ellos MDP y a los otros 10 MFP, ambos marcados con ^{99m}Tc . Los animales experimentales se sacrificaron 3 hr después de la administración de los radiofármacos. Se extrajo los órganos apropiados para el estudio: hueso (fémur), riñón e hígado y se pesó cada uno. Por último se midió el porcentaje de radioactividad en un detector de centello marca Ortec. La actividad de los radiofármacos se calculó mediante análisis de varianza para un diseño factorial 2×3 , se demostró que probablemente con un 95 % de confianza es similar, ya que no existe diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) (Tabla 2).

La biodistribución de los radiofármacos en los órganos, hueso, riñón e hígado, se calculó mediante análisis de varianza para un diseño factorial 2×3 , se demostró que probablemente con un 95 % de confianza existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (Tabla 2 Y 3).

Así mismo, al efectuar un análisis de varianza de una vía para cada uno de los radiofármacos se obtuvo que, probablemente con un 95 % de confianza, existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la biodistribución para cada órgano (Tabla 5 y 7).

Posteriormente se efectuó la prueba de Fisher (minima diferencia significativa-LSD) para determinar diferencia entre cada órgano, los resultados para el análisis efectuado para el MDP fueron que, entre cada órgano con ($\alpha = 0.05$) un 95 % de confianza la biodistribución es diferente ($p < 0.05$) (Tabla 6), sin embargo los resultados del análisis para el MFP demostraron que probablemente con un 95 % de confianza la biodistribución entre hueso e hígado y riñón e hígado son diferentes ($p < 0.05$), pero entre hueso y riñón la biodistribución es igual, ya que no existe diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) (Tabla 8).

La caja de Tukey de la gráfica 1 relaciona el porcentaje de actividad/g de órgano con los dos tratamientos aplicados, y en la gráfica 2 se muestra la interacción entre los dos radiofármacos; demostrando lo anteriormente expuesto.

TABLA 1

C.C. de la pureza desviación standard del radioquímica realizado al MFP.

SOLVENTES	NaCl	ACETONA
REPETICIONES 1	82.75	98.45
2	74.75	75.71
3	32.16	95.90
4	32.74	94.58
5	40.90	99.81
6	64.59	99.76
Promedio	54.65	94.04
Desviación standard	22.21	9.22

Control de calidad de la pureza radioquímica realizada al MDP

SOLVENTES	NaCl	ACETONA
Original	91.78 %	99.68 %
Día Investigación	85.00 %	98.35 %

TABLA 2

Análisis de varianza para un diseño factorial 2 x 3 del porcentaje de actividad entre radiofarmacos y organos.

Muestra	df:	Suma de cuadrados	Significado de cuadrados	F-TEST	P VALUE
Radiofarmacos(A)	1	1.067E-4	1.067E-4	3.751E-6	.9985
Organos	2	24345.299	12172.65	438.085	.0001
AB	2	2513.102	1256.551	44.19	.0001
Error	54	1535.497	26.435		

TABLA 3

Biodistribución de radiofarmacos en organos

ORGANOS		HUESO	RINON	HIGADO	TOTALES
RADIO FICA..	MDP	10 63.785	10 30.926	10 5.291	30 33.334
	MFP	10 46.762	10 45.268	10 7.964	30 33.331
TOTALS		20 55.274	20 38.097	20 6.627	60 33.333

SECRET
BIB

TABLA 4

XI: HUESO (MDP)

Significado	Desv. Std.	Error Std.	Varianza	Coef. Var.:	Muestras
63.785	5.775	1.826	33.353	9.054	10

Mínimo	Máximo	Rango	Suma	Suma de Cuadrados	Medida
52.18	71.91	19.73	637.85	40985.444	0

XI: RIGON (MDP)

Significado	Desv. Std.	Error Std.	Varianza	Coef. Var.:	Muestras
30.926	5.3	1.676	28.093	17.139	10

Mínimo	Máximo	Rango	Suma	Suma de Cuadrados	Medida
22.61	41.29	18.68	309.26	9817.014	0

