

CNEA - Instituto Dan Beninson


Especialización en Radioquímica y Aplicaciones Nucleares

**Marcación de proteínas o péptidos con
HYNIC para el desarrollo de
radiofármacos para localización de
inflamación/infección en una instalación
de Radiofarmacia Hospitalaria**

Bioq. Carolina Poch

Directora de beca: Dra Graciela Rabiller

Fecha: Diciembre de 2008

	
ERAN	N° <u>131</u>
	CD: <u> </u> AÑO <u> </u>

INDICE

RADIOFARMACIA	3
DESARROLLO DE UN RADIOFÁRMACO	4
PREPARACIÓN DE LOS RADIOFÁRMACOS DEL ^{99m}Tc.....	7
RADIOFÁRMACOS DE ^{99m}Tc	9
MARCACIÓN DE PROTEÍNAS O PÉPTIDOS CON ^{99m}Tc.....	12
AGENTES QUELANTES UTILIZADOS EN EL DISEÑO DE RADIOFÁRMACOS DE ^{99m}Tc	16
MARCACIÓN CON HYNIC.....	17
INFLAMACIÓN E INFECCIÓN.....	21
RADIOFÁRMACOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE INFECCIONES E INFLAMACIONES	23
INMUNOGLOBULINA G (Ig G).....	30
INTERLEUKINA-8.....	38
PERSPECTIVAS FUTURAS	45
ANEXO I.....	47
ANEXO II (PRÁCTICAS).....	51
CONCLUSIONES DE LOS TRABAJOS PRÁCTICOS	75
CONCLUSIONES FINALES	77
REFERENCIAS.....	78

RADIOFARMACIA

La Medicina Nuclear es hoy una especialización médica reconocida y practicada en todo el mundo. Se inició en el año 1950 con el uso de moléculas o drogas marcadas con un radionucleído (radiofármacos), para la realización de estudios diagnósticos *in vivo* o *in vitro*, o para conseguir un efecto terapéutico.

A principios de la década del 70, su desarrollo y evolución se acentuó gracias a la electrónica, al aporte de nuevos instrumentos de detección para el diagnóstico por imágenes (Cámara gamma) y a la aparición de nuevos radionucleídos (en particular el ^{99m}Tc).

La Radiofarmacia trajo aparejado la formación de especialistas (Radiofarmacéuticos), entrenados en preparar, fraccionar, controlar y entregar los radiofármacos, ya que el uso de generadores (en especial, $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$), ha exigido la preparación *in situ* de los distintos radiofármacos a partir del radionucleído. De esta manera las diferentes técnicas implementadas y la variedad de radiofármacos disponibles permiten estudiar los distintos procesos fisiológicos o bioquímicos que ocurren en el organismo, en situación normal o patológica. En estos últimos años, se ha observado un resurgimiento en los procedimientos terapéuticos, los cuales están orientados a una radioterapia dirigida y específica, utilizando anticuerpos monoclonales, péptidos bioactivos y determinados radionucleídos.

Radiofármacos

Se denomina radiofármaco a «toda sustancia que, por su forma farmacéutica, cantidad y calidad de radiación emitida puede usarse en el **diagnóstico y tratamiento de las enfermedades** de los seres vivos, cualquiera sea la vía de administración empleada».

El radiofármaco resulta de la combinación de especies orgánicas o inorgánicas y un radionucleído. **No tienen acción farmacológica**, pero están sujetos a estrictas regulaciones establecidas por las autoridades sanitarias.

Los radiofármacos se clasifican en:

- **Radiofármacos para uso Diagnóstico:**

Se consideran verdaderos trazadores radiactivos y se administran con el fin de:

- a) visualizar la anatomía de un órgano o sistema.
- b) evaluar el comportamiento fisiológico a nivel de los tejidos.
- c) analizar a través de su metabolismo el comportamiento bioquímico.
- d) determinar cuantitativamente sus parámetros farmacocinéticos.

- **Radiofármacos para uso Terapéutico:**

Se administran al paciente con el propósito de irradiar tejido interno. Su valor terapéutico se basa en el efecto de las radiaciones sobre el tejido blanco (target) y en la selectividad de la localización de la fuente radiactiva (*in situ*).

DESARROLLO DE UN RADIOFÁRMACO

El diseño de un radiofármaco para uso diagnóstico, está en relación con la fisiología que presenta el órgano blanco, por ello se deben considerar dos elementos fundamentales:

1. Elección del radionucleído

La primera etapa es conocer las características del radionucleído con el que se va a trabajar, ya que el mismo introducido en moléculas, sirve como trazador en tejidos y órganos.

Cada vez es más frecuente el uso de radionucleídos emisores gamma puros, que desintegran por captura electrónica o transición isomérica y que pueden obtenerse por elución de un sistema generador.

Propiedades que deben reunir los radionucleídos para uso diagnóstico:

- Administrar bajas dosis de radiación al paciente.
- Alto rendimiento del fotón para que un procedimiento de Medicina Nuclear sea llevado a cabo en un corto período de tiempo.
- Producirse en cantidades que cubran la demanda del uso rutinario.
- Costos aceptables.
- Disponibles como un preparado farmacéutico o que pueda ser elaborado usando una manipulación sencilla.
- No requieran que el paciente sea aislado después del procedimiento.

Los radionucleídos más utilizados en la clínica son: ^{99m}Tc , ^{18}F , ^{123}I , ^{131}I , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , entre otros.

El campo de la Medicina Nuclear ha experimentado un crecimiento exponencial en las últimas décadas como resultado de la introducción de un trazador ideal, tal es el caso del ^{99m}Tc .

Propiedades químicas del ^{99m}Tc : el radioisótopo ideal.

- Energía ideal para imágenes. Su baja energía gamma de 140 Kev, hace posible una fácil colimación y lograr imágenes con buena resolución espacial en la cámara gamma.
- Apropiado $t_{1/2}$ (6.0 h) y ausencia de radiación β . Permite administrar una cantidad importante sin que implique una dosis de radiación demasiado alta al paciente.
- Fácil de obtener y disponible (generador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$). Se obtiene en forma estéril y libre de pirógenos.
- Bajo costo.

- Habilidad para unirse a una multitud de compuestos (DTPA, HYNIC, MAG3, etc).
- 85% de todos los estudios por imágenes en USA son realizados usando ^{99m}Tc .

2. Elección de su forma química

Al considerar la forma química del agente portador del indicador radioactivo se debe tener en cuenta:

- La forma química utilizada debe permitir su incorporación al compartimiento biológico deseado, donde su cinética debe ser la adecuada (que permanezca en circulación un cierto tiempo, o localizarse en cierto tipo de tejido o excretarse de una forma determinada).
- El radionucleído debe ser fácilmente incorporable a la estructura del compuesto sin alterar sus propiedades.
- Su excreción debe ser lo más rápida posible una vez finalizada la prueba diagnóstica, de modo que se reduzca la dosis de radiación total del paciente.

La dosis de radiación absorbida por el organismo va a depender no sólo del tipo de emisión del radionucleído que forma parte del radiofármaco administrado sino, además de la energía de esa emisión, del $T_{1/2}$ físico, y del tiempo que el radiofármaco permanece en el organismo ($T^{1/2}$ biológico).

Período de Semidesintegración Efectivo ($T^{1/2}$ Efectivo): expresa el tiempo en el cual la radiactividad suministrada al paciente pasa a ser la mitad.

$$T^{1/2} \text{ efectivo} = \frac{T^{1/2} \text{ físico} \times T^{1/2} \text{ biológico}}{T^{1/2} \text{ físico} + T^{1/2} \text{ biológico}}$$

Idealmente el tiempo medio de un radiofármaco, es 1,5 veces la duración del procedimiento diagnóstico. Por ello se establece un compromiso entre la dosis mínima de

radiación que se administra al paciente y la dosis máxima a ser inyectada, de manera tal de obtener una buena estadística en la medición y que la calidad de la imagen sea óptima.

PREPARACIÓN DE LOS RADIOFÁRMACOS DEL ^{99m}Tc

El tecnecio es un metal de transición artificial y se ubica en el grupo VII A de la tabla periódica. Presenta múltiples estados de oxidación que van de -1 a $+7$, siendo en solución los más estables $+7$ y $+4$. Las propiedades químicas que posee le permiten coordinarse con diferentes sustratos orgánicos (ricos en electrones). Por lo tanto, puede combinarse con:

- moléculas simples, como pirofosfatos, ó análogos de azúcares (glucoheptanato)
- péptidos y anticuerpos
- coloides y macroagregados insolubles
- antibióticos
- y a otras moléculas complejas, dando origen a una variedad de radiofármacos.

El pertecnetato de sodio ($^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$) como tal, no se une a otras especies químicas si previamente no se reduce su valencia $+7$ a otras menores. Para obtener estados de oxidación menores del ^{99m}Tc deben usarse agentes reductores, siendo el más utilizado el ión estannoso bajo la forma de cloruro de estaño ($\text{Cl}_2\text{Sn}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$), y otros como floruro de estaño, ácido ascórbico.

Las reducciones se llevan a cabo en presencia de un ligando, que puede estabilizar la valencia menor del Tc y minimizar o prevenir subsiguientes reacciones de hidrólisis y reducción. Este hecho es posible, manteniendo los iones del agente reductor complejados con un agente quelante, que generalmente es el mismo compuesto que se desea marcar con ^{99m}Tc (ej: ^{99m}Tc -DTPA).

El ión estannoso es un poderoso agente reductor y ha permitido obtener rendimientos cuantitativos de los compuestos de Tc. Esto permitió elaborar juegos de reactivos (kits) «instantáneos» para la preparación de radiofármacos de ^{99m}Tc .

Un kit se presenta en un frasco tipo penicilina estéril, que contiene los compuestos químicos no radiactivos principalmente: *el agente complejante* (ligando) y *el agente reductor*. El mismo se prepara adicionando a la solución del agente complejante a un pH definido, el cloruro de estaño en solución ácida. Alícuotas de la mezcla final se ponen en frascos preesterilizados y el producto se almacena en forma liofilizada bajo presión de nitrógeno. En estas condiciones, el compuesto puede reaccionar con el $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$ y producir un determinado radiofármaco. Un juego de reactivos liofilizado se mantiene inalterado por varios meses.

El agente complejante (pirofosfato, metilendifosfonato, glucoheptanato de calcio, etc.) está presente con un exceso molar de 10-20 veces a la cantidad de estaño para asegurarse que todo el Sn^{+2} o Sn^{+4} se compleje. En las reacciones químicas que se producen en la preparación de los radiofármacos de ^{99m}Tc , el Sn^{+2} pasa a tener valencia +4 y el $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (+7) se reduce a $^{99m}\text{Tc}^{+4}$ y en menor proporción están presentes cantidades de Tc de valencia +3 y +5. El tecnecio reducido se une muy activamente a los grupos $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$ y $-\text{SH}$, que actúan como dadores de pares de electrones (marcación).

En general la marcación de los radiofármacos del ^{99m}Tc se hace a temperatura ambiente y en pocos minutos, mediante la simple adición del $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$ al juego de reactivos, previamente haber determinado en un Activímetro la actividad absoluta del eluido.

Una vez obtenido el radiofármaco, se procede a evaluar el porcentaje de impurezas radioquímicas. Para ello, el método más común inmediato es la cromatografía en capa fina instantánea (ITLC) o en papel, y en la misma se pueden identificar las impurezas radioquímicas de un radiofármaco marcado y las diferentes formas químicas en que pueden presentarse:

- a) $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$ libre que no a sido reducido por el Sn^{+2}
- b) El ^{99m}Tc reducido e hidrolizado (coloide)
- c) El radiofármaco de ^{99m}Tc deseado

RADIOFÁRMACOS DE ^{99m}Tc

El ^{99m}Tc -pertechnetato de Na, tal como se eluye del generador, puede ser inyectado vía intravenosa o unirse a moléculas para ser administrado en forma oral, o puede ser utilizado para la marcación de células sanguíneas.

El $^{99m}\text{TcO}_4\text{Na}$ se une a proteínas plasmáticas entre 70-80%, preferentemente a la albúmina. El 20% de este anión no unido, es altamente difusible, razón por la cual puede ser encontrado en muchos órganos, incluyendo la glándula tiroides, glándulas salivales, mucosa gástrica y el plexo coroideo en el cerebro y es removido de la sangre por la captación de algún tejido o por pérdida de fluido extracelular (orina, saliva, etc.).

Casi el 80% de los compuestos radiofarmacéuticos utilizados con fines diagnóstico son marcados con ^{99m}Tc . Se clasifican en:

- **Radiofármacos marcados con ^{99m}Tc :**

Dentro de este grupo se incluyen:

- a) Partículas y coloides: coloide de sulfuro de tecnecio (azufre coloidal), agente usado para centellografía; macroagregados de Tc albúmina (agente pulmonar).
- b) Proteínas: Albúmina y Anticuerpos poli y monoclonales.
- c) Células: eritrocitos, leucocitos y plaquetas
- d) Pequeñas moléculas: polifosfatos, difosfonatos, etc. (se usan como agentes óseos).

Químicamente los radiofármacos marcados con ^{99m}Tc pueden ser:

Compuestos de coordinación del ^{99m}Tc : las propiedades físicas y biológicas están determinadas por el ^{99m}Tc y se denominan Tc esenciales.

- 1) Agentes de la función renal: ^{99m}Tc DTPA (ác. dietilentriamipentaacético)
- 2) Agentes de estructura renal: ^{99m}Tc glucoheptanato
- 3) Agentes de imagen cardíaca: ^{99m}Tc isonitrilos

4) Agentes para infartos: ^{99m}Tc pirofosfato

Complejos de Tc con ligandos bifuncionales: un ligando bifuncional es una molécula biológicamente activa (ej:blemicina) que se une a unquelante (ej:EDTA) que puede coordinarse con el ^{99m}Tc . El compuesto original y el derivado marcado deben tener la misma biodistribución. (1)

El rol de los radiofármacos de ^{99m}Tc en el futuro

Nuevas técnicas de marcación desarrolladas en los 1990s usando, por ejemplo, HYNIC y carbonilos pueden ser aprovechados para desarrollar nuevos trazadores para oncología, cardiología y neurología. Algunos de estos radiofármacos encontrarán una gran aceptación debido a su bajo costo y gran disponibilidad. Aunque las imágenes del tomógrafo por emisión de positrones (PET/CT) son intrínsecamente superiores a las imágenes del tomógrafo por emisión de fotón único (SPECT), esta mejora se traduce en un incremento significativo de los precios. Como resultado de los avances actuales en tecnologías de detectores y algoritmos de reconstrucción, la resolución espacial de las imágenes del SPECT se están acercando rápidamente a la de las imágenes de PET, sin una disminución en la sensibilidad. La introducción del SPECT/CT ha adoptado esta modalidad de imágenes. Estas mejoras del SPECT/CT, juntas con las mejoras de los radiofármacos del ^{99m}Tc , proporcionarán un nivel alto de información funcional y anatómica como el que es alcanzado por el PET/CT. Se espera que todos estos acontecimientos aumenten la demanda y utilidad de los radiofármacos del ^{99m}Tc y sus kits. (2)

Algunos de los radiofármacos rutinarios usados en el Centro de Medicina Nuclear del Hospital de Clínicas José de San Martín están descriptos en el ANEXO I.

