

***Técnicas de marcación de doxorrubicina con  $^{99m}\text{Tc}$ .***

**CARRERA: ESPECIALIZACIÓN EN RADIOQUÍMICA  
Y APLICACIONES NUCLEARES**

Alumno: Lic. Clara Sanchez Terrero

Director: Dra. Ana Cristina Zarlenga

Co-director: Dra. Silvia Vanzulli

## Agradecimientos

*En primera instancia quería agradecer al personal del Laboratorio de Radioisótopos, Cátedra de física de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA), en particular a Jimena Salgueiro y Marcela Zubillaga, quienes me brindaron el espacio, herramientas y conocimientos para llevar adelante este trabajo final de Especialización.*

*En segundo lugar a Silvia Vanzulli y Cristina Zarlenga, por el seguimiento, dirección y empuje para realizar este trabajo.*

*A Sandra Siri, por su constante apoyo y buena predisposición, no sólo durante la cursada sino también en esta última etapa de la carrera.*

*Al equipo de investigación del Roffo, por el constante apoyo y empuje: Cristina Zarlenga, Silvia Vanzulli, Jorge Cardoso, Lucas Colombo, Gisela Ruty Solá y Luisa Ambrosio.*

## Índice

<b>Resumen</b>	5
<b>Capítulo 1: Introducción</b>	
1.1. Medicina Nuclear	6
1.2. Seguridad Radiológica en el ámbito de la investigación	6
1.2.1 Principios fundamentales	7
1. 3. Definición y clasificación de los Radiofármacos	8
1.3.1 Radiofármacos de diagnóstico	9
1.3.2 Elaboración de radiofármacos de tipo compuesto marcados	10
1.3.2.1 Tipos de marcación	11
1.3.2.2 Métodos de marcación	11
1.3.3 Radiofármacos del tecnecio	14
1.3.3.1 Impurezas comunes a los radiofármacos del tecnecio	16
1.3.3.2 Controles de calidad	17
1.4 Principios del funcionamiento de los sistemas de detección de la radiación	21
1.5 Antecedentes	24
1.6. Objetivo	28
<b>Capítulo 2: Materiales y Métodos</b>	
2.1 Datos de la instalación	29
2.2 Metodologías generales	29
2.3. Metodologías específicas	34
2.3.1 Marcación de doxo con <sup>99m</sup> Tc	34
2.3.2 Controles de Calidad	36

<b>Capítulo 3: Resultados</b>	
3.1 Manipulación y trabajo con radioisótopos	45
3.2 Procedimiento de marcación de doxo con $^{99m}\text{Tc}$	48
3.2.1 Experiencia I	50
3.2.2 Experiencia II	53
<b>Capítulo 4: Discusión y conclusión</b>	62
<b>Capítulo 5: Referencias bibliográficas</b>	69

## Resumen

El campo de la medicina nuclear provee técnicas de diagnóstico y tratamiento de enfermedades, mediante la utilización de radiofármacos. El método de radiomarcación es mediante el cual se consigue incorporar una marca radiactiva a una molécula. Esta unión depende de las propiedades químicas del radioisótopo y del precursor frío (no radiactivo). Un compuesto marcado contiene una pequeña cantidad de dicho precursor y es conocido como "trazador", el cual no ejerce acción farmacológica alguna. Están sujetos a estrictas regulaciones establecidas por las autoridades sanitarias y deben ser sometidos a los controles de calidad de las sustancias radiactivas. El radionucleído que forme parte de un radiofármaco determinado, dependerá del objetivo de la práctica, así como de las características del propio radionucleído: tipo de radiación emitida, periodo de semidesintegración, comportamiento biológico, disponibilidad y precio.

Toda práctica que involucre manipulación de material radiactivo requiere de conocimientos previos en cuanto a seguridad y protección radiológica. Las metodologías de manipulación de radioisótopo, así como las técnicas de marcación también requieren de formación tanto teórica como práctica. Conociendo los factores que pueden afectar el curso de la marcación así como aquellos que afectan el comportamiento y diseño del radiofármaco y sus requerimientos básicos, es posible la optimización de las prácticas. A su vez, la determinación de impurezas y como minimizarlas, teniendo en cuenta además que con la misma práctica es posible conseguir esta optimización.

En esta experiencia, tomada como preliminar para futuras tareas, se plantea la marcación de moléculas con  $^{99m}\text{Tc}$  utilizando en este caso como precursor frío la doxorubicina (doxo) teniendo como base referencias bibliográficas, con miras a la adquisición de conocimientos de la metodología de trabajo con material radiactivo y técnicas de marcación de este tipo de compuestos.

## **Capítulo 1: Introducción**

### *1.1) Medicina Nuclear*

La medicina nuclear es una especialidad médica que mediante la utilización de isótopos radiactivos provee técnicas de diagnóstico y tratamiento de enfermedades. El radionucleído que forme parte de un radiofármaco determinado dependerá del objetivo de la práctica.<sup>1,2</sup>

De acuerdo a la Farmacopea Argentina, "A los fines pertinentes la manipulación y el empleo de preparaciones radiofarmacéuticas (o radiofármacos) deben ajustarse a todas las normas, regulaciones, disposiciones nacionales e internacionales vigentes en materia de radioprotección emanadas de la Autoridad Nuclear competente" y en materia sanitarias a las normas provenientes de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología (A.N.M.A.T.)<sup>3</sup>. Su uso sólo puede justificarse por la obtención de un beneficio neto que compense el riesgo que pueda entrañar el empleo del radiofármaco.<sup>1,4</sup>

### *1.2) Seguridad Radiológica en el ámbito de Investigación*

La Autoridad Regulatoria Nuclear (ARN) es el organismo nacional competente que, mediante normas, regula y fiscaliza la actividad nuclear en materia de la seguridad radiológica y nuclear, las salvaguardias y protección física. En particular la Norma 10.1.1, tiene como objetivo lograr un nivel apropiado de protección de las personas contra los efectos nocivos de las radiaciones ionizantes y de seguridad de las fuentes radiactivas. Se aplica a todas las instalaciones, prácticas e intervenciones que regula y fiscaliza la ARN, de acuerdo a las atribuciones que le confiere la legislación vigente<sup>5</sup>.

La ARN clasifica las instalaciones en base al riesgo radiológico y la complejidad tecnológica en instalaciones de Clase I, II o III, según describe la Norma 8.2.4. Mi práctica la realicé en una instalación que se caracteriza por llevar a cabo prácticas de uso de fuentes abiertas o selladas, de muy baja actividad en investigación, en docencia o en otro tipo de aplicaciones y por lo tanto se define

como Clase III. Para operar una instalación o para llevar a cabo una práctica, se debe contar con la licencia de operación otorgada por la Autoridad Regulatoria. A su vez debe existir un Titular, quien debe cumplir ciertos requisitos dependiendo de la instalación y debe asignar un Responsable (en algunos casos puede ser el mismo titular), quien debe garantizar que el personal esté capacitado para las funciones que le compete y garantizar que la operación de la instalación se lleve a cabo en correctas condiciones de seguridad radiológica aplicando procedimientos apropiados.<sup>6</sup>

### 1.2.1) Principios fundamentales

Los principios fundamentales de la seguridad radiológica son la justificación de la práctica, limitación de dosis y optimización de la protección. Durante la operación normal de una instalación una práctica está justificada si las actividades realizadas originan un beneficio neto positivo para la sociedad. Durante la realización de una práctica, ningún individuo (trabajador o público) debe ser expuesto a dosis de radiación superiores a los límites y restricciones establecidas. Los sistemas de protección radiológica deben estar optimizados, a satisfacción de la ARN, de manera que las dosis resulten tan bajas como sea razonablemente alcanzable (ALARA\*, por sus siglas en inglés), teniendo en cuenta factores sociales y económicos, considerando los niveles de actividad, tiempo de exposición, la distancia a la fuente y el uso de blindajes apropiados en el diseño u operación de una instalación o de una práctica. Se debe prevenir la ocurrencia de accidentes así como mitigar sus consecuencias radiológicas en el caso de que estos ocurran.<sup>5</sup>

La vigilancia radiológica de los trabajadores expuestos a las radiaciones ionizante es la herramienta esencial que contribuye a alcanzar los objetivos de la protección radiológica ocupacional: asegurar que en condiciones normales de

---

\* ALARA: as low as Reasonably Achievable

trabajo no se superen los límites de dosis considerando además las restricciones dependiendo de la instalación, las prácticas y limitar las exposiciones. Un sistema de monitoreo o control radiológico bien planificado, permitirá además conocer los niveles de exposición en caso de situaciones anormales.<sup>7</sup>

En este trabajo final de Especialización se expone el abordaje integral de la metodología de trabajo con radioisótopos para la aproximación a las técnicas de marcación de moléculas mediante la obtención de un radiotrazador diagnóstico, doxo-<sup>99m</sup>Tc, en el ámbito de la investigación.

### *1.3) Definición y Clasificación de los Radiofármacos*

La Farmacopea Argentina define a un radiofármaco (o preparación radiofarmacéutica) como todo producto farmacéutico que, una vez terminado y listo para ser empleado, contiene uno o más nucleídos radiactivos (radioisótopos), incluidos con un propósito médico.<sup>3</sup>

Los radioisótopos pueden ser clasificados según su propósito o también según su estructura química. Cuando son utilizados con un propósito diagnóstico, se aprovecha la propiedad emisora de los radioisótopos para detectarlos a distancia, permitiendo la evaluación funcional y anatómica a través de procedimientos poco invasivos. Cuando la intención es terapéutica, se aprovecha el efecto deletéreo que la radiación puede tener sobre un tejido. Según su estructura química, pueden clasificarse en radionucleídos primarios y compuestos marcados.<sup>8</sup>

Los radionucleídos primarios son sales de compuestos inorgánicos del radioisótopo, como el <sup>131</sup>I-yoduro de sodio. Los compuestos marcados son esencialmente una asociación entre dos componentes: un radionucleído y una molécula que funciona como "vehículo" del radionucleído que compone al radiofármaco. Esta última dirige al radiofármaco selectivamente a un tejido específico en respuesta a condiciones fisiológicas o patrones de expresión

genética específicos. Las moléculas pueden ser simples, orgánicas o inorgánicas, partículas, coloides, proteínas o péptidos, células o antibióticos u otras biomoléculas. Hoy en día, se desarrollan radiofármacos de tercera generación que presentan una capacidad de acción más específica, localizada, lo cual reside en una molécula biológicamente activa (BAM), en general suelen ser péptidos o anticuerpos monoclonales, unida covalentemente a un complejo de  $^{99m}\text{Tc}$  apropiado, mediante quelantes bifuncionales. Los radiofármacos se administran en cantidades de trazas que rondan los  $10^{-11}\text{M}$  y en general no producen modificaciones fisiológicas visibles por interacción con biomoléculas específicas del organismo (no tienen efecto farmacológico o tienen mínimo efecto farmacológico).

En Argentina, el 95 % de los radiofármacos utilizados en medicina nuclear son de diagnóstico mientras que aproximadamente un 5 % se usan para terapia<sup>9</sup>.

### 1.3.1) Radiofármacos Diagnósticos

En diagnóstico, un compuesto marcado se forma cuando el radionucleído se incorpora a una molécula orgánica o inorgánica, la cual se dirige selectivamente a un órgano de interés o se incorpora a un proceso metabólico o fisiológico del organismo. Debido a que el radionucleído es un emisor de fotones (gamma o X) o emisor de positrones, en cuyo caso interesan los fotones de aniquilación que éstos producen, se pueden obtener imágenes externas a través de cámaras gamma y equipos de tomografía de emisión de positrones. Es posible diseñar radiofármacos con diferentes estructuras moleculares con una biodistribución específica para la obtención de imágenes. De esta manera, el patrón de distribución del radiofármaco y más precisamente en el órgano de interés permite: evaluar el comportamiento fisiológico, fisiopatológico y bioquímico de los tejidos, determinar parámetros farmacocinéticos, localizar masas tumorales o procesos infecciosos.

### 1.3.2) Elaboración de radiofármacos de tipo compuesto marcado<sup>4,9,10,11</sup>

La elaboración de un compuesto marcado requiere conocimientos teóricos previos de aquellos factores que pueden influir en su comportamiento y por lo tanto deben ser tomados en cuenta a la hora del diseño, según el objetivo de la práctica. Estos factores se listan en la Tabla 1.

Tabla 1: Factores que influyen en la elaboración de un radiofármaco

FACTORES	
<b>Compatibilidad química</b>	Entre molécula a marcar y radionucleído
<b>Estequiometría</b>	Relación molar entre el ligando, el agente reductor y el radionucleído.
<b>Carga y Tamaño de la molécula</b>	Pueden modificar su comportamiento biológico
<b>Solubilidad</b>	En el caso de soluciones inyectables debe ser soluble en agua y soluble en membranas biológicas y poseer una osmolalidad adecuada.
<b>Unión a proteínas plasmáticas</b>	Afecta biodistribución y clearance plasmático
<b>Estabilidad <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i></b>	La radiación emitida por un radionúclido, al interactuar con las moléculas del medio, es capaz de inducir reacciones de oxidoreducción. Con el fin de ser administrados en seres vivos, deben tener una forma química estable <i>in vitro</i> y debe mantener la estabilidad <i>in vivo</i> .

Dado que los radiofármacos se administran a humanos deben poseer ciertos requerimientos básicos que permiten cumplir con el objetivo de una cada práctica, como se listan en la Tabla 2:

Tabla 2: Requerimientos básicos para un radiofármaco

CARACTERÍSTICAS	
<b>Tipo de emisión adecuada al tipo de estudio</b>	Diagnóstico: fotones (gamma), positrones ( $\beta^+$ ) y que no emitan partícula $\beta^-$ o $\alpha$ . -Terapia: partículas $\beta^-$ , e- Auger, $\alpha$
<b>Rango de energía adecuado (diagnóstico)</b>	Entre 30 y 300KeV, a mayores energías produce efecto Compton (por fotón residual) y pérdida de resolución.

<p><b>Bajo <math>T_{1/2}</math> biológico (<math>T_{1/2}b</math>) y <math>T_{1/2}</math> efectivo (<math>T_{1/2}ef</math>) relativamente bajo</b></p> $(T_{1/2}ef = \frac{T_{1/2}b \times T_{1/2}f}{T_{1/2}b + T_{1/2}f})$	<p><math>T_{1/2}b</math> compatible con el tiempo requerido para rastrear el fenómeno biológico estudiado</p> <p>Compromiso entre <math>T_{1/2}ef</math> que sean lo suficientemente largos como para que el radiofármaco se concentre en el órgano blanco antes de que el radionucleído decaiga pero no demasiado largos para que no causen innecesaria irradiación a tejidos normales</p>
<p><b>Impartir bajas dosis de radiación al paciente</b></p>	<p>La actividad del material radiactivo administrado con fines diagnósticos debe ser tal que la dosis al paciente sea la mínima necesaria y suficiente para conseguir el objetivo perseguido.</p>
<p><b>Alta relación blanco/fondo</b></p>	<p>Que permita interpretar resultados</p>
<p><b>Tipo de eliminación adecuado</b></p>	<p>No interfiera con la imagen (diagnostico), baja irradiación de tejidos sanos (terapia)</p>
<p><b>Buena disponibilidad</b></p>	<p>Bajo costo y fácil producción</p>

Se habla de radiomarcación cuando se quiere incorporar una marca radiactiva a una molécula. Como se mencionó anteriormente, esta unión depende de las propiedades químicas del radioisótopo y de la molécula fría, así como de las características físicas de radioisótopo, dependiendo del objetivo de la práctica.

