

20, 9



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
ZARAGOZA**

**"ESTUDIO COMPARATIVO DE REACTIVOS
MARCADOS CON Tc-99m EN LA EVALUA-
CION DE LA FUNCION BILIAR"**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :
GUILLERMINA FERRO FLORES



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

Página

1. INTRODUCCION	
1.1. Radiofármacos Hepatobiliares.	1
1.2. Algunos aspectos del Tecnecio	13
1.3. Estructura y Biodistribución de complejos Tc-99m-HIDAS	23
1.4. Gammagrafia Hepatobiliar.....	26
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	36
3. FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA	38
4. OBJETIVOS	40
5. HIPOTESIS	41
6. MATERIAL Y METODOS	42
7. RESULTADOS	65
8. DISCUSION DE RESULTADOS	82
9. CONCLUSIONES	92
10. BIBLIOGRAFIA	94
11. ANEXO 1	99
12. ANEXO 2	100

1. INTRODUCCION

1.1 RADIOFARMACOS HEPATOBILIARES

La constante aparición de nuevos radiofármacos hepatobiliares que argumentan ser "los mejores" nos conduce, inevitablemente, a tratar de establecer las características del radiofármaco "perfecto" y, en base a ello, realizar un análisis de los logros obtenidos en los agentes hepatobiliares hasta hoy desarrollados.

En general, el mejor radiofármaco debe excretarse rápida y únicamente a través de la zona patofisiológica de interés, es decir, una eficiencia de extracción por parte de los hepatocitos del 100% con una rápida excreción al canalículo biliar provocando, de esta forma, un constante flujo radiactivo que permita una adecuada visualización de detalles anatómicos tales como los ductos intrahepáticos (alta sensibilidad). Estas propiedades no deben verse alteradas en pacientes ictericos, por lo tanto, el radiofármaco debe ser capaz de desplazar a las bilirrubinas en sitios de unión a proteínas. (2, 29 y 32)

En cuanto a su producción y control radioquímico es deseable un rápido radiomarcaje con alta pureza radioquímica y estabilidad. (1, 2 y 34)

El desarrollo de dichos agentes se inicia en 1923(17) cuando Delprat propone al Rosa de Bengala como un fármaco para evaluar la función hepática. En 1955 (18) Taplin sintetiza I-131-rosa de bengala, este agente tuvo poco uso clínico, pero influyó lo suficiente para impulsar el desarrollo de otros tipos de compuestos marcados con I-131 y I-123, algunos de éstos incluyen bromosulfaleína, verde de indocianina y I-123-rosa de bengala.

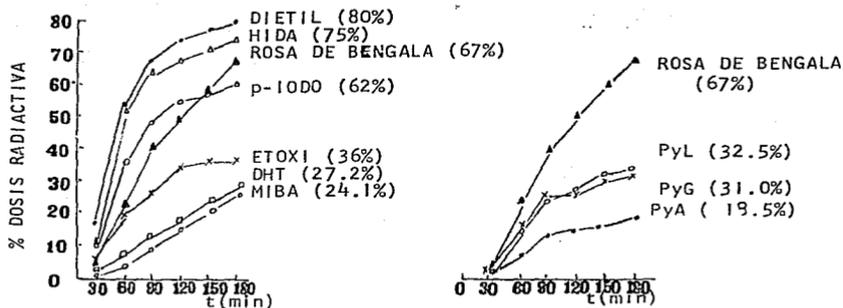
Posteriormente, en 1972(19), se reporta el marcaje de Penicilamina con Tc-99m como un nuevo agente colescintigráfico; desde este reporte a la fecha han aparecido alrededor de 30, nuevos e improvisados, agentes hepatobiliares marcados con Tc-99m.

