

## Tesis de Posgrado

# Agentes para diagnóstico y terapia tumoral en medicina nuclear

Noto, María Gracia

1990

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Noto, María Gracia. (1990). Agentes para diagnóstico y terapia tumoral en medicina nuclear. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2344\\_Noto.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2344_Noto.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Noto, María Gracia. "Agentes para diagnóstico y terapia tumoral en medicina nuclear". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1990.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2344\\_Noto.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2344_Noto.pdf)

Registro N° 2344

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

AGENTES PARA DIAGNOSTICO Y TERAPIA TUMORAL  
EN MEDICINA NUCLEAR

AUTOR: María Gracia NOTO

DIRECTOR: Roberto O. MARQUES

REALIZADO EN LA COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA

1990

2344  
ef. 2

TRABAJO PARA OPTAR AL TITULO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS



## AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer al Dr. Roberto O. MARQUES el haber aceptado la dirección de esta Tesis y el haberme guiado en su ejecución.

A las Autoridades de la COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA por haberme permitido la realización de este trabajo.

Al Servicio de Medicina Nuclear del Instituto "A.ROFFO" y al personal médico que realizó la evaluación clínica de la Bleomicina-Tc-99m.

A mis compañeros del CENTRO ATOMICO EZEIZA por la colaboración en este trabajo, en especial al Lic. R. BRIOZZO y a D.MARCIALE que colaboraron en la síntesis y marcación de la MIBG-I-131; a R. AMOR que colaboró en la determinación del Re por espectrofotometría y en la biodistribución del HEDP-Re-186; a la Bqca. G. RABILLER por la liofilización del fibrinógeno-Sn; al Lic. C.ROCCO por su contribución en la espectrometría gamma del Re-186.

Al Laboratorio de Moléculas Marcadas por la síntesis del HEDP, en especial al Dr. A.MITTA consejero de estudios.

Al Departamento de Química Orgánica de la FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES por los controles de los productos sintetizados.

A. E.ESTEBAN y a E.STABILE por la colaboración en los dibujos y el tipeado.

Por último va mi agradecimiento a todos aquellos que me alentaron y aconsejaron en esta labor, en especial al Lic. A.MANZINI y a la Dra. G. ARGUELLES.

**INDICE**

## INTRODUCCION

	<u>Páginas</u>
MEDICINA NUCLEAR	15-17
AGENTES PARA DIAGNOSTICO TUMORAL EN MEDICINA NUCLEAR	
<u>RADIOFARMACOS EN EL DIAGNOSTICO ONCOLOGICO</u>	
RADIOISOTOPOS Y SUS RADIACIONES	19
1- Desintegración radiactiva	19
1.1.- Estabilidad nuclear	19
1.2.- Ley de decaimiento radiactivo	19
1.3.- Actividad	19-20
1.4.- Período de semidesintegración	20
2- Modos de desintegración	
2.1.- Desintegración alfa	20-21
2.2.- Desintegración beta	21
2.3.- Captura electrónica	21-22
2.4.- Conversión interna	22
2.5.- Transición isomérica	22
2.6.- Rayos gamma	22
2.6.1.- Absorción fotoeléctrica	22-23
2.6.2.- Absorción Compton	23
2.6.3.- Producción de pares	23
3- Dosis de radiación	23-24
TECNICAS DE DIAGNOSTICO "IN VIVO"	25
1- Métodos directos de detección del tumor	25
1.1.- Marcadores de una función celular específica	25-26
1.2.- Sustratos metabólicos	26
1.3.- Cationes y otros agentes que son captados en el interior de la célula tumoral	26-28
1.4.- Agentes que son captados específicamente por la superficie de la célula tumoral	28

	<u>Pág.</u>
1.5.- Marcadores que utilizan características del tumor no específicas del mismo	28-29
2- Métodos indirectos de detección del tumor	29
2.1.- Sistema óseo	29
2.2.- Sistema hepático	30
2.2.1.- Sistema retículoendotelial (SRE)	30
2.2.2.- Espacio vascular hepático	30
2.2.3.- Permeabilidad de las vías biliares	30-31
2.3.- Sistema nervioso central	31
2.3.1.- Radiofármacos no difundibles	31
a) Angiografía radioisotópica	31-32
b) Centellografía cerebral	32
c) Cisternografía	32
2.3.2.- Radiofármacos difundibles	32-33
3- Radiofármacos en la regulación de la quimioterapia oncológica	33-34
TECNICAS DE DIAGNOSTICO "IN VITRO"	35-36
<u>AGENTES EN EL DIAGNOSTICO ONCOLOGICO POR RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR</u>	
RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR	37-42
1- Aplicación de la RMN al diagnóstico del cáncer	43
2- Agentes de contraste paramagnéticos	44
AGENTES PARA TERAPIA TUMORAL EN MEDICINA NUCLEAR	
RADIONUCLEIDOS PARA TERAPIA INTERNA ONCOLOGICA	46
Radionucleídos emisores beta	47-48
Radionucleídos emisores alfa	49

<b>RADIOFARMACOS EN TERAPIA TUMORAL</b>	<b>50</b>
1- Radiofármacos que entran por un camino metabólico específico	50-51
2- Radiofármacos que atacan la superficie celular	51
2.1.- Estabilidad	52
2.2.- Permanencia	52
2.3.- Período de semidesintegración del radionucleído	52
2.4.- Competición con los antígenos circulantes	52
2.5.- Inmunoreactividad	52
3- Administración regional de radiofármacos	53
4- Intercambio y absorción sobre superficies	53
Sr-89	54
Compuestos de fósforo marcado	54
<u>FUNDAMENTOS DE LA TESIS</u>	<b>56</b>
CONTROL DE CALIDAD DE RADIOFARMACOS	57-58
<u>CONTROL ANALITICO DE LA CALIDAD</u>	58
PUREZA RADIONUCLEÍDICA	58-59
Determinación de la pureza radionucleídica	59
Espectrometría gamma	59
Espectrometría beta	60
Espectrometría alfa	60
CONCENTRACION RADIATIVA	61
ACTIVIDAD ESPECIFICA	61
PUREZA QUIMICA	61-62
PUREZA RADIOQUIMICA	62



	<u>Pág.</u>
1- Sustancias radiactivas reaccionantes	62-63
2- Productos radiactivos intermedios	63
3- Productos radiactivos simultáneos	64
4- Productos de descomposición	64-65
 AFINIDAD BIOLOGICA	 65-66
 <u>ORGANIZACION DEL CONTROL DE LA CALIDAD</u>	 66
1). RADIOFARMACOS DISPUESTOS PARA SU USO	66
2). GENERADORES Y JUEGO DE REACTIVOS	67-68
3). RADIOFARMACOS ELABORADOS EN LA INSTALACION DE MEDICINA NUCLEAR	68
 <u>PARTE EXPERIMENTAL</u>	 69
<u>FIBRINOGENO-Tc 99m</u>	70
 INTRODUCCION	 71-72
Fibrinógeno	72-73
 MATERIALES Y METODO	 74
PREPARACION DEL FIBRINOGENO-Sn	74
Método	74-75
 GENERADOR DE Mo 99/Tc 99m	 75-79
CONTROL DE CALIDAD DEL GENTEC	80
Determinación de la pureza radionucleídica	80
Impurezas gamma emisoras	80
Determinación de la pureza química de soluciones de Tc-99m	80-81
Pureza radioquímica	81

	<u>Pág.</u>
MARCACION DEL FIBRINOGENO-Sn con Tc-99m	81
CONTROL DE PUREZA RADIOQUIMICA	81
Cromatografía instantánea en capa delgada	81
Cromatografía en gel	82
CONTROL DE AFINIDAD BIOLOGICA "IN VITRO"	82
ENSAYOS DE BIODISTRIBUCION	82
 RESULTADOS	
PUREZA RADIONUCLEIDICA DEL Mo-99	83
SOLUCION DE PERTECNECIATO (Tc-99m): PUREZA RADIONUCLEIDICA, QUIMICA Y RADIOQUIMICA	83
INFLUENCIA DEL TIEMPO DE INCUBACION EN EL RENDIMIENTO DE MARCACION DEL FIBRINOGENO-Tc 99m	83-84
ENSAYOS DE BIODISTRIBUCION	85
AFINIDAD BIOLOGICA, PUREZA RADIOQUIMICA y pH	85-86
 DISCUSION	 87-90

### BLEOMICINA-Tc 99m

INTRODUCCION	92-94
CANTIDAD TOTAL DE TECNECIO	95-96
PRESENCIA DE OXIDANTES	96-97

MATERIALES Y METODO	
CELDA ELECTROLITICA	98-99
BLEOMICINA	99
SOLUCION DE Tc-99m	99
METODO	100
PUREZA RADIOQUIMICA	100-101-
ESTUDIO DEL RENDIMIENTO Y CINÉTICA DE MARCACION	101
SELECCION DE ENFERMOS	101-104
RESULTADOS	105
PUREZA RADIOQUIMICA	105-106
CINETICA DE MARCACION-INFLUENCIA DEL ION NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	106-107
ESTUDIOS CLINICOS	108-112
CONCLUSIONES	113
ESTUDIOS CLINICOS	113-114

M-IODOBENCILGUANIDINA I-131

INTRODUCCION	116-119
MATERIALES Y METODO	12-
SINTESIS DE LA METAIODOBENCILGUANIDINA	120
SOLUCION DE I-131	12-122-
Control de pureza radioquímica	122
Control de pureza radionucleídica	122

	<u>Pág.</u>
SINTESIS DEL COMPUESTO MARCADO	123
Temperatura	124
Concentración del sustrato	124
pH	124
Sustancias catalíticas	125
METODO	125-126
CONTROL DE LA PUREZA RADIOQUIMICA	126
PURIFICACION DE LA m-IBG (I-131)	126
CONTROLES FARMACOLOGICOS	127
Determinación de pirógenos	127-128
Ensayos de esterilidad	128
Ensayos de toxicidad	129
FARMACOCINETICA DE LA m-IBG	129-130
ESTABILIDAD	130
ESTUDIOS CLINICOS - EMPLEO	130-131
RESULTADOS	
CONTROL DE CALIDAD DE LA m-IBG	132
CONTROL DE CALIDAD DE LA SOLUCION DE NaI-131	132
INFLUENCIA DEL pH, AGREGADO DE SULFATO DE AMONIO EN LA RADIOIODINACION DE LA m-IBG	132-133
CONTROL DE LA PUREZA RADIOQUIMICA DE LA m-IBG(I-131)	133
PURIFICACION DE LA m-IBG (I-131)	133-134
CONTROLES FARMACOLOGICOS	134
FARMACOCINETICA DE LA m-IBG	134-135
ESTABILIDAD	135-136
ESTUDIOS CLINICOS	137-138
DISCUSION	142-145

RADIOFARMACOS DE RE-186 PARA TERAPIA  
PALIATIVA DE METASTASIS OSEAS

	<u>Páginas</u>
INTRODUCCION	147-148
ELEMENTOS DEL GRUPO VII A DE LA TABLA PERIODICA	149
FOSFONATOS DE Tc-99m y Re-186	150
MATERIALES Y METODO	
OBTENCION DE Re-186	151
Cálculo de la actividad a fin de la irradiación	151-152
Obtención de la solución de Re-186	152
Determinación de la pureza radionucleídica gamma	152
Determinación de la actividad absoluta de Re-186 por espectrometría gamma	152-153
Pureza radioquímica de la solución de perrhenato (Re-186)	153
Determinación espectrofotométrica de Re	154
MARCACION DE LOS COMPUESTOS DE Re-186	156
Determinación de la pureza radioquímica de los compuestos de Re-186	156
Ensayos de biodistribución	156-157
RESULTADOS	158-159
PUREZA RADIOQUIMICA DE LA SOLUCION DE Re-186	159
CONCENTRACION DE Re	159-160
MARCACION DE COMPUESTOS DE Re-186	161-162
PUREZA RADIOQUIMICA DE LOS COMPUESTOS DE Re-186	162-163
ENSAYOS DE BIODISTRIBUCION	163-164

	<u>Pág.</u>
CONCLUSIONES	165
 <u>FARMACOCINETICA Y ESTIMACION DOSIMETRICA</u> <u>DEL HEDP-RE 186</u>  	
MATERIALES Y METODO	167
SINTESIS DEL HEDP	167-168
CONTROL DE CALIDAD DEL HEDP	168
PREPARACION Y CONTROL DE CALIDAD DEL HEDP-Re 186	168-169
FARMACOCINETICA DEL HEDP-Re 186	169
ENSAYOS DE TOXICIDAD	169-171
 RESULTADOS  	
FARMACOCINETICA Y CALCULO DE DOSIS	172-182
ENSAYOS DE TOXICIDAD	183
DETERMINACION DE LA DL 50 DEL HEDP-Re	184-185
 DISCUSION  	
DISCUSION GENERAL	186-188
BIBLIOGRAFIA	189-193
	194-198



## MEDICINA NUCLEAR

Los estudios de Christiansen y Lomholt, en 1932, utilizando radionucleídos para estudiar el metabolismo de plantas y animales, demostró que los átomos radiactivos pueden ser utilizados como trazadores representativos de los átomos estables de un mismo elemento, a los cuales acompañan en todos los procesos de los sistemas biológicos.

En 1924, Blumgart y Yens, iniciaron los primeros estudios clínicos con radioisótopos; sentaron así bases importantes para la Medicina Nuclear, a pesar de que sus investigaciones estaban limitadas a unos pocos radioisótopos naturales.

Con la producción de radioisótopos artificiales en el ciclotrón (Lawrence, E.; 1931) y los producidos por bombardeo nuclear (Fermi, E.; 1934), aumenta la variedad de isótopos radiactivos disponibles.

John Lawrence, en 1936, inicia el empleo terapéutico de los radioisótopos, utilizando P-32 para el tratamiento de la leucemia.

Los estudios de la función tiroidea tienen como antecedente las investigaciones de Hertz y Evans, en conejos, con I-128.

En 1942, Fermi desarrolló el primer reactor nuclear experimental, generando gran variedad de radionucleídos artificiales; uno de ellos fue el radiocobalto (Co-60), que fue utilizado por primera vez para tratamiento del cáncer, en la Universidad Estatal de Ohio, en 1948. (1)

Pasadas cuatro décadas, la Medicina Nuclear ha alcanzado grandes logros en el diagnóstico y tratamiento de diversas patologías, debido al desarrollo de compuestos radiomarcados (radiofármacos) y a las técnicas y equipos de detección.



En 1951, Benedict Cassen desarrolló el primer gammá-grafo lineal. Los fotones producidos en la desintegración radiactiva de los radionucleídos gamma emisores, producen centelleos de luz cuando interactúan con ciertos cristales; un tubo fotomultiplicador los transforma en señales eléctricas susceptibles de ser amplificadas.

La máxima eficiencia del detector fue lograda utilizando cristales de ioduro de sodio activados por la adición de pequeñas cantidades de talio: éste es, desde entonces el detector por excelencia en Medicina Nuclear.

Hal Anger desarrolló la cámara gamma, con la que se obtienen imágenes rápidas sin necesidad de rastrear el área de interés, como sucede con el centellógrafo lineal; el cristal detector de INa (Tl) de varias pulgadas de diámetro, iba acoplado a una batería de tubos fotomultiplicadores.

Cuando fue lanzada comercialmente, en 1964, la versión mejorada, produjo un verdadero impacto en la Medicina Nuclear y propició un avance considerable en el que ha jugado también un papel relevante el uso del Tc-99m, introducido por Harper y colaboradores, casi 30 años después de haber sido obtenido por Segré y Seaborg, en Berkeley, en 1938.

En los últimos años, la Medicina Nuclear cuenta con una nueva generación de cámaras gamma con detectores de gran campo de visión, acoplados a 37 ó más tubos fotomultiplicadores de elevada eficiencia, colimadores multiperforados apropiados para radionucleídos de diversas energías, con alta sensibilidad y resolución, a los que se les ha incorporado avanzados sistemas de computación.

La tomografía computada es un método de diagnóstico radiológico que provee imágenes de secciones transversales del cuerpo.

El principio de la reconstrucción de la imagen usado en la tomografía computada, puede ser utilizado para la visualización de estructuras anatómicas, no sólo por medio de rayos X, sino también en el campo de la Medicina Nuclear, utilizando emisores gamma, técnica denominada tomografía de emisión de fotón único (SPECT: single photon emission computed tomography) o bien emisores de positrones, en estos casos se habla de tomografía de emisión de positrones (PET: positron emission computed tomography).

El diagnóstico por imágenes obtenidas por la administración de un radiofármaco es actualmente la contribución más importante de la Medicina Nuclear a la oncología.

**AGENTES PARA**  
**DIAGNOSTICO TUMORAL**  
**EN**  
**MEDICINA NUCLEAR**

# RADIOFARMACOS EN EL DIAGNOSTICO ONCOLOGICO

## RADIOISOTOPOS Y SUS RADIACIONES

### 1. DESINTEGRACION RADIATIVA

#### 1.1. Estabilidad Nuclear:

La estabilidad del núcleo de un átomo depende principalmente de la cantidad relativa de protones y neutrones.

Los elementos livianos son estables cuando la relación  $n/p$  es aproximadamente la unidad, por ejemplo C-12 y C-13 con ratios  $n/p$  de 1,00 y 1,17 son estables; C-10 y C-11 con valores  $n/p$  de 0,67 y 0,80 desintegran con la transformación de un protón en un neutrón, emitiendo un electrón positivo ( $\beta^+$ ) y para C-14 y C-15 con  $n/p$  de 1,33 y 1,50, la transformación radiactiva que se produce es de un neutrón a un protón, acompañada por la emisión de un electrón negativo ( $\beta^-$ ).

#### 1.2. Ley de decaimiento radiactivo:

El número de átomos que desintegran en la unidad de tiempo es proporcional al número de átomos presentes.  $N$ . El número  $dN$  que se desintegra en un tiempo  $dt$  está dado por:

$$dN = - \lambda N dt$$

donde  $\lambda$  es la constante de decaimiento que es característica de cada radionucleído. El número de átomos presentes a un tiempo  $t$ , será:

$$N = N_0 e^{-\lambda t} \quad (1)$$

donde  $N_0$  es el número original de átomos ( $t=0$ ).

#### 1.3. Actividad:

La actividad de una muestra radiactiva se define como el número de átomos que desintegran en cada segundo ( $\lambda N$ ). La unidad de actividad, el Becquerel (Bq) es por definición, la velocidad de desintegración equivalente a 1 desintegración por segundo.

En la práctica, aún el curie y sus submúltiplos el millicurie (mCi) y microcurie ( $\mu$ Ci) son los más utilizados.

$$\begin{aligned}1 \text{ Ci} &= 3,7 \times 10^{10} \text{ Bq} = 37 \text{ GBq} \\1 \text{ mCi} &= 3,7 \times 10^7 \text{ Bq} = 37 \text{ MBq} \\1 \mu\text{Ci} &= 3,7 \times 10^4 \text{ Bq} = 37 \text{ KBq}\end{aligned}$$

#### 1.4. Período de semidesintegración:

El parámetro más utilizado para describir el decaimiento de un radioisótopo, es el período de semidesintegración  $T$ , que es el tiempo en el que una dada cantidad de un radioisótopo se reduce a la mitad, por efecto de la desintegración radiactiva.

De la ecuación (1) se deduce que cuando  $N/N_0 = 0,5$ , el valor de  $\lambda t$  toma el valor 0,693.

$$T = 0,693/\lambda$$

Otro parámetro es  $\bar{T}$ , vida media de todos los átomos radiactivos.

$$\bar{T} = 1/\lambda = 1,44 T$$

## 2. Modos de desintegración:

Frecuentemente existe más de una ruta por la cual el núcleo vuelve a la estabilidad.

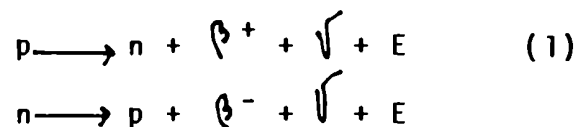
### 2.1. Desintegración alfa:

A medida que aumenta el número atómico, se requiere una relación mayor de n/p. Para números atómicos altos, la inestabilidad nuclear está asociada con la emisión de la partícula alfa. Esta partícula es un pequeño grupo de nucleones, 2 protones y 2 neutrones que forman una fuerte configuración, idéntica al núcleo del átomo de helio. Las partículas  $\alpha$  son emitidas a partir del núcleo, con una energía determinada por la diferencia de masas entre el núcleo padre y el núcleo hija, menos la correspondiente a la masa de la partícula emi-

tida. En algunos casos, sin embargo, una proporción de partículas alfa es emitida con menos de su energía máxima y por lo tanto el núcleo hija queda excitado. Esta energía de excitación se pierde luego por la emisión de un rayo gamma.

## 2.2. Desintegración beta:

Cuando el núcleo desintegra con emisión de una partícula beta, quedará con un número atómico  $Z-1$  si se emitió un positrón y  $Z+1$  si se emitió un negatrón.



La energía máxima para la partícula  $\beta^-$  es equivalente a la diferencia de las masas de los átomos iniciales y finales.

En la mayor parte de las emisiones, sin embargo, una parte de la energía es llevada por el neutrino  $\bar{\nu}$ , por lo que la energía beta es menor que el máximo. Los emisores beta están caracterizados por un espectro de energía continuo que abarca desde cero hasta el máximo. La energía promedio es aproximadamente 1/3 de la energía máxima.

## 2.3. Captura electrónica:

Una alternativa de la transición nuclear de la ecuación (1) es la captura del núcleo de un electrón de los orbitales (K ó L).



El núcleo puede quedar en un estado excitado; en este caso se emiten rayos gamma. Por otro lado, la transición puede sólo ser detectada por la radiación X característica emitida por el núcleo cuando los electrones de la capa K ó L son reemplazados.

Un proceso alternativo a la emisión de rayos X, es la emisión directa de un electrón llamado electrón Auger. Estos electrones tienen la energía del rayo X correspondiente, menos la energía de unión del electrón.

La captura electrónica compite con la emisión de positrones y puede tener lugar cuando la diferencia de energías de los núcleos, antes y después de la transformación, es menor que 1,02 MeV, necesaria para que ocurra la emisión de positrones. El positrón tiene corta vida y se aniquila emitiendo dos rayos gamma de 0,5 MeV.

#### **2.4. Conversión interna:**

La transición de un estado excitado del núcleo a su estado normal, puede tener lugar transfiriendo el exceso de energía a un electrón orbital (K, L ó M), que es eyectado con una energía igual a la energía en exceso del núcleo, menos la energía de unión del electrón.

#### **2.5. Transición isomérica:**

La transición isomérica ocurre en núcleos excitados en estado metaestable, que por emisión de un fotón gamma decaen al estado de menor energía de un isómero del nucleído.

#### **2.6. Rayos gamma:**

El núcleo se desexcita por emisión de un fotón que interactúa con un electrón que es eyectado del átomo con parte, o en algunos casos, casi toda la energía del fotón. Este electrón secundario es el agente por el cual la energía del fotón es disipada en el medio.

##### **2.6.1. Absorción fotoeléctrica:**

Este proceso es importante para energías del fotón, debajo de 0,2 MeV y para átomos de alto número atómico. La energía del fotón, menos la energía de unión del electrón orbital, es transmitida a este electrón.

La energía de unión del electrón (electrón de la capa K del átomo de oxígeno) es menor de 0,5 KeV en agua y 4 KeV (electrón K del calcio) para hueso. En tejidos blandos, por lo tanto, el fotoelectrón es eyectado con casi toda la energía del fotón.

### 2.6.2. Absorción Compton:

En este proceso, el fotón interacciona con el electrón débilmente unido o libre y le suministra parte de su energía, siendo defletrado como fotón de baja energía.

### 2.6.3. Producción de pares:

En un campo eléctrico fuerte cercano al núcleo de un átomo, un fotón puede generar un positrón y un electrón, cuando la energía del fotón es mayor o igual a 1,02 MeV. ( $\geq 2 m_0 c^2$ ).

## 3. Dosis de radiación:

Cuando un tejido es expuesto a la radiación, los cambios biológicos se deben a la energía de radiación que es absorbida en el tejido. En el caso de la irradiación por fotones es la energía impartida como energía cinética del electrón secundario. Generalmente cuando el tejido es irradiado por partículas alfa de radioisótopos, depositados internamente, la totalidad de la energía es impartida en él. Esto es frecuente en el caso de las partículas beta, excepto cuando el rango es mayor que las dimensiones del tejido.

La unidad de dosis absorbida, el **rad**, se define como la absorción de 100 erg/g. En el caso de radioisótopos depositados internamente, la dosis en rad puede ser calculada a partir del esquema de decaimiento del radioisótopo y la concentración de actividad por gramo de tejido.



La dosis absorbida es insuficiente por sí misma para predecir ya sea la gravedad o la probabilidad de los efectos deletéreos sobre la salud, debidos a la irradiación en condiciones no especificadas.

Se ha considerado conveniente introducir otra cantidad que establece una mejor relación con los efectos deletéreos más importantes de la exposición a las radiaciones. Esta cantidad, llamada dosis equivalente es la dosis absorbida ponderada por los factores modificantes.(2)

Dichos factores pueden tener en cuenta, por ejemplo, la tasa de la dosis absorbida y su fraccionamiento. La unidad de dosis equivalente es el rem. Actualmente la unidad de dosis absorbida utilizada es el gray (Gy) y la unidad de dosis equivalente el sievert (Sv).

$$1 \text{ Gy} = 1 \text{ Jkg}^{-1} \quad ( = 100 \text{ rad} )$$

$$1 \text{ Sv} = 1 \text{ Jkg}^{-1} \quad ( = 100 \text{ rem} )$$

## TECNICAS DE DIAGNOSTICO "IN VIVO"

La contribución más importante de la Medicina Nuclear en oncología es la imagen tumoral; este estudio se utiliza en el diagnóstico, en la evaluación inicial de la extensión del tumor y en el seguimiento del paciente, para determinar la respuesta al tratamiento.

Dentro de los métodos de detección, la centellografía, imagen obtenida luego de la administración de radiofármacos, juega un importante rol en la adquisición de dicha información.

Los radionucleídos utilizados en el diagnóstico por imagen centellográfica, deben reunir determinadas características físicas; las más adecuadas son las que corresponden a un emisor gamma puro con período de semidesintegración suficientemente largo, para que permita realizar el estudio y lo suficientemente corto para evitar una dosis adicional innecesaria al paciente. La energía de la radiación gamma debe estar, preferentemente, comprendida entre los 100 y 200 KeV, para facilitar la detección. El radionucleído de elección es el Tc-99m, emisor gamma de 140 KeV y período de semidesintegración de 6,02 h., de fácil disponibilidad y bajo costo.

Los radiofármacos utilizados en centellografía tumoral pueden clasificarse según los métodos por los cuales detectan el tumor: directos o indirectos. (3)

### 1. Métodos directos de detección del tumor:

Los métodos directos pueden clasificarse según el mecanismo por el cual el radiofármaco concentra en tumor.

#### 1.1. Marcadores de una función celular específica:

La aplicación del I-131 para la detección y tratamiento de metástasis funcionantes de cáncer diferenciado de tiroides,

fue iniciada por Seidlin, Marinelly y Oshry, en la década del cuarenta, sentando las bases para el estudio de la fisiología y fisio-patología de la glándula tiroides; ésta glándula atrapa selectivamente ciertos aniones del grupo VII-A como  $I^-$ ,  $TcO_4^-$ ,  $ReO_4^-$ ,  $Br^-$ ,  $ClO_4^-$  y  $MnO_4^-$  pero la organificación sólo ocurre con el  $I^-$  que se une a los residuos de tirosina de la tiroglobulina.

La metaiodobencilguanidina-I-131 (MIBG I-131) fue propuesta por Sisson y colaboradores, en 1981, para la obtención centellográfica de feocromocitomas. Posteriormente se observó que concentraba también en neuroblastomas, paragangliomas no funcionantes y tumores carcinoides. La captación sería por medio de un mecanismo tipo 1 amina, por lo que permite obtener imágenes de una gran variedad de tumores neuroendócrinos que poseen esa función. El 10% de los feocromocitomas son malignos y responden muy poco a la quimioterapia y a la radioterapia, por lo que éstos y sus metástasis no sólo pueden ser diagnosticados, sino también tratados, por lo menos, paliativamente con dosis altas de MIBG I-131.

### 1.2. Sustratos metabólicos:

Otra de las características de los tumores malignos que puede proporcionar un método para el diagnóstico centellográfico, es el incremento de la velocidad metabólica del tumor.

Spencer y colaboradores lo observaron utilizando Se-75 seleniometionina, en 1967. Hayes y colaboradores utilizaron aminoácidos marcados con C-11 y N-13 en 1976 con el mismo fin.

La no especificidad hace que éstos métodos no tengan un rol consistente en el diagnóstico tumoral por imágenes.

### 1.3. Cationes y otros agentes que son captados en el interior de la célula tumoral:

El citrato Ga-67 ha sido, desde 1970, el radiofármaco más utilizado en centellografía tumoral, particularmente en Estados Unidos. En Europa este rol lo cumple la bleomicina-Co-57. Ambos agentes son no específicos y de comportamiento errático, sin embargo en comparaciones específicas entre estos radiofármacos, la bleomicina Co-57 demostró ser superior.

El Ga-67 se une a las proteínas plasmáticas; las células en división requieren la disponibilidad de estas proteínas y de esta manera el Ga es transferido dentro de las células malignas, siendo su unión al citoplasma, aún causa de controversia. Algún mecanismo específico parece estar involucrado por el hecho de que sólo el Ga-67 de alta actividad específica (libre de portador) es captado por el tumor. Las lesiones inflamatorias también concentran este radiofármaco, contribuyendo a dar falsos positivos.

La bleomicina no es una simple sustancia, sino un complejo de péptidos solubles en agua que forman quelatos con ciertos metales. Entre los agentes utilizados en quimioterapia de cáncer, la bleomicina es uno de los pocos que se localiza en tumor. Su afinidad por el DNA sería responsable de la concentración selectiva. Varios radionucleídos han sido utilizados para marcar la bleomicina, incluyendo Co-57, In-111 y Tc-99m.

A pesar de las ventajas del Tc-99m en estudios diagnósticos por imagen, la bleomicina Tc-99m ha sido poco utilizada debido a su inestabilidad, responsable de la cual sería el método de producción.

Otros agentes que se unen a las proteínas plasmáticas que transportan metales, en especial las requeridas para el crecimiento celular, han sido propuestos para imagen tumoral, pero sin ventajas sobre el Ga-67 (Hg-203; In-111; lantánidos).

Las porfirinas y sus análogos son retenidas por la célula tumoral, siendo este mecanismo común a todas las células de división rápida; la afinidad por el tumor se reduce cuando se adiciona el radionucleído a la molécula de porfirina, sin embargo, compuestos como tetrasulfoftalocinina-Tc-99m mostraron afinidad tumoral en animales.

#### **1.4. Agentes que son captados específicamente por la superficie de la célula tumoral:**

Goldemberg y colaboradores, en 1978, desarrollaron el concepto de la imagen tumoral, utilizando anticuerpos policlonales anti-CEA (antígeno carcinoembrionario). La técnica tiene antecedentes anteriores, como la utilización de gamma-globulinas y fibrinógeno marcados (algunos resultados iniciales que requieren una mayor comprobación parecen indicar que el fibrinógeno Tc-99m, es capaz de distinguir entre tumores primarios en crecimiento y metástasis de los tumores no proliferativos que no captarían el radiofármaco.

La antegenicidad de la superficie de la célula maligna aliada a los métodos de producción de anticuerpos monoclonales, descrita por Kohler y Milstein, en 1975, ocupan un lugar preponderante en la investigación actual de la detección y terapia del cáncer.

#### **1.5. Marcadores que utilizan características del tumor, no específicas del mismo:**

Algunas características del tumor como necrosis, calcificación, expansión del espacio extravascular extracelular, explican la gran profusión de publicaciones registradas en la bibliografía sobre casos aislados de visualización de tejido tumoral, con quelatos o fosfonatos marcados con Tc-99m.

Estudios comenzados en 1984 por Ohta y colaboradores, demuestran que la captación tumoral de determinados complejos de Tc-99m, depende del estado de valencia del radio-nucleído.

Las limitaciones de dichas técnicas, por lo impredecible de los resultados, las descartan como estudios sistemáticos.

## **2. Métodos indirectos de detección del tumor:**

Los métodos indirectos se basan en el fenómeno asociado a la presencia del tumor, por ejemplo el desplazamiento del tejido de un órgano por la masa tumoral. (4)

La exploración con radiofármacos más frecuente en Medicina Nuclear oncológica es la del sistema óseo, hígado y sistema nervioso central, dado que son los órganos que con mayor frecuencia son invadidos por metástasis originadas por tumores primarios de otro origen.

### **2.1. Sistema óseo:**

Gran parte de los estudios óseos con radiofármacos se llevan a cabo para detectar metástasis óseas para evaluar el estadio de la enfermedad del paciente con tumores primarios en otros órganos. El cáncer de mama, próstata y pulmón son los que con mayor frecuencia progresan con formación de metástasis en esqueleto. El radiofármaco se concentra en la lesión dando imágenes positivas; los más utilizados son los fosfonatos (unión C-P-C) marcados con Tc-99m.

Una característica importante para la elección del agente óseo, es la relación lesión ósea/tejido óseo normal; esta relación para metiléndifosfonato e hidroxietilidendifosfonato marcados con Tc-99m (MDP-Tc-99m y HEDP-Tc-99m) es de 2,5.

Se ha propuesto el dimetilaminometilendifosfonato-Tc-99m (DMAD-Tc-99m) con una relación mayor; sin embargo, el MDP-Tc-99m es aún el más utilizado para centellografía del sistema óseo.

## **2.2. Sistema hepático:**

La centellografía hepática informa sobre la anatomía y funcionalidad del órgano, proporcionando la imagen de sus estructuras histológicas fundamentales: el parénquima hepático integrado por los hepatocitos y la del retículo endotelio constituido por las células de Kupffer.

Administrando por vía intravenosa los radiofármacos adecuados, puede estudiarse la capacidad fagocítica del sistema retículoendotelial, la distribución del espacio vascular hepático y la permeabilidad de las vías biliares.

### **2.2.1. Sistema retículoendotelial:(SRE)**

Las células de Kupffer del SRE fagocitan las partículas coloidales, por lo que la administración de un colioide radiactivo permite el estudio anatómico y funcional del hígado, bazo y médula ósea. Masas ocupantes se detectan como áreas frías.

Los radiofármacos más utilizados son el sulfuro de Tc-99m y el fitato de calcio Tc-99m.

### **2.2.2. Espacio vascular hepático:**

Las imágenes centellográficas de masas ocupantes son áreas frías (baja captación) en el estudio con coloides radiactivos.

Un segundo estudio con un radiofármaco que permanece en el espacio vascular (glóbulos rojos marcados), determina si la zona es avascular o vascularizada, con lo que aporta elementos de juicio para averiguar la etiología de las masas ocupantes.

### **2.2.3. Permeabilidad de las vías biliares:**

Los agentes hepatobiliares permiten evaluar el estado funcional del parénquima hepático, de la vesícula y tracto biliar. Se utilizan radiofármacos derivados del ácido iminodiacético, marcados con Tc-99m. El más utilizado es el diu-

tilderivado.

La introducción de un alógeno (I, Br) en el anillo aromático, aumenta su especificidad.

Imágenes seriadas permiten el seguimiento del radiofármaco a tiempos prefijados, permitiendo el diagnóstico de varias patologías, entre ellas la ictericia obstructiva (obstrucción de vías biliares por compresión de la masa tumoral).

### **2.3. Sistema nervioso central:**

Los radiofármacos empleados en la exploración del sistema nervioso central (SNC), pueden clasificarse en radiofármacos no difundibles y difundibles.

#### **2.3.1. Radiofármacos no difundibles:**

Son aquellos que no atraviesan la barrera hematoencefálica en condiciones normales.

Las técnicas utilizadas en la exploración del SNC con estos agentes de radiodiagnóstico son: angiografía radioisotópica, centellografía cerebral y cisternografía.

##### **a). Angiografía radioisotópica:**

Consiste en los estudios dinámicos que evidencian alteraciones del flujo sanguíneo que llega a distintas regiones del organismo. El flujo sanguíneo cerebral no puede medirse pero se logra una información por comparación de las zonas simétricas, separadas por el plano sagital a partir de varias imágenes centellográficas, tomadas en el primer minuto post administración durante el pasaje por los vasos del cuello y de la cabeza, de un radiofármaco no difundible inyectado por vía intravenosa en forma de bolo (volumen menor de 1 ml).



Los radiofármacos más utilizados son el dietilentriaminopentaacético y el glucoheptonato marcados con Tc-99m. Este estudio dinámico que registra el primer pasaje del radiofármaco con imágenes seriadas que distinguen un tiempo arterial, un tiempo arteriocapilar y un tiempo venoso, determinan el grado de vascularidad de una lesión focal y/o las alteraciones que el proceso localizado provoca en los vasos principales adyacentes, por lo que está indicado en presencia o sospecha de una lesión vascular. Esta prueba precede en forma rutinaria a la centellografía cerebral por la información complementaria que puede aportar.

**b). Centellografía cerebral:**

Se utilizan los mismos radiofármacos mencionados anteriormente, pero dado que se registran imágenes estáticas, puede utilizarse para registrar la imagen el centellografo lineal, por lo que en este caso pueden emplearse radiofármacos de In-113m como el DTPA-In-113.

Las lesiones se evidencian por la mayor concentración del radiofármaco, con respecto a la escasa densidad radiactiva del parénquima normal.

**c). Cisternografía:**

Inyectado por punción lumbar o suboccipital, el radiofármaco permite estudiar la cinética del líquido cefalorraquídeo (LCR), por lo que detecta entre otras patologías (hidrocefalia, fístulas del LCR), la presencia de metástasis vertebrales y compresión medular. Por las características que debe reunir un radiofármaco para cisternografía, el más aconsejable es el DTPA-In-111, aunque también se utiliza DTPA-Tc-99m y albúmina I-131.

