

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

MODIFICACION DEL pH EN LA PREPARACION
DE NANO-COLOIDE DE ALBUMINA HUMANA PARA LA
RADIOLOCALIZACION DE MEDULA OSEA.

INFORME DE TESIS

Presentado por.

Gabriela del Rosario Castillo Rios

Para optar al titulo de

QUIMICA FARMACEUTICA

Guatemala, enero de 1998.

66
7/1947
0.4

JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

DECANO	LIC. JORGE RODOLFO PEREZ 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. HERBERT RAUL AREVALO ALVARADO
VOCAL V	BR. MANOLA ANLEU FORTUNY

AGRADECIMIENTOS

A MIS ASESORAS:

LICENCIADA. DIANA YOLANDA FREIRE DE NAVE
LICENCIADA. CLAUDIA MARIA QUINTERO JORDAN
POR SU AMISTAD, COMPRENSION Y ASESORIA
CIENTIFICA PARA LA REALIZACION DE ESTE
TRABAJO

A LOS TECNICOS DE LABORATORIO DE RADIOFARMACIA; FLAVIANO Y EFRAIN
TELON, POR SU GRAN AYUDA.

DEDICO ESTA TESIS

A: GUATEMALA

A: HUEHUETENANGO

A: LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE
GUATEMALA

A: LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y
FARMACIA

A: EL LABORATORIO DE RADIOFARMACIA DE LA
DIRECCION DE ENERGICA NUCLEAR Y EN
ESPECIAL A TODO SU PERSONAL POR SU
VALIOSA COLABORACION

A: TODAS LAS PERSONAS QUE AYUDARON DE UNA U
OTRA FORMA A LA REALIZACION DE ESTE
TRABAJO

INDICE

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCION	3
III.	ANTECEDENTES	5
IV.	JUSTIFICACION	13
V.	OBJETIVOS	14
VI.	HIPOTESIS	15
VII.	MATERIALES Y METODOS	16
VIII.	RESULTADOS	24
IX.	DISCUSION DE RESULTADOS	26
X.	CONCLUSIONES	29
XI.	RECOMENDACIONES	30
XII.	REFERENCIAS	31
XIII.	ANEXOS	36

I. RESUMEN

La utilización de coloides en Medicina Nuclear se fundamenta en la capacidad del sistema fagocítico macronuclear de extraerlas del sistema circulatorio, con lo que los coloides son radiofármacos de elección para la obtención de imágenes hepáticas, esplénicas y de médula ósea.

El objetivo del presente trabajo de investigación fue producir un radiofármaco, el nanocoloide de albúmina, para uso en centellografía de médula ósea. Se hizo una comparación de dos métodos para la preparación del mismo, teniendo como diferencia en los métodos la modificación del pH del nanocoloide agregando una sustancia alcalina rápidamente, evitando así que la albúmina se desnaturalice; determinando de esta manera si la reformulación del radiofármaco cumple con los controles de calidad y si existe o no variabilidad en la biodistribución de las preparaciones. Para ello se realizaron controles microbiológicos, físicos, pureza radioquímica y biodistribución en ratones.

El trabajo se inició con la producción del radiofármaco en su preparación normal, luego se hicieron varias pruebas con diferentes cantidades de la sustancia alcalina, hasta obtener el volumen adecuado y se procedió a la producción utilizando la modificación del pH; ambas preparaciones se sometieron a los controles de calidad, del cual los resultados son negativos; lo mismo que de el control físico.

En cuanto a la pureza radioquímica, se marcó con ^{99m}Tc , se evaluó midiendo la desintegración por minuto del ^{99m}Tc en un contador de centelleo tipo pozo, determinándose el porcentaje de pureza mayor del 95% y no presentando diferencia estadísticamente significativa ($P>0.05$).

La biodistribución se evaluó en ratones albinos comprendidos entre 20 y 30 gramos de peso; a los que se les inyectó entre 200 y 300 mCi (milicurios) y después de una hora se decapitaron y se extrajeron los órganos de interés; se hizo también una medición en el contador de centelleo y los resultados presentaron mucha dispersión por lo que no se pudo analizar estadísticamente con el análisis de varianza de dos vías; aún así, se observó que la absorción de las dos preparaciones, se llevó a cabo principalmente en el hígado, más del 10%, pulmón y hueso, lo que hace pensar que el modelo biológico utilizado para el estudio no es el adecuado ya que tanto la preparación original como la modificada, presentaron gran variabilidad en sus resultados.

II. INTRODUCCION

El estudio por imágenes centellográficas es actualmente uno de los medios que sirve de gran ayuda en muchos de los campos que abarca la medicina nuclear, especialmente la diagnóstica. Los radiofármacos para diagnóstico, se administran para diferenciar una bioquímica, fisiología o anatomía que se presente; esta utilización se ha visto incrementada gracias a la eficiencia no sólo del radiofármaco sino también de equipos más sensibles en la adquisición de imágenes.

En Guatemala, actualmente se cuenta con una radiofarmacia centralizada, ubicada en la Dirección General de Energía Nuclear. En este lugar se producen diferentes radiofármacos con distintas aplicaciones, una de ellas es la centellografía de médula ósea, para la cual se necesitan radiofármacos que ofrezcan una visualización de los defectos en la distribución de la médula activa, en los huesos largos o en diagnósticos de enfermedades como mielofibrosis, anemia hemolítica o desórdenes mieloproliferativos.

En el presente trabajo se compararon dos métodos para la preparación del radiofármaco nanocoloide de albúmina, marcado con ^{99m}Tc , para la radiolocalización de médula ósea. Esta preparación presentó como diferencia la modificación del pH, para evitar que cuando llegase al pH isoeléctrico de la albúmina, ésta se desnaturalice; este paso se hizo añadiendo una base rápidamente, logrando así que el radiofármaco sea más estable y así se observó cuál de los dos métodos simplifica la producción del

radiofármaco.

Se llevarón a cabo los controles de calidad adecuados entre ellos pureza radioquímica y distribución biológica o biodistribución en animales de laboratorio.

III. ANTECEDENTES

3.1. HISTORIA DEL ^{99m}Tc INTRODUCCION.

En la década de los cincuenta, los laboratorios Nacionales de Brookhaven en Nueva York, Estados Unidos, desarrollaron un generador de Tecnecio a partir del Molibdeno. En 1960 se sugirió que las características fisicoquímicas del ^{99m}Tc podrán ser de gran utilidad para medicina Nuclear. Actualmente casi el 80% de los Radiofármacos utilizados son compuestos marcados con ^{99m}Tc el cual se obtiene del ^{99}Mo producido por fisión del óxido de ^{235}U . El estado metaestable (^{99m}Tc) del Tecnecio decae a ^{99}Tc por emisión gamma de energía 140 Kev con un período de semidesintegración radiactiva de 6 horas; las características físicas descritas causan un bajo nivel de radiación para el paciente.

El ^{99m}Tc tiene además la ventaja de estar siempre disponible en los Servicios de Medicina Nuclear como pertecnetato eluido de generador de Molibdeno-Tecnecio.

3.2. HISTORIA DE RADIO FARMACOS PROTEICOS.

KITS PARA EL MARCAJE DE COMPUESTOS CON ^{99m}Tc

La comercialización de equipos reactivos, kits, para ser marcados con ^{99m}Tc , ha facilitado la práctica de la Radiofarmacia. Los Kits se presentan con largos períodos de caducidad y una vez almacenados en las condiciones requeridas se puede disponer de ellos en cualquier momento. En la mayoría de

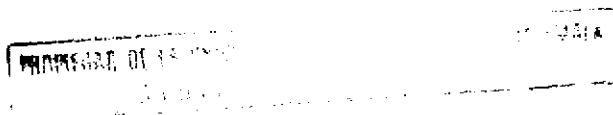
los Kit, el marcaje se lleva a cabo por simple adición del Pertecnetato al vial.

Como agentes reductores, el que aparece mayoritariamente es el cloruro de Estaño, siendo las cantidades de sales de Estaño las suficientes para conseguir la reducción completa del $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ya que éste se encuentra en concentraciones nanomolares.

3.3. COLOIDES Y PARTICULAS MARCADAS

Las soluciones verdaderas son aquellas en las que partículas de soluto se distribuyen entre el solvente sin distinguirse de éste, tienen un tamaño menor de 1 nanometro y no son visibles por ultramicroscopía. El lado opuesto es una suspensión, también llamada emulsión, cuyas partículas son de tamaño mayor a 1 micrometro. El sistema coloidal con un tamaño de partícula entre 10 nanometros y 1 micrometro se encuentra entre las dos clases. Las partículas coloidales tienen carga eléctrica que está contrarrestada por una carga igual pero de signo opuesto de las moléculas del disolvente. La adición de electrolitos (sales, ácidos, bases) que son moléculas cargadas, interacciona con el sistema alterando el potencial existente, con lo que el resultado es la agregación o floculación del coloide. Con el fin de prevenir esta agregación, se añaden a los sistemas coloides agentes estabilizantes como gelatina, polivinilpirrolidona o carboximetilcelulosa.

La utilización de coloides en Medicina Nuclear es fundamental en la capacidad del sistema fagocítico



macronuclear de extraerlas del sistema circulatorio, con lo que los coloides son radiofármacos de elección para la obtención de imágenes hepáticas, esplénicas y de médula ósea. Tienen también aplicaciones en Medicina Nuclear las partículas grandes, de tamaño superior a 1 micrometro; estas una vez en el torrente circulatorio son atrapadas por los capilares pulmonares con la consiguiente obtención de imágenes pulmonares (los macroagregados de albúmina y las microesferas).

3.4. DESCRIPCIÓN Y APLICACIONES DE LOS RADIOFÁRMACOS DEL ^{99m}Tc

3.4.1. FOSFONATOS Y FOSFATOS MARCADOS CON ^{99m}Tc .

Los fosfatos se introdujeron en los años setenta para la obtención de imágenes ósea. Los polifosfatos fueron sustituidos por los pirofosfatos (PYP), que proporcionaron mayor captación en hueso. Sin embargo, los mayores progresos en la obtención de imágenes óseas se obtuvieron con la aparición de los difosfatos, entre ellos, 1-hidroxi-etiliden difosfonato (EHDP), Metileno difosfonato (MDP), y hidroximetileno difosfonato (HMDP o HDP).

El mecanismo conocido de incorporación del radiofármaco al hueso es el de adsorción a la capa de iones hidratados del cristal de hidroxiapatita.

3.4.2. MACROAGREGADOS Y MICROESFERAS DE ALBUMINA MARCADOS CON ^{99m}Tc .

Los ^{99m}Tc -MAA tienen un tamaño de partícula superior a 150 micrometros y se distribuyen en grupos irregulares de partículas, es el agente de elección en estudios de perfusión pulmonar,

gracias a la capacidad del lecho vascular pulmonar de retenerlas. Las microesferas de Albumina tienen la misma aplicación que los MAA, se diferencian de estos en su forma y distribución.

3.4.3. SULFURO COLOIDAL MARCADO CON ^{99m}Tc

Radiofármaco de aplicación en estudios del sistema reticulo endotelial, gracias a la propiedad fagocítica de las células que extraen el radiofármaco del sistema circulatorio (1).

3.5. PREPARACION DE NANOCOLOIDES DE ALBUMINA.

Coloide: Es un término derivado de la palabra griega que significa cola de pegar, aplicado a polipéptidos como albúmina y gelatina, a gomas vegetales como acacia, almidón y dextrina, y a compuestos inorgánicos como los hidróxidos metálicos gelatinosos y el azul de Prusia.

Los sistemas en estado coloidal contienen una o más sustancias que tienen por lo menos una dimensión de 10 a 100 Å (1 unidad Angstrom = $10^{-8}\text{cm} = 10^{-10}\text{m}$) o 1-10 nm (1 nanómetro = 10^{-9}m) en el extremo inferior y algunos micrones (μ) en el extremo superior ($1 \mu = 10^4 \text{ Å} = 10^{-6}\text{m}$).

Las dispersiones coloidales constan por lo menos de dos fases separadas: una dispersa y una fase continua o externa llamada medio o vehículo de dispersión (2).

Propiedades de los Coloidales:

- Cargas eléctricas: Partículas coloidales individuales, moléculas largas de alto peso molecular (macromoléculas), o agregados de moléculas pequeñas, tampoco son dispersadas en un

medio líquido. En cualquiera de éstos casos ellas casi siempre poseen una carga eléctrica lo cuál es responsable en alto grado de su estabilidad. Hay una repulsión electrostática cuando las partículas de igual carga se aproximan una con otra, operando en contra y formando largas partículas y una eventual floculación. Las cargas sobre las partículas pueden ser adquiridas por adsorción selectiva de iones de los alrededores del medio.

Los electrólitos que proveen éstos iones son conocidos como estabilizantes. Iones de un tipo de carga son fuertemente adsorbidos en una capa y son firmemente pegados a la partícula coloidal y da a la partícula esta carga, éstos iones son los determinantes del potencial. Los iones de carga opuesta son atraídos a la vecindad de la carga y forman una segunda capa más difusa, éstos son los llamados contra. La partícula entera es electricamente neutral pero es rodeada por una doble capa de iones adsorbidos dentro del cuál es la separación de cargas (3).