De estos radiofármacos han surgido dos grandes clases; la primera tiene innovación con el uso del Tc-99m-piridoxilidenglutamato (Tc-PG), producto de la unión de Tc-99m a la

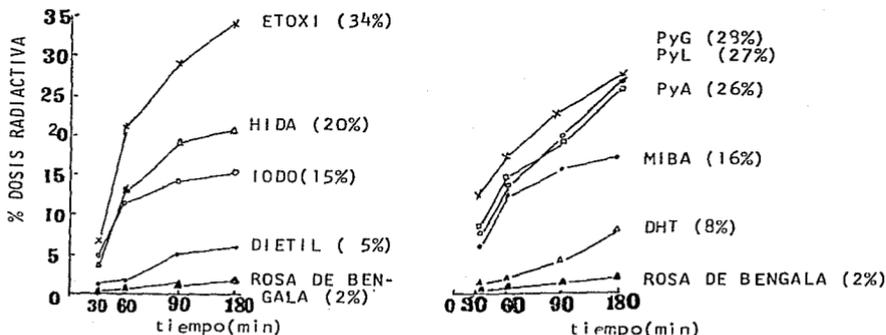
base de Schiff del piridoxal y ácido glutámico(20). El Tc-PG fue excretado en proporción moderada por la bilis con sólo un 45% de especificidad hepatobiliar respecto a la dosis inyectada. Subsecuentes reportes (21,22) mostraron que la especificidad podía ser modificada por sustitución en otros aminoácidos. Más tarde, para facilidad del radiomarcage, se incluyó en la formulación al ión estanoso como agente reductor (23).

La otra clase de agentes hepatobiliares se inicia con la aparición del Tc-99m-N-(2,6-dimetilfenilcarbamoilmetil)-iminodiacético, Tc-99m-HIDA(4), tratándolo como un radiofármaco bifuncional por poseer un grupo quelante capaz de unir metales radiactivos (ác. iminodiacético) y una porción bioquímica (análoga a la lidocaína). Este radiotrazador muestra una rápida extracción hepática y excreción biliar, con una especificidad hepatobiliar de aproximadamente 75%. Subsecuentemente, y dado que se observó que la variación de las características biológicas dependía exclusivamente de la N-sustitución del ácido, aparecieron un gran número de fármacos con diferentes sustituciones alquílicas en el anillo bencénico. En estudios comparativos reportados se encuentran resultados como los siguientes(33):

GRAFICA I.



GRAFICA IA. % de dosis radiativa en bilis (conejos) acumulativo durante tres horas.



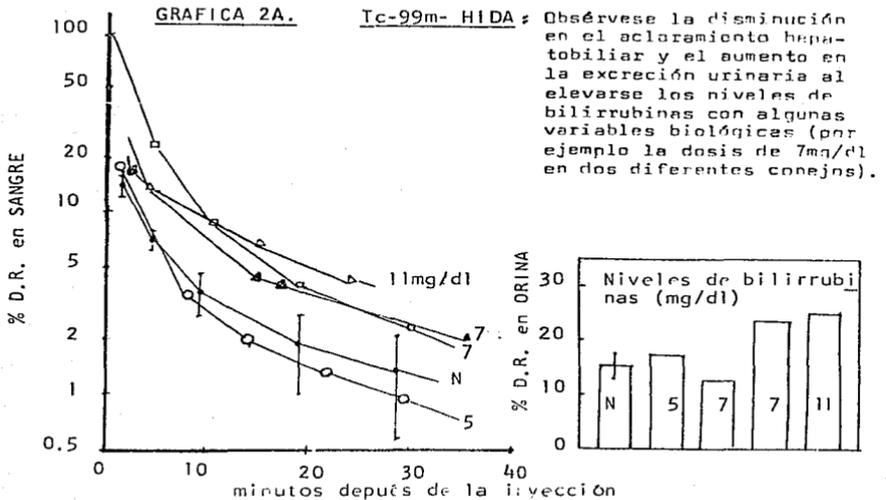
GRAFICA IB. % de dosis radiativa en excreción urinaria (en conejos) acumulativo durante 3 horas.