**2.3.2. Radiofármacos difundibles:**

El uso de la tomografía computada y más recientemente la resonancia magnética nuclear en el diagnóstico por imagen, ha disminuído el uso de los agentes radiactivos en los estudios diagnósticos cerebrales; sin embargo, en los últimos

años ha surgido un nuevo interés en los radiofármacos que posibilitados de atravesar la barrera hematoencefálica, permiten estudios de perfusión regional.

El radiofármaco más adecuado para estos estudios, es un derivado de la propilenaaminaoxina (PnAO), el HM-PAO-Tc-99m.

Para el registro de las imágenes se utilizan equipos SPECT (single photon emission computed tomography) tomografía de emisión de fotón único.

La dificultad de encontrar el trazador adecuado y los requisitos para la visualización de las imágenes, hace que los emisores de positrones sean los más apropiados para los estudios de metabolismo cerebral, biosíntesis proteica y bioquímica de los neuroreceptores, por lo que las imágenes deben registrarse en equipos PET (positron emission tomography).

Ambas técnicas y los radiofármacos adecuados, han permitido un gran avance en el conocimiento de los procesos bioquímicos "in vivo".

### **3. Radiofármacos en la regulación de la quimioterapia oncológica:**

En Medicina Nuclear oncológica cobra un relevante papel los estudios radioisotópicos para regular la quimioterapia, controlando los efectos cardiotoxicos (Adriamicina) o nefrotóxicos, (cis-platino).

Los estudios radiocardiológicos que proporcionan una valiosa información sobre la tolerancia al tratamiento, son los hemodinámicos. Existen numerosas técnicas exploratorias que permiten obtener diversos parámetros hemodinámicos basándose en el registro precordial, mediante detectores adecuados, de los cambios de radiactividad de las cavidades cardíacas, luego de la administración intravenosa de un trazador que, durante la exploración permanece en el interior del torrente circulatorio. Estos cambios de

actividad son motivados por el volumen cambiante de sangre, contenido en las cavidades cardíacas. La información obtenida y las indicaciones incluyen: volumen sanguíneo, gasto cardíaco, volumen latido, tiempos circulatorios, volumen de sangre contenida en el lecho pulmonar, insuficiencia cardíaca, detección de cortocircuitos, representación gráfica de la dinámica regional cardíaca, movimiento de la pared y la que se vincula con mayor frecuencia a la cardiotoxicidad de la Adriamicina, la fracción de eyección.

La marcación del pool sanguíneo se realiza utilizando hematíes marcados con Tc-99m. La técnica consiste en la administración de un compuesto de  $\text{Sn}^{2+}$  ( $15 \mu\text{g/kg}$  peso corporal), en forma intravenosa y a los 20 minutos por la misma vía, la solución de pertechnetato ( $\text{Tc-99m O}_4^-$ ); el compuesto de estaño más utilizado es el pirofosfato de Sn.

En el seguimiento de la nefrotoxicidad de las drogas utilizadas en terapia oncológica, se utilizan pruebas funcionales renales, en especial la determinación del volumen de filtración glomerular (volumen de plasma que atraviesa y es depurada por los glomérulos en la unidad de tiempo), midiendo la depuración plasmática de una sustancia que es filtrada por los glomérulos y no es reabsorbida ni secretada por los túbulos renales. Un radiofármaco con estas características es el DTPA-Tc-99m.

## TECNICAS DE DIAGNOSTICO "IN VITRO"

Uno de los mayores logros en la investigación del cáncer, fue el descubrimiento en carcinomas humanos, de antígenos asociados al tumor; la mayoría pertenecen a la categoría de antígenos carcinofetales (CFAs), es decir que están presentes en grandes cantidades en carcinomas y también en tejidos fetales, pero ausentes o presentes en pequeñas cantidades en tejidos normales. (5)

Prototipos de CFAs son las alfa feto proteínas (AFP) y el antígeno carcinoembrionario (CEA), ambos de gran relevancia en clínica como marcadores de tumor, especialmente CEA, dado que por su falta de especificidad hace que pueda ser determinado en casi todos los tumores sólidos, aunque especialmente es el marcador de elección para aquellos tumores alojados en el tracto intestinal.

Hay una correlación directa entre la cantidad absoluta de antígeno en el tumor y su concentración en sangre. La determinación en sangre de pacientes oncológicos se realiza por métodos altamente sensibles como el radioinmunoensayo (RIA).

Desafortunadamente, la positividad aumenta sólo en presencia de metástasis, por lo tanto, no diagnostica la enfermedad en su fase temprana, sino que es usado para la evaluación de la diseminación del cáncer, en la detección de la recurrencia de la enfermedad durante la etapa post operatoria o en pacientes tratados con quimio, hormona o radioterapia.

Las características de los radionucleídos utilizados en el diagnóstico tumoral "in vitro" incluyen: período de semidesintegración suficientemente largo como para evitar las correcciones de decaimiento a lo largo de la experiencia, posibilidad de ser registrado en los equipos comunes

de detección (detector de centelleo sólido o líquido), de fácil incorporación a las moléculas de los compuestos. El radionucleído de elección es el I-125, de período de semidesintegración 60 días, emisor gamma de 75 KeV, puede, en general, ser incorporado fácilmente a diversas moléculas.

AGENTES EN EL DIAGNOSTICO ONCOLOGICO  
POR RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

La RMN, absorción y reemisión de la energía electro-magnética de radiofrecuencia, por ciertos núcleos situados dentro de ciertos campos magnéticos, es un fenómeno totalmente diferente de las reacciones nucleares encontradas rutinariamente en Medicina Nuclear. (6)

Si bien la inestabilidad nuclear y el decaimiento con la directa o indirecta asociada liberación de energía gamma son conceptos familiares, la RMN hace uso de otras propiedades del núcleo: carga eléctrica y spin nuclear.

Todo núcleo que tiene un número impar de electrones o protones (o ambos), tiene un spin asociado semejante al spin de la tierra alrededor de su eje; como todo núcleo también tiene por lo menos una unidad de carga, este núcleo tendrá un campo magnético o momento magnético, generado por la corriente eléctrica efectiva del movimiento (spin) del núcleo cargado. Este campo magnético es muy pequeño y cacterístico de cada núcleo. La manipulación de esta propiedad magnética natural del núcleo por campos magnéticos artificiales, caracteriza todas las experiencias de RMN.

El momento magnético del spin nuclear, cuando está situado dentro de un campo magnético externo, actúa como la aguja de la brújula dentro del campo magnético de la tierra. Por ejemplo: el núcleo de la muestra en examen tenderá a alinear sus campos magnéticos con las líneas de fuerza del campo magnético externo. El momento magnético nuclear que, en ausencia de un fuerte campo magnético tenía una orientación al azar, ahora se alinea pudiendo hacerlo sólo en dos estados: en sentido paralelo o en antiparalelo con el campo, siendo la tendencia de alinearse con el campo mayor

que la de alinearse en sentido contrario, debido a que en el primer caso se confiere una energía más baja.

El exceso de núcleos que se alinean paralelos al campo magnético externo, es mayor a medida que aumenta ese campo. Dentro de la muestra, la sumatoria de todos esos excesos forma el momento magnético macroscópico o magnetización (M), cuyo vector está alineado con el campo magnético externo  $B_0$ .

Desde un punto de vista práctico, magnetos de campos de fuerza altos, proveen mayor relación señal versus ruido, que puede ser trasladado a imágenes por RMN con mejor resolución espacial o reducción del tiempo para tomar la imagen.

La exacta magnitud de M, no sólo depende de la fuerza del campo, sino también de la temperatura y el grado del campo magnético intrínseco asociado a un tipo dado de núcleo que está caracterizado por una constante  $\gamma$ : el radio giromagnético.

Los isótopos estables del hidrógeno ( $H-1$ ), fósforo ( $P-31$ ), carbono ( $C-13$ ) y fluor ( $F-19$ ) son todos capaces de presentar el fenómeno de RMN; en particular el hidrógeno, debido a su alta concentración y el fósforo, debido a su rol en el metabolismo celular, son de gran interés biológico y proporcionan el foco de atención para las aplicaciones médicas de la RMN; esto, además de su alta abundancia en el cuerpo, hace del  $H-1$  el núcleo más conveniente para imagen por RMN.

El vector de magnetización del núcleo en el equilibrio es de muy poco interés por ser muy difícil de medir, sin embargo, cuando se mueve, este vector exhibe propiedades dinámicas de gran interés para físicos y biólogos. Una de esas propiedades dinámicas, que es básica para el fenómeno de resonancia magnética, es llamada precession.

El vector de magnetización  $M$  rotará en un espacio cónico alrededor de la dirección del campo magnético  $B_0$ . El número de rotaciones que ocurren por segundo ( $\nu$ : precessional motion frequency), es proporcional a la fuerza del campo magnético local que es la suma del campo externo aplicado, modificado por los pequeños campos magnéticos asociados al ambiente local molecular.

$$\nu_{\text{local}} = (\gamma / 2 \pi) B_{\text{local}}$$

Esta frecuencia cae dentro de los valores de la radiofrecuencia 4-400 MHz.

La frecuencia local provee información del ambiente químico de las especies nucleares y por aplicación de campos magnéticos en gradiente, la respuesta de la frecuencia puede proporcionar información estructural de la muestra. Para generar una señal de RMN, se debe desplazar el vector de magnetización  $M$  que, en el equilibrio es paralelo a  $B_0$ . Esto puede hacerse aplicando a la muestra un segundo campo magnético  $B_1$ , mucho más pequeño que el primero y perpendicular a él y a  $M$ .

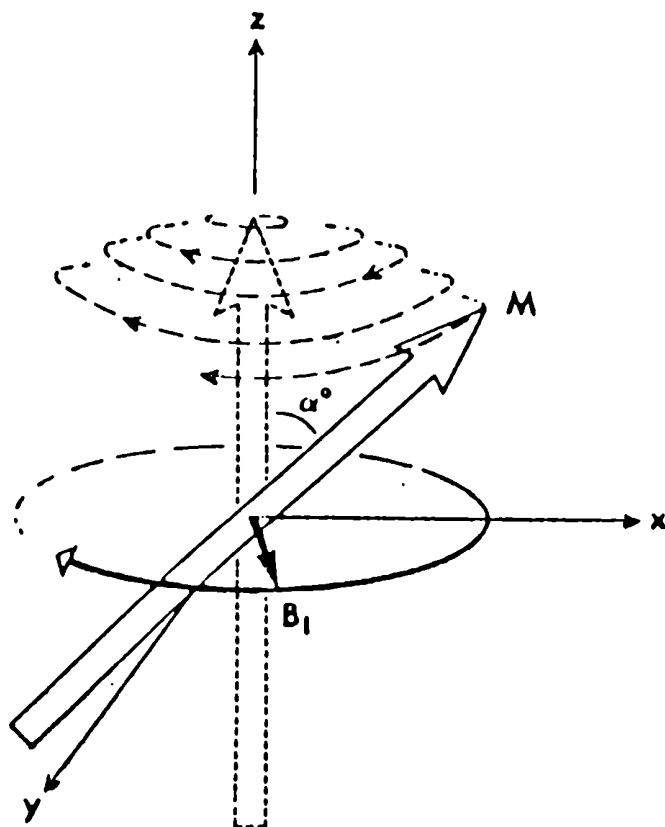
Para producir  $B_1$  se utilizan pulsos de RF, dado que por la naturaleza de sus propiedades electromagnéticas, presenta un campo oscilatorio  $B_1$  asociado. Sin embargo, si los pulsos de RF son aplicados a frecuencias muy diferentes de  $\nu_0$ ,  $M$  no se moverá de su posición de equilibrio. (FIGURA 1)

Luego del pulso de RF, el vector de magnetización vuelve a su posición de equilibrio y la señal de RMN decae en el tiempo (llamada libre decaimiento de inducción: FID).

Para extraer la información, a partir de FID, se utiliza la transformación de Fourier, que convierte la intensidad de la señal versus tiempo en intensidad de señal versus frecuencia; de esta manera se transforman las múltiples frecuencias generadas, por ejemplo en una muestra de etanol, debido a sus tres hidrógenos de los grupos  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$  y  $\text{OH}$ , en tres frecuencias de resonancia, características de cada grupo con picos característicos de áreas



FIGURA Nº 1



Aplicando un pulso de radiofrecuencia resonante con  $\omega_0$  (equivalente a un segundo campo magnético rotatorio transversal  $B_1$ ) el vector de magnetización neto  $M$  se mueve dentro del plano x-y.  $M$  rota alrededor del campo estático paralelo al eje z. El ángulo  $\alpha$  que forma  $M$  con el campo estático aumenta con el tiempo de permanencia del pulso de RF.

proporcionales a la cantidad de cada grupo en etanol.

El proceso de decaimiento de la señal emitida FID, está caracterizado por dos constantes de tiempo, relacionadas con la muestra: T1 (longitudinal o spin lattice) y T2 (transversal o spin-spin) llamados tiempos de relajación.

El interés médico en los tiempos de relajación, data de 1971, cuando Damadian demuestra que los tumores tienen valores de T1 prolongados, comparados con tejidos normales.

Estos parámetros permiten un contraste excelente de tejidos blandos y sensibilidad para la detección de lesiones con imágenes obtenidas por RMN del H1.

El T1 o tiempo de relajación longitudinal, es llamado así porque es la medida de cuán rápido el vector de magnetización recupera su componente longitudinal, quedando paralelo al campo magnético principal  $B_0$ .

Como la energía se pierde desde el sistema de spin nuclear hacia estructuras moleculares vecinas, en este proceso otro nombre comúnmente empleado es spin-lattice relaxation.

En la mayoría de los tejidos blandos, T1 tiene valores entre 150 y 1000 ms; esto significa que luego de un tiempo T1, el valor del componente de magnetización, después del pulso de RF, ha recuperado el valor que tenía en el equilibrio en un 69%.

El otro parámetro de relajación T2 o tiempo de relajación transversa, es la medida de la disminución de los componentes de magnetización perpendiculares (o transversales) a la dirección del campo  $B_0$ . Este proceso no se caracteriza por una pérdida de energía a partir del spin nuclear, sino a un intercambio de energía entre miembros

del sistema de spin (por eso el nombre relajación spin-spin).

Si bien no se pierde una energía neta en este proceso, ocurre un desfasaje de muchos momentos magnéticos-nucleares diferentes. El resultado es que toda la magnetización en el plano transversal, la suma de los momentos individuales tiende a cero. Una manera de visualizar este desfasaje es notar que el núcleo, debido a interacciones con sus vecinos, muestra campos magnéticos levemente diferentes.

## 1.- APLICACION DE LA RMN AL DIAGNOSTICO DEL CANCER.

La aplicación de las técnicas de RMN al diagnóstico del cáncer, fue explorado por primera vez por Damadian, quien propuso que tejidos benignos y malignos pueden ser diferenciados en base a diferencias características en los tiempos de relajación determinados "in vitro" con RMN. La tesis de Damadian fue muy controvertida; la utilidad potencial de la RMN en oncología, fue incrementada considerablemente por el trabajo de Lauterbur, quien mostró que las señales de RMN pueden ser codificadas para producir imágenes del objeto a examinar. Las imágenes de RMN ha hecho posible la medición de T1 y T2 de lesiones "in vivo".

La espectroscopía "in vivo" de protones, P-31 y otros núcleos sensitivos a la RMN, pueden llevarse a cabo por varios métodos; estas técnicas pueden ser útiles en el estudio del cáncer. Por ejemplo, Adams y colaboradores, han utilizado RMN para estudiar los efectos de la radioinmunoterapia con el estudio "in vivo" por P-31 RMN de tumores implantados en ratón. Se encontró que el espectro del P-31 de tumores que crecen rápidamente, es muy diferente de los tumores necróticos, reflejando diferencias en sus estados metabólicos.

La investigación sugiere que la espectroscopía del P-31 por RMN, puede ser utilizada para monitorear, en forma no invasiva, la respuesta metabólica de los tumores a la terapia.

La utilidad clínica de las imágenes es firmemente establecida en la examinación del sistema nervioso central (SNC); con excepción de lesiones calcificadas, tumores intraaxiales son por lo menos tan detectables con RMN como con CT (tomografía computada). Microadenomas pituitarios y meningiomas, son menos detectados con RMN, problema que puede ser corregido por el uso de agentes de contraste paramagnéticos.

## 2. AGENTES DE CONTRASTE PARAMAGNETICOS.

Las diferencias en los tiempos de relajación, son la fuente de la mayor parte de los contrastes observados en imágenes con RMN, no solamente entre órganos normales y tejidos, sino entre lesiones y tejidos adyacentes. Si bien esas diferencias son comúnmente grandes, hay situaciones de bajo contraste en las cuales sería deseable incrementar la visibilidad de un órgano o región.

Una manera para conseguirlo es administrar sustancias que cambian los tiempos de relajación del protón en tejidos, sin causar efectos tóxicos significativos u otros cambios fisiológicos. Iones paramagnéticos y moléculas, ambas con electrones no apareados, pueden ser útiles para dicho propósito, dado que los efectos magnéticos muy grandes asociados con estos electrones, pueden aumentar drásticamente los tiempos de relajación del protón del agua.

Se ha demostrado que hay un factor de aumento significativo para la relajación de los protones del agua por los iones magnesio en tejido, inyectado como  $Mg^{2+}$  o como complejo de citrato o EDTA. Se han utilizado otros iones metálicos paramagnéticos, tales como  $Gd^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $V^{2+}$  y  $Cr^{3+}$ , pero el mejor agente de relajación es el  $Ga^{3+}$ . Algunos iones metálicos son desaconsejados por su toxicidad.

Los radicales libres de nitroxidos estables, son moléculas orgánicas con un electrón no apareado; han sido utilizados en estudios biológicos "in vitro" como marcadores de spin y fueron propuestos como agentes de contraste para las imágenes médicas de RMN.

Otra de las sustancias paramagnéticas propuestas, es el oxígeno molecular, no tóxico y de metabolismo bien conocido.

Los quelatos macrocíclicos paramagnéticos se muestran promisorios como agentes de contraste para imagen por resonancia magnética, comparables a los quelatos de DTPA. El complejo de ciclamato  $Mn^{3+}$  produce un efecto comparable al  $Ga^{3+}$  DTPA.



## RADIONUCLEIDOS PARA TERAPIA INTERNA ONCOLOGICA

El uso terapéutico de los radiofármacos administrados internamente, ofrece un potencial similar a la radioterapia convencional y a la quimioterapia, debido a que los radiofármacos selectivamente irradian el órgano blanco, en forma no invasiva ni traumática y con la ventaja de provocar más baja incidencia de leucemia y otros cánceres que la quimio o la radioterapia.

Esta afirmación está basada en los estudios retrospectivos sobre 40 años de experiencia en el uso de iodo radiactivo, para tratamiento del hipertiroidismo y del cáncer de tiroides y el uso de fósforo radiactivo en el tratamiento de la policitemia vera.

El criterio para seleccionar un radionucleído para terapia tumoral, es totalmente inverso al utilizado para diagnóstico; mientras en el primer caso un emisor beta sería adecuado, dado que disipa su energía ionizante en un volumen pequeño de tejido a ser tratado, sería inapropiado para diagnóstico por el corto alcance, lo que dificultaría su registro por el detector de imagen y además, contribuiría a una dosis de radiación innecesaria para el paciente. El criterio más aceptado es elegir para terapia un emisor beta de corto período de semidesintegración. El I-131, P-32 y Au-198 han sido los radionucleídos más utilizados en terapia. El inconveniente de los radionucleídos de largo período de semidesintegración, es la baja velocidad a la cual es suministrada la radiación, resultando insuficiente para producir una respuesta favorable.

Actualmente, la lista se ha ampliado, siendo varios los radionucleídos con características físicas apropiadas, que pueden ser utilizados en terapia, siempre que se disponga de un vehículo adecuado para obtener altas concentraciones en el tejido tumoral, con captación mínima en otros tejidos. (7)

## - RADIONUCLEIDOS EMISORES BETA.

La terapia con radionucleidos se lleva a cabo en forma rutinaria, utilizando radioisótopos emisores beta. Si bien en teoría pueden emplearse partículas cargadas negativas o positivas, en la práctica sólo se usan negatrones. Las partículas cargadas beta negativas son emitidas con valores de energía continuos, hasta un máximo, por lo que presentan también una distribución de alcance en determinado medio, siendo en promedio igual a la energía máxima en MeV dividido 0,2.

La Tabla Nº 1 muestra los radionucleidos que han sido utilizados para terapia, están bajo investigación para su posible uso o bien han sido sugeridos para ser utilizados. (8)

El valor de la última columna, dado por una radiación particular, refleja la dosis de radiación localizada a ser liberada a partir de una dada cantidad de un determinado radionucleído, cuando se encuentra uniformemente distribuido en un tejido y se expresa en gramos-rad por microcurie-hora.

Cada uno de los procesos de decaimiento beta negativo, puede dejar estados excitados de los núcleos producidos; la energía remanente es liberada por emisión de uno o más rayos gamma.

La emisión del positrón o el electrón de captura pueden también ser acompañados por electrones de conversión, rayos X y electrones Auger.

La presencia de radiación gamma ofrece la posibilidad de obtener la imagen con dosis subterapéuticas, previo al tratamiento, para obtener información necesaria para estimar la dosis terapéutica.



TABLA Nº 1

ISOTOPOS BETA EMISORES PARA TERAPIA

ISOTOPO	PERIODO DE SEMIDESINTEGRACION	E (max) KeV	ALCANCE MAX. mm	g rad/ $\mu$ Ci h
Er-169	9,4 d	350	1,0	0,22
Sn-121	27,1 h	380	1,2	0,24
Cu-67	61,9 h	580	2,2	0,33
I-131	8,0 d	610	2,4	0,40
Te-127	9,4 h	700	2,9	0,48
Br-83	2,4 h	920	4,2	0,68
Pr-143	13,6 d	940	4,2	0,67
Au-198	2,7 d	960	4,4	0,69
Pd-109	13,5 h	1030	4,8	0,93
Re-186	90,6 h	1070	5,0	0,73
Dy-165	2,3 h	1290	6,4	0,95
P-32	14,3 d	1710	8,7	1,48
Re-188	17,0 h	2120	11,0	1,66
Pr-142	19,1 h	2160	11,3	1,72
Y-90	64,1 h	2280	12,0	1,99

- RADIONUCLEIDOS EMISORES ALFA.

El decaimiento alfa ocurre con la emisión del núcleo de helio con una energía entre 5 a 8 MeV; la transferencia lineal de energía es de aproximadamente 100 KeV/ $\mu$ m en agua y es casi constante a lo largo del recorrido. Las partículas alfa tienen, por lo tanto, alcances de 50-80 $\mu$ m ó 5-8 diámetros de células.

Debido a su alta energía inicial y alta transferencia lineal de energía, depositan una alta cantidad de energía por unidad de volumen.

Desafortunadamente, el número de emisores alfa disponibles para terapia es limitado. Los dos más estudiados han sido At-211 y Bi-212. (9)

Astatina-211 se produce por la reacción alfa-2n en Bi-209. Tiene un período de semidesintegración de 7,2 h y emite alfas de 6 y 6,7 MeV, con una energía promedio de 6,5 MeV. Debido a su corta vida debe ser utilizado en el lugar de producción.

Bismuto-212 se puede obtener como elución del generador que puede producirse utilizando cualquiera de los precursores de la cadena de decaimiento, pero el Ra-224 parece ser el más útil para uso rutinario.

Th-228 (1,9 a)  $\longrightarrow$  Ra-224 (3,8 d)  $\longrightarrow$  Rn-220 (56 s)  $\longrightarrow$   
Po-216 (0,15 s)  $\longrightarrow$  Pb-212 (10,6 h)  $\longrightarrow$  Bi-212 (60 min)

El Bi-212 decae a Po-212 por misión beta, seguido de una partícula alfa de 8,9 MeV en un 64%. La otra manera, 36%, es por decaimiento alfa de 6 MeV a Tl-208 de 3 min., que decae luego por emisión beta de 1,0-1,8 MeV con rendimiento cercano al 100%.

## RADIOFARMACOS EN TERAPIA TUMORAL

El éxito en el tratamiento del cáncer con radiofármacos, depende principalmente en conseguir una alta relación tejido tumoral/tejido normal. Este cociente tiene que ser especialmente alto con respecto a órganos sensibles a la radiación, como médula ósea, mucosa intestinal, hígado y riñones.

La radiación máxima que esos órganos radiosensibles pueden tolerar y aún continuar con sus funciones vitales son:

Médula ósea	200 rad
Mucosa intestinal	700 rad
Riñón	1.500 rad
Hígado	2.500 rad

Para que la terapia sea efectiva debe conseguirse una alta concentración del radiofármaco en tumor.

Algunos de los procedimientos utilizados para obtener la localización de los radiofármacos en los estudios diagnósticos, pueden ser adaptados para propósitos terapéuticos. (10)

### 1. RADIOFARMACOS QUE ENTRAN POR UN CAMINO METABOLICO ESPECIFICO.

El mejor ejemplo es el atrapamiento del radioiodo por el tumor diferenciado folicular o papilar-folicular de tiroides. El radioiodo se une a la molécula de tirosina de la tiroglobulina y el radionucleído permanece en el tumor el tiempo suficiente para liberar una dosis de radiación selectiva en el tumor. Se estima que la dosis de radiación de 150 mCi de I-131 proporciona 20.000 rad al tumor diferenciado de tiroides de 1 cm<sup>3</sup>. El uso del I-131 para el tratamiento del carcinoma de tiroides metastásico, es bien tolerado y prolonga, en forma significativa, la sobrevida del paciente.

Más recientemente se ha comprobado la localización preferencial de la metaiodobencilguanidina-I-131 (MIBG-I-131),

en tumores de origen adrenérgico como feocromocitoma, carcinomaideo y neuroblastoma. Esto, probablemente, se deba al desplazamiento por el MIBG-I-131 de la norepinefrina de los gránulos de almacenaje intraneurales. Se han tratado pacientes con tumores originados en la cresta neural con dosis terapéuticas de MIBG-I-131.

Sin embargo, la mayoría de los tumores no poseen un único camino metabólico que permita la utilización de radiofármacos que entren al tumor por caminos específicos.

## 2. RADIOFARMACOS QUE ATACAN LA SUPERFICIE CELULAR.

El rápido avance de la tecnología del hibridoma en la última década, ha permitido el desarrollo de los anticuerpos monoclonales, a una variedad de antígenos asociados al tumor.

El alto grado de especificidad de estos agentes, ha orientado el interés en la aplicación de la inmunoterapia al tratamiento de enfermedades malignas. (11)

Pero los anticuerpos monoclonales han demostrado ser inefectivos para la destrucción del tumor, en parte, debido a la distribución heterogénea de los antígenos asociados al tumor en la superficie de la célula tumoral, debido a lo cual algunas células tumorales que no tienen antígeno, continuarían su proliferación.

En vista de ésto, se ha enfatizado en el estudio de anticuerpos monoclonales que transportan radionucleídos emisores alfa o beta. Como el recorrido de estas partículas es en exceso de varios diámetros celulares, se espera que una vez que la partícula está en el tumor, destruirá tanto las células antígeno negativas como las positivas.

Existen dificultades en el uso de estos agentes para terapia tumoral.

### **2.1. Estabilidad:**

La baja estabilidad del anticuerpo monoclonal radiomarcado "in vitro" e "in vivo".

### **2.2. Permanencia:**

Corta permanencia de la unión del anticuerpo monoclonal radiomarcado al antígeno de la superficie de la célula tumoral.

### **2.3. Período de semidesintegración del radionucleído:**

La baja velocidad a la cual es suministrada la radiación, como sucede con los radionucleídos de largo período de semidesintegración (I-131), resulta insuficiente para producir una respuesta favorable. Es preferible utilizar radionucleídos de corto período de semidesintegración para producir lisis del tumor. Se investigan actualmente Pd-109 (T:13 h) y Y-90 (T: 2,7 d) para unir a los anticuerpos monoclonales al tumor.

### **2.4. Competición con los antígenos circulantes:**

Es la competición de los anticuerpos radiomarcados con los antígenos circulantes asociados al tumor, frecuentemente presentes en el suero de pacientes portadores de cáncer. Se ha propuesto administrar previo al radiomarcado, el anticuerpo monoclonal sin marcar para que se una a los antígenos asociados al tumor que circulan libremente. Esto permitiría la destrucción efectiva del tumor por la localización selectiva del anticuerpo radiomarcado.

### **2.5. Inmunoreactividad:**

Pérdida de la inmunoreactividad debida al procedimiento de marcación del anticuerpo. Esta inactivación puede deberse a reacciones cruzadas intra o intermoleculares, resultado de la desnaturalización de la proteína.

### 3. ADMINISTRACION REGIONAL DE RADIOFARMACOS.

El uso de la inyección local de radiofármacos para terapia tumoral ha sido utilizado por varios investigadores, a pesar de que en muchos casos el acceso al tumor en forma completa es dificultoso.

Durante varios años, se ha administrado en forma intraperitoneal, el fosfato crómico coloidal P-32 y el coloi-  
de de Au-198, para tratamiento paliativo en pacientes can-  
cerosos con retención de líquido ascítico. (12)

Se han utilizado microesferas radiomarcadas, adminis-  
trándolas por cateter en la arteria hepática, para trata-  
miento de tumores intrahepáticos.

La presencia de metástasis diseminadas, impide, en la  
mayoría de los casos, el uso de la inyección regional de  
radiofármacos, ya sea directamente o por vía angiográfica,  
siendo la aplicabilidad clínica muy limitada a tumores ais-  
lados y fácilmente accesibles.

### 4. INTERCAMBIO Y ADSORCION SOBRE SUPERFICIES.

Los factores que influyen en la localización ósea de  
los radiofármacos, son la vascularidad y la velocidad de  
formación del tejido óseo.

Los sitios de formación rápida, como los tumores me-  
tastásicos óseos, están asociados con aumento de superfi-  
cie de intercambio y adsorción.

Las metástasis óseas diseminadas pueden ser tratadas  
paliativamente con radiofármacos emisores beta, que concen-  
tran en hueso y especialmente en las metástasis. Estos ra-  
diofármacos incluyen:

Sr-89

Actúa por su similitud con el Ca y por su facilidad para la sustitución catiónica en la hidroxiapatita  $\text{Ca}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . (13)

Compuestos de fósforo marcados

Los fosfatos y fosfonatos marcados con P-32, Re-186, Sm-153, I-131, reaccionan a través de los grupos fosfato por adsorción en el calcio de la hidroxiapatita del hueso. (14)





## FUNDAMENTOS DE LA TESIS

La captación del radiofármaco por el tumor responde a alguna o varias características del mismo. Esta captación será más o menos específica según esta característica lo sea del tumor.

Algunos radiofármacos para diagnóstico o terapia tumoral se han desarrollado previo conocimiento de determinadas características; otros, sin embargo, concentran por mecanismos no totalmente esclarecidos.

En todos los casos el comportamiento "in vivo" de estos radiofármacos contribuye al conocimiento de la fisiopatología tumoral. Por lo tanto, es de fundamental importancia estudiar las variables que influyen en dicho comportamiento, porque además, y no es lo menos importante, se mejora la eficacia de los estudios diagnósticos y tratamientos terapéuticos.

El motivo de esta tesis es optimizar los métodos de producción de radiofármacos utilizados o propuestos para su uso en diagnóstico y terapia tumoral, investigando aquellos aspectos que completan el conocimiento de los factores a tener en cuenta para que el comportamiento del radiofármaco no sea errático, asegurando que sólo se administran radiofármacos inocuos y efectivos, de una calidad uniforme y en dosis apropiadas.

Como en el caso de otros productos farmacéuticos, el grado de calidad está determinado fundamentalmente por dos procedimientos:

- 1). fijación de normas para el producto
- 2). el proceso de fabricación y manejo

y evaluado implementando los controles de calidad.

## - CONTROL DE CALIDAD DE RADIOFARMACOS

El control de la calidad es un proceso continuo que comienza con el diseño del producto y las especificaciones que rigen las materias primas a partir de las cuales se va a obtener. Para mantener una calidad uniforme será preciso que se determinen especificaciones (es decir normas) para todos los radiofármacos, desde que empiezan a prepararse, inclusive en los ensayos clínicos.

En la sexta edición de la FARMACOPEA NACIONAL ARGENTINA se incluye un suplemento que fija las especificaciones para la mayor parte de los radiofármacos utilizados en la fecha de su publicación, 1982.

Cuando el radiofármaco no está normalizado el productor debe fijar las especificaciones que aseguren la inocuidad y efectividad del producto.

A través de lo que se ha denominado "prácticas adecuadas para la fabricación", se asegura que cada uno de los lotes del producto se atiene a las normas establecidas.

A causa de las propiedades especiales de los radiofármacos y sus procedimientos particulares de manejo, el usuario se encuentra en una situación muy distinta de la que experimentan las personas que han de manejar fármacos no radiactivos. La desintegración radiactiva complica la especificación de dosis al paciente y el hecho de que el usuario haya de dar los últimos toques a la preparación de materiales procedentes de generadores y juego de reactivos, divide la responsabilidad entre el fabricante comercial y el usuario.

Por lo tanto, además de las prácticas correctas de fabricación debe considerarse las prácticas correctas aplicables a la preparación final y a la administración de los radiofármacos llamadas "prácticas adecuadas en radiofarmacia" que hace referencia a los siguientes aspectos: personal, equipo, locales, documentación, seguridad radiológica y control

analítico de la calidad. (15), (16)

- Control analítico de la calidad:

Todos los productos farmacéuticos están sujetos a varios controles específicos que tienden a su identificación, calidad, estabilidad, etc.

El criterio que se adopta para el control de los radiofármacos está regido por su característica radiactiva: vida limitada, poder ionizante de la radiación y baja concentración que contribuye a la complejidad de los cambios producidos en el producto.

Los controles analíticos llevados a cabo en los radiofármacos difieren en algunos aspectos de aquellos a los que se someten los fármacos convencionales, cuando se hace referencia a la determinación de:

- a). Pureza radionucleídica
- b). Concentración radiactiva
- c). Actividad específica
- d). Pureza química
- e). Pureza radioquímica
- f). Afinidad biológica

a). Pureza radionucleídica:

La pureza radionucleídica es el porcentaje de actividad correspondiente al radionucleído especificado.

Las impurezas radionucleídicas (o radionuclídicas) pueden presentarse por impurezas presentes en el blanco a irradiar, reacciones secundarias producidas en el blanco, subproductos de decaimiento, deficiencias en los procesos separativos, etc.

Cuando el período de semidesintegración de la impureza es mayor que el del radionucleído de interés, el problema se acentúa, pues en este caso la pureza radionucleídica disminuirá con el tiempo.

El control de la pureza radionucleídica es importante para asegurar que la biodistribución no está influenciada por alguna impureza radiactiva y también para minimizar la radiación absorbida por el paciente.

La pureza radionucleídica se determina en el isótopo primario, el que será incorporado a diferentes moléculas.

El productor declara las impurezas presentes, que no deben superar límites preestablecidos por las normas.

- Determinación de la Pureza Radionucleídica:

La investigación y determinación de la pureza radionucleídica se lleva a cabo analizando la energía y el tipo de las radiaciones emitidas por el análisis del espectro de radiación, emitido por la muestra.

- Espectrometría gamma:

Se utilizan detectores de centelleo (NaI-Tl) o de estado sólido (Ge-Li ó Ge hiperpuro) que permiten medir la energía de los fotones emitidos y cuantificar el área bajo sus picos. Conocido el esquema de desintegración y la abundancia a través del espectro patrón del radionucleído puro y la eficiencia del detector, se podrá calcular la actividad absoluta de la muestra y de las probables impurezas identificadas.

A pesar de que la eficiencia de los detectores de estado sólido es menor que el detector de NaI-Tl, la alta resolución especialmente del Ge-hiperpuro los hace más adecuados para el estudio de la pureza radionucleídica.

- Espectrometría beta:

Considerando su alta eficiencia, los detectores de centelleo líquido se utilizan preferencialmente para emisores beta de baja energía.

En caso de espectrometría beta pura se utilizan detectores de barrera de superficie que son de alta resolución.

- Espectrometría alfa:

Los detectores de barrera de superficie se utilizan para la detección de las impurezas alfa emisoras. Los límites permisibles de estas impurezas son del orden del límite de detección de los detectores actualmente en uso.

- Atenuación gamma:

Es un método simple que da una medida aproximada de la pureza radionucleídica. El análisis se realiza utilizando una cámara de ionización.

Por ejemplo, para determinar la pureza radionucleídica del eluido de un generador de Mo-99/Tc-99m, se mide éste utilizando un blindaje de Pb de 6 mm de espesor, deteniendo el flujo de fotones de 140 KeV del Tc-99m y detectando parte del flujo de fotones de 790 KeV de la impureza radionucleídica Mo-99 (con un patrón de Mo-99 de actividad conocida, se determina qué porcentaje de la actividad de éste (P) no queda retenida por el blindaje.  $F=100/P$ ).

Ejemplo:

Actividad del eluido medida sin blindaje: 600 mCi de Tc-99m  
Actividad del eluido medida con blindaje: 29  $\mu$ Ci de Mo-99  
F: 4,2 (P=24%)

$$\text{pureza radionucleídica} = \frac{(29,0 \times 4,2) \mu\text{Ci Mo-99}}{600 \text{ mCi Tc-99m}} = 0,2 \frac{\mu\text{Ci Mo-99}}{\text{mCi Tc-99m}}$$

b). Concentración radiactiva:

La actividad se expresa relacionándola con un determinado volumen o masa. Se expresa referida al día y hora en que se efectúa la medida, en MBq/ml o mCi/ml.

