

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

**“PRODUCCION DE UN KIT DE
INMUNOGLOBULINA POLICLONAL
HUMANA PARA MARCAR CON Tc^{99m}”**

Informe final de Tesis

Presentado por

ADA CAROLA SOLARES SOLARES

Para optar al título de

QUIMICO FARMACEUTICO

Guatemala, agosto de 1999



JUNTA DIRECTIVA

DECANA LICDA. HADA MARIETA ALVARADO BETETA

SECRETARIO LIC. OSCAR FEDERICO NAVE HERRERA

VOCAL I DR. OSCAR MANUEL COBAR PINTO

VOCAL II DR. RUBÉN DARIEL VELÁSQUEZ MIRANDA

VOCAL III LIC. RODRIGO HERRERA SAN JOSÉ

VOCAL IV BR. DAVID ESTUARDO DELGADO GONZÁLEZ

VOCAL V BR. ESTUARDO SOLÓRZANO LEMUS

AGRADECIMIENTOS

A LA LICENCIADA MARIA CELESTINA PORTILLO DE PALMA
Por su colaboración y apoyo.

A LA LICENCIADA CLAUDIA QUINTERO
Por sus valiosas enseñanzas y colaboración en todo momento.

A TODAS LAS PERSONAS QUE DE ALGUNA MANERA COLABORARON CONMIGO EN LA
REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

DEDICATORIA

“A TODOS AQUELLOS QUE POR SU BONDAD Y AMOR SOBREVIVEN EN MI
PENSAMIENTO Y QUE DE UNA U OTRA MANERA ME HAN ENSEÑADO LAS
MEJORES LECCIONES QUE ESTA VIDA PUEDE OFRECER...”

INDICE

	Página
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	3
3. ANTECEDENTES	4
4. JUSTIFICACIONES.....	11
5. OBJETIVOS	12
6. HIPOTESIS.....	13
7. MATERIALES Y METODOS.....	14
8. RESULTADOS.....	23
9. DISCUSION DE RESULTADOS	45
10. CONCLUSIONES	48
11. RECOMENDACIONES	49
12. BIBLIOGRAFIA	50
13. ANEXOS	53
ANEXO 13.1	53
ANEXO 13.2	59
ANEXO 13.3	61
ANEXO 13.4	62



1. RESUMEN

La medicina nuclear es una de las técnicas de diagnóstico por imágenes que presenta varias ventajas sobre otras técnicas tales como la radiografía simple, tomografía computarizada, resonancia magnética nuclear, ya que es la única que ubica el foco infeccioso antes de la formación del absceso, es aplicable aún en pacientes donde se han perdido las referencias anatómicas normales por cirugía, traumatismos, o dolencias previas. Puede utilizarse en pacientes con endoprótesis metálicas e informa sobre la extensión de la lesión delineando el sitio anatómico, además de facilitar el seguimiento de la terapia repitiendo los estudios. Sin embargo, hasta la fecha, todavía no se ha podido encontrar un radiofármaco que cumpla con todas las características del radiofármaco ideal, de acuerdo al criterio de los años 90. Dentro de estas características del radiofármaco ideal, se describe, la fácil preparación radiofarmacéutica, amplia disponibilidad y bajo costo para el radionucléido y el fármaco, baja toxicidad y ausencia de respuesta inmune; una acumulación fisiológica poco significativa en sangre, hígado, bazo, tracto gastrointestinal, hueso, médula, riñones o músculo; rápido lavado del fondo y del blanco, rápida detección de focos infecciosos y alta especificidad en detección de otras causas de inflamación.

La utilización de kits de inmunoglobulina policlonal humana para marcar con Tc^{99m} ha sido uno de los resultados de la búsqueda continua del radiofármaco ideal. A un principio se consideró que esta $IgG-Tc^{99m}$ que presenta patrones de biodistribución y localización de focos de inflamación / infección similares a los de los leucocitos marcados, podría ser una opción para mejorar algunas de las desventajas que presenta la utilización de dichas células sanguíneas con el mismo elemento.

El presente trabajo consistió en hacer una evaluación de la producción de kits de $IgG-Tc^{99m}$, considerando los requerimientos de control de calidad y la aplicación de protocolos de producción adaptados de técnicas generales que han sido aplicadas a radiofármacos similares por otros investigadores anteriormente. Para evaluar la posibilidad de utilizar dicho radiofármaco en la localización de focos de inflamación / infección, se realizó un estudio de biodistribución en ratones albinos empleando un grupo de ensayo al que se le generó un absceso mediante la inyección de aceite de trementina en la pata posterior izquierda, 24 horas previas a la inyección del radiofármaco. Se utilizó un grupo control de 8 ratones y un grupo de ensayo con el mismo número de elementos. Los ratones fueron mantenidos bajo condiciones de alimentación y conservación normales, y fueron sacrificados por tracción cervical a las 4 y 24 horas (cuatro elementos de cada uno de los grupos en cada tiempo). Se extrajo los órganos de interés de cada uno de los ratones y se colocaron en tubos prepesados para luego medir la actividad por gramo de órgano en un contador de pozo. También se determinó la pureza radioquímica del producto, empleando una técnica de cromatografía de capa fina instantánea, así como la evaluación de la esterilidad y prueba de endotoxinas bacterianas para determinar la conformidad del producto con las especificaciones con que debe cumplir un radiofármaco dispuesto para su administración por vía intravenosa.

Mediante el estudio de biodistribución se encontró que existe una elevada acumulación del radiofármaco en riñones, sangre, hígado y bazo, por lo que se puede sugerir que este radiofármaco podría no ser adecuado para la visualización de imágenes a nivel abdominal. Sin embargo, se considera que debe evaluarse su utilidad para la localización de imágenes en otras áreas corporales, tales como miembros inferiores, y que sería adecuado comparar, mediante estudios clínicos, el comportamiento del radiofármaco contra otros estándares de la medicina nuclear empleados para propósitos similares, y así determinar su utilidad o mejor aplicación en el campo de la medicina nuclear.

Se obtuvo una pureza radioquímica mayor del 85% propuesto en uno de los objetivos de este trabajo. Sin embargo, se considera que sería necesario aplicar una técnica de cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de pureza radioquímica, ya que mediante ésta, se puede obtener resultados más específicos y precisos que con la técnica de cromatografía de capa fina instantánea que fuera aplicada.

2. INTRODUCCION

Existe en la comunidad científica el consenso de que la detección precoz de las enfermedades, es la clave para lograr un aumento en la eficacia de los tratamientos.

El médico internista enfrenta generalmente un desafío al tratar de encontrar una pronta solución ante el caso de un paciente febril que aún no presenta claras señales de la localización y posible origen de una infección.

En la actualidad, la medicina nuclear presenta varias ventajas sobre otras técnicas de diagnóstico por imágenes (radiografía simple, ultrasonografía, tomografía computarizada, resonancia magnética nuclear). Ya que es la única que ubica el foco infeccioso antes de la formación del absceso, es aplicable aún en pacientes donde se han perdido las referencias anatómicas normales por cirugía, traumatismos, o dolencias previas; puede utilizarse en pacientes con endoprótesis metálicas e informa sobre la extensión de la lesión delineando el sitio anatómico, además de facilitar el seguimiento de la terapia repitiendo los estudios (1).

La radiofarmacia, ofrece una amplia lista de compuestos que va incrementándose paulatinamente y que según algunos autores ha llegado a la tercera generación de radiofármacos; pero hasta nuestros días, todos los radiofármacos presentan algunas ventajas y desventajas, y por ello, la búsqueda aún continúa, ya que se trata de encontrar el agente que reúna los requisitos del radiofármaco ideal (1, 2, 3).

El presente trabajo evalúa la producción de un kit de inmunoglobulina policlonal humana liofilizado para marcar con Tecnecio^{99m}, que es uno de los radiofármacos empleados tanto para la localización de zonas de inflamación/infección, como de tumores primarios.

Hoy día, se puede conseguir kits comerciales de IgG para marcar con Tecnecio^{99m}, sin embargo, la producción al nivel de hospitales u organizaciones estatales, facilitaría su disposición en el momento que se les requiera.

3. ANTECEDENTES

3.1 HISTORIA DE LA RADIOFARMACIA EN GUATEMALA

La radiofarmacia en Guatemala se inicia en el año de 1962, cuando se estableció la Unidad de Medicina Nuclear en el Hospital Roosevelt. En esta época aún no se fabricaban kits a nivel nacional, sino que éstos eran comprados y marcados para su uso en dicha unidad. El uso del Tecnecio^{99m} como agente de radiodiagnóstico se inició en el año de 1972 (33, 34).

En el año de 1984 se iniciaron las actividades en la Unidad de Medicina Nuclear del Hospital San Juan de Dios, donde se empezó realizando la dosificación de diferentes hormonas (33, 34).

El primer trabajo de investigación relacionado con la producción de radiofármacos aparece en el año de 1987. Dicho trabajo sirvió para analizar el procedimiento de producción y control de calidad de radiofármacos a utilizarse en el Hospital San Juan de Dios (33).

En el año de 1990, se realizó un estudio para obtener la síntesis de la sal de los derivados del ácido iminodiacético (IDA) con el objeto de utilizarlo en la evaluación del conducto hepático-biliar (35).

En el año de 1992 se evaluó la marcación de plaquetas utilizando cuatro diferentes radiofármacos a base de Tecnecio^{99m} para emplearlos en el diagnóstico de trombosis. Posteriormente, en el año de 1994 se intentó llevar a cabo la marcación de inmunoglobulina policlonal con Tecnecio^{99m}, comparando dos métodos directos. Mediante este estudio se sugirió que la utilización de 2-mercaptoetanol como agente reductor de la proteína era adecuado, pero que requería mayor tiempo de trabajo y purificación por tratarse de un compuesto tóxico. además, se sugiere que la utilización del ácido ascórbico como agente reductor es más sencillo, práctico y no tóxico, pero que éste es sensible cuando se expone al medio ambiente (34, 36)

En el año de 1996 se llevó a cabo un estudio para evaluar la estabilización de hexametazima marcada con Tecnecio^{99m} con cloruro de cobalto hexahidratado, para la marcación de leucocitos (37).

3.2 GENERALIDADES SOBRE ANTICUERPOS

Los anticuerpos son sustancias producidas por el sistema inmune después de la exposición a una sustancia extraña también conocida como antígeno(1).

Los anticuerpos son secretados por células plasmáticas originadas de los linfocitos B en la médula ósea, los nódulos linfáticos o el bazo. Estos, son glicoproteínas llamadas inmunoglobulinas (Ig) y pueden ser divididas en cinco grupos: IgA, IgD, IgE, IgM e IgG. Un complejo determinante antigénico da origen a un número de especies de inmunoglobulinas que difieren una de otra en su afinidad por las superficies de unión de los antígenos. Este tipo de anticuerpo se conoce como anticuerpo policlonal y puede ser obtenido por la introducción del antígeno en humanos o ratones. Esto activa los linfocitos B, consiguiendo la producción de anticuerpos humanos o murinos respectivamente. Los anticuerpos monoclonales por otro lado, se producen generando una célula productora de una línea de inmunoglobulinas específicas después de la inmunización de humanos o ratones, con un antígeno específico que estimula los linfocitos B para que produzcan anticuerpos. Los linfocitos B son colectados de las especies mencionadas e incubados con células de mieloma inmortal en presencia de polietilenglicol. Los hibridomas resultantes son capaces de ser mantenidos en cultivos por prolongados períodos de tiempo y están en la capacidad de producir grandes cantidades de anticuerpos (1).

3.2.1 ESTRUCTURA Y FUNCION DE LOS ANTICUERPOS

Los anticuerpos son moléculas de glicoproteínas que generalmente consisten de dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas idénticas unidas por un puente disulfuro. Cada cadena está constituida de una región variable y una región constante, también conocidas como dominios. La región variable, es responsable de la unión antigénica y la región constante de las funciones efectoras tales como la fijación del complemento. Las cadenas pesadas tienen cuatro a cinco dominios (uno variable y tres a cuatro regiones constantes) dependiendo de la clase de anticuerpos. Las cadenas livianas tienen una región constante y una región variable. En anticuerpos con tres regiones constantes, la primera y segunda región constante están unidas por una región de bisagra especializada. Pese a que el peso molecular del anticuerpo completo es aproximadamente 150.000 daltons, éste puede ser fragmentado en unidades menores produciendo fragmentos Fab (Fab' o Fab₂). Estos están compuestos de dominios livianos variables y constantes y dominios pesados variables y constantes, así como también, fragmentos Fc conteniendo dominios de cadena pesada (como por ejemplo CH₂ y CH₃). Los fragmentos Fab' y Fc pesan 50.000 daltons, mientras que el fragmento Fab₂ pesa 100.000 daltons aproximadamente. Mientras mas pequeña sea la molécula, mas rápido ocurre su desaparición en la sangre y mayor su facilidad para ingresar a los espacios extravasculares. Sin embargo, en algunos casos se prefiere utilizar el anticuerpo completo dado a que provee mayor tiempo para su utilización, especialmente si está marcado con isótopos de vida larga como el ¹¹¹In (1).

Los anticuerpos de la clase IgG contienen carbohidratos en el dominio CH₂ posicionado bajo la región de bisagra. Estos sitios son comúnmente utilizados para unir otras sustancias o radiomarcarse el anticuerpo(1).

3.3 RADIOINMUNOCENTELLOGRAFIA

La radioinmunocentellografía, ha sido descrita como la localización in vivo de tumores mediante el empleo de anticuerpos marcados con radioisótopos y gammagrafía externa. Sus fundamentos conceptuales, tales como la utilización de anticuerpos para la detección del cáncer y el reconocimiento de una población celular definida por sus características antigénicas datan de aproximadamente una centuria según Himmelweit. Sin embargo, Pressman y Korngold explican que los primeros intentos de Radioinmunocentellografía, fracasaron. No fue sino hasta 1978, que se demostró con preparaciones policlonales de anticuerpos anti-CEA marcados con ¹³¹I, la posibilidad de la localización imagenológica de un tipo de tumor canceroso en humanos (2,3,4).

3.3.1 RADIOINMUNOCENTELLOGRAFIA DE INFLAMACIONES

Un aspecto de la inmunocentellografía que ha tomado importancia, es su uso en el diagnóstico de enfermedades benignas como es el caso de inflamaciones e infecciones.

Se ha propuesto recientemente el uso de nuevas técnicas debido a la necesidad de simplificar el método de marcación de leucocitos con ¹¹¹I, que es considerado como un estándar y cuyo mecanismo de marcaje con oxina, fue investigado por Thakur en 1977 (5).

Como parte de los métodos que fueron sugeridos con la finalidad de mejorar las desventajas de la utilización de los leucocitos marcados, para efectuar procesos de localización, varios científicos trataron de marcar anticuerpos monoclonales y policlonales con radioisótopos como el ⁶⁷Ga (6, 15, 16, 17, 18, 19).

El uso de los anticuerpos monoclonales, fue enfocado hacia la localización tumoral, principalmente. Sin embargo, el uso de las inmunoglobulinas en la detección de procesos infecciosos, no se hizo presente sino hasta 1987 cuando Fischman et al, describieron el uso de la inmunoglobulina policlonal no específica para la detección de focos infecciosos en humanos. Hecho que fuera también descrito por varios autores posteriormente (6, 15, 16, 17, 18, 19).

Al comparar el uso de anticuerpos y células plasmáticas, se puede hacer notar que una de las mayores desventajas del uso de anticuerpos monoclonales en pacientes, es su naturaleza no humana, la cual

eventualmente conlleva una amplia variedad de reacciones inmunológicas. El uso de granulocitos marcados está limitado porque requiere de una compleja y tardada preparación, mientras que la inmunoglobulina policlonal, carece de estas restricciones, y experimentalmente muchos autores han demostrado localización de focos infecciosos, especialmente en el caso de infecciones de muslo profundas y aterosclerosis en ratas (15, 20).

El uso de inmunoglobulina policlonal humana marcada para la detección de focos infecciosos, presenta también algunas desventajas, como mencionan algunos autores. Se ha demostrado una alta actividad en hígado y riñones en ratones, dejando estas áreas poco apropiadas para la localización de infecciones. Más aún, se encontró que existe una actividad de fondo en sangre relativamente alta pese a lo cual, aún es posible la localización efectiva de algunas infecciones. Los hepatocitos de las ratas están equipados con receptores de IgA, por lo cual, algunos autores no encuentran sorprendente la acumulación de Ig marcada en estos órganos (20).

Calame et al., estudiaron los posibles mecanismos de detección de la inmunoglobulina policlonal marcada, sugiriendo al igual que otros autores, que algunas de las explicaciones más factibles son:

- Aumento de la permeabilidad vascular
- Unión del fragmento Fc de la Ig a los receptores Fc del tejido de los leucocitos en el sitio de la infección.
- Unión de las moléculas de Ig a los leucocitos plasmáticos.
- Unión de las inmunoglobulinas a los microorganismos en el sitio de la infección (15,18,20,21,22).

3.4 MARCACION DIRECTA E INDIRECTA DE PROTEINAS

La utilización del Tc^{99m} para marcar proteínas, por la unión del radionucléido con sulfuros reactivos fue desarrollándose inmediatamente después de la invención del generador de Tc^{99m} , sin embargo, las preparaciones iniciales no fueron simples de marcar ni dieron productos estables. A un inicio se emplearon dos mecanismos para proveer sulfuros reactivos en las proteínas. El primero consistió en reducir los puentes disulfuro activos incubando la proteína con iones estaño (preestañado) según describiera Rhodes en 1980. Y el segundo método, que fue estudiado por Fritzberg et al., trataba de introducir grupos que contenían sulfhidrilos libres incorporando quelantes bifuncionales en las proteínas. En base a los mecanismos empleados para la marcación, se pudo hacer la clasificación de los métodos de marcación en métodos directos e indirectos, siendo los primeros, aquellos que trataban de marcar los sulfuros reactivos de las proteínas, minimizando las reacciones laterales que conducían a productos no deseables. Mientras que los

métodos indirectos, se definieron como aquellos que empleaban grupos intermediarios tales como grupos bifuncionales para unir el radionucléido (6, 15, 16, 24, 25).

Paik et al probaron la existencia de sitios de alta y baja afinidad de unión mediante la cantidad de proteína marcada en presencia de cantidades variables de DTPA, que es un agente quelante fuerte para iones Tc^{99m} . Estos autores, sugirieron que los sitios de alta afinidad estaban relacionados con la presencia de grupos sulfuro. Inclusive, sugirieron que el proceso de preestañado aumentaba el número de uniones de alta afinidad (26).

Mather y Ellison estudiaron la reducción de puentes disulfuro, usando 2-mercaptoetanol y encontraron que un incremento en la reducción estaba acompañado por un incremento en la eficiencia de marcación (27). Se han usado diversos agentes reductores de la proteína, tales como ditiotreitol, ácido ascórbico, glutatión etc (24, 25, 26, 27).

Con respecto a los complejos intermediarios de Tc^{99m} y a la marcación por transquelación se han usado diversos agentes tales como el glucoheptonato, tartrato, pirofostato, metilendifosfonato y varios análogos que sirven de ligandos de transferencia para marcar los anticuerpos luego de la reducción de los mismos.

3.4.1 RADIOISOTOPOS PARA MARCACION DE INMUNOGLOBULINAS Y OTRAS PROTEINAS EN CENTELLOGRAFIA:

Se ha propuesto una gran cantidad de isótopos para ser usados en inmunocentellografía, incluyendo Tc^{99m} , In^{111} , I^{123} y I^{131} . Cada uno posee sus ventajas y desventajas específicas, sugiriendo que el uso de diferentes isótopos podría ser más apropiado para ciertas indicaciones. En el desarrollo de estos immunoconjugados radiomarcados, se consideran varios factores, incluyendo la facilidad de preparación, su uso específico en la localización clínica, así como también la integridad de los tres componentes que constituyen el conjugado que incluye el radioisótopo a ser transportado, la tecnología de unión, y el anticuerpo a ser utilizado (1.7).