### 1.3.2.1 Tipos de Marcación:

- *Isotópica:* El radionucleído incorporado es un isótopo de un elemento químico estable que forma parte de la molécula a marcar.
- *No isotópica:* el radionucleído incorporado es un elemento químico extraño a la molécula a marcar

### 1.3.2.2 Métodos de Marcación.

- *Intercambio isotópico:* se reemplazan átomos propios de la molécula por isótopos radiactivos de los mismos átomos. Debido a que las moléculas siguen siendo las mismas, no se alteran las propiedades químicas y

biológicas de la molécula marcada. Por ejemplo:  $^{125}\text{I}$  en T3 y T4; hormonas esteroideas con  $^3\text{H}$ ;  $^{14}\text{C}$  en compuestos orgánicos

- *Introducción de un átomo extraño:* el radionucleído que se utiliza para marcar la molécula en este caso es un átomo extraño a la molécula en cuestión, pudiendo alterar las propiedades químicas y biológicas de esta última. La unión se produce directamente entre el radionucleído (en general de carácter catiónico) y grupos dadores de pares electrónicos existentes en la molécula a marcar (carboxilos, hidroxilos, aminos y sulfhidrilos). Este fenómeno se llama “quelación” y es más eficiente cuanto mayor es la capacidad de coordinación del metal y es ampliamente utilizado en la marcación con radioisótopos de metales de transición, como el tecnecio. Por ejemplo:  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -fármacos;  $^{125}\text{I}$ -proteínas;  $^{125}\text{I}$ -hormonas
- *Marcación con agentes quelantes bifuncionales:* Un quelante bifuncional, tiene la capacidad de, por un lado, unirse mediante un enlace covalente a la molécula a marcar y por el otro, unirse al radionucleído de interés mediante quelación, es decir formando puente entre ambas. Posee electrones libres para la quelación del radioisótopo y un segundo grupo funcional reactivo capaz de unirse covalentemente a la molécula para formar un “bioconjugado”. Por ejemplo:  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA-albúmina;  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA-Anticuerpo;  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DOTA-octeotride.
- *Biosíntesis:* en este método se deja crecer microorganismos en un medio de cultivo que contiene el radionucleído de interés. A medida que el cultivo crece, el radionucleído se incorpora al metabolismo del microorganismo que produce el metabolito marcado que luego se separa químicamente.

Existen factores que pueden afectar la integridad del radiofármaco durante el proceso de marcación, como por ejemplo:<sup>3,9-11</sup>

- *Eficiencia en el proceso de marcación:* La eficiencia del método de marcación debe ser alta, sin embargo si se disponen de métodos de

separación eficiente de molécula marcada y no marcada, se toleran eficiencias medianas.

- *Estabilidad Química del Radiofármaco:* Depende del tipo de estructura, tipo de marcación, tipo de radioisótopo (su emisión). Los enlaces covalentes entre el precursor y el radionucleído poseen alta estabilidad en variadas condiciones fisicoquímicas mientras que los enlaces de coordinación tipo quelato tienen una fuerte competencia *in vivo* dado que variadas moléculas de la sangre pueden actuar como ligandos metálicos, pudiendo ocurrir transquelación.
- *Actividad Específica:* Es la actividad de un radionucleído por unidad de masa del elemento o de la forma química de la que forma parte. Se toman en consideración tanto los isótopos estables como los radiactivos. Si bien es deseable una alta actividad específica, a medida que ésta aumenta existe un mayor riesgo de radiólisis.
- *Purificación:* Para evitar impurezas químicas o radioquímicas, luego de la marcación se realizan procesos de purificación. Para ello se utilizan métodos cromatográficos o extracción por solventes.

Una vez llevado a cabo el procedimiento de marcación se realizan estrictos controles de calidad. Es importante controlar las condiciones fisicoquímicas de las reacciones involucradas tanto durante la marcación como post marcación y asegurar buenas condiciones de almacenamiento para que no altere la propia vida útil del radiofármaco. La vida útil se refiere al tiempo en el cual puede ser administrado de manera segura y eficaz para su propósito. De lo contrario puede haber desnaturalización, donde los reactivos o productos secundarios pueden alterar las propiedades biológicas de la molécula; o una baja eficiencia de marcación debido a radiólisis, sobretodo en radiofármacos terapéuticos. La radiólisis, es la descomposición de un fármaco por efecto de la radiación emitida por los radionucleídos involucrados, la cual provoca mayor cantidad de impurezas y en consecuencia provocaría una irradiación innecesaria en tejido sano.

### 1.3.3) Radiofármacos del Tecnecio<sup>2,10,11</sup>

Debido a sus características físicas y químicas al  $^{99m}\text{Tc}$  se considera como el radionucleído "ideal" para elaborar radiofármacos de tipo diagnósticos. Más de un 80% de todos los radiofármacos empleados en medicina nuclear para diagnóstico *in vivo* son compuestos marcados con  $^{99m}\text{Tc}$ . Se han desarrollado radiofármacos específicos de tecnecio basados en péptidos, nanopartículas, carbohidratos y drogas antineoplásicas como doxorubicina (doxo), daunorrubicina, ciclofosfamida, paclitaxel y bleomicina, entre otras. Una de las aplicaciones de las drogas antineoplásicas marcadas con tecnecio es la detección de tumores.

Dentro de sus características físicas el  $^{99m}\text{Tc}$  posee un  $T_{1/2}$  físico de 6 horas, decae por transición isomérica emitiendo un fotón y de baja energía (140 keV) dentro del rango de energía adecuado para un estudio diagnóstico permitiendo una buena eficiencia de detección en equipos utilizados para dichos estudios (cámara gamma o SPECT/TC).

Su obtención es sencilla, a partir del generador  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ , de amplia disponibilidad en laboratorios de medicina nuclear y bajo costo. El  $^{99}\text{Mo}$  (radionucleído padre) es un emisor  $\beta^-$  y con un periodo de semidesintegración de 66 horas y decae transformándose un 12,5% en  $^{99}\text{Tc}$  y un 87,5% en  $^{99m}\text{Tc}$ , que es el radionucleído hijo (Fig. 1). La obtención a partir del generador se fundamenta en la diferencia del comportamiento fisicoquímico entre las sales del Molibdeno y las del Tecnecio. Las primeras se adsorben fuertemente a la superficie de las partículas de algunos óxidos (óxido de aluminio), en cambio las sales del Tecnecio al no ser fijadas, son arrastradas fácilmente al pasar una solución por la alúmina inerte. En el proceso de extracción, la elución arrastra al pertecneciato mediante solución de NaCl 0.9 % estéril y libre de pirógenos.

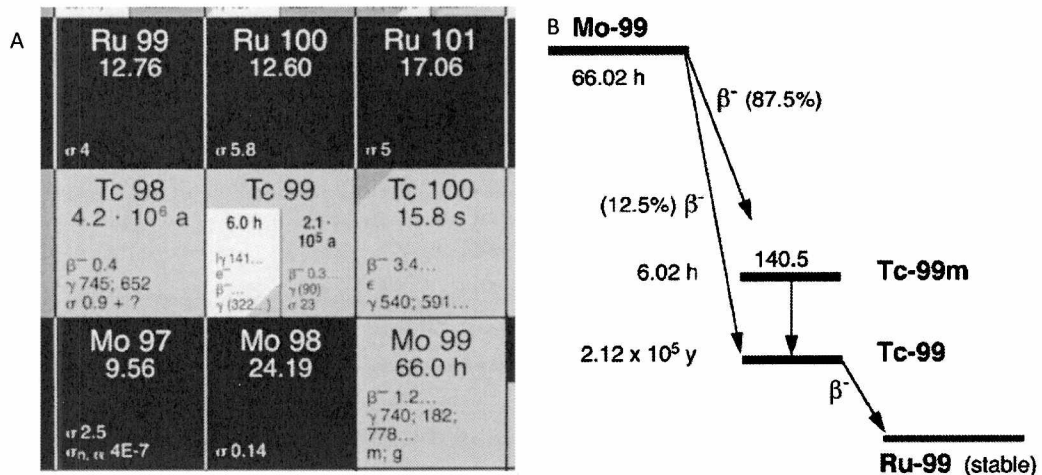
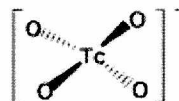


Figura. 1: A) Fragmento de la Tabla de Radionucleidos<sup>12</sup>. B) Esquema de decaimiento radiactivo <sup>99</sup>Mo/<sup>99m</sup>Tc<sup>11</sup> fundamento de los generadores

En cuanto a sus características químicas, el Tecnecio es un metal de transición que pertenece al grupo VIIB. Presenta varios estados de oxidación (-1 al +7). Sin embargo a partir del generador se obtiene Tecnecio en forma de pertechnetato (<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>) con un estado de oxidación de +7, el cual no es una especie reactiva (Fig. 2).

#### Chemical structure



Pertechnetate anion (<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>)

Figura 2: estructura química del pertechnetato salido del generador<sup>11</sup>

Por esta razón para la marcación de moléculas se requiere su reducción desde el estado de oxidación +7 a estados de oxidación más bajos (+3, +4, +5.), en los que es más reactivo. De esta manera se forman complejos de coordinación mediante la unión del Tecnecio, actuando como ácido de Lewis, lo que facilita su

incorporación a distintas moléculas que poseen grupos que actúan como dadores de electrones (bases de Lewis): -COOH, -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH.<sup>4,10,11</sup>

El agente más comúnmente usado para reducir el Tecnecio es el cloruro estannoso (SnCl<sub>2</sub>) por presentar las ventajas de baja toxicidad, gran poder reductor y buen rendimiento de radiomarcación. Sin embargo el grado de reducción dependerá del oxígeno presente, de la relación estequiométrica Sn/Tc, las condiciones en las que se lleve a cabo la reacción (pH, temperatura) y la presencia y naturaleza química del ligante.

El Sn actúa como agente reductor a pH ligeramente ácido. La cantidad de átomos de tecnecio en el eluido de (<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>) es del orden del 10<sup>-8</sup> y 10<sup>-9</sup>M, y es necesaria una pequeña cantidad de Sn<sup>2+</sup> para su reducción, para obtener un alto rendimiento y pureza de marcación. En caso de ausencia de un ligando apropiado, se produce la reducción del óxido de Tecnecio insoluble TcO<sub>2</sub>.xH<sub>2</sub>O.<sup>11</sup>

#### 1.3.3.1) *Impurezas comunes a todos los radiofármacos del tecnecio*<sup>4,7-11</sup>

Las diferentes especies radioquímicas de <sup>99m</sup>Tc que pueden resultar de la elaboración de los radiofármacos empleando Sn como reductor pueden ser: <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> libre y Tecnecio reducido-hidrolizado o "coloide". Estas dos especies pueden ser determinadas por ejemplo mediante un proceso analítico de cromatografía.

Las propiedades de migración del pertecneciato libre están influenciadas por la elección de la fase móvil y fase estacionaria del sistema cromatográfico.

El <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> libre suele aparecer por reducción incompleta o por reoxidación posterior. Las impurezas del pertecneciato pueden ser reducidas manteniendo la suficiente concentración de cloruro estannoso, excluyendo al oxígeno (atmósfera de nitrógeno) y utilizando antioxidantes. El *Tecnecio reducido-hidrolizado o "coloide"* puede aparecer por variaciones de pH durante la marcación o exceso de SnCl<sub>2</sub>. En reacciones con pH neutro y concentración de ligando baja hay más riesgo que aparezcan estas impurezas. El ión estannoso también puede

hidrolizarse y formar un coloide de hidróxido de estaño que puede unirse al tecnecio reducido y competir con el ligante durante la reducción de marcado. Las impurezas de coloide pueden ser minimizadas por el uso de un exceso de ligante y un ajuste adecuado del pH.

Las impurezas radioquímicas deben minimizarse puesto que su administración junto con el radiofármaco en proporciones superiores a las permitidas genera un patrón de distribución propio que interfiere con aquel del radiofármaco y deseado para el análisis diagnóstico. El  $^{99m}\text{Tc}$  libre, suele captarse en estómago, tiroides y glándulas salivales, mientras que el coloide suele captarse en hígado, bazo y médula ósea (es captado por sistema retículo endotelial). En ambos casos, el exceso de impurezas genera una irradiación innecesaria al tejido sano y una mala imagen. Por lo tanto es necesario realizar controles de calidad que determinen el nivel de impurezas radioquímicas presentes.

#### 1.3.3.2) Controles de Calidad en la elaboración de radiofármacos<sup>4,7-11</sup>

##### a) Control de calidad del eluido de $^{99m}\text{Tc}$ proveniente del generadores $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$

El control de calidad del eluido tiene por objeto el comprobar y garantizar su calidad radiofarmacéutica para poder asegurar su uso en humanos. En el servicio de medicina nuclear deben realizarse los siguientes controles:

- **Pureza radionucleídica:** Fracción de actividad del radionucleído de interés respecto a la radiactividad total. Se determina verificando la identidad de todos los radionucleídos presentes y su actividad (A). Esta última debe ser informada para un tiempo determinado, la precisión de esta indicación depende del período de semidesintegración del radionucleído en cuestión, debiendo indicar, día y hora.
- **Pureza química:** La constatación de la pureza requiere la determinación cuantitativa de cada una de las especies químicas que contiene la

preparación según especificaciones de la monografía correspondiente en la Farmacopea Argentina

- *Control de pH:* El pH debe presentar valores entre 4 y 8
- *Aspecto del eluido:* El eluido debe ser una solución salina, incolora y límpida.
- *Pureza radioquímica.* Es la fracción de actividad en la forma química deseada respecto de la radiactividad total.

b) *Control de calidad de Radiofármacos*<sup>1,4, 7-11</sup>

Los radiofármacos están destinados a la administración en humanos, por lo que es necesario que pasen por un estricto control de calidad. Para esto se contemplan varias pruebas específicas y medidas que aseguran la pureza, potencia, identidad del producto y la eficacia del radiofármaco. Tras la preparación de un radiofármaco, antes de su empleo, es necesario verificar una serie de características para comprobar su calidad es decir, para comprobar que el comportamiento del radiofármaco será el correcto y que de su aplicación se obtendrá el beneficio que justifica su utilización de forma segura. Por tanto, asegurar la calidad es una parte integral de la práctica de la radiofarmacia. Los controles de calidad de los radiofármacos involucran:

l) Controles físico-químicos:

- *Aspecto:* debe controlarse el aspecto físico de un radiofármaco en el momento de la producción, recepción, luego de la marcación (cuando corresponda) y antes de ser administrado. Se recomienda efectuar la observación directa del producto marcado interponiendo un vidrio plomado o indirectamente a través de un espejo detrás de pantalla plomada. Cualquier desviación del color y claridad de una solución debe ser analizada, ya que puede reflejar cambios en el radiofármaco que podrían alterar eventualmente su comportamiento biológico.

- *Tamaño y número de partícula* en caso de que la preparación consista en una suspensión de partículas (macroagregados y las microesferas de albúmina): El tamaño de las partículas coloidales debe determinarse mediante los métodos físicos indicados por farmacopea Argentina.
- *pH*. Todos los radiofármacos deben tener una apropiada concentración de iones de hidrógeno o pH para su estabilidad e integridad. Por otro lado, para los medicamentos inyectables el pH debe ser de 7.4 (pH fisiológico). El pH de los radiofármacos, puede variar entre 2 y 9 debido a la alta capacidad buffer de la sangre y así asegurar la estabilidad de la preparación.
- *Pureza radioquímica*: Las impurezas surgen por problemas durante la marcación, la descomposición parcial del solvente, cambio en la temperatura o pH, luz, presencia de agentes oxidantes o reductores y radiólisis. El requerimiento de la pureza radioquímica de cada preparación radiofarmacéutica debe mantenerse hasta la fecha de vencimiento del producto. Para su determinación puede emplearse cualquier procedimiento analítico de separación. En la práctica los más usuales son las cromatografías en papel y en placa delgada (*Cromatografía*) y eventualmente la electroforesis

## II) Controles Biológicos:

-*Biodistribución*: Toda preparación radiofarmacéutica que se emplea con fines médicos tanto para estudios diagnósticos como para fines terapéuticos debe localizarse preferentemente en el órgano o sistema cuya forma, función o metabolismo se desea evaluar. Por ello es imprescindible efectuar un prolijo estudio de biodistribución en el desarrollo de toda preparación radiofarmacéutica. Una distribución biológica acorde con los requerimientos, asegurará en principio una distribución de las sustancias radiactivas en el ser humano tal que se concentre una radiactividad mayor que un cierto mínimo en el órgano blanco y una

actividad menor que un cierto máximo en las áreas que no son blanco. Dichos controles se realizan generalmente en ratones o ratas de laboratorio

- *Endotoxinas bacterianas o pirógenos:* Para ciertas preparaciones radiofarmacéuticas, se encuentra indicado el ensayo de endotoxinas bacterianas. Si la preparación radiofarmacéutica contiene sustancias que provocan interferencias con este ensayo de tal forma que inhiban o activen la reacción y no resulte posible eliminar dichos factores, será necesario realizar el ensayo de pirógenos.