La actividad de los radiofármacos emisores gamma se mide generalmente en cámara de ionización. La cámara debe ser periódicamente controlada con un estándar de actividad conocida. La estabilidad respuesta del sistema de medición se comprueba diariamente con una fuente radioemisora gamma de un radioisótopo de período de semidesintegración largo.

Actualmente las cámaras de ionización o activímetros son digitales y tienen factores de calibración para los radioisótopos de uso corriente.

En el caso de emisores beta se pueden utilizar cámaras de ionización que operan por conversión interna o por medición de bremsstrahlung, dependiendo del tipo de emisión beta.

c). Actividad específica:

Es la actividad por unidad de masa de la sustancia marcada. Se expresa en MBq/mg o mCi/mg de la molécula que se ha marcado o mg del isótopo estable presente como portador.

d). Pureza química:

La pureza química de un preparado radiactivo se define como la fracción de la masa total presente en una forma química específica.

En la práctica, el concepto de pureza química se refiere a la ausencia de compuestos químicos indeseables por su toxicidad o bien por modificar el comportamiento del radiofármaco.

Soluciones reguladoras, sustancias reductoras, estabilizantes que comúnmente forman parte de las preparaciones radiofarmacéuticas no pueden considerarse como impurezas químicas.

La presencia de aluminio en soluciones de Tc-99m proveniente de la columna cromatográfica de óxido de alúmina del generador de Mo-99/Tc-99m, es una impureza química que produce comportamiento anómalo del radiofármaco de Tc-99m cuando su presencia supera ciertos límites que varían según el radiofármaco.

e). Pureza radioquímica:

Se define como la proporción del radionucleído presente en una forma química dada.

La causa principal del comportamiento anómalo de un radiofármaco es la presencia de impurezas radioquímicas: sustancias radiactivas reaccionantes, productos radiactivos intermedios, simultáneos o de descomposición; pueden originarse por la presencia de impurezas en la materia prima, por una técnica de marcación inadecuada o por problemas en la conservación.

La pureza radioquímica se determina generalmente por técnicas cromatográficas, si bien también la electroforesis y filtración por gel se utilizan con cierta frecuencia. (17)

1.- Sustancias radiactivas reaccionantes:

La impureza más frecuente en las moléculas marcadas con un radionucleído, es el mismo radionucleído no unido a dicha molécula, como sucede en los radiofármacos del yodo y del

tecnecio donde las impurezas radioquímicas más frecuentes son el radioiodo como ión yoduro y el ión pertecneiato respectivamente. La presencia de estas impurezas puede deberse a marcación defectuosa o bien a productos de descomposición de la molécula marcada.

La importancia de la presencia del iodo libre se pone de manifiesto en la biodistribución del hipurato radioiodado, utilizado en el estudio dinámico de la función renal.

El 90% de este radiofármaco es depurado por el riñón en el primer pasaje, la mayor parte por los túbulos, aportando una valiosa información sobre la funcionalidad de la masa tubular. Cuando la presencia del ión yoduro ( $I-131$ )<sup>-</sup> supera el 2-3% inicialmente, llega a porcentajes cada vez más elevados a medida que es eliminado el hipurato por el riñón, llegando a distorcionar el renograma.

## 2.- Productos radiactivos intermedios:

Quando en el producto final se encuentran productos radiactivos intermedios se trata de un proceso de producción inadecuado, o bien al desconocimiento de la cinética del proceso, tomando como producto terminado un producto intermedio. Esto último sucede en algunos procesos de marcación que involucra la reducción del Tc-99m (VII) a estados de valencia menores.

Otra impureza radioquímica frecuente es el Tc-99m reducido hidrolizado. Cuando el Tc-99m ha sido reducido pero no encuentra el sustrato adecuado o éste está en muy baja concentración, se forma la especie química  $Tc-99mO_2$  insoluble, impureza radioquímica que se localiza en el sistema retículoendotelial.



### 3.- Productos radiactivos simultáneos:

Simultáneamente con el radiofármaco pueden producirse impurezas radioquímicas a partir de impurezas químicas presentes en el medio provenientes de una materia prima impura o bien formadas a partir de productos de descomposición durante el proceso de marcación.

En la reacción de radioidinación electrofílica ( $I^+$ ), se utilizan sustancias oxidantes que pueden producir productos de descomposición radioiodados. Estos deben separarse del radiofármaco utilizando columnas cromatográficas que actúan generalmente como tamiz molecular.

Se ha comprobado que los fosfonatos marcados con Tc-99m pueden adquirir diversas estructuras (dímeros, trímeros, etc.) dependiendo fundamentalmente del pH del medio y en menor grado de la concentración del reductor ( $Sn^{++}$ ) y del sustrato. Esas estructuras confieren un distinto comportamiento biológico al radiofármaco. Si bien no se identifican como impurezas radioquímicas, existe una configuración óptima para los fines a los cuales se destina el radiofármaco: localización de lesiones óseas.

### 4.- Productos de descomposición:

La investigación de las impurezas radioquímicas producidas por la descomposición del radiofármaco depende del tipo de radiofármaco y fundamentalmente del período de semidesintegración del radionucleído.

Los radiofármacos del Tc-99m (T:6,02 horas) deben preservarse de la presencia de luz y sustancias oxidantes para evitar la oxidación del reductor que se encuentra en casi todos ellos. En estas condiciones, la estabilidad del producto marcado supera generalmente las 6-8 horas, tiempo suficiente para su utilización.

Los productos de descomposición son generalmente el Tc-99m como pertechnetato, el Tc-99m reducido e hidrolizado y la actividad que quede adsorbida en el colnide de SnO<sub>2</sub>, formado a partir de la oxidación del Sn<sup>++</sup>, el reductor por excelencia de los compuestos de Tc-99m.

La principal causa de descomposición de los radiofármacos del I-131 (T: 8,1 días) es la radiólisis, por lo que la estabilidad se favorece con la disminución de la actividad específica, de la concentración de actividad, ausencia de luz, bajas temperaturas y presencia de estabilizantes.

La principal impureza radioquímica producida por descomposición es el (I-131)<sup>-</sup>.

f). Afinidad biológica:

La afinidad biológica puede determinarse en ensayos "in vivo" e "in vitro".

Los ensayos se llevan a cabo utilizando animales de experimentación reproduciendo las condiciones de la experiencia que se llevará a cabo con los humanos.

Los animales utilizados en el control de afinidad biológica "in vivo" de radiofármacos son ratones, ratas y conejos. La implementación de estos ensayos se generalizó como una necesidad de asegurar la eficacia diagnóstica cuando se desarrollaron los radiofármacos del Tc-99m por la dificultad de encontrar técnicas cromatográficas que pudieran predecir el comportamiento "in vivo". Si bien técnicas cromatográficas simples evidencian la presencia de Tc-99m libre y/o reducido-hidrolizado, desde los inicios de la década del 70', recién en la última década se desarrollaron técnicas de cromatografía de

alta precisión para radiofármacos del tecnecio que posiblemente puedan reemplazar el ensayo "in vivo".

Para los radiofármacos nuevos, el estudio de la farmacocinética en animales sirve de base para conocer el comportamiento del radiofármaco en humanos previo a su administración, si bien diferencias entre especies deben ser descartadas previamente. Los ensayos farmacocinéticos proporcionan datos valiosos para el cálculo de dosis en el paciente.

### ORGANIZACION DEL CONTROL DE LA CALIDAD

Los programas de control de calidad dependerán del tipo de radiofármaco. Según su procedencia se agrupan en tres clases:

#### 1). Radiofármacos dispuestos para su uso:

Son los que el fabricante entrega a la instalación de medicina nuclear ya dispuestos para ser administrados al paciente. Puede tratarse de radionucleídos en su más sencilla forma iónica, como Tl-201 ó un compuesto marcado como metaiodobencilguanidina-I-131.

El fabricante cumplimenta el control analítico de la calidad y los ensayos farmacológicos de inocuidad. El usuario realiza un sencillo control del material recibido incluyendo una inspección visual con las correspondientes medidas de protección radiológica. El producto se almacena adecuadamente desde el punto de vista farmacéutico y de protección contra las radiaciones. Cuando se administra la dosis prescrita se mide utilizando un activímetro adecuadamente calibrado.

## 2). Generadores y juegos de reactivos:

Los productores comerciales entregan a la instalación de medicina nuclear "generadores" y reactivos para "marcar" con el eluido de esos generadores. La organización comercial sólo elabora hasta cierta fase del producto que se ha de administrar al paciente y cuya preparación final corresponde al usuario.

Como la preparación radiofarmacéutica se realiza en la instalación de medicina nuclear, una parte de la responsabilidad corresponde al usuario.

### - Generadores:

El ejemplo que a continuación se expone hace referencia al Mo-99/Tc-99m, pero los principios son aplicables a otros generadores.

El rendimiento de elución del pertecneziato Tc-99m dada por el generador, se calcula como un índice del buen funcionamiento del generador. El Mo-99 es una posible impureza radionucleídica y su presencia puede deberse a un montaje incorrecto o bien a algún daño sufrido durante el transporte.

La medición de Mo-99 en la instalación de medicina nuclear se lleva a cabo por medición del eluido con o sin blindaje de plomo como se describió anteriormente.

### - Juego de reactivos:

El fabricante garantiza la calidad del generador y los juegos de reactivos realizando previo al despacho todos los controles para asegurar que los radiofármacos cumplen todas las especificaciones si se han preparado de acuerdo con las instrucciones y se han seguido las prácticas adecuadas de radiofarmacia.

Una evaluación completa de la calidad de un radiofármaco necesita la práctica de pruebas elaboradas y prolongadas. Sin embargo, una sencilla cromatografía puede aportar una valiosa información sobre la pureza radioquímica del producto marcado. Ocasionalmente ésta se realiza en la instalación de medicina nuclear cuando la imagen resulta de interpretación dudosa y existe la posibilidad de que las anomalías observadas pudieran ser atribuídas a un defecto del radiofármaco.

3). Radiofármacos elaborados en la instalación de medicina nuclear:

En este caso es el usuario el que garantiza todos los aspectos de la calidad del producto. Si la marcación del compuesto involucra la utilización de radioisótopos primarios o eluídos de generadores que son provistos por el abastecedor comercial, éste es responsable de las especificaciones de los materiales radiactivos que entregue.

Los radiofármacos autólogos marcados se producen mediante el marcado radiactivo de materiales procedentes del propio paciente, por ejemplo células o compuestos metabólicos y plantean los mismos problemas que cualquier otro radiofármaco elaborado en la instalación hospitalaria, pero es preciso tomar en consideración otros factores importantes como el control de la separación y viabilidad de las células y de las técnicas asépticas y la reducción al mínimo de los riesgos de infección del personal.





## INTRODUCCION

Moléculas biológicamente activas como antígeno carcinoembrionario, alfa fetoproteínas y fibrinógeno han sido marcadas con I-125 ó I-131 y utilizadas para visualizar órganos específicos. Estos radionucleídos no son radiotrazadores ideales para imágenes nucleares.

Un radionucleído apropiado es el Tc-99m debido a la emisión del fotón de 140 KeV, período de semidesintegración de 6 horas y ausencia de emisión  $\beta$ .

Históricamente la marcación de proteínas con Tc-99m comenzó con la albúmina humana poco después de la primera aplicación clínica del generador de Tc-99m, desarrollado en el Brookhaven National Laboratory.

El generador provee Tc en el estado de valencia VII. El ión pertecneciato es muy poco reactivo. Todos los métodos de marcación de proteínas involucran el uso de un sistema que contiene un agente reductor que reduce el Tc (VII) a estados de oxidación más bajos.

El agente reductor más utilizado es el  $\text{Cl}_2\text{Sn}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Cerca del pH neutro el sistema Sn-Tc reducido forma un coloide. Para concentraciones superiores a 0,2 mg/ml en medio acuoso y en ausencia de agentes complejantes, el  $\text{Cl}_2\text{Sn}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  es insoluble a pH entre 2,5 y 11.

La mayor parte del conocimiento sobre la marcación de proteínas con Tc se basa en la marcación de albúmina, pero no es válido extrapolar la experiencia a otras proteínas o polipéptidos.

Desafortunadamente los métodos utilizados para unir el Tc a las macromoléculas, usualmente requieren drásticas condiciones como la reducción en condiciones ácidas provocando esto una desnaturalización de las biomacromoléculas marcadas.



En los últimos años se ha puesto énfasis en encontrar métodos de marcación de macromoléculas biológicamente activas con Tc-99m, en especial anticuerpos policlonales y monoclonales.

- Fibrinógeno:

El fibrinógeno es una proteína plasmática esencial en el mecanismo de coagulación sanguínea.

Está presente en el plasma humano en concentración aproximada de 300 mg/100 ml.

El fibrinógeno tiene un peso molecular de 340.000. La molécula tiene forma de cigarro con una longitud estimada de 240-600 Å.

La biosíntesis del fibrinógeno se produce en el hígado en humanos y desaparece de la circulación con una vida media de 4-6 días. Es una proteína lábil, se desnatura a temperaturas tan bajas como 47°C y puede desnaturarse durante su aislación, marcación o almacenaje.

El fibrinógeno marcado se utiliza en medicina nuclear, para la evaluación de trombosis en venas profundas. Sin embargo, algunos investigadores han utilizado el fibrinógeno marcado como agente para imagen tumoral, encontrando un diagnóstico diferencial entre tumores proliferativos y no proliferativos: los tumores primarios en crecimiento y las metástasis captarían el radiofármaco, no así los no proliferativos. (18), (19).

En la búsqueda de métodos que faciliten la utilización del fibrinógeno marcado en un centro de medicina nuclear, se ha desarrollado una técnica de marcación con Tc-99m que involucra la adición final del radionucleído a un preparado de fibrinógeno-Sn liofilizado.

La técnica ha sido propuesta por Rhodes, B.A. (20) para la marcación de anticuerpos monoclonales con Tc-99m y utilizada por Lavié y col. (21) para la marcación de fibrinógeno.

La técnica consiste en mantener la proteína y el  $\text{Sn}^{++}$  a temperatura ambiente durante varias horas previo a su marcación.

El motivo de este trabajo es la búsqueda de las condiciones más favorables para la obtención de un preparado reproducible de alta calidad. Se pretende también determinar el mecanismo de radiomarcación de la proteína, intentando acortar los tiempos de incubación.

## MATERIALES Y METODO

### PREPARACION DEL FIBRINOGENO-Sn

Se utilizó fibrinógeno humano liofilizado (Inmuno A.G. Viena, Austria) con la siguiente composición:

	%
Fibrinógeno humano	24,39
Citrato trisódico dihidratado	14,63
Glicina	12,20
Cloruro sódico	12,20
Glucosa	36,58

Como agente reductor se utilizó  $\text{Cl}_2\text{Sn}-2\text{H}_2\text{O}$  (Carlo Erba). El poder reductor de la droga se determinó por yodimetría, utilizando una solución valorada de iodo y almidón como indicador. Se tomó como punto final de la valoración la persistencia del color azul durante 10 segundos.

Se preparó una solución de glicina (Merck) 0,05 M, disolviendo la droga en agua bidestilada y llevando a pH 12,0 - 12, 2 con NaOH solución 0,5N, completando luego el volumen hasta la concentración de 3,7 mg/ml. Se utilizó un peachímetro marca Luftman, modelo Digimeter II, provisto de un electrodo apropiado para el rango de pH de trabajo (pH mayor de 10).

### METODO:

Una solución de  $\text{Cl}_2\text{Sn}-2\text{H}_2$  de 0,2 mg/ml en solución reguladora de glicina 0,05 M se mantuvo a  $40 \pm 5^\circ\text{C}$  hasta su clarificación. A ese pH el Sn se disuelve formando el ión estannito.

Se preparó igual volumen de solución acuosa de 0,2 mg/ml de  $\text{Cl}_2\text{Sn}-2\text{H}_2\text{O}$  disolviendo en ella 5 mg de fibrinógeno/ml, (20,5 mg del liofilizado/ml).

Se mezclan las dos soluciones y dejan en baño termostático a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  durante tiempos variables, luego del cual se procedió a pasar la solución por filtro esterilizante de 0,22 micrones. Todas las operaciones se realizaron en forma aséptica y en ambiente de  $\text{N}_2$ .

El Tc-99m se obtuvo de un generador Mo-99/Tc-99m marca "Gentec" producido en la Comisión Nacional de Energía Atómica.

#### GENERADOR DE Mo-99/Tc-99m:

En algunas transformaciones, el producto resultante del decaimiento es también radiactivo por lo que a un dado tiempo habrán decaído parte de los átomos formados por desintegración del radionucleído padre: si éste tiene un período de semidesintegración considerablemente más largo que el radionucleído hijo, se puede conformar un sistema llamado "generador".

En este par padre-hijo, en el cual el período de semidesintegración del padre (Mo-99: 66,48 h.) es mayor que el del hijo (Tc-99m: 6,02 h.), se observa que a partir de la separación del par ( $t=0$ ), la actividad del Tc-99m crece hasta que la relación de actividades Tc-99m/Mo-99 llega a un valor constante (se dice que el par ha entrado en equilibrio transitorio).

La actividad total de la mezcla cae con el período del Mo-99. (FIGURA Nº 1)

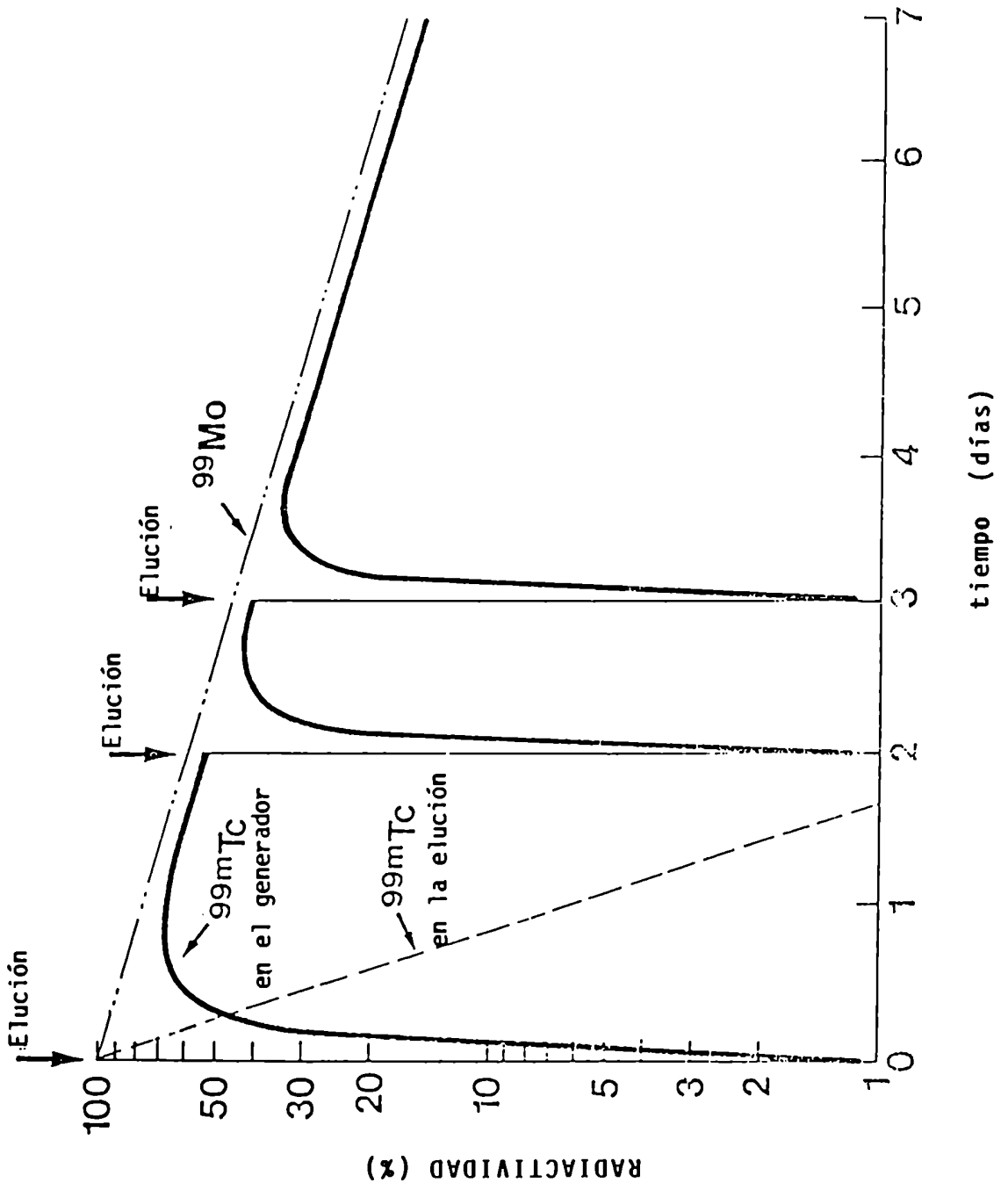
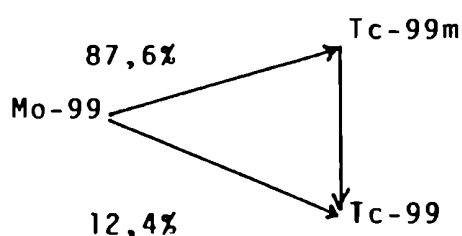


FIGURA Nº 1

Las características físicas del Tc-99m, la disponibilidad del radionucleído padre y la fácil separación de ambos, hacen el sistema Mo-99/Tc-99m ideal para las aplicaciones médicas.

Es posible calcular la actividad del radionucleído padre y del radionucleído hijo a un tiempo determinado a partir de una expresión matemática. El Mo-99 decae a Tc-99m según el siguiente esquema:



El Mo-99 (a) decae con una constante de desintegración  $\lambda_a$  para formar en el 87,6% de las desintegraciones, el producto hijo Tc-99m (b) que decae con una constante de desintegración  $\lambda_b$  a Tc-99, a través de una transición isomérica. En el 12,4% restante de las desintegraciones, el Mo-99 decae directamente a Tc-99.

Consideremos el 87,6% de las desintegraciones. El decaimiento del Mo-99 puede expresarse como:

$$N_a = N_0 e^{-\lambda_a t} \quad (1)$$

La velocidad de crecimiento del Tc-99m es igual a 87,6% de la velocidad de decaimiento del Mo-99, menos su propia velocidad de decaimiento, por lo tanto:

$$\frac{d N_b}{d t} = 0,876 \lambda_a N_a - \lambda_b N_b$$

$$\frac{d N_b}{d t} = 0,876 \lambda_a N_b e^{(-\lambda_a t)} - \lambda_b N_b$$

La solución de esta ecuación diferencial es:

$$N_b N_0^{-1} = 0,876 \lambda_a (\lambda_b - \lambda_a)^{-1} \left[ e^{(-\lambda_a t)} - e^{(-\lambda_b t)} \right]$$

Multiplicando ambos miembros por  $\lambda_b$  y reemplazando ( $N_b \lambda_b = A_b$ ) donde  $b$  no está presente inicialmente, por lo tanto:

$$A_b = 0,876 \lambda_b (\lambda_b - \lambda_a)^{-1} \left[ e^{(-\lambda_a t)} - e^{(-\lambda_b t)} \right] A_a \quad (2)$$

donde  $A_a$  es la actividad del padre al tiempo de la elución.

$$A_a = \lambda_a N_0$$

A partir de la ecuación (1) se calcula la actividad del radionucleído padre a un tiempo  $t$  determinado.

$$A_a = A_0 e^{(-\lambda_a t)}$$

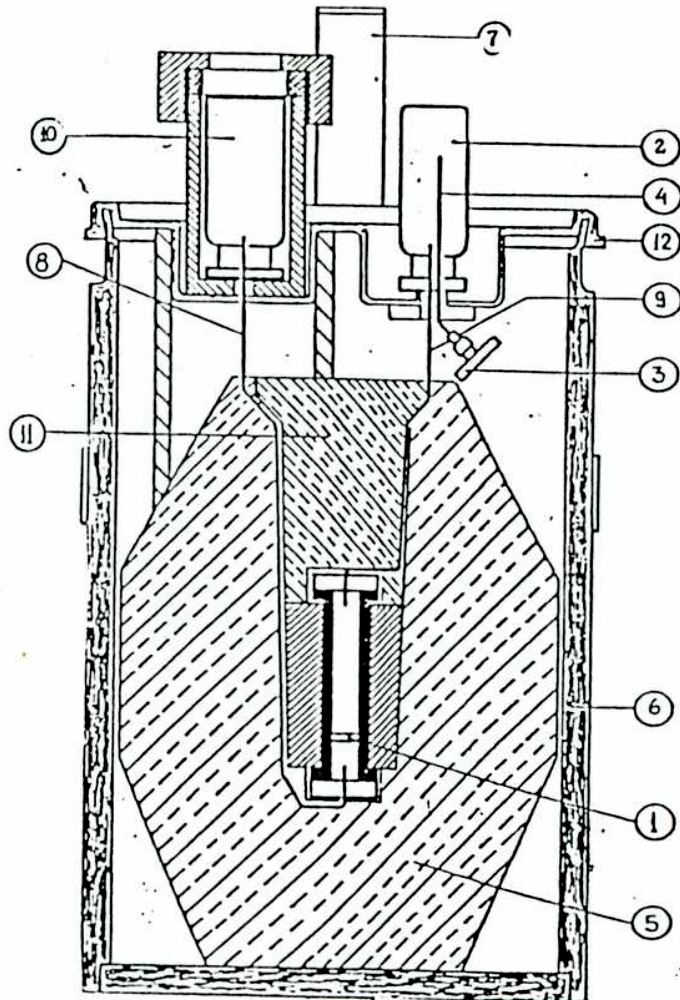
La ecuación (2) expresa la actividad del radionucleído hijo  $b$  a un tiempo  $t$  después de la elución.

El tiempo al cual la actividad de Tc-99m llega al máximo, se obtiene diferenciando y colocando  $d A_b / d t = 0$

$$t_{max} = 22,89 \text{ horas}$$

El "GENTEC" consiste en una columna cromatográfica de vidrio rellena de alúmina, soporte sobre el cual se ha depositado el Mo-99 el cual decae a Tc-99m. Este último se eluye de la columna mediante solución fisiológica levemente oxidante (contiene 100 ppm de  $NO_3^-$ )

GENERADOR DE Mo-99-Tc 99m "GENTEC"



1. columna cromatográfica de alúmina.
2. frasco con 5 ml de solución eluyente.
3. filtro para esterilizar el aire.
4. aguja de entrada de aire
5. blindaje de plomo.
6. envase exterior.
7. manija para el transporte.
8. aguja de salida (Tc-99m)
9. aguja de entrada (solución eluyente)
10. frasco evacuado.
11. blindaje de plomo.
12. tapa.



## CONTROL DE CALIDAD DEL "GENTEC"

### Determinación de la pureza radionucleídica-Impurezas gamma emisoras

El control de calidad comienza con la determinación de la pureza radionucleídica del Mo-99, antes de ser adsorbido en la columna. Se determinó por espectrometría gamma utilizando un detector de germanio hiperpuro asociado a un multicanal (marca Camberra). Una muestra de 10-15  $\mu\text{Ci}$  del Mo-99 de alta actividad específica, producido por separación de los productos de fisión (22), se colocó en un blindaje de plomo de espesor 6 mm para atenuar el Tc-99m y parte del Mo-99 y poder visualizar el espectro de las impurezas I-131 y Ru-103. A partir del gráfico de eficiencia del detector en función de la distancia, se calculó la cantidad de cada contaminante relacionando esta actividad con la actividad de Mo-99 de la muestra corregida por la atenuación.

La pureza radionucleídica de cada eluido del generador se determinó midiendo por atenuación gamma la cantidad de Mo-99 y relacionándola con la actividad del Tc-99m.

### Determinación de la pureza química de soluciones de Tc-99m

Se determinó la cantidad de  $\text{Al}^{3+}$  proveniente del lecho de la columna cromatográfica del generador utilizando una técnica a la gota en placa de toque. (23)

A una gota del eluido se le agregó una gota de solución 1N de NaOH y una gota de solución de alizarina-S al 0,1% en agua. El color violeta desarrollado en medio alcalino desaparece al agregar ácido acético 1N, quedando la coloración rosada de la laca aluminio-alizarina que es proporcional a la cantidad de aluminio presente. Por comparación con soluciones estándar de  $\text{Al}^{3+}$  de 0,5, 10 y 20 ppm se determina el contenido en la elución.

La cantidad de  $\text{NO}_3^-$  se determinó midiendo la absorbancia de soluciones de eluyente diluidas 1:10 en un espectrofotómetro Perkin Elmer, modelo EPS-3T a  $220 \text{ m}\mu$  y comparando con una curva estandar.

### Pureza radioquímica

La pureza radioquímica de la solución de pertecneciato de sodio (Tc-99m) se determinó por cromatografía ascendente utilizando como solvente una solución de HCL 0,3N y como soporte papel Whatman N 1. (24)

### Marcación del fibrinógeno-Sn con Tc-99m

2,5 ml de muestras del preparado con distintos tiempos de incubación se marcaron con 2 ml de solución de pertecneciato (Tc-99m) con una actividad de 10 mCi/ml. El radiofármaco se mantuvo en blindaje de plomo tomando muestras a distintos tiempos post marcación para realizar los controles de calidad

### Control de pureza radioquímica

#### Cromatografía instantánea en capa delgada

Se utilizó cromatografía ascendente en soporte ITLC-SG (fibra de vidrio impregnada en silica gel marca Gelman) y como solvente metanol al 85%, siendo los Rf:

fibrinógeno-Tc-99m	0,0
pertecneciato (Tc-99m)	1,0

### Cromatografía en gel

Se determinó el volumen muerto de una columna de 35 cm de largo por 0,9 cm de ancho de Sephadex G-25, sembrando en el extremo superior azul de bromotimol como indicador del frente de la solución de cloruro de sodio 0,15 N utilizada como eluyente. Se sembró 0,05-0,1 ml de la muestra y agregó lentamente un volumen de solución eluyente igual al volumen muerto. En estas condiciones el Tc-99m hidrolizado queda en el punto de siembra, el pertecneciato (Tc-99m) queda a 1/3 del extremo superior y el fibrinógeno-Tc-99m corre hasta el final de la columna.

Las tiras cromatográficas y las columnas se midieron en un radiocromatógrafo marca Berthold, modelo LB-2723.

### Control de afinidad biológica "in vitro"

Los controles de coagulabilidad se llevaron a cabo con sangre de conejo; a 0,1 ml de la solución de fibrinógeno-Tc-99m en tubo de centrífuga se le agregó directamente de la oreja del conejo 3-4 ml de sangre. Luego de una leve agitación se incubó a 37°C durante 2 horas. Se rompió el coágulo formado con una varilla de vidrio, centrifugó y midió la actividad en coágulo y suero en una cámara de ionización Capintec, modelo CRC-10.

### Ensayos de biodistribución

Se utilizaron ratones de la cepa NIH de peso aproximado 25-30 g. Los animales fueron colocados en un brete adecuado y se les dilató la vena de la cola por acción calórica, inyectando 0,1 ml de las soluciones de fibrinógeno-Tc-99m mediante una jeringa tipo tuberculina con aguja 26 G x 1/2.

Los animales se sacrificaron a los 60 minutos post-administración. El animal entero y los órganos disecados se midieron en una cámara de ionización.

## RESULTADOS

Los controles analíticos de calidad del generador de Tc-99m dieron los siguientes resultados:

### Pureza radionuclídica del Mo-99

Ru-103 menor que  $1 \times 10^{-5} \mu\text{Ci/mCi}$  de Mo-99

I-131 menor que  $1 \times 10^{-5} \mu\text{Ci/mCi}$  de Mo-99

### Pureza radionucleídica de la solución de pertechnetato(Tc-99m)

Mo-99 menor que  $0,1 \mu\text{Ci/mCi}$  Tc-99m

### Pureza química:

En ningún caso la cantidad de  $\text{Al}^{3+}$  superó 5 ppm.

La cantidad de ión  $\text{NO}_3^-$  fue de  $100 \pm 10$  ppm.

### Pureza radioquímica:

Se obtuvo siempre un sólo pico de actividad en el radio-cromatograma con un Rf correspondiente al ión pertechnetato.(0,7)

### Influencia del tiempo de incubación en el rendimiento de marcación del fibrinógeno-Tc-99m:

En el CUADRO N° 1 se muestra el rendimiento de marcación en función del tiempo de incubación a 20°C del fibrinógeno (Sn) a los 20 minutos post marcación con Tc-99m, determinado por cromatografía en capa delgada ITLC-SG.

CUADRO Nº 1

RENDIMIENTO DE MARCACION DEL FIBRINOGENO (Sn) CON 99mTc  
EN FUNCION DEL TIEMPO DE INCUBACION A 20°C y 20 MINUTOS  
POST MARCACION

<u>INCUBACION</u>	<u>MARCACION</u>
Hs.	%
5	66,0 ± 8,9
11	72,3 ± 3,9
17	74,1 ± 9,7
18,50	76,5 ± 6,1
20	78,3 ± 5,7
21	82,5 ± 10,0
22	94,1 ± 2,7
23	94,7 ± 3,3
24	88,0 ± 1,5
25,50	87,8 ± 7,5

### Ensayos de biodistribución:

Se presentan los datos promedio del porcentaje de dosis en diversos órganos de 8 ratones, 1 hora post administración de fibrinógeno-Tc-99m a los 20 minutos post marcación. Corresponde a un tiempo de incubación de fibrinógeno-Sn de 22 horas a  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$

<u>Organo</u>	<u>% DI <math>\pm</math> 1 sd</u>
Sangre	45,9 $\pm$ 3,2
Hígado	19,9 $\pm$ 2,4
Riñón	7,7 $\pm$ 1,3
Orina	16,6 $\pm$ 3,3
S.G.I.	9,1 $\pm$ 2,1

El CUADRO Nº 2 muestra el rendimiento de marcación y distribución biológica en ratones (n=3) 1 hora post administración intravenosa de preparados con distintos tiempos de incubación, a los 80 minutos post marcación con Tc-99m.

### Afinidad biológica, pureza radioquímica y pH:

Para preparados con tiempos de incubación entre 22 y 23 horas y tiempos post marcación de 20 minutos, el porcentaje de actividad unido al coágulo fue de  $73,8 \pm 1,03$  (promedio de 4 preparaciones) y el Tc-99m hidrolizado determinado por cromatografía en Sephadex G-25 fue menor del 5%.

pH: en todos los casos el pH final fue de  $10 \pm 1$ .

CUADRO Nº 2

RENDIMIENTO DE MARCACION 80 min. POST ADICION DEL 99mTc Y DISTRIBUCION BIOLOGICA EN RATONES 1 h. POST ADMINISTRACION EN FUNCION DEL TIEMPO DE INCUBACION DEL

FIBRINOGENO (Sn) a 20°C

<u>INCUBACION</u> <u>Horas</u>	<u>RENDIMIENTO</u> <u>%</u>	<u>DISTRIBUCION BIOLOGICA % DI</u>				<u>SANG. /HIG.</u>
		<u>HIGADO</u>	<u>S.G.I.</u>	<u>RIÑON</u>	<u>ORINA</u>	
8	92,1 ± 2,1	18,7 <sup>±</sup> 0,1	11,4 <sup>±</sup> 2,3	8,3 <sup>±</sup> 1,9	14,8 <sup>±</sup> 3,5	2,5 <sup>±</sup> 0,0
10,5	91,5 ± 1,4	18,2 <sup>±</sup> 1,4	8,1 <sup>±</sup> 1,6	9,0 <sup>±</sup> 0,4	18,2 <sup>±</sup> 3,7	2,5 <sup>±</sup> 0,3
14	91,9 ± 2,1	46,2 <sup>±</sup> 0,7	7,9 <sup>±</sup> 0,5	6,5 <sup>±</sup> 1,7	17,9 <sup>±</sup> 3,4	2,4 <sup>±</sup> 0,3
18	93,7 ± 1,8	45,7 <sup>±</sup> 4,5	8,0 <sup>±</sup> 0,1	7,6 <sup>±</sup> 1,1	15,2 <sup>±</sup> 2,8	2,4 <sup>±</sup> 0,1
20	96,9 ± 2,2	47,3 <sup>±</sup> 2,0	19,9 <sup>±</sup> 0,1	7,2 <sup>±</sup> 1,5	13,2 <sup>±</sup> 0,8	
22	95,5 ± 1,4	48,8 <sup>±</sup> 1,5	21,9 <sup>±</sup> 1,9			
24	95,4 ± 1,3	49,1 <sup>±</sup> 1,1				

## DISCUSION

Se han establecido las condiciones óptimas para la formulación del fibrinógeno-Sn para ser marcado con Tc-99m.

La preparación en medio alcalino evita la desnaturalización del fibrinógeno, obteniendo productos sin deterioro en sus propiedades biológicas con un alto rendimiento de marcación (mayor del 95%).

La técnica de incubar la proteína y el estaño previo al marcado con Tc-99m, ha sido propuesta para anticuerpos monoclonales y en 1984 para fibrinógeno. (21)

Se repitió esta última experiencia coincidiendo con los tiempos óptimos de incubación de 22 horas previo a la marcación. Sin embargo, a pesar de lo expuesto por los autores, se encontró una acción sinérgica entre los tiempos de incubación pre y post marcación.

También existen discrepancias en la cantidad óptima de estaño ( $\text{Sn}^{2+}$ ) ya que encontraron una correlación inversa entre el rendimiento de marcación y la cantidad de cloruro de estaño para concentraciones de  $\text{Cl}_2\text{Sn}$  entre 0,02 y 0,22 mg/ml. El aumento de la cantidad de  $\text{Sn}^{2+}$  en la formulación de un reactivo preparado para ser marcado con Tc-99m, aumenta su vida útil dado que la estabilidad depende fundamentalmente de la concentración del agente reductor, siempre que este aumento no modifique las características del producto bajando la calidad.