Se han realizado las marcaciones rutinarias con ^{99m}Tc de kits liofilizados y controles de calidad de radiofármacos para el entrenamiento en la tarea asistencial. El objetivo fue recibir el entrenamiento necesario para una correcta actividad en el laboratorio de Radiofarmacia, siguiendo las buenas prácticas radiofarmacéuticas y las normas básicas de seguridad radiológica.

El tema particular que se me ha asignado fue la marcación de un compuesto preparado “in house”, la inmunoglobulina G, por un método de marcación indirecta mediante el uso de un agente quelante bifuncional: HYNIC.

Las prácticas realizadas, con sus respectivos resultados se encuentran descriptos en el ANEXO II.

MARCACIÓN DE PROTEÍNAS O PÉPTIDOS CON ^{99m}Tc

La obtención de proteínas marcadas con ^{99m}Tc como radionucleído se desarrollo hace muchos años, luego de la aparición del generador de ^{99m}Tc . Sin embargo las preparaciones iniciales no fueron simples de marcar ni dieron productos estables. Si el ^{99m}Tc es reducido en presencia de una proteína, se obtiene una proteína marcada, pero el átomo de ^{99m}Tc no está necesariamente unido con una unión fuerte y puede disociarse *in vivo*.

Los desarrollos en este tema se orientaron a marcar proteínas con ^{99m}Tc por unión del radionucleído con sulfuros reactivos. Se emplearon dos mecanismos para proveer sulfuros reactivos en las proteínas: el primero fue reducir los puentes disulfuro nativos incubando la proteína con iones estaño, o con otros agentes reductores, y el segundo fue introducir grupos que contenían sulfhidrilos libres incorporando quelantes bifuncionales en las proteínas.

Marcación directa

La marcación con ^{99m}Tc de los grupos sulfuro reactivos de la proteína, es considerada usualmente como marcación directa ya que no hay intermediarios tales como grupos bifuncionales. Una de las mayores ventajas del método directo es que puede resultar en la producción de un equipo diagnóstico.

En la marcación directa es necesario optimizar los parámetros de la reacción involucrados en el acoplamiento de los iones metálicos del ^{99m}Tc , a los grupos sulfuro de las proteínas. En segundo lugar deben minimizarse las reacciones laterales que conduzcan a productos no deseables o impurezas radioquímicas.

Esta metodología comprende varios pasos:

- 1) reducir los grupos disulfuro sin alterar las características biológicas de las proteínas.
- 2) mantener estos grupos sulfuros reactivos.

3) reducir los iones pertecnetato a un estado de oxidación altamente reactivo, estabilizándolo con la presencia de un agente complejante que a su vez lo transfiera a los grupos sulfuros de las proteína.

La proteína que va a ser marcada necesita contener sulfhidrilos(-SH) o monosulfuros (-S- o -S-metal). Estos grupos se llaman tioles. Los mono y disulfuros son una parte nativa de la mayoría de las proteínas y se debe a que uno de los aminoácidos que contiene tioles, la cisteína, es una parte de la cadena peptídica de la mayoría de las proteínas. Para muchas proteínas, tales como las gammaglobulinas, el estado nativo es aquel en el cual la mayoría de los residuos de cisteína están unidos a otros residuos de cisteína formando puentes disulfuro intra o intercatenarios. Estos puentes tienen un rol importante en el mantenimiento de la estructura de la proteína funcionante.

Reduciendo los anticuerpos con agentes reductores tales como ditiotreitól, se incrementaba la actividad específica del anticuerpo marcado con ^{99m}Tc .

El uso de Sn (II) para reducir cisteína está reconocido desde hace años y puede ser usado para reducir los puentes disulfuro en proteínas y para protegerlos de la reoxidación. Se observó también que con niveles de reducción mayores se encontraban fragmentos de menor peso molecular causados por la ruptura de los puentes intracatenarios, y moléculas de alto peso molecular, producidas por entrecruzamiento de dos o más moléculas de anticuerpo durante la formación de puentes disulfuro entre las moléculas reducidas.

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

Por lo tanto las proteínas (incluyendo anticuerpos), y algunos autores sostienen que también los péptidos, pueden marcarse con ^{99m}Tc usando un reductor para reducir el metal, si es que se encuentran sitios de unión adecuados, disponibles para esa unión.

Marcación indirecta

En los métodos indirectos de marcación el ^{99m}Tc es coordinado por medio de un agente quelante sintético, el cual puede ser conjugado a la biomolécula, antes o después del proceso de radiomarcación. La marcación de compuestos bioactivos con ^{99m}Tc requiere entonces la conjugación a un agente quelante bifuncional (BFCA).

Esta técnica se está utilizando actualmente para marcar péptidos, agentes de unión a receptores y otras moléculas bioactivas. Se utilizan generalmente dos esquemas de marcación:

•**a) Técnica del quelante premarcado:** consiste en marcar el BFCA con ^{99m}Tc , purificarlo y luego unirlo a la biomolécula.

La técnica consiste en la marcación de un quelato preformado formándose un complejo estable de ^{99m}Tc . Posteriormente se forma un éster activo el cual es finalmente conjugado al anticuerpo. Este proceso es lento y requiere purificaciones de los intermediarios y del conjugado final marcada.

La ventaja del uso de quelatos preformados marcados es la aplicación de una química definida, sin unión no específica del radionucleído. La biomolécula además, no se somete a condiciones duras de marcación como temperaturas altas, pH alcalinos, presencia de agentes reductores. Esto es importante para preservar la estructura terciaria y la inmunoreactividad de proteínas y anticuerpos. Sin embargo, difícilmente se puedan adaptar estas técnicas para usarlas en un Servicio de Medicina Nuclear.

•**b) Marcación post-conjugación a BFCA.** Se han desarrollado agentes biquelantes que permiten una marcación post-conjugación. Estos compuestos pueden unirse al compuesto bioactivo y luego marcar este conjugado por el agregado de un complejo débil de ^{99m}Tc tal como el ^{99m}Tc gluconato.

La ventaja más importante del método indirecto es que puede ser utilizado para la marcación de diversas biomoléculas independientemente de su tamaño, en contraste con

el método directo que se usa para marcar moléculas de peso molecular elevado. Sin embargo los quelantes usados en los métodos indirectos no están siempre disponibles y generalmente se requieren de diversas etapas de purificación. La principal ventaja del método directo en cambio, es su simplicidad y la posibilidad de desarrollar formulaciones liofilizadas, listas para marcar en un solo paso y ser utilizadas en diagnóstico por imágenes en Centros de Medicina Nuclear. (3)

AGENTES QUELANTES UTILIZADOS EN EL DISEÑO DE RADIOFÁRMACOS DE ^{99m}Tc

Las condiciones que deben cumplir los agentes quelantes son las siguientes:

- Rápida y eficiente marcación con elevada Ae.
- Alta estabilidad de la unión radionucleído-BFCA-biomolécula bajo condiciones fisiológicas.
- Preservación de la actividad biológica de la biomolécula después de la conjugación y marcación.
- Adecuada biodistribución preferentemente con excreción renal (BFCA hidrofílicos).
- Baja unión a proteínas de suero humano (rápida depuración sanguínea).

La formación de complejos con Tc(I) (isonitrilos, tricarbonilos), Tc(III) (mezcla de ligandos, BATOs), Tc(V)-oxo (nitrido, difosfinas, aminooximas, hidrazino) y Tc(V)-dioxo se produce con compuestos que poseen grupos funcionales carboxilo, amino, mercapto, hidroxilo, fosfato e isonitrilo que poseen una estructura molecular adecuada para favorecer uniones de coordinación entre el metal y el agente quelante en forma estable.

Este último punto es de mayor importancia dado que el complejo formado debe ser lo suficientemente inerte para impedir la reoxidación del Tc *in vivo*. Los agentes quelantes bifuncionales (BFCAs) que permiten por un lado unirse a una biomolécula y por otro complejar el radionucleído con alta Ae.

Los más empleados son cDTPA, NHS-DTPA, NHS-S-acetil-MAG₃, tiolactona de DADT (Ae = 0.5 Ci/ mmol), NHS-HYNIC (Ae = 3 Ci/ mmol) y diversos ésteres activos de compuestos tetradentados con el core N₃S como ser TFP-SBz-MAG₃ (Ae = 3.3 Ci/ mmol) y con el core N₂S₂, N₃P y N₂P₂. La presencia del grupo tiol en el core del quelante promueve alta estabilidad y rápida cinética de formación de complejos con Tc(V)-oxo por marcación directa usando Sn(II) o por transquelación usando [$^{99m}\text{TcO(V)}$]-

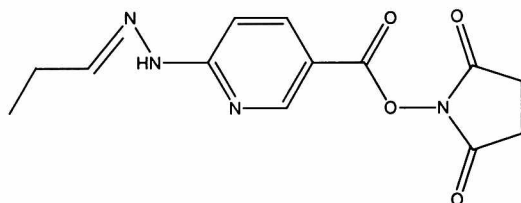
(glucoheptanato)₂]⁻ o ^{99m}TcO(V)-MDP El ligando ^{99m}Tc(V)-oxo [^{99m}Tc=O]³⁺ forma el core más común para agentes de diagnóstico.

Los coligandos que rodean este core determinan la biodistribución, estabilidad y geometría del complejo, que en la mayoría de los casos es cuadrado-piramidal con el oxígeno en la posición axial. También existe el core ^{99m}Tc(V)-dioxo [^{99m}TcO₂]⁺ que forma complejos hexa-coordinados y el core hidrazido-Tecnecio que se forma con HYNIC (quelante monodentado) donde se forma una unión Tc=N y los sitios vacantes de la esfera de coordinación del Tc son completados con diferentes coligandos (EDDA que es tetradentado o tricina) resultando un complejo estable.

Modificaciones en el tipo de coligando utilizado permiten cambiar algunas de las propiedades del complejo. (4)

MARCACIÓN CON HYNIC

El HYNIC (hidrazinonicotinamida) introducido por Abrams et al., funciona como un agente quelante bifuncional (BFCA), formando un puente entre la biomolécula y el Tecnecio. El HYNIC actúa como un ligando monodentado en la conjugación con moléculas, mientras que los coligandos pueden ser tricina o EDTA (ácido etilendiaminodiacético), entre otros.



C₁₃H₁₄N₄O₄
Exact Mass:
290,10
Mol. Wt.: 290,27
C, 53,79; H, 4,86;
N, 19,30; O, 22,05

El HYNIC parece ser un agente quelante bifuncional ideal para la marcación de biomoléculas con ^{99m}Tc y eso es debido a que:

- Permite una marcación rápida y eficiente de proteínas, formando complejos que tienen una alta estabilidad *in vivo*.
- Puede ser usado en concentraciones relativamente bajas.
- Permite obtener radiofármacos con alta actividad específica.

La marcación con HYNIC asegura condiciones suaves, evitando la reducción de los puentes S-S de las cisteínas de las biomoléculas; los derivados de la somatostatina marcados con ^{99m}Tc también pueden ser preparados de esta manera. La mejor versión de estos derivados es el ^{99m}Tc -EDDA-HYNIC-TOC, en el cual el octreotide modificado (conteniendo tirosina en lugar de la fenilalanina en la cadena de aminoácidos (TOC)) y el EDDA (como coligando) están presentes en la molécula. El ^{99m}Tc -EDDA-HYNIC-TOC es una herramienta muy útil para el diagnóstico por imágenes de tumores y metástasis que expresan en su superficie receptores de somatostatina.

El HYNIC proporciona un método de marcación exitoso en el caso de la anexina V, proteína que se une específicamente a la fosfatidilserina, para obtener imágenes de muerte celular programada (apoptosis). El HYNIC también permite la marcación de varios agentes para imágenes de infección e inflamación, como el péptido antimicrobiano ubiquidina (UBI 29-41), la interleukina-8, el antagonista de receptores de leucotrieno B4 (LTB-4), el péptido quimiotáctico RP-463 que contiene la secuencia formil-metionil-leucil-fenilalanil-lisina-HYNIC y liposomas. El HYNIC se une a la lisina, que es un simple aminoácido al cual puede unírsele el tecnecio. (2)

Método de Marcación con HYNIC

Etapa de conjugación: el S-HYNIC reacciona con el grupo amino de los residuos lisina de la proteína (o péptido), formando el conjugado HYNIC-proteína.

Etapa de marcación: este conjugado se marca con ^{99m}Tc usando un coligando.

Una típica marcación de HYNIC-tricina es la siguiente:

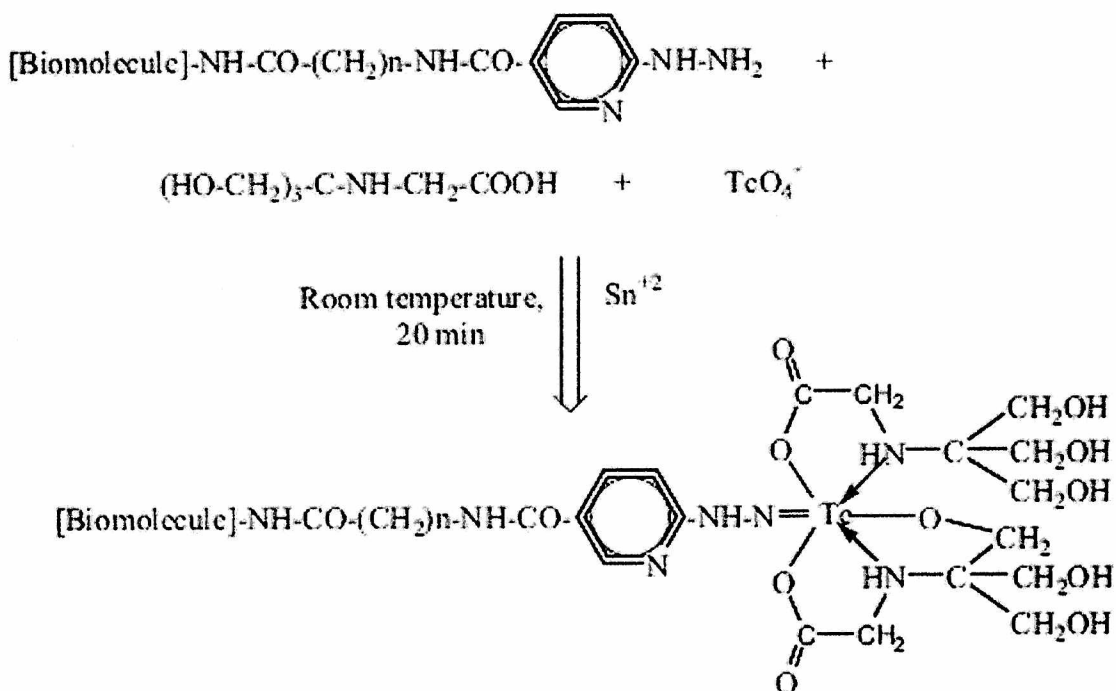


FIG. 2.4. Technetium-99m labelling of a biomolecule through the HYNIC substrate.

La marcación de proteínas o péptidos con ^{99m}Tc usando HYNIC es fácil, rápida, eficiente, se pueden obtener preparaciones con alta actividad específica y la actividad biológica es preservada.

La desventaja es que en caso de que los residuos de lisina, que son los involucrados en la conjugación con S-HYNIC, sean críticos para la actividad biológica las condiciones de conjugación deben ser ajustadas.

INFLAMACIÓN E INFECCIÓN

La respuesta inmune es el fruto de la interacción entre los linfocitos T y los linfocitos B y los monocitos/macrófagos. Esta cooperación conduce a la proliferación celular, la producción de anticuerpos (como la Inmunoglobulina G), la diferenciación de células citotóxicas, el aumento de la actividad microbicida y la diferenciación hematopoyética.