A un valor intermedio de pH (4.5-7) para las diferentes proteínas, los aniones y cationes se neutralizan mutuamente con exactitud. No hay necesidad de contraiones porque los grupos funcionales ionizados que integran la molécula de proteína están en equilibrio exacto. A este valor de pH, llamado punto isoeléctrico, la partícula o molécula de proteína es neutra; su carga eléctrica no es negativa ni positiva sino igual a cero.

- Propiedades Ópticas: Las propiedades ópticas de un medio dependen de su índice de refracción cuando éste es siempre

uniforme la luz atraviesa el medio sin sufrir desviación pero cuando hay variaciones discretas del índice de refracción causadas por la presencia de partículas o por fluctuaciones de densidad en pequeña escala, parte de la luz se dispersa en todas direcciones. Una propiedad óptica característica de los sistemas coloidales, llamada haz de Tyndall, es conocida por todos en el caso de los aerosoles. Cuando un haz estrecho de luz solar entra por un pequeño agujero a una habitación oscurecida, la presencia de las diminutas partículas de polvo suspendidas en el aire se revela por puntos luminosos brillantes. Un haz de luz que toca una partícula polariza los átomos y las moléculas de esta partícula induciendo dipolos que actúan como fuentes secundarias y reemiten luz débil de la misma longitud de onda que la luz incidente. Este fenómeno se llama dispersión de la luz. La radiación dispersa se propaga en todas las direcciones alejándose de la partícula. Las partículas coloidales suspendidas en un líquido también dispersan luz. Cuando un haz luminoso intenso estrechamente definido pasa a través de una suspensión su trayectoria se hace visible porque las partículas del haz dispersan la luz. Este haz de Tyndall es más visible cuando se mira sobre fondo oscuro en dirección perpendicular al haz incidente. La magnitud del enturbiamiento o de la opalescencia depende de la naturaleza, tamaño y la concentración de las partículas (2).

- Estabilidad: Una importante consideración en el estudio y aplicación de coloides es su estabilidad. Uno de los factores principales para ésta estabilidad es la presencia de cargas eléctricas sobre las partículas. Si esta carga es removida o reducida por debajo de un valor crítico, las partículas coloidales se pegan entre sí y rápidamente ocurre precipitación o coagulación. Esta reducción de cargas sobre las partículas coloidales es usualmente causada por la adición de un electrolito (3).

Coloides radiactivos: Las dispersiones coloidales que contienen isótopos radiactivos tiene aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas cada vez mayores en medicina nuclear. Los coloides radiactivos que se acumulan en los tumores y/o lesiones o émbolos, indicando su ubicación y tamaño, pueden usarse como auxiliares de diagnóstico. Los coloides radiactivos cuyas partículas miden alrededor de 300 Å, inyectados por vía intravenosa, se localizan principalmente en el sistema reticuloendotelial del hígado, el bazo y otros órganos y se usan en la formación de imágenes, la radiación emitida por los coloides se hace visible mediante aparatos estacionarios que muestran la ubicación, el tamaño y la forma del órgano investigado, así como los tumores que pueden contener en su interior. Los radiocoloides son útiles en la radioterapia anticancerosa por su baja solubilidad, característica de radiación y capacidad para acumularse y permanecer localizados en ciertos órganos efectores o tumores (2).

Albúmina: Constituye aproximadamente el 50% de la proteína total del plasma. Es posible que intervenga en la asociación con los ácidos grasos y en el transporte de los aniones. Sirve para controlar la presión osmótica de la sangre, así como para mantener la capacidad de regulación de su pH. La seroalbúmina tiene un peso molecular de aproximadamente 67,000. Es una proteína globular típica, con una configuración de baja proporción de α -hélice y una estructura terciaria considerable (4,5).

Sero-albúmina Humana: (Reactivo)

Es un líquido claro de color ambar a café-naranja que contiene aproximadamente 25% p/v de proteínas y no más de 0.65mmol de sodio, 0.05mmol de iones potasio y no más de 0.1mmol de iones citrato por gramo de proteínas. Tiene un pH 6.7 a 7.3. Debe realizarse ensayos de esterilidad, pirógenos, no contener derivados del grupo hemo y no utilizarse si presenta turbidez o precipitado (6).

La solución de albúmina puede ser preparada por disolución en agua para inyección de la seroalbúmina liofilizada, la cual se observa como un polvo crema. La solución final tendrá entre 24-26% p/v de proteína. Esta debe usarse inmediatamente después de su preparación.

Almacenaje: Pretegido de luz, entre 2 - 5 °C, claramente etiquetado y no debe utilizarse después de la fecha de expiración (6,7).

PROPIEDADES DE LA PROTEÍNA
ALBÚMINA HUMANA

IV. JUSTIFICACION

La utilización de radiofármacos en el diagnóstico y la terapia en la medicina nuclear en Guatemala, ha permitido el desarrollo de técnicas centellográficas adecuadas para ser empleadas en el diagnóstico de patologías óseas, hepática y pulmonares, entre otras. Es en la Radiofarmacia Centralizada de la Dirección General de Energía Nuclear (DGEN), donde se viene produciendo radiofármacos desde 1985. Mediante este trabajo de investigación, el cual presentaba como fin hacer una comparación de dos métodos para la preparación de un radiofármaco, el nanocoloide de albúmina, éstos dos métodos tienen como diferencia la modificación del pH del nanocoloide, agregando una sustancia alcalina rápidamente, evitando así que la albúmina se desnaturalice.

Con la investigación, se determinó con cuál de los dos métodos daba una mayor estabilidad al nanocoloide y así utilizar el método más sencillo.

V. OBJETIVOS

5.1. GENERAL;

Producir un radiofármaco, el nanocoloide de albúmina, para uso en centellografía de médula ósea.

5.2. ESPECIFICOS;

5.2.1. Realizar la producción (A) y la producción haciendo la modificación en el pH (B), de nanocoloide de albúmina.

5.2.2. Conseguir en un solo paso, el pH óptimo (rango 7.36-7.40) de la solución de nanocoloide de albúmina.

5.2.3. Determinar si la reformulación del radiofármaco de nanocoloide de albúmina, cumple con los controles de calidad para su uso en centellografía de médula ósea.

5.2.4. Observar si existe variabilidad en la biodistribución de la preparación (A) y la (B).

VI. HIPOTESIS

- 6.1. Acortando los pasos en el procedimiento de la formulación (A); se consigue llegar al rango de pH óptimo de la formulación (B).

- 6.2. Con la modificación del pH en la formulación (B) se obtendrá una biodistribución en la médula ósea de ratones endocriados, similar a la obtenida en la formulación (A).

VII. MATERIALES Y METODOS

7.1. UNIVERSO DE TRABAJO;

El universo de trabajo está constituido por los lotes de radiofármacos a producir.

7.2. MEDIOS;

7.2.1. Recursos Humanos:

Responsable: Gabriela del Rosario Castillo Rios

Asesora: Licda. Claudia Quintero

Asesora: Licda. Diana Yolanda Freire de Nave.

7.2.2. Recursos Institucionales:

El presente trabajo de investigación se realizará en el Laboratorio de Radiofarmacia Centralizada de la Dirección General de Energía Nuclear (DGEN).

7.2.3. Recursos Materiales:

1. Equipo:

- Liofilizadora (Lab-Conco), cap. para 300 fcos.
- Balanza analítica (PRECISA)
- Potenciómetro (FISHER)
- Campana de flujo laminar (Lab-Conco)
- Contador de centelleo tipo pozo-ORTEC, modelo 2000
- Autoclave marca Handyclave Rexal 23 cm x 40 cm L
- Plancha agitadora y calentador
- Termómetro
- Calibrador de dosis (Capintec)

2. Reactivos:

- Seroalbúmina humana HSA 20%
- Cloruro estannoso
- Acido clorhídrico 1.0N
- Agua destilada, apirógena
- Hidróxido de sodio 0.1N
- Solución buffer de fosfatos
- Glucosa 40%

3. Materiales:

- Jeringas y agujas 0.21 - 0.25 g
- Filtros Millipore 0.22 y 0.45 micrometros
- Papel Whatman No. 1
- Pipetas de 1, 5 y 10 ml
- Cubas cromatográficas
- Frascos tipo pyrex 250 ml.
- Viales de vidrio de Borosilicato tipo 1 de color ámbar
- Tapones
- Tubos de ensayo
- Etiquetas
- Erlenmeyers
- Guantes descartables
- Beakers, probetas, agitadores
- Mascarillas, gorras, ropa especial
- Membranas de poliestireno de 20 y 40 micrómetros

4. Animales de Laboratorio:

- Ratonos blancos de 20 a 30 gramos.

7.3. PROCEDIMIENTOS:

7.3.1. Se prepararon las soluciones stock:

Estas soluciones fueron preparadas justamente antes de la preparación de los juegos de reactivos.

Solución Stock de Estaño: 209.2 mg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

+

10 ml de HCl 1N

+

90 ml de H_2O destilada,
apirógena. Agitar 10 minutos y
filtrar en Millipore 0.22 u

7.3.2. Se preparó la solución de nanocoloide de albúmina, formulación (A):

- A 48 ml de la solución Stock, se agregó 2.4 ml de albúmina.
- Se agregó 112 ml de agua destilada, apirógena
- Se observó el pH (2.89 más o menos)
- PUNTO CRITICO: Se agregó 100 ml de NaOH 0.1N; esto se hizo agitando fuertemente.
- Se observó el pH=9.9
- Se agregó ± 13 ml de HCl 1 N
- pH = 7.38 (entre 7.36-7.40) este es el ideal para las nanoalbúminas.

MINISTERIO DE LA SALUD

GUATEMALA

A. G. G. G.

- Se obtuvo un volumen de \pm 280ml con agitación, los cuales se dividieron en 4 porciones de 70 ml, de los que se utilizó solo una.
- Se colocó en un erlenmeyer 170 ml de agua a calentar a 96°C con un termómetro dentro de ella
- PUNTO CRITICO: Cuando llegó a los 96°C se agregó rápidamente la cantidad de albúmina; en este momento la temperatura bajó y se contó cada 15 segundos hasta que subió a
- 90.5°C esto es \pm 2 minutos (se uso cronómetro)
- A los 90.5°C se sacó la solución y se pasó rápidamente a un baño de hielo y se agitó fuerte, se esperó una hora dejando en reposo.
- A la solución se adicionó 18 ml de glucosa 40%
- Se agregó 48 ml de buffer fosfatos pH 7.4
- Se filtró en Millipore 0.45 y 0.22 micrómetros
- Se dispensó la solución 2 ml/ vial.

7.3.3. Preparación del nanocoloide de albúmina, formulación (B).

- A 48 ml de la solución stock, se agregó 2.4 ml de albúmina
- Se agregó 112 ml de agua destilada
- Se observó el pH (2.89 más o menos)

- PUNTO CRITICO; Se calculó la cantidad de NaOH 0.1N y se llevó a pH 7.38 (entre 7.36 - 7.40) éste es el ideal para las nanoalbúminas
- Se obtuvo un volumen de ± 280 ml los que se dividió en 4 porciones de 70 ml cada una y de las que se utilizó solo una, se mantuvo con agitación.
- Se colocó en un erlenmeyer 170 ml de agua a calentar a 96°C con un termómetro dentro de ella para controlar la temperatura
- PUNTO CRITICO: Al llegar a los 96°C se agregó rápidamente la albúmina, en este momento la temperatura bajo y se contó cada 15 segundos hasta que subió a 90.5°C esto es ± 2 minutos
- A los 90.5°C se sacó la solución y se pasó rápidamente a un baño de hielo y se agitó fuerte, se espera una hora dejando en reposo
- A la solución se adicionó 18 ml de glucosa 40%
- Se le adicionó 48 ml de buffer de fosfatos pH 7.4
- Se filtró en Millipore de 0.45 y 0.22 micrómetros
- Se dispensó 2 ml/vial.

7.3.4. Controles de Calidad:

1. Control Radioquímico:

Se marcó el radiofármaco nanocoloide de albúmina con 2 - 5 mCi ^{99m}Tc y se realizó una cromatografía en papel, usando como soporte tiras de papel Whatman No. 1 de 1 x 12 cm, y como solvente acetona.

Esto se utilizó para observar el % de unión del radiofármaco con el radionúclido (^{99m}Tc).

2. Distribución Biológica:

El estudio de biodistribución o distribución biológica se realizó en ratones blancos endocriados de aproximadamente 20 - 30 gramos de peso, a los que se les administró 2 - 5 mCi de ^{99m}Tc -nanocoloide de albúmina de las formulaciones A y B, en la vena caudal de la cola.

Los ratones se sacrificarán a la hora, para poder obtener los órganos apropiados sangre, pulmón, hígado, bazo y huesos largos para la médula ósea. Los órganos se pesarán y se analizará en un contador de centelleo tipo pozo, y se estableció el porcentaje de radiactividad por gramo de órgano (mCi/gr).