Estas discrepancias son difícilmente explicables cuando se emplean materias primas de distinto origen. El fibrinógeno humano utilizado tiene en su composición citrato de sodio, un sustrato que en presencia de  $\text{Sn}^{2+}$  es fácilmente marcado con Tc-99m.



El citrato Tc-99m ha sido utilizado en medicina nuclear para imagen renal. Se puede inferir, sin embargo, a partir de los datos de biodistribución en riñón y de la cromatografía en columna de Sephadex, que no existen cantidades apreciables de este radiofármaco.

Para realizar una evaluación comparativa se adquirió fibrinógeno-Sn en forma de reactivo liofilizado preparado para marcar con Tc-99m que comercializa Sorin Biomédica S.p.A. (Saluggia, ITALIA).

Los controles analíticos de calidad demuestran que no existen diferencias significativas entre el producto desarrollado y el producto comercial TCK-19 con la siguiente composición:

Fibrinógeno humano	5,0 mg
Cloruro de estaño dehidratado	0,4 mg
Glicina	6,2 mg
Cloruro de sodio	4,8 mg

No obstante y a pesar que no significa una limitación importante, el producto liofilizado de producción nacional no puede ser diluido a volúmenes superiores a 2-3 ml, cuando se lo reconstituye con solución salina de pertecneciato (Tc-99m) sin disminución de la pureza radioquímica (aumenta el  $Tc-99mO_4^-$ ).

Por el contrario, el producto importado es capaz de tolerar una dilución de hasta 8 ml, sin desmedro de la pureza radioquímica.

Como esto no ocurre con el preparado antes de liofilizar, se atribuye a la técnica de liofilización la responsabilidad de esa limitación.

Los cambios que se producen durante la incubación del fibrinógeno con el  $\text{Sn}^{2+}$  no han sido clarificados. Es evidente que el cambio reside en un aumento en la velocidad de reacción después del período de incubación.

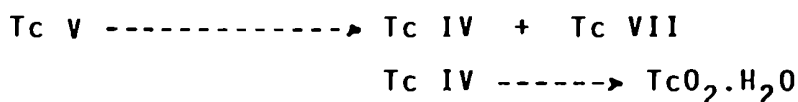
Se ha postulado que la molécula de fibrinógeno modifica su estructura dejando expuestos los sitios de unión del Tc-99m, desplazando el equilibrio hacia la formación del compuesto.

Lavié y colaboradores encontraron que a las 22 horas la cantidad de estaño unida al fibrinógeno llega a un máximo (60%).

Suponen que el  $\text{Sn}^{2+}$  actuaría como un puente entre la molécula de fibrinógeno y el Tc-99m.

Es difícil explicar la presencia de Tc VII simultáneamente con el  $\text{Sn}^{2+}$  que estaría paradójicamente más disponible a tiempos de incubación cortos.

En las condiciones de la experiencia puede obtenerse la especie Tc V que en ausencia de un ligando accesible, se transformaría en Tc VII y Tc IV, este último formaría la especie insoluble  $\text{Tc O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .



Soporta esta hipótesis el hecho que las distribuciones biológicas de preparados con tiempos de incubación menores a las 10 horas, mostraron una alta concentración en hígado, órgano que captaría el coloide formado por el Tc reducido hidrolizado  $\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .

Dado que la columna de Sephadex G-25 discrimina por tamaño molecular, los coloides pueden comportarse como macromoléculas y correr con el volumen muerto de la columna, junto con el pico del fibrinógeno, con lo que se enmascararía su presencia.

En el CUADRO N° 2 se observa que el valor de la relación entre el porcentaje de dosis inyectada en sangre e hígado se correlaciona directamente con la calidad del fibrinógeno-Tc-99m y que el tiempo de incubación puede reducirse siempre que se aumenten los tiempos post marcación del producto; sin embargo, por debajo de 18 horas de incubación los tiempos post marcación deberían aumentarse considerablemente para obtener porcentajes superiores al 95%.

De los datos suministrados en los ensayos se concluye que el tiempo óptimo de incubación está entre 22 y 23 horas, por lo tanto se adopta como método de preparación 22 horas de incubación a  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , pasaje por filtro esterilizante de 0,22 micrones y fraccionamiento de 2 ml/vial inmediatamente antes de realizar la liofilización.

Se realizaron los controles farmacológicos (ensayos de esterilidad y sustancias pirogénicas) al producto liofilizado así como también al primer eluido del generador.

Parte de esta elución se reservó para realizar los controles de pureza radionucleídica, luego de transcurridos 3 meses.

Los valores de contaminación alfa, beta y gamma referidos a la fecha de la elución se encuentran dentro de los valores aceptados por la Farmacopea Nacional Argentina, Suplemento 1981.





Han sido utilizados como agentes para visualización de tumores (28) complejos de BLM con varios iones metálicos radiactivos: Ga-67, Co-57, In-111, Hg-197, Pb-203, Cu-64, Fe-59 y Tc-99m.

De todos los complejos catiónicos estudiados, la BLM-Co-57, demostró ser el más estable; sin embargo, debido a los riesgos del uso médico del Co-57 (T:270 días) se intentó sustituir por un radionucleído más adecuado.

Especial interés se ha puesto en la utilización de BLM-Tc-99m, dadas las características físicas del Tc-99m. La preparación de BLM-Tc-99m ha sido publicada por varios investigadores(29-34), sin embargo su valor clínico no ha recibido una adecuada evaluación. Dependiendo de pequeños cambios en las condiciones de marcación se obtienen complejos de BLM-Tc-99m en diferentes formas químicas; entre ellos el complejo mononuclear, llamado así porque se postula como un complejo en el cual un átomo de tecnecio, en estado tetravalente, se coordina con una molécula de bleomicina, está considerado como la forma química clínicamente válida para una efectiva imagen tumoral con BLM-Tc-99m (35).

La forma química más estable del tecnecio es el ion pertecneciato  $TcO_4^-$ ; la unión a un ligando requiere la reducción del estado de valencia (Tc (VII) a un estado de valencia más bajo, seguida de la estabilización de esta nueva especie por unión al ligando. Debido a los potenciales redox favorables y a la cinética, el pertecneciato puede reducirse fácilmente vía Tc (V) a Tc (IV) o estados más bajos de oxidación. En solución acuosa, sin ligandos apropiados, se forma la especie insoluble  $TcO_2 \cdot H_2O$ .

En presencia del ligando favorable, se forman quelatos del Tc (IV). La caracterización de éstos indica la presencia de especies monoméricas y poliméricas, dependiendo de la concentración de tecnecio.

En la preparación de radiofármacos del Tc-99m, además de la reducción electroquímica, se han utilizado una larga serie de agentes reductores. Los métodos electrolíticos involucran electrodos de diversos materiales. (36), (37).

Schneider (38) utilizó electrodos de Sn para preparar citrato (Sn)-Tc-99m. En los últimos años varios radiofármacos de Tc-99m han sido marcados utilizando esta técnica (39). En la mayor parte de estos radiofármacos, la cantidad de Sn involucrada no resulta crítica, por lo que la marcación de preparados liofilizados del ligando al que se le ha adicionado sales de  $\text{Sn}^{2+}$ , es la forma más generalizada de utilización de dichos productos.

Sin embargo, se ha encontrado que para producir el complejo mononuclear de la BLM-Tc-99m, la cantidad de  $\text{Cl}_2\text{Sn}$  necesaria para reducir el Tc, está en el orden de  $10^{-7}$  -  $10^{-9}$  M. La preparación de soluciones de  $\text{Sn}^{2+}$  en estas concentraciones, es un factor limitante para marcar la BLM-Tc-99m con alto rendimiento y buena reproducibilidad, debido a la inestabilidad de las soluciones de  $\text{Sn}^{2+}$  que oxidan fácilmente a  $\text{Sn}^{4+}$ .

Siendo crítica la cantidad de  $\text{Sn}^{2+}$  disponible, se deben considerar las variables que modifican su concentración:

- 1). Cantidad total de tecnecio
- 2). Presencia de oxidantes

### 1). Cantidad total de tecnecio:

La importancia de conocer la cantidad total de tecnecio por mCi de Tc-99m en los eluidos de generador, ha sido señalada hace más de una década, pero recientemente ha recibido especial atención debido a que este parámetro puede determinar la química y la cinética de la conversión del pertecnetato en radiofármacos que contienen el tecnecio en un estado de oxidación reducido. (40)

El número de átomos de Tc-99m presentes en 1 mCi puede calcularse aplicando la fórmula:

$$N = A/\lambda$$

reemplazando:

$$N = \frac{3.700 \times 10^7 \text{ seg}}{3.208 \times 10^{-5} \text{ seg}} = 1.153 \times 10^{12} \text{ átomos}$$

Aún, si 1 mCi de Tc-99m (producido a partir de Mo-99) puede ser aislado antes que una apreciable cantidad decajera a Tc-99, estaría ya acompañado de Tc-99 formado directa y simultáneamente a partir del Mo-99; según el esquema de decaimiento, se producen 133 átomos de Tc-99 por cada 867 de Tc-99m. Por lo tanto, la cantidad total de átomos de Tc en 1 mCi a este tiempo 0 sería:

$$1.153 \times 10^{12} (1 + 133/867) = 1.329 \times 10^{12}$$

$$\frac{1.329 \times 10^{12}}{6.023 \times 10^{23}} \times 99 = 0,22 \text{ ng}$$

dado que el decaimiento del Tc-99 (a Ru<sup>99</sup> estable) es despreciable, el número total de átomos de Tc se mantiene estable; el número de átomos y la masa requeridos para tener 1 mCi a un tiempo dado, se obtiene multiplicando ese valor inicial por  $e^{-\lambda t}$ .



En la práctica, la cantidad de Tc-99 es mayor que la calculada, debido a varias causas:

1. Los rendimientos de elución del generador no son del 100%, gran parte del Tc-99m retenido eluye en la próxima elución como Tc-99.
2. El  $\text{Tc}^{99\text{m}}\text{O}_4^-$  se produce directamente del  $\text{Mo-99 O}_4^{2-}$  en la superficie de la alúmina en presencia de un flujo de radiación alto. El Tc-99m naciente quedaría más firmemente retenido a la alúmina que el resto de los átomos de Tc, con lo que se enriquecería el eluido en Tc-99.
3. El exceso de átomos de Tc-99 en el momento de la fabricación del generador, provocaría la elución de este exceso de Tc-99 a través de la vida útil del generador, pero con prevalencia en las primeras eluciones.

## 2). Presencia de oxidantes:

El ion  $\text{TcO}_4^-$  puede ser reducido por la radiación en presencia de alúmina a través de radicales libres y electrones hidratados, formados en la radiólisis del agua. Las formas reducidas del tecnecio se unen firmemente a la alúmina y por lo tanto no eluyen.

Algunos autores (24), (41), han puntualizado que la presencia de impurezas orgánicas en la solución salina eluyente, serían responsables de la disminución del rendimiento de elución de los generadores de Mo-99/Tc-99m, debido a la aceleración de la reducción del  $\text{TcO}_4^-$  inducido por la radiación.

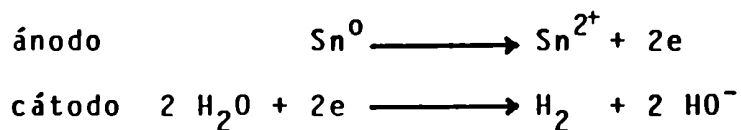
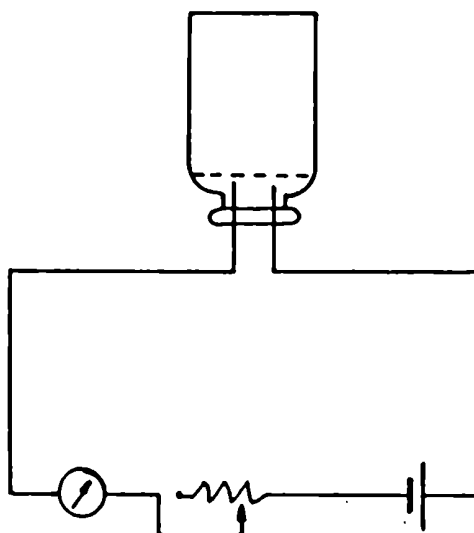
Para reducir los problemas de reducción del  $\text{TcO}_4^-$ , ya sea por la radiólisis del agua o debido a impurezas orgánicas y por lo tanto mantener estable el rendimiento de elución del generador de Mo-99/Tc-99m, el generador o la

solución eluyente contiene habitualmente cantidades pequeñas de un oxidante. Estas sustancias pueden interferir en la preparación de radiofármacos del Tc-99m, especialmente cuando es muy pequeña la cantidad de reductor involucrado.

## MATERIALES Y METODO

### CELDA ELECTROLITICA

La celda electrolítica consiste en dos alambres de Sn insertos en el tapón de un vial de 15 ml de capacidad. Es necesario utilizar sólo en el ánodo el electrodo de Sn, pero para evitar confusión se coloca en ambos electrodos.



La relación entre el  $\text{Sn}^{2+}$  generado y la cantidad de corriente que circula es la siguiente:

$$\text{mM Sn}^{2+} = \frac{I t}{193.000}$$

siendo  $\text{mM Sn}^{2+}$  los milimoles de  $\text{Sn}^{2+}$  liberados para una intensidad de corriente  $I$  (mA) que circula durante un tiempo  $t$  (seg).

La intensidad de corriente y el tiempo se fijan en forma previa según los códigos dispuestos en el equipo.

El volumen mínimo para asegurar que los electrodos queden totalmente sumergidos en la solución es de 1 ml.

- BLEOMICINA:

Se utilizó bleomicina con el nombre comercial de Blocamicina (Lab. GADOR), siendo los principales componentes del lote: bleomicina  $A_2$ : 68,6 % y bleomicina  $B_2$ :29,9%.

Cada ampolla contiene 15 mg de BLM en forma liofilizada con potencia de 1,85 mg/mg.

- SOLUCION DE Tc-99m

El pertecneciato (Tc-99m) se obtuvo de un generador "GENTEC" fabricado en la Comisión Nacional de Energía Atómica. La solución eluyente contiene 0,9% de  $\text{ClNa}$  y 100 ppm de  $\text{NO}_3\text{Na}$ .

Para conseguir una alta concentración de actividad y condiciones reproducibles en toda la experiencia, se trabajó el segundo día laboral de la semana con soluciones recientemente obtenidas de un generador eluido cada 24 horas. En esas condiciones, la concentración de actividad es de aproximadamente 160 mCi/ml. Se utilizaron exactamente 0,2 ó 0,3 ml en cada marcación, con una actividad aproximada de 40 mCi.

## - METODO

El método consiste en disolver la BLM dentro de la ampolla con la solución de Tc-99m que contiene la actividad deseada (aproximadamente 1 ml). Si es necesario se completa el volumen a 1-2 ml con solución de Cl Na 0,9%, libre de agentes oxidantes y se transfiere en forma aséptica esta solución por medio de una jeringa que se descarga a través del tapón del frasco celda que posee los electrodos.

Insertada la celda en la fuente, la electrólisis se produce acompañada de un movimiento vibratorio que previene el depósito de óxidos inertes de tecnecio en los electrodos. Toda la operación se realiza en aproximadamente 5 minutos.

## - Pureza Radioquímica:

La pureza radioquímica del complejo se determinó por cromatografía ascendente, utilizando como solvente acetato de amonio al 10% y metanol (1:1). Como soporte se utilizó TLC (silica gel 60 F654).

Tc <sub>reducido/hidrolizado</sub>	:0,0
Bleomicina A <sub>2</sub>	:0,4 - 0,5
Bleomicina B <sub>2</sub>	:0,7
pertecneciato	:0,8

Dada la proximidad de los Rf de la bleomicina B<sub>2</sub> y el pertecneciato, se evaluó este último por medio de una cromatografía ascendente, utilizando como solvente acetona y como soporte ITLC-SG (Gelman). El tiempo de corrida es de 10 minutos y los Rf:

	Rf
BLM-Tc-99m	0,0
pertecneciato	1,0

Los radiocromatogramas se evaluaron en un radiocromatógrafo PACKARD, Modelo 7200.

- Estudio del rendimiento y cinética de marcación:

La influencia del pH se determinó llevando el preparado a pH 7 y 8 con NaHO diluído, sin sobrepasar el volumen final de 2 ml y, comparando el rendimiento de marcación y la estabilidad con preparados a pH 5,5-6,0.

Se determinó la influencia del volumen final utilizando iguales volúmenes de solución de Tc-99m y completando con solución fisiológica libre de oxidantes a 1,0; 1,5 y 2,0 ml.

Se estudió la influencia del ion  $\text{NO}_3^-$  en la cinética y el rendimiento de marcación. Para 20 y 30  $\mu\text{g}$  se utilizó 0,2 y 0,3 ml de la solución de Tc-99m  $\text{O}_4^-$ . Para concentraciones mayores se agregó cantidades crecientes de solución de  $\text{NO}_3\text{Na}$  (reactivo analítico marca MALLINCKRODT) hasta concentraciones de 100, 200 y 300  $\mu\text{g}$ . En todos los casos el volumen final fue de 1,5 - 2 ml.

La concentración de  $\text{NO}_3\text{Na}$  de la solución eluyente se controló midiendo la transmitancia de 220  $\text{m}\mu$  de soluciones diluídas 1:10, con agua bidestilada en un espectrofotómetro con lámpara de deuterio marca PERKIN ELMER, Modelo EPS-3T. Se graficó absorbancia en función de concentración de soluciones estandar de  $\text{NO}_3\text{Na}$  de 2 a 20 ppm, rango en el cual la relación se mantiene lineal.

- Selección de enfermos:

Debido a que la BLM concentra en los tejidos donde es metabolizada: hígado y bazo y en el sistema urinario que es la vía de eliminación, para evitar errores de interpretación se seleccionaron pacientes con tumores supradiafragmáticos.



Los 20 pacientes, de sexo masculino, eran portadores de tumores epidermoides: cinco de pulmón estadio III, un carcinoma de esófago estadio III y catorce tumores ubicados en cabeza y cuello, de los cuales tres eran de estadio III y once estadio IV. Correspondían a enfermedad locorregionalmente avanzada pero sin metástasis a distancia. Fueron estadificados según la clasificación de la A.J.C.C.S. (American Joint Committee for Cancer Staging, 1977).

La histología, en todos los casos, fue certificada por anatomía patológica la que arrojó los siguientes resultados: siete carcinomas epidermoides bien diferenciados, seis semidiferenciados y siete poco diferenciados.

Dentro de los antecedentes de importancia en estos tipos de tumores es destacable el factor irritativo crónico: alcohol, cigarrillos, que al promover la formación de clones celulares neoplásicos, permiten la expresión fenotípica de genotipos aberrantes. Se registraron los antecedentes, las edades, los motivos de consulta y los datos clínicos globales.

La evaluación clínica fue realizada según protocolos de investigación clínica del Instituto de Oncología A.ROFFO, por la Dra. María C. ZARLENGA.

Se administró por vía intravenosa a cada paciente 7,5 mg de BLM, marcada con una actividad de Tc-99m de 20 mCi (740 MBq). Se realizaron las tomas centellográficas en una cámara OHIO-NUCLEAR INC. a los 5, 30, 60, 120 minutos y 24 horas. Las imágenes fueron procesadas y almacenadas en la computadora adosada a la cámara de centelleo SPECTRUM COMPUTERS Models 550/560, Nº 960108 Revisión A.

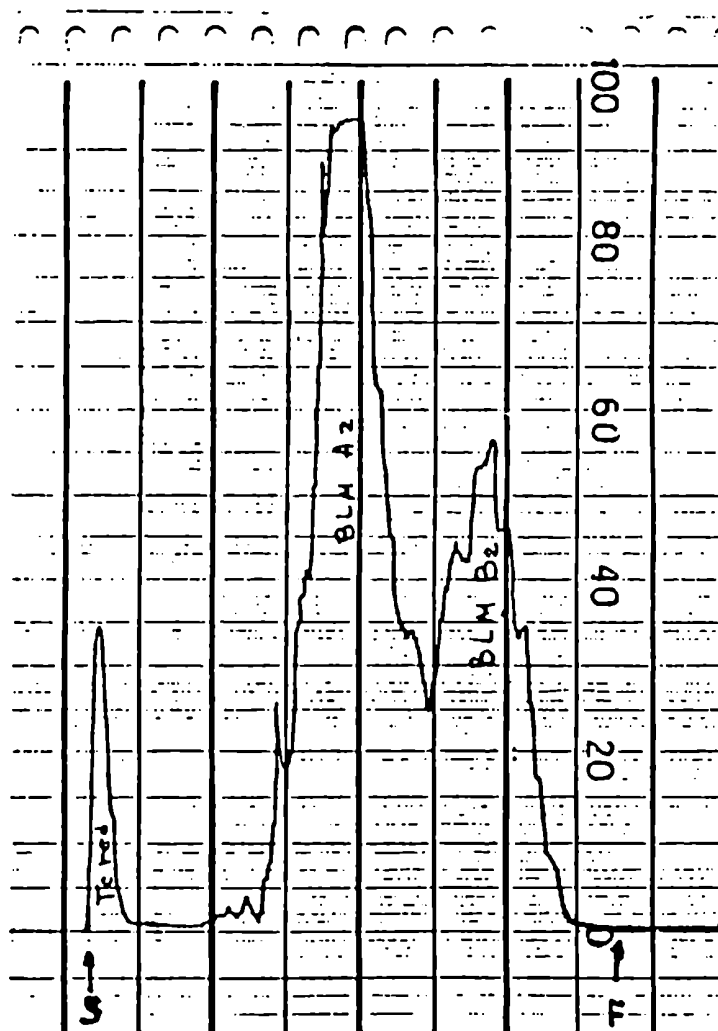


Las imágenes fueron obtenidas en modo Bay en Q (cada imagen ocupa un cuadrante en la pantalla), normal (no fueron magnificadas ni expandidas) acumulándose 1.000 k por imagen.

Para mejorar el contraste entre lesión tumoral y tejido normal circundante (fondo), se procedió a utilizar un programa de computación de sustracción de fondo.

## RESULTADOS

La BLM (15 mg) se marcó utilizando la celda electrolítica en la que circuló una corriente  $I = 0,7$  mA durante 15 seg. En estas condiciones, la cantidad de  $\text{Sn}^{2+}$  liberada fue de  $5,4 \times 10^{-5}$  mM. Cantidades mayores de  $\text{Sn}^{2+}$  producen un aumento del Tc reducido hidrolizado, identificado en el radiocromatograma con  $R_f: 0,0$ .



Radiocromatograma de BLM-Tc-99m a los 90 minutos post marcación con 0,1 ml de solución reciente de pertechnetato obtenido de un generador "GENTEC" que contiene 100  $\mu$ g/ml de  $\text{NO}_3\text{Na}$ . El generador fue eluido cada 24 horas.

Se utilizó como soporte TLC (silica gel) F-654 y solvente acetato de amonio 10%-metanol (1:1).

Tiempo de corrida: 1 hora.

La pureza radioquímica determinada por cromatografía ascendente, utilizando soporte ITLC-SG (Gelman) y solvente acetona, se utilizó para evaluar el porcentaje de marcación previo a la administración al paciente.

Los datos de cantidad de Tc-99m  $O_4^-$  determinados con esta técnica cromatográfica, se correspondieron con los registrados utilizando como soporte TLC (silica gel 60 F-654) y solvente acetato de amonio 10%-metanol (1:1)

Se determinó que entre 1 y 2 ml no influye el volumen en el rendimiento, ni en la cinética de marcación.

La pureza radioquímica de BLM-Tc-99m marcada a pH superiores a 7,0 revela el aumento de Tc-99m libre (Tc  $O_4^-$ ) a distintos tiempos post-marcación, cuando se la compara con preparados de pH 5,5-6,0.

El rendimiento de marcación aumenta a medida que disminuye el ion  $NO_3^-$  presente llegando a valores superiores al 90%, aún a los 60 minutos post-marcación para 5  $\mu$ g de  $NO_3Na$ .

$NO_3Na$ $\mu$ g	BLM Tc-99m %	Tc-99m $O_4^-$ %	Tc-99m red/col. %
5	92,6 $\pm$ 1,9	< 1	7,4 $\pm$ 2,0
30	88,8 $\pm$ 3,0	5,7 $\pm$ 1,1	5,5 $\pm$ 4,0
100	82,8 $\pm$ 3,0	10,4 $\pm$ 3,0	6,8 $\pm$ 2,5
200	75,9 $\pm$ 3,1	11,4 $\pm$ 4,0	12,8 $\pm$ 0,9
300	54,2 $\pm$ 3,1	30,5 $\pm$ 2,2	15,3 $\pm$ 0,5

BLM-Tc-99m: PUREZA RADIOQUIMICA 60 min. POST-MARCACION.  
INFLUENCIA DEL  $NO_3Na$ . (Cada valor es promedio de tres determinaciones.)

El gráfico de la FIGURA 1 muestra la cinética de marcación para concentraciones variables de  $NO_3Na$ , llegando a un máximo de rendimiento a los 90 minutos posteriores a la marcación. para 30 microgramos

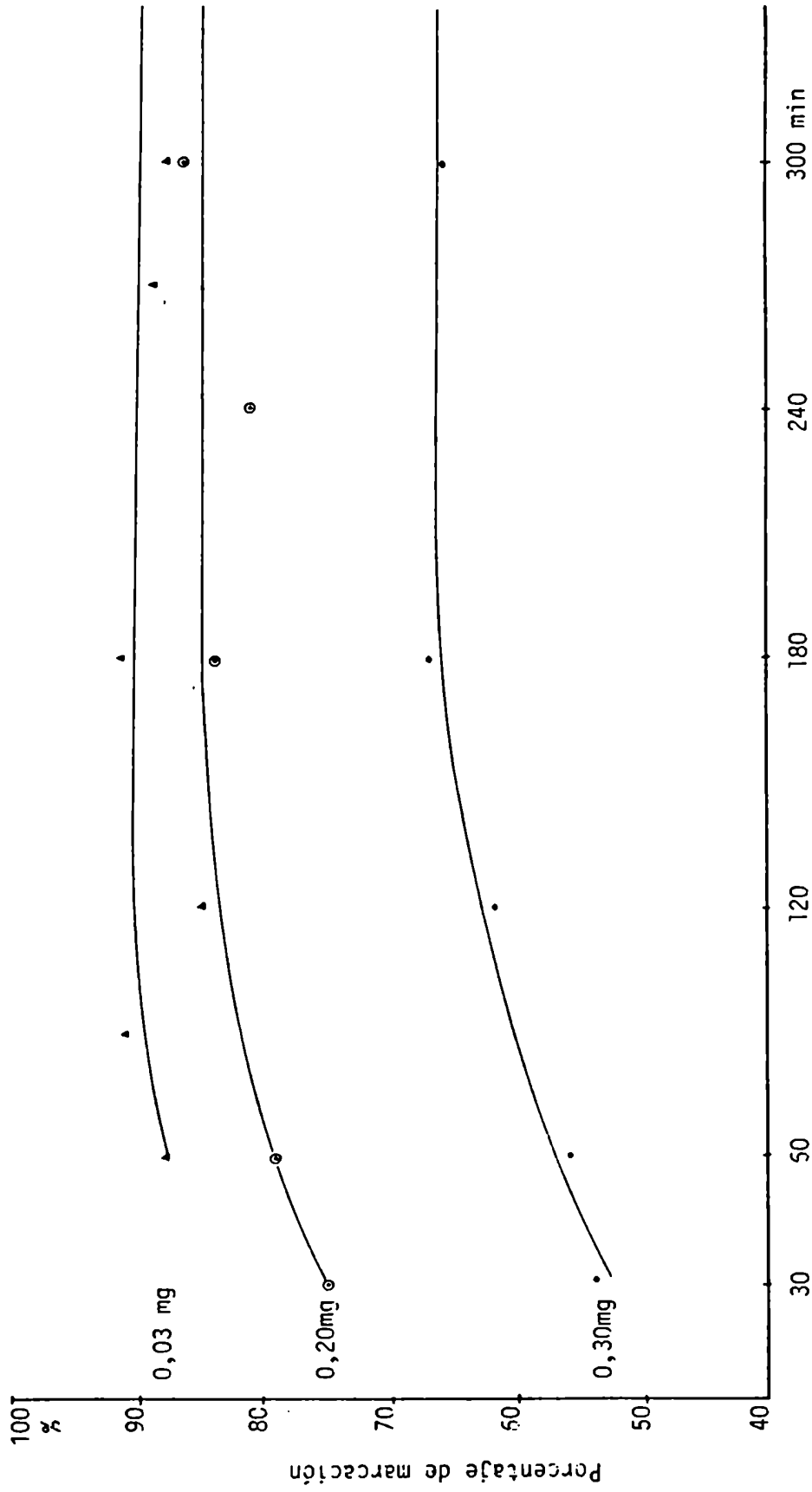


FIGURA Nº 1

- Estudios clínicos:

De los 20 pacientes estudiados, 18 concentraron el trazador sobre las áreas tumorales, 2 no concentraron (falsos negativos); por consiguiente, este método acusó una sensibilidad del 90%.

$$\text{sensibilidad} = \frac{\text{verdaderos positivos}}{\text{verdaderos positivos} + \text{falsos negativos}} \times 100$$

No se obtuvieron falsos positivos dado que las lesiones supuradas no concentraron el radiofármaco. (FOTO Nº 1)

La utilización de un programa de computación de sustracción de fondo permitió eliminar de la pantalla aquellas estructuras que no sufrieron cambios en la distribución del radiofármaco. De esta manera, se resaltan las zonas que a lo largo del tiempo habían concentrado el trazador: tumor, ganglios metastásicos, hígado, bazo, riñones. (Foto Nº 2)

Se determinó que el tiempo óptimo para visualizar las lesiones tumorales es de 3 horas post-administración. (Fotos 3 y 4)

En ningún caso se observó reacción adversa, debido a la administración del radiofármaco.

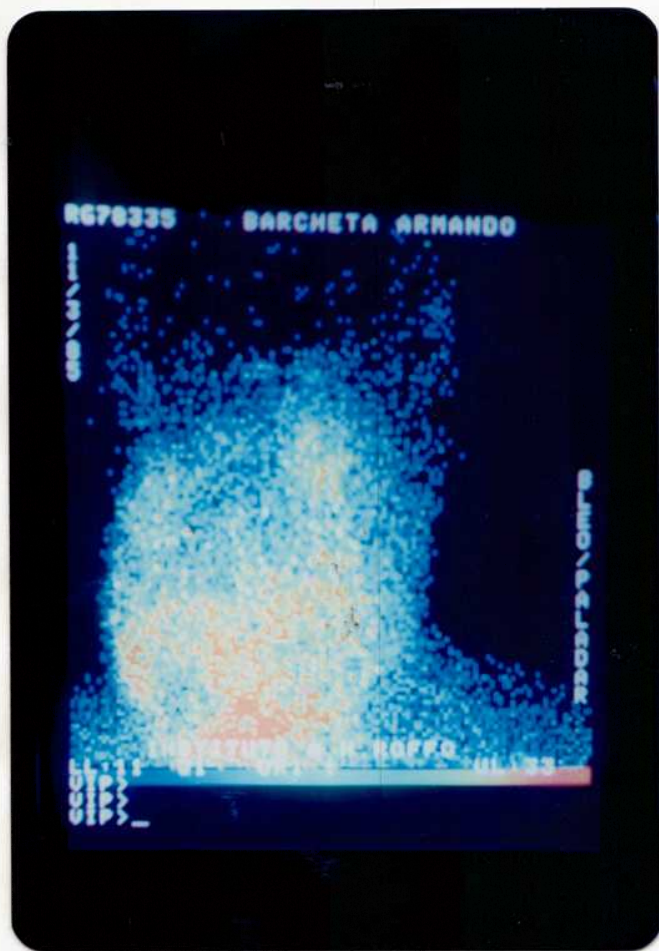


FOTO N° 1: Tumor epidermoide supraglótico derecho con zona supurada negativa.

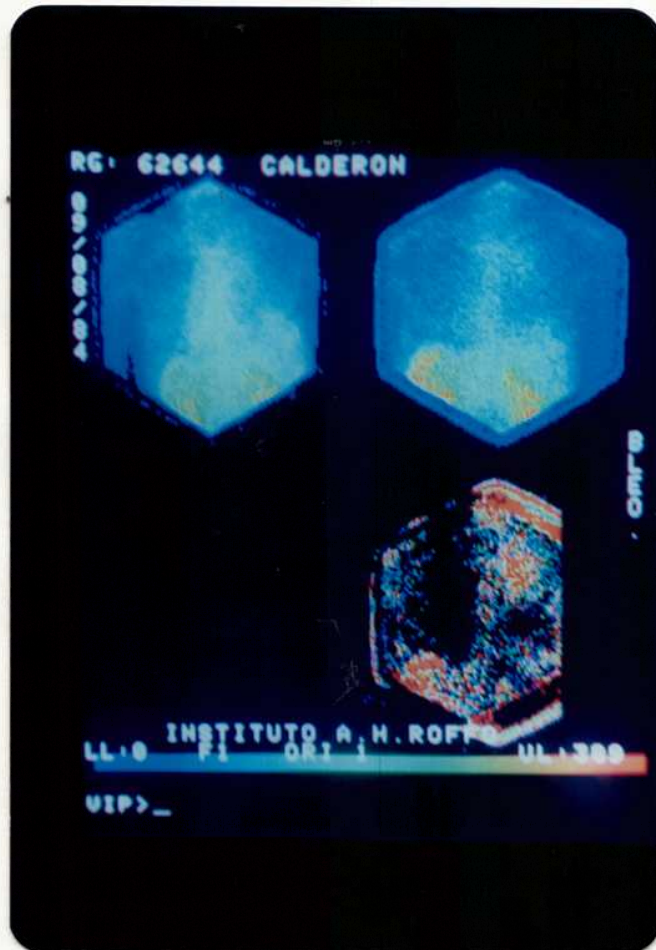
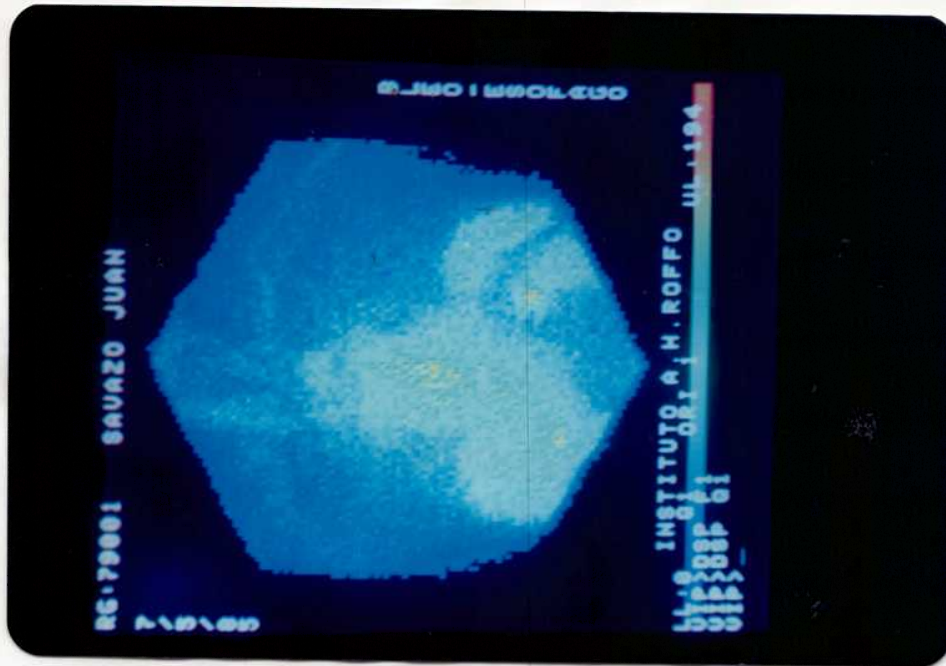
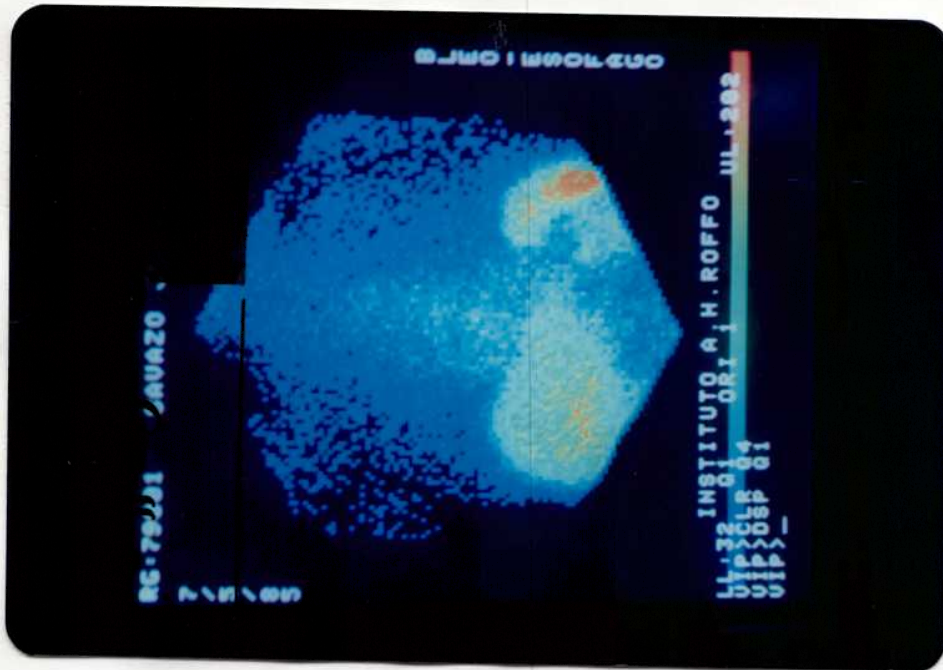


FOTO N° 2: Cáncer epidermoide de pulmón izquierdo y ganglios mediastinales.



a)



b)

FOTOS Nº 3: Cáncer pavimentoso bien diferenciado de esófago

- a). 5 min. post inyección
- b). 3 hs. post inyección



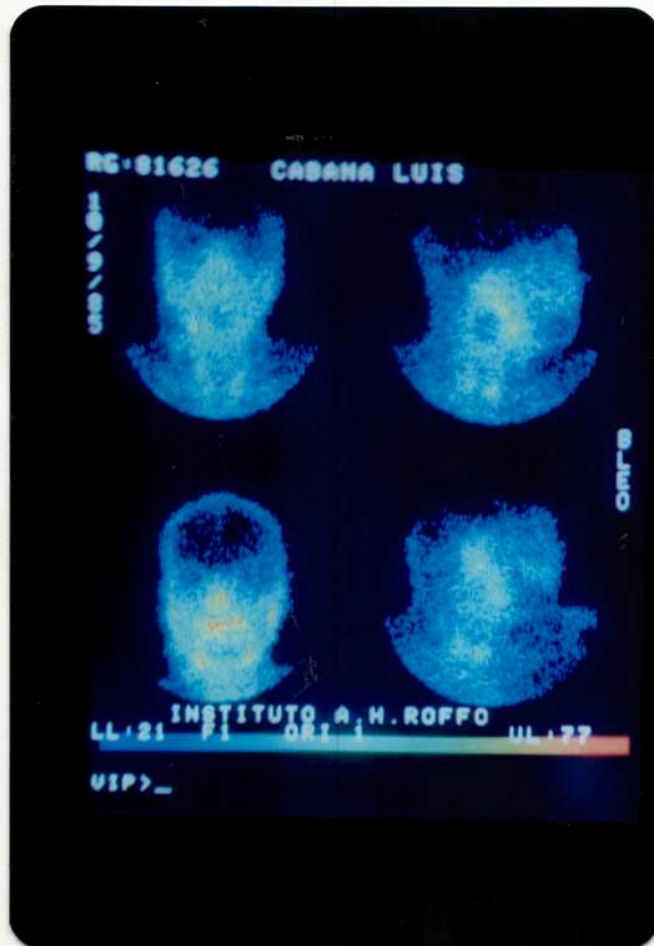


FOTO Nº 4: Imagen (frente y lateral derecho) con zona negativa correspondiente a una adenopatía ulcerada (por tumor en el piso de la boca) que se positivizó a las 3 horas.