La conjugación del Tc^{99m} , está limitada, como se mencionó anteriormente, por el número de sitios de unión funcionales (mayormente sulfhidrilos) en la superficie del anticuerpo. Alternativamente a la estructura de los anticuerpos, éstos, pueden ser radiomarcados indirectamente, mediante el empleo de un sustrato matriz o agentes quelantes bifuncionales que son primeramente unidos al anticuerpo. No importando el método de marcado, es importante que el anticuerpo empleado, ya sea monoclonal o policlonal, retenga su afinidad y sus características de unión al antígeno, si se espera tener éxito en la localización de los sitios de interés (1.7).

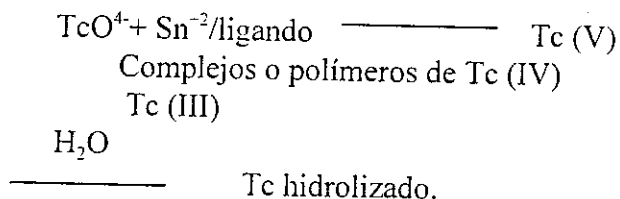
3.4.1.1

QUIMICA BASICA UTILIZADA EN LA PREPARACION DE KITS PARA MARCAR CON Tc^{99m} :

El material inicial para la preparación de radiofármacos de Tc^{99m} es el pertechnetato de Tc^{99m} obtenido de los generadores de Mo^{99}/Tc^{99m} . Las especificaciones concernientes a este producto se describen en varias farmacopeas, como es el caso de La Farmacopea de los Estados Unidos (USP), la Farmacopea Británica (BP) y la Farmacopea Europea (EP) (8, 9, 10).

Las impurezas radionucléicas presentes en el pertechnetato de Tc^{99m} , son incorporadas a los radiofármacos, por lo que es importante evaluar la pureza química y radioquímica del pertechnetato de Tc^{99m} . En esencia, la preparación de radiofármacos en este caso especial, es la compleja formación de un ligando dado con Tc^{99m} con un estado de oxidación del Tecnecio de +7. La composición exacta y la estructura del complejo o complejos formados, no se conoce con certeza. Dependiendo de las condiciones de la reacción, en algunos sistemas Tc^{99m} /ligando, se pueden formar varios complejos con diferentes comportamientos biológicos. Es por ello, que en todos los procedimientos de marcado, el pertechnetato de Tc^{99m} es convertido en un agente reductor, seguido de la formación de un estable complejo quelado con el ligando, o por su unión con partículas apropiadas. La reducción del pertechnetato de Tc^{99m} en la preparación de la mayoría de los radiofármacos puede ser llevada a cabo empleando iones estanosos en vista de su alta eficiencia reductora, facilidad de manipuleo y baja toxicidad (8, 9, 10, 11, 12).

El esquema general para las reacciones ocurrientes en la preparación de los compuestos de Tc^{99m} , es el siguiente:



La cantidad del ligando a ser utilizado para la formación del complejo, es seleccionado principalmente para suprimir la hidrólisis completa y se basa en la información de la toxicidad que éste posee (13, 14).

3.5 SECUENCIA DE PASOS A SEGUIR EN LA PREPARACION DE RADIOFARMACOS DE Tc^{99m} :

- Preparación del complejo estano (Sn(II)) del compuesto
- Reducción del pertecnetato de Tc^{99m} con el complejo de Sn(II) con la simultánea unión del Tc^{99m} reducido al compuesto ligando.

Hasta la fecha, no existen métodos fisicoquímicos establecidos para separar los varios compuestos resultantes de estas reacciones de complejación. la estandarización es generalmente llevada a cabo mediante métodos cromatográficos en conjunción con estudios de biodistribución en animales de laboratorio (12).

3.6 PREPARACION DE LOS KITS

La forma mas popular de los kits se basa en la estabilización de complejos de ligandos estanosos por medio de la liofilización que evita la oxidación e hidrólisis. A pesar de que kits de diferentes formas, como las soluciones líquidas o congeladas bajo atmósferas inertes también han sido empleadas, los kits liofilizados poseen la ventaja de su larga vida de almacenamiento. que generalmente alcanza los seis meses y que hace posible desarrollar test de control de calidad previo a su liberación para uso en humanos (12, 23).

4. JUSTIFICACIONES

En la actualidad, la marcación de inmunoglobulinas se rige por una serie de principios básicos, su uso se ha popularizado en la detección de tumores cancerígenos, (empleando inmunoglobulinas específicas) pero también se ha estudiado su capacidad de detección de procesos infecciosos efectivamente y se le compara con la técnica de detección mediante el uso de células blancas marcadas con Tecnecio. Sin embargo, la técnica de marcaje de inmunoglobulinas ahorra el largo proceso de preparación que requiere el marcaje de células plasmáticas y evita el manipuleo de sangre. Considerando que se cuenta con los recursos mínimos para la producción de los kits, es necesario evaluar la producción de los mismos, previendo, además, que en un futuro se pueda utilizar dicho producto en el diagnóstico y detección de enfermedades, y que, además, se pueda desarrollar técnicas similares que ayuden en el campo de la cancerología.

5. OBJETIVOS

5.1 GENERALES:

- Evaluar los principales requerimientos de calidad con que debe cumplir un kit de inmunoglobulina policlonal humana liofilizada.

5.2 ESPECIFICOS:

- Evaluar la pureza radioquímica del producto.
- Verificar la esterilidad de los kits producidos.
- Efectuar la prueba de endotoxinas a cada lote producido.
- Efectuar un estudio de biodistribución del radiofármaco, como parte del control de calidad y posibilidad de utilización del radiofármaco en estudios de localización de focos infecciosos.
- Obtener un porcentaje de pureza radioquímica, no menor del 85%. en los kits fabricados.

6. **HIPOTESIS**

Los kits de inmunoglobulina policlonal humana liofilizada producidos, presentan una eficiencia de marcación de por lo menos 85% y características de biodistribución adecuadas para su uso en la detección de sitios de inflamación/infección, en ratones albinos de laboratorio.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 UNIVERSO DE TRABAJO:

1000 miligramos de Inmunoglobulina policlonal humana de la casa comercial SANDOZ.

7.2 MEDIOS:

Recursos Humanos:

Tesista responsable: Ada Carola Solares Solares
Asesora: Licda. María Celestina Portillo de Palma
Colaboradora: Licda. Claudia Quintero

7.3 RECURSOS MATERIALES:

Equipo de electrónica nuclear e instrumental del Laboratorio de Radiofarmacia del Hospital Roosevelt de Guatemala y Hospital San Juan de Dios.

7.4 EQUIPO:

Balanza analítica (Precisión)
Balanza semianalítica (OHAUS)
Contador de Pozo (ORTEC, modelo 2000)
Campana de Flujo laminar
Calibrador de dosis (CAPINTEC)
Calibrador de dosis (DELUXE ISOTOPE II)
Autoclave
Potenciómetro (FISCHER)
Generador de Tc^{99m} (MALLINCKRODT)
Incubadora
Refrigerador
Liofilizadora (LABCONCO)
Equipo de disección
Selladora de viales
Agitador (Vortex Genie)

7.5 MATERIALES:

Jeringas y agujas
Pipetas
Gradillas
Tubos Eppendorf de 3 ml
Micropipetas
Varilla de vidrio
Contenedores de plomo
Tijeras

Algodón
Bata plomada
Guantes desechables
Papel para cromatografía instantánea en capa fina impregnado con sílica gel (ITLC-SG) y tijeras.

7.6 REACTIVOS:

Generador de Molibdeno⁹⁹- Tecnecio^{99m}
Inmunoglobulina policlonal humana (SANDOGLOBULINA) de la casa comercial SANDOZ.
2-mercaptoetanol
Sephadex G-50 (de grosor medio)
Metanol (grado reactivo)
Etanol (grado reactivo)
Amoníaco (concentrado)
Metil etil cetona (grado reactivo)
Nitrógeno gaseoso
Cloruro de sodio
Fosfato de sodio dibásico
Fosfato de sodio monobásico
Metilen-difosfato (MDP)
Cloruro de estaño (SnCl₂)

7.7 ANIMALES DE LABORATORIO:

Ratones albinos

7.8 PROCEDIMIENTO:

PROTOCOLO DE REDUCCION Y LIOFILIZACION DE INMUNOGLOBULINA

PREPARACION DE REACTIVOS:

BUFFER DE FOSTATO SALINO

(Aproximadamente 0.05 a 0.01 M en fosfatos y 0.14 M en cloruro de sodio)

■ Preparar una solución que contenga aproximadamente 14.32 g de fosfato dibásico de sodio, 1.31g de fosfato monobásico de sodio y 4.5g de cloruro de sodio en cada 500ml.

SOLUCION DE MDP Y FLUORURO ESTANOSO

■ Disolver 20mg de MDP (metilen difosfonato) en 10ml de solución fisiológica y luego nitrogenar.

- Disolver 2.1mg de SnF₂ en agua bidestilada y nitrogenar por 10 minutos.
- Mezclar volúmenes iguales de estas soluciones de modo que el volumen final obtenido sea el necesario para incorporar a la masa de proteína que se desea utilizar considerando que la proporción de solución a agregar debe ser de 50 microlitros por mg de proteína

RECONSTITUCION DE LA INMUNOGLOBULINA

- El liofilizado de inmunoglobulina se reconstituye con buffer de fosfatos salino esterilizado en autoclave, o solución salina, bajo una campana de flujo laminar, a manera de obtener una concentración de 30mg/ml.
- Almacenar esta solución en el refrigerador, preferiblemente en una caja plástica desinfectada y cubriendo asépticamente el tapón del vial.

REDUCCION Y LIOFILIZACION DE LA INMUNOGLOBULINA

- Preparar una columna de Sephadex G50 o G25 de grosor mediano, tomando en cuenta que el volumen de la columna a emplear deberá ser por lo menos 20 veces el volumen de la solución que contiene el anticuerpo a usar.
- Lavar la columna ya empacada por lo menos con tres volúmenes de buffer de fosfato salino purgado con nitrógeno.
- Tomar el volumen de proteína equivalente a la masa requerida para el tamaño del lote que se desea producir.
- Colocar en un vial con tapón limpio y se agrega el 2-Mercaptoetanol en una concentración de 0.47microlitros por cada mg de proteína (Si es necesario para la correcta medición de éste, se puede hacer una dilución 1:10).
- Incubar la mezcla anterior a temperatura ambiente por 30 minutos.
- Purificar la solución anterior por pasaje a través de la columna de Sephadex eluyendo con buffer de fosfato salino, colectando fracciones de 1 a 1.5ml del eluido en tubos Eppendorf cerrados y sobre hielo.
- Medir la absorbancia de las fracciones colectadas, mezclando luego todas aquellas fracciones que contengan una concentración mayor de 0.5mg/ml.
- Agregar luego, la solución de MDP- SnF₂ en una concentración de 50 microlitros por cada mg de la proteína.
- Fraccionar la solución anterior en alícuotas de 1mg de proteína en cada frasco a liofilizar.

PROTOCOLO DE MARCACION Y EVALUACION DE LA ESTERILIDAD Y PUREZA RADIOQUIMICA DE LOS KIT DE INMUNOGLOBULINA:

MARCACION DE LA INMUNOGLOBULINA

- Eluir el generador de Tecnecio con un vial conteniendo 5ml de solución fisiológica esteril sin agregado de agentes oxidantes.
- Medir la actividad eluida y calcular la concentración de actividad.
- Tomar con jeringa descartable de 1ml, el volumen correspondiente a 3mCi de tecnecio del frasco con el eluido y marcar la proteína contenida en el vial.
- Agitar levemente el vial dentro de un blindaje de plomo e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, antes de utilizar.

EVALUACION DE LA PUREZA RADIOQUIMICA

- Realizar el control de pureza radioquímica empleando tiras de papel para ITLC.
- Preparar tiras de papel de aproximadamente 1.5 por 12 cm. las cuales se han de colocar en tres sistemas diferentes. Utilizando un centímetro en cada extremo para permitir manejo del cromatograma y permitir una sección de contacto con el solvente, cuidando de no sumergir el área de aplicación de la muestra dentro del solvente.
- Normalmente, las tiras de papel utilizadas, podrán ser sujetadas de la parte superior y se les hará colgar en forma perfectamente vertical. Si es necesario, se puede colocar una varilla de vidrio o un contrapeso de material inerte en el extremo inferior para asegurar la correcta colocación de la tira.
- El primer sistema a utilizar, emplea solución fisiológica ($Rf^{99m}TCO_4^- = 1$, $Rf^{99m}Tc-MDP=1$, $Rf^{99m}Tc$ coloidal= 0.0, $Rf^{99m}Tc-IgG = 0.0$).
- El segundo sistema, emplea metiletilcetona ($Rf^{99m}TCO_4^- = 1$, $Rf^{99m}Tc-MDP=0.0$, $Rf^{99m}Tc$ coloidal= 0.0, $Rf^{99m}Tc-IgG = 0.0$).
- El tercer sistema emplea tiras de ITLC que deben estar previamente embebidas en albúmina humana al 0.5%, secas y guardadas en refrigeración a 4 centígrados hasta el momento de su uso. El solvente será una mezcla de etanol:amoníaco:agua (3:1:5) ($Rf^{99m}TCO_4^- = 1$, $Rf^{99m}Tc-MDP=1$, $Rf^{99m}Tc$ coloidal= 0.0, $Rf^{99m}Tc-IgG = 1.0$).
- Aplicar la muestra de IgG marcada utilizando una jeringa, teniendo cuidado de no tocar o dañar la superficie de la tira cromatográfica.
- Correr los cromatogramas hasta la marca del onceavo centímetro.
- Retirar los cromatogramas de las cámaras, permitiendo que se sequen al aire.

- Partir en secciones de 1cm cada una de las tiras y colocar dentro de tubos de medición identificados, para tomar las lecturas de cuentas por minuto en el contador de pozo Ortec.
- El porcentaje de actividad asociado con un pico, es calculado sumando las cuentas en los tubos conteniendo los trozos de la tira cromatográfica, que claramente constituyen el pico y determinando el porcentaje que estos representan del total de las cuentas de todos los tubos que contienen los trozos de la tira cromatográfica, correctamente identificados según su secuencia o distancia.

TEST DE ESTERILIDAD

Los test de esterilidad para los kits de radiofármacos de Tecnecio^{99m} se llevan a cabo de acuerdo a las indicaciones de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) o de la Farmacopea Británica (BP) analizando según las indicaciones para preparaciones inyectables. En el caso de los liofilizados de inmunoglobulina preparados de acuerdo a las indicaciones referidas en este trabajo de investigación, se emplea el método de filtración de membrana, que se describe a continuación:

METODO DE FILTRACION DE MEMBRANA

Este método requiere del uso de discos de membrana de nitrato de celulosa de 0.45 μ m de porosidad y 50 mm de diámetro, esterilizados y empleados bajo condiciones asépticas (campana de flujo laminar) (9,10,28).

PROCEDIMIENTO:

- Tome una muestra de 4 viales o el 10% del número de viales de cada lote seleccionando (lo que sea mayor).
- Humedezca la membrana de filtración con una pequeña cantidad del medio diluyente estéril (Solución 0.1% de peptona o caseína-soya).
- Para cada medio a utilizar, transfiera a una membrana, el contenido de los cuatro viales reconstituídos con el diluyente escogido.
- Filtre inmediatamente
- Corte asépticamente la membrana en partes iguales de acuerdo al número de medios de cultivo a utilizar.
- Incube a 30-35°C los medios destinados a la detección de bacterias (caseína-soya) y a 20-25°C. los medios destinados a la detección de hongos (tioglicolato).

INTERPRETACION DE RESULTADOS

A intervalos durante el período de incubación y al final del periodo de incubación se deberá examinar los medios para detectar cualquier

evidencia macroscópica de crecimiento microbiano. Si se encontrara evidencia de crecimiento bacteriano, se evaluará la posibilidad de contaminación externa de los medios y se llevará a cabo un segundo ensayo para verificar los resultados obtenidos (9, 10).

El número de muestras que se deberá emplear en el análisis de productos estériles, aparece generalmente indicado en las Farmacopeas mencionadas. Sin embargo, típicamente para un lote que no excede los 100 viales, deberá muestrearse un 10% o cuatro viales, (lo que sea mayor). De igual manera, para lotes de 100 a 500 viales, se tomarán 10 viales para ser analizados (9, 10).

Los test se hacen empleando un fluido de tioglicolato y medio de caseína-soya. La incubación de los medios se lleva a cabo por 7 a 14 días a una temperatura de 30-35 centígrados para el fluido de tioglicolato y una temperatura de 20-25 centígrados para el medio de caseína soya. Deberá evaluarse periódicamente para verificar la presencia de crecimiento microbiano. Si no se presenta ningún crecimiento, se considera que la preparación pasa la prueba de esterilidad (8, 9).

PRUEBA PARA LA DETERMINACION DE ENDOTOXINAS

REACTIVOS

Estándar de entotoxinas de E. coli (liofilizado)
Lisado de amebocitos de Limulus (liofilizado)

EQUIPO Y MATERIALES

Tubos de vidrio de 10 X 75 mm apirógenos.
Micropipetas (100 FI)
Puntas plásticas descartables para pipetas automáticas apirógenas (Tips descartables).
Baño de María.
Gradillas para tubos.

OBSERVACIONES

- Todo el material de vidrio debe de esterilizarse por calor seco a 180° por 4 horas.
- Las muestras a examinar deben de estar en el rango de pH de 6.0 a 7.0.
- Los solventes utilizados para los reactivos (agua) deben ser libres de pirógenos.
- El ensayo de pirógenos estima la concentración de endotoxinas bacterianas que pueden estar presentes en una muestra. Cuando el

ensayo está conducido a un límite, la muestra se considera como positiva o negativa al ensayo. Cuando la muestra es conducida o aplicada para determinar concentraciones de endotoxinas, se harán diluciones paralelas de muestras patrón de endotoxinas y el resultado se expresa como unidades de endotoxina (9, 28).

PROCEDIMIENTO

- Reconstituir los reactivos con agua bidestilada estéril y libre de pirógenos y proceder de la manera siguiente: Cada ensayo debe incluir diluciones seriadas del estándar de endotoxina (que indicará la sensibilidad del lisado, que demuestra curva de control positivo por la presencia del gel), diluciones de la muestra (si se desea hacer un análisis cuantitativo), muestras control con agua libre de pirógenos (control negativo, que se demuestra por la ausencia del gel).
- Transferir cuidadosamente evitando contaminación bacteriana y/o pirogénica, 100 µl del estándar, muestra o agua (según sea el caso) en tubos de reacción apropiados (10 X 75 mm) (8, 9, 10).
- Agregar 100 Fl del lisado reconstituido a cada tubo, comenzando por la concentración mas alta de endotoxina.
- Mezclar suavemente los tubos y colocarlos en baño de maría a 37° C durante 1 hora.
- Evaluar cada tubo observando la presencia o ausencia de un gel.
- Anotar los resultados de cada tubo (8, 9, 10).

INTERPRETACION DE RESULTADOS

Presencia del gel firme: Positivo

Ausencia del gel: Negativo

Nota: Si el resultado es positivo, se realizan diluciones de la muestra iguales a las diluciones del estándar de la endotoxina, como en la siguiente tabla:

No. de Tubo	Agua (mL)	Volumen de Estandar Agregado al agua	Concentración de Endotoxinas
1	1.0	1.0 mL de 1 UE/mL	0.5 UE/mL
2	1.0	1.0 mL de tubo 1	0.25 UE/mL
3	1.0	1.0 mL de tubo 2	0.12 UE/mL
4	1.0	1.0 mL de tubo 3	0.06 UE/mL
5	1.0	1.0 mL de tubo 4	0.03 UE/mL

Se compara visualmente la firmeza del gel de la muestra contra cada una de las diluciones del estándar, para determinar la concentración de endotoxinas presentes en la misma (28).