XI. Hgd. (MDP)

Significado	Desv. Std.	Error Std.	Varianza	Coef. Var.:	Muestras
5.291	0.942	0.298	0.887	17.802	10

Mínimo	Máximo	Rango	Suma	Suma de Cuadrados	Medida
3.86	6.94	3.08	52.91	287.931	0

XI: HUESO (MDP)

Significado	Desv. Std.	Error Std.	Varianza	Coef. Var.:	Muestras
46.762	7.506	2.374	56.347	16.052	10

Mínimo	Máximo	Rango	Suma	Suma de Cuadrados	Medida
39.09	63.77	24.68	467.62	22373.97	0

XI: RIGON (MDP)

Significado	Desv. Std.	Error Std.	Varianza	Coef. Var.:	Muestras
45.268	7.094	2.243	50.328	15.672	10

Mínimo	Máximo	Rango	Suma	Suma de Cuadrados	Medida
29.85	54.18	24.33	462.68	20944.875	0

XI: RIGON (MDP)

Significado	Desv. Std.	Error Std.	Varianza	Coef. Var.:	Muestras
7.964	1.265	0.4	1.601	15.889	0

Mínimo	Máximo	Rango	Suma	Suma de Cuadrados	Medida
6.17	9.84	3.67	79.64	648.665	0

TABLA 5

ANALISIS DE VARIANZA DE LA
DISTRIBUCION BIOLOGICA DEL MDP

NO.	HUESO	\sum^2	RINON	\sum^2	HIGADO	\sum^2
1	58.48	3538.08	35.03	1227.10	5.48	30.03
2	68.32	4687.82	27.82	773.95	3.88	14.90
3	71.91	5171.05	22.81	511.21	5.48	30.03
4	64.52	4182.83	30.38	921.73	5.12	26.21
5	64.08	4103.88	30.84	938.81	5.30	28.09
6	58.49	3538.08	33.57	1128.94	6.94	48.18
7	68.10	4637.61	27.25	742.56	4.85	21.82
8	52.18	2722.75	41.28	1704.88	6.53	42.64
9	61.70	3806.89	34.10	1162.81	12.34	152.28
10	68.03	4634.89	28.59	707.03	5.33	28.41
TOTAL	637.85		309.28		61.03	
X	63.78	Ex2	30.93	Ex2	6.10	Ex2
(Ex)2	408852.82	40885.44	95841.75	9817.01	3724.88	422.98

ANDEVA

SCT=SCtrat+SCerror	
SCT=EE \sum^2 -(EEX) \sum^2 /N	
SCT=	17348.82535
SCtrat=(ET) \sum^2 /n-(EEX) \sum^2 /N	
SCt=	18743.89445
SCerror=SCtotal-SCtrat	
SCe=	602.8308
F=CM trat/CM error	
CM trat= SCtrat/K-1	
CM error= SCerror/N-K	
CMtrat=	8371.847223
CMerror=	22.33077407
	F= 374.90
F critica=	3.32
Fcalculada=	374.90

TABLA 6

**PRUEBA DE FISHER PARA LA DISTRIBUCION DEL MDP
(MINIMA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA-LSD-)**

ORDEN	1	2	3
GRUPO	HUESO	PINON	HIGADO
MEDIA	63.79	30.93	6.10

		63.79	30.93	6.10
		1	2	3
6.10	3	-57.69	-24.83	0
30.93	2	-32.86	0	
63.79	1	0		

$LSD = t_{\alpha/2(N-K)} (CM \text{ error } \times (1/n_1 + 1/n_2 + 1/n_3))$

t=	1.96	CMerror	22.33
N=	30	n1=10	n2=10 n3=10

LSD= 1.6910

ORDEN:

3-1	57.690	>	1.691	No.1 y No.3 son diferentes*
3-2	24.830	>	1.691	No.3 y No.2 son diferentes*
2-1	32.860	>	1.691	No.2 y No.1 son diferentes*