7.3.5. Diseño Experimental:

Determinación de cumplimiento de Control de Calidad de los Radiofármacos A y B:

1. Radioquímico: % de marcación

2. Biodistribución: - Médula Osea (actividad/gramo órgano)

Otros órganos: - Sangre

- Pulmón

- Hígado

- Bazo

Cálculo de la muestra:

$$n = \frac{2NC^2\sigma^2}{z}$$

Asumiendo:

a) $\sigma = \text{----} \rightarrow \sigma^2 = 2$

b) $\sigma = 2 \text{ ----} \rightarrow \sigma^2 = 4$

c) $\sigma = /2 \text{ ----} \rightarrow \sigma^2 = 2/4$

a) $n = 2(3.242)^2 = 22$ por grupo de tratamiento

b) $n = 8(3.242)^2 = 85$ por grupo de tratamiento

c) $n = (3.242)^2/2 = 6$ por grupo de tratamiento

Escogiendo la opción de utilizar seis ratones por grupo de tratamiento, por no contar con suficientes animales en el bioterio de la Dirección General de Energía Nuclear.

Análisis:

1. Porcentaje de marcación:

Se sometió a un análisis de t de Student para la media de 2 poblaciones, si el % esperado es <80 se transformarán los datos a arco-seno para estimar mejor las varianzas.

2. Biodistribución: Se hizo un diseño estratificado.

Análisis de varianza de dos vías:

H₀₁ = u normal = u modificada

H₀₂: u médula ósea = u sangre = u hígado = u bazo = u pulmón.

VIII. RESULTADOS

8.1. Producción del Radiofármaco:

8.1.1. La obtención del pH óptimo para el radiofármaco modificado, se logró al ensayar con diferentes cantidades de hidróxido de sodio (NaOH), se ensayó con volúmenes 5 ml hasta 80 ml, el pH óptimo se alcanzó al agregar 59 ml en un solo paso. (Tabla No.1)

8.1.2. Al efectuar la producción de la reformulación de nanocoloide (B). Se observó que el procedimiento para obtener este radiofármaco presenta menos pasos y por lo tanto menos reactivos que el original; es eliminado uno de los puntos críticos que se efectuaba al preparar el radiofármaco original.

8.2. Control de Calidad:

8.2.1. Al determinar si la reformulación del radiofármaco de nanocoloide de albúmina cumplía con los controles de calidad para su uso en centellografía de médula ósea, se efectuó análisis para control microbiológico, control radioquímico y biodistribución.

8.2.2. Las dos preparaciones se sembraron en un caldo tripticasa soya, tioglicolato y agar sabouraud y no hubo crecimiento de bacterias u hongos por lo que el

resultado fue negativo.

8.2.3. La pureza radioquímica del nanocoloide de albúmina en sus dos preparaciones, se determinó por el método de cromatografía en papel, utilizando para medir la radiactividad un contador de centelleo sólido tipo pozo marca Ortec; utilizando papel Whatman No. 1 como soporte y como solvente acetona, se obtuvo que la distancia recorrida, transformada a pureza radioquímica (%) de la reformulación del nanocoloide de albúmina, no presenta diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) (Gráfica 1 y Tabla 2).

8.2.4. Se determinó el % de biodistribución para cada órgano (hueso, bazo, hígado, pulmón, sangre), los valores obtenidos para cada formulación fueron diferentes, así mismo las réplicas (repeticiones) en las determinaciones del % de biodistribución para cada órgano, presentaron variabilidad. (Gráficas 2-8). No se aplicó el análisis de varianza. Ya que se observó en las gráfica que era diferente.

IX. DISCUSION DE RESULTADOS

La producción del radiofármaco nanocoloide de albúmina se llevó a cabo en sus modalidades A (normal) y B (modificada). De la producción modificada, podemos observar que si se obtuvo el pH óptimo, ensayando con varios volúmenes de hidróxido de sodio, se inició probando con 5 ml hasta 80 ml y el pH ideal se alcanzó al agregar 59 ml en un solo paso y con una agitación fuerte; se observa, que con esta modificación, se disminuyen los pasos en la producción del radiofármaco incluyendo uno de los puntos críticos e importantes del procedimiento, con esto también se disminuyen el número de reactivos y en cierta manera el costo de la producción del mismo.

En cuanto al control de calidad, se observa que ambas preparaciones cumplen con este, ya que se sometieron a controles microbiológico, pureza radioquímica y biodistribución. Se observa que el control microbiológico para ambas, es negativo, es decir que no hubo crecimiento de alguna bacteria u hongo.

Los resultados obtenidos para la pureza radioquímica de las preparaciones A y B del nanocoloide son buenos ya que el porcentaje de marcación fue arriba del 95% y al someterse al análisis estadístico: T de Student para la media de dos poblaciones, no presentan diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$).

Para los datos del estudio de biodistribución, se observa que las determinaciones del % de distribución en cada repetición efectuada para cada órgano presentaron gran dispersión por lo que existe poca repetitividad, y no puede efectuarse el análisis de varianza de dos vías, como se había planteado al inicio del experimento. Los resultados pudieron deberse a ciertos factores que afectaron determinadamente el estudio de biodistribución, entre éstos se puede mencionar la técnica de administración ya que pudo haberse perdido radiofármaco en algún movimiento violento del modelo biológico y un rompimiento en la vena que no permitió el ingreso del mismo al organismo; otro de los factores pudo ser una dosificación no adecuada; la duración en el tiempo para la obtención de los órganos que pudo ocasionar un porcentaje disminuido o aumentado y el lugar de la punción.

De acuerdo al Manual de Control de Calidad de radiofármacos del OIEA, para que el radiofármaco dé óptimo resultado a una hora post-inyección, se debe encontrar un 10% en hígado para una biodistribución en médula ósea, con lo cual se deduce que el % en hueso debe aumentar; en la formulación original y reformulación el % de captación en hígado es arriba del 10 %, en promedio, por lo que se considera que uno de los factores y quizá el de más peso es el modelo experimental o biológico utilizado, pues puede ser que este no sea el adecuado.

Independientemente de los resultados de producción y biodistribución de las dos preparaciones, se observa que en la modificación se involucra un paso menos lo cual es una ventaja, principalmente, porque se esta produciendo una sustancia estéril que tiene que ser lo menos manipulada posible.

X. CONCLUSIONES

1. Se logra conseguir en un solo paso, el pH óptimo (rango 7.38 - 7.40) de la solución de nanocoloide de albúmina, con un volumen de hidróxido de sodio 0.1N de 59 ml.
2. El porcentaje de marcación, para el nanocoloide de albúmina, fue mayor de 95% en cualquiera de los métodos de producción, lo que esta de acuerdo a lo reportado en el manual de Control de Calidad del OIEA.
3. El porcentaje de marcación, no presenta diferencia estadísticamente significativa para las dos preparaciones.
4. Para comparar si existía variabilidad en la biodistribución de las preparaciones A y B, el análisis de varianza de dos vías no tuvo aplicación, debido a la gran dispersión de los resultados en los diferentes órganos de los ratones empleados en el estudio.
5. El ratón no es un buen modelo biológico para ser utilizado en el estudio de nanocoloide de albúmina.

XI. RECOMENDACIONES

1. Ampliar los estudios para la producción de nanocoloide de albúmina utilizando la modificación del pH, para disminuir gasto de reactivos y como consecuencia disminuir el costo del radiofármaco.
2. Hacer un análisis de estabilidad para la preparación "B", es decir, con la modificación del pH.
3. Realizar los estudios de biodistribución, utilizando otro modelo biológico (ratas), para obtener una mejor distribución del radiofármaco y mayor reproducibilidad en los resultados.
4. Realizar un estudio de cinética en las producciones del radiofármaco.

IX. REFERENCIAS

1. Ramirez de Arellano y Sarca Cetr. Curso de Introducción a la radiofarmacia: Química y Principales radiofármacos del ^{99m}Tc . Sociedad Española de radiofarmacia Universidad de Barcelona. Curso de Radiofarmacia del 16 de Noviembre al 10. de Diciembre del 83. p. 34, 89,90,91, Folleto de 311 páginas.
2. Osol A, et al. Remington Farmacia Práctica. 17ª ed. Buenos Aires, Argentina: Panamericana, 1987 (p. 381-421).
3. Martin R. Remington's Pharmaceutical Sciences. 17ª ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1985 (p.271-281).
4. Conn EE, Stumpf Pk. Bioquímica Fundamental. 3ª ed. México: Limusa, 1988. III+609p. (p. 123-124).
5. Chang R. Fisicoquímica con Aplicaciones a Sistemas Biológicos. México: Continental, 1987. 781p. (p.732-738).
6. International Atomic Energy Agency. Preparation of Kits for ^{99m}Tc Radiopharmaceuticals. Austria, Doc.Tec. No. 649, 1992. 94p. (p. 7-73).
7. Rodríguez CE. Modificación en la preparación de macroagregados de albúmina marcados con tecnecio ^{99m}Tc metaestable. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1995. 53p.

8. Sodeman W, Sodeman W. Fisiopatología Clínica. 5ª ed. México: Nueva Editorial Interamericana, 1978. V+952p. (p. 487-490, 580, 952).
9. Wyngaarden J, Smith LH. Tratado de Medicina Interna de Cecil. 17ª ed. México: Interamericana. Vols. 2, vol. 2, 1987 (p. 1545-1554, 1606-1609, 1622-1623).
10. Nelson W, Vaughan V, Mc Kay R. Tratado de Pediatría. 6ª ed. México: Salvat, Vols. 2, vol. 2, 1976. 1595p. (p. 1079-1080).
11. "Frédéric Joliot-Curie" National Research Institute for Radiobiology and Radiohygiene. Kit for the preparation of Technetium Tc-99m nano-sized Human Serum Albumin Colloid Injection.
12. González BM. Radiofármacos para Cisternogammagrafía, Linfogammagrafía, Flebogammagrafía y Angiografía. Montevideo, Uruguay: Universidad de la República, 1994.6p.
13. Mallol J. Radiofarmacia; Trazadores radiactivos de uso clínico. Madrid, España: Interamericana- McGraw-Hill, 1989. 130p. (p. 13-17; 37-45, 69).
14. Gotta H. Medicina Nuclear; Aplicaciones clínicas. Buenos Aires, Argentina: Fondo Educativo Interamericano, 1981. VII+415p. (p. 1-10).
15. Saha GB. Fundamental of Nuclear Pharmacy. 3ª ed. USA: Springer-Verlag New York Inc, 1992 (p. 109-115, 272-275, 292-295).

16. Sampson CB. Textbook of Radiopharmacy. USA: Published under Gordon and Breach Sciences, 1990 (p. 278-79).
17. Montero CG. Vilchez T. Atienza M. Radiofármacos: Implicaciones del servicio de farmacia hospitalaria en su manejo. Rev. SEFH XII, 1989;3:229-233.
18. Helman J. Farmacotecnia Teórica y Práctica. México: Compañía Editorial Continental. Vois. 8, vol 7. 1981 (p. 2331).
19. Juárez CD. Uso de antioxidantes en la formulación de Metilendifosfonato liofilizado. Guatemala: Universidad de San Carlos. (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1984. 55p.
20. Fortillo MC. 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.
21. Verdera ES. Control de Calidad de Radiofármacos. Uruguay: O.I.E.A. Universidad de la República, 1994. 14p.
22. León Cabaña AS. Control de Calidad de Radiofármacos de ^{99m}Tc . Montevideo, Uruguay: O.I.E.A. Universidad de la República, 1994. 16p.
23. Nikeev NB. Radiactive Colloidal Solutions and Suspensions for Medical Use. Atomic Energy Review. 1976;14:3-36.
24. Lachman L, et al. The Theory and Practice of Industrial Pharmacy. 2ª ed. USA: Prentice-Hall, 1976.

25. Skoog D. West D. Análisis Instrumental. 2ª ed. México: Interamericana S.A., 1985.
26. Bran AC. Producción de DMS marcado con $^{99m}\text{Tc(V)}$ para la radiolocalización de tumores de cuello. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Química y Farmacia) 1994. 45p.
27. Boletín Informativo sobre Medicamentos. Radiofármacos y su importancia. Chile, 1990. Vol. 7 (No.3).
28. Gutiérrez AL. Comparación de la marcación de leucocitos con coloides de Tc^{99m} en sangre completa y capa leucocitaria como método de radioinmuno diagnóstico. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1991.
29. De La Roca LD. Diseño, desarrollo y evaluación de un nuevo Radiofármaco, el Fluoruro coloidal marcado con ^{99m}Tc para su utilización en centellografía hepática. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1992.
30. Pérez R, et al. A New Radiopharmaceutical for ^{99m}Tc bone scanning. J. Nucl. Med. 1972;13:783,
31. Ayres G. Análisis Químico Cuantitativo. 2ª ed. México: HARLA, 1970. V+727p.(p. 74-77, 156-157).
32. Smith MJ. Clinical Uses of Radiopharmaceuticals. USA: (p. 246-253).

33. Zubizarreta AF. La Aventura del Trabajo Intelectual.
(Como estudiar y como investigar). México: Fondo
Educativo Interamericano, 1979. XI+180p.

BIENHEAR DE LA

SECRETARÍA

XIII. A N E X O S

ANEXO 1

TABLA No 1.