- *Toxicidad:* es necesario considerar el balance riesgo-beneficio que resulta de su empleo en seres humanos. Uno de los riesgos está relacionado con la toxicidad. Cuando corresponda, la misma será establecida de acuerdo a las normas fijadas en sección 360 de la Farmacopea Argentina<sup>3</sup>, correspondiente al ensayo de toxicidad anormal que se emplea para determinar una reactividad biológica inaceptable o inesperada en productos farmacéuticos. La evaluación preclínica de los radiofármacos incluye estudios in vivo toxicidad en animales

### III) Controles Microbiológicos, Esterilidad:

Las preparaciones radiofarmacéuticas que se administran por vía parenteral deben ser elaboradas empleando precauciones que eliminen la contaminación microbiana y aseguren su esterilidad. Debido a que el período de semi desintegración de la mayoría de los radionucleídos empleados en medicina nuclear es mucho más corto que el tiempo que demanda la finalización del ensayo, no siempre es posible esperar el resultado del mismo antes de autorizar la liberación para uso del lote. El ensayo constituye entonces un control de la elaboración. Cuando la preparación radiofarmacéutica contenga un agente bacteriostático, la naturaleza y concentración del mismo deben estar especificadas en la monografía correspondiente e indicada en el rótulo del envase.

#### 1.4) Principios del funcionamiento de los sistemas de detección de la radiación<sup>13</sup>

Los mecanismos de interacción de los fotones emitidos por los nucleídos radiactivos con la materia que los rodea van a permitir su detección, cuantificación y la eventual medición de su energía. Esto constituye la base de la utilización de los nucleídos radiactivos como trazadores. Cada detector tiene sus aplicaciones y posibilidades que deben ser conocidas por el profesional que los emplea.

El efecto primario más importante resultante de esta interacción es la ionización. En este fenómeno se arranca un electrón orbital y queda como remanente un ion positivo. El conjunto se denomina par iónico. La ionización puede ocurrir en cualquier medio. Las partículas con carga eléctrica son directamente ionizantes, es decir producen ionización interactuando a través de su carga y su masa en múltiples ocasiones con distintos electrones. Los fotones y partículas sin carga son indirectamente ionizantes y por distintos mecanismos generan partículas con carga que a su vez interactúan en múltiples ocasiones con electrones orbitales. La carga asociada a la migración de electrones en un campo eléctrico puede servir en la detección.

Otro mecanismo importante es la excitación. En este fenómeno la interacción provoca que un electrón sea llevado a un nivel energético superior, produciéndose así la excitación del átomo o molécula del material absorbente. Si el retorno al estado fundamental se produce con emisión de radiación luminosa, es posible convertir esa emisión en un pulso eléctrico, útil para la detección.

El tipo de material del detector depende de la clase de radiación a estudiar y de la información que se busca obtener (Tabla 3). Por un lado, entre los equipos que utilizan la ionización, el material que se utiliza para la interacción de la radiación puede ser *gaseoso o sólido*. La ionización de un gas, aparece como fundamento en: la cámara de ionización, los contadores proporcionales y los equipos Geiger-Müller. En los tres casos los electrones arrancados por ionización son colectados generando una intensidad de corriente. Por otro lado, entre

aquellos que utilizan la ionización de un *sólido*, se encuentran los semiconductores y las placas radiográficas. Por su utilización en el laboratorio de bioquímica, biomedicina y medicina nuclear, el activímetro y el monitor Geiger-Müller son los equipos de mayor importancia dentro de este grupo.

Dentro de los equipos que utilizan la excitación como fundamento para la detección, se encuentran: los contadores de centelleo líquido y los sólidos. En ambos casos los electrones de los átomos del material son excitados y cuando se desexcitan emiten fotones (luz); de ahí el nombre de materiales centelladores para los medios en los que ocurre la interacción y de contadores de centelleo para los equipos detectores.

Tabla 3: clasificación de detectores según mecanismo de interacción y tipo de material del detector.

Mecanismo de interacción en que se basa la detección	Material detector	Equipos	Utilidad
<b>Ionización</b>	<b>Gaseosos</b>	<b>Cámara de ionización</b>	<b>Activímetro</b> Dosímetro
		Contador Proporcional	Radiocromatografía
		<b>Geiger-Muller</b>	<b>Monitor</b>
	<b>Sólidos</b>	Semiconductores	Determinación de Energía Fantomas Análisis por activación
Películas Radiográficas		Dosímetros individuales Autorradiografía	
<b>Excitación</b>	Líquidos	Contadores de centelleo líquido	Detección de partículas cargadas y radiación de baja energía
	<b>Sólidos</b>	<b>Contadores de centelleo sólido</b>	<b>Detección de fotones</b>

En Negrita aquellos equipos más utilizados en medicina nuclear e investigación

Muchos detectores que se emplean comúnmente no miden Actividad, sino que con ellos se determina un valor de actividad aparente llamado Tasa de conteo

(TC). El número de pulsos que registra un contador en la unidad de tiempo se denomina TC y se expresa en cuentas por minuto o por segundo (cpm, cps). La TC es un reflejo de la velocidad de desintegración (actividad, A) de la fuente radiactiva y ambas están relacionadas a través de la Eficiencia (Ef) que se expresa en pulsos o cuentas por desintegración. ( $TC=A \times Ef$ ). Para que esto se cumpla la eficiencia de medición debe permanecer constante durante el proceso de detección.

La eficiencia de medición está determinada esencialmente por la eficiencia intrínseca del detector (la fracción detectada por partícula que entra al volumen sensible del detector), el factor de corrección por el tiempo muerto del detector, la geometría entre fuente y detector (la fracción de partículas emitidas que llega al detector), el factor de corrección por retrodispersión, el factor de corrección por autoabsorción y autodispersión en la muestra. A su vez la medición debe ser corregida por la lectura de fondo, fundamentalmente cuando la TC sea baja o ambas sean del mismo orden<sup>3</sup>. Es importante saber el grado de influencia de cada uno de estos factores en cada sistema de medición para conocer las ventajas y desventajas de trabajar con cada uno de ellos.

En la realización de un estudio diagnóstico por imágenes se pretende obtener, a partir de la detección, una representación lo más exacta posible de la distribución de la radiactividad (dada por la biodistribución del radiofármaco) dentro del organismo. Utilizando una cámara gamma (contador de centelleo sólido), la detección tiene como resultado la elaboración de una imagen donde verificamos esa distribución y si es posible, muchas veces también se intenta medir (cuantificar) esa distribución. La idea es definir la cantidad de radiactividad que hay en cada sitio y de esa manera caracterizar, con precisión numérica, un evento metabólico o un disturbio funcional.<sup>4,9-11</sup>

### 1.5) Antecedentes

Las Líneas de investigación en las que estoy participando en el Centro Oncológico de Medicina Nuclear del Instituto Ángel H. Roffo (COMNIR), consiste en la caracterización biológica del efecto terapéutico de microesferas de vidrio sólidas y porosas (MEP) para radio y quimioembolización respectivamente, producidas en Centro Atómico Bariloche (CAB-CNEA) (Fig 3).

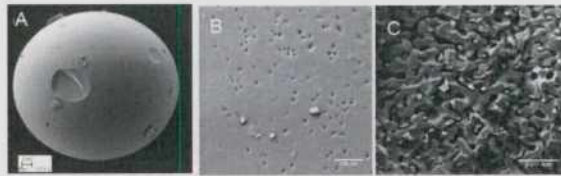


Fig. 3: micrografías en Microscopio electrónico de barrido de las MEP para quimioembolización: estructura externa (A), superficie externa (B) y estructura interna (C). Imágenes adquiridas en Centro Atómico Bariloche (CAB-CNEA)

La indicación más frecuente de este procedimiento es el tratamiento de tumores hepáticos primarios o metastásicos.<sup>14,15</sup> Las microesferas, portadoras de droga antineoplásica, se inyectan a través de un catéter colocado selectivamente en la rama de la arteria hepática que irriga al tumor quedando de esta manera confinadas en los capilares intra y peri tumorales (Fig. 4) permitiendo una descarga localizada de droga antineoplásica, evitando efectos secundarios sistémicos.<sup>16</sup>

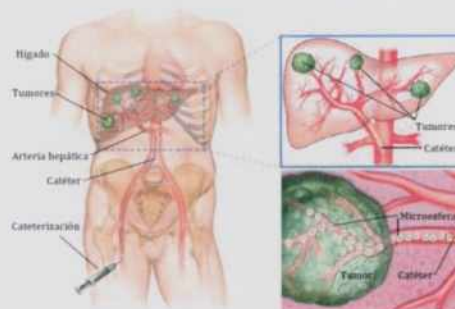


Fig. 4: Esquema de quimioembolización hepática utilizando microesferas<sup>16</sup>

En nuestro caso la droga antineoplásica utilizada para cargar las MEP es la doxo, que posee la particularidad de ser roja y fluorescente lo cual facilita su visualización. Hemos podido evaluar la capacidad de carga y liberación de la doxo por las MEP *in vitro* mediante espectrofotómetro UV-Vis y fluorómetro. Se determinó la carga a partir de distintas concentraciones de solución de doxo y la descarga en Fluido Biológico simulado a 37°C (Fig. 5). 90mg de MEP sumergidas en una solución de 5ml de doxo a 2mg/ml adsorbieron 0,06mg doxo/mgMEP, liberando en 24 hs un 22 % de esa carga.

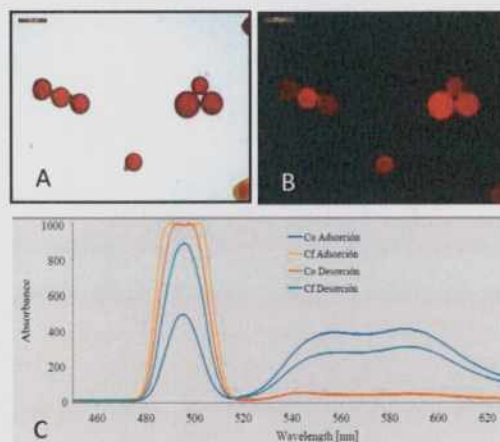


Fig 5: Imágenes de ensayos de carga y descarga de doxo de las ME: a) MEP cargadas con doxo bajo microscopio óptico convencional (40X); b) MEP cargadas con doxo bajo microscopio fluorescencia (40X); c) Espectro de doxo en fluorómetro luego de los ensayos de adsorción y liberación de doxo. Co: concentración inicial; Cf: concentración final en sobrenadante.

Para comprobar si la doxo liberada es suficiente para generar un efecto biológico se realizaron ensayos en cultivos celulares con MEP cargadas (MEP-D) en las mismas condiciones. Se utilizó la línea del adenocarcinoma colónico de rata DHD/k12/TRb considerando que una de las principales indicaciones de las microesferas es en el tratamiento de las metástasis hepáticas siendo más frecuente la del cáncer colorrectal. En los cultivos tratados con MEP-D se observó

la monocapa discontinua y con espacios desprovistos de células indicando que hubo muerte celular a diferencia de los controles donde se observó una monocapa de células continua, (Fig. 6). Los resultados obtenidos evidencian la capacidad de carga y descarga de droga de las MEP, y su capacidad de generar un efecto biológico *in vitro*, condición necesaria para a futuro continuar con ensayos *in vivo* en modelos experimentales.

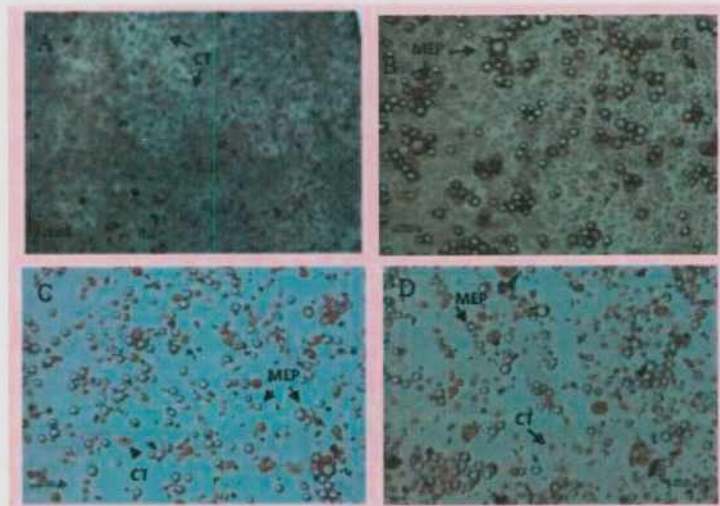


Fig. 6: Ensayos en cultivos celulares. A) control crecimiento tumoral; B) control con MEP vacías; C y D) tratamiento con MEP cargadas con doxo. Con flechas se indica células tumorales (CT) y MEP

La doxo es una droga antraciclínica citotóxica, que ha mostrado tener una significativa actividad terapéutica en diversos tipos de cáncer como leucemias, linfomas, mama, ovario, páncreas y tumores hepáticos. Se convirtió en la antraciclina de mayor uso, siendo una de las más potentes drogas antineoplásicas<sup>17,18</sup>.

La doxo está compuesta por una parte cromófora fluorescente tetracíclica lipofílica unido a un aminoazúcar (Fig. 7 A). El grupo cromóforo se intercala en el surco menor de la doble hélice mientras que el resto aminoazúcar estabiliza esta intercalación por enlace electrostático con los grupos fosfato de la cadena de ADN

<sup>14,16</sup> (Fig. 7 B). Esta droga se enlaza a las membranas celulares así como a las proteínas plasmáticas<sup>19</sup>. Se cree que el efecto citotóxico de la doxo sobre las células malignas así como los efectos tóxicos ejercidos por esta droga sobre los diferentes órganos, guarda una estrecha relación con la intercalación de la base del nucleótido y su enlace lipídico a membranas celulares.

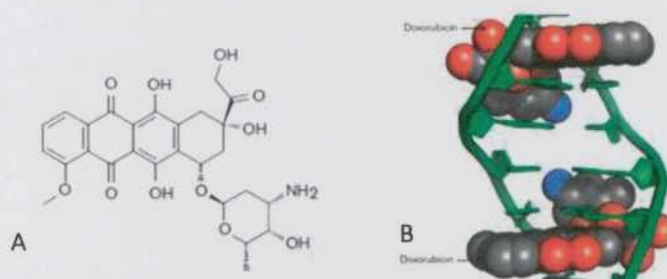


Fig. 7: A) Estructura química de la doxorubicina<sup>2</sup>, B) Diagrama mostrando dos moléculas de doxo intercaladas en el ADN.

Luego de la intercalación, a doxo estabiliza el complejo topoisomerasa II-ADN, evitando el resellado de la doble hebra, deteniendo el proceso de replicación. La inhibición de la topoisomerasa-II bloquea la fase S del ciclo celular y puede inducir rompimientos de ambas hebras del ADN. Cuando los sistemas de reparación fallan se activan vías apoptóticas inhibiendo el progreso del ciclo celular.<sup>17,18</sup>

La doxo posee grupos funcionales dadores de electrones (-OH; -NH<sub>2</sub>; -O-) que son capaces de formar complejos estables (por quelación) con el <sup>99m</sup>Tc (Fig. 7).<sup>2</sup>

El motivo de este trabajo final es implementar la técnica de marcación de doxo con <sup>99m</sup>Tc para, en un futuro, implementarlo en estudios preclínicos de biodistribución de la droga y posteriormente analizar su utilidad como un radiotrazador diagnóstico con valor predictivo de respuesta terapéutica y en quimioterapias localizadas con MEP cargadas con doxo-<sup>99m</sup>Tc.