PROTOCOLO DE BIODISTRIBUCION

MODELO ANIMAL

Se utilizan ratones albinos de aproximadamente 25g de peso, en los que se produce un proceso inflamatorio por inyección subcutánea de 50 microlitros de aceite de trementina en la pata trasera izquierda.

Los ratones deben ser mantenidos durante 48 horas en condiciones normales y al cabo de ese tiempo y comprobándose por tacto el absceso producido se realiza la biodistribución.

BIODISTRIBUCION

La biodistribución se realiza a dos tiempos prefijados: 4 horas y 24 horas post inyección. Cada animal recibirá 100 microlitros de IgG-Tc^{99m} (50 μ Ci), lo que equivale a 10 μ g de IgG por vía endovenosa (vena caudal dilatada con xilol).

La dosis inyectada puede conocerse midiendo la jeringa antes y después de la inyección o preparando un estándar. Para ello, se lleva la dosis inyectada a un volumen fijo en un matraz aforado.

Transcurrido el tiempo preestablecido los animales son anestesiados con cloroformo, disectados, recolectándose en tubos prepesados: sangre hígado, bazo, riñones intestino, pulmón, pata inflamada, pata normal y cola.

Los tubos son pesados nuevamente y medidos en un contador gamma, junto con el estándar de la dosis. si fuera trabajado de esta manera, o tomando como el total de la dosis la actividad de los órganos y la carcaza.

CALCULO DE DOSIS INYECTADA DOSIS INYECTADA EFECTIVA Y % DE DOSIS/g. DE TEJIDO

Previo al cálculo de las distintas dosis se deben realizar los decaimientos de actividad correspondientes, según la fórmula:

$$A_t = A_0 e^{-\lambda t}$$

donde: λ es igual a : $-\ln 2/T$ (6.02 horas, período de semidesintegración del Tc^{99m})

t es el tiempo en horas de decaimiento transcurrido en todas las mediciones.

Dosis inyectada:
 cpm jeringa llena - cpm jeringa vacía

Dosis inyectada efectiva:
 cpm dosis inyectada - cpm cola

% dosis/g de tejido:

$$\frac{\text{cpm \acute{o}rgano}}{\text{cpm dosis inyectada efectiva} \times \text{peso \acute{o}rgano (g)}} \times 100$$

Con estos datos se construye la siguiente tabla:

Organo	Tubo lleno (gr.)	Tubo vacio (gr.)	Peso \acute{o}rgano (gr.)	Dosis efectiva (cpm)	Cpm \acute{o}rgano	Cpm / g \acute{o}rgano	% de dosis	% de dosis gr. de \acute{o}rgano	Pierna izq. / Pierna der.

8. RESULTADOS

Como se podrá apreciar en la sección de metodología, el propósito principal de este trabajo, consistió en la evaluación de la producción de kits de inmunoglobulina policlonal humana liofilizada, utilizando los principios de un método directo de marcación de anticuerpos. Además, para completar, el diseño del protocolo de producción de dichos kits, se trató de enfocar los aspectos de Control de Calidad que son aplicables en la evaluación de radiofármacos similares. Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

- **RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS PRUEBAS DE ESTERILIDAD Y ENDOTOXINAS BACTERIANAS DE LOS LOTES DE IgG-Tc^{99m} PRODUCIDOS:**

TABLA No.1

No. DE LOTE	ESTERILIDAD		ENDOTOXINAS BACTERIANAS	
	Especificación	Resultado	Especificación	Resultado
LOTE 1	Estéril	Cumple	*	< 0.03 UE / mL
LOTE 2	Estéril	Cumple	*	< 0.03 UE / mL
LOTE 3	Estéril	Cumple	*	< 0.03 UE / mL
LOTE 4	Estéril	Cumple	*	< 0.03 UE / mL
LOTE 5	Estéril	Cumple	*	< 0.03 UE / mL
LOTE 6	Estéril	Cumple	*	< 0.03 UE / mL
LOTE 7	Estéril	Cumple	*	< 0.03 UE / mL

* De acuerdo a las especificaciones descritas para la mayoría de los productos radiofarmacéuticos que aparecen en la USP, el límite del contenido de endotoxinas no debe ser mayor de 175 / V unidades USP / mL de solución inyectable, cuando se compara con la Endotoxina SR-USP, siendo V la dosis máxima total recomendada en mL a la fecha u hora de caducidad.

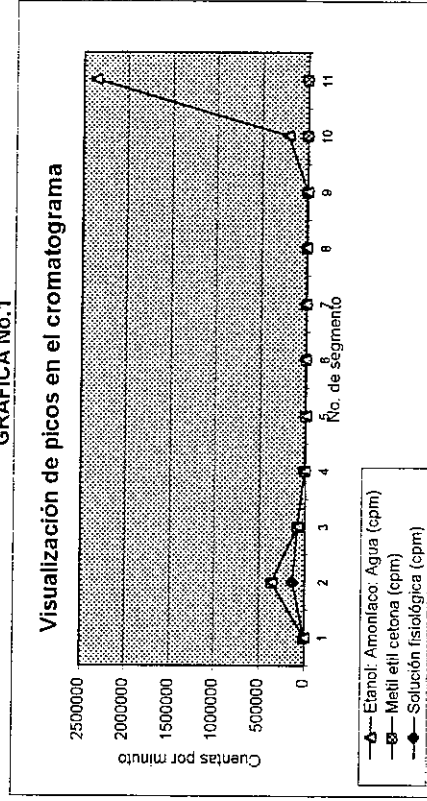
EVALUACION DE LA PUREZA RADIOQUIMICA (LOTE No. 1)

TABLA No.2

PRODUCTO: Ig-G-Tc^{99m}
 METODO: Cromatografía de capa fina instantánea
 EQUIPO DETECTOR: ORTEC
 No. DE LOTE: 01
 FECHA: 01 Febrero / 99

Segmento	Solución fisiológica (cpm)	Metil etil cetona (cpm)	Etanol: Amoniaco: Agua (cpm)
1	30176	228446	26
2	74660	209	49
3	5319	21	20
4	1985	111	192
5	1118	9	5444
6	651	18	3423
7	518	20	3976
8	303	18	1594
9	232	13	210568
10	128	11	2358481
Pico	212320	228655	2567049
Total	215270	228876	2581773
Porcentaje	98.6286%	99.9034%	99.4237%

GRAFICA No.1



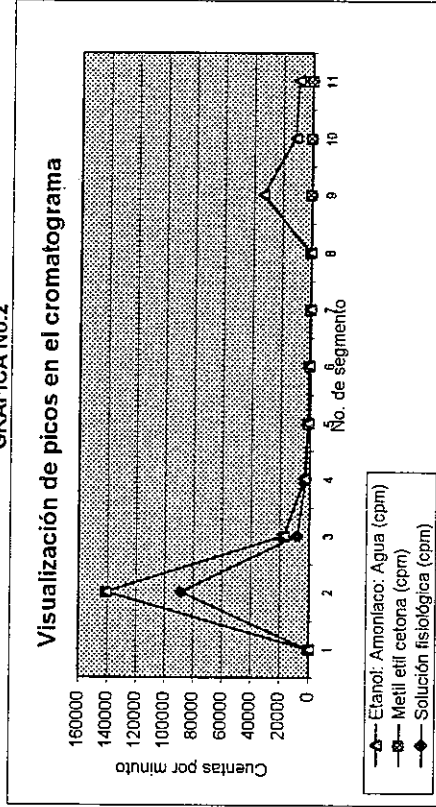
EVALUACION DE LA PUREZA RADIOQUIMICA (LOTE No. 2)

TABLA No. 3

PRODUCTO: IgG-Tc^{99m}
METODO: Cromatografía de capa fina instantánea
EQUIPO DETECTOR: ORTEC
No. DE LOTE: 02
FECHA: 09 Feb / 99

Segmento	Solución fisiológica (cpm)	Metil etil cetona (cpm)	Etanol: Amoniac: Agua (cpm)
1	88692	52142	41
2	8941	9187	110
3	2884	459	42
4	1378	51	37
5	979	44	51
6	351	30	76
7	400	21	58
8	310	24	33109
9	249	30	11250
10	163	29	9299
Pico	99507	61788	53658
Total	103337	62017	54073
Porcentaje:	96.2937%	99.6307%	99.2326%

GRAFICA No.2



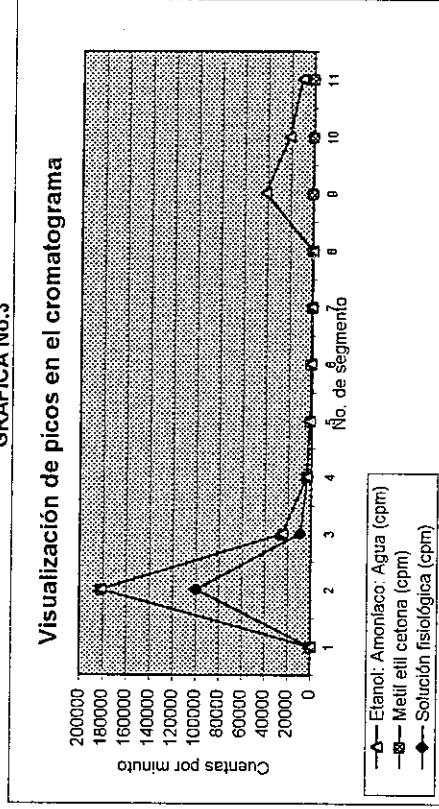
EVALUACION DE LA PUREZA RADIOQUIMICA (LOTE No. 3)

TABLA No. 4

PRODUCTO: IgG-Tc^{99m}
METODO: Cromatografía de capa fina instantánea
EQUIPO DETECTOR: ORTEC
No. DE LOTE: 03
FECHA: 09 febrero / 99

Segmento	Solución fisiológica (cpm)	Metil etil cetona (cpm)	Etanol: Amoniac: Agua (cpm)
1	99504	82201	85
2	9035	15623	41
3	3251	523	12
4	1564	32	48
5	897	56	45
6	203	52	85
7	102	32	65
8	301	45	41235
9	223	23	20850
10	163	21	10290
Pico	111790	98347	72336
Total	115243	98608	72717
Porcentaje	97.0037%	99.73537%	99.4761%

GRAFICA No.3



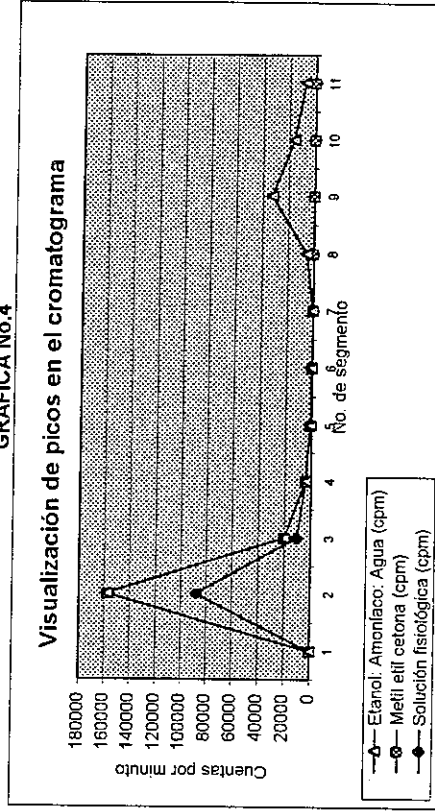
EVALUACION DE LA PUREZA RADIOQUIMICA (LOTE No. 4)

TABLA No.5

PRODUCTO: IgG-Tc^{99m}
METODO: Cromatografía de capa fina instantánea
EQUIPO DETECTOR: ORTEC
No. DE LOTE: 04
FECHA: 14 febrero / 99

Segmento	Solución fisiológica (cpm)	Metil etil cetona (cpm)	Etanol: Amoniaco: Agua (cpm)
1	67501	70125	106
2	10102	9856	78
3	3865	136	35
4	785	85	56
5	502	32	32
6	230	35	102
7	301	52	5230
8	102	26	32410
9	108	56	15662
10	89	45	7105
Pico	101468	80137	60347
Total	103585	80468	60756
Porcentaje	97.9563%	99.5687%	99.3268%

GRAFICA No.4



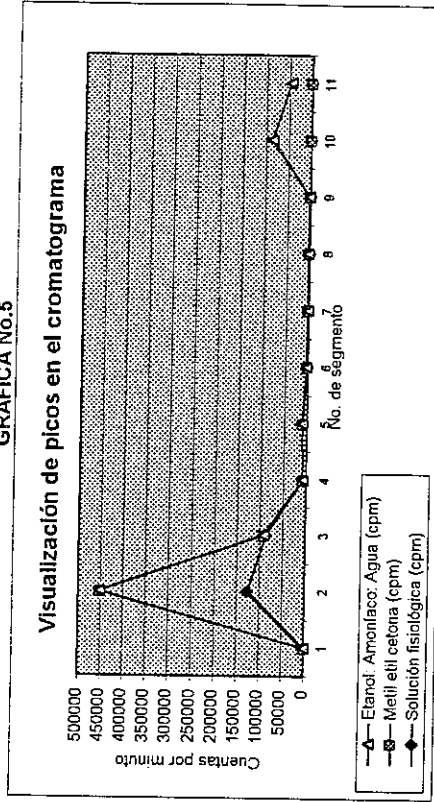
EVALUACION DE LA PUREZA RADIOQUIMICA (LOTE No. 5)

TABLA No.6

PRODUCTO: IgG-Tc^{99m}
METODO: Cromatografía de capa fina instantánea
EQUIPO DETECTOR: ORTEC
No. DE LOTE: 05
FECHA: 14 febrero / 99

Segmento	Solución fisiológica (cpm)	Metil etil cetona (cpm)	Etanol: Amoníaco: Agua (cpm)
1	125630	325621	18
2	85623	5023	15
3	6701	32	12
4	10321	65	152
5	2001	36	1300
6	852	15	1201
7	701	12	2365
8	102	14	1203
9	98	9	85401
10	85	12	45362
Pico total	228275	330644	130763
Porcentaje	232114	330639	137029
	98.3461%	95.9411%	95.4272%

GRAFICA No.5



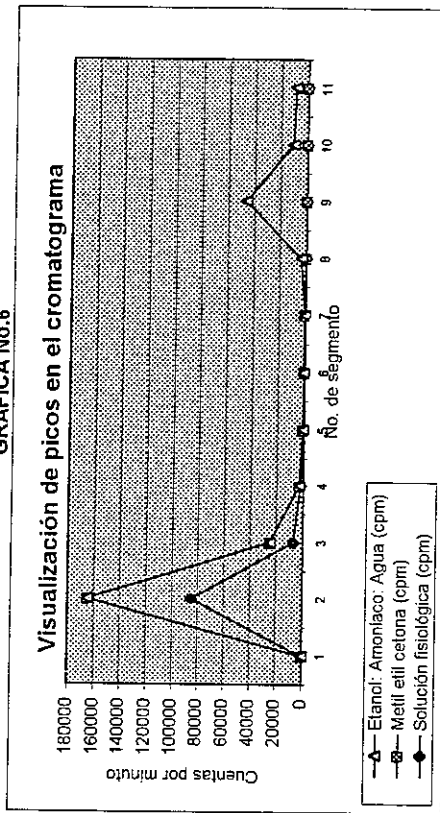
EVALUACION DE LA PUREZA RADIOQUIMICA (LOTE No. 6)

TABLA No.7

PRODUCTO: IgG-Tc^{99m}
 METODO: Cromatografía de capa fina instantánea
 EQUIPO DETECTOR: ORTEC
 No. DE LOTE: 06
 FECHA: 16 febrero / 99

Segmento	Solución fisiológica (cpm)	Metil etil cetona (cpm)	Etanol: Annoniaco: Agua (cpm)
1	84568	79936	35
2	7036	17685	89
3	1958	785	21
4	789	256	39
5	562	156	23
6	201	58	56
7	174	45	3589
8	165	68	45624
9	85	96	10385
10	86	12	8542
Pico	93580	98426	64531
Total	95642	99117	68383
Porcentaje:	97.8448%	99.3028%	94.3870%

GRAFICA No.6



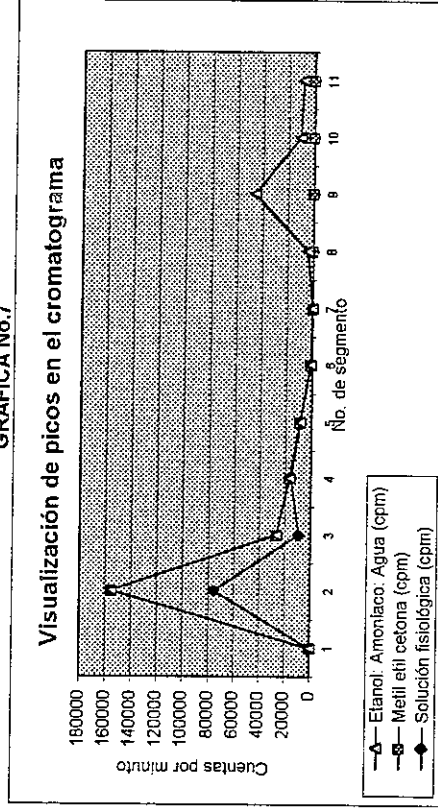
EVALUACION DE LA PUREZA RADIOQUIMICA (LOTE No. 7)

TABLA No. 8

PRODUCTO: IgG-Tc^{99m}
 METODO: Cromatografía de capa fina instantánea
 EQUIPO DETECTOR: ORTEC
 No. DE LOTE: 07
 FECHA: 17 febrero / 99

Segmento	Solución fisiológica (cpm)	Metil etil cetona (cpm)	Etanol: Amoniaco: Agua (cpm)
1	75452	79959	35
2	8901	17685	89
3	15566	786	21
4	8572	256	39
5	856	156	23
6	123	58	56
7	120	45	3589
8	112	68	46624
9	89	96	10865
10	74	12	8540
Pico	108491	98682	64531
Total	109865	99117	68383
Porcentaje	98.7494%	99.5614%	94.3670%

GRAFICA No.7



**ESTUDIO DE BIODISTRIBUCION IgG-Tc^{99m}
(GRUPO DE ENSAYO 4 HORAS POST-ADMINISTRACION)**

TABLA No. 9

Lote: 01
 Equipo detector: ORTEC
 Ratón: 01
 Tiempo de sacrificio: 4 horas
 Peso del ratón: 21.5 g

ORGANO	Tubo lleno (g)	Tubo vacío (g)	Peso órgano (g)	Dosis efectiva (cpm)	cpm órgano	cpm / g órgano	% de dosis	%dosis por g. de órgano	Pata izq / Pata der.
Cola	9.984	9.316	0.668		353214				
Sangre	9.233	8.562	0.671	885381	110854	165207	12.5205%	18.6594%	
Corazón	8.672	8.488	0.184	885381	10852	58978	1.2257%	6.6613%	
Pulmón	9.332	9.201	0.131	885381	8514	64992	0.9616%	7.3406%	
Hígado	10.663	8.97	1.693	885381	185412	109517	20.9415%	12.3695%	
Bazo	9.208	9.043	0.165	885381	25841	156612	2.9186%	17.6887%	
Estómago	9.91	9.041	0.869	885381	24569	28273	2.7750%	3.1933%	
Intestino	11.759	9.169	2.59	885381	40214	15527	4.5420%	1.7537%	
Intestino	10.459	9.053	1.406	885381	30054	21376	3.3945%	2.4143%	
Riñones	9.912	9.414	0.498	885381	130751	262552	14.7678%	29.6541%	
Orina	9.462	9.043	0.419	885381	72561	173177	8.1955%	19.5596%	
Pata derecha	10.227	9.364	0.863	885381	22136	25650	2.5002%	2.8971%	2.719385
Pata izquierda	10.34	9.185	1.155	885381	80564	69752	9.0994%	7.8782%	
Sumatoria de cuentas por minuto totales:					1095536		83.8421%		