PRODUCCION DEL RADIOFARMACO

TABLA DE VOLUMEN DE NaOH y pH ALCANZADO

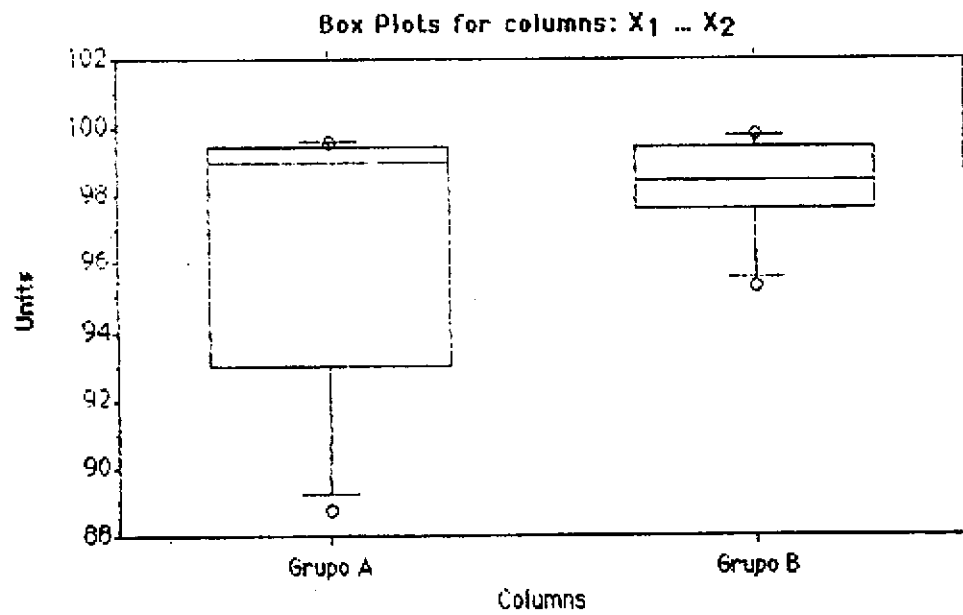
VOLUMEN DE NaOH	pH ALCANZADO	
5 ml	1.89	
10 ml	1.89	
15 ml	2.87	
30 ml	2.89	
50 ml	3.14	
55 ml	4.57	
65 ml	9.68	
70 ml	9.25	
57 ml	5.13	
58 ml	5.77	
59 ml	7.88	
60 ml	7.56	7.44

TABLA No. 2

Paired t-Test X₁: Grupo A Y₁: Grupo B

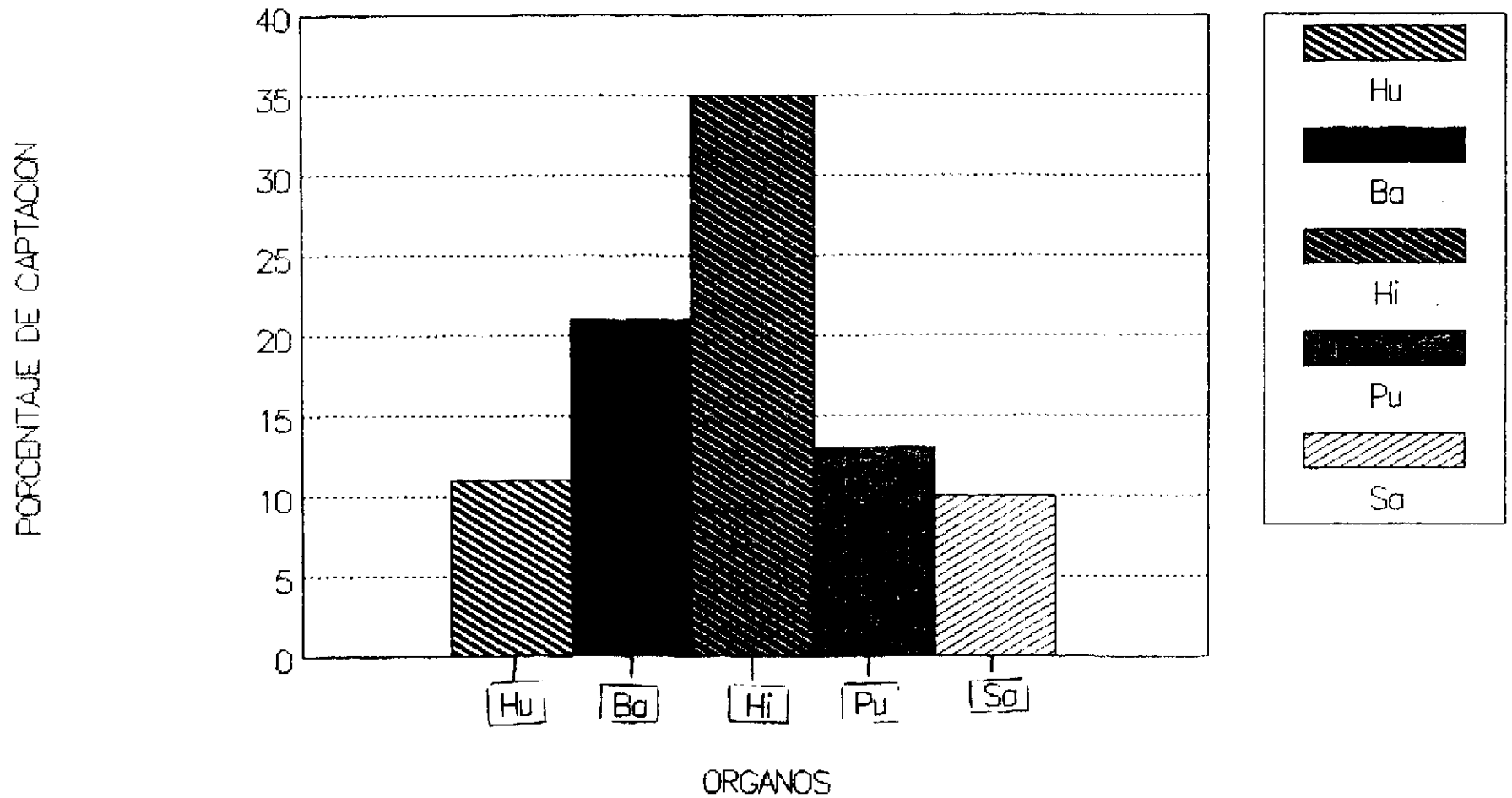
DF.	Mean X - Y.	Paired t value.	Prob. (2-tail).
5	-1.735	-.66	.4292

GRAFICA No. 1



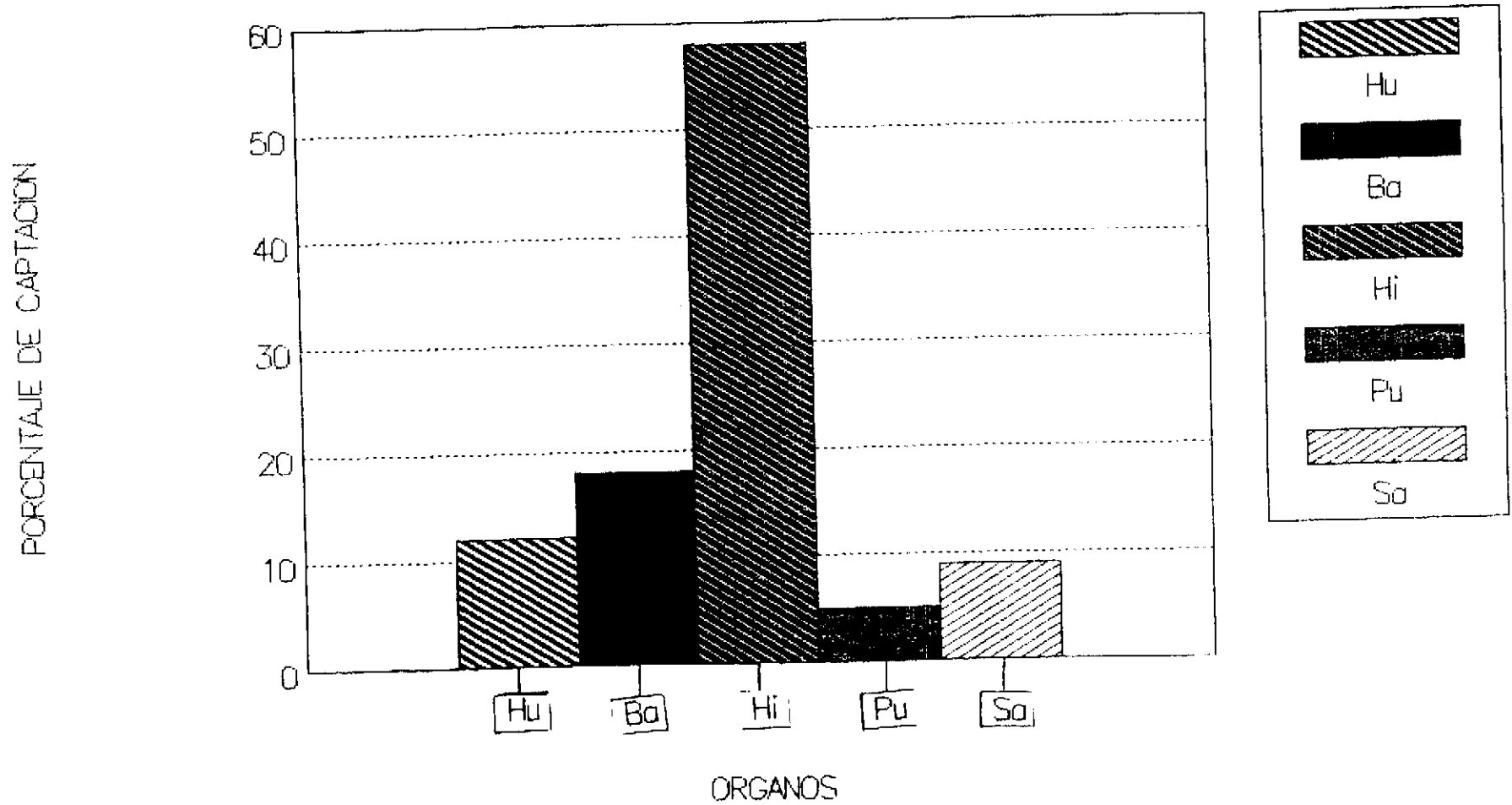
GRAFICA No. 2

PROMEDIO DE BIODISTRIBUCION (ORIGINAL)



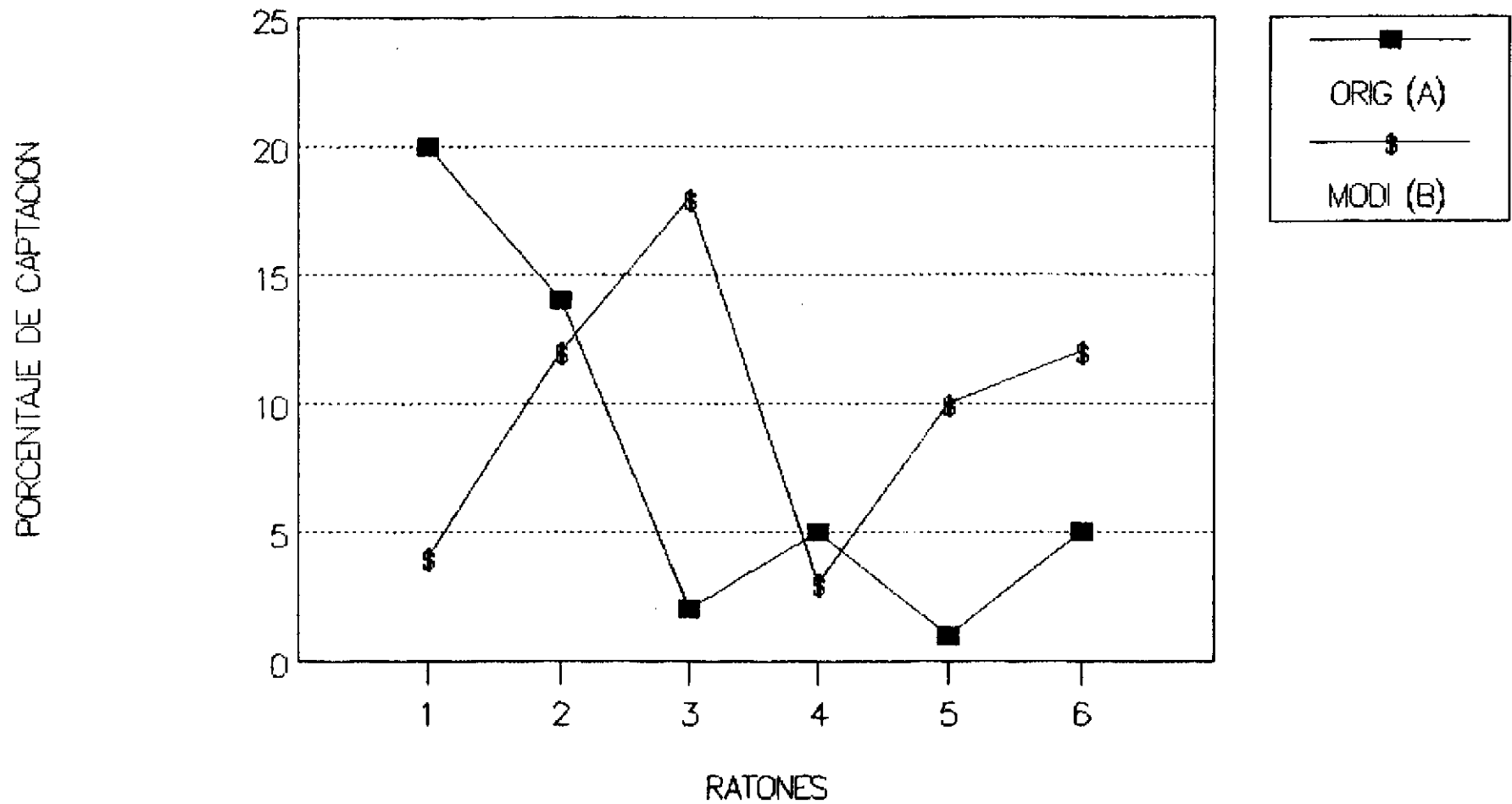
GRAFICA No. 3

PROMEDIO DE BIODISTRIBUCION(MODIFICADA)