## 1.6) *Objetivo*

### Objetivo general

Aplicación de las técnicas de marcación con  $^{99m}\text{Tc}$  para obtención de radiofármacos diagnósticos

### Objetivos específicos

1. Puesta a punto de protocolos de marcación directa de doxorubicina con  $^{99m}\text{Tc}$  obtenidos de fuentes bibliográficas observando las medidas de protección radiológica de una instalación dedicada a la docencia e investigación.
2. Implementación de técnicas de control de calidad de radiofármacos de Tecnecio

## **Capítulo 2: Materiales y métodos**

### *2.1) Datos de la instalación*

Las experiencias se llevaron a cabo en el Laboratorio de Radioisótopos, Cátedra de Física, Facultad Farmacia y Bioquímica (UBA). Licencia de operación 14702/2/5/11-20. Otorgada por resolución del directorio de la ARN 691/2015.

Preceptor a cargo de la práctica: Prof. Dra. María Jimena Salgueiro

Permiso individual: 25193/0/0/02-20. Otorgada por resolución del directorio de la ARN 86/2015

Responsable de la Seguridad Radiológica: Prof. Dra. Marcela Zubillaga

Permiso individual: 24153/1/1/05-22, Otorgada por resolución del directorio de la ARN 266/2017

Los ensayos realizados están vinculados al subsidio de investigación UBACYT 20020170200370BA dirigido por Prof. Dra. María Jimena Salgueiro otorgado por la Secretaria de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires Programación 2018.

### *2.2) Metodologías Generales*

- Obtención de material radiactivo

Para la obtención del material radiactivo se utilizó el procedimiento operativo estandarizado de *Elución y Uso del Generador  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  (PT-003)* y para evaluar que tuviera las características de calidad necesarias para su uso, se realizó lo descrito en el procedimiento *Control de Calidad del Eluido (PT-004)*. El  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  se obtuvo en forma de  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  a partir de la elución de una columna generadora

$^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  comercial (Laboratorios BACON SAIC). El vial donde se recolectó el  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  se colocó en un blindaje de plomo de 3 mm de espesor durante la elución que posteriormente se reemplazó por uno de 5 mm de espesor para los usos ulteriores. El dispositivo cuenta con un blindaje propio para la columna generadora y adicionalmente se mantuvo en el búnker (Fig.8), un espacio delimitado por ladrillos de plomo en el que se almacena el material radiactivo (columna generadora de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , fuentes, residuos).

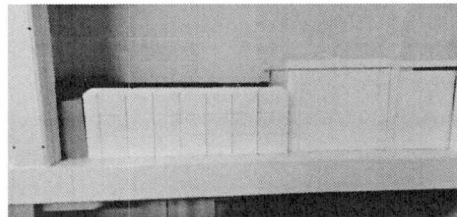


Figura 8. Bunker de plomo del laboratorio

- Manipulación de material radiactivo

Se utilizó  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , emisor de un fotón gamma de 140 keV de energía, por lo tanto las fuentes utilizadas se mantuvieron en blindajes de plomo de 3 a 6mm de espesor. Se dispuso de blindajes para los viales donde se mantenían las soluciones de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  y donde también se realizaron las marcaciones. Adicionalmente para la toma de volumen de una solución radiactiva o para la administración de los compuestos radiomarcados en los que se utilizaron jeringas se mantuvieron hasta el momento de su uso en blindajes porta-jeringa de plomo de 4mm de espesor. Toda práctica que involucró fuentes abiertas de material radiactivo se realizó detrás de una pantalla de fraccionamiento de plomo de 5 mm de espesor (Fig. 9 A, B y C) que cuenta con una porción de vidrio plomado para visualizar las operaciones de manera directa (Servicios y Servicios, Argentina).

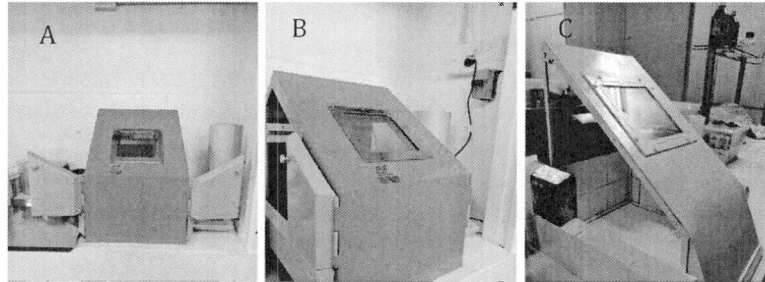


Figura 9. Pantallas plomadas para radioprotección.

- Gestión de residuos radiactivos

La gestión de residuos se realizó según lo descrito en el procedimiento operativo estandarizado *Gestión de Residuos Radiactivos (PT-002)*. Los residuos se rotularon con fecha de generación, de descarte y nombre del nucleído y se confinaron en el bunker para ser gestionados pasadas las 72 hs, según sus características, sean convencionales, biológicos o patológicos. Antes de su descarte todos los residuos fueron monitoreados utilizando un monitor portátil Geiger-Müller (Fig. 10A), siguiendo el PT-002.

- Medición de la radiactividad

Las mediciones de radiactividad realizadas con los equipos que se mencionan a continuación se realizaron según los procedimientos operativos estandarizados *Uso y Verificaciones operacionales del Contador de Centelleo Sólido (PT-015)* y *Uso y Verificaciones operacionales del Activímetro (PT-013)*. Por otro lado, todas las mediciones se realizaron en equipos calibrados y controlados según los procedimientos *Verificaciones de referencia del Activímetro (PT-014)* y *Control de Calidad del Contador de Centelleo Sólido (PT-016)*.

- Medición en Contador de Centelleo Sólido

Las porciones de fases estacionarias de cromatografías, y órganos de animales se midieron utilizando un contador de centelleo sólido de tipo pozo (Alfanuclear, ZX, Argentina) que se muestra en la Figura 10B. En los casos en los que fue necesario calcular la actividad neta correspondiente a las muestras se diseñaron patrones para conocer el valor de la eficiencia de medición (Ef). Los patrones se construyeron a semejanza de la muestra y se midieron en condiciones idénticas de modo que se calculó la eficiencia de medición con la siguiente ecuación:

$$TC = Ef \cdot A$$

Siendo la TC (tasa de conteo) el valor medido con el contador de centelleo sólido y la A (actividad) medida con el activímetro. Cuando fue posible, en las mediciones realizadas con el contador de centelleo sólido, se acumularon más de 10000 cuentas obteniendo un error de medición menor al 1%.

#### - Medición en Activímetro

Se utilizó un Activímetro (Vexcal, Argentina) calibrado para la medición de  $^{99m}\text{Tc}$  (factor de calibración: 0,05763) y  $^{99}\text{Mo}$  (factor de calibración: 0,22710) que se muestra en la Figura 10C. Con este equipo se obtuvieron los valores de actividad del eluido, las marcaciones, las dosis a administrar a los animales, y de los patrones para la calibración del contador de centelleo sólido.



Figura 10. Instrumentos de medición de la radiactividad. A) monitor portátil GeigerMuller; B) contador de centelleo sólido (CCS) y C) activímetro con pantalla para selección de nucleidos.

- Vigilancia radiológica
  - Contaminación de superficies

Para evaluar la presencia de contaminaciones se siguió el procedimiento operativo estandarizado *Vigilancia Radiológica de Áreas y de la Contaminación Superficial de los Operadores (PT-010)*. Se utilizó un monitor portátil Geiger-Müller (Inspector ®, Alfa nuclear, USA) que se colocó a 2 cm de distancia de cada zona a evaluar, barriendo la superficie posiblemente contaminada. La lectura en tasa de conteo, acompañada de la señal sonora, permite detectar zonas con contaminación radiactiva. Luego de finalizar los experimentos se monitorearon mesadas, pisos, pantallas de fraccionamiento, vestimenta de los operadores, guantes y cualquier zona donde hubiera sido probable una contaminación. En caso de la confirmación de la presencia de una contaminación radiactiva, se procede a remover el material impermeable que recubre las mesadas de trabajo. Si la contaminación se produjera en zonas no removibles se debe proceder a descontaminar con una solución de detergente comercial (5%) y algodón, descartando como residuo radiactivo. En caso de que la contaminación no pudiera removerse de esa manera, se procede a delimitar la zona, blindarla (de ser posible) y rotularla. Si no es posible el blindaje, se suspende la tarea hasta el decaimiento de la fuente dado que el nucleído de trabajo ( $^{99m}\text{Tc}$ ) posee un periodo de semidesintegración relativamente corto (6 hs).

- Tasa de exposición

Se utilizó el detector Geiger-Müller para monitorear la tasa de exposición durante las diferentes prácticas que involucraban el uso de material radiactivo. Se tuvo en cuenta la señal audible y la medición (en  $\mu\text{Sv/h}$ ) teniendo una estimación de la exposición en tiempo real. En ninguna práctica se excedieron los  $5\mu\text{Sv/h}$  relacionados a los  $6\text{mSv}$  anuales de la restricción de dosis que establece la Autoridad Regulatoria Nuclear para los trabajadores ocupacionalmente expuestos.

## 2.3) Metodologías Específicas

### 2.3.1 Marcación de doxo con $^{99m}\text{Tc}$

Se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica a partir de PubMed, motor de búsqueda de artículos de investigación científica biomédica, utilizando como criterio de búsqueda “Technetium-99m labeled doxorubicin” en los últimos diez años. Analicé los trabajos encontrados en cuanto a su objetivo, materiales y reactivos utilizados, así como los protocolos de marcación empleados, con motivo de valorar su reproducibilidad. En caso de ser necesario se utilizó bibliografía complementaria.

En la tabla 4 se muestra la información obtenida de las publicaciones (A, Faheem *et al.*, 2012; B, Fernandes, *et al.*, 2016; C, Araujo *et al.*, 2015 y D, Kumar *et al.*, 2012 y E, Kumar *et al.*, 2015).<sup>2,19-22</sup>

Tabla 4: Información extraída de las publicaciones científicas.

Publicaciones	A) Faheem <i>et al.</i> , 2012	B) Fernandes, <i>et al.</i> , 2016	C) Araujo, <i>et al.</i> , 2015	D) Kumaret <i>et al.</i> , 2012 y E) Kumaret <i>et al.</i> , 2015
Reactivos				
Molécula a marcar: [DOXO]	100-500 $\mu\text{g}$ (200 $\mu\text{g}$ ) En PBS	1ml (1mg/ml). En PBS	2mg/ml (1ml), no aclara medio	2mg/ml (1ml) en agua ultra destilada
Agente Reductor: [SnCl <sub>2</sub> ]	5 a 20 $\mu\text{g}$ , óptimo con 12 $\mu\text{g}$	100 $\mu\text{g}$ [0,1mol/l HCl (2mg/ml)]	S/D	[10mg en 1ml de ac. Acético (10%)] 100 $\mu\text{g}$
Filtrado	S/D	S/D	S/D	<b>Filtrado 0,22<math>\mu\text{m}</math></b> Se liofiliza y se conserva en heladera a 4°C.
Eluido: Na $^{99m}\text{Tc}$	370 MBq	37MBq	370MBq	40 MBq (1ml al vial con liofilizado)
<b>Condición de Trabajo</b>				
Volumen final	1,5 $\pm$ 0,2 ml	S/D	S/D	S/D
Temperatura	ambiente	ambiente	S/D	ambiente
Luz	Oscuridad (Doxo fotosensible)	S/D	S/D	S/D

Incubación (min.)	15	30	10	20/30
Purificación	Filtro 0,22µm, radiocoloide < 2%	Filtro 0,22µm	S/D	Filtro 0,22µm

Doxorrubicina (Doxo), Cloruro de estanio ( $\text{SnCl}_2$ ), (S/D) sin datos. En Araujo *et al* 2015 no se expresan metodologías de marcación, por lo tanto no se tomó en cuenta para la propuesta de protocolos. En Kumar *et al*, 2012 hacen una optimización que aplican luego en 2015, por esta razón se evaluaron en conjunto

*Estas publicaciones se tomaron como punto de partida para el planteo de tres protocolos diferentes con algunas adaptaciones de acuerdo al material y herramientas disponibles. El fruto de mi análisis y la consecuente propuesta de protocolos se exponen en la sección de resultados, mientras que las metodologías generales se expondrán en esta sección.*

En los tres protocolos que propuse se realizó una técnica de marcación directa utilizando  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$  ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) obtenido de un generador  $^{99\text{m}}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Los ensayos se realizaron en simultáneo y a temperatura ambiente. Como molécula fría para marcar utilicé la especialidad medicinal de doxorrubicina polvo estéril liofilizado de Clorhidrato de Doxorrubicina (Glenmark Pharmaceuticals, 50mg) reconstituido siguiendo instrucciones del fabricante. Luego se agregó al vial en el siguiente orden: 1) *Cloruro estannoso di hidratado* ( $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), como agente reductor, el cual fue preparado en solución fisiológica a una concentración de 1mg/ml, utilizando HCl (1N) para ajustar a pH 3; 2) *Solución Buffer Bicarbonato / Carbonato* ( $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ ): pH9, 0,3M; 3) detrás de pantalla plomada, se agregó el  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  en forma de pertecneciato ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ) del eluido. Pasado el tiempo de incubación. En caso de ser necesario se tuvo en cuenta un paso de purificación por filtración y se procedió a realizar los respectivos controles de calidad. De acuerdo a los resultados obtenidos se realizaron pasos de purificación según correspondió.

### 2.3.2 Controles de Calidad

Para realizar los respectivos controles de calidad, se tomó en cuenta la información proporcionada por los trabajos científicos consultados (Tabla 5).

Tabla 5: Controles de calidad obtenidos de las publicaciones consultadas<sup>2,19-22</sup>.

Controles de Calidad		Trabajos Científicos			
		A	B	C	D y E
Físico-químicos	pH	6-7 Buffer: NaOH0,5M	7,4 por uso de PBS, no utilizan buffer	S/D	6
	Pureza Radioquímica	<u>Tc libre</u> : FE: ITLC (Whatman No 3). FM: Acetona. <u>Tc coloide</u> : FE:ITLC-SG FM: THF PR >92%	FE: TLC-SG <u>Tc libre</u> : FM: Acetona  PR: 99%	ITLC No aclaran FM PR >90%	FE: ITLC-SG <u>Tc libre</u> FM: acetona <u>Tc coloide</u> FM: solución fisiológica (D) y P:A:W (E) PR>95% y 97,4%
Carga		Electroforesis; Buffer fosfato pH 6,8. PapelWhatman No.1. 30-60min. 300V: neutra	S/D	S/D	S/D
Pureza química		HPLC: FE: columna C-18 FM: acetonitrilo y buffer:>98%	S/D	S/D	S/D
Biológicos	Biodistribución	S/D	Adm. IV3,7MBq en ratones con tumor de mama 4T1 a 1, 4 y 8hs: %Al/g de sangre	S/D	Adm. IV 7,4MBq Ratas sanas a 1, 4 y 24 hs: %Al/g de tejido
	Adquisición de Imágenes	S/D	Adm IV: 18MBq en ratones	SPECT/TC Adm IV Pacientes	conejos sanos y ratón con tumor. Adm

			con tumor, Imágenes a 1, 4 y 8 hs. Cámara gamma	con Carcinoma de mama: 1 y 3hs a cuerpo entero (12 min)	IV: 7,4 MBq a 1,5 , 3 y 4 hs:
<u>Estabilidad</u>	In vitro	Suero humano (37°C) 24h PR=92%	Plasma murino (37°C) Salina T amb. hasta 8hs con ITLC-SG PR>95%	A 24 hs, no especifica protocolo	Suero humano (37°C): 15min, 1, 2, 4 y 24 hs. ITLC (Tc libre) No especifica FM
	In vivo	S/D	Clearance Sanguíneo: en ratón sanas Muestras de sangre a 8hs. pesada y medidas en CCS	S/D	Clearance Sanguíneo: Adm IV 20MBq Conejos. Muestras de sangre a 1,2,3,4,24hs
<u>Caracterización</u>	In vitro	S/D	S/D	S/D	-Unión a proteínas plasmáticas: en plasma humano con 10% de TCA -Lipofiliidad: coeficiente de partición orgánico/ acuoso

ITLC (cromatografía instantánea de capa fina); FE (fase estacionaria); FM (Fase móvil); PBS (tampón fosfato salino); P:A:W (piridina: acetona: agua); THF (tetrahidrofurano); PR (pureza radioquímica); ADM IV (administración intravenosa); TCA (ácido tricloroacético); CCS (contador de centelleo sólido); S/D (sin datos)

Luego de analizar la información, los controles de calidad propuestos en esta experiencia fueron adaptados a los materiales disponibles y en caso de información incompleta se complementó con otras fuentes bibliográficas.