* p < 0.05

LIBRO DE LA UNIV. de Chile

TABLA 7

ANALISIS DE VARIANZA DE LA
DISTRIBUCION BIOLOGICA DEL MFP

No.	HUESO	\sum^2	RINON	\sum^2	HIGADO	\sum^2
1	44.01	1936.88	45.83	2100.39	10.16	103.23
2	40.69	1655.68	50.83	2583.69	8.48	71.91
3	48.73	2183.69	44.48	1978.47	8.79	77.26
4	43.61	1901.83	48.28	2329.03	8.13	66.10
5	48.28	2330.98	43.38	1880.09	6.38	69.89
6	41.55	1726.40	49.63	2463.14	8.82	77.79
7	52.28	2733.20	40.57	1645.82	7.15	51.12
8	48.83	2384.14	44.80	2016.01	6.17	38.07
9	63.77	4068.61	29.85	891.02	6.38	40.70
10	39.15	1532.72	54.18	2935.47	6.87	44.49
TOTAL	469.00		451.88		79.11	
X	46.90	Ex2	45.19	Ex2	7.91	Ex2
(Ex)2	219981.00	22482.12	204204.57	20823.23	6258.39	640.58

ANDEVA

SCT=SCtrat+SCerror	
SCT=EEx2-(EEx)2/N	
SCT=	10582.58327
SCtrat=(ET)2/n-(EEX)2/N	
SCt=	9709.063087
SCerror=SCtotal-SCtrat	
SCe=	883.52018
F=CM trat/CM error	
CM trat= SCtrat/K-1	
CM error= SCerror/N-K	
CMtrat=	4854.531543
CMerror=	32.72298883
	F= 148.35
F critica=	3.32
Fcalculada=	148.35

TABLA 8

PRUEBA DE FISHER PARA LA DISTRIBUCION DEL MFP
(MINIMA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA-LSD-)

ORDEN	1	2	3
GRUPO	HUESO	PINON	HIGADO
MEDIA	46.90	45.19	7.91

		46.9	45.19	7.91
		1	2	3
7.91	3	-38.99	-37.28	0
45.19	2	-1.71	0	
46.90	1	0		

$LSD = t_{\alpha/2(N-K)} (CM\ error \times (1/n_1 + n_2 + n_3))$

t=	1.96	CMerror	32.722
N=	30	n1=10	n2=10 n3=10

LSD= 2.0470

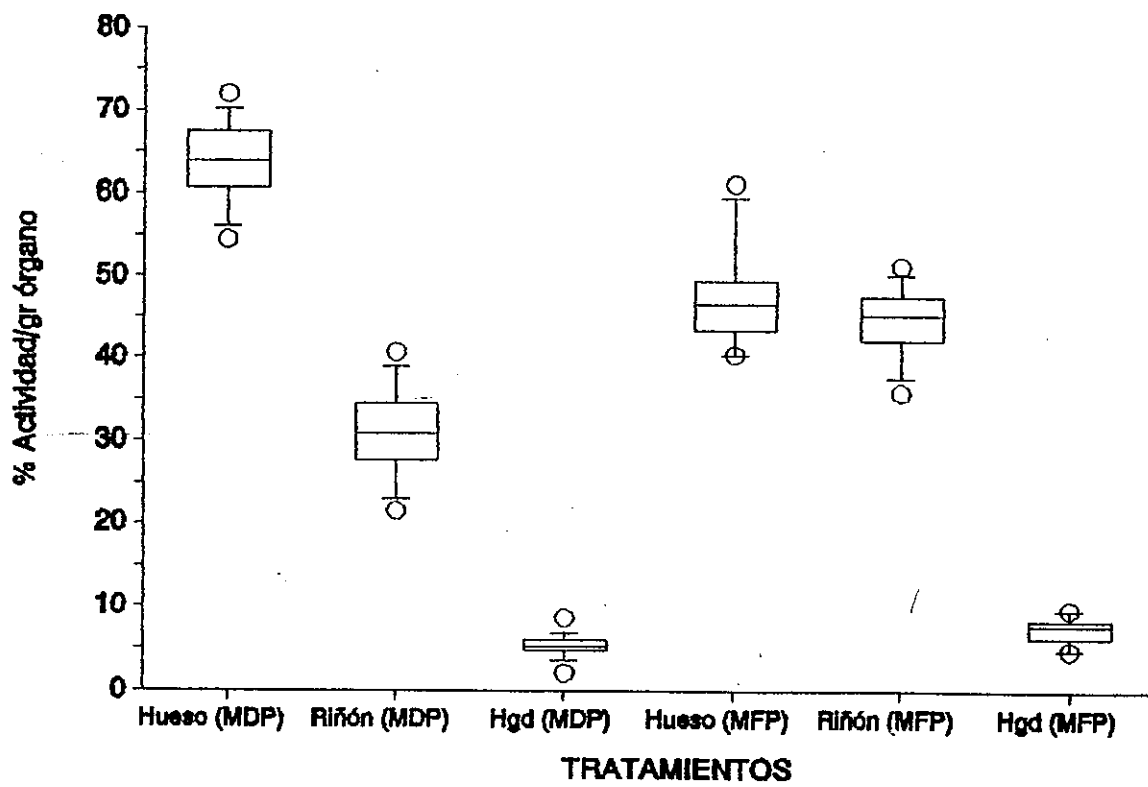
ORDEN:

3-1	38.990	>	2.047	No.1 y No.3 son diferentes*
3-2	37.280	>	2.047	No.3 y No.2 son diferentes*
2-1	1.710	<	2.047	No.2 y No.1 son iguales**

* p < 0.05

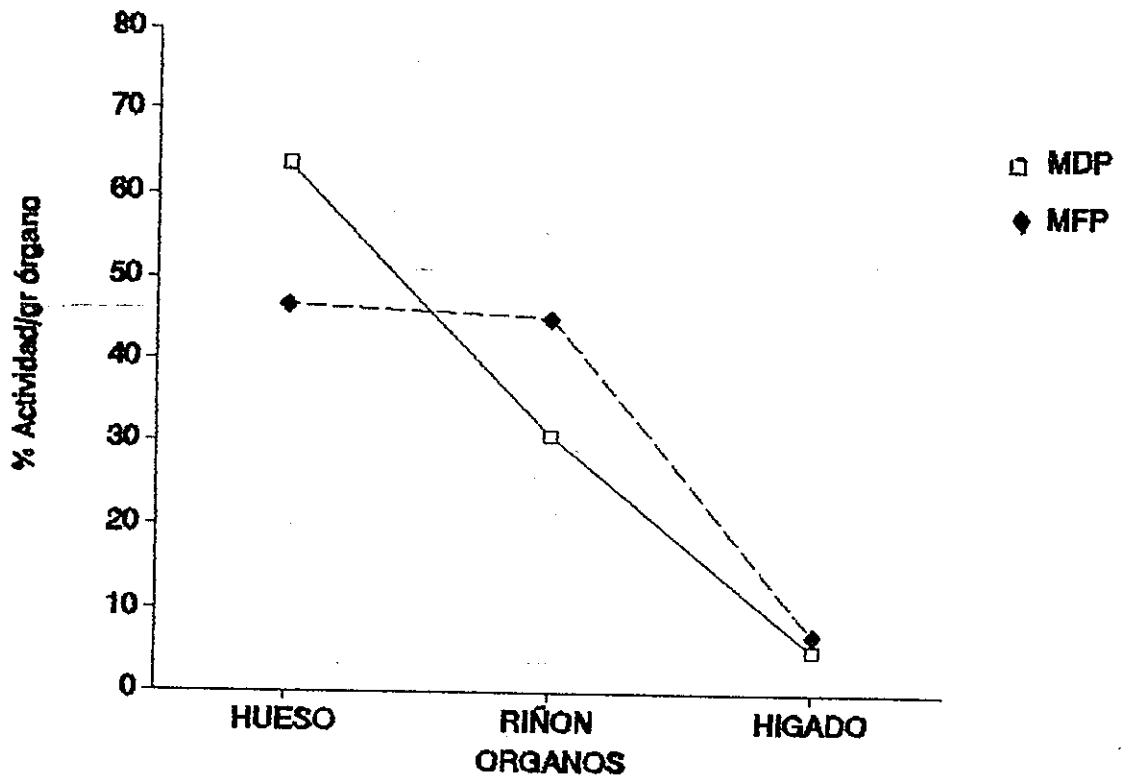
**p > 0.05

Grafica 1



GRAFICA 2

GRAFICO DE INTERACCION RADIOFARMACOS



9. DISCUSION DE RESULTADOS

La formulación del radiofármaco MFP, marcado con ^{99m}Te se llevó a cabo de la misma forma como se produce el MDP en la radiofarmacia de la Dirección General de Energía Nuclear, con la única diferencia que el MDP se produce a pH 6.0 y el pH fué de 5.0; porque si es más alto la solución transparente se transforma en un coloide. A pesar de que el pH ideal para la administración de un radiofármaco es 7.4, no es crítico que el pH del MFP haya sido 5.0, ya que puede variar entre los valores de 1.5 a 9.0, por el poder regulador de la sangre para los pequeños volúmenes de radiofármaco que se administran.

Después de la producción de los radiofármacos se les realizó los controles de calidad necesarios. La solución fue clara, límpida y libre de partículas visibles, estas son las características organolépticas indispensables para cualquier radiofármaco inyectable.

Con la pureza radioquímica se determinó el porcentaje de unión de los fármacos con el radionucleído, se realizó por cromatografía en capa fina (soporte) con solventes de Cloruro de sodio al 0.85 % y acetona. El promedio de los porcentajes de marcación del MDP con el Cloruro de sodio fueron de 85.00 %, mientras que con el MFP variaron, desde un 32.16 hasta un 82.75 %, teniendo una desviación standard de 22.21; lo que indica que varios factores influyeron en la medición del porcentaje, entre ellos se pueden mencionar: la preparación y purificación del radiofármaco, la cantidad de muestra colocada en el soporte, el tiempo necesario para migrar y secar. Por otro lado, el porcentaje de marcación detectado con acetona fue bueno, tanto para el MDP como MFP, siendo estos 98.35 % en el MDP y en MFP oscilaron entre 75.71 y 99.81 %, lo cual tiene una desviación standard de 9.22; lograndose obtener un porcentaje de marcación mayor al 90 %.