Dosis inyectada (cpm)	1238595
Dosis efectiva (cpm)	885381

TABLA No. 10

Lote: 01
 Equipo detector: ORTEC
 Ratón: 02
 Tiempo de sacrificio: 4 horas
 Peso del ratón: 22.8 g

ORGANO	Tubo lleno (g)	Tubo vacío (g)	Peso órgano (g)	Dosis efectiva (cpm)	cpm órgano	cpm / g órgano	% de dosis	%dosis por g. de órgano	Pata izq / Pata der.
Cola	9.674	9.042	0.632		406214				
Sangre	9.427	8.955	0.472	907277	75628	160229	8.3357%	17.6604%	
Corazón	9.663	9.364	0.299	907277	15426	51592	1.7003%	5.6865%	
Pulmón	9.531	8.879	0.652	907277	51973	79713	5.7285%	8.7860%	
Hígado	10.165	9.366	0.799	907277	115093	144046	12.6855%	15.8768%	
Bazo	9.403	8.506	0.897	907277	105214	117295	11.5967%	12.9283%	
Estómago	9.4000	9.227	0.173	907277	12645	73092	1.3937%	8.0562%	
Intestino	11.543	9.353	2.19	907277	25014	11422	2.7570%	1.2589%	
Intestino	11.29	9.241	2.049	907277	28036	13683	3.0901%	1.5081%	
Riñones	9.668	9.03	0.638	907277	154752	242558	17.0568%	26.7347%	
Orina	9.852	9.234	0.618	907277	96874	156754	10.6774%	17.277%	
Pata derecha	10.096	9.309	0.787	907277	32514	41314	3.5837%	4.5536%	3.2126
Pata izquierda	10.011	9.404	0.607	907277	80564	132725	8.8798%	14.6289%	
Sumatoria de cuentas por minuto totales:					1199947		87.485%		

Dosis inyectada (cpm)	1313491
Dosis efectiva (cpm)	907277

ESTUDIO DE BIODISTRIBUCION IgG-Tc^{99m}
(GRUPO DE ENSAYO 4 HORAS POST-ADMINISTRACION)

TABLA No. 11

Lote: 01
Equipo detector: ORTEC
Ratón: 03
Tiempo de sacrificio: 4 horas
Peso del ratón: 20.9 g

ORGANO	Tubo lleno (g)	Tubo vacío (g)	Peso órgano (g)	Dosis efectiva (cpm)	cpm órgano	cpm / g órgano	% de dosis	%dosis por g. de órgano	Pata izq./ Pata der.
Cola	10.066	9.119	0.947		454102				
Sangre	9.295	8.618	0.677	728391	65984	97465	9.0589%	13.3809%	
Corazón	9.192	9.1	0.092	728391	5921	64359	0.8129%	8.8357%	
Pulmón	9.5	9.31	0.19	728391	12524	65916	1.7194%	9.0495%	
Hígado	10.69	9.27	1.42	728391	141258	99477	19.3932%	13.6572%	
Bazo	9.29	9.198	0.092	728391	15026	163326	2.0629%	22.4229%	
Estómago	9.181	8.488	0.693	728391	16747	24166	2.2992%	3.3177%	
Intestino	11.391	9.149	2.242	728391	25987	11591	3.5677%	1.5913%	
Intestino	10.03	8.563	1.467	728391	28365	19335	3.8942%	2.6545%	
Riñones	9.398	8.625	0.773	728391	161548	208988	22.1787%	28.6918%	
Orina	9.833	8.615	1.218	728391	95621	78507	13.1277%	10.7781%	
Pata derecha	9.265	8.97	0.295	728391	8082	27329	1.1068%	3.7519%	2.508664
Pata izquierda	9.409	9.035	0.374	728391	25641	68559	3.5202%	9.4124%	
Sumatoria de cuentas por minuto totales:						1056786		82.742%	

Dosis inyectada (cpm)	1182493
Dosis efectiva (cpm)	728391

TABLA No. 12

Lote: 01
Equipo detector: ORTEC
Ratón: 04
Tiempo de sacrificio: 4 horas
Peso del ratón: 21.2 g

ORGANO	Tubo lleno (g)	Tubo vacío (g)	Peso órgano (g)	Dosis efectiva (cpm)	cpm órgano	cpm / g órgano	% de dosis	%dosis por g. de órgano	Pata izq./ Pata der.
Cola	9.946	9.032	0.914		253565				
Sangre	9.404	8.702	0.702	928928	76561	109061	8.2419%	11.7405%	
Corazón	8.952	8.847	0.105	928928	12023	114505	1.2943%	12.3265%	
Pulmón	9.545	9.369	0.176	928928	12521	71142	1.3479%	7.6585%	
Hígado	10.368	9.112	1.256	928928	198562	158091	21.3754%	17.0186%	
Bazo	9.071	8.949	0.122	928928	20951	171730	2.2554%	18.4868%	
Estómago	9.786	9.277	0.509	928928	26923	52894	2.8983%	5.6941%	
Intestino	10.892	9.404	1.488	928928	45621	30659	4.9111%	3.3005%	
Intestino	10.394	9.057	1.337	928928	32514	24319	3.5002%	2.6179%	
Riñones	9.305	8.652	0.653	928928	166874	255550	17.9641%	27.5102%	
Orina	9.438	8.625	0.813	928928	92568	113860	9.9650%	12.2571%	
Pata derecha	9.597	9.219	0.378	928928	12658	33487	1.3626%	3.6049%	2.745771
Pata izquierda	9.492	9.039	0.453	928928	41652	91947	4.4839%	9.8982%	
Sumatoria de cuentas por minuto totales:						992993		79.600%	

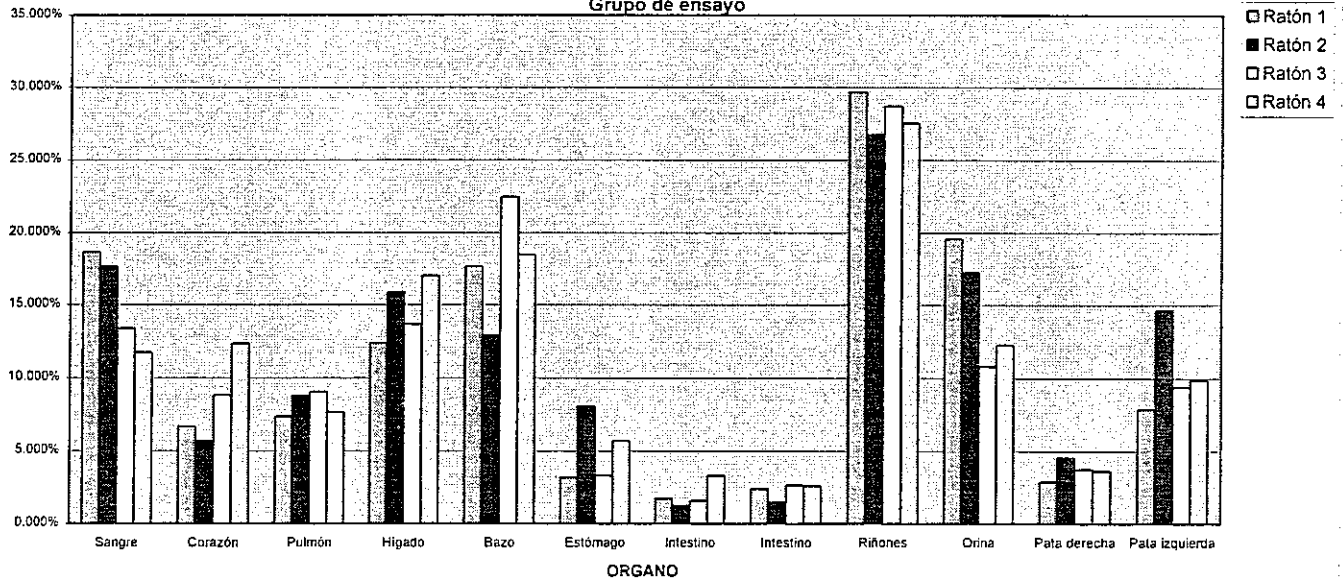
Dosis inyectada (cpm)	1182493
Dosis efectiva (cpm)	928928

**ESTUDIO DE BIODISTRIBUCION IgG-Tc^{99m}
(GRUPO DE ENSAYO 4 HORAS POST-ADMINISTRACION)**

TABLA No. 13

ORGANO	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Ratón 4	promedio	Desviación estándar
Sangre	18.659%	17.660%	13.381%	11.741%	15.360%	3.326%
Corazón	6.661%	5.686%	8.836%	12.327%	8.378%	2.943%
Pulmón	7.341%	8.786%	9.050%	7.659%	8.209%	0.836%
Hígado	12.369%	15.877%	13.657%	17.019%	14.731%	2.104%
Bazo	17.689%	12.928%	22.423%	18.487%	17.882%	3.897%
Estómago	3.193%	8.056%	3.318%	5.694%	5.065%	2.302%
Intestino	1.754%	1.259%	1.591%	3.301%	1.976%	0.907%
Intestino	2.414%	1.508%	2.655%	2.618%	2.299%	0.538%
Riñones	29.654%	26.735%	28.692%	27.510%	28.148%	1.287%
Orina	19.560%	17.277%	10.778%	12.257%	14.968%	4.136%
Pata derecha	2.897%	4.554%	3.752%	3.605%	3.702%	0.679%
Pata izquierda	7.878%	14.629%	9.412%	9.898%	10.454%	2.913%

**GRAFICA No.8
BIODISTRIBUCION LOTE No.1
IgG-Tc^{99m} 4 horas post-administración
Grupo de ensayo**



ESTUDIO DE BIODISTRIBUCION IgG-Tc^{99m}
(GRUPO CONTROL 4 HORAS POST-ADMINISTRACION)

TABLA No.14

Lote: 01
 Equipo detector: ORTEC
 Ratón: control
 Tiempo de sacrificio: 4 horas
 Peso del ratón: 19.8 g

ORGANO	Tubo lleno (g)	Tubo vacío (g)	Peso órgano (g)	Dosis efectiva (cpm)	cpm órgano	cpm / g órgano	% de dosis	%dosis por g. de órgano	Pata izq./ Pata der.
Cola	9.902	9.032	0.87		296512				
Sangre	9.3	8.502	0.798	962541	105485	132187	10.9590%	13.733%	
Corazón	9.241	9.023	0.218	962541	16651	76381	1.7299%	7.9353%	
Pulmón	9.375	9.048	0.327	962541	6525	19954	0.6779%	2.0731%	
Hígado	11.123	9.156	1.967	962541	198756	101045	20.6491%	10.4978%	
Bazo	8.923	8.825	0.098	962541	16520	168571	1.7163%	17.5132%	
Estómago	10.256	9.169	1.087	962541	41985	38625	4.3619%	4.0128%	
Intestino	11.802	9.053	2.749	962541	52698	19170	5.4749%	1.9916%	
Intestino	11.256	9.414	1.842	962541	25601	13898	2.6597%	1.4439%	
Riñones	9.423	9.043	0.38	962541	120956	318305	12.5663%	33.0693%	
Orina	9.736	9.152	0.584	962541	145499	249142	15.1161%	25.884%	
Pata derecha	10.59	8.142	2.448	962541	61254	25022	6.3638%	2.5996%	0.951257
Pata izquierda	10.99	8.156	2.834	962541	67456	23802	7.0081%	2.4729%	
Sumatoria de cuentas por minuto totales:						1155898		89.2831%	

Dosis inyectada (cpm)	1259053
Dosis efectiva (cpm)	962541

TABLA No.15

Lote: 01
 Equipo detector: ORTEC
 Ratón: control 2
 Tiempo de sacrificio: 4 horas
 Peso del ratón: 19.9 g

ORGANO	Tubo lleno (g)	Tubo vacío (g)	Peso órgano (g)	Dosis efectiva (cpm)	cpm órgano	cpm / g órgano	% de dosis	%dosis por g. de órgano	Pata izq./ Pata der.
Cola	9.902	9.032	0.87		287011				
Sangre	9.3	8.601	0.699	977871	100258	143431	10.2527%	14.668%	
Corazón	9.241	9.023	0.218	977871	15632	71706	1.5986%	7.3329%	
Pulmón	9.375	9.048	0.327	977871	6140	18777	0.6279%	1.9202%	
Hígado	11.123	9.156	1.967	977871	208956	106231	21.3685%	10.8635%	
Bazo	8.923	8.825	0.098	977871	15665	159847	1.6019%	16.3464%	
Estómago	10.125	9.169	0.956	977871	42698	44663	4.3664%	4.5674%	
Intestino	11.802	9.053	2.749	977871	49857	18136	5.0985%	1.8547%	
Intestino	11.256	9.414	1.842	977871	26542	14409	2.7143%	1.4735%	
Riñones	9.423	9.043	0.38	977871	121810	320553	12.4567%	32.7807%	
Orina	9.736	9.152	0.584	977871	146257	250440	14.9567%	25.611%	
Pata derecha	10.59	8.142	2.448	977871	6120	2500	0.6258%	0.2557%	0.973183
Pata izquierda	10.99	8.156	2.834	977871	6895	2433	0.7051%	0.2488%	
Sumatoria de cuentas por minuto totales:						1033841		76.3731%	

Dosis inyectada (cpm)	1264882
Dosis efectiva (cpm)	977871

ESTUDIO DE BIODISTRIBUCION IgG-Tc^{99m}
(GRUPO CONTROL 4 HORAS POST-ADMINISTRACION)

TABLA No.16

Lote: 01
Equipo detector: ORTEC
Ratón: control 3
Tiempo de sacrificio: 4 horas
Peso del ratón: 20.2 g

ORGANO	Tubo lleno (g)	Tubo vacío (g)	Peso órgano (g)	Dosis efectiva (cpm)	cpm órgano	cpm / g órgano	% de dosis	%dosis por g. de órgano	Pata izq./ Pata der.
Cola	9.902	9.032	0.87		356512				
Sangre	9.3	8.604	0.696	908597	99987	143659	11.0045%	15.811%	
Corazón	9.241	9.023	0.218	908597	12154	55752	1.3377%	6.1361%	
Pulmón	9.375	9.048	0.327	908597	6895	21086	0.7589%	2.3207%	
Hígado	11.123	9.156	1.967	908597	178952	90977	19.6954%	10.0129%	
Bazo	8.923	8.825	0.098	908597	12698	129571	1.3975%	14.2606%	
Estómago	10.256	9.169	1.087	908597	50264	46241	5.5320%	5.0893%	
Intestino	11.802	9.053	2.749	908597	52412	19066	5.7685%	2.0984%	
Intestino	11.256	9.414	1.842	908597	28951	15717	3.1863%	1.7298%	
Riñones	9.423	9.043	0.38	908597	122841	323266	13.5199%	35.5786%	
Orina	9.736	9.214	0.522	908597	147599	282757	16.2447%	31.120%	
Pata derecha	10.59	8.142	2.448	908597	32221	13162	3.5462%	1.4486%	0.949343
Pata izquierda	10.99	8.156	2.834	908597	35412	12495	3.8974%	1.3752%	
Sumatoria de cuentas por minuto totales:						1136898		85.8891%	

Dosis inyectada (cpm)	1265109
Dosis efectiva (cpm)	908597

TABLA No.17

Lote: 01
Equipo detector: ORTEC
Ratón: control 4
Tiempo de sacrificio: 4 horas
Peso del ratón: 20.4 g

ORGANO	Tubo lleno (g)	Tubo vacío (g)	Peso órgano (g)	Dosis efectiva (cpm)	cpm órgano	cpm / g órgano	% de dosis	%dosis por g. de órgano	Pata izq./ Pata der.
Cola	9.902	9.032	0.87		317452				
Sangre	9.3	8.506	0.794	959753	124879	157278	13.0116%	16.387%	
Corazón	9.241	9.023	0.218	959753	12584	57725	1.3112%	6.0145%	
Pulmón	9.375	9.048	0.327	959753	5896	18031	0.6143%	1.8787%	
Hígado	11.123	9.156	1.967	959753	199856	101604	20.8237%	10.5865%	
Bazo	8.923	8.825	0.098	959753	15213	155235	1.5851%	16.1744%	
Estómago	10.251	9.169	1.082	959753	45698	42235	4.7614%	4.4006%	
Intestino	11.802	9.053	2.749	959753	65698	23899	6.8453%	2.4901%	
Intestino	11.256	9.414	1.842	959753	27562	14963	2.8718%	1.5591%	
Riñones	9.423	9.043	0.38	959753	125647	330650	13.0916%	34.4516%	
Orina	9.736	9.152	0.584	959753	148751	254711	15.4989%	26.539%	
Pata derecha	10.59	8.142	2.448	959753	20254	8274	2.1103%	0.8621%	0.924912
Pata izquierda	10.99	8.156	2.834	959753	21687	7652	2.2596%	0.7973%	
Sumatoria de cuentas por minuto totales:						1131177		84.7848%	

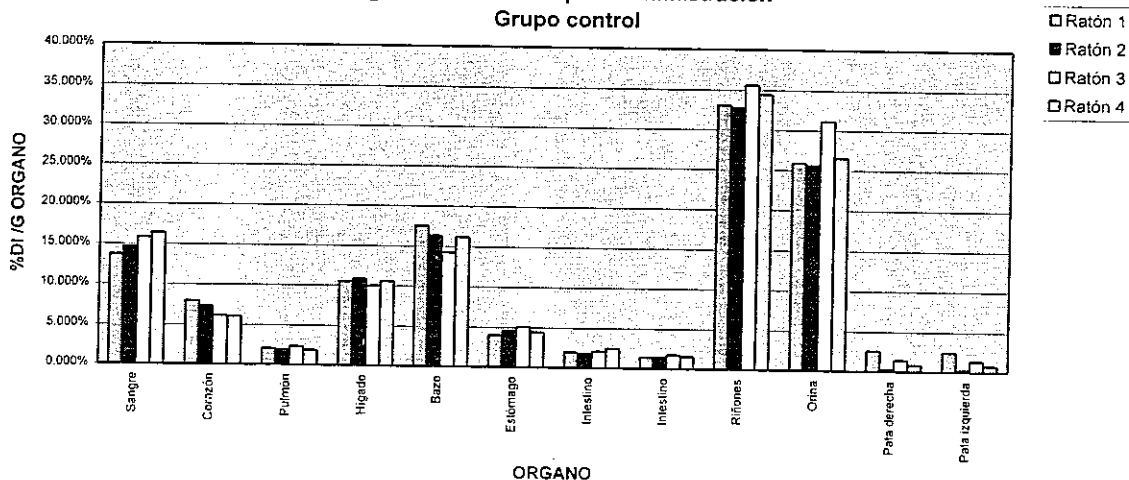
Dosis inyectada (cpm)	1277205
Dosis efectiva (cpm)	959753

**ESTUDIO DE BIODISTRIBUCION IgG-Tc^{99m}
(GRUPO CONTROL 4 HORAS POST-ADMINISTRACION)**

TABLA No.18

ORGANO	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Ratón 4	promedio	Desviación estándar
Sangre	13.733%	14.668%	15.811%	16.387%	15.150%	1.184%
Corazón	7.935%	7.333%	6.136%	6.015%	6.855%	0.934%
Pulmón	2.073%	1.920%	2.321%	1.879%	2.048%	0.200%
Hígado	10.498%	10.863%	10.013%	10.587%	10.490%	0.354%
Bazo	17.513%	16.346%	14.261%	16.174%	16.074%	1.347%
Estómago	4.013%	4.567%	5.089%	4.401%	4.518%	0.446%
Intestino	1.992%	1.855%	2.098%	2.490%	2.109%	0.273%
Intestino	1.444%	1.474%	1.730%	1.559%	1.552%	0.128%
Riñones	33.069%	32.781%	35.579%	34.452%	33.970%	1.297%
Orina	25.884%	25.611%	31.120%	26.539%	27.288%	2.584%
Pata derecha	2.600%	0.256%	1.449%	0.862%	1.291%	0.999%
Pata izquierda	2.473%	0.249%	1.375%	0.797%	1.224%	0.951%