En cuanto a la metodología empleada, en primer lugar, a partir de un eluido apto, previamente controlado, se procedió a la marcación y luego se realizaron los controles de calidad físico-químicos y biológicos.

#### -Controles Físico Químicos

Aspecto: Se realizó la inspección visual del vial sin blindaje a través del vidrio plomado detrás de la pantalla plomada. Se tomó como referencia la solución madre de doxorubicina, roja y libre de partículas

- pH: se tomó una gota del vial de reacción y se colocó sobre la tira indicadora de pH. Se comparó con la referencia de colores indicada en la caja (Fig.11). El resultado se comparó con el valor de pH de las publicaciones científicas consultadas.

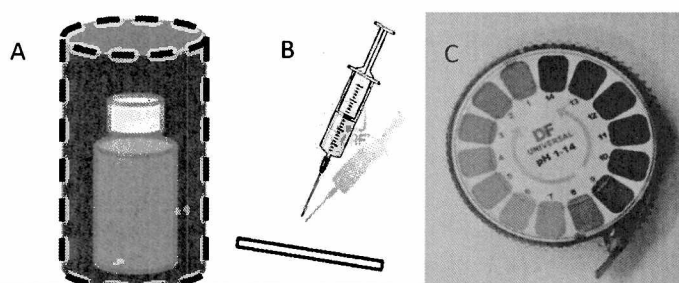


Figura 11: Pasos para la determinación del pH de la solución. A) vial en su blindaje. B) siembra de gota de solución en la tira de pH. C) referencia de colores para comparar con la propia tira

- Pureza Radioquímica: se utilizaron sistemas cromatográficos conformados por ITLC-SG (instant thin layer chromatography), de 10cm de longitud por 1cm de ancho como fase estacionaria y, según la especie radioquímica a separar  $^{99m}\text{Tc}$  libre y  $^{99m}\text{Tc}$  coloidal hidrolizado (llamado a lo largo del trabajo como Tc coloidal), como fase móvil Acetona y solución fisiológica respectivamente.



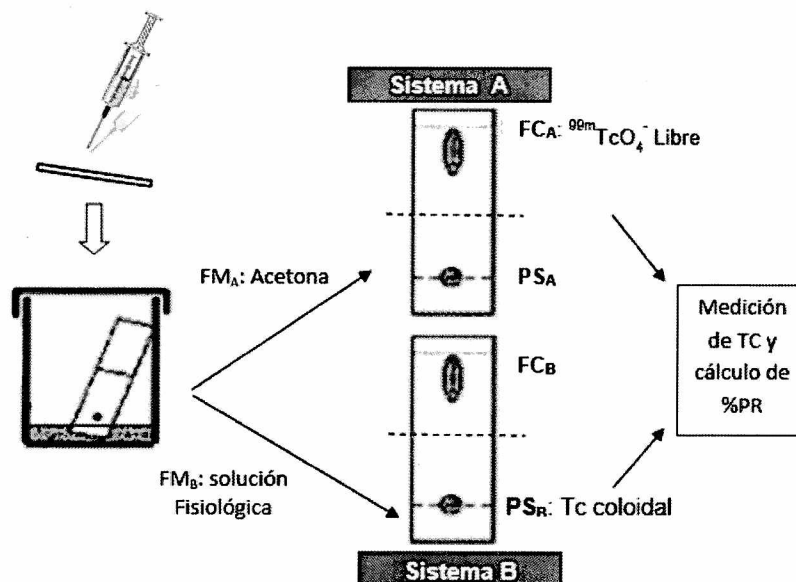


Figura 13: Esquema del procedimiento del cálculo de pureza radioquímica (PR). FMA y FMB: Fase móvil sistema A y B respectivamente; FC: Frente de corrida; PS: Punto de siembra; TC: Tasa de conteo. (...) Rf de corte de las tiras.

Se midió cada microtubo en contador utilizando las condiciones de lectura detalladas en tabla 6, registrando la tasa de conteo obtenida para cada uno.

Tabla 6: Condiciones de lectura del contador de centelleo solido utilizado. TFM (tensión de fotomultiplicador); BD (base de discriminador); AC (ancho de canal)

EQUIPO	TFM (volts)	BD (div)	AC (div)	Tiempo (seg)
4	650	100	Infinito	6

El cálculo de pureza radioquímica se realizó siguiendo el siguiente procedimiento: se sumó la Actividad del PS y FC, para obtener la Tasa de Conteo (TC) total de la tira cromatográfica. A partir de este dato calculamos qué porcentaje respecto de la

TC total (de cada sistema) poseen las fracciones correspondientes a las impurezas presentes ( $PS_{SistA}$  y  $FC_{SistB}$ ). La pureza radioquímica del radiofármaco debe ser superior al 90%, por lo que la suma de impurezas de cada sistema no debe ser mayor al 10%.

#### *-Control Biológico*

El control biológico se realizó mediante ensayos de Distribución Biológica adaptando la información obtenida de bibliografía a los elementos disponibles

- *Animales Experimentales*

Se utilizaron ratones sanos de la cepa Balb-c (Bioterio central de la Facultad Farmacia y Bioquímica, UBA). Los animales se mantuvieron en la sala de animales de la Cátedra de Física, equipada con dos armarios ventilados con agua y alimento balanceado (GANAVE, Argentina) *ad libitum*, a temperatura entre 22-23°C, humedad cercana al 56% y con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas de duración. En todos los casos, las condiciones fueron las recomendadas por la "Guide for the care and use of Laboratory Animals 8th Edition". Todos los procedimientos realizados con animales se encuentran aprobados por la Comisión Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, de la Universidad de Buenos Aires, Resolución 671/2018 "Evaluación de sondas radiactivas, sondas fluorescentes y sondas híbridas para protocolos de imágenes moleculares en animales de experimentación".

### *Distribución Biológica*

- *Administración*

Los animales se anestesiaron por inhalación de isofluorano 2%v/v (Scott Casará, Argentina) a través de una mascarilla conectada a un sistema de vaporización con arrastre de oxígeno. Para verificar la anestesia se constató la pérdida del reflejo de retracción podal, de "tailpinch" y el reflejo de incorporación. Sólo se procedió a realizar los procedimientos en caso de que los reflejos mencionados resultaran negativos. En estas condiciones y detrás de pantalla plomada, se administró el material radiactivo por vía intravenosa utilizando la vena lateral de la cola, con aguja 27G. Se esperó el tiempo de biodistribución seleccionado para la adquisición de imágenes (1 hora), en el que los animales fueron alojados en el bioterio, en un sector especialmente diseñado con blindajes de plomo. Sobre un grupo de animales se adquirieron imágenes. Luego se procedió a la eutanasia y disección de la totalidad de los ratones

- *Adquisición de Imágenes*

Los animales, bajo el efecto de la anestesia, fueron colocados en posición ventral sobre el colimador de alta sensibilidad previamente protegido, para adquirir imágenes estáticas de cuerpo entero, utilizando una matriz de 128x128 y hasta conseguir un mínimo de 10000 cuentas. Previamente se había realizado el control de uniformidad intrínseca, el del ajuste del fotopico y el del fondo, como chequeos operacionales previos a la adquisición de imágenes.

- *Eutanasia y Disección*

Detrás de pantalla plomada y con el animal anestesiado se realizó la extracción de sangre de la mejilla y luego se procedió a la dislocación cervical. Se disecaron los siguientes órganos: cola (sitio de inyección),

pulmón, corazón, estómago, intestino, riñones, hígado, bazo y carcasa remanente.

- *Análisis de imágenes centellográficas*

Se realizó el análisis cualitativo de las imágenes para establecer las principales zonas de captación que se van a corresponder con resultados de distribución biológica *ex vivo*.

- **Procesamiento de las muestras:**

1. *Pesado de los órganos disecados:* fueron pesados por separado en balanza analítica de precisión en frascos de plástico previamente pesados.

2. *Medición de tasa conteo (TC):* se llevó a cabo en contador de centelleo sólido de pozo seleccionando condiciones de medición del  $^{99m}\text{Tc}$ . Se expresó en cuentas por minuto (cpm). Para la muestra de sangre se consideró la volemia como un 7% del peso corporal del ratón a partir de la cual se determinó la actividad total en sangre.

3. *Cálculo de Actividad (dpm):* A partir de los valores de factores de eficiencia obtenidos por el uso de patrones para cada tipo de muestra se aplicó la ecuación  $TC = Ef \times A$  para convertir la tasa de conteo en Actividad.

4. *Cálculo de la actividad neta inyectada:* determinada mediante la medición de actividad en la jeringa antes y después de cada administración, para cada uno de los ratones. Realizada en el activímetro y expresada en mCi y luego se realizó la conversión a dpm.

5. *Cálculo de la actividad inyectada corregido por punto de inyección:* se obtiene mediante la resta entre la actividad inyectada y la actividad remanente en el sitio de inyección (cola).

6. *Cálculo de porcentaje de actividad de cada órgano*: es la actividad de cada órgano con respecto a la actividad neta inyectada corregida por el decaimiento radiactivo.

7. *Cálculo de porcentaje de actividad neta inyectada por gramo de tejido (%AI/g)*: se obtiene a partir del porcentaje de actividad neta inyectada en cada órgano por unidad de masa (g).

### **Capítulo 3: Resultados**

#### *3.1) Manipulación y trabajo con radioisótopos*

La iniciación y permanente experiencia práctica en un laboratorio de radioisótopos es muy importante para poder volcar los conceptos teóricos aprendidos durante la especialización. En mi caso tuve la oportunidad de visitar el laboratorio antes de realizar las prácticas, lo cual me permitió familiarizarme con la instalación, la distribución, equipamiento, superficies de trabajo y gestión de residuos. A su vez, durante estos ensayos estuve bajo la supervisión de personal calificado y capacitado, con amplia experiencia en las tareas. Recibí instrucciones precisas en cada paso de mi práctica, no solo por seguridad sino por enriquecer mi formación.

En cada instalación en donde se trabaja con material radiactivo es necesario que el control del cumplimiento de las normas este a cargo de personal con capacitación específica teórico-práctica. En base a estos hechos en un laboratorio se diseñan procedimientos operacionales estandarizados que fueron respetados. Es de gran importancia la práctica de un procedimiento, realizarlo más de una vez ya que de esa manera se logra experiencia y seguridad, acortando los tiempos de manipulación reduciendo riesgos y exposición. A su vez hay que tener en cuenta el entrenamiento en el trabajo detrás de pantallas plomadas y manipulación y procesamiento de muestras activas.

La elución del tecnecio, fue llevada a cabo por personal del laboratorio debido a que es una práctica que puede generar dosis y en mi caso no soy personal ocupacionalmente expuesto de la instalación.

Al momento de realizar el procedimiento de marcación, el agregado del  $^{99m}\text{Tc}$  fue realizado detrás de pantalla de fraccionamiento. Utilizando a su vez blindajes para los viales donde se mantuvieron las soluciones de  $^{99m}\text{Tc}$  y donde

también se realizaron las marcaciones. En la Figura 14 se observan los blindajes para cada uno de los viales correspondientes a cada protocolo. Se tomó la precaución de colocar sobre la superficie, un material impermeable y por encima un paño absorbente para contener cualquier eventual derrame de material radiactivo. A su vez se dispuso de pinzas que permitieron manipular los viales aplicando la distancia entre la fuente y mi mano, para reducir la posible irradiación externa. Para medir pH de cada una de las soluciones de marcación se utilizaron cintas descartables.

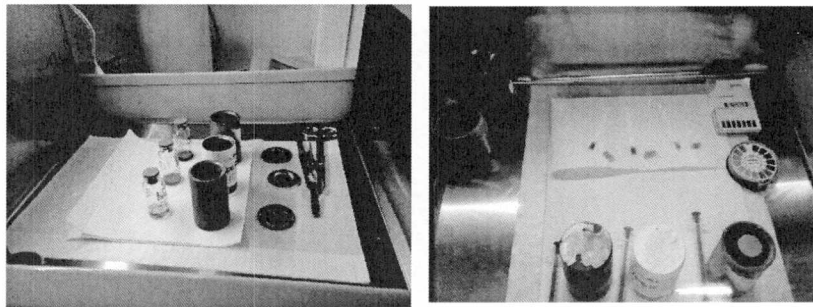


Figura 14: Área de trabajo detrás de pantalla plomada. A) Viales y sus correspondientes contenedores para su blindaje y pinzas, B) viales dentro del blindaje y las tiras para la determinación del pH

Los viales permanecieron detrás de pantalla y dentro de sus respectivos blindajes durante el tiempo de incubación.

Para la determinación de la pureza radioquímica de cada solución se tomaron muestras (una gota) con jeringa, sin sacar los viales de sus blindajes. Las cubetas cromatográficas se mantuvieron detrás de pantalla de fraccionamiento. Se realizaron marcas con tinta de diferente color para cada tira como control visual de corrida (Fig. 15 A). De esa manera fue posible controlar que la fase móvil no se pase de la corrida evitando irradiación externa y de cristalino, ya que permite un control rápido de seguimiento detrás de pantalla. Sobre un papel absorbente

fueron trasladadas y colocadas sobre el colimador para la correspondiente adquisición de imágenes.

El colimador de la cámara gamma fue cubierto por material impermeable y por encima material absorbente, para evitar cualquier posible contaminación tanto en la adquisición de imágenes de las tiras cromatográficas como de una eventual orina de los animales anestesiados (Fig. 15 B y C).

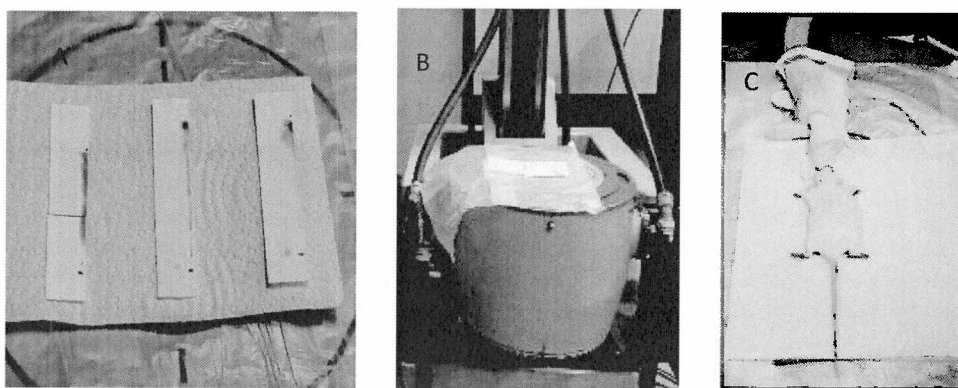


Figura 15: A) tiras cromatográficas sobre papel absorbente; B) colimador de alta sensibilidad con protección; C) ratón bajo efecto de anestesia sobre el colimador cámara gamma Ohio utilizada para la adquisición de imágenes,

El inculo de animales y la posterior eutanasia, necropsia y disección de órganos fueron llevadas a cabo por un técnico de bioterio categorizado y con dosímetro personalizado.