La regulación de esta compleja red de respuestas inmunitarias e inflamatorias depende sobre todo de la comunicación entre la células participantes e interactuantes, la cual se logra por medio de moléculas proteicas solubles que se denominan citoquinas.

Estas sustancias no solo afectan la respuesta inmune, la hematopoyesis y la integración del sistema inmune con el sistema neuroendocrino, sino que también están implicadas en la fisiopatología de un gran número de enfermedades: el cáncer, las inmunodeficiencias, las enfermedades autoinmunes y los procesos infecciosos.

Los receptores para las citoquinas pertenecen a diferentes familias, pero todos ellos se caracterizan por ser específicos y de muy alta afinidad por sus ligandos, presentan (K_d 10^{-10} - 10^{-12} M). Como consecuencia de ello solo muy pequeñas cantidades de citoquinas (concentraciones fentomolares) son requeridas para gatillar el efecto biológico. La expresión celular de estos receptores es regulada a través de señales específicas que pueden ser generadas por otra o aún la misma citoquina, lo cual permite amplificar la señal positiva o generar un efecto de retroalimentación negativa. (5)

La inflamación puede ser descripta como una reacción en el organismo frente a cualquier tipo de injuria. Esa injuria puede ser desde un trauma a una isquemia, una neoplasia y también una invasión de microorganismos, en este último caso se habla de infección. La infección simplemente significa “contaminación con microorganismos”. Puede haber infección sin que haya inflamación, como en el caso de un paciente severamente inmunocomprometido. Especialmente en esos casos es claro que para obtener imágenes se necesitaría un agente que directamente interaccionara con el microorganismo. Puede haber inflamación sin infección cuando el daño en el tejido no es debido a la invasión de

microorganismos, sino que es causado por estímulos como un trauma, isquemia, neoplasia o partículas extrañas (ej: asbestos).

Componentes de la respuesta inflamatoria:

La respuesta a una infección/inflamación aguda está caracterizada por:

- Incremento de la llegada de sangre a la región
- Incremento de la permeabilidad vascular en el área afectada
- Mayor transudación de proteínas del plasma
- Migración de leucocitos al área afectada

En respuesta al daño que se produce en el tejido se activan poderosos mecanismos de defensa: células (leucocitos) y proteínas del plasma (opsoninas, factores del complemento, anticuerpos). En este proceso están involucrados una compleja variedad de mediadores, que son vasoactivos y quimiotácticos. Estos mediadores son generados en el sitio de inflamación/infección y amplifican la respuesta local por medio del reclutamiento de células y componentes del plasma desde la sangre. Para facilitar la extravasación de proteínas y células se induce la vasodilatación y el aumento de la permeabilidad endotelial. Además se estimula la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales y leucocitos. De esta manera los leucocitos migran activamente desde la circulación al tejido inflamado. Primero, se adhieren al endotelio vascular debido a la mayor expresión local de moléculas de adhesión. Posteriormente, atraviesan el endotelio y la membrana basal (diapedesis) y migran al foco inflamatorio (quimiotáxis). En la inflamación/infección aguda las células que infiltran son predominantemente polimorfonucleares (PMN).

En la inflamación/infección crónica la respuesta celular es diferente a la aguda. Las células que infiltran son predominantemente mononucleares: linfocitos, monocitos y macrófagos. (6)

RADIOFÁRMACOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE INFECCIONES E INFLAMACIONES

La visualización gammagráfica de la localización de la infección y la inflamación es un requerimiento actual en la práctica clínica, por sus importantes consecuencias en el tratamiento de pacientes con este tipo de patología. A fin de decidir con rapidez el tratamiento más adecuado, la ubicación y el diagnóstico de los focos infecciosos en estos pacientes es fundamental. Si la historia clínica y la examinación física no fueran decisivos, el médico puede elegir entre varias modalidades diagnósticas para determinar la localización, la extensión y la gravedad de la enfermedad. Nuevas exploraciones radiológicas de gran sensibilidad, como la resonancia magnética (RM) y la tomografía computarizada helicoidal (TC), pueden localizar anomalías focales relativamente pequeñas. Sin embargo, estos métodos radiológicos están basados en alteraciones morfológicas y, por lo tanto, su precisión es menor en los estadios iniciales de la infección o la inflamación y no tienen capacidad para discriminar entre procesos activos y alteraciones anatómicas provocadas por una infección curada o posteriores a una intervención quirúrgica (tejido cicatricial). Así, las técnicas de imagen nuclear han probado jugar un rol fundamental en el diagnóstico de los procesos inflamatorios. Esos métodos proporcionan información diferente y sus roles en las diferentes patologías han sido discutidos en numerosos reviews con particular énfasis en la ampliación del uso de IgG policlonal, liposomas, antibióticos, péptidos, citoquinas (Interleukinas-IL) radiomarcados para imágenes centellográficas de infección/inflamación.

La representación gammagráfica de la inflamación se puede conseguir básicamente de tres maneras: dirigiéndose al objetivo mediante mecanismos de captación inespecífica, mediante leucocitos y dirigiéndose de forma directa al objetivo con microorganismos infiltrados.

La primera forma consiste en utilizar la permeabilidad vascular aumentada localmente mediante la inyección de moléculas marcadas radiactivamente que muestran el aumento

de la extravasación en el lugar de la inflamación. El proceso de acumulación y retención del radiofármaco en el lugar de la inflamación en este caso es inespecífico. Algunos ejemplos son ^{67}Ga -citrato, inmunoglobulinas inespecíficas radiomarcadas. La utilización de radiotrazadores inespecíficos para obtener imágenes de procesos inflamatorios tiene importantes limitaciones. En primer lugar, el proceso de extravasación de macromoléculas por difusión es un proceso lento. Es necesario mantener concentraciones altas prolongadas en sangre para permitir la difusión necesaria hacia el tejido elegido como objetivo. Sin embargo, el mantenimiento de concentraciones sanguíneas elevadas se traduce en concentraciones de fondo relativamente altas, especialmente en tejidos con buena perfusión. En segundo lugar, en la inflamación crónica, la permeabilidad vascular tiende a normalizarse.

Además, dada las características comunes de la inflamación infecciosa y la no infecciosa, estos agentes no tienen la capacidad para distinguir entre ambos tipos de inflamación. En consecuencia, los radiotrazadores inespecíficos tienen una limitación importante de la capacidad para detectar (y discriminar entre ellas) las inflamaciones infecciosas y no infecciosas. En este sentido, los métodos con ^{67}Ga -citrato, inmunoglobulinas inespecíficas radiomarcadas, liposomas y avidina-biotina, se enfrentan a las mismas limitaciones intrínsecas.

El segundo método consiste en aprovechar la diapédesis y la quimiotaxis de los leucocitos, ya sea mediante el marcado radiactivo de leucocitos del paciente *in vitro* o dirigiéndose directamente a antígenos leucocitarios o receptores *in vivo* mediante la administración de anticuerpos monoclonales antigranulocitos o ligandos de unión a receptores radiomarcados. En estos casos, se cree que el proceso de acumulación y retención del radiofármaco en el lugar de la inflamación es, al menos en parte, específico, es decir que el radiofármaco se une de forma específica a la zona en estudio.

La tercera forma consistiría en utilizar agentes que se dirijan de forma específica y directa al microorganismo infeccioso (bacterias u hongos). (7)

La elección del radiofármaco que se utilizará va a depender de si la infección/inflamación es aguda o crónica.

Los radiofármacos que se utilizan para la localización de los procesos de infección/inflamación agudos son: leucocitos autólogos radiomarcados, ^{67}Ga -citrato, Inmunoglobulinas no específicas, IL-1, IL-8, sistema avidina-biotina para la marcación de anticuerpos monoclonales, antibióticos radiomarcados, péptidos quimiotácticos radiomarcados, entre otros.

En cambio los que se usan para procesos crónicos son: ^{67}Ga -citrato, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -nanocoloides, IL-2, anticuerpo anti-granulocitos radiomarcados, entre otros. (8)

Nuevos radiofármacos en el estudio por imagen de la infección y la inflamación

Todos los radiofármacos disponibles actualmente para el estudio por imagen de las infecciones tienen sus limitaciones. La aplicabilidad del ^{67}Ga -citrato es limitada debido a la captación intestinal fisiológica y a la elevada dosis de radiación.

Los leucocitos radiomarcados todavía son considerados el método gold standard, pero la preparación consume mucho tiempo y tiene riesgos asociados a la manipulación de sangre potencialmente contaminada.

La Interleukina-2 radiomarcada es una herramienta importante para la detección de infiltración linfocitaria en el intestino delgado y se utiliza para el seguimiento de la terapia. La preparación de este radiofármaco es laboriosa pero carece de manipulación de sangre potencialmente contaminada. Este concepto es de mucha importancia para el caso de pacientes inmunosuprimidos. Los radiofármacos disponibles que pueden ser usados en lugar de los leucocitos marcados para la visualización centellográfica de focos infecciosos e inflamatorios son: ^{67}Ga -citrato y $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Anticuerpo antigranulocito entre otros. Varios agentes marcados con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ están siendo desarrollados actualmente para esta aplicación. Muchos de estos agentes, recientemente desarrollados, son ligandos que

se unen a receptores de subpoblaciones de células sanguíneas blancas activadas, por ejemplo anticuerpos monoclonales, péptidos quimiotácticos y citoquinas.

La IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, G-CSF, IFN-gamma y el EGF han sido radiomarcados para que se unan *in vivo* a diferentes leucocitos con resultados prometedores.

Otros agentes desarrollados como los antibióticos radiomarcados, podrían distinguir potencialmente entre infección e inflamación no séptica.

El virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) es el agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). El paciente inmunocomprometido puede ser afectado por diferentes patógenos oportunistas que atacan todos los sistemas de órganos, particularmente el respiratorio, el sistema nervioso central o el sistema gastrointestinal.

Nuevos radiofármacos “in house” serán necesarios para la detección de infecciones específicas y tumores y esto será un avance en el campo de la medicina nuclear molecular, el cual se espera que sea transferido al cuidado clínico del HIV.

El 80% de todos los radiofármacos usados en medicina nuclear clínica son compuestos marcados con ^{99m}Tc , debido a sus características físicas y nucleares extremadamente favorables, su disponibilidad y su bajo costo. Sin embargo, la química, por ejemplo la conjugación de péptidos y proteínas para permitir la marcación con ^{99m}Tc , tiene algunas dificultades. Están disponibles muchas estrategias para la marcación de proteínas con ^{99m}Tc .

Radiofármacos para localización específica de infecciones

Los procesos inflamatorios pueden ser agudos, crónicos o de base autoinmune, con síntomas inespecíficos, para los que se requiere de agentes diagnósticos lo suficientemente selectivos para diferenciarlos de una infección.

Recientes avances en el conocimiento de la fisiopatología de los procesos inflamatorios a nivel molecular, combinado con progresos en las ciencias radiofarmacéuticas, han

permitido el diagnóstico diferencial entre inflamación e infección mediante técnicas de medicina nuclear.

A fin de no confundir un proceso estéril de uno séptico, se han desarrollado distintos radiofármacos. La respuesta del organismo a los procesos inflamatorios o infecciosos es similar, por lo que se requieren radiofármacos que permitan un diagnóstico diferencial seguro.

Por otra parte la identificación y localización del foco inflamatorio o infeccioso de manera precoz permitirá encarar conductas terapéuticas rápidas y acertadas.

Las técnicas gammagráficas se basan en cambios fisiológicos y bioquímicos que ocurren en el tejido afectado, característicos de las distintas fases de cada patología (inflamación, infección o inflamación crónica de base autoinmune), permitiendo, en forma incruenta la exploración de cuerpo entero en un solo estudio.

Estas técnicas presentan tantas ventajas que impulsaron el desarrollo de variados radiofármacos, incluyendo moléculas mediadoras de última generación. (7)

El radiofármaco ideal para obtener imágenes debería proveer a un rápido diagnóstico (2-4hs) mostrando una mínima captación en tejidos no inflamados / infectados.

Los radiofármacos para infección se dividen en:

- a) **Radiofármacos no específicos**: que actúan por su capacidad de localizarse en el sitio de inflamación el cual frecuentemente es acompañado con infección.
- b) **Radiofármacos específicos**: que en cambio muestran una interacción adicional con el agente causante de la infección o con el sistema inmune.

Las condiciones que deberían cumplir son:

- Fácil preparación radiofarmacéutica

- Amplia disponibilidad y bajo costo para ambos: radionucleído y fármaco
- Baja toxicidad y ausencia de respuesta inmune
- Una acumulación fisiológica poco significativa en sangre, hígado, bazo, tracto intestinal, médula, hueso, riñones o músculo
- Rápido lavado del fondo y del tejido blanco
- Rápida detección de focos infecciosos. Que permita realizar un diagnóstico diferencial entre inflamación e infección.
- Alta especificidad en la detección de otras causas de inflamación. (9)

RADIOFÁRMACOS NO ESPECÍFICOS	RADIOFÁRMACOS ESPECÍFICOS
⁶⁷ Ga-citrato ¹¹¹ In-DTPA-IgG	¹¹¹ In-Glóbulos blancos autólogos
^{99m} Tc-IgG ^{99m} Tc-HYNIC-IgG ^{99m} Tc-MAG3-IgG	^{99m} Tc-AcMo antigranulocitos BW250/183 Leucoscan: NCA-90 Leucotech: CD-15
^{99m} Tc-Micropartículas de albúmina	^{99m} Tc-Péptidos quimiotácticos IL-2, IL-8
Avidina/ ^{99m} Tc-EB-1 Avidina/ ¹¹¹ In-DB-2 Otros derivados de biotina	^{99m} Tc-Péptidos antimicrobianos UBI 29-41 Otros péptidos sintéticos
^{99m} Tc-PEG-liposomas ^{99m} Tc-HYNIC-liposomas	^{99m} Tc-infecton (ciprofloxacina)

Agente	Radionucleído	Captación en infección/inflamación	Acumulación en tejidos no blandos	Clearence	Toxicidad
Fmet.leu.phe	^{99m}Tc	Temprana, específico.	Bazo(++),hígado, riñones, vejiga, intestino.	Rápido (++)	Neutropenia
IL-1	^{123}I	Temprana, específico.	Captación temprana en riñones, vejiga, hígado y bazo	Rápido (+)	>10 ng/Kg
IL-2	$^{123}\text{I}, ^{99m}\text{Tc}$	Temprana, específico.	Captación temprana en hígado, bazo, riñones y vejiga	Rápido (+)	No se observa
IL-8	$^{123}\text{I}, ^{131}\text{I}$	Temprana, específico.	Ninguna	Rápido (++)	Netropenia
PF-4	^{99m}Tc	Temprana, especificidad no demostrada.	Hígado, bazo, riñones	Rápido (++)	No se observa

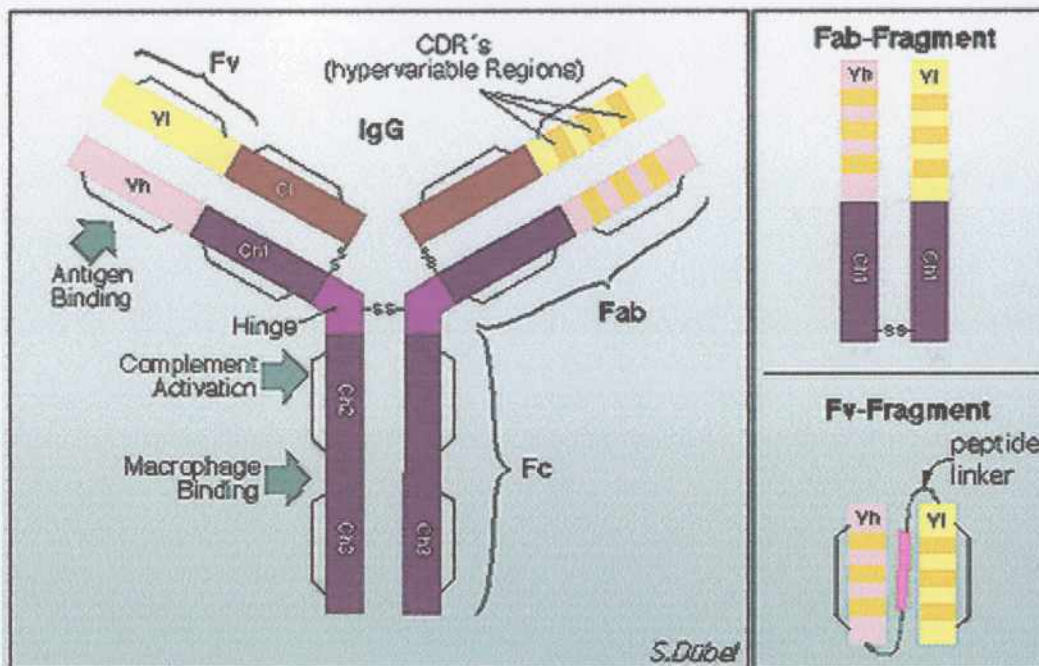
INMUNOGLOBULINA G (Ig G)

La técnica de marcación utiliza una inmunoglobulina policlonal humana que sirve para detectar infección/inflamación pero no diferencia entre ambas.