## CONCLUSIONES

A pesar de que varias firmas que comercializan generadores de Mo-99/Tc-99m declaran cantidades variables de  $\text{NO}_3\text{Na}$  en las soluciones eluyentes, no existían hasta el presente estudios sobre la influencia de éste u otro oxidante en el rendimiento de marcación de la BLM-Tc-99m. Es interesante hacer notar que BARDY, A. (32) que asegura rendimientos de marcación mayores del 85%, se presume utiliza eluciones con 50 ppm de  $\text{NO}_3\text{Na}$  (CIS), no obstante en un caso particular cuando emplea el menor volumen de pertecneciato, 0,5 ml, obtiene rendimientos del 94,1 %.

Tampoco se ha encontrado en la bibliografía la determinación de los tiempos óptimos post-marcación; esta omisión explicaría la variabilidad en el porcentaje de marcación 50-75% en un determinado método. (31) En este trabajo se han investigado las causas de la variabilidad en los rendimientos de marcación de la BLM-Tc-99m, encontrando las condiciones óptimas para obtener un producto de alta pureza radioquímica con un método de excelente reproducibilidad.

Se utiliza una técnica rápida que no requiere personal altamente especializado y puede ser implementada en cualquier centro de medicina nuclear, dado que:

- 1). No requiere preparación diaria de soluciones de  $\text{Sn}^{2+}$  que en concentraciones de  $10^{-8}$  requiere severas condiciones, debido a la tendencia a formar especies hidrolizadas que obligarían a trabajar en ambientes libres de oxígeno por burbujeo constante de nitrógeno. (Aún así, la solución comienza a envejecer desde el inicio de la dilución de los cristales de  $\text{Cl}_2\text{Sn}$ ).
- 2). No debe ajustarse el pH. En las condiciones fijadas el pH final queda en 5,5-6,0.
- 3). No es necesario el pasaje por membrana filtrante para esterilizar el producto final.

- ESTUDIOS CLINICOS:

El tiempo medio biológico de la BLM depende de mecanismos biológicos de inactivación por una encima aminopeptidasa, la "BLM hidrolasa" que se encuentra en todos los tejidos, hallándose en baja concentración en pulmón y piel, sitios donde la BLM ejerce su acción tóxica.

MÜLLER y col. (42) midieron la "BLM hidrolasa" en 23 pacientes con cáncer de cabeza y cuello hallando que los carcinomas bien y moderadamente diferenciados tenían una actividad pobre, mientras que los poco diferenciados e indiferenciados tenían una actividad aumentada.

Los dos pacientes que acusaron estudios negativos eran portadores de tumores epidermoides bien diferenciados, lo que nos indicaría una baja actividad encimática, hipótesis que se correlacionaría con lo demostrado por MULLER y col., que encontraron una baja actividad encimática en aquellos tumores altamente diferenciados, por lo que la BLM, al no ser degradada encimáticamente, seguiría circulando sin acumularse en el área tumoral.

El método de sustracción de fondo, resultó útil para resaltar aquellas lesiones en las cuales la concentración del trazador era baja (FOTO Nº 2)

Contrariamente a lo que sucede con la BLM marcada con otros metales (Ga), la BLM-Tc-99m no concentra en lesiones no tumorales supuradas (FOTO Nº 1 )

La BLM-Tc-99m demostró ser estable "in vitro" e "in vivo". Probó ser eficaz para marcar tumores epidermoides con una sensibilidad del 90%.

**IODOBENCILGUANIDINA-I 1**



**(mIBG-I 131)**

## INTRODUCCION

Las glándulas adrenales consisten en dos regiones funcional y embriológicamente distintas: la corteza y la médula.

Para obtener la imagen centellográfica de la corteza adrenal y sus neoplasmas se ha utilizado radiocolesterol (43). Sin embargo no se tenía un radiofármaco comparable para la médula adrenal y sus neoplasmas, tales como feocromocitomas y neuroblastomas.

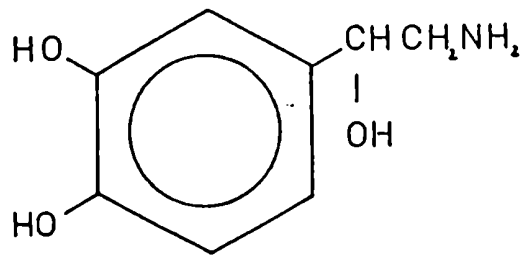
En base al rol que juega la médula adrenal en la síntesis y almacenamiento de las catecolaminas, se marcó dopamina y sus análogos para la imagen de la médula adrenal (44).

A partir de la similitud funcional entre las células cromafínicas de la médula adrenal y las neuronas adrenérgicas, se utilizó un compuesto análogo radioiodado del agente antiadrenérgico "bretylum" para obtener la primera imagen de la médula adrenal. (45)

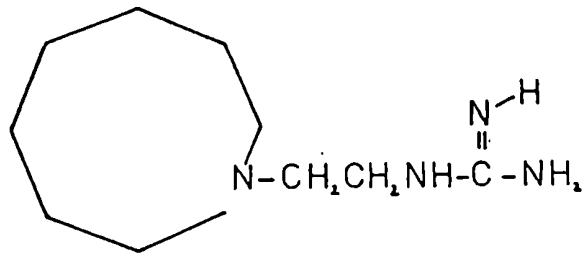
Si bien promisorios, ninguno de estos agentes fue lo suficientemente exitoso para ser aplicado en humanos.

Como el bretylum, la guanetidina es un potente agente de bloqueo neuronal que actúa selectivamente sobre los nervios adrenérgicos. Desde la década del 60, la combinación de la porción bencílica del bretylum con el grupo guanidina de la guanetidina ha proporcionado a la medicina una variedad de aralkilguanidinas con una alta potencia antiadrenérgica. (46)

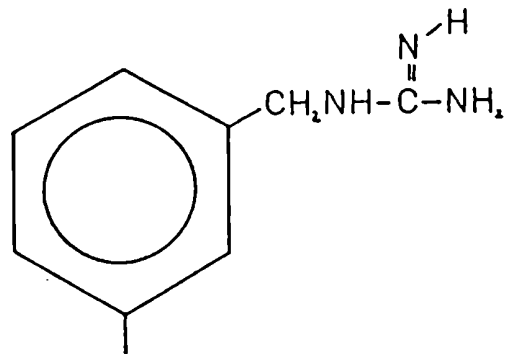
Wieland y col. (47) evaluaron las aralkilguanidinas radioiodadas como agentes potenciales para imagen de médula y miocardio. Las imágenes fueron obtenidas administrando a perros iodobencilguanidina I-131, demostrando así la afinidad de estos compuestos por la médula adrenal.



NOREPINEFRINA



GUANETIDINA



I M-IBG

COMPARACION DE LA ESTRUCTURA DE LA  
 NOREPINEFRINA, GUANETIDINA Y META-IODOBENCILGUANIDINA

Sintetizaron los tres isómeros: orto, meta y para bencilguanidina y marcaron con I-131.

Los compuestos meta y para mostraron más afinidad que el isómero orto.

La concentración en médula adrenal del isómero para fue un orden de magnitud más alta que los obtenidos con dopamina marcada y cuatro veces la obtenida con un análogo del bretylium, el I-131-iodobencildimetil  $\beta$  hidroxietilamonio.

En los nervios adrenérgicos, la guanetidina y la fenetilguanidina tendrían el mismo transporte que la norepinefrina y acumularían en los gránulos de almacenamiento intraneurales, desplazando a la norepinefrina. (48)

Se explicaría así la larga retención de los isómeros meta y para bencilguanidina en médula adrenal, dado el rol fisiológico que éste juega en el almacenamiento de las catecolaminas por largo tiempo.

La actividad en tiroides, debido al secuestro del radioiodo es menor para el isómero meta, demostrando ser el más resistente a la deiodinación "in vivo".

Sisson (49) utilizó en humanos portadores de feocromocitomas la meta iodobencilguanidina (I-131) obteniendo alta concentración en tumor. Esta alta concentración en tumor ha sugerido la aplicación de la m-IBG (I-131) en altas dosis para tratamientos terapéuticos.

Si bien la eficacia diagnóstica del compuesto ha sido ampliamente demostrada, no así su eficacia como agente terapéutico.

El motivo de este trabajo fue sintetizar la m-iodobencilguanidina, seleccionar el método de marcación con I-131, establecer los métodos de control de calidad, estudiar la farmacocinética del producto marcado en animales de laboratorio, determinar la estabilidad y elaborar un informe a partir de los estudios clínicos en pacientes con presunto diagnóstico de feocromocitomas o neuroblastomas.



## MATERIALES Y METODO

### SINTESIS DE LA METAIODOBENCILGUANIDINA:

La MIBG se sintetizó según el método de Wiland y col.(47) En un baño de aceite se calentó a 100°C durante 4 horas, 589 mg (2,0 milimoles) de clorhidrato de MIBG y 125 mg de cianamida (3,0 milimoles).(FIGURA Nº 2)

El sólido vítreo resultante fue disuelto en 1 ml de agua. Se precipitó luego como bicarbonato por agregado gota a gota de 200 mg (2,0 milimoles) de CO<sub>3</sub>HK disueltos en 1 ml de agua.

Se lavó el precipitado con agua fría para luego agregarle 5 ml de una solución de SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> 0,32N (1,6 miliequivalentes).

La suspensión resultante se calentó hasta disolución y el derivado sulfato se cristalizó enfriando a temperatura ambiente.

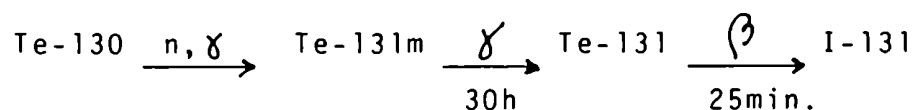
Los cristales incoloros se filtraron y lavarón con agua fría.

El producto MIBG como sulfato, se cristalizó en etanol-agua hasta que el punto de fusión llegó al valor de 164-165°C.

### SOLUCION DE I-131:

Se utilizó Na I-131 sin portador ni reductor producido en la Comisión Nacional de Energía Atómica (50).

El I-131 se produce por reacción n,γ sobre óxido de telurio en el reactor RA-3 del Centro Atómico Ezeiza.



SINTESIS DE LA m- IODOBENCILGUANIDINA

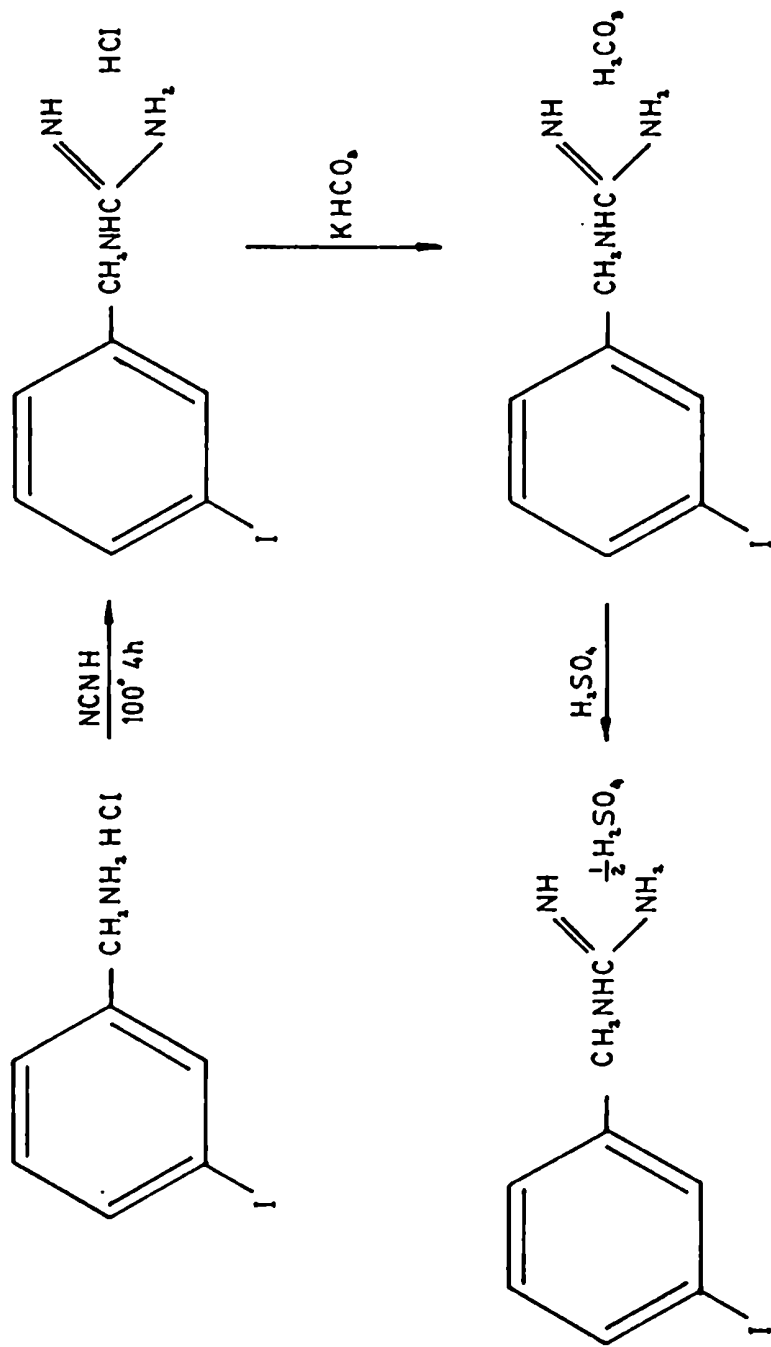


FIGURA Nº 2

El blanco irradiado es disuelto en solución de hidróxido de sodio y el ión yoduro se coprecipita sobre óxido de plata formado "in situ"; separado el precipitado por sedimentación, la disolución con ácido sulfúrico 10 M es favorecida por el tratamiento previo con persulfato de amonio y peróxido de hidrógeno adicionados para oxidar el telurito de sodio.

El I-131 se separa por destilación y recoge en solución reguladora de carbonato-bicarbonato de sodio de pH 9,0.

La concentración de actividad está comprendida entre 40 y 100 mCi por ml, siendo la actividad específica superior a  $10 \text{ Ci mg}^{-1}$ .

Se llevaron a cabo los controles de calidad de la solución de I-131:

- Control de pureza radioquímica:

Se determinó por cromatografía ascendente utilizando como soporte papel Whatman Nº 1 y como solvente metanol al 75%, siendo los Rf:

Periodato	0,0 - 0,10
Iodato	0,45- 0,50
Ioduro	0,75

El radiocromatograma se obtuvo en un radiocromatógrafo Packard, Modelo 720.

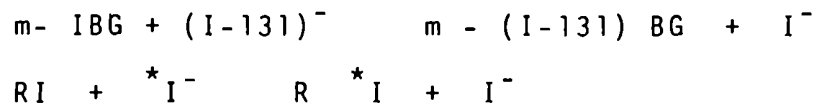
- Control de pureza radionucleídica:

La pureza radionucleídica se determinó analizando el espectro gamma obtenido en un detector de estado sólido de germanio hiperpuro asociado a un multicanal.

-pH: El pH de la solución de I-131 se determinó en un peachímetro marca LUFTMAN, modelo Digimeter II.

- Síntesis del compuesto marcado:

La radioiodinación de la MIBG se lleva a cabo por una reacción de sustitución nucleofílica.



Siendo el producto químicamente idéntico a los reactivos, la energía de ambos es la misma y por lo tanto la constante de equilibrio será la unidad:

$$K = \frac{(R {}^*I) (I^-)}{(R I) ({}^*I^-)} = 1$$

$$\frac{(R {}^*I)}{({}^*I^-)} = \frac{(R I)}{(I^-)}$$

$$\% \text{ Intercambio} = 100 \frac{(R {}^*I)}{(R {}^*I) + ({}^*I)} = \frac{100}{1 + (I^-)/(R I)}$$

En el equilibrio, la incorporación de radioiodo (el rendimiento de marcación) es una función inversa del cociente entre la masa de yoduro (portador) y el sustrato (m-IBG).

Para radioiodo libre de portador, el rendimiento de intercambio en base a las consideraciones en el equilibrio, sería mayor al 99,9%.

En la práctica, la concentración máxima de I-131 representa el 30% en peso del yodo total presente.

Los procedimientos basados en la irradiación de Te o de sus compuestos lleva a la formación de distintos isótopos del I: I-127; I-129 e I-131(51). El I-127 es estable y

el I-129 tiene un período de semidesintegración de  $2 \times 10^7$  años, y si bien el I-131 representa prácticamente la única actividad de iodo presente, las masas de los isótopos de iodo formados en la irradiación corresponden a:

I-127: 55,6%; I-129: 14,88%; I-131: 29,6%.

Si el rendimiento en el equilibrio depende sólo del cociente de las concentraciones de los reactivos, la velocidad de reacción es la que determina el rendimiento efectivo del producto marcado. Los factores que afectan la velocidad de la reacción son: temperatura, concentración del sustrato, pH y sustancias catalíticas.

### 1). Temperatura:

Es difícil llevar a cabo con buenos rendimientos la radioiodinación en la posición meta por simple intercambio isotópico utilizando métodos convencionales, por lo que se utilizó la técnica de "fusión" que consiste en llevar a cabo la radioiodinación a temperaturas de fusión del compuesto a marcar. (52), (53) y (54).

### 2). Concentración del sustrato:

El incremento de la concentración de MIBG aumenta el rendimiento de marcación, sin embargo la actividad específica del producto marcado disminuye debido a la dilución con el sustrato sin marcar, por lo que se debe establecer un balance entre el rendimiento de marcación y la actividad específica del producto. Debido a la especificidad de biolocalización del producto marcado se centró la atención en la obtención de un producto de alta actividad específica en perjuicio del rendimiento de la reacción. Se utilizaron en cada proceso 2 mg de MIBG.

### 3). pH:

Es conocido el hecho de que la presencia de un exceso de base en las soluciones del radioiodo tiende a inhibir

el intercambio.

El pH es una de las variables más importantes en la caracterización de las diferentes fuentes de provisión de radioiodo destinado a la marcación de diversos sustratos.

Se agregó solución de ácido sulfúrico diluido (0,02N) para llevar el pH de la mezcla reactiva a valores que variaron entre 3,5 y 5,0. Se estudió la influencia del pH en el rendimiento de marcación.

#### 4). Sustancias catalíticas:

Se ha destacado la importancia de la presencia de sulfato de amonio como catalítico de la reacción de marcación de MIBG con radioiodo.

Se dispuso el agregado de cantidades variables de sulfato de amonio para estudiar el efecto en el proceso de marcación de la MIBG. (3 - 5 mg)

#### Método:

La m-IBG, el sulfato de amonio, la solución de ácido sulfúrico 0,02N y por último la solución de I-131 sin portador ni reductor (15-30 mCi), se colocaron en un frasco tipo penicilina de 15 ml de capacidad y éste dentro de un baño de parafina provisto de un termómetro de 0-200°C.

Originalmente la mezcla reactiva está en solución en un volumen de 1-1,5 ml.

El sistema comienza a calefaccionarse y a liberar I-131 desde el inicio de la reacción, por lo que se colocó dentro de una celda radioquímica adecuada provista de un sistema de extracción de aire con filtro absoluto de carbón activado.

La mezcla reactiva se llevó a sequedad y luego a temperatura entre 140 y 160°C durante 90 minutos.

Interrumpido el calentamiento y a temperatura ambiente se agregó 1-2 ml de solución fisiológica.

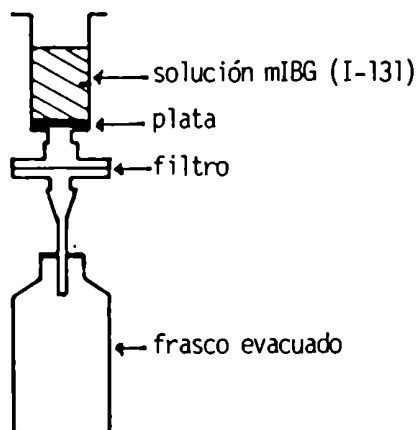
- CONTROL DE LA PUREZA RADIOQUIMICA:

Se determinó la pureza radioquímica por cromatografía ascendente utilizando como soporte una capa delgada de gel de sílice marca Gelman (TLC-SG) y solvente la capa superior de una mezcla de tolueno-ácido acético-butanol-agua(4:3:2:2)

- PURIFICACION DE LA m-IBG (I-131):

La bibliografía propone diversas resinas para la separación del ión ioduro no unido al compuesto radioiodado; para m-IBG se han utilizado: resina aniónica Cellex-D (Bio-Rad), (47), (55) AG1-X8, (56), (57).

Se ensayó la eficacia de plata pulverizada en la purificación de m-IBG (I-131).



**- CONTROLES FARMACOLOGICOS:**

**- Determinación de pirógenos:**

Se realizaron los controles de pirógenos "in vivo" en conejos, según lo establecido en la Farmacopea Nacional Argentina.

Se realizaron ensayos "in vitro" para determinar endotoxinas de bacterias Gram-negativas en base a la reacción con el LAL (Limulus Amebocyte Lysate) de la firma KabiVitrum que incluye un sustrato cromogénico para cuantificar la endotoxina.

El sustrato es un péptido sintético con el grupo cromóforo para nitroanilina (pNA).

Las endotoxinas de las bacterias Gram-negativas catalizan la activación de una proenzima del LAL. Esta enzima libera la pNA. La reacción se interrumpe con ácido acético al 20% y la cantidad de pNA liberada es medida fotométricamente a 405 nm.

Existe una correlación lineal entre la absorbancia y la cantidad de endotoxina entre 0,1 y 1,2 EU/ml (EU: unidades de endotoxina).

1. Proenzima  $\xrightarrow{\text{Endotoxina}}$  Enzima

2. Sustrato  $\xrightarrow{\text{Enzima}}$  péptido + pNA (amarillo)

Se procesaron simultáneamente con las muestras de m-IBG (I-131) soluciones standard de endotoxinas, según el protocolo de la firma proveedora.



La experiencia se llevó a cabo en un baño termosta-  
tizado a  $37 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ , marca P.M.Tamson N.V. Holland.

La absorbancia se midió en un espectrofotómetro Perkin  
Elmer modelo EPS-ST, utilizando semi-micro cubetas de 1 ml.

Se utilizó la fórmula:

$$\text{Endotoxina (EU/ml)} = \frac{0,60}{A_{1,2} - A_{0,6}} \times (A_x + A_{1,2} - 2A_{0,6})$$

donde:

$A_{0,6}$  y  $A_{1,2}$  son las absorbancias de la solución standard  
de 0,6 y 1,2 EU/ml respectivamente.

$A_x$  es la absorbancia de la muestra.

#### - Ensayos de esterilidad:

Luego de ser esterilizada por pasaje por membrana fil-  
trante de  $0,22\mu\text{m}$ , la m-IBG (I-131) se sembró en medio só  
lido Saboraud y caldo nutritivo para hongos y bacterias, res-  
pectivamente.

Se mantuvieron los medios de cultivo a  $20-21^{\circ}\text{C}$  los pri-  
meros y a  $36-37^{\circ}\text{C}$  los segundos con observación diaria.

La m-IBG (I-131) se dispensa a las 48 horas si los  
cultivos son negativos, sin embargo el ensayo de esterili-  
dad se completa a los 15 días siendo en realidad un ensayo  
de garantía de calidad del proceso.

- Ensayos de toxicidad:

Para cada nueva síntesis de la metaiodobencilguanidina se realizó el ensayo de toxicidad en ratones blancos de 25 g de peso.

Se les administró en la vena de la cola en forma lenta (1 minuto) 0,4 ml de la solución de m-IBG de 0,05 mg/ml.

Los animales se dejaron en observación. Se sacrificaron a los 15 días, se pesaron para determinar la probable pérdida de peso y se procedió a la observación visual de los órganos internos.

- FARMACOCINETICA DE LA m-IBG

Se estudió la farmacocinética de la metaiodobencilguanidina radioiodada en 16 ratas macho de la cepa Wistar de 250 g de peso.

Los animales fueron anestesiados por inhalación de éter etílico, previo a la administración intravenosa en la vena del pene, de 5  $\mu$ Ci de m-IBG (I-131) en un volumen de 0,25 ml (actividad específica 5 mCi/mg m-IBG).

Los animales se anestesiaron administrando uretano por vía intraperitoneal (1g/kg de peso), 15 minutos previo al sacrificio.

Por extracción de sangre de la arteria femoral fueron sacrificados a las 2, 24, 43 y 120 horas post-administración del radiofármaco.

Se separaron los diferentes órganos, pesaron y midieron en un contador gamma con cambiador automático de tubos Alfa Nuclear, modelo MP con computadora Zenit Data Systems.

Una dosis igual a la administrada a los animales se diluyó convenientemente y una parte alícuota se midió junto con los órganos disecados, con el fin de poder calcular el porciento de dosis inyectada en cada órgano.

- ESTABILIDAD:

Cada 48 horas se determinó la pureza radioquímica de soluciones de mIBG (I-131) almacenadas en la oscuridad a 20, 4 y -20°C.

Las muestras tenían inicialmente las siguientes características:

concentración de actividad	0,5 mCi/ml
actividad específica	4-6 mCi/mg
pH	6,0
pureza radioquímica	mayor del .98%

- ESTUDIOS CLINICOS:

Durante 1988 y 1989 se dispensaron 73 dosis de mIBG (I-131) de 1 mCi a diversos Centros de Medicina Nuclear.

La solución inyectable de MIBG-I-131 para diagnóstico, es una solución estéril, apirógena, límpida e incolora que contiene 0,04 mg de metaiodobencilguanidina y 9 mg de cloruro de sodio por ml de solución, con las siguientes características:

pH	6,0 - 6,5
concentración de actividad	0,2 mCI/ml
actividad específica	2,5 - 5,0 mCI/mg
pureza radioquímica	mayor del 98%

Empleo: desde el día previo a la inyección y durante 7 días por lo menos, debe administrarse al paciente solución de lugol por vía oral, 5-10 gotas dos veces por día para bloquear la tiroides y disminuir la dosis de radiación por la liberación del radioiodo.

Para un adulto de 70 Kg, la dosis aconsejada es de 18,5 MBq (0,5 mCi) por administración lenta (2 minutos) por vía intravenosa.

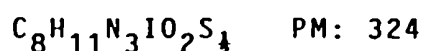
El estudio se efectúa entre las 24 y 48 horas posteriores, siendo conveniente utilizar cámara gamma con sistema de computación. Una vez obtenido el registro óptimo es aconsejable efectuar centellografía hepática (Tc-J 3/2) y renal (Tc J4) para poder realizar sustracción de imágenes.

Tc-J 3/2 y Tc J4: nombres comerciales de CNEA para los reactivos para preparar fitato-Tc 99m y Dietilentríaminopentaacetato de Ca y Na-Tc 99m respectivamente.

## RESULTADOS

### - CONTROL DE CALIDAD DE LA m-IBG

La composición centesimal de la m-IBG sintetizada según el método de Wieland se determinó en el Laboratorio de Microanálisis (FCEN-UBA).



	C %	H %	N %
Calculado	29,63	3,39	12,96
Encontrado	29,37	3,61	12,65

### - CONTROL DE CALIDAD DE LA SOLUCION de NaI-131

La pureza radioquímica determinada por cromatografía fue mayor del 99%, revelando la presencia de un sólo pico de actividad con Rf:0,75 correspondiente al ión ioduro.

El espectro gamma de la solución coincide con el espectro del I-131, no detectando la presencia de impurezas radiactivas.

Los valores de pH variaron entre 7,5 - 8,0.

### - INFLUENCIA DEL pH Y AGREGADO DE SULFATO DE AMONIO EN LA RADIOIODINACION DE LA m-IBG

Del estudio de la influencia del pH en el proceso de radioiodinación de la m-IBG, se concluye que a pH entre 4 y 5 no se detectan diferencias significativas en el rendimiento de marcación (75-80%), ni en la pureza radioquímica del producto final.

A pH 3,5 baja considerablemente el rendimiento de marcación a valores menores del 50%, debido a la pérdida de yodo por volatilización.

La variación de la cantidad de sulfato de amonio entre 3 y 5 mg no modifica ni el rendimiento ni las características del compuesto radioiodado.

En todos los casos, la pureza radioquímica fue mayor del 98%.

#### - CONTROL DE LA PUREZA RADIOQUIMICA DE LA m-IBG (I-131)

Utilizando la técnica cromatográfica propuesta, los Rf de la m-IBG (I-131) y las probables impurezas radiactivas son los siguientes:

	Rf
m-IBG (I-131)	0,30 - 0,35
(I-131) <sup>-</sup>	0,00 - 0,10
benzoico (I-131)	0,90 - 1,00

La principal forma de descomposición de los compuestos radioiodados es por liberación del ión yoduro.

En algunos procesos de marcación de m-IBG (I-131) se obtuvo 1-2% de una sustancia radioiodada que corre con Rf: 0,90-1,00, coincidiendo con el Rf del ácido benzoico en ese medio.

#### - PURIFICACION DE LA m-IBG (I-131)

Se corroboró la eficacia de la plata pulverizada para la retención del ión yoduro. Sin embargo, utilizando el método de marcación propuesto, se obtiene un producto con pureza radioquímica mayor del 98% por lo que, luego de una

dilución apropiada y pasaje por membrana filtrante, el radio fármaco está listo para su uso siendo innecesario proceder a su purificación.

#### - CONTROLES FARMACOLOGICOS

Se cumplieron los ensayos de esterilidad y pirógenos de muestras de m-IBG (I-131) destinadas para uso humano.

Se determinó que la m-IBG no inhibe la reacción de cuantificación de pirógenos "in vitro" por el método propuesto, determinando la concentración de endotoxinas en muestras apirógenas de mIBG a las que se adicionó solución estandar de endotoxina. Se descartó así la posibilidad de resultados falsos negativos.

Los ratones sometidos al ensayo de toxicidad (0,8 mg de mIBG/Kg de peso) sobrevivieron sin variación de peso apreciable; no se observaron reacciones adversas y la inspección visual de los órganos internos de los animales sacrificados 15 días post administración, no evidenció ninguna anomalía.

#### - FARMACOCINETICA DE LA MIBG

La TABLA 1 muestra el porcentaje de dosis inyectada en diferentes tejidos de ratas y la TABLA 2 el % DI/g de tejido.

A las 24 horas el nivel de tiroides, debido al I-131 liberado "in vivo", alcanza la máxima actividad. (GRAFICO Nº 1)

Desde el punto de vista de la posibilidad de obtener imágenes cardíacas, la concentración en corazón es similar a la que se obtiene con Tl-201, debido a la inervación simpática de dicho órgano. (GRAFICO Nº 2)

La larga retención del compuesto en la médula adrenal, aún a los 5 días de la administración, con todos los otros órganos con muy bajos niveles de actividad, dan relaciones de concentración entre médula adrenal y estos órganos, entre

10 y 40. (GRAFICO Nº 3)

T A B L A 1

PORCENTAJE DE MIBG(I-131) EN DIFERENTES TEJIDOS DE RATAS

(n=3)

<u>ORGANO</u>	<u>2 horas</u>	<u>24 horas</u>	<u>43 horas</u>	<u>120 horas</u>
sangre	3,26 <sup>±</sup> 0,14	1,10 <sup>±</sup> 0,04	0,45 <sup>±</sup> 0,00	0,27 <sup>±</sup> 0,03
bazo	0,67 <sup>±</sup> 0,11	0,11 <sup>±</sup> 0,00	0,04 <sup>±</sup> 0,01	0,03 <sup>±</sup> 0,00
riñón	2,91 <sup>±</sup> 0,01	0,28 <sup>±</sup> 0,02	0,11 <sup>±</sup> 0,01	0,07 <sup>±</sup> 0,01
adrenales	0,12 <sup>±</sup> 0,03	0,05 <sup>±</sup> 0,01	0,04 <sup>±</sup> 0,00	0,04 <sup>±</sup> 0,00
hígado	3,45 <sup>±</sup> 0,16	0,83 <sup>±</sup> 0,14	0,46 <sup>±</sup> 0,05	0,24 <sup>±</sup> 0,01
pulmón	1,53 <sup>±</sup> 0,53	0,23 <sup>±</sup> 0,10	0,08 <sup>±</sup> 0,02	0,07 <sup>±</sup> 0,03
corazón	2,90 <sup>±</sup> 0,19	0,17 <sup>±</sup> 0,02	0,07 <sup>±</sup> 0,00	0,04 <sup>±</sup> 0,00
tiroides	0,29 <sup>±</sup> 0,08	1,74 <sup>±</sup> 0,50	1,51 <sup>±</sup> 0,07	0,91 <sup>±</sup> 0,15

A las dos horas posteriores a la administración se determinó además el porciento de dosis en otros órganos:

músculo	30,24 <sup>±</sup> 10,08
estómago e intestinos	18,48 <sup>±</sup> 2,80
orina	9,70 <sup>±</sup> 2,31
hueso	4,48 <sup>±</sup> 0,61

- ESTABILIDAD

La pureza radioquímica de soluciones de mIBG (I-131) sometidas a los ensayos de estabilidad revela la descomposición del producto por liberación de (I-131)<sup>-</sup> en relación directa con el tiempo y la temperatura de almacenamiento.



A -20°C el producto se mantuvo estable por lo menos durante 1 mes, aún para preparados con valores iniciales de actividad específica y concentración de actividad de 5 mCi/mg y 2 mCi/ml. A 4°C la estabilidad de la MIBG (I-131) es de unos pocos días. La descomposición se acelera a temperatura ambiente (20°C).

El proceso de autoclavado ejerce un efecto negativo en la estabilidad

PORCENTAJE DE DOSIS DE MIBG (I-131) POR GRAMO DE TEJIDO DE RATA WISTAR (n=3)

<u>ORGANO</u>	<u>2 horas</u>	<u>24 horas</u>	<u>43 horas</u>	<u>120 horas</u>
sangre	0,205	0,079	0,029	0,020
bazo	1,283	0,241	0,097	0,106
riñón	4,087	0,152	0,055	0,044
adrenales	2,00	0,83	0,87	0,76
hígado	0,627	0,099	0,038	0,037
pulmón	1,677	0,192	0,074	0,062
corazón	2,297	0,210	0,083	0,059
tiroides	2,099	17,38	15,10	9,06

- ESTUDIOS CLINICOS:

De las 73 dosis entregadas a distintos centros hospitalarios sólo en un caso se informó un resultado falso negativo.

El CUADRO Nº 1 presenta una evaluación de la MIBG (I-131) realizada en 8 pacientes del Centro De Medicina Nuclear del Hospital Ricardo Gutiérrez.

- DIAGNOSTICO Y CONFIRMACION:

1. Feocromocitoma recidiva  
Por cirugía se confirmó la presencia de un feocromocitoma bilateral.
2. Ganglioneuroma paravertebral  
La imagen negativa de las suprarrenales coincide con la imagen normal similar obtenida con MIBG (I-131). CIS-Francia.
3. Neuroblastoma estadio IV de evolución prolongada.  
Confirmación por imagen similar con MIBG (I-131). CIS-Francia.
4. Sin diagnóstico (hipertenso)  
Ewing var neuroectodérmico
5. Sin diagnóstico (hipertenso)
6. Neuroblastoma estadio IV (en evolución)
7. Neuroblastoma estadio I  
Estudio hecho post adrenalectomía; confirmación por imagen similar con MIBG (I-131). CIS-Francia.
8. Hallazgo de tumor adrenal por radiografía.