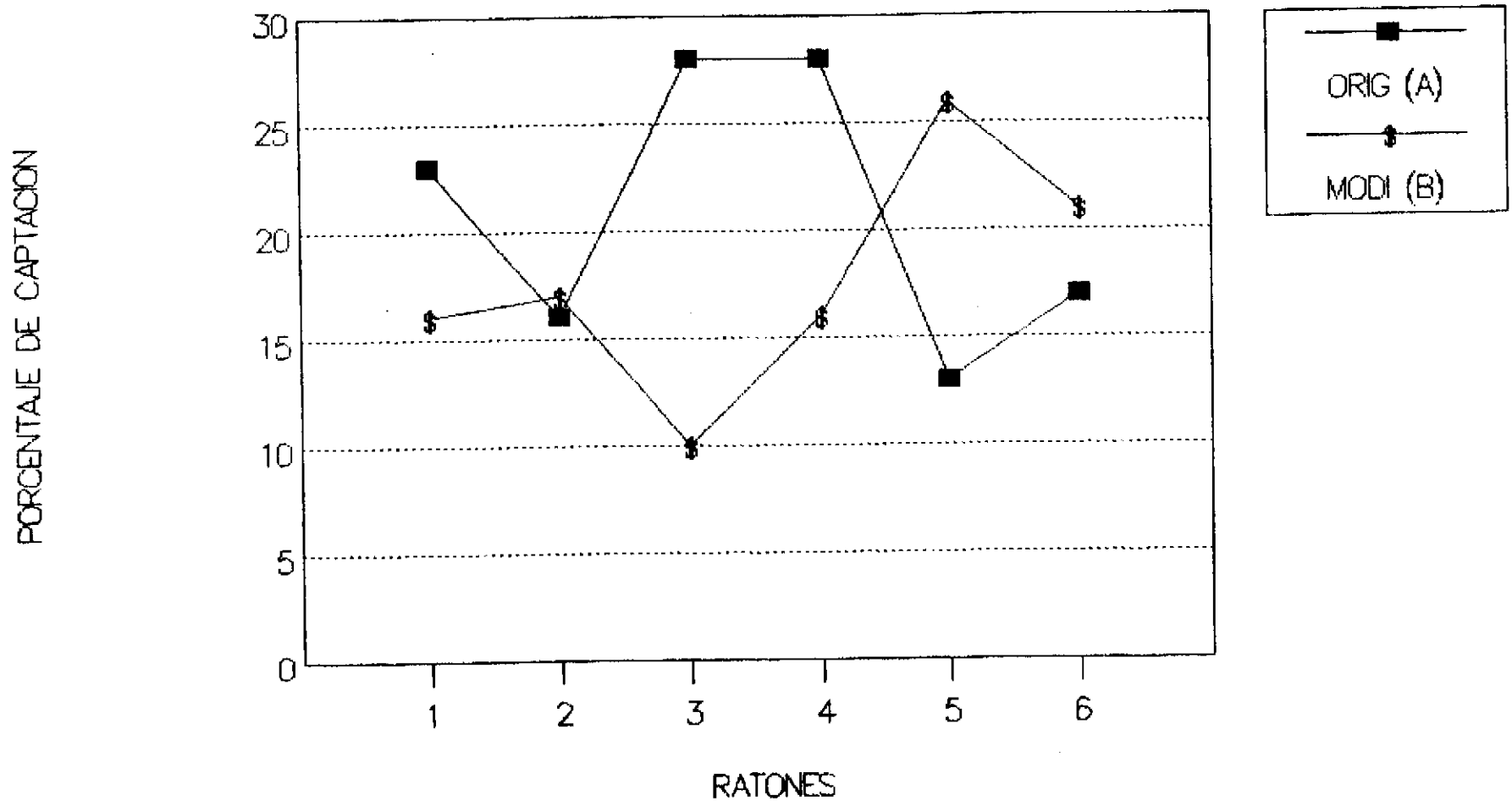
GRAFICA No. 4

COMPARACION DEL NANOCOLOIDE A Y B HUI



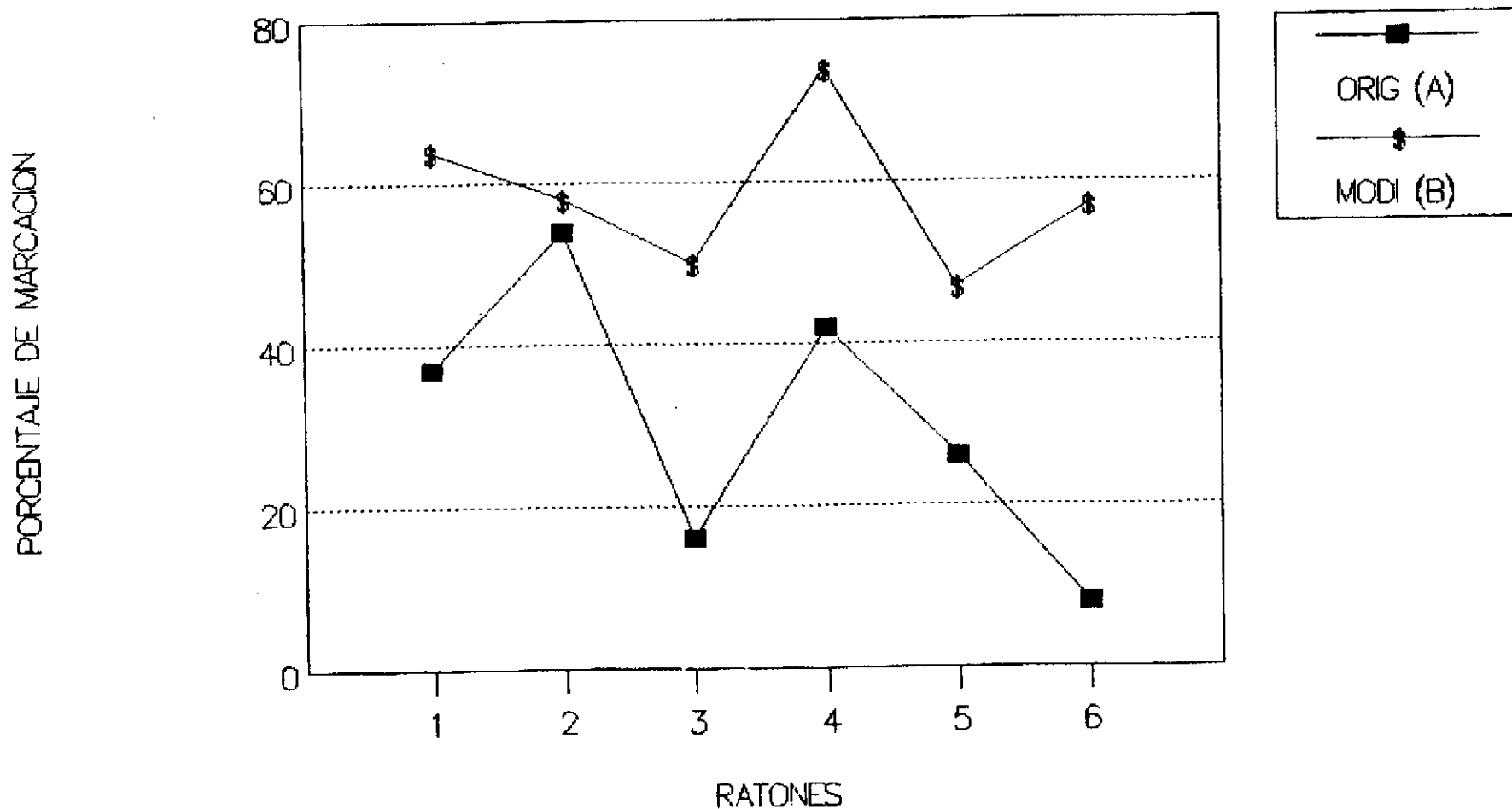
GRAFICA No. 5

COMPARACION DEL NANOCOLOIDE A Y B BAZ



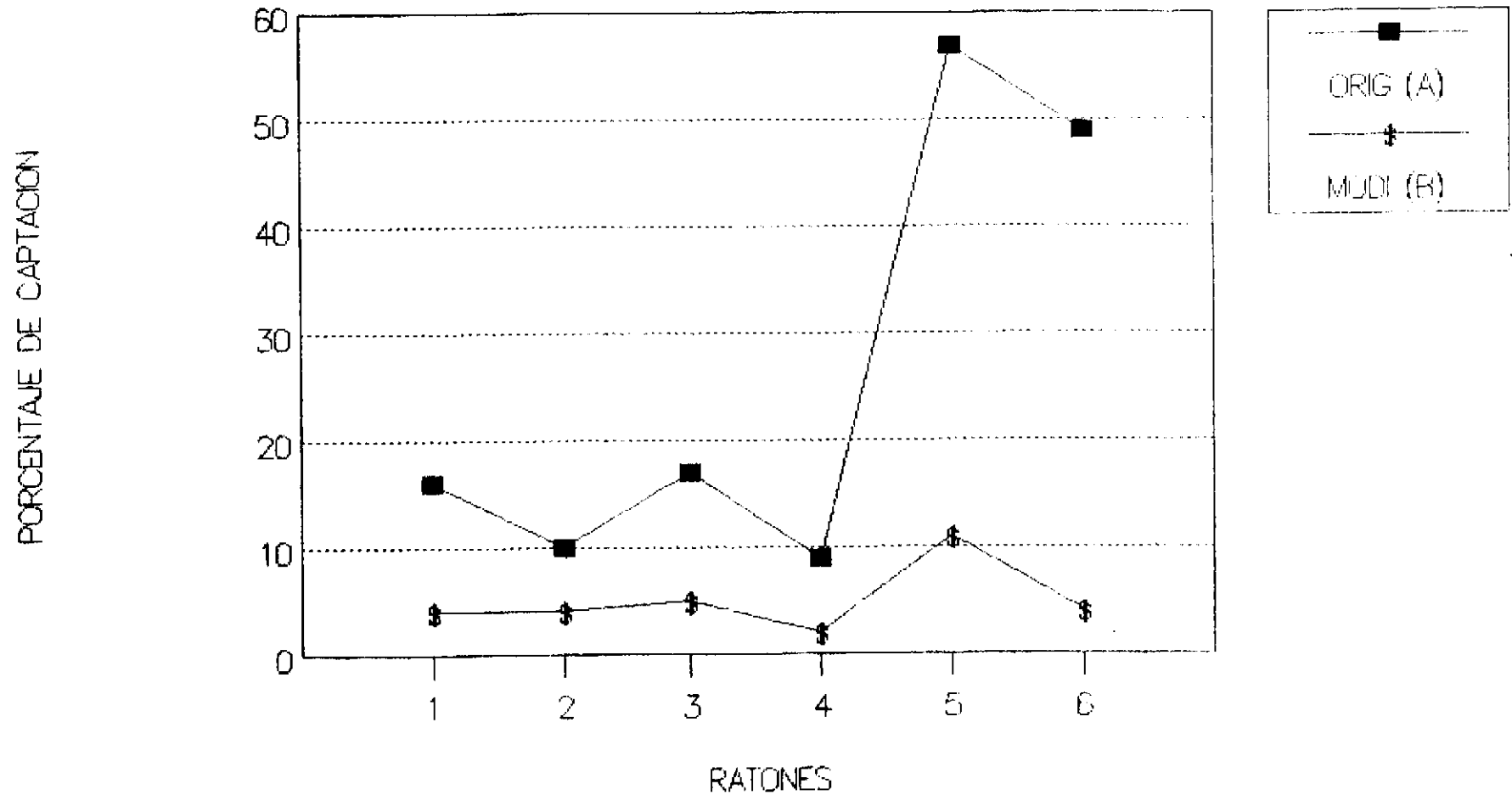
GRAFICA No. 6

COMPARACION DEL NANOCOLOIDE A Y B HIG



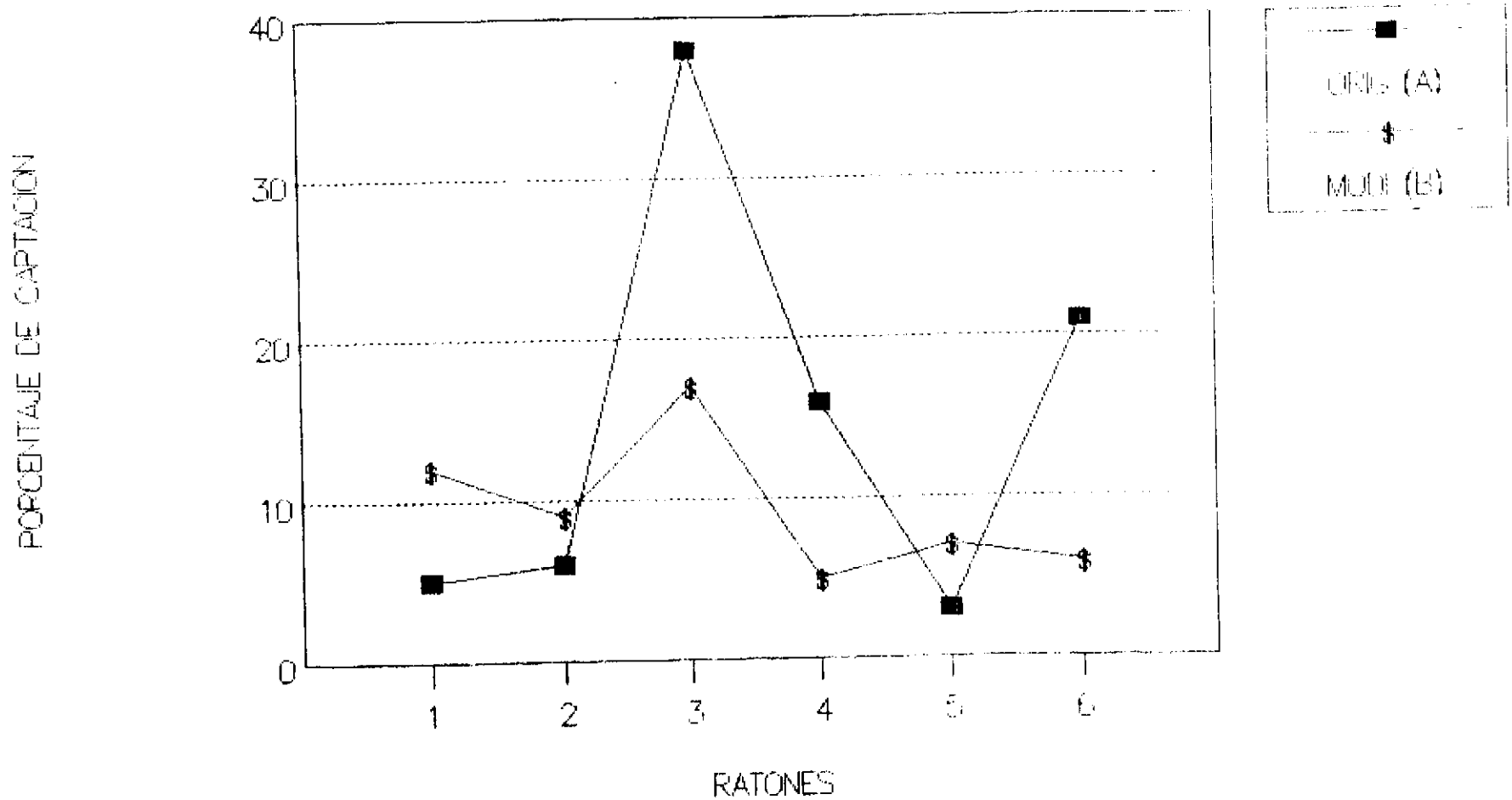
GRAFICA No. 7

COMPARACION DEL NANOCOLOIDE A Y B PUI



GRAFICA No. 8

COMPARACION DEL NANOCOLOIDE A Y B SAN



^{99m}Tc-NANOCOLOIDE

Solución estéril de Sero Albúmina Humana que contiene partículas coloidales menores de 100nm.

Endotoxinas bacterianas : no mas de 175 U E / v

Controles fisico-químicos

pH : 6.0 - 7.4

Tamaño de Partículas: Mas del 95% debe tener un tamaño de partículas entre 10 y 80 nm cuando 20nm se miden por microscopía electrónica.

Pureza Radioquímica

Cromatografía ascendente

Soporte	TLC-SG
Solvente	Acetona
Rf ^{99m} Tc-Nanocoloide	0.00
Rf ^{99m} TcO ₄	0.90-1.00

La Pureza Radioquímica debe ser mayor de 95%

Distribución Biológica

Modelo animal: ratas

Tiempo de biodistribución: A.- para centellografía de médula ósea. 60' inyección endovenosa.

B.- para linfocentellografía. 3horas. inyección subcutánea.

El porcentaje de la dosis inyectada en hígado debe ser del 10% para centellografía de médula ósea y del 40-50% para linfocentellografía.

Determinación de actividad

Medición de la dosis a administrar en un calibrador de dosis

El Radiofármaco es estable durante 4 horas a 2-8 °C

ANEXO

A. MEDULA OSEA;

Los elementos formes de la sangre consituyen un órgano de volumen y complejidad considerable. En promedio, mide aproximadamente 30 ml por Kg. de peso corporal, y si se añade la médula ósea activa, que mide aproximadamnte 20 ml por Kg. de peso corporal, alcanza un volumen aproximadamente doble que el del hígado (8).

Estructuralmente la médula ósea está formada por un tejido delicado de vasos y nervios, células reticuloendoteliales, células progenitoras diferenciadas e indiferenciadas, y tejido graso que sirve para ocupar todo el espacio vacío. La red vascular está formada por arteriolas que se vacían en un sistema venoso sinusoidal complejo. Este drena en una vena colectora central (8).

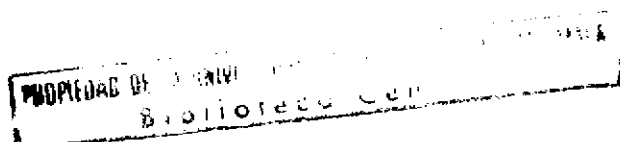
La inervación de la médula ósea es muy extensa; algunos nervios están en estrecho contacto con los islotes hematopoyéticos y pueden percibir cambios de presión causados por la proliferación celular. Si tales señales se transmiten a los nervios unidos a las paredes vasculares, puede muy bien existir un sistema autorregulador que ajuste el riego de la sangre para permitir la proliferación sin trastorno y la maduración antes que las células sean liberadas a la circulación (8).

1. Desordenes de la Médula Ósea:

a. Anemia aplásica: Es un trastorno de la médula ósea caracterizado por disminución del número o función de las células madres multipotenciales. Esta reducción, a su vez origina disminución en el volumen de la médula ósea activa productora de células de la sangre, y pancitopenia. La médula residual queda limitada a islotes pequeños, muchas veces con gran actividad, rodeados de tejido graso. Esta sustitución grasosa es el sine quanon de la verdadera anemia aplásica (8,9).

Las manifestaciones clínicas guardan toda relación directa con la pancitopenia. La anemia puede provocar debilidad, fatiga y palidez; la granulocitopenia puede originar fiebre e infecciones, la trombocitopenia puede originar hemorragias, hematomas y petequias. La hepatomegalia y la esplenomegalia son raras en etapa temprana de la enfermedad su presencia obliga a reconsiderar el diagnóstico. Pero después de enfermedad prolongada, infecciones repetidas pueden producir hiperplasia reticuloendotelial reactiva de bazo, y más tarde la hemosiderosis por transfusión puede originar hepatomegalia y esplenomegalia (9).

La anemia suele ser macrocítica y el número de reticulocitos es pequeño, pero éstos son relativamente inmaduros. Estos hechos reflejan un tiempo de tránsito por la médula ósea y una liberación acelerada, posiblemente a consecuencia de una concentración elevada de eritropoyetina, o por el medio acumulado



y comprimido en el resto de islotes medulares óseos (8,9).

b. Anemia Hemolítica: La base fundamental de las anemias hemolíticas estriba en un acortamiento del tiempo de supervivencia de los glóbulos rojos. Normalmente, los glóbulos rojos pasan unos 100 a 120 días en la circulación; alrededor del 1% de los glóbulos rojos (los envejecidos) son eliminados de la sangre cada día, siendo reemplazados por un número igual de nuevas células liberadas de la médula ósea.