SE OBTIENE UN RADIOFARMACO INESPECÍFICO.

Mecanismo de acción

- Pasaje a través de los vasos por incremento de permeabilidad.
- Se supone que ocurren cambios fisicoquímicos en la Ig G resultando en una polimerización y captura en el sitio de inflamación.
- Algunos autores proponen que hay una unión específica a receptores Fc en leucocitos.
- Y otros que hay una unión específica a bacteria.



Marcación de IgG

Se pueden utilizar dos métodos para la marcación de Ig G: uno indirecto, usando HYNIC como quelante; y otro directo: en donde la unión del ^{99m}Tc es a los grupos sulfhidrilos.

El radiofármaco IgG-HYNIC- ^{99m}Tc que se obtiene con el método indirecto parece ser superior al IgG- ^{99m}Tc para la detección de infecciones/inflamaciones dado su mayor estabilidad *in vivo*.

Además el clearance corporal total del ^{99m}Tc -HYNIC-hIgG fue significativamente menor, se observó baja captación en riñones y la captación del ^{99m}Tc -HYNIC-hIgG en el absceso, como porcentaje de la actividad remanente corporal, fue significativamente superior. (10)

SE DISPONE PARA USO RUTINARIO, EN EL CENTRO DE MEDICINA NUCLEAR DEL HOSPITAL DE CLÍNICAS JOSÉ DE SAN MARTÍN, LA IgG-HYNIC- ^{99m}Tc COMO UN RADIOFÁRMACO “IN HOUSE”. (11)

A continuación se describen las etapas de desarrollo de un radiofármaco “in house” en la Radiofarmacia Hospitalaria.

Los controles de calidad que se realizaron durante el desarrollo de IgG-HYNIC- ^{99m}Tc fueron los siguientes:

Pureza radioquímica

Se determinó utilizando los siguientes sistemas cromatográficos:

ITLC / buffer citrato

Rf = 0-0.25 (^{99m}Tc -HYNIC-IgG, ^{99m}Tc -reducido-hidrolizado)

Rf = 0.7-1.0 (^{99m}Tc -tricina, $^{99m}\text{TcO}_4^-$)

ITLC / Metiletilcetona

Rf = 0 (^{99m}Tc -HYNIC-IgG, ^{99m}Tc -reducido-hidrolizado)

Rf = 1 ($^{99m}\text{TcO}_4^-$)

ITLC (bloqueado con albúmina humana 5%) / $\text{NH}_3:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$

Rf = 0.7-0.8 (^{99m}Tc -HYNIC-IgG)

Rf = 0.0 (^{99m}Tc -reducido-hidrolizado)

Rf = 1.0 ($^{99m}\text{TcO}_4^-$)

Resultados obtenidos:

En todos los casos el rendimiento de marcación fue mayor al 95%.

Primera marcación: rendimiento = 95%

Segunda marcación: rendimiento = 98%

Tercera marcación: rendimiento = 98%

Cuarta marcación: rendimiento = 98%

Quinta marcación: rendimiento = 98%

He realizado la marcación de un conjugado de Ig G durante la práctica y el rendimiento que obtuve fue del 92 %.

Test de estabilidad en suero

El ensayo fue llevado a cabo de la siguiente manera:

Se marcó un vial de IgG-HYNIC con ^{99m}Tc (Actividad específica: 15 mCi/mg, Concentración de actividad: 4 mCi/ml).

Se agregó 1 mCi de la preparación a 1 ml de PBS (buffer fosfato salino) y 1 mCi a 1 ml de plasma humano y se incubó a 37°C.

Se tomaron muestras (10 μl) de cada mezcla de incubación luego de 0, 1, 2, 4 y 6 hs.

Se diluyó las muestras 10 veces con el agregado de 90 μl de buffer citrato 0.15 M, pH 5.5 (si no se diluye la muestra de plasma se pueden producir interferencias en el proceso de ITLC-SG debido a la saturación de la fase sólida).

Se analizaron las muestras en ITLC-SG usando buffer citrato 0.15 M, pH 5.5 como fase móvil.

Resultados de la estabilidad en suero

La IgG-HYNIC- ^{99m}Tc fue preparada el 2/09/2005 y el kit de tricina el 28/12/2005.

▪ **0 hs:**

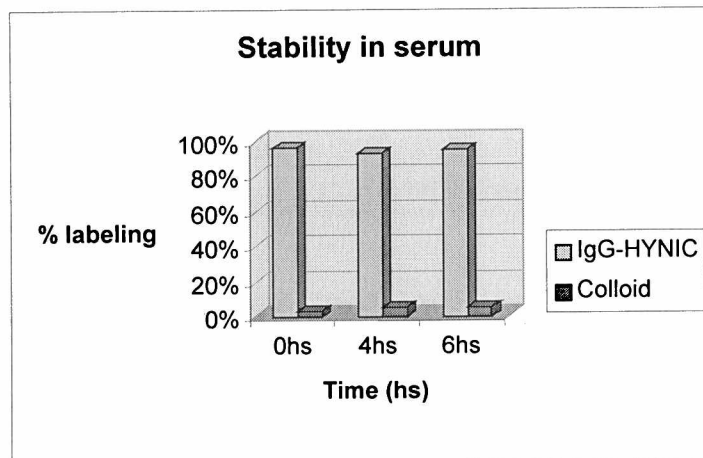
- ITLC/ citrate buffer Rf 0-0.25 = 96%
- ITLC(blocated with human albumin 5%) / NH₃:EtOH:H₂O
Rf 0.8 = 97%

▪ **4hs:**

- ITLC/ citrate buffer Rf 0-0.25 = 93%
- ITLC(blocated with human albumin 5%) / NH₃:EtOH:H₂O
Rf 0.8 = 95%

▪ **6 hs:**

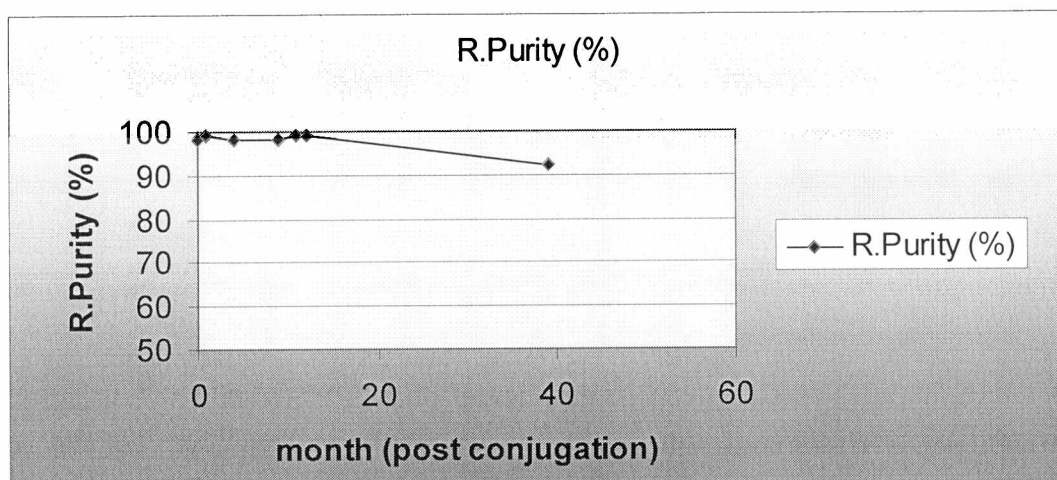
- ITLC/ citrate buffer Rf 0-0.25 = 95%
- ITLC(blocated with human albumin 5%) / NH₃:EtOH:H₂O
Rf 0.8 = 95%



Estabilidad de la IgG-HYNIC (Shelf life)

Se utilizó el mismo batch de IgG.

Fecha	Pureza Radioquímica (%)	Tiempo (meses)
1/9/2005	98	0
1/10/2005	99	1
12/1/2006	98	4
1/6/2006	98	9
4/7/2006	99	11
4/8/2006	99	12
19/11/2008	92	39



Esta técnica permitirá utilizar el conjugado IgG-HYNIC estable durante el período ensayado y será de gran utilidad en Radiofarmacia Hospitalaria.

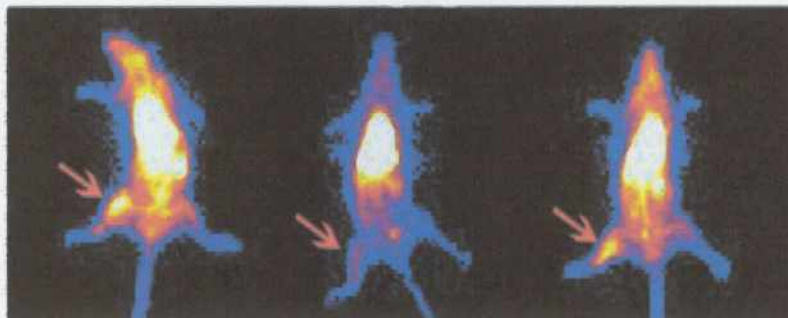
Modelo animal

Se introdujo un absceso en el músculo de ratas Wistar hembras y jóvenes (150-200 g) (tres ratas) con aproximadamente 2×10^8 unidades formadoras de colonias de *Staphylococcus aureus* suspendidas en 0.1 ml de sangre de rata.

Luego de 24hs de la inoculación del *S. aureus* en el músculo, el absceso fue evidente y el Tc^{99m} HYNIC-IgGh fue inyectado por vía endovenosa. La dosis usada fue 37MBq en 0.1 ml (dosis de proteína 200 μ g) por rata.

Las siguientes son imágenes de ratas a las 4hs y 24hs post inyección, obtenidas en cámara gamma del Centro de Medicina Nuclear del Hospital de Clínicas:

4hs post inyección



24hs post inyección



Biodistribución 24hs post inyección

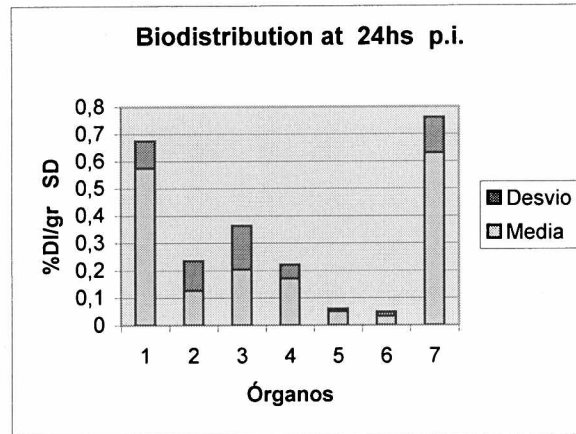
El gráfico muestra la biodistribución de la radiactividad a las 24hs post inyección (porcentaje de dosis inyectada por gramo \pm SD) en ratas Wistar hembras (tres ratas).

Las ratas fueron sacrificadas con la inyección de 20 mg de fenobarbital administrado intraperitonealmente, seguido de dislocación cervical 24hs post inyección de la IgG-HYNIC-^{99m}Tc.

La actividad medida en los tejidos fue expresada como porcentaje de dosis inyectada por gramo y corregida por el decaimiento radiactivo.

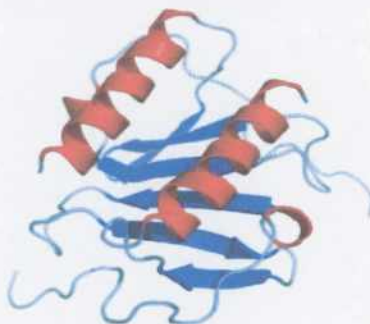
	1.Hígado	2.Hueso	3.Sangre	4.Pulmón	5.Bazo	6.Riñones	7.Corazón
%I.D.	0.57	0.13	0.20	0.17	0.05	0.04	0.63
SD	0.10	0.11	0.16	0.05	0.01	0.01	0.13

Gráfico de biodistribución de la radiactividad a las 24hs post inyección



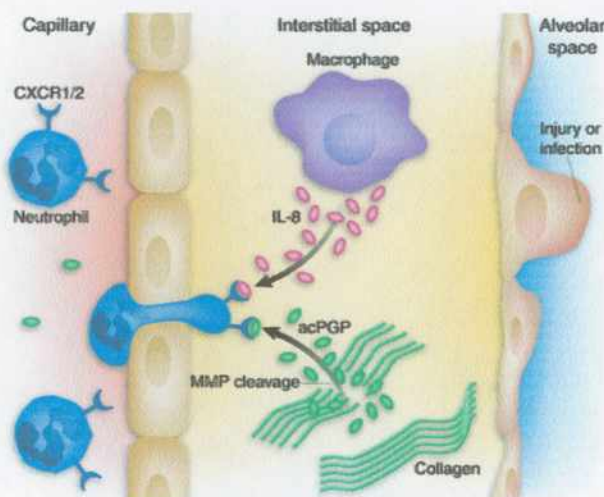
INTERLEUKINA-8

La IL-8 es una proteína pequeña (8.5 kDa), miembro de la familia CXC de las citoquinas quimiotácticas (citoquinas inflamatorias de bajo peso molecular), en cuales los dos primeros residuos de cisteína están separados por un residuo de aminoácido.