**GRAFICA No. 9
BIODISTRIBUCION LOTE No.1
IgG-Tc^{99m} 4 horas post-administración
Grupo control**



ESTUDIO DE BIODISTRIBUCION IgG-Tc^{99m}
(GRUPO DE ENSAYO 24 HORAS POST-ADMINISTRACION)

TABLA No.19

Lote: 01
 Equipo detector: ORTEC
 Ratón: 01
 Tiempo de sacrificio: 24 horas
 Peso del ratón: 20.2 g

ORGANO	Tubo lleno (g)	Tubo vacío (g)	Peso órgano (g)	Dosis efectiva (cpm)	cpm órgano	cpm / g órgano	% de dosis	%dosis por g. de órgano	Pata izq./ Pata der.
Cola	10.084	9.485	0.599		3465				
Sangre	9.276	9.189	0.089	46585	385	4326	0.8264%	9.286%	
Corazón	9.271	9.141	0.13	46585	201	1546	0.4315%	3.3190%	
Pulmón	9.082	8.958	0.124	46585	112	903	0.2404%	1.9389%	
Hígado	10.522	9.152	1.37	46585	3002	2191	6.4441%	4.7037%	
Bazo	8.998	8.913	0.085	46585	384	4518	0.8243%	9.6976%	
Estómago	10.206	9.118	1.088	46585	3521	3236	7.5582%	6.9469%	
Intestino	11.203	9.071	2.132	46585	2524	1184	5.4181%	2.5413%	
Intestino	11.642	9.168	2.474	46585	3201	1294	6.8713%	2.7774%	
Riñones	9.766	8.812	0.954	46585	8254	8652	17.7181%	18.572%	
Orina	10.062	8.812	1.25	46585	4895	3916	10.5077%	8.406%	
Pata derecha	9.845	9.008	0.837	46585	615	735	1.3202%	1.5773%	3.412301
Pata izquierda	10.044	9.354	0.69	46585	1730	2507	3.7136%	5.3821%	
Sumatoria de cuentas por minuto totales:						32289		61.8740%	

Dosis inyectada (cpm)	50050
Dosis efectiva (cpm)	46585

TABLA No.20

Lote: 01
 Equipo detector: ORTEC
 Ratón: 02
 Tiempo de sacrificio: 24 horas
 Peso del ratón: 21.2 g

ORGANO	Tubo lleno (g)	Tubo vacío (g)	Peso órgano (g)	24339	cpm órgano	cpm / g órgano	% de dosis	%dosis por g. de órgano	Pata izq./ Pata der.
Cola	10.8	9.156	1.644		8521				
Sangre	8.917	8.858	0.059	43997	156	2644	0.3546%	6.0097%	
Corazón	9.407	9.295	0.112	43997	205	1830	0.4659%	4.1602%	
Pulmón	9.099	8.92	0.179	43997	225	1257	0.5114%	2.8570%	
Hígado	10.427	9.039	1.388	43997	4874	3512	11.0780%	7.9813%	
Bazo	9.323	9.229	0.094	43997	274	2915	0.6228%	6.6252%	
Estómago	9.956	9.189	0.767	43997	798	1040	1.8138%	2.3647%	
Intestino	10.756	9.125	1.631	43997	1857	1139	4.2207%	2.5878%	
Intestino	10.621	9.224	1.397	43997	1885	1349	4.2844%	3.0668%	
Riñones	9.546	8.199	1.347	43997	6562	4872	14.9147%	11.072%	
Orina	9.907	9.226	0.681	43997	3101	4554	7.0482%	10.350%	
Pata derecha	9.503	9.196	0.307	43997	405	1319	0.9205%	2.9984%	2.337243
Pata izquierda	9.48	9.12	0.36	43997	1110	3083	2.5229%	7.0081%	
Sumatoria de cuentas por minuto totales:						29973		48.7579%	

Dosis inyectada (cpm)	52518
Dosis efectiva (cpm)	43997

ESTUDIO DE BIODISTRIBUCION IgG-Tc^{99m}
(GRUPO DE ENSAYO 24 HORAS POST-ADMINISTRACION)

TABLA No.21

Lote: 01
Equipo detector: ORTEC
Ratón: 03
Tiempo de sacrificio: 24 horas
Peso del ratón: 21.2 g

ORGANO	Tubo lleno (g)	Tubo vacío (g)	Peso órgano (g)	Dosis efectiva (cpm)	cpm órgano	cpm / g órgano	% de dosis	%dosis por g. de órgano	Pata izq./ Pata der.
Cola	9.803	9.136	0.667		4526				
Sangre	9.531	9.376	0.155	47889	578	3729	1.2070%	7.7868%	
Corazón	9.381	9.25	0.131	47889	412	3145	0.8603%	6.5673%	
Pulmón	9.187	9.004	0.183	47889	200	1093	0.4176%	2.282%	
Hígado	10.946	9.459	1.487	47889	6595	4435	13.7714%	9.2612%	
Bazo	9.181	9.137	0.044	47889	156	3545	0.3258%	7.403%	
Estómago	9.96	9.042	0.918	47889	1358	1479	2.8357%	3.0890%	
Intestino	11.651	9.268	2.383	47889	2051	861	4.2828%	1.7972%	
Intestino	11.551	9.128	2.423	47889	2547	1051	5.3185%	2.1950%	
Riñones	9.684	9.012	0.672	47889	6254	9307	13.0594%	19.43%	
Orina	10.09	9.005	1.085	47889	5147	4744	10.7478%	9.906%	
Pata derecha	9.963	9.046	0.917	47889	704	768	1.4701%	1.6031%	2.532011
Pata izquierda	10.384	9.404	0.98	47889	1905	1944	3.9779%	4.0591%	
Sumatoria de cuentas por minuto totales:						32433		58.2743%	

Dosis inyectada (cpm)	52415
Dosis efectiva (cpm)	47889

TABLA No.22

Lote: 01
Equipo detector: ORTEC
Ratón: 04
Tiempo de sacrificio: 24 horas
Peso del ratón: 21.4 g

ORGANO	Tubo lleno (g)	Tubo vacío (g)	Peso órgano (g)	Dosis efectiva (cpm)	cpm órgano	cpm / g órgano	% de dosis	%dosis por g. de órgano	Pata izq./ Pata der.
Cola	9.674	9.042	0.632		5862				
Sangre	9.427	8.955	0.472	47121	886	1877	1.8803%	3.9836%	
Corazón	9.663	9.364	0.299	47121	396	1324	0.8404%	2.8107%	
Pulmón	9.531	8.879	0.652	47121	569	873	1.2075%	1.8520%	
Hígado	10.165	9.366	0.799	47121	2587	3238	5.4901%	6.8712%	
Bazo	9.403	9.12	0.283	47121	1025	3622	2.1753%	7.6864%	
Estómago	9.4	9.227	0.173	47121	584	3376	1.2394%	7.1639%	
Intestino	11.543	9.353	2.19	47121	2114	965	4.4863%	2.0485%	
Intestino	11.29	9.241	2.049	47121	2844	1388	6.0355%	2.9456%	
Riñones	9.668	9.03	0.638	47121	5896	9241	12.5125%	19.61%	
Orina	9.426	9.234	0.192	47121	1065	5547	2.2601%	11.772%	
Pata derecha	10.096	9.109	0.987	47121	888	900	1.8845%	1.9093%	3.849003
Pata izquierda	10.011	9.404	0.607	47121	2102	3463	4.4609%	7.3490%	
Sumatoria de cuentas por minuto totales:						26818		44.4727%	

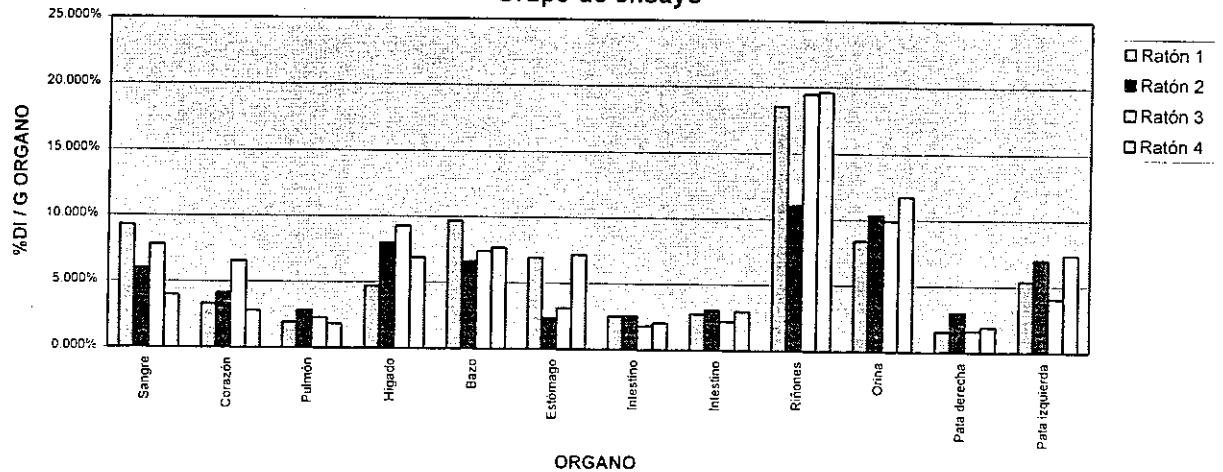
Dosis inyectada (cpm)	52963
Dosis efectiva (cpm)	47121

**ESTUDIO DE BIODISTRIBUCION IgG-Tc^{99m}
(GRUPO DE ENSAYO 24 HORAS POST-ADMINISTRACION)**

TABLA No.23

ORGANO	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Ratón 4	promedio	Desviación estándar
Sangre	9.286%	6.010%	7.787%	3.984%	6.767%	1.982%
Corazón	3.319%	4.160%	6.567%	2.811%	4.214%	1.441%
Pulmón	1.939%	2.857%	2.282%	1.852%	2.233%	0.395%
Hígado	4.704%	7.981%	9.261%	6.871%	7.204%	1.673%
Bazo	9.698%	6.625%	7.403%	7.686%	7.853%	1.134%
Estómago	6.947%	2.365%	3.089%	7.164%	4.891%	2.181%
Intestino	2.541%	2.588%	1.797%	2.049%	2.244%	0.333%
Intestino	2.777%	3.067%	2.195%	2.946%	2.746%	0.334%
Riñones	18.572%	11.072%	19.434%	19.612%	17.173%	3.544%
Orina	8.406%	10.350%	9.906%	11.772%	10.108%	1.200%
Pata derecha	1.577%	2.998%	1.603%	1.909%	2.022%	0.579%
Pata izquierda	5.382%	7.008%	4.059%	7.349%	5.950%	1.320%

**GRAFICA No.10
BIODISTRIBUCION LOTE No. 1
IgG-Tc^{99m} 24 horas post-administración
Grupo de ensayo**



ESTUDIO DE BIODISTRIBUCION IgG-Tc^{99m}
(GRUPO CONTROL 4 HORAS POST-ADMINISTRACION)

TABLA No.24

Lote: 01
 Equipo detector: ORTEC
 Ratón: control
 Tiempo de sacrificio: 24 horas
 Peso del ratón: 20.5 g

ORGANO	Tubo lleno (g)	Tubo vacío (g)	Peso órgano (g)	Dosis efectiva (cpm)	cpm órgano	cpm / g órgano	% de dosis	%dosis por g. de órgano	Pata izq./ Pata der.
Cola	9.856	9.032	0.824		13121				
Sangre	9.256	9.023	0.233	37664	875	3755	2.3232%	9.971%	
Corazón	9.31	9.023	0.287	37664	359	1251	0.9532%	3.3211%	
Pulmón	9.358	9.048	0.31	37664	356	1148	0.9452%	3.0490%	
Hígado	11.099	9.156	1.943	37664	4201	2162	11.1539%	5.7405%	
Bazo	8.926	8.825	0.101	37664	310	3069	0.8231%	8.1492%	
Estómago	10.245	9.169	1.076	37664	2217	2060	5.8863%	5.4705%	
Intestino	11.758	9.053	2.705	37664	3524	1303	9.3564%	3.4589%	
Intestino	11.195	9.414	1.781	37664	2524	1417	6.7014%	3.7627%	
Riñones	9.399	9.043	0.356	37664	2587	7267	6.8686%	19.294%	
Orina	9.815	9.152	0.663	37664	1569	2367	4.1658%	6.283%	
Pata derecha	10.62	8.142	2.478	37664	1895	765	5.0313%	2.0304%	1.060093
Pata izquierda	10.29	8.156	2.134	37664	1730	811	4.5932%	2.1524%	
Sumatoria de cuentas por minuto totales:					35268		58.8015%		

Dosis inyectada (cpm)	50785
Dosis efectiva (cpm)	37664

TABLA No.25

Lote: 01
 Equipo detector: ORTEC
 Ratón: control 2
 Tiempo de sacrificio: 24 horas
 Peso del ratón: 20.2 g

ORGANO	Tubo lleno (g)	Tubo vacío (g)	Peso órgano (g)	Dosis efectiva (cpm)	cpm órgano	cpm / g órgano	% de dosis	%dosis por g. de órgano	Pata izq./ Pata der.
Cola	9.856	9.032	0.824		12512				
Sangre	9.256	9.023	0.233	36530	758	3253	2.0750%	8.906%	
Corazón	9.31	9.023	0.287	36530	502	1749	1.3742%	4.7882%	
Pulmón	9.358	9.048	0.31	36530	278	897	0.7610%	2.4549%	
Hígado	11.099	9.156	1.943	36530	3985	2051	10.9088%	5.6144%	
Bazo	8.926	8.825	0.101	36530	289	2861	0.7911%	7.8330%	
Estómago	10.245	9.169	1.076	36530	1865	1733	5.1054%	4.7448%	
Intestino	11.758	9.053	2.705	36530	3245	1200	8.8831%	3.2840%	
Intestino	11.195	9.414	1.781	36530	1985	1115	5.4339%	3.0510%	
Riñones	9.399	9.043	0.356	36530	2254	6331	6.1703%	17.332%	
Orina	9.815	9.152	0.663	36530	1432	2160	3.9201%	5.913%	
Pata derecha	10.62	8.142	2.478	36530	1745	704	4.7769%	1.9277%	1.039423
Pata izquierda	10.29	8.156	2.134	36530	1562	732	4.2759%	2.0037%	
Sumatoria de cuentas por minuto totales:					32412		54.4758%		

Dosis inyectada (cpm)	49042
Dosis efectiva (cpm)	36530

ESTUDIO DE BIODISTRIBUCION IgG-Tc^{99m}
(GRUPO CONTROL 24 HORAS POST-ADMINISTRACION)

TABLA No.26

Lote: 01
Equipo detector: ORTEC
Ratón: control 3
Tiempo de sacrificio: 24 horas
Peso del ratón: 20.1 g

ORGANO	Tubo lleno (g)	Tubo vacío (g)	Peso órgano (g)	Dosis efectiva (cpm)	cpm órgano	cpm / g órgano	% de dosis	%dosis por g. de órgano	Pata izq./ Pata der.
Cola	9.856	9.032	0.824		15123				
Sangre	9.256	9.023	0.233	33601	710	3047	2.1130%	9.069%	
Corazón	9.31	9.023	0.287	33601	236	822	0.7024%	2.4472%	
Pulmón	9.358	9.048	0.31	33601	256	826	0.7619%	2.4577%	
Hígado	11.099	9.156	1.943	33601	3258	1677	9.6961%	4.9903%	
Bazo	8.926	8.825	0.101	33601	301	2980	0.8958%	8.8694%	
Estómago	10.245	9.169	1.076	33601	2154	2002	6.4105%	5.9577%	
Intestino	11.758	9.053	2.705	33601	3256	1204	9.6902%	3.5823%	
Intestino	11.195	9.414	1.781	33601	2458	1380	7.3153%	4.1074%	
Riñones	9.399	9.043	0.356	33601	1985	5576	5.9076%	16.594%	
Orina	9.815	9.152	0.663	33601	1456	2196	4.3332%	6.536%	
Pata derecha	10.62	8.142	2.478	33601	1562	630	4.6487%	1.8760%	0.933717
Pata izquierda	10.29	8.156	2.134	33601	1256	589	3.7380%	1.7516%	
Sumatoria de cuentas por minuto totales:					34011		56.2126%		

Dosis inyectada (cpm)	48724
Dosis efectiva (cpm)	33601

TABLA No.27

Lote: 01
Equipo detector: ORTEC
Ratón: control 4
Tiempo de sacrificio: 24 horas
Peso del ratón: 20.5 g

ORGANO	Tubo lleno (g)	Tubo vacío (g)	Peso órgano (g)	Dosis efectiva (cpm)	cpm órgano	cpm / g órgano	% de dosis	%dosis por g. de órgano	Pata izq./ Pata der.
Cola	9.856	9.032	0.824		13627				
Sangre	9.256	9.023	0.233	37794	658	2824	1.7410%	7.472%	
Corazón	9.31	9.023	0.287	37794	456	1589	1.2065%	4.2040%	
Pulmón	9.358	9.048	0.31	37794	259	835	0.6853%	2.2106%	
Hígado	11.099	9.156	1.943	37794	3895	2005	10.3059%	5.3041%	
Bazo	8.926	8.825	0.101	37794	305	3020	0.8070%	7.9902%	
Estómago	10.245	9.169	1.076	37794	1725	1603	4.5642%	4.2418%	
Intestino	11.758	9.053	2.705	37794	3156	1167	8.3505%	3.0871%	
Intestino	11.195	9.414	1.781	37794	1765	991	4.6701%	2.6222%	
Riñones	9.399	9.043	0.356	37794	2187	6143	5.7866%	16.255%	
Orina	9.815	9.152	0.663	37794	1332	2009	3.5244%	5.316%	
Pata derecha	10.62	8.142	2.478	37794	1296	523	3.4291%	1.3838%	1.216751
Pata izquierda	10.29	8.156	2.134	37794	1358	636	3.5932%	1.6838%	
Sumatoria de cuentas por minuto totales:					32019		48.6638%		

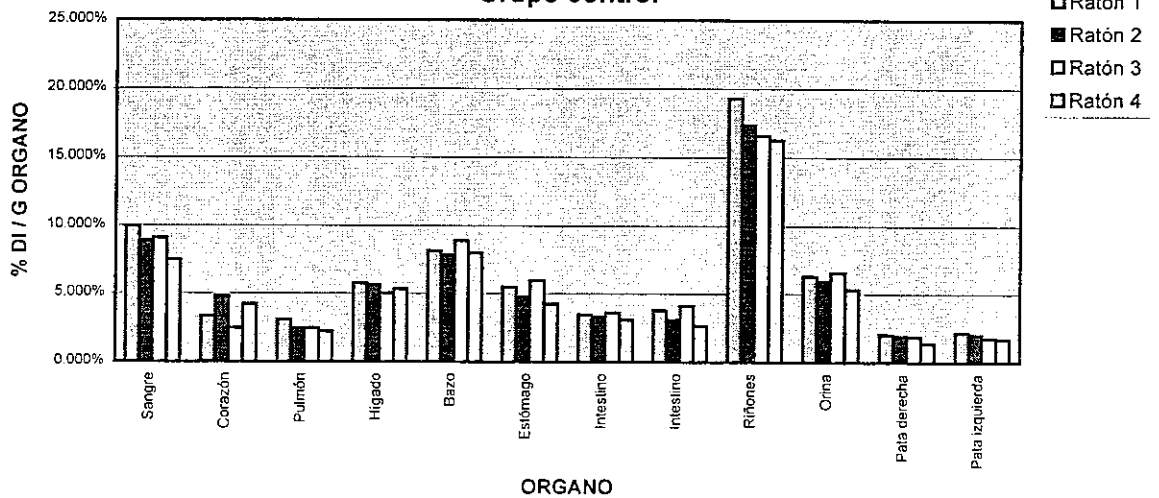
Dosis inyectada (cpm)	51421
Dosis efectiva (cpm)	37794