Para asegurar la esterilidad de los radiofármacos fue necesario aplicar buenas prácticas de manufactura, que incluyeron técnicas asépticas a nivel de producción y fraccionamiento de dosis al administrar. Los procesos de esterilización de los radiofármacos se realizaron al final del proceso de fabricación, si filtró las soluciones en viales estériles en una campana de flujo laminar horizontal.

Mediante el análisis de varianza para un diseño factorial 2 x 3 se demostró que, probablemente con un 95 % de confianza el porcentaje de actividad del MDP y MFP es similar, ya que no existe diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$); pero en la biodistribución en hueso, riñón e hígado sí existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Con el análisis de varianza de una vía para cada uno de los radiofármacos, se demostró que sí existe diferencia estadísticamente significativa en la biodistribución de cada órgano; pero para determinar la diferencia en la biodistribución entre cada órgano se aplicó, la prueba de Fisher (mínima diferencia significativa-LSD), lo que dio como resultados; en el MDP sí existe diferencia estadísticamente significativa en la biodistribución entre cada órgano ($p < 0.05$), mientras que para el MFP sólo existe diferencia estadísticamente significativa entre hueso e hígado y entre riñón e hígado ($p < 0.05$), pero entre hueso y riñón no existe diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$); concluyéndose que el MFP no es equivalente al MDP debido a que la biodistribución en hueso y riñón es similar, lo cual no es aconsejable porque puede crear confusión en el momento del diagnóstico dando resultados falsos positivos, o bien, puede marcar poca actividad en hueso y excretar la mayor parte del radiofármaco, esto impide que la matriz ósea aumente su porcentaje de captación.

La distribución biológica del radiofármaco MFP marcado con ^{99m}Te administrado a ratones pudo verse afectado por la unión a proteínas del plasma o permaneció como compuesto libre y se une a proteínas o células al concentrarse en el órgano blanco; su lipofilia, el tamaño y carga iónica, la unión a receptores y otras propiedades físicas y químicas. Las observaciones hechas en ratones no siempre pueden trasladarse a humanos, sin embargo se pudieron obtener ciertas ideas generales sobre la captación, almacenamiento y depuración del MFP.