En respuesta a la reducida supervivencia periférica de los glóbulos rojos, la actividad de la médula ósea aumenta. La cifra periférica de reticulocitos supera el 2%. La reticulocitosis sostenida junto con un nivel constante de hemoglobina hace sospechar la existencia de un trastorno hemolítico. Se produce una hiperplasia de los elementos medulares eritropoyéticos, con disminución de la relación mieloide-eritroide. En los procesos hemolíticos crónicos de la infancia, la hipertrofia de la médula puede expandir los espacios medulares y dar origen a notables alteraciones radiográficas, particularmente en el cráneo.

Es posible calcular directamente la supervivencia de los glóbulos rojos mediante técnicas isotópicas. La médula ósea normal estimulada puede, de ordinario, aumentar su rendimiento de 6 a 8 veces. Mediante tal compensación, la supervivencia de los glóbulos rojos puede reducirse, en teoría, a 15 a 20 días sin que se produzca anemia, pero con mucha frecuencia en los niños la

hemólisis crónica origina cierto grado de anemia. Los pacientes con anemias hemolíticas de cualquier tipo pueden presentar episodios transitorios de insuficiencia medular ósea. Estas crisis aplásicas están caracterizadas por reticulocitopenia y una notable reducción en el número de precursores de los glóbulos rojos existentes en la médula. Cabe la posibilidad de que se desarrolle de forma rápida una anemia profunda, que puede poner en peligro la vida, a causa de que la disminución de la supervivencia de los glóbulos rojos ya ni siquiera es parcialmente compensada. Las anemias hemolíticas se dividen en dos grandes clases: 1. aquellas debidas a la destrucción prematura por anomalías intrínsecas de los glóbulos rojos, y 2. las inducidas por factores extraeritrocitarios nocivos (10).

c. Mielofibrosis: Puede ocurrir como enfermedad independiente, o como complicación de la policitemia vera o la leucemia granulocítica crónica; se caracteriza por grados diversos de fibrosis u osteosclerosis de la cavidad medular hematopoyesis extramedular extensa, sobre todo en el bazo, cambios leucoeritroblásticos en sangre periférica, y generalmente curso lento (8,9).

La fibrosis y osteosclerosis de la médula no es en modo alguno siempre uniforme, tiende a ser máxima en los huesos planos donde la médula generalmente se halla en actividad hematopoyética; puede asociarse con una cantidad variable de

grasa (8).

Las manifestaciones clínicas son: Debilidad, fatiga, anorexia, pérdida de peso, palidez y percepción de una masa en el cuadrante superior izquierdo. Otras manifestaciones posibles son edemas en las partes inferiores, artralgias, dolores óseos y fiebre, los pacientes tienden a resistir mal el calor por su hipermetabolismo. Cuando el número de plaquetas es elevado, las trombosis pueden ser molestas, cuando es bajo pueden aparecer petequias, equimosis y hemorragias (8).

d. Trastornos Mieloproliferativos: Muchos hematólogos, influidos sobre todo por Dameshek, se han sentido atraídos por la idea de que la policitemia vera, la mielofibrosis con metaplasia mieloide, la leucemia mielocítica aguda y crónica, la trombocitopenia primaria o esencial, y el síndrome de Di Guglielmo, debían clasificarse juntos como trastornos mieloproliferativos. Según este concepto, incluyen las proliferaciones de una, dos o más células medulares, dentro de la médula o en médula potencial (médula amarilla, restos embrionarios como los de bazo e hígado). Una vez iniciada la proliferación, no hay tendencia a recuperar el estado inicial (9).

B. DIAGNOSTICO RADIOLOGICO;

Centellografía:

Consiste en la aplicación de un radiofármaco por vía intravenosa y obtención de una imagen de distribución de la radiactividad que provee información acerca del estado del órgano que se estudia; en este caso la centellografía de la médula ósea; sirve para visualizar defectos en la distribución de la misma, expansión de médula activa dentro de los huesos largos en mielofibrosis, anemia hemolítica o enfermedades proliferativas (11,12).

C. RADIOFARMACO;

La práctica clínica de la Medicina Nuclear está apoyada por tres ciencias hijas principales como complemento a la base médica; la ciencia radiobiológica, la instrumentación (tecnología de aparatos de detección, de radiación y aplicación de los ordenadores), y por último pero no de menor importancia, la radiofarmacología, clave en la Medicina Nuclear, tanto "in vitro" como "in vivo" (13).

Se define como radiofármaco a una sustancia radiactiva que por su forma farmacéutica, calidad y cantidad de radiación emitida, puede usarse en el diagnóstico o tratamiento de las enfermedades, cualquiera que sea la vía de administración usada (14).