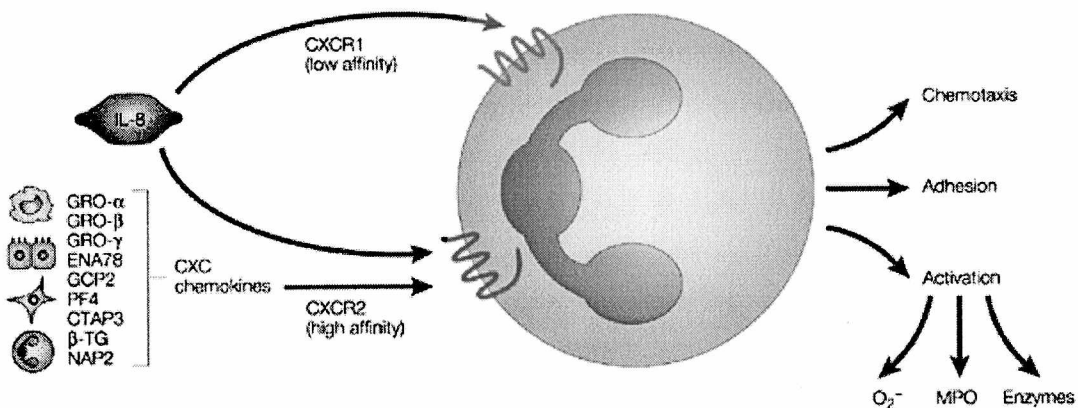
Mecanismo de acción

La IL-8 está involucrada en la activación y reclutamiento de neutrófilos al área de infección. La IL-8 ejerce además un gran número de actividades pro-inflamatorias. Produce degranulación de los neutrófilos, induce la expresión de moléculas de adhesión y favorece así la adherencia de los neutrófilos a las células endoteliales. Posee efecto comitogénico para los queratinocitos y actúa como factor autócrino en ciertos melanomas.(5)



Hay varios mecanismos de migración de la IL-8-^{99m}Tc propuestos, groseramente están divididos en: transporte unido a neutrófilo y transporte no unido a neutrófilo. El transporte unido a neutrófilo involucra la unión de la IL-8-^{99m}Tc con alta afinidad a los receptores de los neutrófilos periféricos, seguido de la migración de las células marcadas al tejido inflamado y pasaje al endotelio. El transporte no unido a neutrófilo involucra la circulación libre de la IL-8-^{99m}Tc, la cual extravasa y es posteriormente atrapada por los receptores de los neutrófilos infiltrados. Además se demostró que la IL-8-^{99m}Tc puede unirse en cierto grado a receptores de baja afinidad de glóbulos rojos. Esa unión a glóbulos rojos es reversible y se supone que la disociación de la IL-8-^{99m}Tc del sitio de unión en los glóbulos rojos se lleva a cabo en el sitio de inflamación donde la IL-8-^{99m}Tc es expuesta a numerosos sitios de unión de alta afinidad en neutrófilos. (12)

Los efectos biológicos de la IL-8 son desarrollados a través de receptores de superficie (IL-8R). En el humano han sido documentadas dos entidades las que se cree que surgieron por duplicación genética. Son miembros de los receptores de citoquinas acoplados a proteína G y poseen capacidad para unir su ligando específico con alta afinidad. Se une con alta afinidad al receptor CXC tipo I y II que están sobreexpresados en neutrófilos y monocitos (0.3-4 nM).

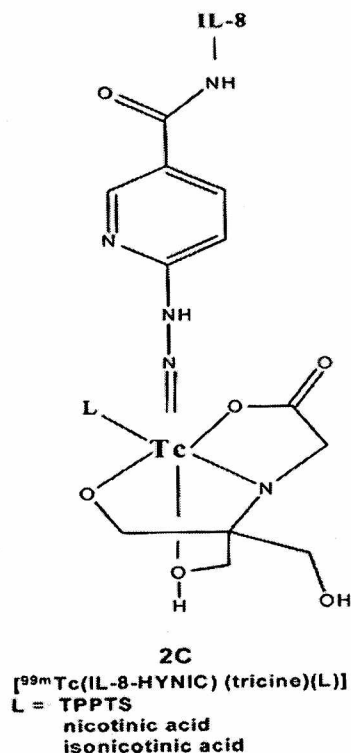


La interleukina 8 activa dos receptores: el de baja afinidad (CXCR1) que media la activación de neutrófilos, y el de alta afinidad (CXCR2), el cual media la quimiotáxis. Hay otras citoquinas CXC que también activan el CXCR2: CTAP3 (péptido activador del tejido conectivo III), ENA (proteína activadora de neutrófilos epiteliales), GCP2 (proteína quimiotáctica de granulocitos 2), GRO (oncoproteína relacionada con el crecimiento), NAP2 (péptido activador de neutrófilos 2), PF4 (factor activador de plaquetas 4), β -TG (β -tromboglobina). (13)

^{99m}Tc -HYNIC-IL-8 para detección de infección e inflamación

El ^{99m}Tc -HYNIC-IL-8 tiene excelentes características como agente para la detección centellográfica de infección e inflamación. La IL-8 puede ser marcada con ^{99m}Tc usando HYNIC como quelante preservando su capacidad de unión al receptor en leucocitos.

La marcación de proteínas con ^{99m}Tc usando como quelante HYNIC es fácil, rápida y eficiente y se pueden obtener preparaciones de alta actividad específica. Sin embargo, en caso de que los residuos de lisina, que son los involucrados en la conjugación con S-HYNIC, **sean críticos para la actividad biológica** las condiciones de conjugación deben ser ajustadas.



Rennen y cols. han realizado la optimización de la reacción de conjugación: han evaluado seis parámetros:

- La cantidad de HYNIC agregada a la mezcla de reacción.
- La forma en que la solución de HYNIC debe ser agregada a la preparación proteica (gota a gota, o único bolo).
- La temperatura de reacción
- El pH de la reacción
- La concentración de proteína
- El tiempo de reacción

El objetivo de este estudio fue caracterizar y optimizar la conjugación del HYNIC a las proteínas para obtener un conjugado que pueda ser marcado eficientemente con ^{99m}Tc .

Se concluyó que la eficiencia óptima de marcación puede ser obtenida sólo a expensas de la unión a receptor. Por otra parte, si la unión al receptor es preservada, la eficiencia de marcación será menor. Un cuidadoso balance de las condiciones de reacción dará como resultado una aceptable, aunque subóptima, eficiencia de marcación y unión a receptor.

(14)

En otro estudio realizado por estos investigadores se evaluó el efecto de la variación del coligando en las características *in vivo* del ^{99m}Tc -HYNIC-IL-8 en la detección de la inflamación. El ^{99m}Tc -HYNIC-IL-8 fue preparado usando 5 formulaciones de ligandos diferentes. Como resultado de esta investigación se obtuvo que las mejores características en las imágenes de infección fueron encontradas para las formulaciones que utilizaban ácido nicotínico/tricina como coligando, combinando una alta actividad específica y una alta estabilidad *in vitro*. Además demostró tener las características más favorables *in vivo* (una alta relación absceso/músculo y alta relación absceso/background). (15)

Como efecto adverso se observa neutropenia seguida de leucocitosis, pero aumentando la actividad específica de la preparación de IL-8 radiomarcada (en combinación con la preservación de la capacidad de unión al receptor del leucocito) puede reducirse la cantidad de material biológicamente activo que será administrado y de esta manera evitar estos efectos adversos. Por lo tanto, la disminución suave y transitoria de leucocitos y la ausencia de leucocitosis sugieren que ^{99m}Tc -HYNIC-IL-8 puede ser aplicado como un agente para imágenes clínicamente útil, sin efectos adversos significativos.

Los leucocitos radiomarcados todavía son considerados el método gold standard, pero la preparación consume mucho tiempo y tiene riesgos asociados a la manipulación de

sangre potencialmente contaminada. Por este motivo se requiere de un agente que sea tan efectivo como los leucocitos marcados, pero que su preparación sea más fácil y sin riesgos de contaminación.

Rennen y cols. han realizado un estudio con el propósito de comparar las imágenes obtenidas con ^{99m}Tc -HYNIC-IL-8 con las obtenidas con ^{99m}Tc -HMPAO-granulocito.

En este estudio se indujo químicamente una colitis aguda a conejos, y las lesiones inflamatorias fueron visualizadas centellográficamente después de la administración de IL-8 o granulocitos, ambos marcados con ^{99m}Tc .

Las siguientes son las imágenes centellográficas de conejos con colitis experimental a los 2min y 1, 2 y 4h post inyección de ^{99m}Tc -HMPAO-granulocitos, con la imagen del colon disecado separado (A). In vivo, la captación específica de intestino se observa hasta las 4h post inyección de ^{99m}Tc -HYNIC-IL-8 (B). (15)

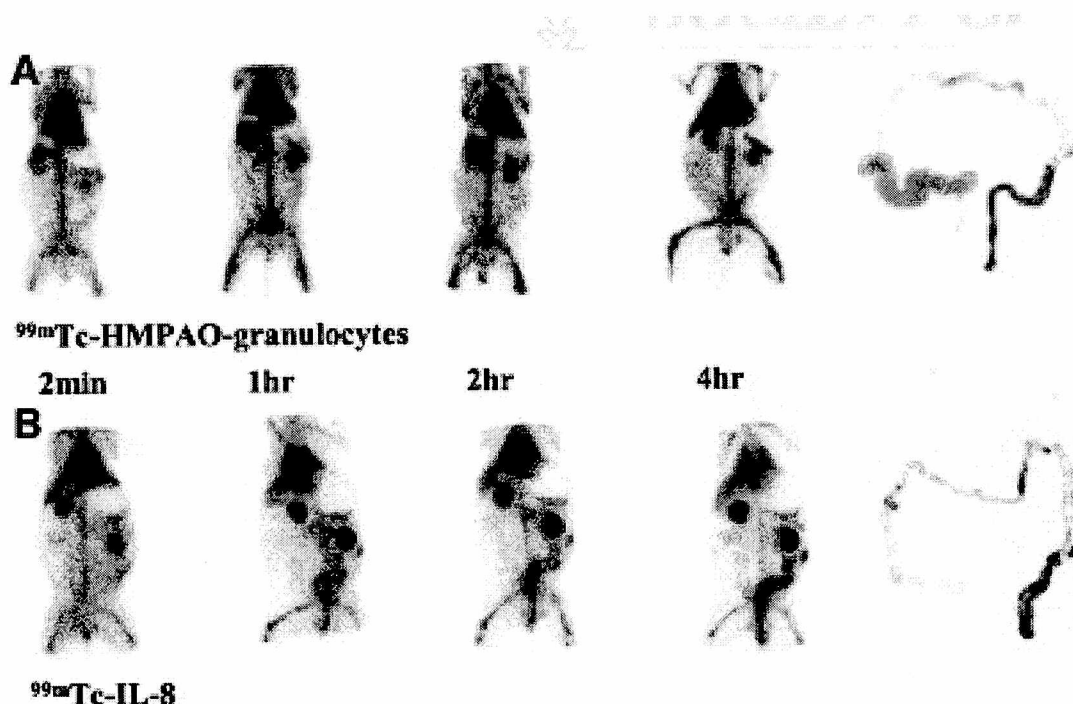


TABLE 1
Uptake of ^{99m}Tc -HYNIC-IL-8 and ^{99m}Tc -HMPAO-Granulocytes in Affected and Nonaffected Colonic Segments

Time	^{99m}Tc -HYNIC-IL-8		^{99m}Tc -HMPAO-granulocytes		P ¹
	Nonaffected* (%ID)	Affected (%ID)	Nonaffected* (%ID)	Affected (%ID)	
2 min	—	0.012 ± 0.003	—	0.010 ± 0.003	<0.7
1 h	—	0.034 ± 0.005	—	0.029 ± 0.003	<0.5
2 h	—	0.07 ± 0.017	—	0.021 ± 0.002	<0.03
4 h	—	0.06 ± 0.02	—	0.019 ± 0.006	<0.03

*No visual uptake.
¹Mann-Whitney test: ^{99m}Tc -HYNIC-IL-8 vs. ^{99m}Tc -HMPAO-granulocytes. Level of significance was set at $P < 0.05$.
Colonic uptake (%ID [mean ± SEM]) of both tracers is shown at different time points.

Como resultado se obtuvo que ambos agentes permitieron la visualización de la colitis dentro de la hora post inyección. Sin embargo, las imágenes de las anomalías del colon obtenidas con ^{99m}Tc -HYNIC-IL-8 fueron más precisas y la intensidad de captación en el colon afectado se incrementó continuamente hasta las 4hs post inyección, mientras que no se observó centellográficamente ese aumento luego de la hora post inyección para el ^{99m}Tc -HMPAO-granulocitos. Usando el ^{99m}Tc -HMPAO-granulocitos las imágenes fueron menos precisas porque la captación en el foco inflamatorio fue mucho menor a las 2hs y 4hs post inyección.

Los experimentos futuros con ^{99m}Tc para la marcación de IL-8 se centrarán en la mejora de la eficiencia de marcación sin compromiso de la capacidad de unión al receptor y localización de la infección del agente.

PERSPECTIVAS FUTURAS

La Técnica de HYNIC permitirá en el futuro marcar también radiofármacos para PET (tomografía por emisión de positrones) y otras biomoléculas de última generación.

Se han realizado múltiples estudios acerca de la marcación de varias biomoléculas con ^{99m}Tc usando como quelante HYNIC. Algunas de las moléculas estudiadas fueron los análogos de somatostatina. Los análogos de somatostatina marcados son herramientas importantes para la localización in vivo y la terapia radionucleídica dirigida de tumores neuroendocrinos con sobreexpresión de receptores de somatostatina. Uno de los radiofármacos más estudiados es el HYNIC-Tyr3-Octreotide- ^{99m}Tc (HYNIC-TOC).

Hynic-Toc es un radiofármaco que presenta características similares al ^{111}In Octreotide, accesible en tiempo y costo por estar marcado con ^{99m}Tc . Evalúa la presencia de receptores de somatostatina y permite identificar a aquellos pacientes susceptibles de ser tratados con análogos de la somatostatina fríos o marcados con emisores beta. (17)

Este radiofármaco fue comparado con otro análogo de somatostatina (el péptido RC-160) y marcado con distintos quelantes y los mejores resultados se obtuvieron con el conjugado de HYNIC-TOC marcando con tricina como coligando. Los resultados son alentadores y muestran un potencial uso de este último compuesto marcado en estudios de Medicina Nuclear. (18)

Hay un amplio espectro de péptidos radiomarcados con alta afinidad por receptores expresados en células tumorales están siendo evaluados preclínica y clínicamente para poder obtener imágenes centellográficas y poder realizar una terapia radionucleídica.

Otra biomolécula que está siendo estudiada es la Colecistokinina-8 (CCK-8). La colecistokinina y los péptidos derivados de la gastrina marcados pueden ser potencialmente usados para terapia radionucleídica que utiliza péptidos que se unen a receptores expresados en los tumores (peptide receptor radionuclide therapy ,PRRT).

Recientemente, se ha demostrado que receptor CCK2i4svR se expresa constitutivamente en cáncer colorectal humano y en cáncer pancreático, pero no en tejido normal.