10. CONCLUSIONES

- 10.1. El porcentaje de marcación del MFP con ^{99m}Tc a pH 5.0 varia con el solvente de Cloruro de sodio al 0.85 %, pero es estable con acetona, lográndose una marcación mayor al 90 %.
- 10.2. El porcentaje de marcación del MDP y MFP es similar ya que no existe diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$).
- 10.3. En la biodistribución del MDP y MFP en hueso, riñón e hígado, el valor p es menor a 0.05, por lo que si existe diferencia estadísticamente significativa.
- 10.4. En la biodistribución del MDP si existe diferencia estadísticamente significativa entre cada órgano (hueso e hígado, riñón e hígado, hueso y riñón) ($p < 0.05$).
- 10.5. En la biodistribución del MFP si existe diferencia estadísticamente significativa entre hueso e hígado y riñón e hígado ($p < 0.05$), pero no existe diferencia estadísticamente significativa entre hueso y riñón ($p > 0.05$).
- 10.6. La biodistribución en ratones blancos de los radiofármacos MDP y MFP, marcados con ^{99m}Tc , utilizados en centellografía ósea no es equivalente.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1. Formular un radiofármaco químicamente estable a base de MFP, marcado con ^{99m}Tc para uso de centellografía ósea a un pH diferente de 5.0, para observar la variación de la biodistribución y actividad en hueso, riñón e hígado del nuevo radiofármaco, mediante comparación con un grupo control al que se le administre MDP marcado con ^{99m}Tc .
- 11.2. Fomentar la investigación en la búsqueda de nuevas sustancias químicas que sus moléculas sean similares al MDP para encontrar un radiofármaco alternativo en la centellografía ósea.

12. REFERENCIAS

1. Portillo M.C. Comparación de dos métodos de producción de radiofármacos y evaluación de su calidad. Guatemala: Universidad de San Carlos (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1987. 111p.
2. Wagner H. Principles of nuclear medicine. Philadelphia: W.D.Sauders.1986. 586p. (p 13-17)
3. Godoy N. Fundamentos de radiofarmacia. Chile. Comisión chilena de energía nuclear, Doc. Tec. 1989. 12p. (p 1-5).
4. Gottschalk S.A., et al. Diagnostic nuclear medicine. Baltimore: Williams and Willins. 1976. 320p. (p 38-42).
5. Steigman J., et al. Chemistry of Technetium 99m. Sem. Nucl. Med. 1974; 4:269-279p.
6. Colombetti L.G. Performance of 99mTc generatin systems. p 183-194. (In Rhodes BA. Quality control in nuclear medicine. Sanin Lois: The CV Mosty Company. 1997. XII + 508p.
7. Subramanian G, McAffe J.G. A new complex of 99mTc for skeletal imaging radiology. 1971; 99:(p 192-196).
8. Bogarello L. Flúor. Rev. Facultad de Odontología. U.N.C. 1983; 2(1.2):(p 63-106).
9. The Merck Index, and encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Merck & Co. Inc. 11a ed. New Jersey. 1989. XIX + 1606p.
10. Mejicanos H.R. Cuantificación del contenido de fluoruros libres en los compuestos que se encuentran en el mercado de Guatemala y que ananucian prevenir la caries dental. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Odontología). 1986. 127p.
11. Krager S. Monofluorophosphate perspectives. Suiza: Revista J. Eur. Org. Car. Res-ORCA. 1983; 17(S1); IV + 136p.
12. Bernier J.L., Mulher J.C. Medidas preventivas para mejorar la práctica dental. Trad Samuel Leyt. Buenos Aires: Mundi. 1977. (p 106-107).
13. Zummer A.M., Pavel D.G. Rapid miniaturized chromatographye quality control procedures for 99mTc radiopharmaceuticals. J Nucl Med. 1977; 18:(p 1230-1233).
14. Wesler S. Animal models of thrombosis and hemorrhagic diseases. Washington D.C.: HEW Publication No. 20 Doc. Tec. 1975. 9832p. (p 76).