Los radiofármacos, se van a utilizar en medicina nuclear con

tres usos diferentes:

a. Exploraciones diagnósticas por la imagen:

Son las exploraciones gammagráficas. En ellas se aprovecha la afinidad del radiofármaco empleado por un determinado órgano diana, donde tiende a acumularse; de esta forma se puede captar desde el exterior la radiación emitida por el radiofármaco acumulado y transformarle en imágenes de las que se obtiene información morfológica y funcional (13,15).

b. Exploraciones diagnósticas sin imagen:

Son las pruebas diagnósticas "in vivo". En ellas se aprovecha el comportamiento del trazador en un determinado compartimiento biológico y para poder detectarlo por la radiación que emite y cuantificarlo, obteniendo así información diagnóstica pero sin obtener imágenes (13,15).

c. Radioterapia con radiofármacos:

En determinados casos se aprovecha la afinidad del radiofármaco por un determinado órgano para localizar en el órgano diana la suficiente radiactividad como para dar dosis terapéuticas de radiación, procurando que ésta sea reducida en otros órganos (13,16).

1. CARACTERÍSTICAS DE LOS RADIOFÁRMACOS;

Desde el punto de vista estructural los radiofármacos son compuestos que poseen en su constitución algún componente radiactivo. La estructura química puede ser muy diversa, ya que hay radiofármacos que son átomos radiactivos simples (gases

nobles radiactivos), moléculas inorgánicas (Cloruro de ^{201}Tl , citrato de ^{67}Ga) y moléculas más complejas (complexonas, derivados de albúmina, anticuerpos monoclonales específicos) marcados con diversos radionúclidos (^{111}In , ^{131}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$), e incluso células sanguíneas (eritrocitos, plaquetas) marcadas con radionúclidos (13,15).

Los radiofármacos, compuestos radiactivos, se van a emplear siempre al interior por lo que su utilización sólo puede justificarse por la obtención de un beneficio neto que compense el riesgo que puede entrañar el empleo del mismo por pequeño que este sea, por lo que es necesario que este reúna una serie de características que hagan su empleo seguro; éstas características son:

a. Inercia metabólica:

En los radiofármacos se persigue que la molécula sea inerte, sin que ejerza ninguna acción per se, ni se integre en ninguna ruta metabólica, sino que tras una fijación temporal en el órgano diana se elimine lo más rápidamente posible (13).

b. Afinidad por el órgano diana:

Los radiofármacos empleados tienen una determinada afinidad por un tejido, órgano o función concretos (órgano diana) por lo que se acumulan en su órgano diana permitiendo la exploración o el tratamiento que se persigue (13,15).

c. Vida media efectiva corta:

La vida media efectiva es la resultante de la vida media física del radionúclido del radiofármaco (período de semidesintegración) y de la vida media biológica del preparado (tiempo en el que se elimina la mitad del compuesto). La vida media efectiva es inferior a la vida media física y a la biológica (13,15).

d. Asequibilidad:

Para que el radiofármaco tenga una vida media efectiva corta uno de los requisitos es que el radionúclido sea de período de semidesintegración corto, lo que impone que ese radionúclido sea fácilmente asequible para poder ser utilizado, ya que si el semiperíodo es muy corto sólo podrá utilizarse inmediatamente tras su producción y en las proximidades del centro productor. Debe ser asequible también desde el punto de vista económico (13,16).

e. Emisión radiactiva adecuada:

El radionúclido que se emplee para marcar los radiofármacos destinados a realizar exploraciones gammagráficas debe tener energía de emisión lo suficientemente energética como para que la atenuación del cuerpo del propio paciente no impida captar la radiación desde el exterior del cuerpo con el detector, pero también pueda ser tan energético que la radiación emitida atraviese el cristal del detector sin interaccionar. Los radiofármacos ideales serán los que no

tengan ninguna acción farmacológica, con gran afinidad por el órgano diana, con una vida media efectiva corta, fácilmente asequible y marcado con un radionúclido emisor de radiación gamma con un fototipo entre 30 y 300 KeV (13,15).

2. MECANISMO DE ACCION DE LOS RADIOFARMACOS;

La fijación del radiofármaco en el órgano diana se realiza por diversos mecanismos de acción entre los que destacan:

a. Fagocitosis y bloqueo capilar:

De esta forma actúan los radiofármacos particulados. Si las partículas son muy gruesa, entre 10 y 40 micrómetros de diámetro, producen un bloqueo de los vasos capilares; así actúan los macroagregados de albúmina (MAA) y las microesferas de albúmina (MEA) (13,15,16).

Si las partículas son más pequeñas, inferiores a 1 micrómetro de diámetro, forman una dispersión coloidal y al ser inyectadas son captadas por células del sistema retículo endotelial por un proceso de fagocitosis. Es el mecanismo de acción de las suspensiones coloidales de fitato, sulfuro coloidal, milimicroesferas de albúmina, etc. (2,13,17).

b. Secuestro celular:

El bazo es capaz de retirar del torrente circulatorio a los glóbulos rojos desnaturalizados por lo que los eritrocitos marcados con ^{99m}Tc y desnaturalizados por calor o medios químicos (Bromomercurichidroxipropano) serán un buen radiofármaco

para realizar exploraciones esplénicas (13).

c. Cambio iónico:

Sobre la superficie mineral y porosa de los huesos se fijan los derivados fosfatados (pirofosfato, fosfonatos) por atracciones electrostáticas entre el radiofármaco y los cristales de hidroxapatita del hueso, realizando un proceso de cambio iónico (15).

d. Simple difusión:

Por este mecanismo la albúmina sérica nativa marcada con diversos radionúclidos (^{99m}Tc , ^{131}I , etc.) y los eritrocitos marcados difunden y se mantienen en el torrente circulatorio sin sufrir extravasación y permiten la exploración gammagráfica del sistema cardiocirculatorio (13).

e. Integración bioquímica o farmacológica:

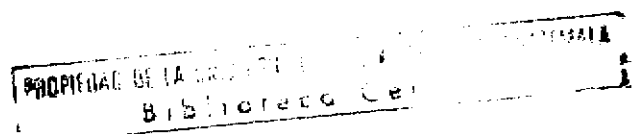
En ocasiones el radiofármaco se integra en una ruta metabólica específica del órgano diana. Es la forma de actuar del ^{131}I yodocolesterol en la exploración de las glándulas adrenales, de los derivados del ácido iminodiacético (IDA) en las exploraciones hepatobiliares, etc. (13).

f. Analogía estructural:

El radiofármaco tiene una estructura y comportamiento similar a la de un compuesto biológico, y actúa imitando el comportamiento del compuesto al que se asemeja (13,15,18).

g. Proceso activo:

El radiofármaco tiene una estructura y comportamiento este se



une al órgano diana por sitios específicamente de forma activa (13).

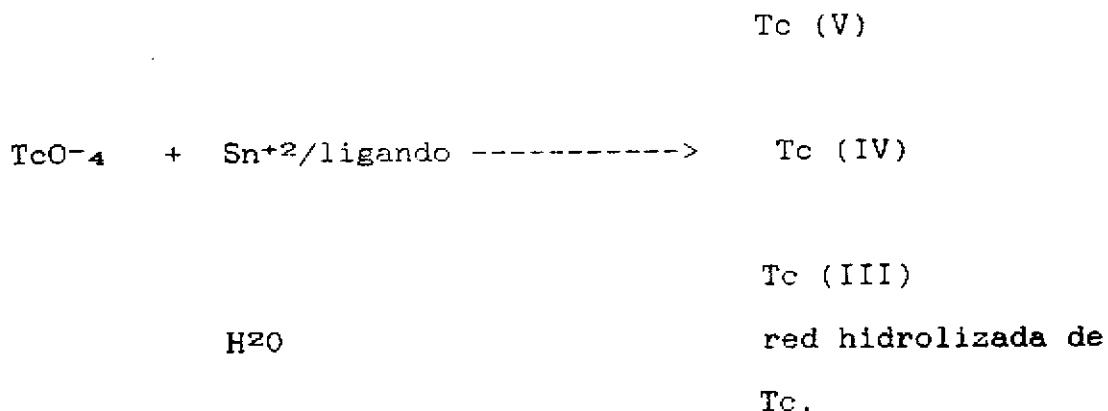
D. JUEGOS DE REACTIVOS PARA RADIOFARMACOS DE ^{99m}Tc :

1. Bases Químicas:

El material inicial para la preparación de radiofármacos de ^{99m}Tc es pertecneciato- Tc^{99m} (Tc VII) obtenido por elución de generadores de Molibdeno 99 (Mo^{99})- Tc^{99m} . El radionucleído es obtenido fácilmente en forma estéril, libre de pirógenos y sin portador. En el proceso de elución se obtiene TcO_4^- (Tc VII) el cual es el estado químico del tecnecio en solución acuosa, con la desventaja de que éste no se une a agentes quelantes, los cuales son necesarios para efectuar estudios centellográficos de diferentes órganos (6,7).

En esencia la marcación del radiofármaco con ^{99m}Tc es una compleja formación de un ligando con ^{99m}Tc en solución, o sea el Pertecneciato de sodio (TcO_4Na) debe ser reducido por un agente reductor. Se utilizan iones de estaño (cloruro estannoso) por su eficiencia reductora, fácil manejo y baja toxicidad; seguido por la formación de un complejo quelado estable con el ligando o de unión a partículas adecuadas (6,7,19).

El esquema general para las reacciones que toman lugar en la preparación de componentes marcados con ^{99m}Tc es:



La secuencia de pasos en la marcación de radiofármacos de ^{99m}Tc son:

- preparación del agente reductor Sn (III)
- reducción del pertechnetato- ^{99m}Tc reducido con el complejo Sn (II) y unión simultánea del ^{99m}Tc reducido al componente ligando (6,7,20).

Las condiciones de reacción deben ser estandarizadas meticulosamente, con un apropiado control de calidad de los reactivos utilizados incluyendo el TcO_4^- , para obtener óptima pureza radioquímica y reproducibilidad. Los parámetros que deben ser evaluados son:

- a. Cantidad de iones de Sn^{+2} que van a ser usados
- b. pH de reacción
- c. Efecto de las trazas de impurezas (Al^{+3} , MoO_4^{-2})
- d. Calentamiento, si es necesario.

La estandarización es usualmente realizada usando métodos cromatográficos, en conjunto con estudios de biodistribución en animales de laboratorio (6,7).

2. Preparación de los juegos de reactivos:

Los juegos de reactivos contienen un precursor no radiactivo del radiofármaco de Tc^{99m} , ingredientes estériles y apirógenos esenciales para la simple y conveniente preparación del radiofarmaco en un sistema cerrado.

La mayoría de los juegos de reactivos son basados en el proceso de liofilización dando una mayor estabilidad al complejo, contra la oxidación al aire y la hidrólisis. Otros son líquidos o soluciones congeladas bajo una atmósfera inerte. Los juegos de reactivos liofilizados tienen ventajas, por su larga vida media y fácil reconstitución en soluciones claras o en suspensiones en el caso de marcación de coloides o partículas requeridas para administración parenteral. La larga vida de éstos, aproximadamente de 6 meses a 1 año, hace posible llevar a cabo un cuidadoso control de calidad del radiofármaco, antes de su administración en humanos (6,7).

E. CONTROL DE CALIDAD DE RADIOFARMACOS;

1. Controles Físicos y Fisicoquímicos:

a. Aspecto Visual:

En formulaciones radiofarmacéuticas, la apariencia y verificación de los atributos exigidos son importantes ya que su alteración puede reflejar cambios que influyan sobre su utilidad o eficacia; vemos que si es una formulación inyectable bajo forma de soluciones verdaderas, no deben detectarse partículas visibles a la observación sobre fondo blanco y negro a través de vidrio

plomado o indirectamente a través de un espejo. Su color debe corresponder a las especificaciones (17,21,22).

b. Tamaño y número de partículas:

En el caso de soluciones coloidales o suspensiones, además de su aspecto no transparente, turbio, debe verificarse el tamaño de las micelas por filtración, pasaje a través de membranas o microscopía electrónica (13,21,23).

Particularmente, en preparaciones tales como macroagregados o microesferas de seroalbúmina humana marcados con ^{99m}Tc debe controlarse tamaño y número de partículas, lo cual se realiza por observación al microscopio empleando cámara cuenta glóbulos (13, 15,21).

c. Determinación de actividad:

Es la medida de la cantidad de radiactividad presente en una preparación. El análisis se realiza usando equipo de detección seleccionados en base al tipo y energía de la radiación emitida, siendo práctica común el empleo de cámara de ionización para la medición de radiofármacos marcados con emisores gamma (13,21, 22,24).