**ESTUDIO DE BIODISTRIBUCION IgG-Tc^{99m}
(GRUPO CONTROL 24 HORAS POST-ADMINISTRACION)**

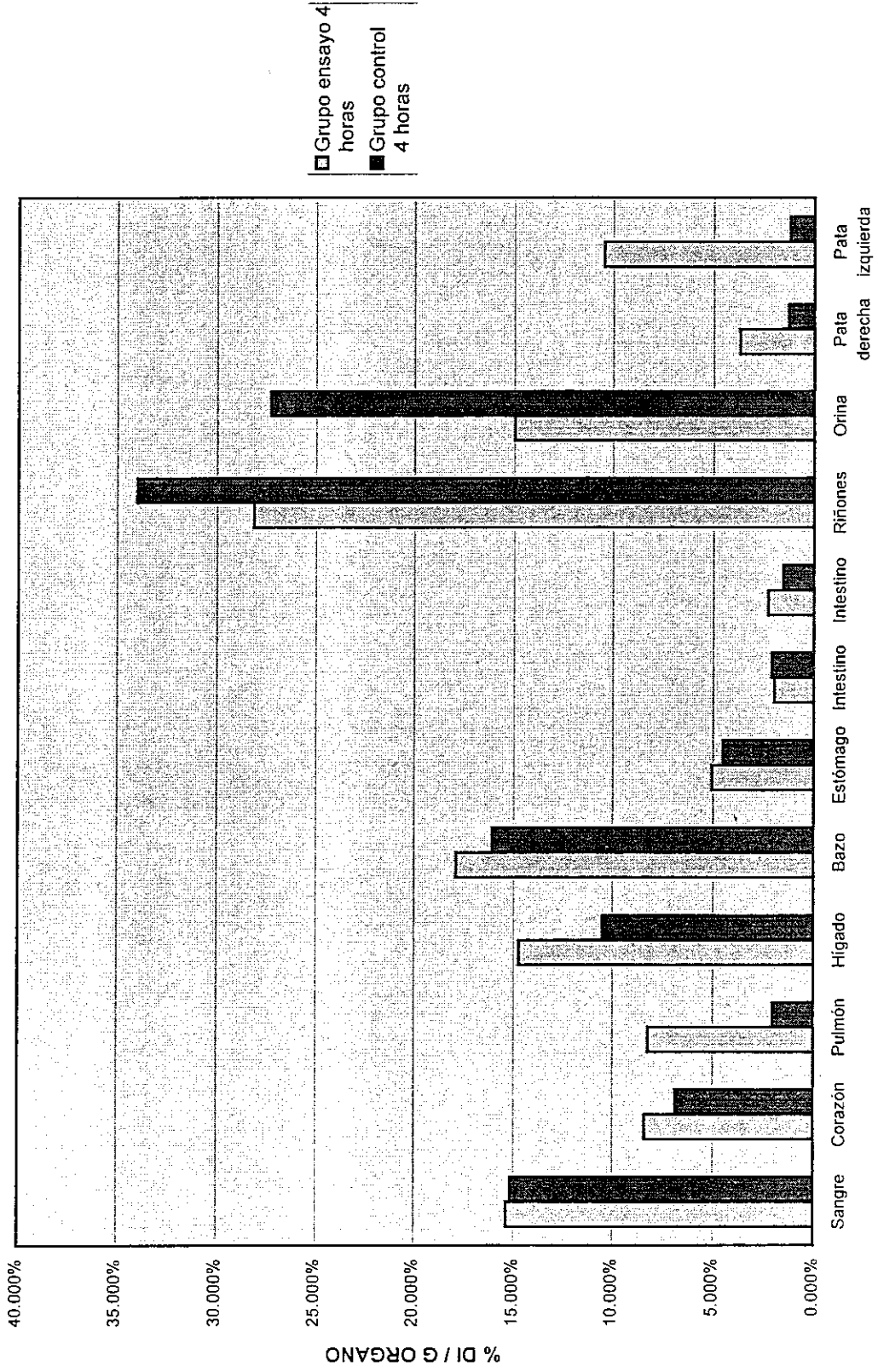
TABLA No. 28

ORGANO	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Ratón 4	promedio	Desviación estándar
Sangre	9.971%	8.906%	9.069%	7.472%	8.854%	1.034%
Corazón	3.321%	4.788%	2.447%	4.204%	3.690%	1.025%
Pulmón	3.049%	2.455%	2.458%	2.211%	2.543%	0.357%
Hígado	5.741%	5.614%	4.990%	5.304%	5.412%	0.336%
Bazo	8.149%	7.833%	8.869%	7.990%	8.210%	0.458%
Estómago	5.470%	4.745%	5.958%	4.242%	5.104%	0.761%
Intestino	3.459%	3.284%	3.582%	3.087%	3.353%	0.215%
Intestino	3.763%	3.051%	4.107%	2.622%	3.386%	0.673%
Riñones	19.294%	17.332%	16.594%	16.255%	17.369%	1.360%
Orina	6.283%	5.913%	6.536%	5.316%	6.012%	0.530%
Pata derecha	2.030%	1.928%	1.876%	1.384%	1.804%	0.288%
Pata izquierda	2.152%	2.004%	1.752%	1.684%	1.898%	0.218%

**GRAFICA No. 11
BIODISTRIBUCION LOTE No.1
IgG-Tc^{99m} 24 horas post-administración
Grupo control**

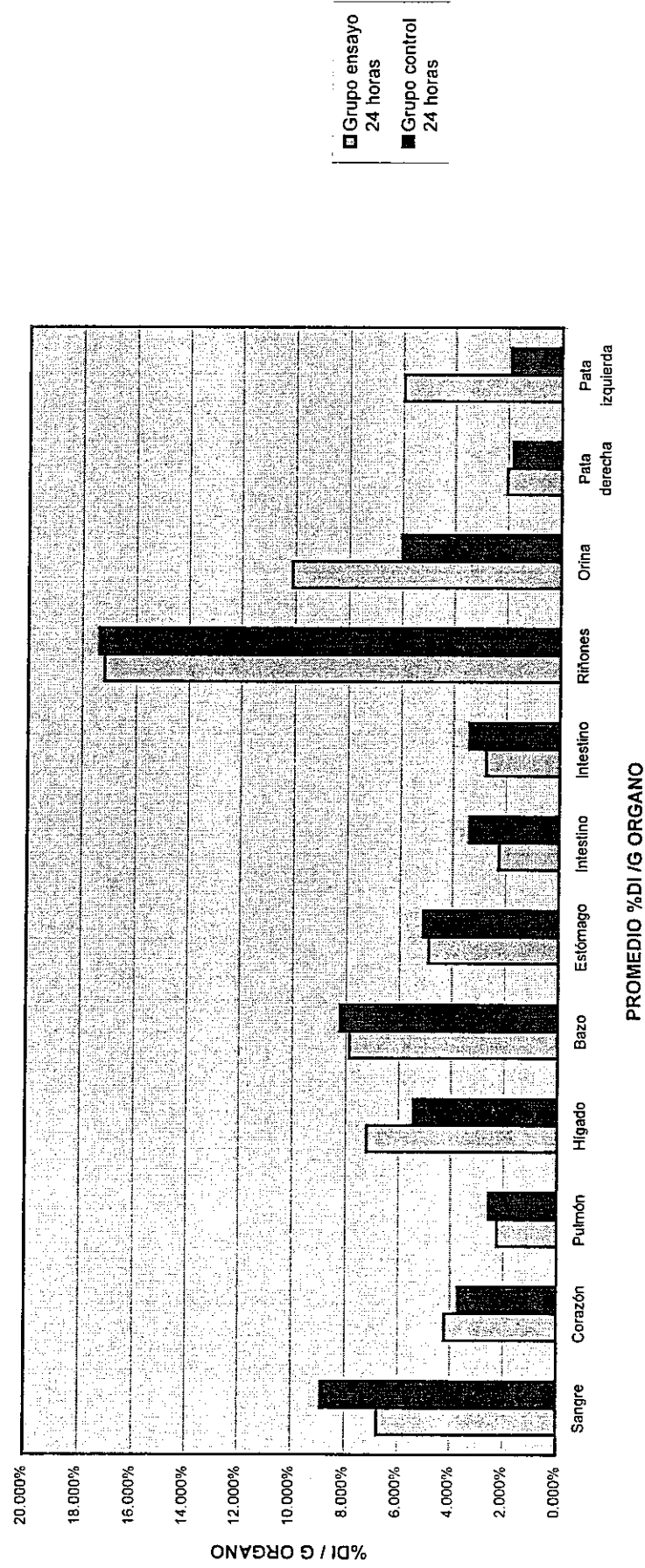


GRAFICA No.12
 COMPARACION DEL GRUPO CONTROL Y GRUPO DE ENSAYO
 IgG-Tc99m 4 horas post-administración



PROMEDIO %DI / G ORGANO

GRAFICA No.13
COMPARACION DEL GRUPO DE ENSAYO Y EL GRUPO CONTROL
IgG-Tc99m 24 horas post-administración



9. DISCUSION DE RESULTADOS

Desde hace varios años se ha comprobado que la IgG marcada con ^{111}In es un agente adecuado para obtener imágenes de abscesos, y que al igual que el citrato de Galio ésta se acumula en los tumores. También se ha estudiado la posibilidad de marcar IgG con $\text{Tc}^{99\text{m}}$ para conseguir mejorar de esta manera, la visualización de imágenes, ya que se puede dar mayores dosis debido a las excelentes propiedades físicas del $\text{Tc}^{99\text{m}}$, a su disponibilidad y bajo costo (32).

El objetivo de este trabajo fue la evaluación de la producción de kits de inmunoglobulina policlonal humana para marcar con $\text{Tc}^{99\text{m}}$. En la producción de los kits, se utilizó los principios básicos de marcación de anticuerpos según un método directo que consistió en reducir los puentes disulfuro de la proteína con 2-mercaptoetanol, utilizando luego metilendifosfonato (MDP) como ligando de transferencia de acuerdo a la técnica que se explica en la sección de metodología.

El trabajo presentado se enfocó primordialmente hacia la parte del control de calidad y producción de los kits, por lo que se hizo necesario complementar los resultados de la evaluación con una breve mención de los principios fundamentales en los que se basa la radiofarmacia, y lograr comprender de mejor manera, la importancia de verificar tanto los aspectos de control de calidad como de manufactura, en la obtención de este tipo de productos. Esta información se presenta en la sección de anexos.

En general, se describe que el criterio desarrollado para un nuevo radiofármaco de imágenes inflamatorias / infecciosas en los años 90 es aquel que cumple con los principios de fácil preparación radiofarmacéutica, amplia disponibilidad y bajo costo para ambos, radionucleido y fármaco, así como baja toxicidad y ausencia de respuesta inmune, una acumulación fisiológica poco significativa en sangre, hígado, bazo, tracto gastrointestinal, hueso, médula, riñones o músculo, rápido lavado del fondo y del blanco, rápida detección de focos infecciosos y alta especificidad en detección de otras causas de inflamación. Ante esto, puede decirse que pese a que el radiofármaco bajo evaluación sí cumple con algunos de estos criterios, puede observarse en los resultados obtenidos en el estudio de biodistribución de la IgG- $\text{Tc}^{99\text{m}}$, (según se presenta en las tablas 9 – 18 y gráficas 8 y 9) que existe una elevada acumulación del radiofármaco en sangre hígado, bazo y riñones tanto en el grupo de ensayo, como en el grupo control, y que ésta permanece elevada en relación a otros órganos, aún después de 24 horas post-administración (véase tablas 19 – 28 y gráficas 10 y 11), por lo que puede deducirse que este radiofármaco no resultaría muy útil o adecuado para la detección de focos infecciosos en la región abdominal, lo cual también es un criterio sugerido por varios autores anteriormente. Sin embargo, no debe desecharse la posibilidad de la utilización de éste radiofármaco, sino hasta haber evaluado mejor su comportamiento en estudios clínicos, y haberlo comparado con otros radiofármacos considerados como estándares en el campo de la medicina nuclear para la detección de focos de inflamación / infección. La alternativa de marcar la IgG con $\text{Tc}^{99\text{m}}$ es de por sí un esfuerzo realizado para conseguir mejorar las características del radiofármaco, que como se mencionara anteriormente, también ha sido producido mediante el uso de In^{111} como radioisótopo de

opción. Debe mencionarse también, que la marcación de anticuerpos, es también una alternativa ideada con el afán de facilitar el trabajo de la localización de imágenes mediante el uso de células sanguíneas leucocitarias que presentan la desventaja de una preparación que requiere de más tiempo y del trabajo de un técnico especializado. Se considera que es adecuado proseguir con las investigaciones para mejorar las características del radiofármaco, mediante la variación de factores tales como el radioisótopo, (caso ya mencionado), o la utilización de otros métodos de producción que empleen diferentes agentes reductores, agentes quelantes u otra vía de producción, ya que no debe olvidarse, que las técnicas de marcaje de anticuerpos desarrolladas exitosamente, podrían resultar de gran importancia en el futuro, puesto que los principios que se aplican en la marcación de anticuerpos en general, pueden ser empleados en la producción de kits de inmunoglobulinas monoclonales específicas, que con los avances de la ciencia son descubiertas más rápidamente cada día, y que podrían servir para la localización, detección o radioterapia de tumores específicos de un tipo de cáncer dado, o de alguna patología específica (20).

Según los resultados presentados en las gráficas 12 y 13, la acumulación del radiofármaco en la pata infectada, fue siempre mayor que en la pata normal en los ratones a los que previamente se les había generado inflamación mediante la inyección de aceite de trementina, mientras que no se encontró este fenómeno en los ratones control, en los cuales la acumulación del radiofármaco fue similar para ambos miembros (no infectados), lo que demuestra la especificidad del radiofármaco en la detección de un foco infeccioso. La elevada acumulación de la IgG- Tc^{99m} , en la pata infectada, comparada con la pata normal, se pudo apreciar desde las primeras cuatro horas post-administración, y esta situación persistió aún después de 24 horas, (ver tablas 13 y 23 y gráficos 8, 10, 12 y 13). Este hallazgo sugiere que normalmente, la visualización de un foco infeccioso sería posible aún después de 24 horas, pero que se podría aprovechar la ventaja de que la visualización del foco infeccioso es posible tempranamente desde las cuatro horas posteriores a la administración del radiofármaco (gráfica 12). Debido a que la acumulación del radiofármaco no es tan elevada en músculo y hueso, comparada con los órganos de la región abdominal, quizá podría emplearse para la visualización de imágenes en regiones corporales como miembros inferiores en humanos.

En cuanto a las características de pureza radioquímica que se presentan en las tablas 2 - 8 y gráficas 1 - 7 de acuerdo a los números de lote, y los datos de esterilidad y endotoxinas bacterianas que se muestran en la tabla No. 1, puede notarse que los kits producidos, si cumplen con los parámetros de calidad que se deseaba obtener al inicio del estudio. Se consiguió alcanzar una pureza radioquímica mayor del 85%, en los siete lotes producidos, (aunque generalmente se acepta que la mayoría de radiofármacos no deben contener una cantidad mayor del 2% de contaminantes radioquímicos). Según los test de esterilidad realizados, los kits producidos sí cumplen con la condición de esterilidad que se exige para una solución inyectable. En cuanto a la prueba de endotoxinas bacterianas, se encontró que todos los lotes contenían una cantidad de unidades USP / mL menor de 0.03 UE / mL, pero como este producto aún no figura dentro de ninguna de las farmacopeas revisadas, no se encontró un límite de endotoxinas

bacterianas para el producto, por lo que se tomó el valor que se le asigna generalmente a la mayoría de radiofármacos, según la USP XXIII. Sin embargo, tendría que efectuarse un estudio para determinar la dosis máxima total recomendada, en mL a la fecha u hora de caducidad para poder evaluar cuál sería el valor aplicable a este producto. Según el estudio de biodistribución, se comprueba la posibilidad de la utilización de este radiofármaco para la localización de sitios de inflamación / infección, ya que como puede notarse, se obtuvo una relación pata infectada : pata normal mayor de 1 en todos los casos de ensayo.

No existe un criterio claro que explique el mecanismo de detección de los focos de infección / inflamación de la inmunoglobulina policlonal humana marcada con Tc^{99m} , lo cual podría ser un factor que si bien no ayudara a mejorar las propiedades del radiofármaco mencionado, quizá serviría para diseñar otros radiofármacos que cumplieran de mejor manera con los requisitos y especificaciones que se han fijado como características del radiofármaco ideal.

10. CONCLUSIONES

- 10.1 Mediante la aplicación del método de marcaje descrito en los protocolos de metodología de este estudio, se consiguió obtener porcentajes de pureza radioquímica mayores de 85%.
- 10.2 La acumulación del radiofármaco en órganos tales como hígado, bazo y riñones podrían dificultar la visualización de imágenes en la región abdominal.
- 10.3 Las técnicas de marcaje de anticuerpos desarrolladas exitosamente, podrían ser útiles para su aplicación en anticuerpos monoclonales (específicos) en el futuro.
- 10.4 El radiofármaco bajo estudio, sí cumple con algunos de los parámetros de calidad especificados para el radiofármaco de diagnóstico ideal en los años 90, tales como principios de fácil preparación radiofarmacéutica, amplia disponibilidad y bajo costo para ambos, radionucleido y fármaco, baja toxicidad y ausencia de respuesta inmune así como rápido lavado del fondo y del blanco.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Como una reflexión ante el trabajo efectuado, puede decirse que en la actualidad en nuestro país, la rama de la radiofarmacia es un terreno poco conocido por los estudiantes recién egresados de la carrera de Química Farmacéutica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, puesto que este tema, no constituye una parte importante dentro del pensum de estudios de la carrera; sin embargo, podría tratarse que en el futuro se relacionara a los estudiantes de la carrera con las instituciones nacionales que se dedican a la producción y uso de éstos productos, ya que esta área también es un campo que le concierne al Químico Farmacéutico.
- 11.2 La radiofarmacia constituye un campo específico que merece ser investigado, y cuyo desarrollo en nuestro país se encuentra en las manos de las instituciones que manejan dicha tecnología, por lo que sería adecuado aprovechar la enseñanza que otras instituciones internacionales pudieran aportar para desarrollarnos en esta rama.
- 11.3 Sería conveniente evaluar la posibilidad de verificación de la pureza radioquímica del producto mediante el empleo de una técnica de Cromatografía líquida de alta resolución, ya que aunque el empleo de cromatografía de capa fina instantánea, provee datos bastante precisos, la cromatografía líquida de alta resolución, puede proveer información más precisa y adecuada en cuanto a las impurezas o características del radiofármaco.