15. Research resources reporter US Department of health, human services. Washington: Department of health and services, Doc. Tec. No. 2. 1983. 20p. (p. 15-16).
16. Rodriguez, et al. Handbook of radiopharmaceuticals of nuclear biology medicine societies. (Alasbimn), Doc. Tec. 1989. 154p. (p 13-23)
17. Pauwels E, Feitsma R. Radiochemical quality control of ^{99m}Tc labeled radiopharmaceuticals. Eur. J. Nucl. Med. 1977; 2:(p 97-103).
18. Piera C. Control de calidad de radiofármacos de ^{99m}Tc en Hospital Provincial. Barcelona: CIEMAT. Doc. Tec. 1992. 18p. (p 7-9).
19. Gil M.C. Diseño de radiofármacos. Farmacia centralizada de Chile. Doc. Tec. 1992. 25p (p 7-18).
20. International atomic energy agency. Preparation of kit for ^{99m}Tc radiopharmaceuticals. Lugar: IAEA. Doc. Tec. 1992. 649p. (p17-18).

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
BIBLIOTECA Central

13. ANEXOS

ANEXO 1

CONTROL DE CALIDAD RADIOQUIMICO DEL MFP CON TECNICIO 99 META-ESTABLE

EQUIPO DE DETECCION: OETEC

SOPORTE: ITLC-SG WHATMAN

pH: 5

NaCl	Acetona	NaCl	Acetona	NaCl	Acetona	NaCl	Acetona	NaCl	Acetona	NaCl	Acetona	NaCl	Acetona	NaCl	Acetona	NaCl	Acetona
5528	28289	7324	198275	38483	172485	35572	98106	980	76095	2947	229104						
13469	63450	20841	145271	72403	157750	50712	125137	6436	53959	7150	158482						
10831	206	7465	5359	58374	1893	25559	514	5339	26	8556	37						
13380	130	7206	4244	48131	1043	30803	542	5702	22	9441	14						
10844	123	5378	4941	57641	1482	28298	514	6628	34	10590	24						
10561	93	5937	5452	47901	988	28216	425	6425	23	10947	32						
10910	82	8132	5179	43937	581	27616	407	6610	18	13129	31						
15275	98	10504	3586	41121	507	23054	446	5571	17	16569	43						
32636	73	14811	3977	87147	487	30283	402	5180	20	17658	26						
313659	69	33837	3690	86337	930	25632	645	6074	85	36046	696						
25	93	160444	5995	19683	5628	109612	8901	11896	--	54032	16						
19	479	198486	39023	272	587	--	--	28131	--	86556	23						
Total	436947	93185	334892	601380	344341	4113298	236942	92972	130299	273951	383528						
BG	361570	91739	253546	193419	330235	155295	222243	38027	130054	176934	387586						
%	82.75	98.45	75.71	32.16	95.90	32.74	94.58	40.90	99.81	64.59	99.76						

ANEXO 2

EVALUACION DE LA DISTRIBUCION BIOLOGICA DEL MDP EN 10 RATONES

No.	PESO		ACTIVIDAD		PESO		ACTIVIDAD		ACT/GR		ACT/GR		ACT/GR		ACT/GR	
	HUESO	RINON	HUESO	RINON	HUESO	RINON	HUESO	RINON	HUESO	RINON	HUESO	RINON	HUESO	RINON	HUESO	RINON
1	0.333	0.371	130456	84307	70435	70435	385964.50	227242.59	35573.74	35573.74	59.49	35.03	59.49	35.03	5.48	5.48
2	0.289	0.376	191165	101279	74575	74575	661470.59	269359.04	37343.52	37343.52	68.32	27.82	68.32	27.82	3.86	3.86
3	0.260	0.424	160675	82367	68467	68467	617880.77	194261.79	47121.13	47121.13	71.91	22.61	71.91	22.61	5.48	5.48
4	0.248	0.361	173755	199034	85525	85525	700665.32	329734.07	55644.11	55644.11	64.52	30.36	64.52	30.36	5.12	5.12
5	0.311	0.374	153421	88268	63071	63071	493315.11	236610.70	40796.25	40796.25	64.08	30.64	64.08	30.64	5.30	5.30
6	0.475	0.468	168304	93580	68284	68284	354324.21	199957.27	41359.18	41359.18	59.49	33.57	59.49	33.57	6.94	6.94
7	0.237	0.287	208335	100937	74442	74442	879050.63	351696.86	60633.87	60633.87	68.10	27.25	68.10	27.25	4.65	4.65
8	0.396	0.319	164971	117894	87062	87062	467098.48	369573.67	58470.11	58470.11	52.18	41.29	52.18	41.29	6.53	6.53
9	0.291	0.399	169690	128585	88668	88668	583127.15	322268.17	39779.77	39779.77	61.70	34.10	61.70	34.10	12.34	12.34
10	0.215	0.391	177117	125811	109120	109120	823800.00	321767.26	64568.05	64568.05	68.08	26.59	68.08	26.59	5.33	5.33