CUADRO Nº 1

PACIENTE Nº	EDAD (años)	INFORME		CALIDAD DE IMAGEN	DISTRIBUCION MIBG (I-131)		CATECOLAMINAS URINARIAS
		SRI	SRD		miocardio parótidas adrenales	I D	
1	21	+	+	Buena	+	+	↑
2	4			Buena			↑
3	9	+ ganglios retroperitoneal		Buena			Normal
4	11			Buena			Normal
5	adulto			Regular			Normal
6	14	+ rodilla		Buena			↑
7	3			Buena			↑
8	55			Buena			Normal

SRI, SRD: suprarrenal izquierda y derecha respectivamente

+: imagen positiva

GRAFICO Nº 1

Farmacocinetica de la m-IBG (I-131)  
en ratas Wistar

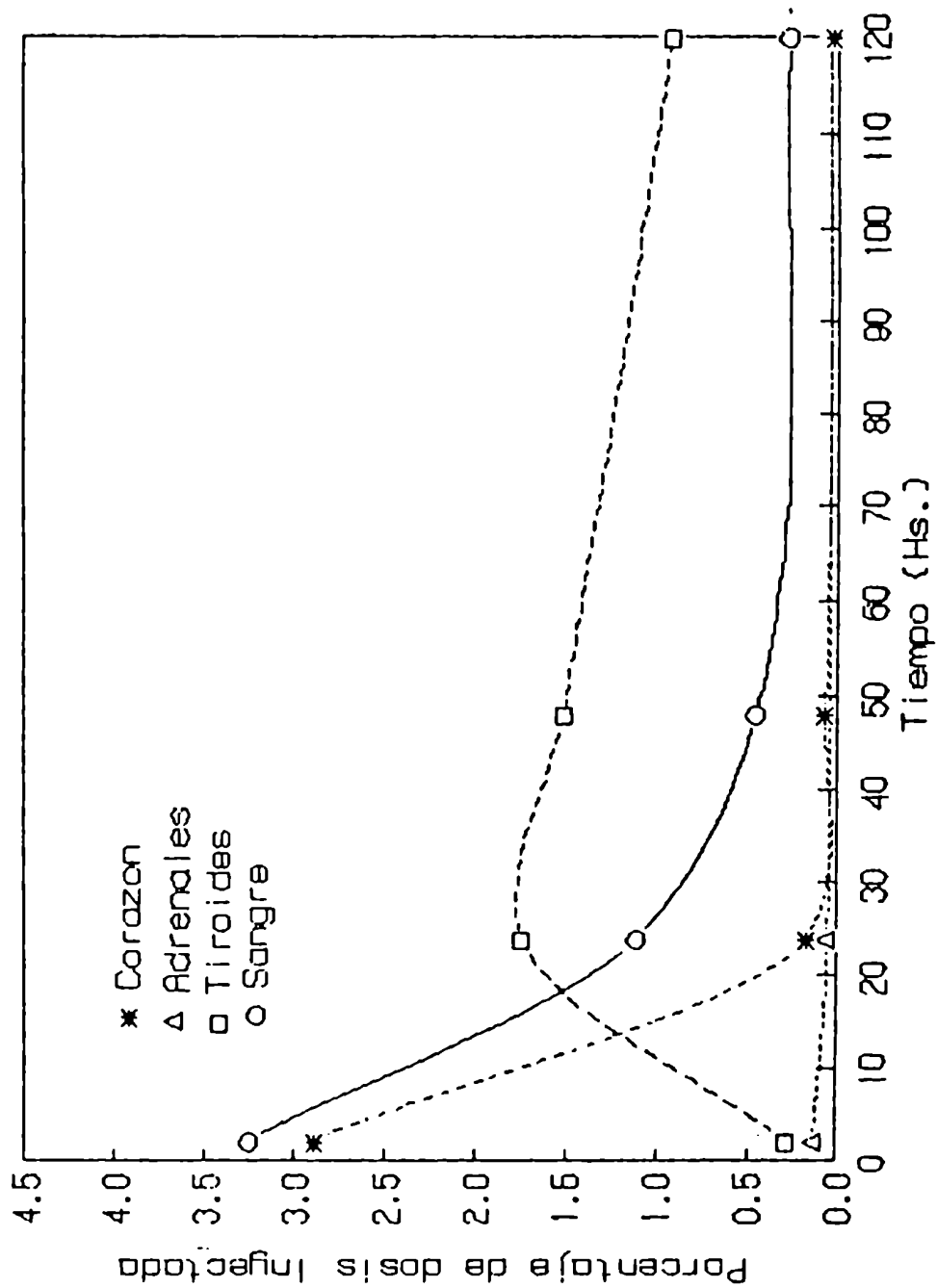


GRAFICO Nº 2

Desde el punto de vista de la posibilidad de utilizar MIBG (I-131) para imagen cardíaca, la concentración en corazón es similar a la del Tl-201. Sin embargo, las relaciones de porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido entre corazón/hígado y corazón/pulmón no alcanza los valores necesarios para obtener una buena imagen cardíaca.

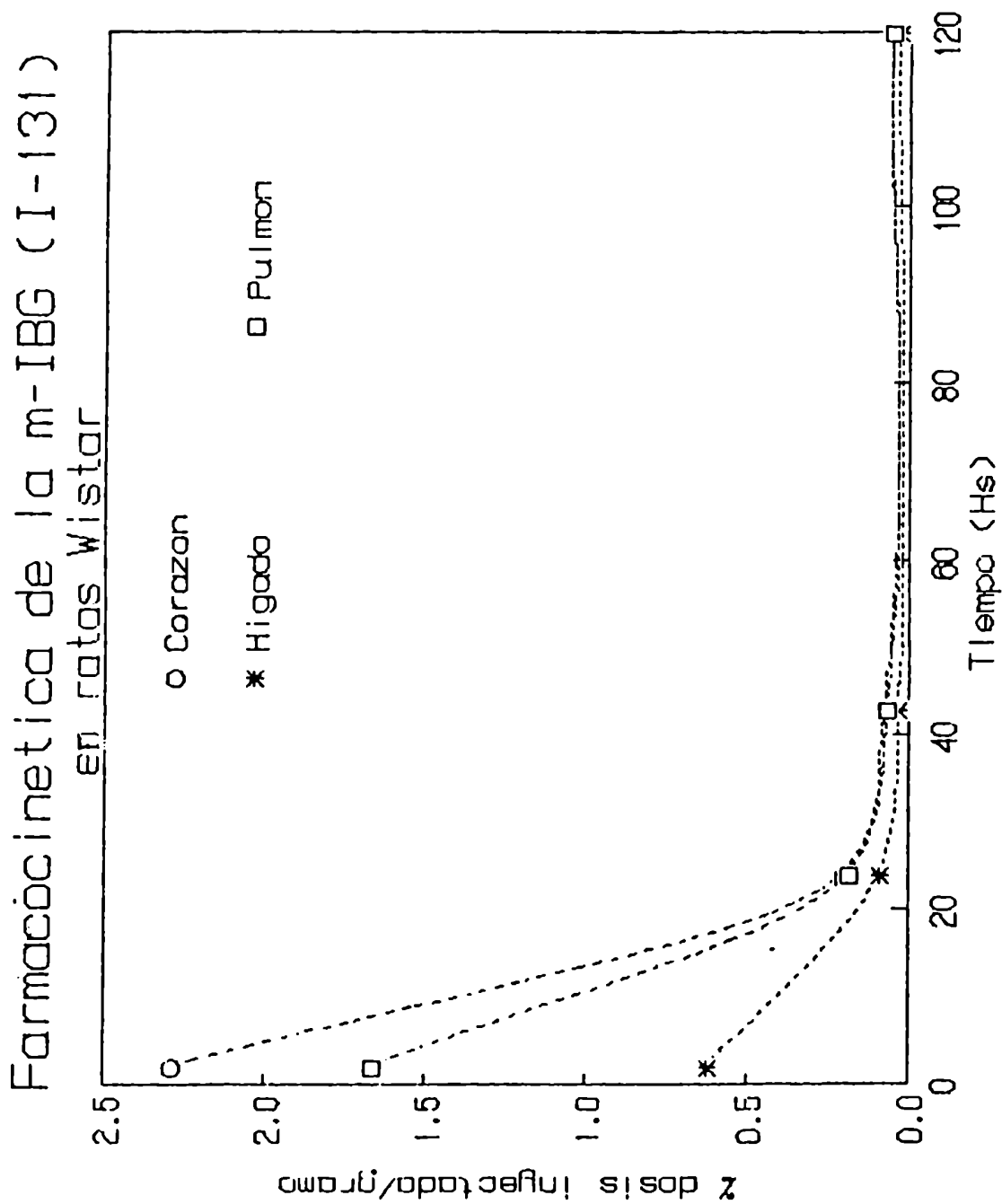
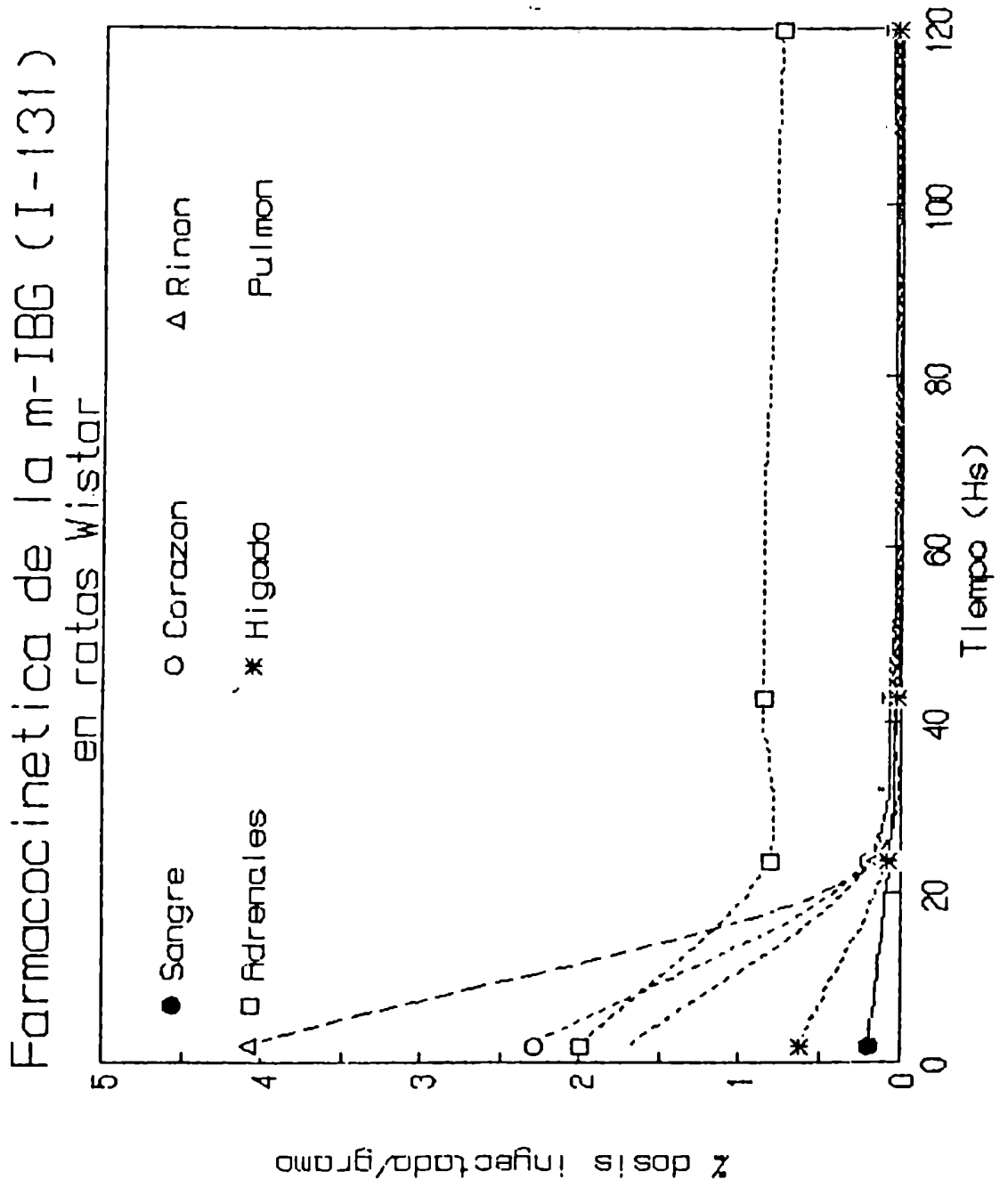


GRAFICO Nº 3



## DISCUSION

La bibliografía describe gran variedad de métodos de radioiodinación de m-iodobencilguanidina; los esfuerzos están orientados a aumentar el rendimiento y acelerar el proceso de marcación cuando se utiliza I-123, radionucleído de alto costo y corto período de semidesintegración.

Por sus características físicas, el I-123 presenta la ventaja sobre el I-131 de suministrar una dosis de radiación menor al paciente sometido al estudio diagnóstico y la obtención de imágenes con mejor resolución.

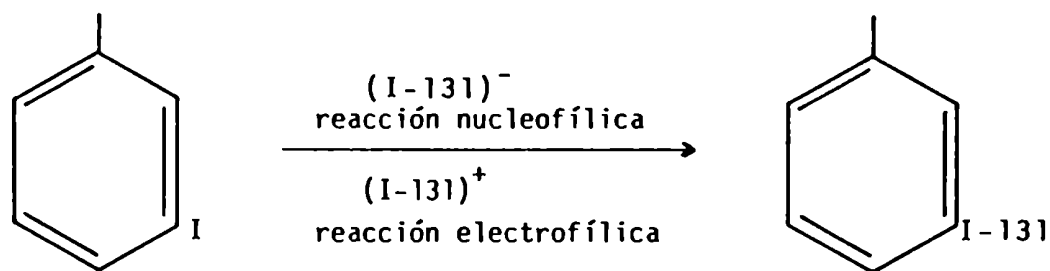
Nucleído	Período de semidesintegración	Forma de decaimiento	Rayos gamma energía KeV(abundanc.)	
I-131	8,1 días	$\beta^-$	80	( 2,6)
			284	( 5,4)
			364	(82)
			637	( 6,8)
			723	( 1,6)
I-123	13,3 horas	EC	159	(83)

Extrapolando a partir de los datos obtenidos en la biódistribución en animales, se puede calcular la dosis de radiación en humanos (16).

<u>ORGANO</u>	<u>ESTIMACION DE LA DOSIS EN HUMANOS</u>	
	<u>rad/mCi</u>	
	<u>I-131(mIBG)</u>	<u>I-123(mIBG)</u>
Tiroides	35	2,2
Médula adrenal	100	0,8
Corazón	0,7	0,03
Hígado	0,4	0,05
Bazo	1,6	0,14
Cuerpo total	0,1	0,02

El I-123 es un producto de ciclotrón, por lo tanto no accesible en nuestro país. Se ha utilizado I-131, de costo relativamente bajo, por lo que se seleccionó un método de radioiodinación para obtener un producto de alta pureza radioquímica y adecuada actividad específica que permitiera utilizarlo en diagnóstico y terapia.

El método utilizado es una variante del llamado método de fusión. Se supone que la alta reactividad del estado fundido promueve el intercambio nucleofílico del yodo en la posición meta. Sin embargo no se descarta la posibilidad de que el ión  $I^-$  sea parcialmente oxidado a  $I_2$  y se disocie en  $I^+$  y  $I^-$ , produciendo la reacción de intercambio electrofílica en posición meta.



Sinn, H. y colaboradores sostienen que la marcación de mIBG es posible por una reacción electrofílica y lo demuestran agregando un oxidante para favorecer la reacción,  $HAuCl_4$  como agente productor de iones  $I^+$ . (56)

Mertens, J. y colaboradores (59) promueven el intercambio nucleofílico por agregado de  $Cu(I)$ , incluyendo en la mezcla reactiva un agente reductor.

Baldwin, R. sostiene que en medio ácido la especie química presente es el ion yoduro que intercambia fácilmente (equilibrio) entre los estados -1, neutro y +1. (60)

Se concluye que las condiciones para optimizar la marcación de mIBG con I-131 son las siguientes:



- 1). El medio acuoso inhibe la reacción, por lo que el método seleccionado es en fase sólida.
- 2). La presencia de exceso de base de la solución de I-131 inhibe la reacción de intercambio isotópico, por lo que se llevó la mezcla radiactiva a pH 4-5 con solución de ácido sulfúrico. Se comprobó que a pH menores de 4 el rendimiento de reacción baja significativamente.
- 3). La masa de MIBG influye en forma directa en el rendimiento de la reacción pero en desmedro de la actividad específica. Utilizando 2 mg de MIBG se obtuvieron rendimientos entre el 75 y 80%, con actividades específicas de hasta 12 Ci/g.
- 4). El aumento de sulfato de amonio de 3 a 5 mg no modifica el proceso de marcación. El sulfato de amonio actuaría como un catalizador ácido (53) por formación progresiva de ácido sulfúrico y liberación de yoduro de amonio (I-131). Eisenhut, M. responsabiliza a un efecto de dilución el bajo rendimiento asociado a un gran aumento de sulfato de amonio. (61)
- 5). El tiempo durante el cual debe mantenerse la temperatura de reacción está en relación directa con dicha temperatura. A 150-155°C el tiempo para obtener un producto de pureza radioquímica mayor del 98% es de 60 minutos.

La iodobencilguanidina sustituida en la posición meta ha mostrado ser muy poco estable a temperatura ambiente. Así lo demuestran los ensayos de pureza radioquímica de soluciones de baja concentración de actividad y actividad específica, condiciones que favorecen la estabilidad.

La eficacia de los estudios diagnósticos con MIBG radioiodada ha sido ampliamente demostrada en la bibliografía universal.

Las imágenes obtenidas con mIBG producida según el método descrito, han sido coincidentes con las obtenidas utilizando el producto importado (CIS, Francia)

Las posibilidades de estudios diagnósticos con ( $I^*$ ) mIBG se han incrementado en los últimos años. Han comenzado a aparecer publicaciones sobre la disminución en la concentración de catecolaminas y por lo tanto de mIBG en miocardio, en pacientes propensos a tener alteraciones del ritmo cardíaco, propensión a muerte súbita. Se ha propuesto también la utilización de este radiofármaco para la detección precoz de la miocardía diabética.

No se tiene conocimiento, sin embargo, de conclusiones sobre la aplicación de MIBG ( $I-131$ ) para terapia tumoral.

**RADIOFARMACOS DE RE-186 PARA**  
**TERAPIA PALIATIVA DE METASTASIS OSEAS**

## INTRODUCCION

Las alteraciones destructivas debidas a irritaciones mecánicas o químicas de las fibras nerviosas aferentes por el crecimiento invasivo de las células cancerosas en el tejido óseo, provocan severos síndromes de dolor que con frecuencia no responden a los analgésicos convencionales.

Las radiaciones ionizantes pueden reducir el dolor. La terapia por irradiación con una fuente externa puede ser aplicada cuando el dolor óseo está restringido a un área focal. Sin embargo las metástasis óseas diseminadas pueden ser tratadas con radionucleídos emisores de partículas  $\beta^-$  que concentran en las metástasis.

Desde que fue demostrada la concentración selectiva del P-32 en tejido neoplásico (62) se han hecho numerosos intentos para aumentar su concentración en metástasis óseas, incluyendo previa administración de esteroides (63), parathormona (64), incorporación del P-32 en polifosfatos (65) o en difosfonatos (66).

Los resultados de los tratamientos (67), (68), (65) fueron variables e impredecibles. Esta variabilidad se atribuye, por lo menos en parte, a la dificultad de estimar la concentración del radiofósforo dado que la cuantificación externa de la emisión  $\beta^-$  es impracticable. Además de la pobre biolocalización en lesión, la incorporación del P-32 a las células proliferativas de la médula ósea provoca depresión de los elementos de la sangre, aún a dosis relativamente bajas.

El Sr-89 fue aplicado como terapia sistemática en un paciente con metástasis esqueléticas de un carcinoma de próstata en 1942. (69)

Más recientemente, el Sr-89 demostró ser efectivo para la disminución del dolor en un alto porcentaje de pacientes con metástasis óseas de cáncer primario de mama y próstata. (70)

El período de semidesintegración del Sr-89 (50,5 días) tiene el inconveniente de necesitar recolectar las excretas para ser desechadas como residuos radiactivos y además excluye su uso en la terapia de múltiples dosis en intervalos cortos.

Como el P-32, el Sr-89 no emite rayos gamma y decae exclusivamente por emisión de partículas  $\beta^-$ , por lo tanto no es posible obtener imágenes con esos radionucleídos para verificar su distribución "in vivo" por lo que la dosificación se hace necesariamente empírica.

Debido a esto se propusieron radionucleídos con emisión  $\beta^-$  y  $\gamma$ : Re-186 (71), Sm-153 (72)(73), I-131 (74) que además presentan la ventaja de tener períodos de semidesintegración más cortos que el Sr-89 y P-32 (es más alta la velocidad a la cual es suministrada la radiación lo que aumenta la eficiencia para producir una respuesta terapéutica favorable).

<u>Nucleído</u>	<u>Emisión</u>	<u>T 1/2</u>
Sr-89	$\beta^-$	50,5 d
P-32	$\beta^-$	12,0 d
I-131	$\beta^-$ , $\gamma$	8,1 d
Re-186	$\beta^-$ , $\gamma$	90,64h
Sm-153	$\beta^-$ , $\gamma$	46,27h

## - Elementos del grupo VII A de la tabla periódica

Los elementos Mn, Tc y Re comprenden el grupo VII A de la tabla periódica.

La química del Tc y Re es muy parecida pero difieren de la del Mn. Esto es porque el llenado de los 14 orbitales 4f (que incluye los 14 elementos lantánidos) ocurre entre el llenado de los 10 orbitales 4d (que incluye los 10 metales de transición del grupo VII B) y los 10 orbitales 5d (que incluye los 10 metales de transición del grupo VIII B). Estos 14 electrones 4f no protegen eficazmente sus 14 protones nucleares asociados cargados positivamente, por lo que los electrones 5d experimentan una carga nuclear efectiva relativamente grande y son atraídos hacia el núcleo más de lo esperado normalmente. Esta contracción lantánida es la causa de que los elementos de transición del grupo VIII B sean más pequeños de lo previsto, por lo que el radio de estos elementos es muy similar a la de sus congéneres del grupo VII B.

Por ejemplo, en el grupo VII A, el radio de los cristales de: Mn VII, Tc VII y Re VII son 0,39; 0,51 y 0,52 Å<sup>0</sup> respectivamente. Similarmente la unión M-Cl en (Tc<sup>IV</sup>Cl<sub>6</sub>)<sup>2-</sup> y (Re<sup>IV</sup>Cl<sub>6</sub>)<sup>2-</sup> es de 2,35 ± 0,01 Å en ambos (76) (77) y los radios del Tc<sup>0</sup> y Re<sup>0</sup> en los metales libres son idénticos.

Por lo tanto, mientras el hecho de estar el Tc y el Re en el mismo grupo periódico asegura que la química de ambos será cualitativamente similar, la "contracción lantánida" provoca que esta química común sea significativamente diferente a la del Mn.

## - Fosfonatos de Tc-99m y Re-186

La farmacocinética del Tc y sus compuestos ha sido muy estudiada en los últimos años, debido a la aplicabilidad del Tc-99m en medicina nuclear.

Entre los radiofármacos para imagen ósea, los fosfonatos de Tc-99m ocupan el primer lugar debido a la mayor relación de concentraciones entre lesión ósea y tejido óseo normal.

En 1979 Mathiew y col. (71) realizaron centellogramas óseos en ratas con Re-186-HEDP (hidroxietiliden difosfonato) y Tc-99m-HEDP, comprobando que la concentración en tejido óseo era similar para los dos compuestos, por lo que, dadas las características físicas del Re-186 y la conocida propiedad del Tc-99m-HEDP de concentrar preferentemente en lesión ósea, propusieron el Re-186-HEDP para tratamiento paliativo del dolor en pacientes con metástasis óseas.

En 1982 Eisenhut (77), realizando centellogramas en conejos, demuestra que el Re-186-MDP (metilendifosfonato) y el Tc-99m-MDP concentran en forma similar en tejido óseo.

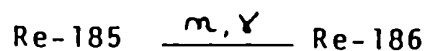
En 1984 Weinenger y col. (78) administran Re-186-HEDP a ratas y ratones con lesión ósea y a partir del centellograma obtienen una relación lesión ósea/tejido óseo normal de 4 a 5,4.

El motivo de este trabajo es buscar las condiciones óptimas de marcación con Re-186 de varios compuestos que concentran en tejido óseo y la biodistribución de estos compuestos en animales de experimentación, a fin de determinar el agente terapéutico más apropiado para tratamiento paliativo en pacientes con metástasis óseas diseminadas. Se llevó a cabo la biodistribución del agente seleccionado en ratas para tiempos variables post-marcación para inferir la dosis de radiación en pacientes.

## MATERIALES Y METODO

### - OBTENCION DE Re-186

El Re-186 se obtuvo por irradiación neutrónica del Re-metálico o bien directamente del perrhenato de amonio en el Reactor del Centro Atómico Ezeiza RA-3.



### Cálculo de la actividad a fin de la irradiación:

Se utiliza la expresión:

$$A = N \sigma \phi (1 - e^{-\lambda t})$$

donde:

A = es la actividad obtenida

N = es el número de átomos irradiados

$\phi$  = flujo de neutrones térmicos:  $3 \times 10^{13}$  neutrones/cm<sup>2</sup> seg

$\sigma$  = sección eficaz de Re-185:  $112 \times 10^{-24}$  cm<sup>2</sup>

$\lambda$  = constante de decaimiento del Re-186: 0,693/90,64

t = tiempo de irradiación: 120 horas

N se calcula a partir de la masa irradiada y la abundancia isotópica del Re-185.

Masa de Re estable: 7,66 mg

Abundancia isotópica del Re-185: 37,40%

Masa de Re-185: 2,86 mg

$N = \text{masa Re-185} \times N \text{ Avogadro} / \text{Atomogramo de Re-185}$

$2,86 \times 10^{-3} \text{ g} \times 6,02 \times 10^{23} / 185 \text{ g} = 9,306 \times 10^{18}$  átomos de Re-185



reemplazando:

$$A = 9,306 \times 10^{18} \text{ átomos} \times 112 \times 10^{-24} \text{ cm}^2 \times 3 \times 10^{13} \text{ n/cm}^2 \text{ seg} \left( 1 - e^{-\frac{0,693/90 \times 120}{90,64}} \right)$$

$A = 1877,5 \times 10^7$  átomos que desintegran por segundo, siendo:

$$3,7 \times 10^7 \text{ desintegraciones/seg} = 1 \text{ mCi}$$

$$A = 507,4 \text{ mCi a fin de irradiación}$$

#### - OBTENCION DE LA SOLUCION DE Re-186

La muestra de Re metálico irradiado se trató con agua oxigenada al 10% durante dos horas, neutralizando luego con  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 25%. (77)

Restos de Re metálico y de la ampolla de cuarzo que lo contenía son separados por filtración.

La solución de Re-186 cuando se irradió perrhenato de amonio, se obtuvo por simple disolución acuosa.

#### - Determinación de la pureza radionucleídica gamma:

Se determinó por espectrometría gamma entre 1 día y 3 meses posteriores a la finalización de la irradiación.

#### - Determinación de la actividad absoluta de Re-186 por espectrometría gamma:

Se utilizó un equipo multicanal marca Camberra modelo serie 85 de 2.400 canales, asociado a un detector de estado sólido de Germanio hiperpuro marca Camberra.

La cámara de ionización utilizada fue el modelo CRC-30, marca Capintec.

Las cámaras de ionización están provistas de selectores para la medición de la actividad de los radionucleídos utilizados actualmente en medicina nuclear, entre los que no figura el Re-186. Por lo tanto se determinó la actividad absoluta de una muestra de Re-186 exactamente pesada, de aproximadamente  $10\ \mu$  Ci por espectrometría gamma, calculando el número de desintegraciones bajo el área del pico de 0,137 MeV de energía que emite el Re-186 en el 9,4% de las desintegraciones.

Con el dato del peso de la muestra total se calculó la actividad de la misma..

Para buscar las condiciones en la cámara de ionización se procedió a medir en la posición seleccionada para el Tc-99m (por la proximidad de los valores de energía de los dos radionucleídos), calculando el valor del factor de corrección por el que debe multiplicarse la lectura para que coincida con el valor de actividad absoluta de la muestra.

**- Pureza radioquímica de la solución de perrhenato (Re-186):**

Dadas las semejanzas químicas del Re y el Tc, se utilizó una técnica propuesta para la determinación de los estados de oxidación del Tc-99m.

La pureza radioquímica se determinó por cromatografía ascendente utilizando como soporte papel Whatman N 1 y como solvente HCl 0,3 N. (24)

Los cromatogramas se obtuvieron en un radiocromatógrafo Packard, modelo 7020.

### - Determinación espectrofotométrica del Re

Cuando se irradió perrhenato de amonio, la concentración de Re se calculó a partir de la masa irradiada y considerando una recuperación del 100 %.

A partir de Re metálico irradiado se obtuvieron rendimientos de Re-186 variables, por lo que se desarrolló una técnica de determinación espectrofotométrica de Re para calcular posteriormente la actividad específica.

El método utilizado es una modificación del descrito por Beeston y Lewis (79) para la determinación de Re en presencia de Mo.

La formación de un complejo coloreado de tiocianato de renio se obtuvo por adición de tiocianato y cloruro de estaño a la muestra de Re. El complejo coloreado se extrajo luego con éter etílico midiendo la absorbancia de la fase orgánica a 430 nm.

Una muestra conteniendo aproximadamente 0,050 mg de Re en 19 ml de ácido clorhídrico 6N, se colocaron en un embudo de decantación. Se agregó agitando cada vez 1 ml de solución de 0,514 g/ml de  $\text{Cl}_2\text{Sn}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en  $\text{ClH}$  6 N y 1 ml de solución de KSCN al 20% y por último 25 ml de éter etílico dejando luego en reposo durante 30 minutos.

Se separó la fase orgánica con el complejo amarillo de Re y se midió el porcentaje de transmitancia en un espectrofotómetro Perkin Elmer contra un blanco de reactivos.

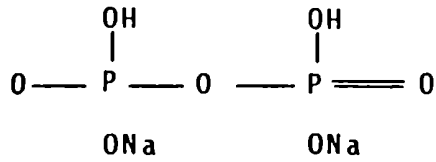
A partir de una solución de concentración conocida de perrhenato de amonio se construyó la curva estandar.

DROGA

PROCEDENCIA

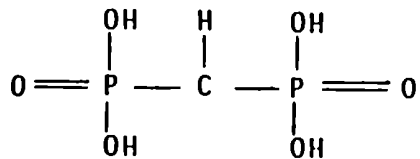
PIROFOSFATO DISODICO (PYP)

(MALLINCKRODT)



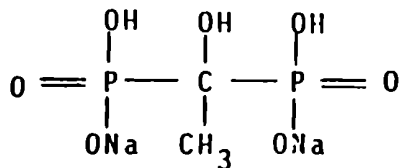
METILENDIFOSFORICO (MDP)

(ALDRICH)



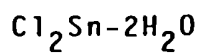
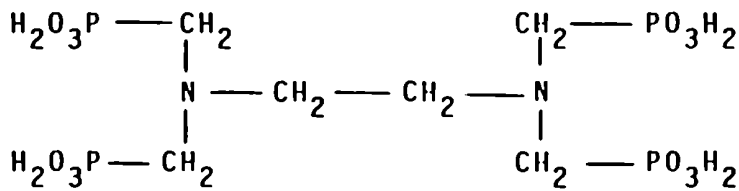
HIDROXIETILIDENDIFOSFONATO DISODICO (HEDP)

(SINTESIS)



ETILENDIAMINOTETRAMETILENFOSFORICO (EDTMP)

(MONSANTO)



(CARLO ERBA)

PERRHENATO DE AMONIO

(JOHNSON, MATTHEY)

RENIO METALICO

(JOHNSON, MATTHEY)

#### - Marcación de los compuestos de Re-186

Se estudiaron las condiciones de marcación de pirofosfato disódico, (PYP), hidroxietilidendifosfonato de sodio (HEDP), metilendifosfonato (MDP) y etilendiaminotetrametilfosfórico (EDTMP) con Re-186.

Similarmente al Tc, el Re se une a las distintas moléculas en estados de oxidación reducidos.

Se utilizó como reductor del Re, solución de 50 mg/ml de  $\text{Cl}_2\text{Sn}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en  $\text{ClH}$  1 N.

Las relaciones de  $\text{Sn}^{2+}$ /sustrato variaron hasta encontrar aquella que para una misma cantidad de Re proporcionara un producto de alta pureza radioquímica. La determinación de ésta se utilizó para seguir el rendimiento de marcación a través del tiempo. Se determinó la influencia del pH en la cinética de marcación.

#### - Determinación de la pureza radioquímica de los compuestos de Re-186

Se utilizó la técnica cromatográfica implementada en la mayor parte de los compuestos de Tc-99m (80).

La técnica consiste en una cromatografía ascendente en soporte papel de fibra de vidrio Whatman GF-A o bien ITLC-SG (cromatografía instantánea en capa delgada de sílica gel, marca Gelman). Se utilizó como solvente agua y metiletilcetona para determinar sustancias coloidales, Re reducido, hidrolizado en el primer solvente y Re libre como perrhenato en el segundo.

#### - Ensayos de biodistribución

Se realizaron los ensayos de biodistribución en ratas de la cepa Wistar de 250 g de peso. Previo a la administración por vía intravenosa en la vena del pene, los animales fueron

anestesiados con uretano en dosis de 1 g por kg de peso corporal.

Las dosis administradas se determinaron midiendo en cámara de ionización la jeringa antes y después de la inyección.

Se extrajo sangre de la vena femoral o por punción cardíaca previo al sacrificio a las 2 horas post administración. Se procedió a separar los órganos y se midió en cámara de ionización.

Los datos de actividad se corrigieron por decaimiento, determinándose el porcentaje de dosis en cada órgano. Se tomó para el cálculo de sangre total el valor de 7% del peso corporal. Para el valor de masa esquelética se consideró el 10% del peso corporal.

## RESULTADOS

Cuando se analiza por espectrometría gamma el producto de irradiación de Re, se obtiene el espectro mezcla del Re-186 y el Re-188. Cuando la mayor parte de la actividad ha decaído, se puede observar además el espectro del Re-184.

En el cuadro siguiente se muestran los períodos de semidesintegración, principales radiaciones emitidas, energía y abundancia de los radionucleídos de Re obtenidos por irradiación neutrónica.

	<u>T 1/2</u>	<u>Principal emisión</u>	<u>Energía MeV</u>	<u>Abundancia %</u>
Re-186	90,64 hs.	$\beta^-$	1,071	76,6
			0,933	23,4
		$\gamma$	0,137	9,4
			0,122	0,7
Re-188	16,98 hs.	$\beta^-$	2,116	79,0
			1,965	20,0
		$\gamma$	0,155	15,2
			0,633	1,3
Re-184	38,0 días	$\gamma$	0,903	36,3
			0,792	36,0

La cantidad relativa de cada radioisótopo de Re en función del tiempo post irradiación, tomando como 1 la actividad de Re-186, se detalla en la Tabla siguiente:

<u>Días</u>	<u>Re-186</u> mCi	<u>Re-188</u> mCi	<u>Re-184</u> $\mu$ Ci
0,0	1	1,6	< 0,001
0,63	1	1,0	< 0,001
1,0	1	0,70	0,001
5,0	1	0,03	0,002

Transcurridos 5 días luego de la irradiación, la actividad del Re-186 representa el 97% del total. En esas condiciones se pueden calibrar las cámaras de ionización o actívimetros para fijar las condiciones de medición del Re-186.

La muestra de Re-186 acusó una medida de actividad 2,58 veces menor que la detectada por medición absoluta, por lo que se fijó este número como factor de corrección por el cual debe multiplicarse la actividad leída en este equipo.

La actividad de la muestra total, calculada a partir de la actividad de la muestra exactamente pesada y la masa total de solución de Re-186, coincide con los valores de actividad calculados a partir de los datos de irradiación.

#### - Pureza radioquímica de la solución de Re-186

La pureza radioquímica de las soluciones de Re-186 determinadas por cromatografía, evidenciaron la presencia de un sólo pico de actividad con  $R_f=0,65$ , correspondiente al  $\text{Re}^{\text{VII}}$  como ión perrhenato  $\text{ReO}_4^-$ .