Se ha demostrado que el CCK2i4svR es un potencial blanco para PRRT usando el péptido CCK-8 sulfatado radiomarcado y análogos de gastrina. (19)

Se demostró que los análogos de CCK-8 pueden ser marcados eficientemente con ^{99m}Tc usando como quelante HYNIC y ácido nicotínico/tricina como coligandos sin comprometer la unión al receptor. Por lo tanto, más estudios están siendo llevados a cabo para investigar el posible uso del ^{99m}Tc -CCK-8s (sulfatado) para la obtención de imágenes centellográficas de tumores con sobreexpresión de receptores de CCK-8 en humanos. (20)

En los últimos años se ha demostrado que el HYNIC marcado con ^{99m}Tc y conjugado con el MB67 antagonista del LTB4 (leucotrieno B4) permite visualizar focos infecciosos en conejos adecuadamente y a las pocas horas de inyección. Recientemente el conjugado HYNIC-MB67 antagonista de LTB4 (análogo de MB81) ha sido marcado con ^{18}F vía formación de hidrazona y evaluada *in vivo*. Los resultados obtenidos demostraron que este radiofármaco puede ser utilizado eficientemente para el diagnóstico de procesos infecciosos a través del PET. (21)

La obtención de imágenes mediante el PET tienen un interés particular debido a su alta resolución espacial. Esta resolución espacial alta es importante, por ejemplo cuando es crucial discriminar entre infección en tejidos blandos y la infección en huesos en casos de osteomielitis.

ANEXO I

RADIOFÁRMACOS	USO	MARCACIÓN	ESTABILIDAD DEL PRODUCTO MARCADO	CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO MARCADO	ADVERTENCIAS
Macroagregados de albúmina humana	Estudios pulmonares	Agregar la actividad requerida en 2ml de solución fisiológica . Agitar 1 minuto. Uniformar tamaños de partículas pasándolos a una jeringa estéril con aguja de 0.50x16mm. Actividad máxima 20 mCi	30 minutos	Volumen final: 2ml Actividad/dosis: 5-10mCi N° de dosis/frasco: 2-3 (paciente adultos)	Todas las operaciones se deben realizar en forma aséptica y sin ingreso de aire.
Gluconato	Estudios renales	Agregar la actividad requerida en un volumen no mayor a 5 ml. Agitar 1 minuto. Actividad máxima 20mCi	Inyectar en forma inmediata	Volumen final:5ml Actividad/dosis: 10mCi N° dosis/frasco: 2	Idem al anterior. No usar en el caso en que la solución aparezca coloreada o tenga partículas en suspensión
DMSA	Estudios renales	Agregar la actividad en un volumen aproximado de 2ml. Agitar 1 minuto, incubar 30 minutos a T ambiente. Actividad máxima 20 mCi	3 horas. No debe estar en presencia de luz.	Volumen final: 2 ml. Actividad/dosis: 5-10 mCi N° dosis/frasco: 1-3	
DTPA	Estudios cerebrales, renales, pulmonares	Agregar la actividad de ^{99m} Tc en un volumen no mayor de 7 mCi Agitar 1 minuto.	6 horas	Volumen final: 7ml. Actividad/dosis: <ul style="list-style-type: none"> • para flujo renal y radiorenograma: 8-10 mCi • para estudios estáticos: 3-5 mCi • pulmonares: 40mCi • cerebrales: 15mCi N° dosis/frasco: 2	No debe ingresar oxígeno. Todas las operaciones deben realizarse en forma aséptica. No utilizar si la solución es coloreada o con partículas

Pirofosfato	1- Estudios óseo e infarto de miocardio.	1- Agregar la actividad en 2-3 ml de solución fisiológica.	30 minutos	V. final: 2-3 ml Actividad/dosis: 30mCi N° dosis/frasco: 4	No debe ingresar oxígeno. Todas las operaciones deben realizarse en forma aséptica. No utilizar si la solución es coloreada o con partículas
	2- Estudios circulatorios o pool sanguíneo	2- Técnica "in vivo" a) Agregar al frasco 2ml de solución fisiológica. Agitar. Inyectar inmediatamente. b) A los 20 minutos, inyectar la actividad de Tc en 1-1,5 ml	Iniciar el estudio después de inyectar	V. final: 2-3 ml Actividad/dosis: 25mCi N° dosis/frasco: 2	
Sulfuro de antimonio	Estudios hepatoesplénicos y linfografías	a) A 5ml de coloide se le agrega la actividad requerida en un volumen de 2,5 ml. Actividad máxima 40mCi b) Se coloca a baño maría durante 30 minutos. c) Se deja enfriar y se le agrega 1ml de solución de acetato de sodio 10% (ampolla). Respetar la relación 2:1 entre volumen de coloide y ^{99m} Tc	4 horas	Volumen final: 8,5 ml (máximo) Actividad/dosis: 5 -10 mCi N° dosis/frasco: ≈ 8 dosis Para linfografías: 300 -500 uCi en 0,3 a 0,5 ml	No ingresar oxígeno. No utilizar si aparecen partículas en suspensión.
Fitato	Estudios hepáticos	Agregar la actividad de Tc en un volumen no mayor de 5ml. Actividad máxima: 20 mCi Agitar 1 minuto.	4 horas	Volumen final: menor o igual 5ml Actividad/dosis: 5 mCi N° dosis/frasco: 2	No ingresar oxígeno. No utilizar si aparecen partículas en suspensión. El fitato debe ser incoloro
MDP	Estudios óseos	Agregar la actividad en un volumen de 3-4 ml de solución fisiológica. Actividad máxima 150 mCi. Agitar 1 minuto.	6 horas	Volumen final: 3-4 ml Actividad/dosis: 30mCi N° dosis/frasco: 4	- No usar si el producto aparece coloreado - No ingresar oxígeno Realizar todas la operaciones en forma aséptica.

HDP hidroxietildifosf onato	Estudios óseos	Agregar la actividad en un volumen de 3-4 ml de solución fisiológica. Agitar 1 minuto. Actividad máxima: monodosis 100mCi - multidosis :400mCi	6 horas	Vol. Final: 3-4 ml Actividad/dosis: 30mCi N° dosis/frasco: monodosis 3; multidosis 12-15	- No usar si el producto aparece coloreado - No ingresar oxígeno - Realizar todas la operaciones en forma aséptica. El tiempo de fijación al hueso es menor que con MDP y la relación <u>Hueso tumoral</u> hueso normal es > que con MDP
MIBI Sestamibi	Perfusión miocárdica. Viabilidad tumoral.	Agregar la actividad en un volumen de 3 ml de solución fisiológica. Agitar 1 minuto y calentar a baño María 20 minutos T°C 100 o en microondas según la potencia para lograr un calentamiento equivalente. Actividad máxima: si es monodosis o multidosis variará de 150 mCi a 800mCi	6 horas	Volumne final: 3 ml Actividad/dosis: 1° etapa: 5mCi 2° etapa: 10mCi Gatillado: 1° etapa: 10mCi 2° etapa: 25 mCi	- No usar si el producto aparece coloreado o turbio - No ingresar oxígeno - Realizar todas la operaciones en forma aséptica.
ECD Etilcisteina	Perfusión cerebral	Agregar la actividad de ^{99m} Tc en un medio buffer de pH superior a 6. Reconstituir el liofilizado con 3 ml de sc. Fisiológica e inmediatamente mezclar 1 ml de esta solución con el ^{99m} Tc. Incubar 15 minutos a T ambiente, protegido de la luz. Actividad máxima 60 mCi.	18 horas	Vol. Final: 5ml. Actividad/dosis: 30 mCi	- No usar si el producto aparece coloreado o turbio - No ingresar oxígeno - Realizar todas la operaciones en forma aséptica.

HIDA Derivados del iminodiacético	Centellogra- fías de vías bilíares	Agregar la actividad ^{99m} Tc en un volumen de 3-5 ml. Disolver sin agitar para no formar espuma. Reposar 10 minutos a T ambiente. Actividad máxima: 100mCi	6 horas	Volumen final: 5 ml Actividad/dosis: 5- 10 mCi	- No usar si el producto aparece coloreado o turbio - No ingresar oxígeno - Realizar todas la operaciones en forma aséptica.
MAG 3 Mercaptoacetil triglicina	Función renal	Agregar 2-4 ml de ^{99m} Tc. Agitar. Según el productor se agrega o no 2 ml de aire esteril. Se incuba 15 minutos en baño María a ebullición. Actividad máxima 20 mCi	4-6 horas	Vol. Final: 1-5 ml Actividad/dosis: según tipo de estudio 1-15 mCi	- No usar si el producto aparece coloreado o turbio - No ingresar oxígeno - Realizar todas la operaciones en forma aséptica. El aire se inyecta después que el ^{99m} Tc y a través de un filtro de 0,22 um de poro

ANEXO II

PRÁCTICAS

PRÁCTICA 1. MARCACIÓN DE PIROFOSFATO

- **Fórmula cuali-cuantitativa:** cada frasco de reacción contiene:

Pirofosfato de Sodio Decahidratado.....	20.00 mg
Cloruro estañoso dihidratado	5.00 mg
Manitol.....	20.00 mg

- **Indicaciones:** evaluación de trastornos circulatorios y fallas de perfusión especialmente en aquellos cambios de la dinámica cardíaca.

- **Método de marcación:**

1) Quitar el precinto de seguridad del vial de Tin-Tec®. Sanitizar con un algodón embebido en alcohol el área del tapón de goma butilo que queda expuesta al retirar la protección de plástico. Colocar el vial dentro de un contenedor de plomo de 6mm de espesor en todas sus dimensiones.

2) Obtener de un generador de $^{99m}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ 3 mL de solución estéril, apirógena y libre de sustancias oxidantes de TcO_4^- con una actividad máxima de 740 GBq (20 mCi).

3) Adicionar al vial de Tin-Tec® 3 mL de solución fisiológica, apirógeno para reconstituir el polvo liofilizado cuidando de no burbujear aire dentro de la solución.

4) Examinar visualmente, a través de un vidrio plomado, el contenido del vial de reacción garantizando total disolución del liofilizado.

5) Administrar vía intravenosa 2 mL de la solución inyectable no radiactiva del Tin-Tec®.

6) Dejar transcurrir 15 minutos de administrar vía intravenosa los 740 MBq (20 mCi) de solución estéril y apirógeno de pertecneiato de sodio ($^{99m}\text{TcO}_4^-$).

➤ **Control de calidad**

Determinación de pureza radioquímica:

Soporte	ITLC-SG	ITLC-SG
Solvente	MEC o acetona	NaCl 0,9%
Rf ^{99m}Tc -Pirofosfato	0,0	0,9-1,0
Rf $^{99m}\text{TcO}_4^-$	0,9-1,0	0,9-1,0
Rf ^{99m}Tc -reducido-hidrolizado	0,0	0,0

La Pureza Radioquímica deberá ser mayor de 90 %.

Resultados de la cromatografía:

NaCl 0,9%: Siembra = 0.00 μCi

Frente = 3.38 μCi

MEC: Siembra = 1.68 μCi

Frente = 0.00 μCi

Porcentaje de TcO_4^- : 0%

Porcentaje de ^{99m}Tc -reducido-hidrolizado (Coloide): 0%

Porcentaje de Pirofosfato marcado (^{99m}Tc -pirofosfato): 100.%

Rendimiento de marcación: 100%

PRÁCTICA 2. MARCACIÓN DE DTPA

- **Fórmula cuali-cuantitativa:** cada frasco de reacción contiene:

Ácido dietilentriaminopentaacético.....1.67 mg/mL

Cloruro estañoso dihidratado.....0.08 mg/mL

- **Indicaciones:** evaluación y diagnóstico de la perfusión y función renal, hidronefrosis, obstrucción, cuantificación de la función renal por separado, determinación de la filtración glomerular y obtención de imágenes cerebrales.

- **Método de marcación:**

1) Quitar el precinto de seguridad del vial de Nefro-Tec®. Sanitizar con un algodón embebido en alcohol el área del tapón de goma butilo que queda expuesta al retirar la protección de plástico. Colocar el vial dentro de un contenedor de plomo de 6mm de espesor en todas sus dimensiones.

2) Obtener de un generador de $^{99m}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ 3 mL de solución estéril, apirógena y libre de sustancias oxidantes de TcO_4^- con una actividad máxima de 3700 GBq (100 mCi).

3) Adicionar al vial de Nefro-Tec® que se encuentra en un contenedor de plomo 750 GBq (20 mCi) de solución de NaTcO_4 (^{99m}Tc) y reconstituir el liofilizado cuidando de no burbujear aire dentro de la solución.

4) Examinar visualmente, a través de un vidrio plomado, el contenido del vial de reacción.

- **Control de calidad**

Determinación de pureza radioquímica:

Soporte	ITLC-SG	ITLC-SG
Solvente	MEC o acetona	NaCl 0,9%
Rf ^{99m}Tc -DTPA	0,0	0,9-1,0
Rf $^{99m}\text{TcO}_4^-$	0,9-1,0	0,9-1,0
Rf ^{99m}Tc -reducido-hidrolizado	0,0	0,0

La Pureza Radioquímica deberá ser mayor de 90 %.

Resultados de la cromatografía:

NaCl 0,9%: Siembra = 0.29 μ Ci

Frente = 2.85 μ Ci

MEC: Siembra = 2.94 μ Ci

Frente = 0.29 μ Ci

Porcentaje de TcO_4^- : 9%

Porcentaje de ^{99m}Tc -reducido-hidrolizado (Coloide): 9%

Porcentaje de DTPA marcado (^{99m}Tc -DTPA): 82%

Rendimiento de marcación: 82%

PRÁCTICA 3. MARCACIÓN MDP

- **Fórmula cuali-cuantitativa:** cada frasco de reacción contiene:

Medronato.....10.00 mg

Cloruro estañoso dihidratado.....1.00 mg

Manitol.....20.00 mg

- **Indicaciones:** para la realización de estudios diagnósticos del esqueleto y la obtención de imágenes que demuestren la posible existencia de áreas con procesos osteogénicos alterados en pacientes adultos y/o pediátricos; como tumores óseos primarios y secundarios, infecciones, enfermedad ósea de origen metabólico, traumatismos, fracturas por estrés, entre otros.

- **Método de marcación:**

1) Quitar el precinto de seguridad del vial de Nefro-Tec®. Sanitizar con un algodón embebido en alcohol el área del tapón de goma butilo que queda expuesta al retirar la protección de plástico. Colocar el vial dentro de un contenedor de plomo de 6mm de espesor en todas sus dimensiones.

2) Obtener de un generador de $^{99m}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ 3 mL de solución estéril, apirógena y libre de sustancias oxidantes de TcO_4^- con marcación con, no más, de 5550 MBq (150 mCi).

3) Adicionar la solución radiactiva al vial y agitar durante un minuto. Examinar visualmente, a través de un vidrio plomado, el contenido del vial de reacción constatando la total disolución del liofilizado, ausencia de partículas y coloración.

4) Dejar 5 minutos a temperatura ambiente.

➤ **Control de calidad**

Determinación de pureza radioquímica:

Soporte	ITLC-SG	ITLC-SG
Solvente	MEC o acetona	NaCl 0,9%
Rf ^{99m}Tc -MDP	0,0	0,9-1,0
Rf $^{99m}\text{TcO}_4^-$	0,9-1,0	0,9-1,0
Rf ^{99m}Tc -reducido-hidrolizado	0,0	0,0

La Pureza Radioquímica deberá ser mayor de 90 %.

Resultados de la cromatografía:

NaCl 0,9%: Siembra = 0.00 μCi

Frente = 3.02 μCi

MEC: Siembra = 2.33 μCi

Frente = 0.00 μCi

Porcentaje de TcO_4^- : 0%

Porcentaje de ^{99m}Tc -reducido-hidrolizado (Coloide): 0%

Porcentaje de MDP marcado (^{99m}Tc -MDP): 100.%

Rendimiento de marcación: 100%

PRÁCTICA 4. MARCACIÓN DE SULFURO DE ANTIMONIO

- **Fórmula cuali-cuantitativa:** cada frasco de reacción contiene:

Vial A

DENOMINACIÓN	CANTIDAD POR VIAL	FUNCIÓN
Sulfuro de Antimonio 1%	2.70 Ml	Principio Activo
Polivinilpirrolidona	0.30 mL	Estabilizador

Vial B

DENOMINACIÓN	CANTIDAD POR VIAL	FUNCIÓN
Acetato de Sodio 10%	1.00 mL	Buffer

- **Indicaciones:** para la evaluación de patologías hepáticas y exploración de Ganglio Centinela “*in vivo*”.