Una vez realizada la disección de los órganos, los mismos fueron colocados en recipientes sobre una bandeja cubierta con material impermeable para trasladar los mismos al sector del contador de pozo (Fig. 16). Durante la medición aplique el principio de distancia y tiempo como criterio de protección radiológica, alejando la bandeja y midiendo uno a uno cada órgano y manipulando los recipientes de manera rápida pero segura, disminuyendo el tiempo de exposición.

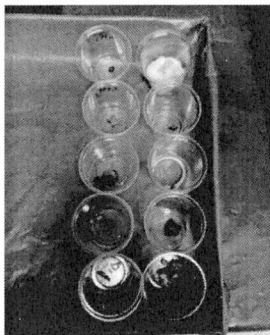


Figura 16: órganos aislados en frascos de plástico para el análisis de biodistribución.

Durante la experiencia realicé la preparación de las soluciones antes de la marcación, procesamiento de las muestras, de resultados y su posterior análisis. No solo es importante conocer las metodologías de trabajo sino también una vez obtenidos los resultados, saber interpretarlos, analizarlos y procesarlos.

Los residuos fueron colocados en una bolsa para descarte. Una vez finalizada la práctica dicha bolsa, debidamente rotulada (fecha de generación, de descarte y nombre del nucleído), fue colocada en el bunker de decaimiento. Una vez transcurridas las 72hs pero antes de su descarte, todos los residuos fueron monitoreados para luego ser debidamente gestionados según sus características

### 3.2) Procedimiento de marcación:

Luego del análisis de las fuentes bibliográficas, se propusieron tres protocolos de marcación directa siguiendo el mismo esquema de procedimiento de marcación (Fig.17A). Cada protocolo fue identificado con número y color: 1 (Azul); 2 (Vede) y 3 (Naranja) (Fig.17B), Cada uno de ellos se desprende de una fuente bibliográfica determinada: A, B y D y E respectivamente. En Araujo *et al* 2015 (C)

no se expresan metodologías de marcación, por lo tanto no se tuvo en cuenta para la propuesta de protocolos.

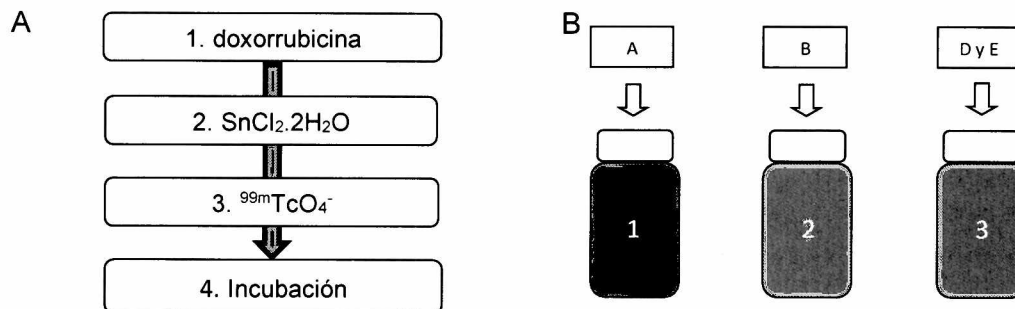


Figura 17: Protocolos de marcación: A) Esquema general del procedimiento de marcación: orden de agregado de reactivos. B) Fuentes bibliográficas analizadas (A, B, Dy E) y los protocolos propuestos a partir de cada uno de ellos: 1, 2 y 3

### Purificación

Se utilizaron filtros de jeringa de 0,22µm (Millipore). Se determinó el porcentaje de Tc coloidal antes y después de dicho filtrado mediante el sistema cromatográfico conformado por ITLC-SG/ Solución Fisiológica.

En la tabla 7 se exponen los volúmenes, actividades y tiempos de incubación para cada uno de los protocolos propuestos. Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente.

Tabla 7: Volúmenes, actividades y tiempo de incubación de cada protocolo propuesto

Protocolos	1	2	3
Doxo	100µl(Doxo 2mg/ml en PBS)	1ml(Doxo 2mg/ml en PBS)	1ml (Doxo 2mg/ml en H <sub>2</sub> O destilada)
Sn <sub>2</sub> Cl	12µl (12ug)	100µl (100µg)	100µl (100µg)
<sup>99m</sup> TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	10mCi	1mCi	1mCi
tiempo incubación (min)	15	30	20

10mCi=370MBq; 1mCi=37MBq

A partir de las metodologías específicas mencionadas se realizó una primera experiencia.

### 3.2.1) Experiencia I

La solución estéril y libre de pirógenos de pertecnecio de sodio se obtuvo con una concentración de actividad (CA) de 35mCi/5ml= 7mCi/ml, de un generador con blindaje de plomo, previamente acondicionado. De acuerdo a esta CA se tomaron los volúmenes necesarios para cada marcación (Tabla 8).

Tabla 8: volumen final resultante en cada protocolo por agregado de buffer, eluido de <sup>99m</sup>Tc teniendo en cuenta doxo y cloruro estannoso

Protocolos I	1	2	3
Volumen doxo+ SnCl <sub>2</sub>	112µl	1,100ml	1,100ml
Ajuste pH	Sin buffer	50µl buffer	50µl buffer
<sup>99m</sup> TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	1,5ml (10mCi)	150ul (1mCi)	150ul (1mCi)
Vol. Final	1,612ml	1,300ml	1,300ml

#### - Controles de Calidad físico-químicos

Se propusieron las siguientes técnicas de controles de calidad (Tabla 9): los resultados obtenidos fueron comparados con valores de referencia de las publicaciones citadas. Solo se realizan pH y pureza radioquímica. Adicionalmente se verifica el aspecto de la solución obtenida aunque no existe referencia para este resultado en ninguna de las publicaciones. Se realizará la comparación con respecto a la solución de doxorubicina original, roja y traslucida.

Tabla 9: Técnicas de los Controles de calidad realizados en la experiencia I

Controles de Calidad		1	2	3
Físico Químicos	Aspecto	Inspección visual directa detrás de vidrio plomado		
	pH	Tiras reactivas de pH		
	Pureza Radioquímica	Cromatografía en placa delgada utilizando ITLC-SG/ FM Acetona y FE ITLC/FM solución fisiológica.		

ITLC-SG/Acetona para la determinación de <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub> y ITLC-SG/Solución fisiológica para la determinación de Tc coloidal

Para la determinación de la pureza radioquímica en las publicaciones utilizan TLC basadas en sistemas cromatográficos conformados por ITLC-SG como Fase estacionaria y como fase móvil, para la determinación del tecnecio libre utilizan Acetona y para la determinación de <sup>99m</sup>Tc coloidal THF o P:W:A. En el laboratorio contamos con THF, pero en la primera experiencia se comparó con solución fisiológica como fase móvil y al obtener los mismos resultados se propuso continuar los controles utilizando este último solvente.

- **Aspecto:**

A partir de la inspección visual, se observó un cambio de coloración y presencia de turbidez en la solución del protocolo 2 con respecto a la solución original. Mientras que en protocolo 1 y 3, las soluciones permanecieron sin turbidez (Tabla 10).

- **pH:**

Tomando como referencia valores de pH de las publicaciones consultadas, en esta primera experiencia mis resultados de pH no cumplen con los valores especificados en los trabajos científicos (Tabla 10).

Tabla 10: Resultados de controles de calidad físico químicos (aspecto y pH).

Controles de Calidad		1	2	3
Físico Químicos	Aspecto	<i>rojo claro</i>	<i>rojo intenso oscuro, algo turbio</i>	<i>rojo Sin cambios</i>
	pH	5	8	4
	pH de publicación de referencia	6-7	7,4	6

Se incluye los valores de pH obtenidos en las respectivas publicaciones de referencia.

- *Pureza Radioquímica:*

En esta experiencia se tomaron los datos de Rf de cada especie radioquímica a partir de imágenes adquiridas en cámara gamma (imágenes no mostradas) y de bibliografía complementaria<sup>9</sup> para luego determinar el Rf de corte de las tiras cromatográficas de ambos sistemas, para su posterior medición en contador de centelleo sólido de pozo.

Debido a que en esta primera experiencia, los procedimientos abordados en cada uno de los protocolos mostraron una baja pureza radioquímica (Tabla 11). Se realizó un paso de purificación utilizando filtros de 0,22µm para eliminar la especie coloidal. Se muestran datos luego de la purificación.

Tabla 11: Pureza radioquímica resultante de la marcación de doxorubicina de cada protocolo. Se muestra cada impureza y su Rf.

Experiencia I		Protocolos			
		1	2	3	
	Rf	%	%	%	
	<sup>99m</sup> TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	5	63	4	
	<sup>99m</sup> Tc coloidal (con filtrado)	0-0,1	71	23	90
<b>Total de impurezas (%)</b>		<b>76</b>	<b>86</b>	<b>94</b>	
<b>Pureza Radioquímica de <sup>99m</sup>Tc-doxo (%)</b>		<b>&lt;30</b>	<b>&lt;20</b>	<b>&lt;10</b>	

Una vez evaluados estos resultados, observamos que los valores de pH fueron diferentes a los valores de referencia de la literatura utilizada. Por lo que se

repetieron los protocolos propuestos en una segunda experiencia ajustando volúmenes de buffer empelados.

### 3.2.2) Experiencia II

Para este segundo ensayo se obtuvieron 120mCi/5ml en el eluido. Debido a la alta actividad, se decidió diluirlo para obtener una CA de 24mCi/6ml= 4mCi/ml. En la Tabla 12 se muestra nuevo volumen de buffer utilizado en Exp II (variable que se cambió debido a los resultados de la Exp I), volumen y actividad del eluido y volumen final de la solución en Exp II.

Tabla 12: Protocolos de la Experiencia II: volumen reactivos y nuevo volumen de buffer de la Exp II, actividad y volumen final de Exp II para cada protocolo

Protocolos II	1	2	3
Volumen doxo+ SnCl <sub>2</sub>	112µl	1,100ml	1,100ml
Ajuste pH (ExpII)	50µl buffer	Sin buffer	50µl buffer
<sup>99m</sup> TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	2,5ml (10mCi)	250ul (1mCi)	250ul (1mCi)
Vol. Final	2,662ml	1,350ml	1,400ml

#### -Controles de Calidad

En la tabla 13 se expresan los controles de calidad realizados en la segunda experiencia.

Tabla 13: Controles de calidad realizados en la experiencia II

Controles de Calidad		1	2	3
Físico Químicos	Aspecto	Inspección visual		
	pH	Tiras de pH		
	Pureza Radioquímica	Cromatografía en placa delgada utilizando ITLC-SG/ FM Acetona y FE ITLC/FM solución fisiológica.		
Biológico	Distribución biológica	En 6 ratones Balb-c sanos, administrados vía endovenosa y analizados a 1 hora post administración, resultados in vivo y ex vivo		

Los resultados de los controles fisicoquímicos nuevamente fueron comparados con los obtenidos en las publicaciones.

- *Aspecto*

Luego de la inspección visual, en protocolos 1 y 3, se observó turbidez y de un color violáceo y rojo oscura respectivamente (Tabla 14), mientras que en el protocolo 2 no se observaron cambios con respecto a la solución original. Los colores de los viales pueden ser distinguidos en la figura 18 A y B.

- *pH*

En esta experiencia obtuve valores similares a los de referencia, cercanos a la neutralidad (Tabla 14). En la figura 18 C se observan las tiras de pH de cada protocolo detrás de pantalla plomada

Tabla 14: Resultados de controles de calidad físico químicos (aspecto y pH) de la Experiencia II

Controles de Calidad		1	2	3
Físico Químicos	Aspecto (Figura 14A)	color violeta, algo turbia.	Rojo Sin cambios	rojo oscuro, turbia.
	pH experimental (Figura 14B)	7-7,5	6-6,5	7-7,5
	pH de publicación de referencia	6-7	7,4	6



Figura 18: A y B) Viales correspondientes a las soluciones detrás de pantalla plomada luego del agregado de <sup>99m</sup>Tc, de abajo hacia arriba viales 1, 2 y 3, C) Luego de medición de pH, tiras correspondientes a cada vial.

- *Pureza Radioquímica*

Se utilizaron sistemas cromatográficos de placa delgada con fase estacionaria de ITLC-SG combinado con diferentes fases móviles según la determinación de impurezas radioquímicas. Para  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  se utilizó acetona y para  $^{99m}\text{Tc}$  coloidal se utilizó solución fisiológica.

Finalizada la corrida cromatográfica, se adquirieron imágenes de las tiras bajo cámara gamma planar (Fig. 19). Se observa la tinta indicadora a lo largo de las tiras como control visual de corrida.

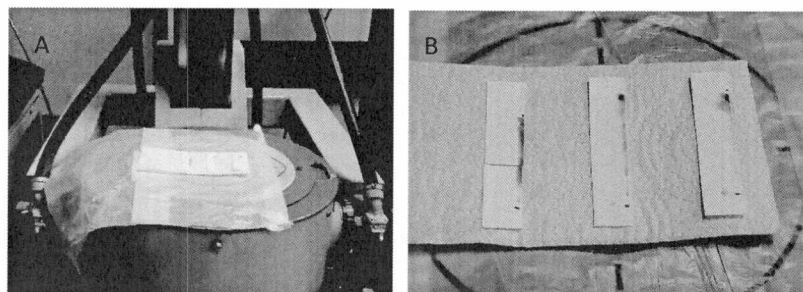


Figura 19: A y B) Tiras de ITLC sobre el colimador para determinación de distribución de actividad. Cada color corresponde a los distintos protocolos.

Una vez obtenidas las imágenes de las tiras se confirmaron los Rf de cada componente de la muestra (Tabla 15) y se decidieron los Rf de corte ( $R_f=0,5$ ) para la posterior medición de cada fragmento de las tiras en contador de pozo y cálculo de impurezas.

Tabla 15: Relación de Frente (Rf) de cada componente en cada sistema cromatográfico

Fase Estacionaria	ITLC-SG	ITLC-SG
Fase Móvil	Acetona	Solución fisiológica
Rf=1 Frente de corrida	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$^{99m}\text{TcO}_4^-$ $^{99m}\text{Tc-doxo}$
Rf=0-0,1 Punto de siembra	$^{99m}\text{Tc}$ coloidal $^{99m}\text{Tc-doxo}$	$^{99m}\text{Tc}$ coloidal

Se expresan los resultados de impurezas radioquímicas junto a las imágenes de dichas tiras utilizadas para su determinación en cada uno de los protocolos (Fig. 20, 21 y 22). En el caso del sistema con solución fisiológica se muestran los resultados antes y después del paso de purificación por filtración (flecha azul). En líneas punteadas se señala el Rf de corte y a su vez, se muestran el punto de siembra (PS), el frente de corrida (FC) y los Rf de cada especie radioquímica y su porcentaje respecto a la solución. Las flechas blancas indican los valores utilizados para el cálculo de pureza radioquímica. En el protocolo 1 se obtuvo una pureza radioquímica después del filtrado del 90%, en el protocolo 2 del 92% y en el protocolo 3 de 75%. En las publicaciones de referencia los valores alcanzados de pureza radioquímica fueron 99% (A, Faheem), 92% (B, Fernandes), y 95 y 97,4% (D y E, Kumar).