Como medida de la cantidad de radiación el Sistema Internacional de Unidades ha definido el Becquerel (Bq), $1 \text{ Bq} = 1 \text{ dps}$, en muchos países se continúa utilizando el Curie (Ci) y submúltiplos ($1 \text{ Ci} = 3.7 \times 10^{10} \text{ dps}$). La concentración radiactiva es usualmente expresada en términos de:

- Concentración específica que es la actividad por unidad de volumen (Ci/ml, mCi/ml) y/o
- Actividad específica que es la actividad por unidad de masa del elemento o la forma química presente (Ci/mg, mCi/mg). La actividad de un radiofármaco a ser administrado en paciente representa la DOSIS. Su cálculo será dependiente del radiofármaco, propósito del estudio, características del paciente (edad, peso, etc.) y otros. No debe olvidarse que dosis correcta con fines diagnósticos en Medicina Nuclear es la que brinda la mejor información con mínima dosis de radiación (13,21).

d. Identidad y Pureza Radionucleídica:

El uso seguro y eficaz de los radiofármacos requiere que ellos presenten la mayor pureza desde el punto de vista del radionucleido y de su composición química; la identificación del radionucleido es parte integral de la determinación de pureza de la preparación (21).

Se define pureza radionucleídica como la relación de actividad de un radionucleido dada respecto a la actividad total de la muestra, expresándose usualmente en términos de porcentaje. Se refiere tanto a radioisótopos de un mismo elemento (^{124}I en ^{123}I) como a radionucleidos de elementos diferentes ($^{99\text{m}}\text{Mo}$ en soluciones de $^{99\text{m}}\text{Tc}$) (21).

La pureza radionucleídica no es un fenómeno estacionario sino que depende de los períodos de semidesintegración de las impurezas del radionucleido de interés; por ello usualmente se

exige 99% de pureza radionuclídica al momento de utilización del material radiactivo (21).

e. pH:

La importancia del valor del pH en productos radiofarmacéuticos está directamente relacionada con su estabilidad, ya que si la vía de administración es endovenosa pueden ser tolerados grandes diferencias con el pH sanguíneo (pequeños volúmenes de inyección y gran capacidad tampón de la sangre). Esto no es válido para la vía de administración intrarraquídea (17,21).

f. Isotonicidad:

En la mayoría de los radiofármacos que se administran por vía endovenosa, el volumen utilizado es tan pequeño que puede tolerarse desviaciones importantes de la isotonicidad, sin que ello ocasione inconvenientes a los pacientes, dada la rápida dilución en la sangre; sin embargo la isotonicidad es esencial en aquellos estudios clínicos en que se realice marcación de glóbulos rojos y se deba mantener la integridad de las membranas (18,21).

El control se puede realizar por diversos métodos, siendo los más prácticos aquellos que determinan la presión osmótica por medio del descenso crioscópico (21,22).

2. Controles Químicos:

a. Pureza Química:

Es la fracción de masa total presente en una forma química establecida. En radiofarmacia se refiere a la medida de la presencia de especies químicas en la preparación del radionucleido y/o radiofármaco como en el producto final (13, 21).

Fundamentalmente importan aquellas impurezas químicas tóxicas (por ejemplo metil-etil-cetona en soluciones de $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ obtenido por extracción por solvente) y las que puedan alterar el comportamiento fisicoquímico y/o biológico del preparado (por ejemplo exceso de ion aluminio en eluidos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -azufre coloidal) (17,21).

b. Pureza Radioquímica:

Es el porcentaje de actividad del radionucleido en la forma química establecida en relación con la actividad total presente de dicho radionucleido. Impurezas pueden originarse como resultado de reacciones químicas competitivas durante el procedimiento de marcación o por descomposición química o radiolítica del producto final. Su presencia tiene gran importancia en radiofarmacia ya que presentan patrones de biodistribución diferentes al radiofármaco deseado. Ello puede disminuir la claridad de la imagen, incrementar la dosis absorbida y causar problemas en la interpretación diagnóstica;

por lo que es necesario que se realice este control; el análisis es frecuentemente llevado a cabo por métodos analíticos "in vitro" y por biodistribución en animales, de los métodos usados los de mayor utilidad son la cromatografía en papel y capa fina (13,21,25).

Partiendo de la premisa de que el método de control debe ser sensitivo y reproducible, la limitación que surge es que el valor de pureza se refiere unicamente al poder de separación del sistema empleado en el control. La reproducibilidad es dependiente de los errores aleatorios inherentes a la técnica de separación y a los que originan en el conteo de los términos de la ecuación que define, en el control cromatográfico la pureza radioquímica:

$$P.RQ = \frac{Rc - Bc}{Rt - Bt} \times 100$$

Rc= radiactividad correspondiente al compuesto de interés.

Bc= radiactividad de fondo (BG) en la misma región

Rt= radiactividad total del cromatograma

Bt= radiactividad total del fondo del cromatograma.

Se pueden cometer errores sistemáticos, conduciendo a falsos resultados (uso de solventes no adecuados, material de vidrio en malas condiciones, procedimientos de siembra equivocados, etc.). En función a que ciertas impurezas no son resueltas por éstos sistemas de control, se ha extendido el uso de la cromatografía

líquida de alta resolución, metodología que desempeña un papel muy importante en los programas de control de calidad y en el análisis de radiofármacos modernos (21,22,25).

3. Controles Biológicos:

a. Esterilidad:

Se define como la ausencia de microorganismos viables (bacterias, hongos y levaduras) que pueden crecer en medios estandar de cultivo, siendo un requerimiento para toda preparación de uso parenteral. La producción de un inyectable debe tender a evitar la contaminación ya que la destrucción de microorganismos es un problema complejo y condicionado a un gran número de factores entre éstos, condiciones ambientales, materiales auxiliares y de acondicionamiento, materias primas, etc. Los procedimientos de esterilización más usados en radiofarmacia son el tratamiento con calor seco o húmedo y la filtración (18,20,21).

b. Apirogenicidad:

Pirógenos son sustancias hipertermizantes, compuestos complejos de proteínas y polisácaridos, asociados en parte a lípidos, procedentes del metabolismo bacteriano, de tamaño entre 0.5-1 micrómetro, generalmente solubles y termoestables (13,21).

La fuente más común de pirógenos es el agua, los productos

químicos y el material de vidrio, por lo que se recomienda el uso de soluciones estériles recientemente preparadas, reactivos de alta pureza, material despirogenizado y correcta metodología de trabajo. El método oficial de control se basa en la respuesta febril obtenida en conejos por administración de las sustancias a controlar. Otro de los métodos más usados y más moderno es el LAL un test "in vitro" basado en la acción del lisado de amebocitos del Limulos (LAL) (13)., presenta mayor sensibilidad, rapidez y practicidad de realización, y es aplicable a productos hiper e hipotermizantes por objetivo, hipertóxicos por naturaleza y productos radiactivos de corta vida. Como se dijo se basa en la gelificación del lisado de amebocitos del líquido circulante de un arácnido, el Limulus Poliphemus, en presencia de pequeñas cantidades de endotoxinas bacterianas (del orden de ng/ml), la que en condiciones óptimas de ensayo es concentración dependiente (18,21).

c. Biodistribución en animales de laboratorio:

Estudios de biodistribución en animales de laboratorio o de experimentación constituyen un control de rutina en Centros de Producción de Juegos de reactivos y contribuyen a la determinación de su vida útil; sirve para evaluar la pureza radioquímica. Estos estudios son una etapa esencial para el establecimiento y eficacia de todo nuevo agente diagnóstico (17, 21).

El objetivo de esta evaluación preclínica es determinar la

potencial utilidad en humanos a partir de resultados en modelos animales. Por ello la elección del modelo debe tener en cuenta la diferencia anatómica y/o funcional; el estudio de situaciones normales y patológicos requiere modelos experimentales que se asemejen lo más posible a la situación clínica a evaluar. Las técnicas empleadas pueden ser no invasivas o invasivas (21).

4. Otros Estudios:

El estudio de un radiofármaco antes de su incorporación en la práctica clínica, debe haber cumplido una serie de experimentaciones de carácter preclínico y clínico. La etapa preclínica prevee la definición de toda la fase de producción, la identificación de los métodos analíticos y límites de aceptación, la conformidad con las especificaciones de un preparado farmacéutico (esterilidad, pirogenicidad, toxicidad, etc.), la definición del método para determinar el comportamiento biológico del producto, del período de validez y las condiciones de conservación del producto así como la determinación de características toxicológicas. Una vez culminada la fase preclínica, se pasa a la fase clínica de experimentación. Esta incluye aspectos como:

a. Atoxicidad:

En el diseño de un nuevo radiofármaco es necesario considerar el balance riesgo-beneficio que resulta de su utilización en humanos. El riesgo debe ser considerado en términos de toxicidad, cuyo estudio tiene por objetivo establecer aproximadamente un factor de seguridad y determinar cual será la

reacción por sobre dosis. Debe ser evaluado (riesgo) desde el punto de vista de los componentes químicos no radiactivos de la preparación, sus propiedades físicas y la propia radiación que abarca efectos genéticos y somáticos aunque muy raros (21).

b. Estabilidad:

Se refiere al mantenimiento de los atributos físicos, químicos y biológicos de la preparación, que asegure su uso seguro y eficaz (18,21).

Puede influir en la estabilidad factores ambientales, interacciones de componentes con el envase y el fenómeno de radiolisis (18,21).

c. Ensayos Clínicos:

Su objetivo es:

- confirmar el comportamiento del compuesto marcado en humanos;
- verificar la metodología propuesta;
- establecer la biodistribución en sujetos normales y obtener los datos necesarios para el ajuste de cálculo de dosis;
- comprobar la utilidad del estudio en situaciones patológicas;
- investigar cualquier posibilidad de reacciones adversas o toxicológicas.
- Solo un entendimiento profundo de los mecanismos y factores involucrados en el ensayo clínico de un nuevo agente radiofarmacéutico podrá dar valor a las conclusiones que surgen de los resultados experimentales (21,26).

d. Reacciones Negativas a los Radiofármacos:

Las más comunes son la hipersensibilidad en caso de péptidos, reacciones pirógenas, ausencia de esterilidad, destacando en este caso los derivados de componentes plasmáticos, presencia de partículas con tamaño mayor de 100 micrómetros o en número excesivo, causando un tromboembolismo pulmonar o la oclusión de un número excesivo de capilares (13,17).

Los radiofármacos también interfieren con otros medicamentos alterando su biodistribución, en especial si el medicamento convencional actúa sobre el mecanismo de acción del radiofármaco. Estas interacciones pueden aprovecharse con efectos positivos, como es la administración del lugol y I^{131} cuando se pretende evitar captación por el tiroides, o bien la administración parenteral de vitamina B₁₂ en el test de Schilling para evitar la utilización celular de los trazadores radiactivos. Aparecen efectos indeseables en casos de aporte excesivo de yodo (medicamentos yodados, colorantes alimentarios, desinfectantes yodoforos) al estudiar la captación tiroidea. Un alto contenido de aluminio en sangre procedente de la ingestión de antiácidos, aumenta la captación hepática de radiofármacos en caso de exploraciones óseas. También se pueden presentar alteraciones, como pueden ser la presencia de depósitos de hierrodextrano y de gluconato cálcico, creciéndose o creándose zonas hipercaptantes en tejidos normalmente no captantes (17,27).

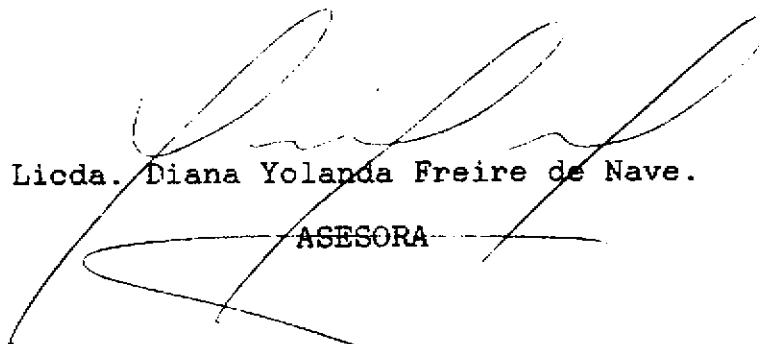
Contraindicaciones en el uso de radiofármacos: La administración está contraindicada en caso de una fracción de radiactividad libre superior a los límites establecidos por las farmacopeas, interacción medicamentosa negativa, niños, adolescentes y mujeres lactantes y gestantes, salvo beneficio ineludible, en mujeres en edad fértil, durante los 10 días siguientes al final de la última menstruación (17,27).

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE BAHÍA BLANCA
BIBLIOTECA Central



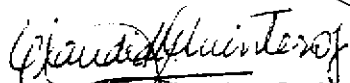
Gabriela del Rosario Castillo Rios

AUTORA



Licda. Diana Yolanda Freire de Nave.

ASESORA



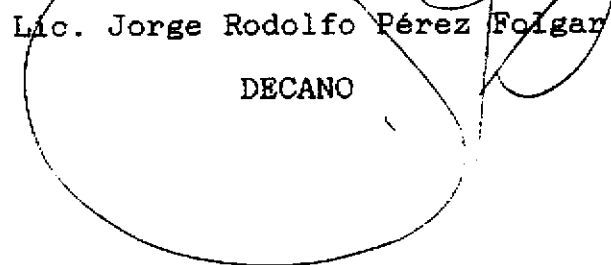
Licda. Claudia María Quintero Jordán

ASESORA



Licda. Beatriz Batres de Jiménez

DIRECTORA



Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar

DECANO