➤ **Método de marcación:**

1) Quitar el precinto de seguridad del vial A. Sanitizar con un algodón embebido en alcohol el área del tapón de goma butilo que queda expuesta al retirar la protección de plástico. Colocar el vial dentro de un contenedor de plomo de 6mm de espesor en todas sus dimensiones.

2) Obtener de un generador de $^{99m}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ 3 mL de solución estéril, apirógena y libre de sustancias oxidantes de TcO_4^- con marcación con, no más, de 5550 MBq (150 mCi).

3) Determinar en un calibrador de dosis, la actividad del eluido calculando la concentración de actividad (MBq/ml o mCi/ml).

- 4) Utilizando una aguja estéril y apirógena colocada dentro de un protector plomado retirar el volumen de solución de pertecnecio de sodio ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) necesario para marcar la solución del vial A. Agitar durante un minuto.
- 5) Transportar la jeringa y el contenedor de plomo con el vial A tras el vidrio plomado que también se encuentra en el área limpia.
- 6) Adicionar dentro del vial A la solución de pertecnecio de sodio ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) cuidando de igualar la presión interna y externa del vial cuando se adiciona.
- 7) Preparar un baño de agua y calentarlo hasta ebullición.
- 8) Colocar dentro del mismo el vial A y dejarlo durante 20 minutos manteniendo la temperatura constante. El vial debe tener, en su tapón de goma, una aguja estéril y apirógena de 21G que permitirá la eliminación de la presión interna que se genere por el calentamiento de la solución radioactiva.
- 9) Cumplido el tiempo retirarla del baño de agua y dejarla enfriar durante 5 minutos.
- 10) Con una aguja estéril y apirógena obtener 0.6 mL de la solución contenida en el vial B.
- 11) Adicionarlos dentro del vial A.
- 12) Con una aguja estéril y apirógena colocada dentro de un protector plomado tomar una alícuota de la solución para determinar su pureza radioquímica, que debe ser superior al 90%.

➤ **Control de calidad**

Determinación de pureza radioquímica:

Soporte	ITLC - SG
Solvente	MEC
Rf ^{99m}Tc Sulfuro antimonio	0,0
Rf $^{99m}\text{TcO}_4^-$	0,9-1,0
Rf ^{99m}Tc -reducido-hidrolizado	0,0

La Pureza Radioquímica deberá ser mayor de 90 %.

Resultados de la cromatografía:

MEC: Siembra = 17.70 μ Ci

Frente = 9.70 μ Ci

Porcentaje de TcO_4^- : 35%

Porcentaje de Sulfuro de Antimonio marcado ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pirofosfato) + coloide: 65%

PRÁCTICA 5. MARCACIÓN DE MACROAGREGADOS DE ALBÚMINA (MAA)

- **Fórmula cuali-cuantitativa:** cada frasco de reacción contiene:

Albúmina como Macroagregados	2.00 mg
Acetato de Sodio	10.00 mg
Cloruro Estannoso Dihidratado	0.50 mg
Tween 80.....	1.50 mg
Manitol.....	20.00 mg

- **Indicaciones:** para la evaluación del estado de perfusión pulmonar.

- **Método de marcación:**

1) Quitar el precinto de seguridad del vial. Sanitizar con un algodón embebido en alcohol el área del tapón de goma butilo que queda expuesta al retirar la protección de plástico. Colocar el vial dentro de un contenedor de plomo de 6mm de espesor en todas sus dimensiones.

2) Obtener de un generador de $^{99m}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ 3-5 mL de solución estéril, apirógena y libre de sustancias oxidantes de TcO_4^- con una actividad entre 111-1184 MBq (3-32 mCi).

3) Adicionar la solución radiactiva al vial que se encuentra en un contenedor de plomo y reconstituir el polvo liofilizado cuidando de no burbujear aire dentro de la solución. Agitar.

4) Examinar visualmente, a través de un vidrio plomado, el contenido del vial de reacción garantizando total disolución del liofilizado.

5) Tomar con una jeringa de 1.0 ml provista de aguja tipo insulina, el volumen correspondiente a la actividad a administrar y pasarlo varias veces entre el vial y la jeringa logrando una total homogeneización de los macroagregados de albúmina.

➤ **Control de calidad**

Determinación de pureza radioquímica:

Soporte	ITLC-SG
Solvente	MEC
Rf ^{99m}Tc -MAA	0,0
Rf $^{99m}\text{TcO}_4^-$	0,9-1,0
Rf ^{99m}Tc -reducido-hidrolizado	0,0

Resultados de la cromatografía:

MEC: Siembra = 61.70 μCi

Frente = 3.10 μCi

Porcentaje de TcO_4^- : 5%

Porcentaje MAA marcado (^{99m}Tc -MAA) + coloide: 95%

PRÁCTICA 6. MARCACIÓN DE IDA

- **Fórmula cuali-cuantitativa:** cada frasco de reacción contiene:

Trimetil-IDA.....21.40 mg
Cloruro Estannoso Dihidratado0.17 mg

- **Indicaciones:** para el diagnóstico y evaluación de diversas patologías hepatobiliares.

- **Método de marcación:**

1) Quitar el precinto de seguridad del vial. Sanitizar con un algodón embebido en alcohol el área del tapón de goma butilo que queda expuesta al retirar la protección de plástico. Colocar el vial dentro de un contenedor de plomo de 6mm de espesor en todas sus dimensiones.

2) Obtener de un generador de $^{99m}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ 3-5 mL de solución estéril, apirógena y libre de sustancias oxidantes de TcO_4^- con una actividad total de 3700 MBq (100 mCi).

3) Adicionar la solución radiactiva al vial y agitar durante un minuto.

4) Examinar visualmente, a través de un vidrio plomado, el contenido del vial de reacción garantizando total disolución del liofilizado.

- **Control de calidad**

Determinación de pureza radioquímica:

Soporte	ITLC-SG	ITLC-SG
Solvente	MEC	NaCl 0,9%
Rf ^{99m}Tc -trimetil IDA	0,0	1,0
Rf $^{99m}\text{TcO}_4^-$	0,9-1,0	0,9-1,0
Rf ^{99m}Tc -reducido-hidrolizado	0,0	0,0

Resultados de la cromatografía:

NaCl 0,9%: Siembra = 10.9 μ Ci

Frente = 24.7 μ Ci

MEC: Siembra = 10.5 μ Ci

Frente = 100 μ Ci

Porcentaje de TcO_4^- : 90%

Porcentaje de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -reducido-hidrolizado (Coloide): 31%

Porcentaje de trimetil IDA marcado ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -trimetil IDA): 0%

Rendimiento de marcación: 0%

PRÁCTICA 7. TEST DE ENDOTOXINAS (LAL)

Se realizó el test de endotoxinas bacterianas al liofilizado de DTPA.

➤ Pasos:

1) Precalentar la incubadora (baño seco o húmedo) hasta $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Verificar la temperatura usando un termómetro

2) Colocar la muestra en un recipiente libre de pirógenos.

Precaución:

- algunas jeringas contienen siliconas, las cuales pueden inhibir el test, cuidar que la muestra no sea retenida durante largo tiempo.

- Tener cuidado de no contaminar la muestra con los dedos, instrumentos, por estornudos, etc.

3) Usar un marcador indeleble para identificar los tubos para muestra (TM) y el tubo con control positivo (TCP).

Evitar marcar por encima de las líneas de 0.5ml y 0.25ml.

4) Remover y descartar el tapón de un tubo TM (tubo para muestra con tapa azul) y uno de un TCP (tubo con control positivo con tapa roja). No tocar el borde de los tubos mientras se remueven los tapones.

5) Abrir una pipeta estéril sin contaminar la punta o el cuello de la misma.

6) Tomar de la muestra (agua/dializado) hasta 0.5 ml (localizada cerca del centro de la pipeta) y transferir al tubo TM .

No dejar que la pipeta toque el tubo, pues se usará en el paso 8.

7) Mezclar suavemente el contenido del tubo golpeando ligeramente en la parte inferior varias veces con el dedo. El contenido del tubo debería disolverse completamente dentro de 20-60 segundos.

8) Usando la misma pipeta, tomar 0.25ml de líquido del tubo TM y transferirlos al tubo TCP. Descartar la pipeta.

9) Mezclar suavemente el contenido del tubo TCP golpeando ligeramente en la parte inferior varias veces con el dedo (60 segundos).

10) Inmediatamente colocar los dos tubos en la incubadora. Incubar a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por la cantidad de tiempo indicada en el Certificado de Cumplimiento que está incluido en el kit.

Nota: el tiempo de incubación varía para cada lote. Nuestro lote estaba especificado el tiempo de incubación por 25 minutos.

11) Cuando se cumple el tiempo, retirar rápida y cuidadosamente ambos tubos de la incubadora. Suavemente invertir los tubos hasta que se confirma la ausencia de un gel-coágulo sólido. No se deben agitar los tubos cuando se está leyendo el test. Si se forma el coágulo sólido el resultado es positivo (+). Si no se forma, por ejemplo la mezcla permanece líquida o el coágulo se rompe, el resultado es negativo (-)

PPC (control positivo del producto) debe tener el tubo un coágulo. Si no tiene la prueba no es válida. Hay que repetir la prueba.

TCP (Muestra) del tubo no debe tener coágulo. Un resultado negativo significa que tiene menos de 0,25 EU / mL de endotoxina. Si el SPL tiene la formación de coágulos, la muestra está contaminada y no debe usar el agua o el dializado, ni mucho menos inyectarlo a ningún paciente.

➤ **Resultados:**

En el tubo TM (donde estaba el liofilizado del DTPA que se quería evaluar) no se observó presencia del coágulo.

Se ha observado coágulo en el tubo TCP, con lo cual el test no se invalida. Dado que el control positivo ha dado correctamente, se puede asegurar que no hay presencia de pirógenos en el liofilizado de DTPA.

PRÁCTICA 8. MARCACIÓN DE ECD

- **Fórmula cuali-cuantitativa:** cada frasco de reacción contiene:

Vial A

Diester N,N'(1,2 etanodiil) bis-L-cisteina (ECD).....0.9 mg

Cloruro estannoso dihidratado.....0.075 mg

Acido etilendiaminotetraacetico.....0.36 mg

Manitol.....24.0 mg

Vial B

Solución buffer fosfato 0.019M, pH 7.8.....1.0 ml

- **Indicaciones:** Se utiliza para el diagnóstico vascular de alteraciones cerebrales.

- **Método de marcación:**

- 1) Quitar el precinto de seguridad del vial A y del vial B. Sanitizar con un algodón embebido en alcohol el área del tapón de goma butilo que queda expuesta al retirar la protección de plástico.
- 2) Colocar un vial A y un vial B dentro de un contenedor de plomo de 6 mm de espesor en todas sus dimensiones.
- 3) Determinar en un calibrador de dosis, la actividad del eluido calculando la concentración de actividad (MBq/ml o mCi/ml).
- 4) Utilizando una aguja estéril y apirógena colocada dentro de un protector plomado retirar el volumen de solución de pertecneciato de sodio ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) necesario.
- 5) Utilizando una jeringa estéril y apirógena obtener 1.0 ml de solución fisiológica estéril y apirógena.
- 6) Transportar ambas jeringas y los contenedores de plomo con los viales A y B tras el vidrio plomado que también se encuentra en el área limpia.

- 7) Adicionar dentro del vial B la solución de pertecneciato de sodio ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) cuidando de igualar la presión interna y externa del vial cuando se adiciona. La actividad máxima a utilizar es de 1110 MBq (30 mCi) en un volumen máximo de 0.5 ml.
- 8) Adicionar inmediatamente el mililitro de solución fisiológica dentro del vial A reconstituyendo el polvo liofilizado. Agitar durante un minuto.
- 9) inmediatamente adicionar, dentro del vial B, el mililitro de solución del vial A.
- 10) dejar reaccionar durante 45 minutos protegido de la luz.
- 11) con una aguja estéril y apirógena colocada dentro de un protector plomado tomar una alícuota de la solución para determinar su pureza radioquímica.

➤ **Control de calidad**

Cromatografía extractiva:

En un tubo se colocan cantidades iguales de cloroformo y solución fisiológica (ej, 3 ml de cloroformo y 3 ml de solución fisiológica). Dado que este radiofármaco es lipofílico se concentrará en la fase clorofórmica (que por tener mayor densidad se encuentra abajo). El TcO_4^- libre y el coloide, por ser hidrofílicos, quedarán en la fase acuosa (arriba) y esta cantidad no deberá ser mayor al 10%.

Resultados:

Total de actividad	Solución Fisiológica	Cloroformo
580	110	470

Porcentaje de coloide + TcO_4^- : 19%

Porcentaje de ECD marcado (^{99m}Tc -ECD): 81.%

Rendimiento de marcación: 81%

PRÁCTICA 9. MARCACIÓN DE MIBI

➤ **Fórmula cuali-cuantitativa:** cada frasco de reacción contiene:

Tetraís (2-metoxi isobutil isonitrilo) cobre (I) tetrafluorborato.....	0.25 mg
Cloruro estañoso dihidratado.....	0.18 mg
Citrato de sodio.....	0.65 mg
Hidrocloruro de L-cisteína.....	0.25 mg
Manitol.....	10.0 mg

➤ **Indicaciones:** evaluación y diagnóstico de la perfusión cardiaca, permitiendo diferenciar el miocardio normal del anormal y al mismo tiempo diferenciar zonas patológicas en pacientes con antecedentes o sospechas de antecedentes de infartos miocárdicos. Es también utilizado para la función miocárdica empleando para ello la técnica del primer pasaje.

➤ **Método de marcación:**

1) Quitar el precinto de seguridad del vial de MIBI. Sanitizar con un algodón embebido en alcohol el área del tapón de goma butilo que queda expuesta al retirar la protección de plástico. Colocar el vial dentro de un contenedor de plomo de 6mm de espesor en todas sus dimensiones.

2) Obtener de un generador de $^{99m}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ de 2 a 5 mL de solución estéril, apirógena y libre de sustancias oxidantes de TcO_4^- con una actividad máxima de 5550 GBq (150 mCi).

3) Adicionar al vial de MIBI el volumen necesario para su marcación. de solución de NaTcO_4 (^{99m}Tc) y reconstituir el liofilizado cuidando de no burbujear aire dentro de la solución.

4) Agitar por 60 segundos.

5) Colocar en baño de agua por 15 minutos.

- 6) Retirar y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- 7) Examinar visualmente, a través de un vidrio plomado, el contenido del vial de reacción.
- 8) Determinar su pureza radioquímica.

➤ **Control de calidad**

Cromatografía extractiva:

En un tubo se colocan cantidades iguales de cloroformo y solución fisiológica (ej, 3 ml de cloroformo y 3 ml de solución fisiológica). Dado que este radiofármaco es lipofílico se concentrará en la fase clorofórmica (que por tener mayor densidad se encuentra abajo). El TcO_4^- libre y el coloide, por ser hidrofílicos quedarán en la fase acuosa (arriba) y esta cantidad no deberá ser mayor al 10%.