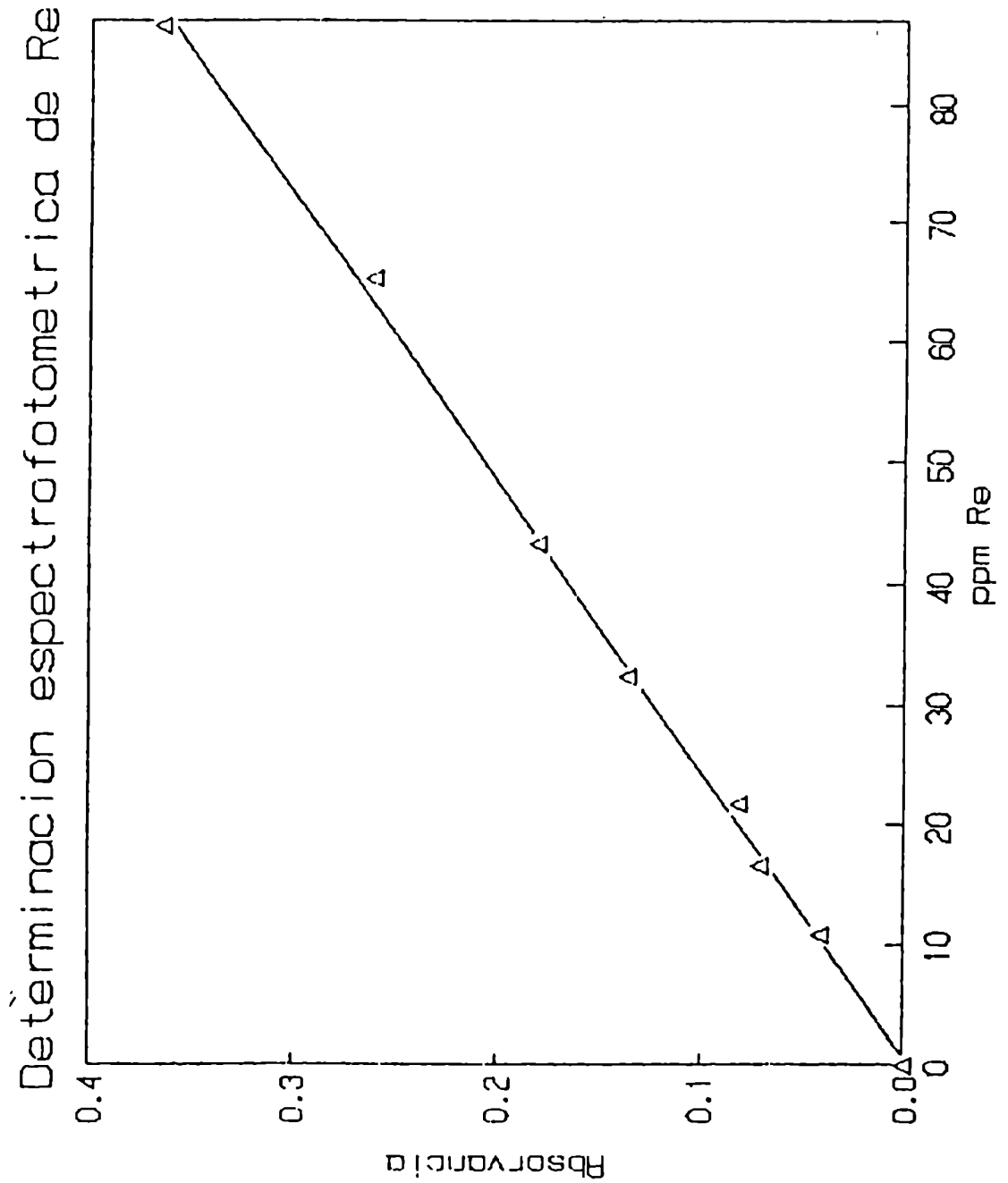
#### - Concentración de Re

A partir de la curva estandar se determinó la concentración de Re de las soluciones de Re-186 obtenido por irradiación de Re-metálico. (GRAFICO Nº 1)



### GRAFICO Nº 1

La concentración de Re en ppm corresponde a 1 ml de soluciones estandar de Re a las que se procesó según método descrito. A partir de los valores experimentales se construyó la línea de regresión, procesando los datos en una computadora personal (compatible IBM) tipo XT, empleando software de estadística.



<u>Masa de Re</u> mg x 10 <sup>-3</sup> /ml	<u>Absorbancia</u> 430 nm
10,85	0,040
16,49	0,070
21,69	0,080
32,54	0,135
43,39	0,180
65,08	0,260
86,77	0,365

- Marcación de los compuestos de Re-186

Inicialmente se utilizó la técnica propuesta por Weninger y colaboradores (78) para marcar etidronato con Re-186.

Variando el pH se modificó la cinética de marcación, así como el complejo obtenido ya que si bien no puede demostrarse las diferencias entre especies químicas obtenidas con uno y otro método por simples ensayos cromatográficos, las variaciones en el comportamiento "in vivo" en los ensayos de biodistribución evidencian que se trata de especies químicas diferentes.

Se consiguió además minimizar la cantidad de Sn<sup>2+</sup> aumentando la relación de masas Re/Sn.

	<u>Weninger y col.</u>	<u>Método propuesto</u>
HEDP	35,0 mg	40,0 mg
SnCl <sub>2</sub> - 2H <sub>2</sub> O	12,5 mg	25,0 mg
pH de marcación	6-7	1,5
Re	0,125 mg	1,2 mg
tiempo de marcación	60-90 min.	30 min
pH final	6-7	6-6,5
pureza radioquímica	90-95 %	mayor del 99%

Se utilizó la técnica propuesta para el resto de los compuestos. Para todos ellos la velocidad de marcación aumenta al disminuir el pH; sin embargo la baja solubilidad de algunos compuestos como el MDP en su forma ácida, limita los valores de pH de marcación a los señalados en el cuadro siguiente:

Moles $\times 10^{-4}$	Atg Sn <sup>++</sup> $\times 10^{-4}$	Vol. ml	pH marcación	Tiempo de marcación min	pH final
PYP 1,5	1,0	2	3,0	90	6
HEDP 1,5	1,0	2	1,5	30	6
MDP 1,5	1,0	2	3,0	90	6
EDTMP 4,16	0,3	2	2,0	60	6

Condiciones de marcación de compuestos de Re para  $7 \times 10^{-6}$  Atomos gramo de Re.

- Pureza radioquímica de los compuestos de Re-186

Determinada por la técnica descripta, como era previsible los Rf de las especies químicas investigadas coinciden con sus semejantes de Tc-99m.

Soporte: TLC-SG (Gelman) o fibra de vidrio GF-A (Whatman)

Solvente: MEC

Agua o solución fisiológica

Rf compuesto:	0,0	1,0
Rf Re $O_4^-$ :	1,0	1,0
Rf reducido y/o hidrolizado :	0,0	0,0

En todos los compuestos la pureza radioquímica del producto final fue mayor del 99%.

Los compuestos permanecieron estables por lo menos durante 8 horas post marcación, aún después de diluirlos 10 veces.

- Ensayos de biodistribución

Los datos de distribución biológica de los compuestos de Re-186 muestran concentraciones relativas en tejido óseo de ratas, similares a las encontradas en los compuestos de Tc-99m. Así, la concentración en esqueleto sigue el esquema:



El cuadro muestra los porcentajes de dosis inyectada en los distintos órganos de ratas Wistar a las 2 horas post inyección de los compuestos MDP-Re-186 y HEDP-Re-186, éste último marcado por el método de Weninger y col. (I) y por el método propuesto (II). Cada valor es promedio de tres animales.

	<u>HEDP-Re-186</u>		<u>MDP-Re-186</u>
	(I) DI% $\pm$ $\sigma$	(II) DI% $\pm$ $\sigma$	DI% $\pm$ $\sigma$
Sangre	3,19 $\pm$ 0,41	3,48 $\pm$ 0,16	3,97 $\pm$ 0,53
Músculo	4,03 $\pm$ 2,01	3,72 $\pm$ 2,20	3,02 $\pm$ 0,53
Hueso	8,19 $\pm$ 1,03	24,82 $\pm$ 1,95	27,56 $\pm$ 0,83
Hígado	0,99 $\pm$ 0,01	0,78 $\pm$ 0,11	1,11 $\pm$ 0,12
Bazo		0,08 $\pm$ 0,03	0,03 $\pm$ 0,03
Pulmón	-	0,13 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,09
Intestino	3,94 $\pm$ 0,11	1,86 $\pm$ 0,26	3,26 $\pm$ 0,07
Estómago	0,39 $\pm$ 0,06	0,53 $\pm$ 0,01	0,58 $\pm$ 0,52
Testículos	-	0,38 $\pm$ 0,11	0,18 $\pm$ 0,08
Riñón	10,46 $\pm$ 4,85	4,65 $\pm$ 0,17	2,86 $\pm$ 0,60
Orina	75,61 $\pm$ 10,22	54,08 $\pm$ 1,38	56,21 $\pm$ 4,40

En la biodistribución del MDP-Re-186 existe una alta dependencia entre la cantidad de droga administrada por kilo de peso corporal y la captación del radiofármaco en el sistema retículoendotelial para dosis superiores a 1,2 mg MDP/kg.

Cantidades de HEDP entre 1 y 5 mg/kg de peso corporal no modificaron significativamente los valores de biodistribución.

## CONCLUSIONES

Las células de riesgo carcinogénico en el esqueleto se han identificado como las células hematopoiéticas de la médula, además de las células osteogénicas, particularmente las de la superficie del endostio.

El MDP a pH bajos tiende a precipitar en forma de coloide que acumula en el sistema reticuloendotelial, hígado, bazo y médula ósea.

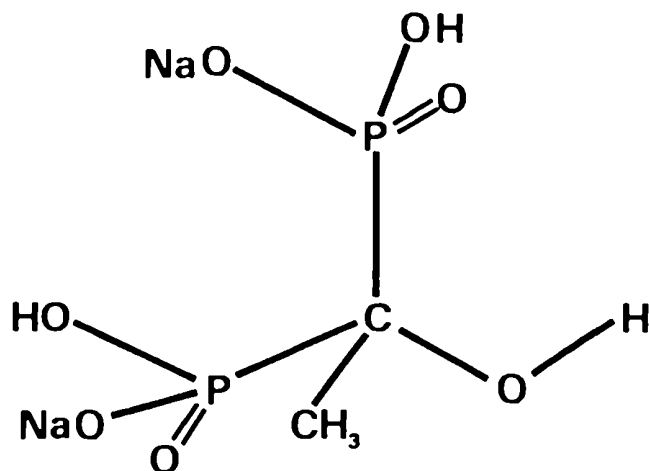
La formación de un coloide por la sal ácida del MDP puede evitarse por el control del pH (superior a 3,0) y por el control de la pureza radioquímica (el coloide queda en la siembra del cromatograma).

Existe además el riesgo que el MDP concentre en sistema retículoendotelial cuando la dosis por kg de peso supera el valor de 1,2 mg/kg, que limitaría a 84 mg la cantidad total a administrar en un hombre estandar; teniendo en cuenta una actividad específica de 58 mCi/mg Re, esta limitación carece de importancia pues corresponde a 190 mCi de MDP-Re 186.

Del análisis estadístico de los datos de biodistribución en ratas, de MDP y HEDP marcados con Re-186, se concluye que no existen diferencias significativas entre la captación ósea de estos radiofármacos.

Sin embargo, teniendo en cuenta la similitud entre los compuestos de Re y Tc y en base a los datos bibliográficos (81), sería de esperar una mayor relación metástasis ósea/tejido óseo normal para el HEDP-Re-186 comparado con el MDP-Re-186, por lo que se seleccionó el HEDP-Re-186 como agente que presenta mejores características para ser utilizado en terapia paliativa en pacientes con metástasis óseas.

FARMACOCINETICA Y ESTIMACION DOSIMETRICA  
DEL HEDP-Re 186



HEDP

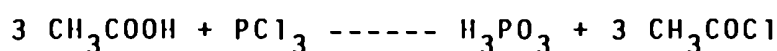
La síntesis del HEDP, sal disódica, se realizó en el Laboratorio de Moléculas Marcadas (CNEA).  
El control de calidad se llevó a cabo por RMN y composición centesimal en el Laboratorio de Microanálisis (FCEN-UBA)

## MATERIALES Y METODO

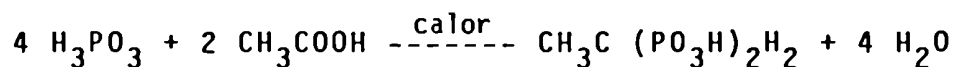
### - Síntesis del HEDP (etano-1-hidroxi-1,disodio difosfonato)

La síntesis del HEDP (82), (83), (84) a partir del tri cloruro de fósforo y ácido acético, se basa en la siguiente secuencia de reacciones:

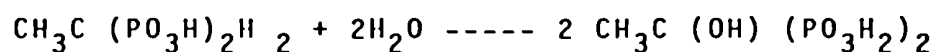
#### Formación del ácido fosforoso



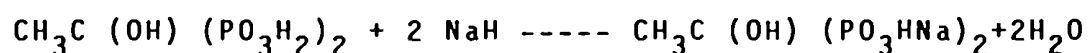
#### Reacción de condensación



#### Hidrólisis



#### Neutralización



Bajo campana bien ventilada se coloca un balón de tres bocas con refrigerante, termómetro y ampolla de decantación, provisto de agitador magnético. Se deja caer lentamente gota a gota durante 10 minutos 68,8g de  $\text{Cl}_3\text{P}$ , desde la ampolla de decantación en el balón que contiene 180 g de ácido acético glaciar. Se coloca luego el balón en un baño frío hasta que alcance una temperatura de 5°C, agitando durante 30 minutos.

Se pasa a un baño de aceite manteniendo durante 2 horas a 60°C y finalmente se sube la temperatura del baño a 120-130°C durante 20-30 minutos, hasta que la solución se torne opaca. Se deja enfriar a temperatura ambiente; se for-



man dos capas, desechándose la capa superior.

Se agregan 30 ml de ácido acético y se destila en evaporador rotatorio a presión reducida; se agregan 60 ml de agua y se destila nuevamente a presión reducida, repitiendo esta operación dos veces más.

El producto se disuelve en 60 ml de agua y se agregan lentamente, aproximadamente 50 ml de una solución de HONa al 40% hasta llegar a un pH de 4,5. Se deja enfriar y el precipitado se filtra, lava con agua fría y cristaliza de agua.

#### - Control de calidad del HEDP

El control de calidad puede llevarse a cabo por titulación con NaOH, el HEDP muestra puntos equivalentes a valores de pH de 4,4; 8,5 y 10,7, análisis elemental del C, H, O y P o por resonancia magnética nuclear.

#### - Preparación y control de calidad del HEDP-Re-186

A 1 ml de la solución de HEDP sal disódica (40 mg/ml) se le agregan 0,5 ml de solución de  $\text{Cl}_2\text{Sn}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (50 mg/ml en  $\text{ClH}$  1 N). Se le adiciona luego un volumen de solución de  $^{186}\text{ReO}_4\text{NH}_4$  conteniendo como máximo 1,2 mg de Re. El tiempo necesario para completar la reacción está relacionado en forma directa con el pH.

En las condiciones descriptas la reacción se completa en 30 minutos y puede controlarse por cromatografía ascendente utilizando como soporte ITLC-SG y como solvente metil-etil-cetona (el compuesto queda en el punto de siembra y el  $\text{ReO}_4^-$  migra con el frente del solvente).

Completada la reacción, el preparado se lleva a pH 6 y se controla la ausencia de Re reducido y/o coloide utilizando cromatografía ascendente, soporte ITLC-SG y solvente solución fisiológica (el compuesto migra con el frente del solvente y en el punto de siembra quedan las impurezas investigadas).

#### - Farmacocinética del HEDP-Re-186

Se inyectó el HEDP-Re-186 en ratas Wistar de aproximadamente 250-300 g de peso; los animales fueron anestesiados con éter en el momento de la administración intravenosa y con uretano (1 g/kg) 15 minutos previo al sacrificio. Las cantidades administradas de HEDP por kg de peso del animal oscilaron entre 2 y 5 mg/kg.

La dosis administrada se calculó por medición de la actividad de la jeringa antes y después de la inyección en la vena del pene de 0,2-0,4 ml del preparado.

Por extracción de sangre de la arteria femoral los animales fueron sacrificados a 1, 2, 4, 6, 15, 20, 24, 48, 70, 90, 141 y 190 horas post administración. Para cada de terminación se utilizaron tres animales.

Se separaron los distintos órganos y midieron en cámara de ionización. La biodistribución en ratas 2 horas post administración se comparó con el compuesto de Tc-99m preparado por adición de Tc-99m al HEDP-Re.

#### - Ensayos de toxicidad

Se determinó la DL50 del HEDP-Re preparado según el método descrito con muy baja actividad de Re-186 para poder asegurar por medio del radiocromatograma la pureza ra dioquímica del producto ensayado.

Se utilizaron ratones de la cepa NIH, endocriados provenientes del bioterio del Centro Atómico Ezeiza (CNEA).

Se trabajó con igual cantidad de machos y hembras con un peso aproximado de 25 g, utilizando 8 grupos de 10 animales cada uno.

Se administró por vía intravenosa en la vena de la cola, en forma lenta, 0,2 ml del preparado conteniendo cantidades variables del compuesto.

Inmediatamente antes de la administración y cuando se consideró terminada la experiencia se registró el peso de los animales.

Los animales sobrevivientes se sacrificaron a los 15 días post administración y se observaron sus órganos internos para visualizar, si existiera, alguna anomalía.

Para estimar el valor de la DL-50 se graficaron los resultados en papel semilogarítmico, adjudicándoles a los distintos porcentajes de mortandad un valor probabilístico, según la técnica descrita por Miller, L.C. y colaboradores (TABLA 1). (85) Cada uno de estos valores probit se graficó en función de la masa del compuesto administrado por kilogramo de peso corporal.

T A B L A 1

VALORES PROBIT

<u>% de muerte</u>	<u>Probabilidad</u>	<u>% de muerte</u>	<u>Probabilidad</u>
1,0	2,674	80,0	5,842
5,0	3,355	81,0	5,878
10,0	3,718	82,0	5,915
15,0	3,964	83,0	5,954
20,0	4,158	84,0	5,994
25,0	4,326	85,0	6,036
30,0	4,476	86,0	6,080
34,0	4,588	87,0	6,126
36,0	4,642	88,0	6,175
38,0	4,694	89,0	6,226
40,0	4,747	90,0	6,282
42,0	4,798	91,0	6,341
44,0	4,849	92,0	6,405
46,0	4,900	93,0	6,476
48,0	4,950	94,0	6,555
50,0	5,000	95,0	6,645
52,0	5,050	96,0	6,751
54,0	5,100	97,0	6,881
56,0	5,151	98,0	7,054
58,0	5,202	98,5	7,170
60,0	5,252	99,0	7,236
62,0	5,306	99,1	7,366
64,0	5,358	99,2	7,409
66,0	5,412	99,3	7,457
68,0	5,468	99,4	7,512
70,0	5,524	99,5	7,576
72,0	5,583	99,6	7,652
74,0	5,643	99,7	7,748
76,0	5,706	99,8	7,878
78,0	5,772	99,9	8,090

## RESULTADOS

### - Farmacocinética y cálculo de dosis

La TABLA 2 muestra el porcentaje de dosis inyectada de HEDP-Re-186 en los distintos órganos de rata a distintos tiempos post administración. Para el cálculo del peso del esqueleto y sangre total se tomó el valor de 10% y 7% del peso del animal respectivamente. El porcentaje de dosis inyectada en fémur, dos horas post administración para HEDP-Re-186 y HEDP-Tc-99m con la misma cantidad de HEDP, Re y Sn es de  $0,58 \pm 0,18$  y  $0,98 \pm 0,06$  respectivamente; las diferencias son altamente significativas (nivel de significancia 0,01).

A partir de los datos de biodistribución se procesaron los datos de hueso (GRAFICO Nº 1); sangre (GRAFICO Nº 2); orina (GRAFICO Nº 3); riñón (GRAFICO Nº 4) y estómago e intestino (GRAFICO Nº 5) en una PC compatible IBM tipo XT.

En base a los datos farmacocinéticos del HEDP-Re-186 y aplicando el modelo dosimétrico para hueso propuesto por la Comisión Internacional de Protección Radiológica (Publicación 30), se determinó la dosis de radiación en hueso (SH) y médula ósea roja (MO) debida a la administración del compuesto en humanos.

La dosis equivalente en superficie ósea y médula ósea debida a la administración de 1 mCi de Re-186 considerando que el 100% de las transformaciones ocurren con una emisión beta de 1 MeV, será:

$$H_{50,SH} = k \left[ U_{HT} \text{ SEE}(SH \leftarrow HT) + U_{HC} \text{ SEE}(SH \leftarrow HC) \right]$$

$$H_{50,MO} = k \left[ U_{HT} \text{ SEE}(MO \leftarrow HT) + U_{HC} \text{ SEE}(MO \leftarrow HC) \right]$$

siendo:

$U_{HT} = U_{HC} = 1/2 U_{HM}$  el número de transformaciones que ocurren en el hueso trabecular y cortical respectivamente e igual a la mitad de las transformaciones que ocurren en la totalidad del hueso mineral por la administración de 1 mCi de Re-186.

Considerando el gráfico que muestra la radiactividad en hueso en función del tiempo post administración del HEDP-Re-186 como una curva exponencial simple, se puede calcular la actividad acumulada calculando el área bajo la curva.

Se estima que el 20% de la actividad administrada llega a hueso y la eliminación sigue el decaimiento radiactivo

$$\lambda \text{ efectivo} = \frac{0,693}{906h} = 0,00077 \text{ h}^{-1}$$

$$U_{HM} = 200 \mu \text{ Ci} / 0,00077 \text{ h}^{-1} = 25.974 \mu \text{ Ci h}$$

$$U_{HT} = U_{HC} = 12987 \mu \text{ Ci h} = 46,75 \times 10^6 \mu \text{ Ci seg.}$$

y:

$$SEE (SH \leftarrow HT) = \frac{E \text{ AF } (SH \leftarrow HT) Q}{M_{SH}} (\text{MeV g}^{-1} \text{ transformación}^{-1})$$

siendo:

E: energía promedio = 0,33 MeV

AF (SH  $\leftarrow$  HT): es la fracción de energía absorbida en la superficie del hueso (SH) debida a la radiación originada en el hueso trabecular (HT) e igual a 0,025 (CUADRO Nº 1)

$M_{SH}$ : es la masa en g de la superficie ósea (endostio) e igual a 120 g.

Similarmente:

$$SEE (SH \leftarrow HC) = \frac{E AF (SH \leftarrow HC) Q}{M_{SH}} (\text{MeV g}^{-1} \text{ transformación}^{-1})$$

$$SEE (MO \leftarrow HT) = \frac{E AF (MO \leftarrow HT) Q}{M_{MO}}$$

siendo:

Q: factor de calidad de la radiación. En este caso Q=1

$M_{MO}$ : la masa en g de la médula ósea roja = 1500 g

Reemplazando y teniendo en cuenta que  $k=1,6 \times 10^{-10} \frac{\text{joule g}}{\text{MeV Kg des}}$

y pasando  $\mu\text{Ci}$  a des/seg la dosis equivalente en médula ósea roja y superficie del hueso resulta:

$$H_{50,SH} = 3 \text{ rem/mCi}$$

$$H_{50,MO} = 3 \text{ rem/mCi}$$

#### CUADRO Nº 1

VALORES DE FRACCION ABSORBIDA EN LA SUPERFICIE DEL HUESO Y EN MEDULA OSEA PARA EMISORES BETA DE ENERGIAS IGUAL O MAYOR DE 0,2 MeV, LOCALIZADOS EN LA SUPERFICIE DE LOS HUESOS TRABECULAR Y CORTICAL.

ORGANO FUENTE	ORGANO BLANCO	FRACCION ABSORBIDA
hueso trabecular	superficie del hueso	0,025
hueso cortical	superficie del hueso	0,015
hueso trabecular	médula ósea roja	0,5
hueso cortical	médula ósea roja	0,0

La dosis de radiación en riñón considerando la eliminación urinaria como única vía, se calculó a partir del GRAFICO 6 que da

el porcentaje de dosis en riñón en función del tiempo post-administración. Se obtuvo un sistema suma de dos componentes exponenciales con períodos biológicos de 6 y 48 horas, con actividad inicial de 6 y 1,3% respectivamente.

La actividad integrada debida a la administración de 1 mCi será:

$$U = 60 \mu\text{Ci}/\lambda_1 \text{ ef} + 13 \mu\text{Ci}/\lambda_2 \text{ ef}$$

siendo:

$$\lambda_1 \text{ ef} = \frac{0,693}{90,6 \text{ h}} + \frac{0,693}{6 \text{ h}}$$

$$\lambda_2 \text{ ef} = \frac{0,693}{90,6 \text{ h}} + \frac{0,693}{48}$$

reemplazando y dividiendo por la masa del riñón 209 g:

$$U = 1078,3 \mu\text{Ci h}/209 \text{ g} = 5,16 \mu\text{Ci h/g}$$

Multiplicando por la constante de dosis promedio en el equilibrio para Re-186: 0,73 g rad/ Ci h y considerando  $\phi$  factor de calidad de la radiación igual a 1, la dosis equivalente en riñón, debida a la administración de 1 mCi de HEDP-Re-186 resulta de 3,77 rem.

Se calculó la dosis adicional debida a la administración de Re-188. Para médula ósea roja y superficie ósea (endostio) es de 1 rem/mCi Re-188.-HEDP



DISTRIBUCION BIOLOGICA DE 186 RE HEDP EN RATAS WISTAR

TIEMPO:HS. ORGANO % DI + SD	1	2	4	6	15	20	24	48	70	90	141	190
SANGRE	7.35 0.50	3.48 0.16	2.02 0.42	2.21 0.50	1.34 0.41	1.47 0.51	0.77 0.06	0.30 0.02	0.17 0.09	0.16 0.03	0.10	
MISCLLO	6.83 1.93	3.72 2.20	3.31 0.28	1.36 0.49	1.53 0.67	2.03 0.45	0.70 0.13	0.91 0.32	0.68 0.38	0.32 0.15	0.57 0.07	0.35 0.13
HUESO	33.15 6.21	24.82 1.95	33.61 0.07	20.23 1.90	20.23 5.43	15.32 0.32	17.40 0.20	10.86 0.65	9.05 2.82	8.35 2.23	9.11 1.70	7.61 2.17
HIGADO	1.90 1.28	0.78 0.11	0.57 0.07	0.70 0.17	0.85 0.15	0.40 0.11	0.37 0.01	0.18 0.02	0.20 0.06	0.19 0.11	0.14 0.08	0.21 0.18
ESTOMAGO	0.60 0.31	0.53 0.01	0.73 0.60	0.93 0.34	5.25 1.58	8.91 1.56	2.21 0.14	0.26 0.02	0.57 0.51	0.11 0.07	0.09 0.02	
INTESTINO	2.87 0.69	1.86 0.26	1.81 0.95	3.65 0.86	2.15 0.47	2.88 0.03	1.24 0.43	0.88 0.14	1.21 1.12	0.25 0.02	0.25 .07	0.03 0.01
RIFON	8.69 5.14	4.65 0.17	2.46 0.54	6.05 1.47	5.65 2.84	2.48 0.17	1.16 0.09	0.74 0.20	0.40 0.24	0.40 0.19	0.15 0.02	0.07 0.01
ORINA	37.44 11.85	52.38 1.38	55.22 0.38	64.58 5.14	62.61 9.16	63.22 7.43	75.95 0.10	85.52 0.14	87.39 5.86	89.79 2.02	89.59 1.28	91.82 2.62
FEMUR	0.67 0.10	0.58 0.18	0.66 0.00	0.40 0.03	0.45 0.07	0.40 0.11	0.35 0.02	0.20 0.01	0.21 0.06	0.22 0.08	0.20 0.03	0.16 0.06

GRAFICO Nº 1

Farmacocinetica del HEDP-Re 186  
en ratas Wistar

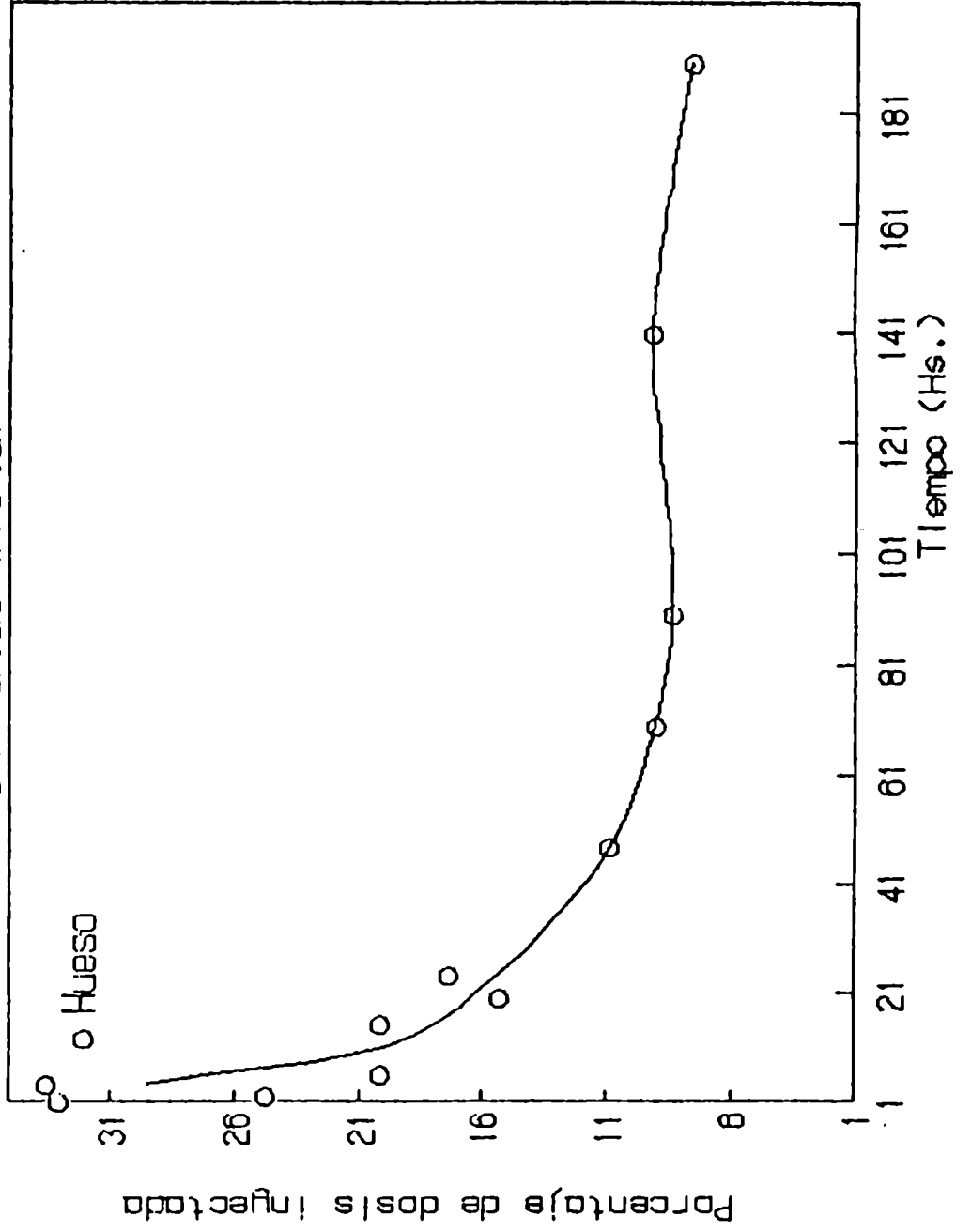
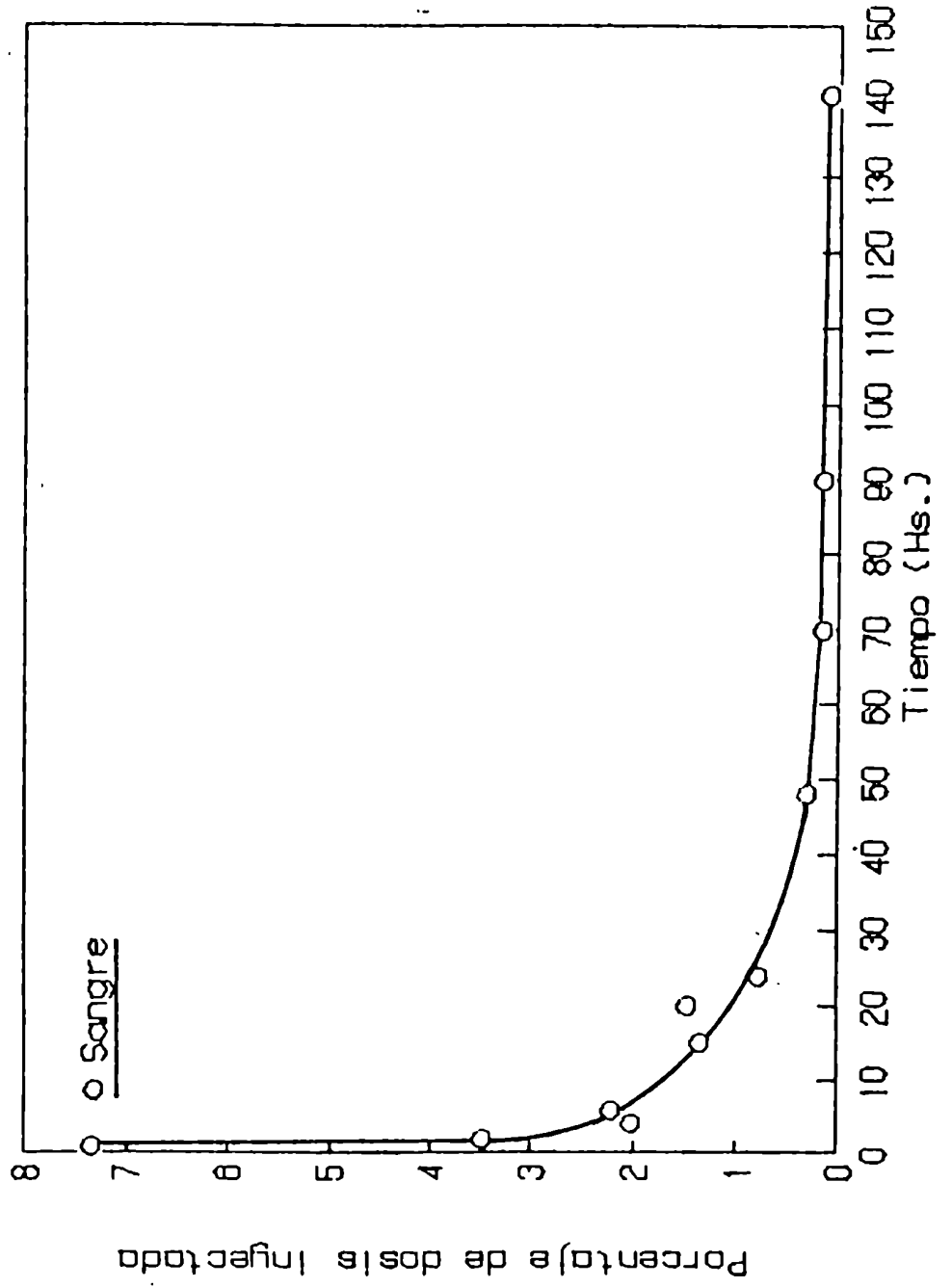