12. BIBLIOGRAFIA

- 12.1 Serafini AN, From Monoclonal Antibodies to Peptides and Molecular Recognition Units: An Overview. *J Nucl Med.* 1993;34:533-536.
- 12.2 Himmelweit B, The Collected Papers of Paul Erlich. Oxford; Pergamon Press, 1975.
- 12.3 Pressman D, Korngold L, The in Vivo localization of Anti-Wagner-Osteogenic-Sarcoma Antibodies. *Cancer.* 1953; 6: 7619.
- 12.4 Goldenberg DM, Deland F, Kim E, et al. Use of Radiolabelled Antibodies to CEA for the Detection and Localization of Diverse Cancers by External Photoscanning. *New Engl J Med.* 1978; 298: 1384.
- 12.5 Thakur ML, et al. Indium-111-Labelled Autologus Leukocytes in man. *J Nucl Med.* 1977; 18:1012-1019.
- 12.6 Fischman AJ, Keech F, Bailai-Kovach M, et al., Detection of Focal Inflammation in Humans with Non-specific polyclonal IgG. *J Nucl Med.* 1987; 28:614.
- 12.7 Koppel GA, Recent Advances with Monoclonal Antibody Drug Targeting for the Treatment of Human Cancer. *Bioconj Chem.* 1990; 1:13-23.
- 12.8 United States Pharmacopoeial Convention. Inc., United States Pharmacopeia, XXIII Edition.
- 12.9 Crown Copyright, British Pharmacopoeia of 1993.
- 12.10 The European Pharmacopoeia 1990.
- 12.11 Farrington KJ, The Quality Control of Tc^{99m}, Radiopharmaceuticals produced at AAEC, Research Establishment Report, AAEC/M103, 1983.
- 12.12 Kristensen K, Preparation and Control of Radiopharmaceuticals in Hospitals, Technical Reports Series No. 194 IAEA, Viena, 1979.
- 12.13 Russel CD, Quantity of Tin in Bone Imaging Agents, *J Nucl Med.* 1978;19:1272.
- 12.14 Subramanian G, ^{99m}Tc-labelled Radiodiagnostic Agents a Compillation of Current Procedures, Upstate Medical Centre, Syracuse, New York, 1989.

- 12.15 Rubin RH, Young Ls, Hansen WP, et al. Specific and Non-specific Imaging of Localized Fisher immunotype 1 *Pseudomonas aeruginosa* Infection with radiolabeled monoclonal antibody. *J Nucl Med.* 1988; 29:651-656.
- 12.16 Vorne M, Karhunen K, Lantto T, et al. Comparison of ^{123}I Monoclonal Granulocyte Antibody and $\text{Tc}^{99\text{m}}$ -HMPAO-labeled Leucocytes in the Detection of Inflammation. *Nucl Med Comm.* 1988; 9:623-629.
- 12.17 Breedveld FC, Van Kroonenburgh MJPG, Camps JAJ, et al. Imaging of inflammatory arthritis with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled IgG. *J Nucl Med.* 1989;30:2017-2021.
- 12.18 Rubin RH, Fischman AJ, Needleman M, et al. Radiolabeled Nonspecific, Polyclonal Human Immunoglobulin in the Selection of Focal Inflammation by Scintintigraphy: Comparisson with Gallium-67-Citrate and Technecium-99m-labeled albumin. *J Nucl Med.* 1989;30:385-389.
- 12.19 Blok D, Ogtrop M, Van Arndt JW, et al. Detection of Inflammatory Lesions with Radiolabeled Immunoglobulins. *Eur J Nucl Med.* 1990;16:303-305.
- 12.20 Fischman AJ, Rubin RH, Khaw BA, et al. Radionuclide Imaging of Experimental Atherosclerosis with Nonspecific Polyclonal Immunoglobulin G. *J Nucl Med.* 1989;30:1095-1100.
- 12.21 Calame W, Van der Waals R, Mattie H, Van Furth R, Influence of etoposide and Cyclofosfamide on the Efficacy of Cloxacillin and Erythromycin in an Experimental Staphylococcal Infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33:980-982.
- 12.22 Oyen WJG, Claessens RAMJ, Van der Meer JWM, Corstens FHM, Biodistribution and Kinetics of Radiolabeled Proteins in Rats with Focal Infection. *J Nucl Med.* 1992;33:388-393.
- 12.23 Frier M, Hasslewood SR, Quality Assurance of Radiopharmaceuticals: A Guide to hospital Practice, Special Issue of Nuclear Medicine Communications, Chapman & Hall, 1980.
- 12.24 Rhodes BA, Direct Labeling of Proteins with Technetium-99m. *J Nucl Med.* 1991;32:667-676.
- 12.25 Fritzberg AE, Abrams PG, Beaumier LP, et al. Specific and Stable Labeling of Antibodies with Technetium-99m with Diamide Dithiolate Chelating Agent. *Proc Natl Acad Sci.* 1988; 85:4025-4029.
- 12.26 Paik CH, Phan LN, Hong JJ, et al. The Labeling of High Affinity Sites of Antibodies with $\text{Tc-}99\text{m}$. *Int J Nucl Med Biol.* 1985;12:3-8.

- 12.27 Mather SJ, Ellison D, Reduction Mediated Technecium-99m Labeling of Monoclonal Antibodies. J Nucl Med. 1990; 31:629.
- 12.28 Limulus Amebocyte Lisate Pyrogen Test U.S. Licence No. 709 Cat. No. N283, N284, N288.
- 12.29 Drug Information 94. American Hospital Formulary Service, U. S. A., 1994.
- 12.30 PDR Generics. First Edition Medical Economics, New Jersey, 1995.
- 12.31 Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, 8ava. Edición, Editorial Médica Panamericana, México, 1991.
- 12.32 Rubin, RH, Fischman AJ, Collahan RJ, Klaw B.A, Keech F, Ahmad M, Wilkinson R, Strauss HW, 111In Labeled Nonspecific Immunoglobulin Scanning in the Detection of Focal Infection. N Eng J Med. 321, 935-940, 1989.
- 12.33 Portillo, MC, Rodríguez SR. 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.
- 12.34 Godoy, CC, Portillo MC. Marcación de plaquetas utilizando cuatro radiofármacos con Tc^{99m} , en diagnóstico de trombosis. Guatemala: Universidad de San Carlos (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1992.
- 12.35 Girón, DC, Freire D. Síntesis de dos derivados del ácido iminodiacético y estudios de biodistribución de disida para su posible uso en el diagnóstico hepatobiliar. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1990.
- 12.36 Bonilla AI, Portillo MC. Marcación de inmunoglobulina G policlonal con tecnecio 99 metaestable. Comparación de dos métodos directos. Guatemala: Universidad de San Carlos (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1994.
- 12.37 Oliva, RM, Freire D. Estabilización de hexametazima marcada con tecnecio 99-metaestable (^{99m}Tc) con cloruro de cobalto hexahidratado, para la marcación de leucocitos. Universidad de San Carlos (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1996.

13. ANEXOS

13.1 ESPECIFICACIONES DE LA INMUNOGLOBULINA COMERCIAL EMPLEADA

NOMBRE COMERCIAL: SANDOGLOBULINA®
CASA COMERCIAL: SANDOZ

COMPOSICION DEL PRODUCTO:

Inmunoglobulina G(IgG) inalterada de origen humano, suministrada en unidades de 1 g, 3 g, 6g y 12 g. La IgG representa, al menos, un 96% de la proteína total (un 90% como mínimo de la IgG se presenta en forma de monómeros o dímeros); el resto se compone de fragmentos de IgG polimérico y trazas de IgA e IgM. La distribución de las subclases de IgG es muy semejante a la del plasma humano normal.

Como estabilizador se añade sacarosa (1.64 a 1.69g/1g de proteína). La preparación también contiene trazas de cloruro de sodio(=0.02g/1g de Proteína) pero está exenta de agentes conservadores (29, 30, 31).

PROPIEDADES:

La Sandoglobulina es un producto polivalente de inmunoglobulina humana que contiene un amplio espectro de anticuerpos opsónicos y neutralizantes contra las bacterias, los virus y otros agentes patógenos. Se prepara a partir de plasma procedente de donantes sanos, no remunerados, que, en la medida en que se puede determinar mediante exámenes clínicos, pruebas hematológicas de laboratorio y el estudio de su historial médico, no presentan agentes infecciosos detectables transmisibles por transfusión de sangre o de sus derivados. En particular, se realizan pruebas para detectar el antígeno superficial de la hepatitis B, los anticuerpos del VIH-1, VIH-2 y del virus de la hepatitis C (VHC) y un nivel elevado de ALAT mediante métodos apropiados debiendo obtenerse resultados negativos (29, 30, 31).

El fraccionamiento se lleva a cabo según el proceso de Kistler-Nitschmann.

La inocuidad del método de fabricación de Sandoglobulina se estableció mediante un estudio de inactivación vírica que mostró que la fase de pepsina/pH 4 utilizada en el proceso de fabricación posee una capacidad de inactivación sobre los siguientes virus de ensayo: VIH-1 (retrovirus envuelto), virus de la seudorrabia (virus AND envuelto), virus de la seudorrabia (virus AND envuelto), virus de la diarrea vírica de bovino (virus ARN envuelto, modelo para VHC) y parvovirus de bovino (virus AND no envuelto, modelo para virus no envueltos, p. ej., parvovirus humano B 19) (29, 30, 31).

En los pacientes con síndromes de inmunodeficiencia primaria o secundaria, la Sandoglobulina sustituye los anticuerpos de IgG faltantes, reduciendo así el riesgo de infección. En otros trastornos de la función inmunitaria, p. ej., La púrpura trombocitopénica

(inmunológica) idiopática (PTI) y el síndrome de Kawasaki, no se conoce bien el mecanismo de acción responsable de los efectos beneficiosos de la Sandoglobulina (29, 30, 31).

FARMACOCINETICA:

Al administrarse mediante perfusión i.v., el 100% de la dosis de Sandoglobulina pasa inmediatamente a la circulación, tiene lugar un proceso de distribución entre el plasma y el espacio extravascular, alcanzándose el equilibrio en el término de 7 días aproximadamente. Los anticuerpos presentes en la Sandoglobulina poseen las mismas características farmacocinéticas que los de la IgG endógena. La vida media biológica de las inmunoglobulinas intravenosas es de 21 días por término medio en sujetos con niveles séricos de IgG normales, mientras que en los pacientes con hipogammaglobulinemia o agammaglobulinemia tratados con Sandoglobulina, se halló que la vida media de la IgG total era de 32 días por término medio. No obstante, existen variaciones interindividuales considerables que pueden ser importantes para determinar la posología individual (29, 30, 31).

INDICACIONES:

La Sandoglobulina está indicada para el tratamiento de pacientes en los que una reposición/sustitución de anticuerpos naturales es clínicamente aconsejada. Indicaciones reconocidas:

Terapia de sustitución para prevenir la infección en pacientes con síndromes de inmunodeficiencia primaria:

- agammaglobulinemia
- inmunodeficiencias variables comunes asociadas a agammaglobulinemia o hipogammaglobulinemia.
- deficiencias de las subclases de IgG (29, 30, 31).

Terapia de sustitución para prevenir las infecciones en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia secundaria asociado

- a la leucemia linfocítica crónica
- al SIDA pediátrico
- al trasplante de médula ósea (29, 30, 31).

Inmunomodulación e inhibición de la inflamación:

- púrpura trombocitopénica (inmunológica) idiopática (PTI)
- síndrome de Kawasaki (29, 30, 31).

Posibilidades de empleo al estudio:

- tratamiento de infecciones bacterianas (incluida sepsis) o virales graves, en combinación con agentes antibacterianos o antivíricos
- prevención de infecciones en neonatos prematuros de bajo peso al nacer (< 1500g)
- tratamiento de la neutropenia autoinmune y de la anemia hemolítica autoinmune

- tratamiento de la trombocitopenia de origen inmunológico, como la púrpura postransfusional o la trombocitopenia isoimmune del neonato
- tratamiento de la hemofilia inducida por la formación de autoanticuerpos contra el factor VIII
- tratamiento de la miastenia grave
- prevención y tratamiento de las infecciones causadas por medicamentos citostáticos o inmunosupresores
- prevención de abortos espontáneos recurrentes
- tratamiento del asma infantil esteroideodependiente grave (29, 30, 31).

POSOLOGIA Y ADMINISTRACION:

La Sandoglobulina se administra por perfusión intravenosa. La posología que debe aplicarse en las diversas indicaciones depende del estado inmunitario de los pacientes, de la gravedad de la enfermedad y de la tolerancia individual. No se pueden hacer recomendaciones universalmente válidas, por lo que las posologías que se sugieren a continuación se dan solamente a título indicativo:

Síndrome de Inmunodeficiencia primaria:

0.2-0.8g/Kg de peso corporal (generalmente 0.4g/Kg) administrados a intervalos de 3 a 4 semanas para mantener un nivel plasmático mínimo de IgG de 5g/L como mínimo (29, 30, 31).

Síndromes de Inmunodeficiencia secundaria:

0.2-0.4g/Kg a intervalos de 3 a 4 semanas. Para la prevención de infecciones en los receptores de aloinjertos de médula ósea, la dosis recomendada es de 0.5g/Kg; se puede administrar una vez 7 días antes del trasplante y repetirse a intervalos semanales durante un período posterior de 9 meses después del trasplante, y a intervalos mensuales durante un período posterior de 9 meses (29, 30, 31).

Púrpura trombocitopénica (inmunológica) idiopática (PT):

En el tratamiento inicial se administran 0.4g/Kg durante 5 días consecutivos, o 0.4g a 1g /Kg una vez o durante 2 días consecutivos. Si es necesario, el tratamiento podrá continuar con la administración de 0.4g.Kg a intervalos de 1 a 4 semanas para mantener el recuento de plaquetas a un nivel adecuado (29, 30, 31).

Síndrome de Kawasaki:

1.6 a 2.0g/Kg administrados en varias dosis repartidas durante un período de 2 a 4 días, generalmente como suplemento de una terapia estándar con preparaciones de ácido acetilsalicílico.

Infecciones bacterianas (incluida sepsis) e infecciones virales graves:

0.4 a 1g/Kg a intervalos de 1 a 2 semanas (29, 30,31).

Prevención de infecciones en neonatos prematuros de bajo peso al nacer:

0.4 a 1g/Kg de peso a intervalos de 1 a 2 semanas (29, 30,31).

Síndrome de Guillain-Barré, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica:

0.4-1 g/Kg durante 5 días consecutivos, repetidos a intervalos de 4 semanas en caso necesario. Según las necesidades de los pacientes, el liofilizado puede disolverse en una solución de cloruro de sodio al 0.9%, en agua para inyectables o en una solución de dextrosa al 5%. La concentración de Sandoglobulina en cualquiera de estas soluciones para perfusión i.v. puede oscilar entre el 3 y el 12%, según el volumen utilizado de Sandoglobulina en agua para inyectables es hipotónica (192 mOsm/Kg) (29, 30,31).

A los pacientes tratados con Sandoglobulina por primera vez se les debe administrar una perfusión al 3% a una velocidad inicial de 0.5 a 1.0 ml/min (aproximadamente de 10 a 20 gotas/min). Si no se presenta ninguna reacción adversa durante los primeros 15 minutos, se puede incrementar la velocidad gradualmente hasta un máximo de 2.5 ml/min (aproximadamente 50 gotas/min) (29, 30,31).

En los pacientes que reciben Sandoglobulina regularmente y la toleran bien, se puede utilizar concentraciones superiores (hasta un máximo de 12%), pero la perfusión debe iniciarse siempre a una velocidad lenta y se requiere una vigilancia continua del paciente cuando se aumenta la velocidad progresivamente (29, 30,31).

CONTRAINDICACIONES:

Hipersensibilidad a las inmunoglobulinas humanas, especialmente en los pacientes con deficiencia de IgA conocidos por tener anticuerpos circulantes anti-IgA.

PRECAUCIONES:

Los pacientes con agammaglobulinemia o hipogammaglobulinemia grave que nunca recibieron una terapia de sustitución de inmunoglobulina o cuyo último tratamiento tuvo lugar hace más de 8 semanas pueden correr el riesgo de sufrir reacciones anafilactoides, que en ocasiones llegan a provocar shock, si las inmunoglobulinas intravenosas se administran por perfusión i.v. rápida. En estos pacientes debe evitarse una perfusión rápida; se deben controlar continuamente los signos vitales y durante la transfusión es preciso vigilar cuidadosamente al paciente. Se deberá tener al alcance de la mano adrenalina y una preparación corticosteroide parenteral para tratar una posible reacción anafilactoide. Muy raramente, las inmunoglobulinas intravenosas pueden provocar una caída rápida de la presión arterial acompañada de signos clínicos de una anafilaxis, incluso en pacientes en los que se había tolerado bien la administración previa de preparaciones de inmunoglobulina. Como con otras preparaciones de inmunoglobulinas intravenosas, se han registrado aumentos transitorios en los niveles de creatinina tras la administración de Sandoglobulina en algunos casos, especialmente en pacientes de edad avanzada con un trastorno preexistente de la función renal inducido por lupus o diabetes (29, 30,31).

El aumento fue, en la mayoría de los casos, leve, transitorio (5 a 2 días) y se observó 2 a 5 días después de la infusión (29, 30,31).

Todos los pacientes presentaron factores múltiples de riesgo y recibían inmunoglobulinas intravenosas por primera vez. Más del 50% de los pacientes que

presentaban las enfermedades arriba indicadas, se deberá vigilar la creatinina sérica durante 3 días tras la infusión (29, 30,31).

Se han registrado algunos casos de hemólisis habitualmente leve tras la infusión de Sandoglobulina, así como con otras preparaciones de inmunoglobulinas intravenosas. Estos casos se atribuyeron a la transferencia de anticuerpos de tipo sanguíneo y parecieron ser estimulados por una transfusión sanguínea concomitante. Principalmente en pacientes con trombocitopenia idiopática y que recibían altas dosis de inmunoglobulinas intravenosas, se ha registrado una irritación meníngea aséptica con alteración transitoria del líquido cefalorraquídeo tras la infusión de inmunoglobulina, así como con otras preparaciones de inmunoglobulinas intravenosas. Su interrupción tuvo como consecuencia una remisión en el término de varios días (29, 30,31).

Cuando se administran productos medicinales preparados a partir de sangre o plasma humanos, no se pueden excluir totalmente las enfermedades infecciosas debidas a la transmisión de agentes infecciosos a pesar de una cuidadosa selección de los donadores, de un examen de las donaciones y de fases de inactivación vírica durante la fabricación. Ello también se aplica a patógenos de naturaleza desconocida hasta ahora. (Véase también "PROPIEDADES"). Las instrucciones de preparación y empleo deberán seguirse escrupulosamente. No se debe agitar el frasco para evitar la formación de espuma. El producto reconstituido debe ser inspeccionado visualmente para detectar la presencia de partículas en suspensión; sólo debe usarse una solución límpida. Una vez preparada la solución, la perfusión debe realizarse sin demora. Se deben desechar todos los frascos utilizado parcialmente (29, 30,31).

EMBARAZO Y LACTANCIA:

No se ha realizado ningún estudio de reproducción en animales con la Sandoglobulina y la experiencia con mujeres embarazadas es limitada. Aunque no se ha observado ningún efecto adverso en el feto o en la capacidad de reproducción, la Sandoglobulina sólo deberá administrarse a las mujeres embarazadas en caso de estricta necesidad.

Siendo las proteínas contenidas en la Sandoglobulina constituyentes normales del plasma humano, es probable que se excreten en la leche materna sin ningún efecto adverso para el lactante (29, 30,31).

INTERACCIONES:

La Sandoglobulina no debe mezclarse con ningún otro fármaco y debe administrarse siempre mediante un sistema de perfusión por separado.

La eficacia de una inmunización activa puede reducirse con un tratamiento simultáneo de inmunoglobulinas intravenosas. La administración de inmunoglobulinas puede reducir la eficacia de las vacunas vivas de virus atenuado tales como sarampión, rubéola, parotiditis y varicela. El trastorno suele durar de 6 semanas a 3 meses. Sin embargo, en niños que reciben dosis de 0.4 a 1.0 g/Kg de inmunoglobulinas intravenosas



para el tratamiento repetido de la púrpura trombocitopénica idiopática o para otros trastornos, la vacuna antisarampión deberá diferirse durante 8 meses (29, 30,31).

Tras la administración de inmunoglobulina, el aumento transitorio de los anticuerpos transferidos pasivamente a la sangre del paciente puede dar lugar a resultados positivos engañosos en las pruebas serológicas (29, 30,31).

EFFECTOS SECUNDARIOS:

Si se observan las contraindicaciones, las precauciones de empleo y las recomendaciones para la posología y la administración (véanse las secciones correspondientes), las reacciones adversas graves a la Sandoglobulina son raras (29, 30, 31).