Protocolo 1

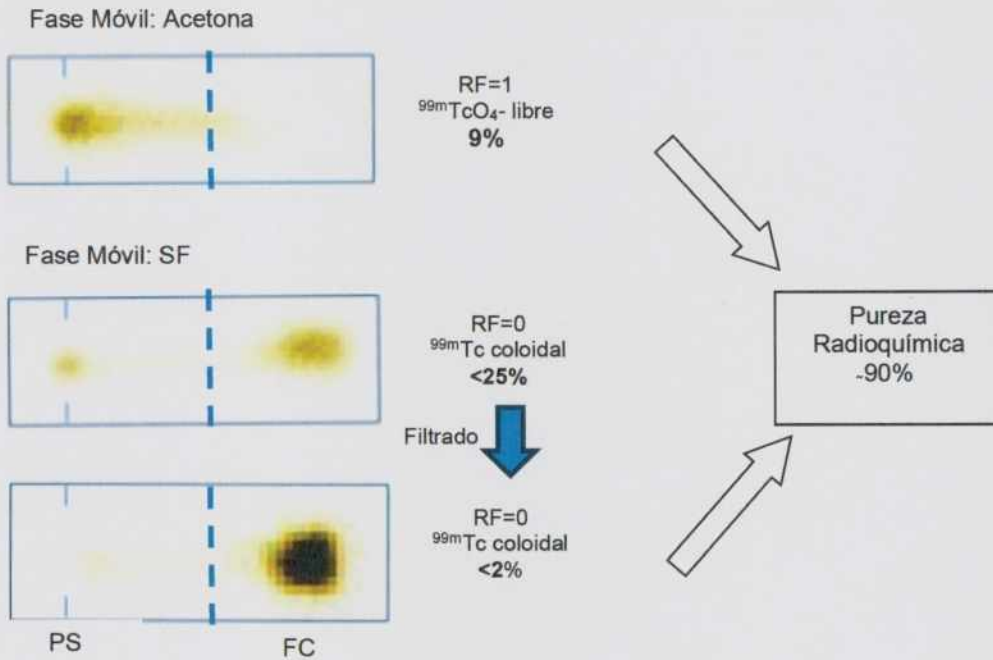


Figura 20: Imágenes centellográficas de las tiras de ITLC, indicando el Rf de corte (con línea punteada), el Rf cada impureza y la pureza radioquímica del protocolo 1. Flecha azul indica el filtrado. Flechas blancas indican valores utilizados para el cálculo de pureza radioquímica.

• Protocolo 2

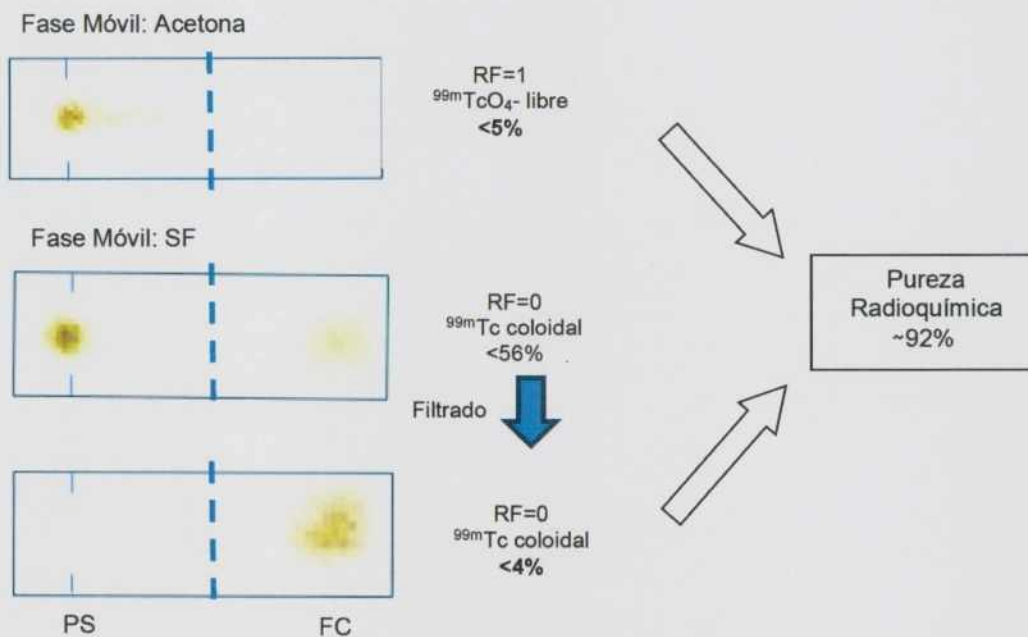


Fig. 21: Imágenes centellográficas de las tiras de ITLC, indicando el Rf de corte (con línea punteada), el Rf cada impureza y la pureza radioquímica del protocolo 2. Flecha azul indica el filtrado. Flechas blancas indican valores utilizados para el cálculo de pureza radioquímica

• Protocolo 3

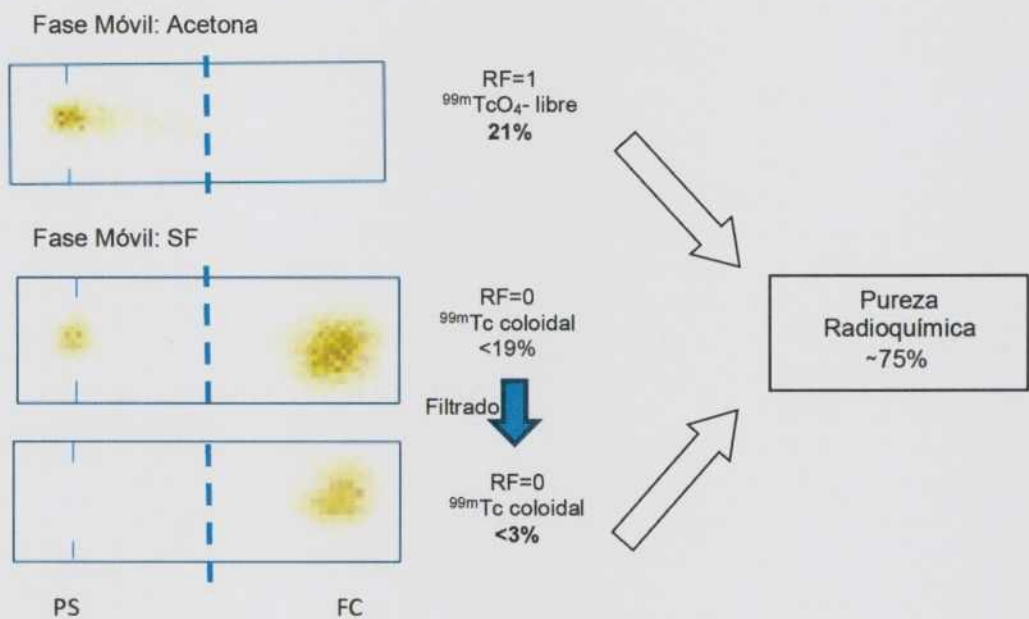


Fig. 22: Imágenes centellográficas de las tiras de ITLC, indicando el Rf de corte (con línea punteada), el Rf cada impureza y la pureza radioquímica del protocolo 3. Flecha azul indica el filtrado. Flechas blancas indican valores utilizados para el cálculo de pureza radioquímica

- Control Biológico

*Adquisición de Imágenes*

Las imágenes fueron adquiridas con los animales del protocolo 1. Se expone una imagen representativa del grupo de ratones (Figura 23). Una vez obtenidas las imágenes se buscaron focos captantes. Se puede distinguir en la zona abdominal, las siluetas renales los riñones y la vejiga con alta captación indicando la probable vía de eliminación de este compuesto. Asimismo, se puede observar la silueta del animal con fondo captante circulante indicando la probable presencia de  $^{99m}\text{Tc}$ -doxo en sangre. En la imagen no se aprecia infiltración en el sitio de inyección indicando una administración exitosa. No se observa contaminación de colimador ni del cuerpo del animal, así como tampoco se observa captación en glándulas tiroides y/o estómago compatibles con la presencia de  $^{99m}\text{Tc}$  libre, ni de bazo y/o sombra hepática compatible con la distribución de captación de impurezas coloidales, en ambos casos provenientes de la marcación o de la descomposición in vivo de la molécula marcada.

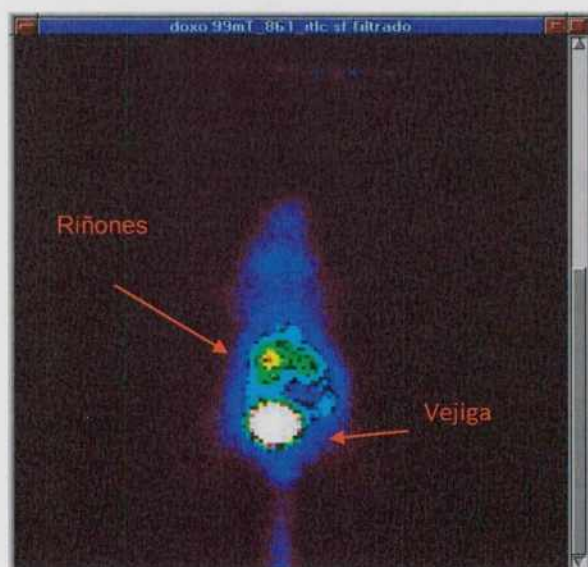


Figura 23: Imágen centellográfica de la distribución de captación de  $^{99m}\text{Tc}$ -doxorubicina elaborada según el protocolo 1 en ratón balb-c1 hora post-administración endovenosa.

*-Distribución Biológica*

La distribución de captación del  $^{99m}\text{Tc}$ -doxo en cada órgano se expresa como el porcentaje de la actividad neta inyectada por gramo de tejido (%AI/g). En el gráfico 1, se muestran los resultados promedio obtenidos en los grupos correspondientes a cada uno de los protocolos.

Los ratones administrados con  $^{99m}\text{Tc}$ -doxo siguiendo el protocolo 1 (azul), muestran un alto porcentaje de actividad en estómago y riñones, al igual que en protocolo 3. Mientras que los administrados con protocolo 2 arrojaron mayores porcentajes de actividad en riñones.

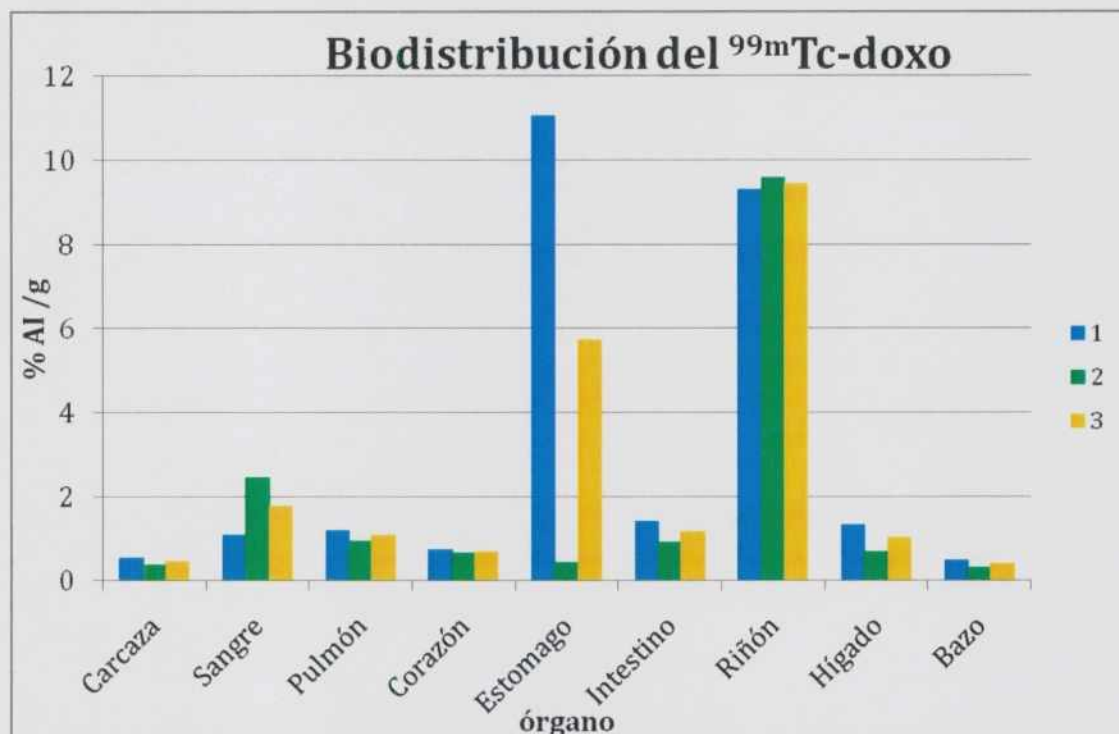


Gráfico 1: Biodistribución de  $^{99m}\text{Tc}$ -doxo. Promedio de porcentajes de actividad neta inyectada por gramo de tejido (%AI/g), entre ratones de cada grupo (n= 6 ratones Balb-c, dos de cada protocolo). La numeración de la leyenda corresponde al número de protocolo

#### **Capítulo 4: Discusión y conclusión**

Toda práctica que involucre manipulación de radioisótopos debe estar justificada, debe llevarse a cabo respetando los límites y las restricciones de dosis establecidas, efectuando la optimización de la protección radiológica y previniendo adecuadamente la posibilidad de accidentes. Por esta razón es de gran importancia contar con procedimientos operacionales conocidos y actualizados, así como una buena planificación de la práctica, utilizando vestimenta y herramientas adecuadas para evitar dosis recibida por contaminación.

Las técnicas de marcación tienen un componente teórico el cual fue abordado en la especialización, por ejemplo en cuanto a los tipos de marcación, factores que influyen en la eficiencia y rendimiento de la marcación, así como las características que se buscan en un radiotrazador de acuerdo al objetivo de la práctica. En esta experiencia se llevó a cabo la marcación de doxorubicina con tecnecio partiendo de información proporcionada por fuentes bibliográficas, como primera aproximación a la manipulación de radioisótopos y técnicas de marcación de moléculas.

En primer lugar hice una búsqueda bibliográfica y análisis que me permitió establecer condiciones generales de ensayo para la marcación de doxorubicina con tecnecio. Sin embargo, la exacta reproducibilidad de los protocolos publicados no fue posible debido a que tuve que adaptarlos a los materiales, equipos y herramientas disponibles en la instalación, al momento de la práctica. Otro factor que limitó la reproducibilidad fue la ausencia de datos de procedimiento en algunas publicaciones. Considerando que se trata de un ensayo preliminar y de mi iniciación en técnicas de marcación, me focalicé en proponer tres protocolos siguiendo la metodología de las publicaciones y en caso de adaptaciones, que estas sean sencillas para una manipulación del material más rápida y segura. Teniendo en cuenta principios fundamentales de protección radiológica.

Las propias características físicas y químicas del  $^{99m}\text{Tc}$  que lo hacen un radioisótopo ideal para la elaboración de radiofármacos para diagnóstico, me permitieron aplicar métodos sencillos de manipulación. La estructura química del  $^{99m}\text{Tc}$  en este caso y de la doxo, permite un método de marcación directo, simple y rápido, sin la necesidad de contar con agentes quelantes bifuncionales. Sin embargo, la química de formación del  $^{99m}\text{Tc}$ -doxo no se conoce con exactitud, se asume que se forma un complejo quelante entre una o más moléculas de doxo unidas a un  $^{99m}\text{Tc}$  reducido<sup>19</sup>. La unión directa se produce entre el radionucleído, de carácter catiónico y los electrones disponibles de los grupos funcionales como  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{O}-$  de la doxorubicina<sup>2</sup>.