Resultados:

Total	Suero Fisiológico	Cloroformo
477 μCi	100 μCi	377 μCi

Porcentaje de coloide + TcO_4^- : 21%

Porcentaje de MIBI marcado ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI): 79.%

Rendimiento de marcación: 79%

PRÁCTICA 10. MARCACIÓN DE GLÓBULOS ROJOS

Pirofosfato de sodio

- **Fórmula cuali-cuantitativa:** cada frasco de reacción contiene:

Pirofosfato de sodio decahidratado20.0 mg
Cloruro estannoso dihidratado5.0 mg
Manitol20.0 mg

- **Indicaciones:** Se utiliza para el diagnóstico y evaluación de desordenes circulatorios y fallas de perfusión especialmente cuando existen cambios en la dinámica cardiaca.

- **Método de marcación (*in vitro*)**

- 1) Se coloca en un frasco de Cl_2Sn (pirofosfato) 15 ml de sangre del paciente con 1,5 ml de ACD (ácido cítrico dextrosa).
- 3) En un frasco estéril se colocan 35-40 mCi de TcO_4^- + 1ml de EDTA 2.2% estéril.
- 4) Sobre esto se agrega la sangre extraída cuyos glóbulos rojos están sensibilizados.
- 5) Se realiza un lavado con 3-5 ml de solución fisiológica después de centrifugar 10 min a 700g.

- **Resultados de la marcación de glóbulos rojos *in vitro***

Total de actividad	Líquido sobrenadante	Glóbulos Rojos
8.02 mCi	0.27 mCi	7.75 mCi

Porcentaje de TcO_4^- : 0%

Porcentaje de Glóbulos rojos marcados ($^{99\text{m}}\text{Tc}$): 100%

PRÁCTICA 11: MARCACIÓN DE IgG-HYNIC (Radiofármaco preparado “in house”)

Nota: se utiliza un conjugado IgG-HYNIC ya preparado y congelado.

- **Indicaciones:** se utiliza para estudios de inflamación/infección.

- **Método de marcación:**

Preparación del vial Sn-tricina:

- 1) Pesar en tres viales estériles 100 mg de tricina, 10 mg de SnSO₄ y 0.6 g de NaOH.
- 2) Solubilizar la tricina en 8 ml de agua destilada.
- 3) Remover el oxígeno de la solución con nitrógeno.
- 4) Agregar 0.5 ml de una solución 2M de HCl para acidificar la solución.
- 5) Solubilizar el sulfato de estaño en 0.5 ml de HCl y agregar la solución de SnSO₄ a la solución de tricina.
- 6) Solubilizar el NaOH en 3ml de agua destilada.
- 7) Agregar porciones pequeñas (20-50 µl) de la solución de NaOH para ajustar el pH a pH = 5.5.
- 8) Ajustar el volumen total de la solución a 10 ml con NaCl 0.9%.
- 9) Fraccionar la solución (1 ml en cada vial).
- 10) Congelar a -20°C.

Marcación del conjugado IgG-HYNIC con ^{99m}Tc

- 1) Llevar a temperatura ambiente un vial de IgG-HYNIC y otro de Sn-tricina.
- 2) Agregar 4ml de NaCl 0.9% a la solución de Sn-tricina.
- 3) Agregar 50 µl de la solución de tricina al vial de IgG-HYNIC.

4) Agregar 30 mCi de TcO_4^- eluido al vial de IgG-HYNIC e incubar durante 30 minutos.

➤ **Control de calidad**

Determinación de pureza radioquímica:

Soporte	ITLC-SG
Solvente	Buffer citrato 0.15M pH 5.5
Rf ^{99m}Tc -HYNIC-IgG y coloide	0,0-0,25
Rf ^{99m}Tc -tricina, $^{99m}TcO_4^-$	0,7-1,0

Tiras de ITLC embebidas con BSA: se utilizan para comprobar que lo que quedó en la siembra de la ITLC-SG corrida con buffer citrato no es todo coloide sino que es el radiofármaco marcado.

Soporte	ITLC embebidas con BSA
Solvente	Etanol/amoníaco/agua (2:1:5)
Rf ^{99m}Tc -HYNIC-IgG	0,7-0,8
Rf ^{99m}Tc -reducido-hidrolizado	0,0
Rf $^{99m}TcO_4^-$	1,0

Preparación:

- 1) Sumergir las tiras en BSA o HSA 5% durante 2 minutos.
- 2) Sumergirlas en agua durante 1 minuto.
- 3) Secar al aire (18-20°C), usar secador de pelo en temperatura fría.
- 4) Una vez secas guardar en heladera hasta el momento de uso. Son estables una semana, las ponemos en bolsa de nylon con sachet de silicagel preferentemente.

Resultados de la cromatografía:

Buffer citrato: Siembra = 93.4 μ Ci

Frente = 7.7 μ Ci

Etanol/amoníaco/agua: Siembra = 8.23 μ Ci

Frente = 87.6 μ Ci

Porcentaje de TcO_4^- : 8%

Porcentaje de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -reducido-hidrolizado (Coloide): 9%

Porcentaje de IgG-HYNIC marcada ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-IgG): 92%

Rendimiento de marcación: 92% (en este caso no se descuenta el coloide)

CONCLUSIONES DE LOS TRABAJOS PRÁCTICOS

He realizado marcaciones rutinarias (kits liofilizados), marcación de radiofármacos preparados “in house” y controles de calidad logrando.

En cuanto a las marcaciones rutinarias he realizado las siguientes marcaciones con sus respectivos controles de calidad.

- En el caso del pirofosfato, DTPA, MDP y el IDA: el control de calidad consistió en realizar una cromatografía en capa fina con dos sistemas diferentes (dos fases móviles distintas). Con el primer sistema, NaCl 0.9%, se determinó el porcentaje de coloide. Con el segundo, Metiletilcetona, se calculó el porcentaje de pertecnetato libre.

En todos estos controles la Pureza Radioquímica debió ser mayor de 90%.

- En el caso del sulfuro de antimonio y el MAA: el control de calidad consistió en una cromatografía de capa fina con Metiletilcetona como fase móvil. Con este sistema se pudo calcular el porcentaje de pertecnetato libre, pero no se puede diferenciar entre coloide y radiofármaco, por lo que no se pudo calcular el rendimiento de marcación. Lo que se observó es que en el caso del MAA la cantidad de pertecnetato libre fue muy poca (del 5%) y que en ese sentido se podría administrar. Pero para el sulfuro de antimonio el porcentaje fue más alto (35%), por lo que se descarta la posibilidad de ser administrado. Este último radiofármaco no cumplió con las especificaciones requeridas.
- Para el ECD y el MIBI: se realizaron cromatografías extractivas como control de calidad. , para determinar el rendimiento de marcación (calculando el porcentaje de pertecnetato libre y de coloide que quedan en la fase hidrofílica) y evaluar si el radiofármaco conserva la lipofílicidad luego de la marcación. En ambos casos se observó que el radiofármaco no modificó su lipofílicidad, sin embargo el

porcentaje de impurezas fue mayor al 10% por lo que no pueden ser administrados a pacientes.

También he realizado el test de pirógenos (LAL) a un kit de DTPA en el cual se obtuvo un resultado negativo, con lo cual puedo decir que no hay presencia de pirógenos en el liofilizado de DTPA evaluado.

En cuanto a la marcación de glóbulos rojos debido a que se utilizó el método *in vitro*, en el cual se realizan lavados con solución fisiológica, se pudo obtener un rendimiento de marcación del 100%, debido a que en esos lavados se elimina el pertecnetato libre que no es incorporado al glóbulo rojo.

La marcación de IgG-HYNIC (radiofármaco preparado “in house”) se ha realizado con un rendimiento de marcación del 92%. Se utilizaron dos sistemas cromatográficos: ITLC-SG e ITLC embebidas con BSA, corridas con Buffer citrato 0.15M pH 5.5 y Etanol/amoníaco/agua (2:1:5), respectivamente. Con el primer sistema se determinó el porcentaje de pertecnetato libre y con el segundo el porcentaje de coloide. El rendimiento de marcación se calculó a partir de la ITLC-SG corrida con buffer citrato tal como lo sugirió el experto del proyecto, el Dr Otto Boerman.

Como conclusión principal he podido realizar marcaciones de radiofármacos rutinarios y uno preparado “in house” en el laboratorio de Radiofarmacia, para el entrenamiento en la tarea asistencial del Centro de medicina Nuclear del Hospital de Clínicas, siguiendo las buenas prácticas radiofarmacéuticas y las normas básicas de seguridad radiológica.

CONCLUSIONES FINALES

El seminario experimental en Radiofarmacia Hospitalaria realizado me ha permitido:

1. Entrenarme en el trabajo en un laboratorio de Radiofarmacia para garantizar la segura y eficaz preparación de los radiofármacos, desde el punto de vista radiológico como microbiológico. Respetando siempre las normas de buenas prácticas radiofarmacéuticas y las normas de la Autoridad Regulatoria Nuclear.
2. Comprender la necesidad de la implementación de un Sistema de Gestión Integrado de la Calidad en el laboratorio de Radiofarmacia para lograr la trazabilidad de los resultados, a partir de la elaboración de la documentación requerida a fin de registrar todas las actividades del laboratorio. Además la necesidad de mantenerse informado de las recomendaciones del Organismo Internacional de Energía Atómica, mediante las guías que editan, y la importancia de tratar de aplicarlas.
3. Tener criterios para saber en que casos deben realizarse los controles de calidad de los radiofármacos y cuales deben hacerse.
4. Tener en cuenta que deben realizarse controles microbiológicos del ambiente, el cual influye en la calidad de los radiofármacos que serán administrados a los pacientes.
5. Comprender la importancia de conocer el mecanismo bioquímico de acción y el metabolismo de cada radiofármaco para la interpretación de la biodistribución anormal de los mismos a fin de inferir causas fundadas en mala marcación, interacciones farmacológicas, patologías propias del paciente. Esta información es de importancia fundamental en la elaboración del informe médico que recibirá el paciente.

REFERENCIAS

1. Tomografía en Medicina nuclear. Mariana Levi de Cabrejas. Capítulo 8: Radiofarmacia. Silvia G. De Castiglia, Myriam Forneris. 1999.
2. Technetium-99m Radiopharmaceuticals: Manufacture of Kits. Technical Reports Series N°. 466. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY VIENNA, 2008
3. Silvia G. de Castiglia. Marcación de proteínas con ^{99m}Tc . Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 2003; 37 (2): 181-7.
4. José Luis Crudo. Química del Tc-99m y del Re-188. Maestría en Radioquímica, mención Radiofarmacia. Año 2008.
5. Las citoquinas y sus receptores. Dra Elida Alvarez. Cátedra de inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica.
6. Huub J.J.M Rennen, Otto C. Boerman, Wim J.G. Oyen, Frans H.M. Corstens. Imaging infection/inflammation in the new millennium. European Journal of Nuclear Medicine 2001;28:241-252.
7. Validación Bioquímica de un Nuevo Radiofármaco para localización de focos infecciosos. CEFTIZOXIMA-Tc99m. Dra. Graciela Rabiller. Centro de Medicina Nuclear del Hospital de Clínicas. UBA-CNEA. 2007
8. M Chianelli, S.J. Mather, J. Martin-Comin y A. Signore. Radiopharmaceuticals for the study of inflammatory processes: A review. Nuclear Medicine Communications, 1997, 18, 437-455.
9. José Luis Crudo. Radiofármacos para detección de inflamación / infección. Maestría en Radioquímica, mención Radiofarmacia. Año 2008.
10. Claessens RA, Boerman OC, Koenders EB, Oyen WJ, van der Meer JW, Corstens FH. Technetium-99m labelled hydrazinonicotinamido human non-specific polyclonal immunoglobulin G for detection of infectious foci: a comparison with two other technetium-labelled immunoglobulin preparations. Eur J Nucl Med. 1996 Apr;23(4):414-

11. "Development in Argentina of radiopharmaceuticals for infection/inflammation in HIV/AIDS positives patients. Preparation in hospital radiopharmacy". N° 13031/RO(RBF). September, 2006. Part of Co-ordinated Poyect: Development and quality control of hospital prepared radiopharmaceuticals for infection/inflammation in HIV/AIDS positives patients. This contract is made between IAEA and Nuclear Medical Center; Clinical Hospital José de San Martín, Buenos Aires Argentina. Proyect Officer: Dr. Kishor K. Solanki, Chief Scientific Investigator: Dra. Graciela Rabiller.
12. Huub J.J.M. Rennen, Otto C. Boerman, Win J.G. Oyen, Frans H.M. Corstens. Kinetics of ^{99m}Tc -labeled interleukin-8 in experimental inflammation and infection. *J Nucl Med* 2003;44:1502-1509.
13. Peter J. Barnes. New treatments for COPD. *Nature Reviews Drug Discovery* 1; 437-446 (2002); doi:10.1038/nrd820.
14. Huub J.J.M. Rennen, Otto C. Boerman, Emile B. Koenders, Win J.G. Oyen, Frans H.M. Corstens. Labeling proteins with ^{99m}Tc Hydrazinonicotinamide (HYNIC): Optimization of the conjugation reaction. *Nucl Med Biol* 2000;27:599-604
15. Huub J.J.M. Rennen, Julliette E. van Eerd, Win J.G. Oyen, Frans H.M. Corstens, D. Scott Edwards, Otto C. Boerman. Effects of coligand variation on the in vivo characteristics of ^{99m}Tc -labeled interleukin-8 in detection of infection. *Bioconjug Chem* 2002;13:370-377.
16. Stefan Gratz, Huub J.J.M. Rennen, Otto C. Boerman, Wim J.G. Oyen, and Frans H.M. Corstens. Rapid Imaging of Experimental Colitis with ^{99m}Tc -Interleukin-8 in Rabbits. *J Nucl Med* 2001; 42:917-923.
17. Zarlenga A.C.; Parma P.; Mayoski C.; Armesto A.; Mickiewicz E.; Alvarez A.M. Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo". ANALOGOS DE LA SOMATOSTATINA ^{99m}Tc -HYNIC-TOC.
18. E. Obenaus, J. Crudo, M. Edreira, S. G. de Castiglia. Análogos de Somatostatina Marcados con ^{99m}Tc . *Alasbimn Journal*, Year 5, N° 19, January 2003.

19. Laverman P, Roosenburg S, Gotthardt M, Park J, Oyen WJ, de Jong M, Hellmich MR, Rutjes FP, van Delft FL, Boerman OC. Targeting of a CCK(2) receptor splice variant with (111)In-labelled cholecystokinin-8 (CCK8) and (111)In-labelled minigastrin. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2008 Feb;35(2):386-92.
20. Laverman P, Béhé M, Oyen WJ, Willems PH, Corstens FH, Behr TM, Boerman OC. Two technetium-99m-labeled cholecystokinin-8 (CCK8) peptides for scintigraphic imaging of CCK receptors. *Bioconjug Chem*. 2004 May-Jun;15(3):561-8.
21. RENNEN Huub J. J. M. ; LAVERMAN Peter ; VAN EERD Julliette E. M. ; OYEN Wim J. G. ; CORSTENS Frans H. M. ; BOERMAN Otto C. PET imaging of infection with a HYNIC-conjugated LTB4 antagonist labeled with F-18 via hydrazone formation. *Nuclear medicine and biology* 2007;34(6):691-5.