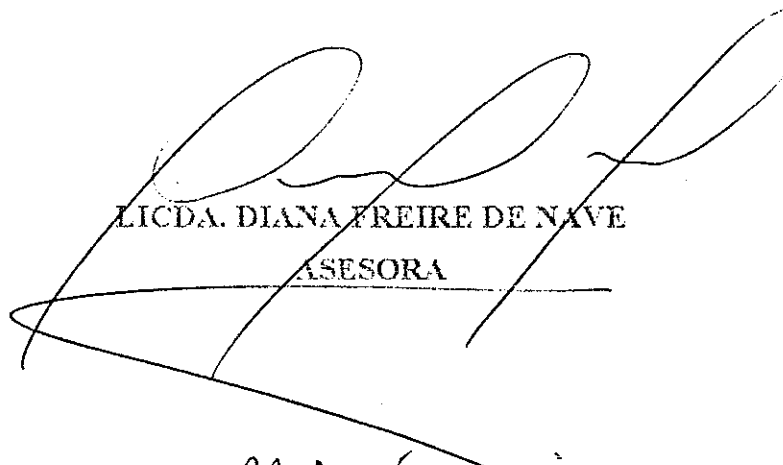
PROPIEDAD DE LA INSTITUCION DE SALUD DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES
Biblioteca Central

ANEXO 3

EVALUACION DE LA DISTRIBUCION BIOLOGICA DEL MFP EN 10 RATONES

No.	PESO		ACTIVIDAD		ACT/GR		ACT/GR		ACT/GR		ACT/GR	
	HUESO	RINON	HUESO	RINON	HUESO	RINON	HUESO	RINON	HUESO	RINON	HUESO	RINON
1	0.416	0.453	153.205	173740	125845	366281.25	383532.00	85030.41	44.01	45.83	10.16	
2	0.351	0.351	169449	210430	152642	479916.68	599515.66	99962.02	40.69	50.83	8.48	
3	0.331	0.374	157459	169349	125743	475706.94	452804.81	59496.80	46.73	44.48	8.79	
4	0.312	0.291	181323	187166	130599	581163.46	643182.13	108291.04	43.61	48.25	8.13	
5	0.307	0.450	191144	251594	166363	622618.89	559097.77	107817.88	48.28	43.36	8.36	
6	0.294	0.286	177394	206126	139787	603330.95	720730.27	129010.07	41.55	49.63	8.82	
7	0.302	0.416	245021	261889	131340	811327.81	629540.86	110929.05	52.28	40.57	7.15	
8	0.296	0.403	184903	230995	135359	624672.29	573188.58	78834.60	48.93	44.90	6.17	
9	0.192	0.379	179801	106160	117199	936463.54	438416.88	93684.25	63.77	29.85	6.38	
10	0.356	0.340	169732	211103	105317	448685.39	620891.17	76482.93	39.15	54.18	6.67	


MARIA GABRIELA SANCHEZ MONTUFAR
AUTORA


LICDA. DIANA FREIRE DE NAVE
ASESORA


LICDA. BEATRIZ BATRES DE JIMENEZ
DIRECTORA


LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR
DECANO