Es más probable que se produzcan durante la primera perfusión que en las administraciones posteriores (ya sea poco después del inicio de la perfusión o, con más frecuencia, durante los 30 a 60 minutos siguientes) y pueden ser de tipo anafilactoide (29, 30, 31).

Las reacciones menos graves observadas con una frecuencia del 1 al 3% durante o tras la perfusión son cefaleas, hipertermia, náuseas y, raramente (<1%), vómitos, dolor abdominal, diarrea, fatiga, malestar, mareos, escalofríos, sudación, cianosis, disnea, sensación de opresión o dolor torácico, dolor de espalda, mialgia, rigidez rubefacción o palidez, hipertensión, hipotensión y taquicardia. La mayoría de estos efectos están relacionados con la velocidad de perfusión y pueden aliviarse reduciendo la velocidad o interrumpiendo temporalmente la perfusión (29, 30,31).

Hipotensión grave, colapso circulatorio y pérdida de conciencia son efectos muy raros. Si se manifiestan tales reacciones, se debe interrumpir la perfusión hasta que desaparezcan los síntomas, pudiendo estar indicada la terapia con adrenalina, corticosteroides, antihistamínicos y líquidos intravenosos (29, 30,31).

Como con otras preparaciones de inmunoglobulinas intravenosas, se han registrado aumentos transitorios de los niveles de creatinina hemólisis e irritación meníngea aséptica en algunos pacientes (véase precauciones) (29, 30,31).

SOBREDOSIFICACION:

No se ha registrado ningún caso de sobredosis de Sandoglobulina; si se produjera, no cabe esperar ningún efecto grave (29, 30,31).

CONSERVACION:

La Sandoglobulina debe protegerse de la luz y conservarse por debajo de 25 centígrados. No debe congelarse y no deberá usarse tras la fecha de expiración indicada en la etiqueta.

13.2 BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA (GMP) EN LA PREPARACION DE LOS KITS

BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA

Las buenas prácticas de manufactura son definidas como un sistema comprensivo, designado, documentado e implementado con personal y equipo tal, que los productos terminados sean de una calidad apropiada al uso al que se les destina (11, 23).

■ PERSONAL

El personal designado para la preparación y ensayo de los kit, deberá estar bien calificado y entrenado. Deberán pertenecer a cualquiera de las áreas de Química o Química Farmacéutica con entrenamiento adicional en radioquímica y radiofármacos (11, 23).

■ PREMISAS

La preparación de los kits debe llevarse a cabo bajo premisas de definida limpieza, de acuerdo a las Buenas Prácticas de Manufactura; dado que los productos que se han de manufacturar, no pueden ser esterilizados en su envase final (11, 23).

Las áreas de trabajo deben ser provistas con aire filtrado a través de filtros retenedores de microbios. El uso de una campana de flujo laminar que provea la atmósfera de trabajo ideal es esencial (11, 23).

■ EQUIPO

CAMPANA DE FLUJO LAMINAR:

La campana de flujo laminar ya sea de flujo vertical u horizontal, puede ser empleada, siempre y cuando cumpla con los requerimientos de los estándares británicos 5295 Clase 1, los cuales especifican que el conteo de partículas en el ambiente no debe exceder un total de 3000 partículas/m³ con un tamaño de 0.5µm o mayor, siempre y cuando, la partícula de mayor tamaño presente en cualquier muestra, no sea mayor de 5µm. Para obtener este tipo de aire necesario para la campana de flujo laminar, éste, debe ser filtrado a través de filtros HEPA con una eficiencia mínima del 99.9995% (11, 23).

Previo a su uso, la campana de flujo laminar debe ser desinfectada utilizando alcohol acuoso al 70% y el flujo debe ser chequeado mediante la exposición de placas de agar en el área de trabajo para detectar cualquier tipo de contaminación microbiana (11, 23).

FILTRACION A TRAVES DE MEMBRANA

Puede emplearse membranas de 0.22µm y soportes de plástico o acero inoxidable. Las membranas no deberán emplearse mas de una vez.

Para la filtración de nitrógeno para purgar soluciones o sellar viales bajo atmósfera de nitrógeno, se deberá emplear filtros para gas adecuados.

LIOFILIZADO

Deberá emplearse una liofilizadora de bandeja, con una capacidad para acomodar aproximadamente 200 viales de 10cc de capacidad. La unidad debe poseer facilidades para sellar los viales mecánicamente bajo atmósfera de nitrógeno y al vacío. Otras especificaciones con las que debe cumplirse, son: un condensador mecánico, capaz de alcanzar una temperatura de -40 centígrados, capacidad de remoción de hielo de aproximadamente 2Kg en 24 horas de operación, capacidad de mantener una presión de 50 torr sin carga y capacidad de enfriar y calentar la bandeja de -40 centígrados a +40 centígrados con flujo circulante (11, 23).

RECIPIENTES Y TAPONES

Los recipientes a usar deberá ser viales de 10cc de capacidad de vidrio tipo 1 USP, de borosilicato neutro. Otro tipo de cristalería tales como beakers, varillas de agitación, probetas, pipetas graduadas, etc. deberán estar hechos de vidrio de borosilicato de buena calidad y limpiarse y esterilizarse adecuadamente. Los tapones deberán ser de goma sintética, con separación en el extremo interno (11, 23).



13.3 PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA DE VIALES Y TAPONES

PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA DE VIALES:

- Anotar: No. de lote, capacidad y fecha.
- Limpiar inicialmente los viales con una solución de Teepol al 0.1% cepillando individualmente los viales, o por medio de un ultrasonido durante 30 minutos.
- Lave con agua corriente para eliminar el Teepol completamente.
- Sumerja en una solución de Acido Nítrico al 15% v/v y deje reposar una noche.
- Retirar de la solución de Acido Nítrico al día siguiente y lave para remover el ácido completamente.
- Chequee con papel pH la eliminación completa del ácido.
- Lave individualmente los viales con agua bidestilada y coloque en posición invertida en un recipiente limpio y esterilizado.
- Esterilice con calor seco a 180 centígrados por dos horas o a 160 centígrados por 6 horas (11, 23).

PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA DE TAPONES:

Los tapones que deben emplearse, consisten en tapones de goma sintética, con la parte interior dividida para su uso en operaciones de liofilización. Estos se pueden obtener en varios colores.

En general, el proceso de limpieza de los tapones, debe efectuarse de la manera siguiente:

- Los tapones se lavan con agua corriente para eliminar cualquier partícula extraña visible.
- Sumergir los tapones en una solución de Teepol al 1% y limpie con cepillo los tapones individualmente.
- Eliminar la solución de Teepol lavando con suficiente agua.
- Sumergir los tapones en una solución de Hidróxido de Sodio 10% peso/volumen y deje reposar toda una noche.
- Al día siguiente elimine todo el álcali lavando con suficiente agua.
- Sumerja los tapones en una solución de Acido Clorhídrico al 20% volumen/volumen y deje reposar durante 24 horas.
- Lave los tapones con agua destilada para eliminar todo el ácido.
- Lave nuevamente con abundante agua bidestilada.
- Coloque en beakers esterilizados y seque en un horno a 70 centígrados.
- Esterilice utilizando ya sea radiación, o bien, por medio de autoclave, colocando los tapones dentro de bolsas de polipropileno, a 121 centígrados por 30 minutos y 15 pies por pulgada cuadrada de presión (11, 23).

13.4 CONCEPTOS BASICOS DE RADIOFARMACIA

Cuando se habla de los conceptos básicos de radiofarmacia, es preciso aclarar algunos de los siguientes conceptos:

RADIOFÁRMACO:

Un radiofármaco es un compuesto radioactivo que cuando se administra por propósitos de diagnóstico o terapia, no produce respuesta fisiológica en el paciente.

El diseño de estos compuestos se basa únicamente en la función del órgano blanco. A diferencia de las técnicas radiográficas, que dependen enteramente de las diferencias de densidad de los tejidos. La visualización con radiofármacos, es esencialmente independiente de la densidad del órgano blanco. El mecanismo de localización de un radiofármaco en un órgano en particular, puede ser tan simple como el atrapamiento fisiológico de partículas, o tan sofisticado como una reacción antígeno-anticuerpo o quimiosorción de un fosfato inorgánico.

Existe una significativa diferencia entre un radioisótopo (un radionucléido cuya forma química es desconocida) y un radiofármaco cuya forma química es generalmente precisa y conocida.

Propiedades del radiofármaco de diagnóstico ideal:

Un radiofármaco de diagnóstico debe cumplir en la medida de lo posible con los siguientes aspectos:

- Emisión gamma pura
- $100 < \text{energía gamma} < 250 \text{ KeV}$
- Vida media efectiva = 1.5X duración del test.
- Alta relación del blanco/fondo
- Dosis de radiación mínima para el paciente y el personal que lo manipula
- Seguridad del paciente
- Reactividad química
- Bajo costo y alta disponibilidad del radiofármaco
- Preparación sencilla y control de calidad interno.

Tipo de emisión del radiofármaco:

Cuando un radioquímico diseña un radiofármaco, existen muchos factores que deben ser considerados. El mejor desempeño de un radiofármaco requiere que éste posea ciertas características. La primera de éstas es que el radioisótopo debe ser un emisor gamma puro, decayendo ya sea por captura de electrones o transición isomérica. Otros tipos de radiación no penetrantes, por ejemplo alfa y beta, son poco deseables, por dos razones: Debida a su alta transferencia de energía lineal, la fracción de energía depositada por cm de recorrido es muy alta, lo cual resulta en una absorción casi cuantitativa en el cuerpo. La pocas partículas que logran escapar del cuerpo del paciente, no pueden penetrar el cristal para interactuar. Consecuentemente, las radiaciones alfa y beta no son visualizables. En



adición, puede decirse que este tipo de emisiones confieren una elevada dosis de radiación para el paciente.

Energía de visualización:

Desde el punto de vista de la visualización, el rango de energía ideal se ubica entre 100 – 250 keV. El uso de energías más altas, compromete la calidad de la imagen, debido a que se requiere de una colimación mayor en el aparato, disminuyendo tanto la resolución como la sensibilidad. Dentro de los radioisótopos comúnmente usados, se considera que el Tc^{99m} y el I¹²³ son ideales bajo este concepto.

Vida media efectiva:

Idealmente, un radiofármaco debe tener una vida media aproximadamente 1.5 veces la duración del tiempo del test. Esto, con el propósito de minimizar la exposición del paciente a la radiación.

El típico ejemplo del tiempo de vida media efectiva apropiada lo constituye el MDP-Tc^{99m} que posee una vida media de 6 horas, y la localización en tejido óseo dura aproximadamente 4 horas, por lo que la relación de vida media: duración del test es de 1.5:1.

Alta relación blanco/fondo:

Una alta relación blanco:fondo es crítica. Si ésta no es lo suficientemente elevada, la visualización del blanco no sería posible, por ejemplo, cuando se realiza una visualización de tiroides, idealmente la radiación deberá depositarse en esta glándula y no en otra parte del área del cuello. Aún cuando la elevada acumulación en hígado sería indeseable, ésto no tendría ningún impacto en el proceso, puesto que la región de interés no se ve afectada.

Dosis de radiación mínima:

La dosis de radiación debe controlarse tanto para el paciente como para la persona que administra el radiofármaco o está expuesta a él. La menor dosis posible deberá ser empleada.

Seguridad del paciente:

Idealmente, un radiofármaco no deberá exhibir ninguna toxicidad para el paciente.

Reactividad química:

Una de las características que hace que el Tc^{99m} sea un radioisótopo ideal para el diagnóstico por imágenes, es su gran habilidad para unirse a una gran variedad de compuestos bajo condiciones fisiológicas. Acá deberá considerarse también las características del sustrato que se desea marcar, puesto que una molécula puede perder su capacidad o funcionalidad dentro del cuerpo una vez ésta ha sido marcada, por lo que resulta sin utilidad para su empleo.

CATEGORIAS DE LOS RADIONUCLEIDOS:

MÉTODOS DE PRODUCCIÓN:

Los radionucléidos empleados en Medicina Nuclear son todos sintéticos y caen dentro de cuatro categorías generales:

- Producidos en generador
- Producidos en reactor termal de neutrones
- Producidos en Ciclotron
- Producidos en reactor de fisión

De estos radionucléidos, se mencionará únicamente los producidos por generador, que es al grupo al que pertenece el Tc^{99m} .

Radionucléidos producidos por generador:

Un generador es un sistema que contiene una mezcla en equilibrio de un elemento o sustancia madre y una sustancia hija, el sistema suele estar diseñado para producir la sustancia hija para algún propósito y generalmente permite una fácil separación de la sustancia madre y la hija. Para ser útil, es necesario que la sustancia madre posea una vida media más larga que la de la sustancia hija.

Control de Calidad del Generador de Tc^{99m} :

Tipos de impurezas en un generador de Mo^{99}/Tc^{99m} :

- El Mo^{99} , lo cual puede causar un aumento en la dosis de radiación y una baja calidad de la imagen.
- Tecnecio coloidal que puede producir poca calidad en la imagen y aumento en la dosis de radiación.
- Al^{+3} produce baja calidad en la imagen debido a los problemas que causa en el marcaje.

Los controles de calidad de los generadores de Mo^{99}/Tc^{99m} consisten en verificar la elución del Mo^{99} en cada elución, al igual que la elución del Al^{+3} en cada elución.

Elución de Mo^{99} :

La elución del Mo^{99} se ensaya directamente en el recipiente de plomo especial que es proveído por el fabricante del calibrador de dosis. El Tc^{99m} es después ensayado directamente en la manga plástica del calibrador de dosis. La actividad en μCi de Mo^{99} es dividida dentro la actividad en mCi de Tc^{99m} para obtener la relación. Si esta relación es $< 0.15 \mu Ci Mo^{99} / mCi Tc^{99m}$ al momento de la inyección, el generador pasa la prueba de elución de Mo^{99} . Como una regla general, si la relación es < 0.038 al momento de la elución, el material será apropiado para su inyección, por lo menos por 12 horas.

Elución de Al^{+3} :

El Al^{+3} es medido colorimétricamente. Una gota del eluido es colocada en un extremo de una cinta de un papel test especial, una gota de la solución estándar de Al^{+3} , (concentración 10 ppm) se coloca en el otro extremo de la cinta de papel test. Si el color en el centro de la

gota de eluido es menos íntensa que la de la solución estándar, el eluido pasa la prueba y el resultado puede expresarse en $\mu\text{g} / \text{mL}$.

PRECAUCIONES EN LA PREPARACION DE RADIOFARMACOS:

Existen varias precauciones que deben tomarse en cuenta en la preparación y uso de los radiofármacos, en general, y en cuanto a los radiofármacos de $\text{Tc}^{99\text{m}}$, en particular. Debido a que la mayoría de los radiofármacos son administrados por vía intravenosa, es necesario que se utilice una técnica aséptica para conseguir manterne la esterilidad del producto. El tapón del vial deberá ser limpiado con isopropanol al 70% previo a su perforación con una aguja. Esto es más bien un paso de limpieza que una técnica de esterilización debido a que el alcohol no permanece en el tapón el tiempo necesario para destruir todos los patógenos que puedan estar presentes.

El aire nunca debe ser inyectado en ningún vial de radiofármaco, especialmente uno que contenga $\text{Tc}^{99\text{m}}$, debido a que el oxígeno contenido en solamente 0.1mL de aire es suficiente para destruir completamente el ion estanoso utilizado en muchos kits comerciales como agente reductor. Además, el aire del ambiente no es estéril, así que es posible que se introduzca patógenos en el vial mediante la utilización de una inyección previa de aire para aumentar la presión interna del vial y facilitar la remoción del contenido.

Previo a reconstituir los kits con $\text{Tc}^{99\text{m}}$ pertecnetato, pertecnetato libre de agentes oxidantes debe ser diluido al volumen final requerido con solución salina normal. Idealmente, solución salina libre de oxidantes (Oxígeno salino disuelto) debe ser empleado para la dilución. Reconstitución de un kit con un pequeño volumen de pertecnetato, seguido unos minutos después de una posterior dilución con solución salina puede ser la causa de la disociación de ciertos quelatos débiles, resultando en la formación de significativas cantidades de Tc libre.

RADIOFARMACOS DE $\text{Tc}^{99\text{m}}$:

El pertecnetato de sodio puede ser usado "per se" después de la elución del generador y es el único compuesto de $\text{Tc}^{99\text{m}}$ que no requiere manipulación de parte del personal de Medicina Nuclear. Este puede ser inyectado por vía intravenosa, o empleado para marcar células sanguíneas u otras moléculas para inyección intravenosa o unirse a moléculas adecuadas para la administración oral.

La mayoría de los compuestos de $\text{Tc}^{99\text{m}}$ emplean el método de reducción con estaño, lo cual hace uso del principio de que el cloruro estanoso es uno de los más poderosos agentes reductores disponibles para los químicos. El $\text{Tc}^{99\text{m}}$ obtenido del generador se encuentra disponible en la forma de TcO_4^- , o pertecnetato. Mientras que el anión tiene una carga general negativa de -1 , el número de oxidación del Tc es $7+$. Los agentes quelantes más empleados para preparar este tipo de productos son también aniones con una carga general negativa debida a la presencia de átomos de N, O ó P, cada uno de los cuales posee uno o mas pares extra de electrones, estas cargas negativas se repelen unas a otras, de tal manera que el pertecnetato no forma quelatos. Un agente reductor es por tanto necesario para

convertir el Tc^{99m} en una forma catiónica electropositiva capaz de unirse a agentes quelantes.

MECANISMOS DE LOCALIZACION DE LOS RADIOFARMACOS:

El mecanismo de localización de un radiofármaco en particular se basa en diversos procesos tan variados como las reacciones antígeno-anticuerpo, atrapamiento físico de partículas, unión a sitios de recepción, remoción de células intencionalmente dañadas de la circulación, y transporte de una especie química a través de la membrana celular al interior de la célula por procesos metabólicos normales. La radioquímica juega una parte importante en el desarrollo de éstos compuestos y en los métodos de desarrollar el control de calidad para asegurar la pureza radioquímica. Dentro de estos mecanismos se puede mencionar los siguientes:

Transporte activo:

Incluye el uso de un proceso operativo normal en el cuerpo, mediante el cual se transporta el radiofármaco a través de la membrana celular hacia el interior de la célula, como en el caso del NaI para visualización de tiroides.

Fagocitosis:

El atrapamiento físico de las partículas coloidales por las células de Kupffer, como ocurre en la visualización de hígado y bazo.

Bloqueo Capilar:

Microembolización intencional de un lecho capilar con partículas, como por ejemplo en la perfusión pulmonar con Tc^{99m} unido a anticuerpos monoclonales.

Secuestro celular:

Inyección de células dañadas intencionalmente para visualizar un órgano específico, como en el caso de la visualización del bazo sin interferencia de actividad en hígado.

Difusión:

Un mecanismo por medio del cual un radiotrazador se difunde a través de la membrana celular y se une a un órgano específico.

Localización en compartimentos:

Colocación de un radiotrazador en un espacio corporal y la visualización de ese espacio, como en el caso de la perfusión pulmonar con gas de Xe^{133} .

Quimiosorción:

Unión de un radiofármaco a una superficie sólida como en el caso de las plaquetas usadas para la localización de trombos.

Reacciones antígeno-anticuerpo:

Visualización de sitios tumorales debido a la unión de anticuerpos a los antígenos de superficie.

Unión a receptores:

Unión de radiofármacos a receptores de alta afinidad.

Ada Carola Solares

Ada Carola Solares Solares

AUTORA

Celestina Portillo

Licda. Célestina Portillo de Palma

ASESORA

Lucrecia Peralta de Madriz

Licda. Lucrecia Peralta de Madriz

DIRECTORA

Hada Marieta Alvarado Beteta

Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta

DECANA