Sin embargo, la reducción de Tc (VII) del eluido, a un menor estado de oxidación es condición necesaria para la formación de complejos del tecnecio. El agente reductor más utilizado, incluyendo las publicaciones consultadas, es el  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , debido a su baja toxicidad, gran poder reductor y buen rendimiento de marcación.<sup>11</sup> El grado de reducción depende del oxígeno presente, es decir de una buena técnica de manipulación, de la relación estequiométrica entre el Sn/ Tc, de las condiciones en que se lleve a cabo la reacción (pH, ligeramente ácido y temperatura ambiente) y de la presencia y naturaleza química del ligante. La forma y técnica de preparación es muy importante y puede tener mucha influencia en el rendimiento de la reacción.<sup>11</sup>

En ninguna de las publicaciones consultadas se mostró el procedimiento de preparación del  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , por lo tanto se adoptó una metodología conocida y ya utilizada en el laboratorio. Los compuestos del estaño tienen una química complicada. El ion estannoso es fácilmente oxidable por agentes oxidantes como por ejemplo el  $\text{O}_2$  del aire y sobretodo en solución, durante un procedimiento de marcación debido a la baja concentración de Sn utilizada. Por lo tanto se requiere de un especial cuidado durante su preparación para evitar su oxidación e hidrólisis. La cantidad de  $\text{SnCl}_2$  es optimizada empíricamente, manteniendo el balance entre dos parámetros: por un lado que el Sn esté presente en exceso con

respecto a la actividad del pertecneio utilizado y por otro lado que esa cantidad a su vez sea lo mínima posible para evitar una mayor reducción a menores estados de oxidación. Por esta razón es muy importante la práctica y el re entrenamiento en los procedimientos.

En esta experiencia, la relación estequiométrica Sn/TC se mantuvo igual a las publicaciones de referencia en cada protocolo y se trabajó a temperatura ambiente, debido a que en estas condiciones, en las publicaciones consultadas, obtienen eficiencias mayores al 92% en todos los casos. En cuanto al pH, el mismo fue ajustado utilizando el buffer disponible en el laboratorio (carbonato/bicarbonato) en vez de NaOH utilizado en las publicaciones. El aspecto de las soluciones durante el procedimiento fue diferente según el pH de la solución. En los casos donde el agregado de buffer llevó el pH a la alcalinidad (protocolo 2, Exp I) la solución se observó turbia y de color oscuro a violáceo. Por el contrario, en la Exp II, sin agregado de buffer, el pH bajó a 6-6,5 y la solución permaneció roja y traslúcida como la solución de doxorubicina original, obteniendo en este caso una pureza radioquímica del 92%. Es decir que evidentemente hubo una alteración en la estructura química de la molécula, que fue corregida ajustando el pH a un valor ligeramente ácido. Kumar *et al.* han reportado que la estructura química de la doxo se hidroliza en condiciones alcalinas<sup>21,22</sup>. En mi caso realicé un ajuste de pH que mejoró los resultados, posiblemente por la conservación de la estructura química de la doxo pero también teniendo en cuenta que a este pH la química del SnCl<sub>2</sub> también se ve favorecida para la reducción del <sup>99m</sup>Tc. Ambos factores ayudarían a reducir las impurezas. A su vez en cuanto a la presencia del ligando, en mi experiencia asumo que se utilizó menos cantidad debido a que la doxorubicina comercial utilizada posee una sexta parte de doxo activa y el resto es excipiente.

En todos los trabajos proponen un método de purificación mediante el uso de filtros de jeringa de 0,22µm, para eliminar el radiocoloide. En el caso de Kumar *et al.*, 2015, donde publican la formulación de un kit de este radiocompuesto, proponen una filtración antes del agregado de tecnecio, el cual en mi caso no fue

incluido en el procedimiento. En mi experiencia la implementación del paso de purificación en los tres protocolos redujo significativamente el porcentaje de impurezas coloidales de tecnecio, a valores menores del 5%. A partir de este procedimiento de filtración es posible disminuir impurezas coloidales pero reduciendo el rendimiento de la marcación e incorporando un paso de posible exposición y mayor generación de residuos. La técnica debe ser realizada con cuidado ya que por ejemplo en mi caso al no tener completa experiencia, no realicé dicho procedimiento. Este tipo de filtros son utilizados comúnmente como método para esterilizar, por lo tanto al incluir este paso de filtración no solo se consigue purificar sino también controlar la esterilidad de la solución ya que se trabajó en ambiente no controlado. De todos modos sería conveniente confirmar dicha esterilidad mediante ensayos in vitro.

Las marcaciones siguiendo los protocolos 1, 2 y 3 resultaron en una pureza radioquímica de 90, 92 y 75% respectivamente, mientras que en las publicaciones de referencia fueron en Faheem 99% (A), Fernandes 92% (B), y en Kumar 95 y 97,4% (DyE). Factores como la preparación del  $\text{SnCl}_2$ , el buffer utilizado y sobretodo la menor cantidad de ligando respecto al Sn y Tc en los tres protocolos, podrían ser los causantes de no haber alcanzado la pureza radioquímica que se expresa en publicaciones de referencia. El uso de PBS (protocolos 1 y 2), por su pH 7.4, contribuye a la estabilidad de las moléculas durante el proceso de marcación<sup>2</sup> con respecto al uso de agua destilada en protocolo 3, un factor que pudo haber influido en los resultados. Durante mi práctica, debo considerar un posible ingreso de  $\text{O}_2$  al vial, el cual pudo haber ocurrido por defectos de cierre o debido a mi propia manipulación, antes del agregado de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , lo cual pudo afectar las condiciones de reacción para el Sn y consecuente reducción del  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .

Las especies radioquímicas de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  que pueden resultar de la elaboración de los radiofármacos empleando Sn como reductor pueden ser:  $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$  libre y Tecnecio reducido-hidrolizado o "coloide". Es de gran importancia mantener el nivel de impurezas dentro de los valores aceptables para un radiofármaco. Si el

porcentaje de impurezas es mayor al 10%, se corre el riesgo de que el radioisótopo se dirija hacia órganos o tejidos no deseados, produciendo una irradiación innecesaria y una imagen de mala calidad diagnóstica. Mediante el método cromatográfico ITLC-SG puede determinar el porcentaje de impurezas en cada uno de los protocolos y con estos resultados establecer el porcentaje de pureza radioquímica.

Debido al proceso de purificación por filtración, la mayor proporción de impurezas va a estar dada en los tres protocolos por el Tc libre. Este puede producirse por una reducción incompleta o reoxidación posterior. Como se mencionó anteriormente, uno de los factores que podría haber influenciado es el ingreso de oxígeno a los viales durante la práctica, consumiendo el cloruro de estaño presente y evitando la correcta reducción del  $^{99m}\text{Tc}$  aumentando el porcentaje de impurezas. A su vez, al contar con poca experiencia práctica, la propia técnica de manipulación puede también influir en los resultados.

Con respecto a las imágenes centellográficas, en Fernandes *et al*, 2016 (B), analizan adquisiciones en ratón a 1, 4 y 8 hs. En mi experiencia, la imagen centellográfica presentada correspondiente al protocolo 1, fue realizada a 1 hora de biodistribución. Si bien este protocolo fue propuesto en base a la metodología de la publicación A (Faheem *et al* 2012), las imágenes adquiridas, se corresponden a los procedimientos descritos en la publicación B (Fernandes *et al* 2016). Por esta razón, me fue posible comparar con la imagen a 1 hora. Tanto en esta publicación como en mi experiencia, la imagen mostró riñones y vejiga como foco captante, indicando una vía de eliminación del radiotrazador. En Fernandes *et al*, obtienen una pureza radioquímica del 92 %, mientras que en mi caso obtuve una pureza radioquímica del 90% y un porcentaje de  $^{99m}\text{Tc}$  libre cercano al 9%. Este valor no tuvo implicancias en la interpretación de la distribución biológica e imágenes diagnósticas ya que no se observó captación ni en estómago ni en tiroides, siendo estos sitios de distribución de  $^{99m}\text{Tc}$  libre. En esta imagen se

corroboró el bajo porcentaje de Tc coloidal, debido a la purificación. Ya que no se observó ni hígado ni bazo captantes.

Por otro lado, en Kumar *et al* 2015 en imágenes de conejos sanos obtienen mayor captación en hígado, bazo, riñones y vejiga, con una pureza radioquímica del 99%. Los autores explican que el radiotrazador sigue un metabolismo hepatobiliar y como vías de eliminación la hepática y renal como la doxorubicina sin marcar.

En cuanto a los ensayos de biodistribución únicamente en Kumar *et al*, 2012, expresan sus resultados en % AI/g de tejido, obteniendo mayor porcentaje en riñones, bazo e hígado, nuevamente explicando la eliminación por vía renal y hepática. Comparando con mis resultados, en los tres protocolos se obtuvo un elevado porcentaje de actividad inyectada en riñones indicado una vía de eliminación como en Kumar *et al* 2012. Sin embargo, en protocolo 1 y 3 se observó muy elevado el porcentaje de actividad en estómago. Esto se corresponde por un lado con el valor de Tc libre obtenido en protocolo 3, cerca del 20%, siendo el factor más influyente en la baja pureza radioquímica mientras que, en protocolo 1 el  $^{99m}\text{Tc}$  libre si bien resultó en un 9%, en la imagen centellográfica no se observó el estómago como foco captante. Esto podría deberse a que el estómago, al ser un órgano grande, si hay un alto porcentaje de actividad, al no estar concentrada en un pequeño tamaño no se distingue como foco de captación. Además los resultados de biodistribución se expresaron como un promedio entre los valores obtenidos de los ratones inoculados con radiotrazador elaborado siguiendo protocolo 1.

Como perspectivas a futuro, se realizarán ensayos a partir del protocolo de mejor resultado (2, con 92% de pureza radioquímica) con el objetivo de lograr la optimización y obtención de mejores resultados e incrementar mi entrenamiento. A

su vez mejorar la relación ligando y Sn/Tc, para reducir la formación de impurezas y mejorar el rendimiento de la marcación.

La incorporación de un elemento extraño a la molécula a marcar, como en este caso, puede alterar las propiedades químicas y biológicas de la molécula. Por esta razón sería prudente realizar ensayos donde se pueda comprobar si la marcación afecta la actividad biológica y el comportamiento de la doxo. Así como también estudiar la estabilidad de la marcación tanto in vitro como in vivo.

Esta experiencia preliminar me permitió familiarizarme con la manipulación de radioisótopos, incorporar conocimientos básicos en las técnicas de marcación y las diferentes metodologías, así como cada uno de los factores a tener en cuenta para realizar la práctica. Encontré muy satisfactoria esta práctica, ya que me llevó a asentar muchos conceptos generales y específicos vistos durante la especialización. Los resultados preliminares obtenidos me dan la pauta de qué camino seguir en cuanto a la marcación de la doxorubicina.

## **Capítulo 5: Referencias Bibliográficas**

1. Sopena Novales, M.C. Plancha Mansanet, C. Martinez Carsi, R. SopenaMonforte. Medicina nuclear y radiofármacos. 2014, 56:1-44.
2. Fernandes R S, Silva J. O., Lopes S. C.A., Chondrogiannis S, Rubello D, Cardoso V. N., Oliveira M. C., Ferreira L. A.M, de Barros A. L.B. Technetium-99m-labeled doxorubicin as an imaging probe for murine breast tumor (4T1 cell line) identification Nuclear Medicine Communications 2016, 37(3): 307-312
3. Farmacopea Argentina. Ministerio de salud de la Nación, Secretaria de Políticas, Regulación e institutos, Administración Nacional de alimentos, medicamentos y tecnología médica ANMAT, Instituto Nacional de medicamentos INAME, 8va Edición
4. Kowalsky, R. J.; Falen, S. W.; Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy and Nuclear Medicine; American Pharmacist Association DC, 2004; 256-277.
5. Autoridad Regulatoria Nuclear. AR 10.1.1: Norma básica de seguridad radiológica, Revisión 3. Aprobada por Resolución del Directorio de la Autoridad Regulatoria Nuclear N° 22/01 (Boletín Oficial 20/11/01). Modificada por Resolución del Directorio de la Autoridad Regulatoria Nuclear N°230/16 (Boletín Oficial 29/04/16). República Argentina, impresión 2006
6. Autoridad Regulatoria Nuclear. AR 8.2.4: Uso de fuentes radiactivas no selladas en instalaciones de medicina nuclear, revisión 1. Aprobada por Resolución del Directorio de la Autoridad Regulatoria Nuclear N° 18/02 (Boletín Oficial 22/7/02) República Argentina, impresión 2003
7. Olivas B B, Belinda L, Torres Lovaton B, Mancy M. Farmacocinética de compuestos marcados con tecnecio-99m y samario 153. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica trabajo de aptitud profesional para optar el título de: químico farmacéutico Asesor: lie. Mario Cóndor Escobar Lima – Perú 1997
8. Conde SuárezE. "Preparación del radiofármaco  $^{99m}\text{Tc-hynic-[lys]}^3\text{-bn}$ " tesis que para obtener el título de: químico farmacéutico biólogo facultad de química universidad autónoma del estado de México. Dra. Guillermina Ferro Flores asesor externo Dr. Fernando Ureña Nuñez asesor interno. Toluca, México. Febrero de 2007.

9. Chain Y, Illanes L.. Rafofarmacos en medicina nuclear. Fundamentos y aplicación clínica. Facultad ciencias exactas. Universidad Nacional de la plata, Libro de catedra, 2015
10. Gómez Perales J L. Radiofarmacia. Puerta del Mar University Hospital, Cádiz, Spain 2016. [www.researchgate.net/publication/304527146](http://www.researchgate.net/publication/304527146)
11. Ilse Zolle. Technetium-99m pharmaceuticals. Preparation and quality control in nuclear medicine. Springer Berlin Heidelberg. 2007
12. Magill J, Pfennig G, Dreher R, Sóti Z. Karlsruhe Nuclide Chart 7<sup>th</sup> Edition 2006
13. Physics and radiobiology of nuclear medicine. Gopal Saha. Second Edition. 2001. Capítulos 1-2
14. Jordan O, Denys A, De Baere T, Boulens N, and Doelker E. Comparative Study of Chemoembolization Loadable Beads: In vitro Drug Release and Physical Properties of DC Bead and Hepasphere Loaded with Doxorubicin and Irinotecan. *JVascIntervRadiol* 2010;21:1084–1090
15. Bruix J, Sala M, Llovet JM. Chemoembolization for Hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;127:179-88.
16. Rivera Figueroa E. Desarrollo de microesferas cerámicas porosas para aplicaciones en quimioterapia interna selectiva a tumores malignos. Tesis carrera de maestría en ingeniería. Director, Mónica Guraya. Co-director, Miguel Oscar Prado. Departamento de materiales nucleares - división de aplicaciones médicas e industriales. Instituto Balseiro, Universidad Nacional de cuyo, Comisión Nacional de Energía Atómica, Argentina (CNEA), 2012
17. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni I. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*. 2004; 56:185–229.

18. Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 1999; 57:727–741
19. Faheem A. R, Tanveer H. B, Roohi S, Mushtaq A.. Direct labeling of doxorubicin with technetium-99m: its optimization, characterization and quality control *J RadioanalNuclChem.* 2012; 293:303–307
20. Araujo F I, Proença F P P, Ferreir C G, Ventilari S C, Rosado de Castro P H, Moreira R D, Fonseca L M B, Souza S A L, Gutflen B. Short communication. Use of <sup>99m</sup>Tc-doxorubicin scintigraphy in females with breast cancer: a pilot study. *Br J Radiol.* 2015; 88.
21. Kumar P, Singh B, Ghai A, Hazari P, Mittal B. R., and Mishra A K.. Development of a single vial kit formulation of [<sup>99m</sup>Tc]-labeled doxorubicin for tumor imaging and treatment response assessment preclinical evaluation and preliminary human results. *J. Label Compd. Radiopharm* 2015, 58: 242–249
22. Kumar P, Singh B, Sharma S, Ghai A, Chuttani K, Mishra A. K., Dhawan D., Mittal B. R. Preclinical Evaluation of [<sup>99m</sup>Tc]-Labeled Doxorubicin as a Potential Scintigraphic Probe for Tumor Imaging. *Cancer biotherapy and radiopharmaceuticals.* 2012. 27 (3): .221-226