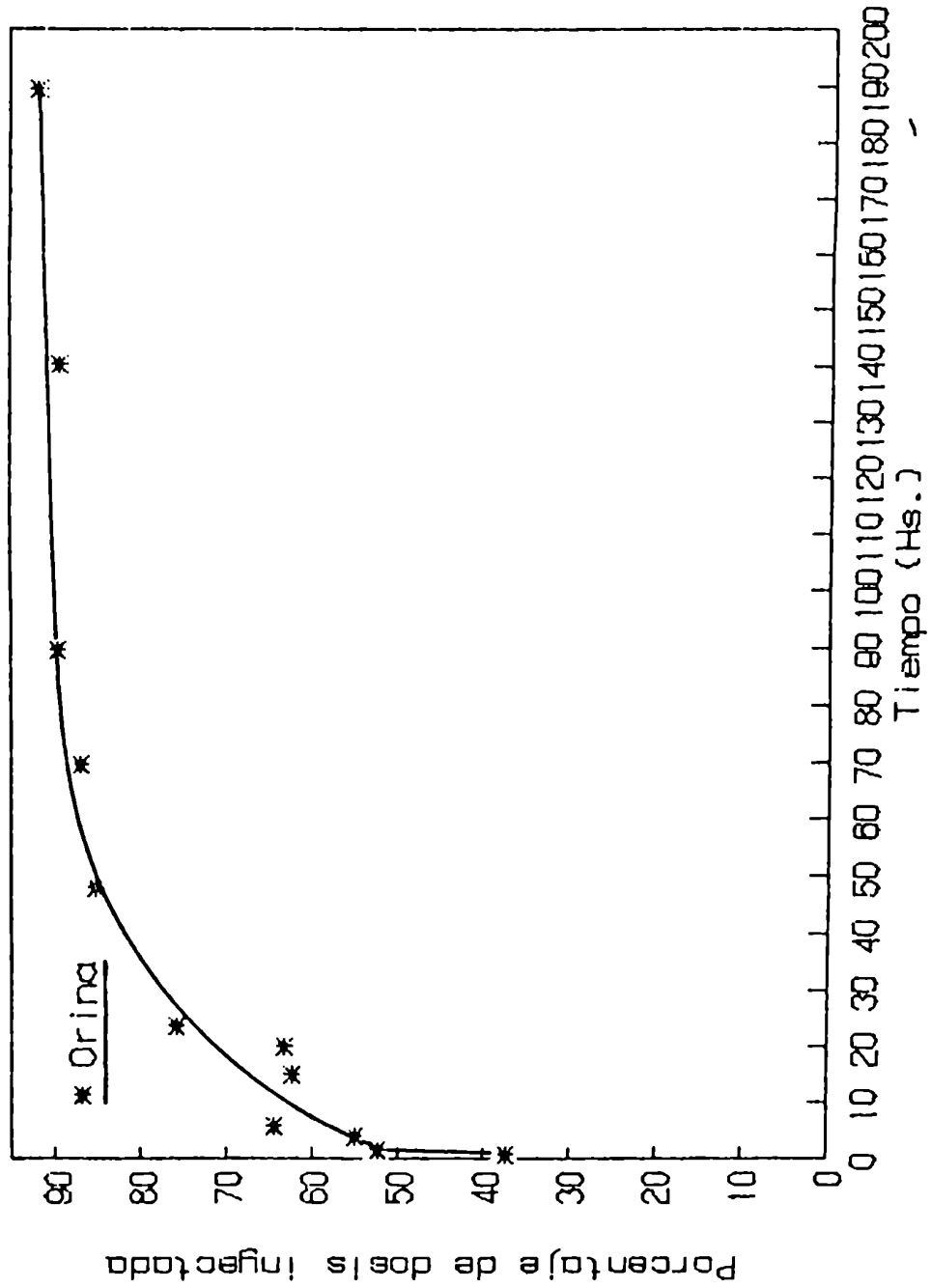
GRAFICO Nº 2

Farmacocinetica del HEDP-Re 186  
en ratas Wistar



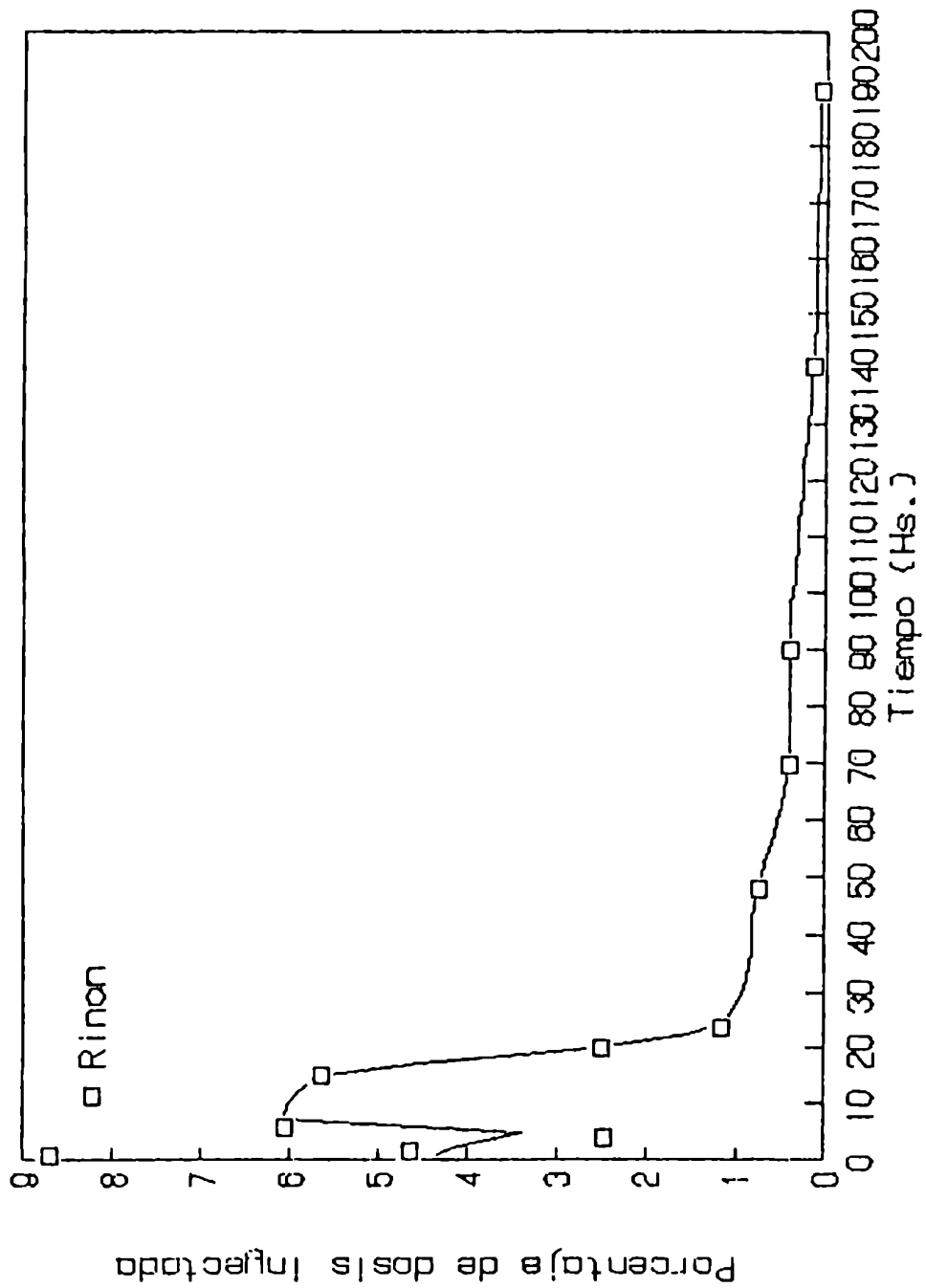
Farmacocinetica del HEDP-Re 186  
en ratas Wistar

GRAFICO Nº 3



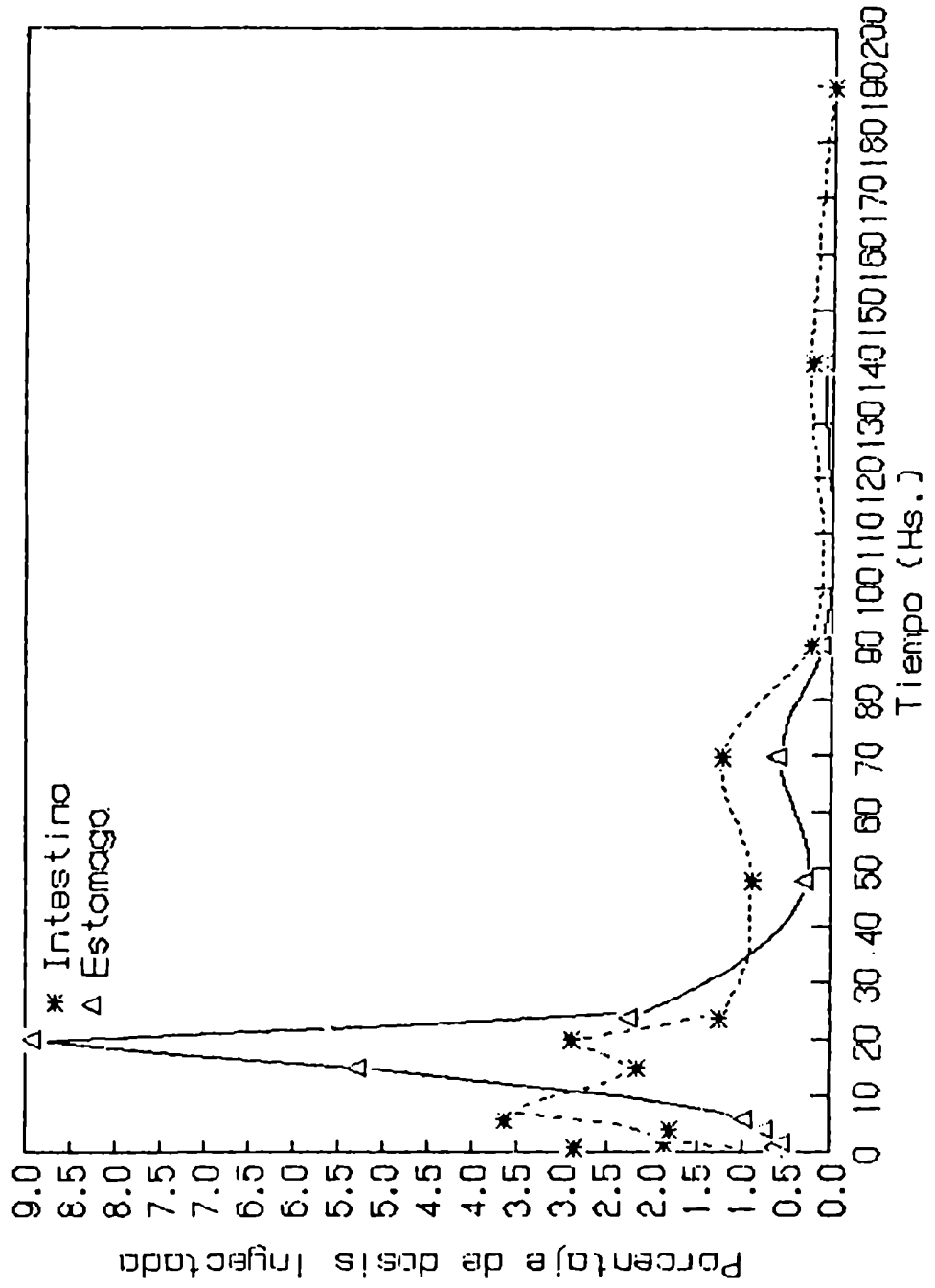
# Farmacocinetica del HEDP-Re 186 en ratas Wistar

GRAFICO Nº 4



# Farmacocinética del HEDP-Re 186 en ratas Wistar

GRAFICO Nº 5



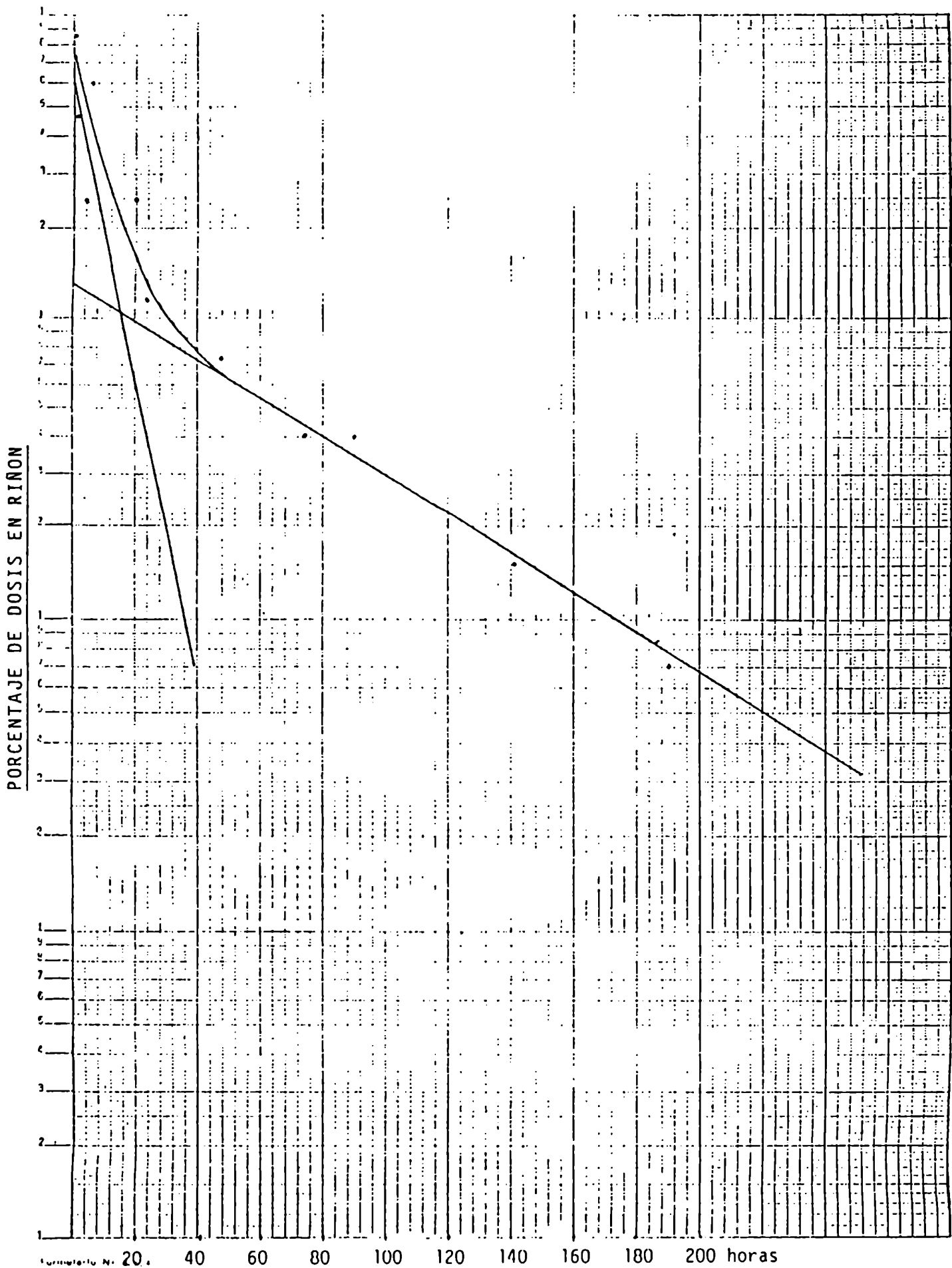
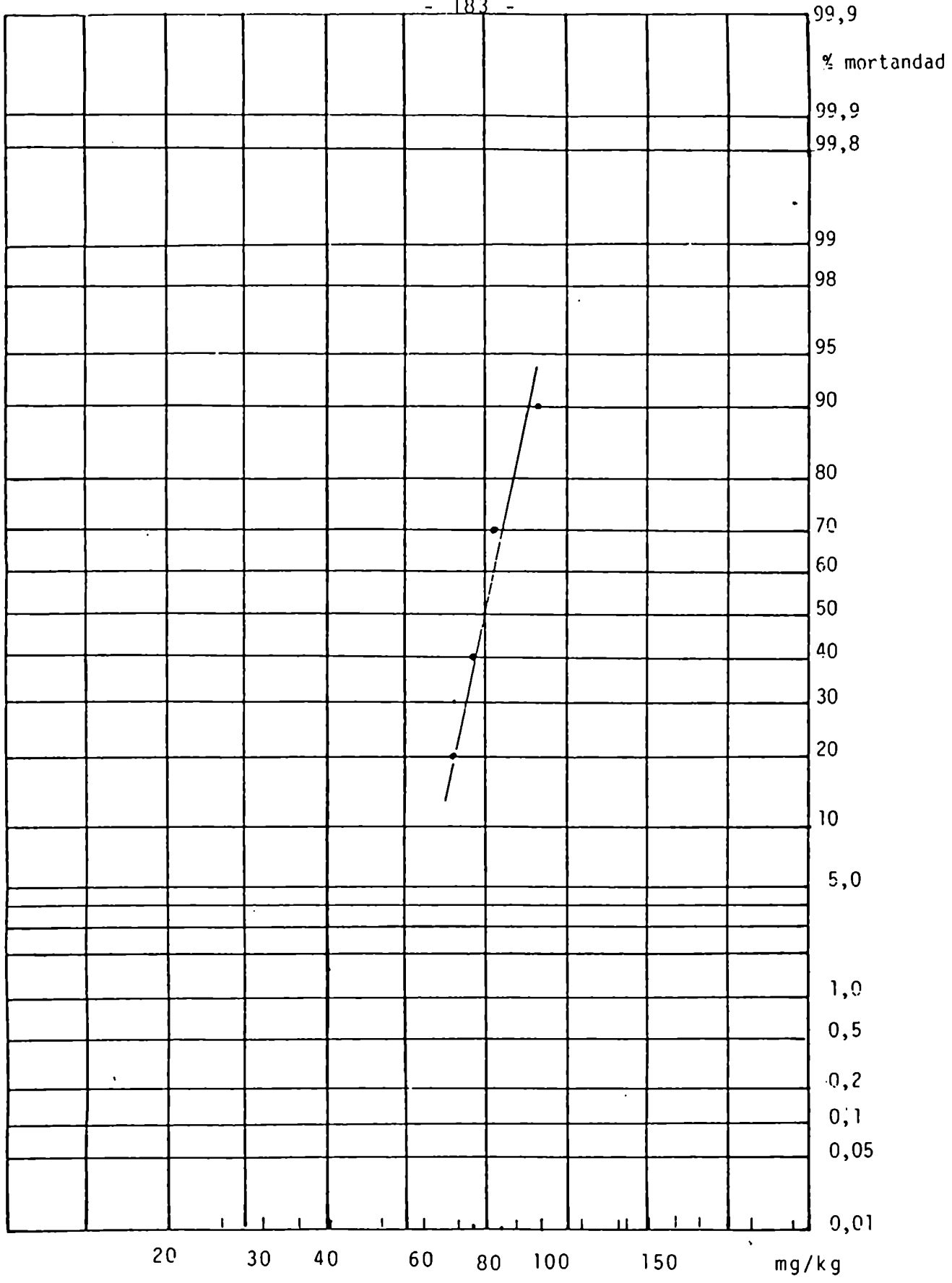


GRAFICO Nº 6



ENSAYOS DE TOXICIDAD

DETERMINACION DE LA DOSIS LETAL CINCUENTA DEL HEDP-Re



<u>Dosis mg/kg</u>	<u>% de mortandad</u>
130	100
120	100
100	90
85	70
75	40
70	20
60	0
50	0

La dosis letal 50 determinada en ratones para HEDP-Re-186 es de 80 mg/kg, coincidiendo con la del HEDP sal disódica.

Los datos registrados en la bibliografía (86) dan para inyección rápida del HEDP en ratas y conejos valores de DL50 entre 40 y 70 mg/kg y para inyección lenta 70-100 mg/kg, no evidenciando reacciones adversas por inyecciones repetidas de 20 mg/kg en perros, cerdos, ratas y conejos.

En ratones (87) se determinaron valores de DL50 entre 40 y 50 mg/kg para soluciones de HEDP en su forma ácida.

La toxicidad de los compuestos de estaño está relacionada con su forma química. La DL50 de cloruro estannoso en perros (inyección intravenosa) es 20-50 mg/kg. Ha sido utilizado óxido estánnico como medio de contraste en rayos X en dosis de 350-380 mg de estaño por kilo de peso, sin signos ni síntomas de toxicidad. (88)

- Toxicidad aguda del HEDP (Sn)-Re

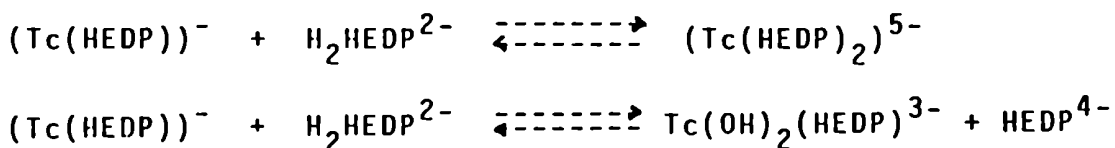
<u>Autor</u>	<u>Producto</u>	<u>Administración</u> <u>Intravenosa</u>	<u>Especie</u>	<u>DL50</u> <u>mg/kg</u>
Dunson y col.	HEDP	lenta rápida	ratas conejos	70-100 40- 70
Subramanian y col.	HEDP	forma ácida	ratones	40- 50
Presente trabajo	HEDP(Sn)-Re	lenta	ratones	80

### DISCUSION

La química del Tc y el Re es cuantitativamente similar. En base a esto se puede anticipar que los complejos de Tc y Re tendrán el mismo tamaño, forma, momento dipolar, carga formal, movilidad iónica, lipofilidad, etc., por lo que en soluciones acuosas, fluidos biológicos o sitios receptores las propiedades físicas de los compuestos análogos de Tc y Re serían indistinguibles y se comportarían de igual manera. (89)

Sin embargo, a pesar que existe una similitud que es muy importante en el contexto de las aplicaciones en medicina nuclear, el comportamiento biológico reveló una discriminación significativa entre los dos radionucleídos cuando se administró en forma intravenosa la formulación HEDP(Sn)-Re con agregado de Tc-99m y comparó la captación ósea con el preparado HEDP(Sn)-Re-186.

Posiblemente la mayor diferencia entre los compuestos de Re y Tc responda a la mayor cantidad de portador que tienen las soluciones de Re-186, pero esta competencia a nivel de la superficie del hueso entre el compuesto de Re estable y el de Re-186 no se produce entre el compuesto de Re y el de Tc-99m, lo que marca de por sí una discriminación biológica entre ambos. También se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la biodistribución de compuestos de Re-186 marcados a diferentes pH. Un comportamiento similar se observa en los fosfonatos marcados con Tc-99m, especialmente en presencia de tecnecio como portador (Tc-99), bajo condiciones ácidas o básicas. Este comportamiento se explica para el Tc por el siguiente mecanismo de reacción:



En estas fórmulas, el estado de oxidación del Tc se eligió como III en concordancia con las publicaciones de Claess y col. y Scott.

Sin embargo, la elección no es esencial para el mecanismo propuesto. Se puede argumentar que el estado de valencia del Tc tiene probablemente poca influencia en la carga de sus iones complejos: el Tc(V) tiende a formar  $Tc(V)O^{3+}$ , el Tc(IV) tiende a formar  $Tc(IV)OH^{3+}$  y  $Tc^{3+}$  tiene poca tendencia a adicionar iones  $O^{2-}$  ó  $OH^-$ .

En condiciones de marcación neutras se formarían complejos más grandes que en condiciones ácidas o básicas. (90)

La biodistribución del HEDP-Re-186 en ratas durante 8 días, muestra una alta concentración en tejido óseo.

Veinticuatro horas luego de la administración, la retención total corregida por el decaimiento radiactivo es de 23,85% correspondiendo al tejido óseo el 17,4%. La depuración sanguínea fue rápida; a las 24 horas la actividad urinaria acumulada alcanza el 75,95% de la dosis inyectada, no encontrándose actividad en las heces de las ratas.

Similarmente a lo que ocurre con los fosfonatos marcados con Tc, alguna de las formas que toma el complejo de Re se fijaría en el parénquima renal.

Considerando la DL50 de 80 mg/kg, la cantidad que puede administrarse a un hombre estándar de 70 kg con un factor de seguridad de 100 es:

$$\frac{80 \text{ mg/kg} \times 70 \text{ kg}}{100} = 56 \text{ mg}$$

Teniendo en cuenta la formulación del complejo 56 mg están asociados a 1,15 mg de Re. Con una actividad específica de 58 mCi/mg de Re, la actividad máxima a administrar es:  $1,15 \text{ mg} \times 58 \text{ mCi/mg} = 66,7 \text{ mCi}$ .

De los cálculos de dosis se infiere que en superficie ósea se liberan 3 rad por cada mCi administrado. Si se considera una relación de concentración del radiofármaco lesión ósea/tejido óseo normal=5 (78), la dosis liberada en metástasis ósea por la administración de 66,7 mCi es:

$$5 \times 3 \text{ rad/mCi} \times 66,7 \text{ mCi} = 1000 \text{ rad (10 Gy)}$$

Se considera que la dosis necesaria para producir un efecto anestésico en metástasis ósea es de 1000 rad(10 Gy). (74

Por lo expuesto se concluye que el HEDP-Re-186 es un radiofármaco adecuado para terapia paliativa del dolor en pacientes con metástasis óseas múltiples que no respondan a los calmantes convencionales.

*Para una dosis única la actividad específica debe ser mayor o igual a 58 mCi/mg de Re-186.*

DISCUSSION

GENERAL

## DISCUSION

La mayor parte de los compuestos radiactivos utilizados actualmente en medicina nuclear incluyen radiofármacos del Tc-99m y del I-131. De allí la importancia del estudio de los métodos de marcación con estos radionucleidos, realizado en esta Tesis.

Se evaluó además, la posibilidad de administrar en humanos radiofármacos de Re-186, aplicando técnicas de marcación similares a las utilizadas con Tc-99m, en base a las semejanzas químicas de ambos. La marcación con Tc y Re involucra la reducción del estado de valencia VII a estados de valencia menores. Como agente reductor se empleó cloruro estannoso en medio ácido, neutro y alcalino empleando distintas técnicas de marcación, de acuerdo con las características del sustrato a marcar.

Como ejemplo de compuesto liofilizado listo para ser reconstituido con solución del generador en la instalación hospitalaria, se desarrolló el fibrinógeno-Sn para marcar con Tc-99m, y propuesto para diferenciar tumores primarios en crecimiento y metástasis, (que captarían el radiofármaco) de los tumores no proliferativos (que darían imagen negativa). La técnica puede ser aplicada a la marcación de otras macromoléculas, especialmente anticuerpos monoclonales para los cuales fue utilizada por Rhodes, B.A. y colaboradores. Se utilizó el cloruro de estaño en medio alcalino como agente reductor, demostrando la acción sinérgica del tiempo de incubación de este agente con la proteína y el tiempo post marcación con Tc-99m.

Se desarrolló la técnica de marcación de la bleomicina con Tc-99m utilizando una técnica electroquímica con liberación de  $\text{Sn}^{2+}$  en medio neutro, a partir del ánodo, sin antecedentes en la bibliografía si bien es conocida su aplicabilidad para otros radiofármacos del Tc-99m.

La técnica seleccionada se adapta al tipo de radiofármaco que por sus características debe ser preparado íntegramente en el centro hospitalario donde debe ser administrado. La simplicidad de la preparación de la BLM-Tc99m no requiere personal altamente capacitado; no es necesario efectuar ensayos farmacológicos y los controles analíticos de calidad se limitan a una simple cromatografía.

A pesar de las ventajas del Tc-99m como agente diagnóstico, la BLM-Tc99m había sido descartada, debido a su inestabilidad "in vitro" e "in vivo".

En el presente trabajo se estudió la influencia de la presencia de oxidantes en la solución de pertechnetato en la cinética y el rendimiento de marcación de la BLM-Tc99m, estableciendo las condiciones óptimas para obtener un producto estable de alta pureza radioquímica y de fácil reproducibilidad. La evaluación clínica se realizó en 20 pacientes portadores de tumores epidermoides, probando ser eficaz para detectarlos con una sensibilidad de 90%. Los dos pacientes que acusaron estudios negativos eran portadores de tumores epidermoides bien diferenciados, lo que concuerda con las experiencias de Müller y colaboradores que encontraron una baja actividad encimática en los tumores altamente diferenciados, por lo que la BLM, al no ser degradada encimáticamente, seguiría circulando sin acumularse en el tumor.

La metaiodobencilguanidina radioiodada es el primer radiofármaco para la imagen de la médula adrenal y sus neoplasmas. En este trabajo se describe la síntesis de la MIBG, la búsqueda de las condiciones de marcación para obtener un radiofármaco de calidad reproducible de alta actividad específica, el desarrollo de una técnica inédita para la determinación de la pureza radioquímica de la MIBG radioiodada, el estudio farmacocinético en animales de laboratorio para evaluar su comportamiento en humanos, especialmente la estabilidad "in vivo".



Esto ha permitido la distribución del producto "listo para su uso" en distintos centros de medicina nuclear de la Capital y el interior del país, llegando a pacientes que por el alto costo del producto importado, no tendrían acceso al mismo.

El mecanismo de radioiodinación por sustitución en el núcleo bencénico en posición meta ha motivado una aún continuada discusión entre los que sostienen la posición tradicional de sustitución nucleofílica y los que apoyan la teoría de la sustitución electrofílica.

Si bien es cierto que en medio ácido coexistirían las dos especies químicas  $(I-131)^-$  y  $(I-131)^+$ , en presencia de un medio oxidante como el ácido sulfúrico o el sulfato de amonio, prevalecería la reacción electrofílica.

La técnica desarrollada para determinar la pureza radioquímica evidenció la presencia de 1-2% de una impureza identificada como benzoato radiomarcado en alguno de los procesos de marcación. La discontinuada presencia de esta impureza y el hecho de que no se incrementa con el envejecimiento del producto, sugieren que se origina en el proceso de marcación. La actividad específica de 12 Ci/g permite su utilización en terapia de feocromocitomas, neuroblastomas y sus metástasis.

Se marcaron varios compuestos de Re-186, algunos no mencionados en la bibliografía, buscando las condiciones óptimas de marcación para obtener la configuración química con máxima afinidad por el tejido óseo.

Esta configuración y el aumento de la cinética de marcación, se consiguió adicionando el Re al sustrato-Sn en medio ácido (pH 1,5-3,0).

Se implementaron los controles analíticos de calidad desarrollando técnicas cromatográficas para el control del ion perrhenato y los distintos compuestos de Re-186.

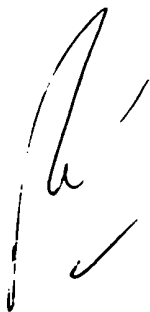
Se demostró que el Re y el Tc, aunque cualitativamente similares, pueden ser discriminados biológicamente.

A partir de los ensayos de biodistribución se seleccionó el compuesto de Re-186 más adecuado para evaluar la posibilidad de ser utilizado en terapia paliativa del dolor en pacientes con metástasis óseas diseminadas, que no respondan a los calmantes convencionales.

Seleccionado el HEDP-Re-186, se determinó la farmacocinética del radiofármaco en ratas Wistar entre 1 y 190 horas, para evaluar la dosis de radiación en la superficie ósea (endostio), en tumor y en médula ósea roja, considerada el órgano crítico.

La actividad a fin de irradiación calculada coincide con la medida por medición absoluta de la actividad por espectrometría gamma del fotón de 137 KeV del Re-186. La concentración de Re se determinó desarrollando una técnica espectrofotométrica.

A partir de los datos de actividad específica y la dosis letal 50 determinada en ratones, se concluye que este radiofármaco puede ser aplicado para los fines propuestos. Sin embargo, previo al tratamiento se deberá administrar al paciente una dosis subterapéutica para evaluar la relación de concentración de actividad lesión/tejido sano en cada caso particular.

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized initial 'P' followed by a checkmark.A handwritten signature in black ink, appearing to be 'AS' followed by 'foto' and a horizontal line underneath.



1. Lawrence, J.H.; J.Nucl.Med. 20:561-564, 1979.
2. Rossi, H.H.; Rad. and Environm.Biophys. 14, pp.275-283, 1977.
3. Lentle, B.Proc. of the Fourth. Int.Symp. on Radiopharmacology. Ed. M.W. Billinghamurst, Pergamon Press. pag. 48-61.
4. Larson, S.M. Carrasquillo J.A. Seminars in Nuclear Medicine. Vol. XIV, Nº 4-pp. 268-276, 1984.
5. Kleist, S. von. Nuklearmedizin. 23:1984, pag. 1-3
6. Freeman, L.M.; Blaufox, M.D. Ed. Seminars in Nuclear Medicine. Vol. XIII, Nº 4, 1983.
7. Spencer, R. Seminars in Nuclear Medicine. Vol. XV, Nº 1, 1985. pag. 21-27.
8. Adelstein, S.J.; Kassis, A.I. Nucl.Med. Biol. Vol. 14, Nº 3. pp. 165-169, 1987.
9. Troutner, D.E. Nucl.Med.Biol. Vol. 14, Nº 3. pp.171-176, 1987.
10. Fawwaz, R.A. y col. Nucl.Med.Biol. Vol. 13, Nº 4. pp.429-436, 1986.
11. Larson, S.M. J.Nucl.Med. 26, pp. 538-545, 1985.
12. Croll, M.N.; Brady, L.W. Seminars in Nuclear Medicine, Vol.IX, Nº 2, pp. 108-113, 1979.
13. Silberstein, E.B.; Craig, W. J.Nucl.med. 26; pp. 345-348, 1985.
14. Wallace, J.C. y col.; Brit.Journ.Radiol. 50; pp. 664-666, 1977.
15. Kristensen, K.; Norbygaard, E. Ed. Safety and Efficacy of Radiopharmaceuticals, Nijhoff, The Hague, 1984.
16. Rhodes, B.A. Ed. Quality Control in Nuclear Medicine.
17. Pfeiffer, G. The role of HPLC in development and quality control of radiopharmaceuticals. Radiopharmacy and Radiopharmacology; Yearbook. Peter H.Cox. Ed. Gordon and Breach Publisher N.Y., 1983.
18. Creutzig, H. y col. Der Nuklearmediziner, 4:351, 1980.
19. Muranaka, A. y col. Radioisotopes, 32:70, 1983.
20. Rhodes, B.A. y col. J.Nucl.Med. 21, p.54, 1980.
21. Lavie, E. y col. Int.J.Appl.Radiat.Isot. Vol. 35, Nº 2, pp.99-100, 1984.
22. Marqués, R.O. y col. IAEA-TEC-DOC-515, pag. 23-33, 1989.

23. Feigl, F. Spot Test in Inorganic Analysis. Elsevier Publishing Co., VI, Ed. 1972.
24. Cifka, J. Int.J.Appl.Radiat.Isot. 33,849, 1982.
25. Umezawa, H. y col. J.Antibiot Ser A (Tokyo) 19:200, 1966.
26. Ichikawa, T. y col. Proceedings of the 5th. International Congress of Chemotherapy AIV-4135. June 1967, Vienna, Austria.
27. Umezawa, H. y col. J.Antibiot. (Tokyo) 25:409, 1972.
28. Nowel, J.P. G.A.N.N. Monogr.Cancer Res. 19, 301, 1976.
29. Lin, M.S. y col. J.Nucl.Med. 15, 338. 1974.
30. Mori, T. y col. Nucl.Med. 16, 414. 1975.
31. Ryo, V.Y. y col. J.Nucl.Med. 16, 127. 1975.
32. Bardy, A. y col. J.Nucl.Med. 16, 435, 1975.
33. Horiuchi, K. y col. Int.J.Appl.Radiat.Isot. 32, 47. 1980.
34. Liberatore, M. y col. Technetium in Chemistry and Nuclear Medicine. Ed.Nicolini, M; Bandoll, G.; Mazzei, V. Tomo 2. 1985.
35. Yokoyama, A. y col. Int.J.Appl.radiat.Isotopes 549. 1978.
36. Benjamin, P.P. Int.J.Appl.Rad.Isot. 20, 187. 1969.
37. Wong, D.W. y col. J.Nucl.Med. 15, 544. 1974.
38. Schneider, P.B. J.Nucl.Med. 14, 843. 1973.
39. Gil, M.C. y col. Int.J.Appl.Rad.Isot. 27, 69. 1976.
40. Deutsch, E. y col. Comments Inorg.Chem. 3, 83. 1984.
41. Molinski, V.J. Int.J.Appl.Radiat.Isot. Vol.33, pp. 811-819. 1982.
42. Muller, W. y col. Gann. 67:425-438. 1976.
43. Beierwaltes, W.H. y col. Semin.Nucl.Med. 7:5-21. 1978.
44. Ice, R.D. y col. J.Nucl.Med. 16:1147-1151. 1975.
45. Korn, N. y col. J.Nucl.Med. 18:87-89. 1977.
46. Short, J.H. y col. J.Med.Chem. 10:833-840. 1967.
47. Wieland, D.M. y col. J.Nucl.Med. 21:349-353. 1980.

48. Fielden, R. y col. Br.J.Pharmacol. 24:408-417. 1965.
49. Sisson, J.C. y col. Engl.J.Med. 305:12-17. 1981.
50. Marqués, R.O. Informe CNFA 348. 1973.
51. Constant, R. B.L.G.-442.
52. Elías, H. y col. Int.J.Appl.Radiat.Isot. 24, 463. 1973.
53. Mangner, T.J. y col. J.Org.Chem. 47, 1484. 1982.
54. Mangner, T.J. y col. J.Nucl.Med. 24. pag. 118. 1983.
55. Mc Ewan, A.J. y col. Appl.Radiat.Isot. Vol. 37, Nº 8. pp.765-775. 1986.
56. Sinn, H. y col. Appl.Radiat.Isot. Vol. 38 Nº 11. pp.921-925. 1987.
57. Mock, B.H. y col. Appl.Radiat.Isot. Vol. 39 Nº 9. pp. 939-942. 1988.
58. Srvanson, D.P. y col. Proc.Third.Int.Radiopharmaceutical Dosimetry Symposium. Health and Human Services Publication FDA 81-8166-Rockville, Maryland. p. 213-244. 1981.
59. Mertens, J.J.R. y col. J.Nucl.med. 26, 123. 1985.
60. Baldwin, R.M. Appl.Radiat.Isot. Vol.37 Nº 8. p.817-821. 1986.
61. Eisenhut, M. y col. J.Lab.Comp. and Radioph. Vol. XXI, Nº 11-12. pag. 1130.
62. Kenney, J.M. et al. Radiology. 37, 683-687. 1941.
63. Hertz, S. Journ Clin.Invest. 29, 821. 1950.
64. Tong, E.C.K. et al. Jour.Urol. 109, 71-75, 1973.
65. Kaplan, E. et al. J.Nucl.Med. 1, 1-13. 1960.
66. Hall, J.N. et al. J.Nucl.Med. 16, 532. 1975.
67. Maxfield, J.G.S. et al. Southern Med.Journ. 51, 320-327. 1958.
68. Parsons, R.L. Journ.Urol. 85, 342-344. 1961.
69. Pecher, C. Publications in Pharmacology. 11. 117. 1942.
70. Robinson, R.G. et al. Nucl.Med.Biol. Vol. 14 Nº 3, 219-222. 1987.
71. Mathiew, L. et al. Int.J.Appl.Rad.Isot. 30, 725. 1979.
72. Ketring, A.R. Nucl.Med.Biol. Vol.14, Nº 3. pp.223-232.1987.

73. Goeckeler, W.F. et al. Nucl.Med.Biol. Vol. 13, Nº 4. pp. 479-482. 1986.
74. Eisenhut, M. et al. J.Nucl.Med. 27, 1255. 1986.
75. Elder, M. et al. J.Chem.Soc. (A) 1423. 1967.
76. Adman, E. et al. Inorg.Chem. 6, 210. 1967.
77. Eisenhut, M. Int.J.Appl.Rad.Isot. 33, 99. 1982.
78. Weininger et al. Nuklearmedizin. 23, 81. 1984.
79. Beeston, J. y col. Anal.Chem. Vol. 25, Nº 4. 1953.
80. Noto, M.G. y col. Informe CNEA Nº 371. 1973.
81. Fogelman, I. y col. J.Nucl.Med. 20, 98-101. 1979.
82. Castronovo, F.P. y col. Journ.Nucl.Med. 15, 127. 1974.
83. Van den Brand, J.A. ECN-98. Octubre 1981.
84. Mitta, A.E. Comunicación personal.
85. Miller, L.C. y col. Proc.Soc.Exp.Biol. 57:261-264. 1944.
86. Dunson, G. y col. Drug Intell.Clin.Pharm. 7, 470-474. 1973.
87. Subramanian, G. y col. J.Nucl.Med. 16, 744-755. 1975.
88. Fisher, H.W. Radiology 68, 488. 1957.
89. Deutsch, E. y col. Nucl.Med.Biol. Vol. 13, Nº 4. pp.465-477. 1986.
90. Huigen, Y.M. y col. Appl.Radiat.Isot. Vol. 38, Nº 8. pp. 615-618. 1987.