NOTA:

Para las gráficas IA y IB los nombres de los compuestos que se abrevian son:

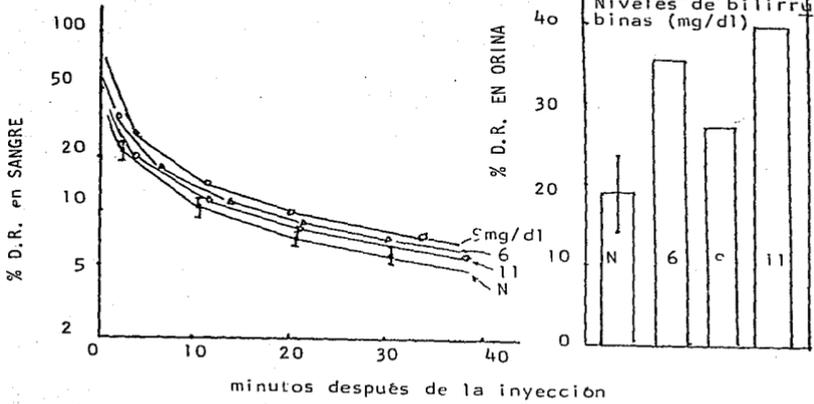
- DIETIL : ác. (2,6--dietilfenilcarbamoilmetil) iminodiacético
- HIDA : ác. (2,6-dimetilfenilcarbamoilmetil) iminodiacético
- p-iodo : ác. (p-iodofenilcarbamoilmetil) iminodiacético
- ETOXI : ác. (p-etoxifenilcarbamoilmetil) iminodiacético
- DHT : ác. dihidrotioctico
- MIBA : ác. mercaptoisobutírico
- PyG : complejo de piridoxal-glutamato
- PyA : complejo de piridoxal-arginina
- PyL : complejo de piridoxal-leucina

Son también ilustrativos, los experimentos realizados por Jansholt et. al. (47), en donde a través de la inyección de altas dosis de bilirrubinas en conejos logran comparar el efecto de éstas en la farmacocinética de Tc-PG, I-131 Rosa de bengala y derivados del Tc-99m-IDA. Ellos concluyen que el aumento en los niveles de bilirrubinas séricas provoca, en todos los radiotrazadores, un aumento en la excreción urinaria así como una disminución en el tiempo de aclaramiento hepatobiliar; algunos de estos resultados podemos sintetizarlos en las siguientes gráficas:



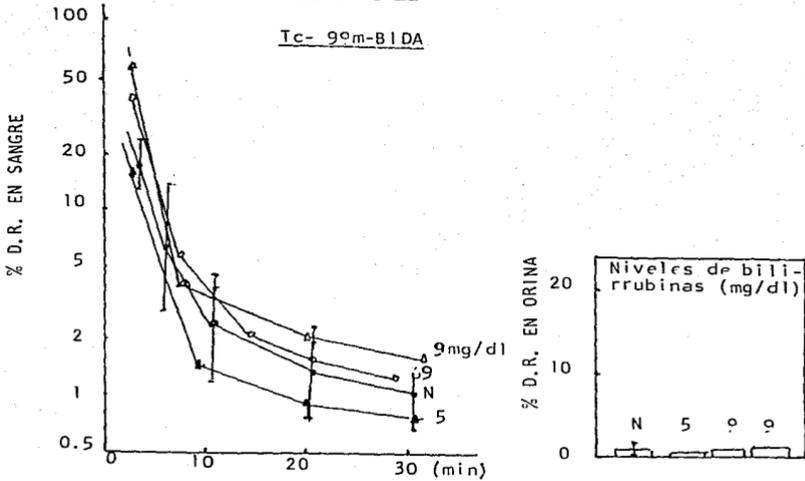
GRAFICA 2B

Tc-99mPyG



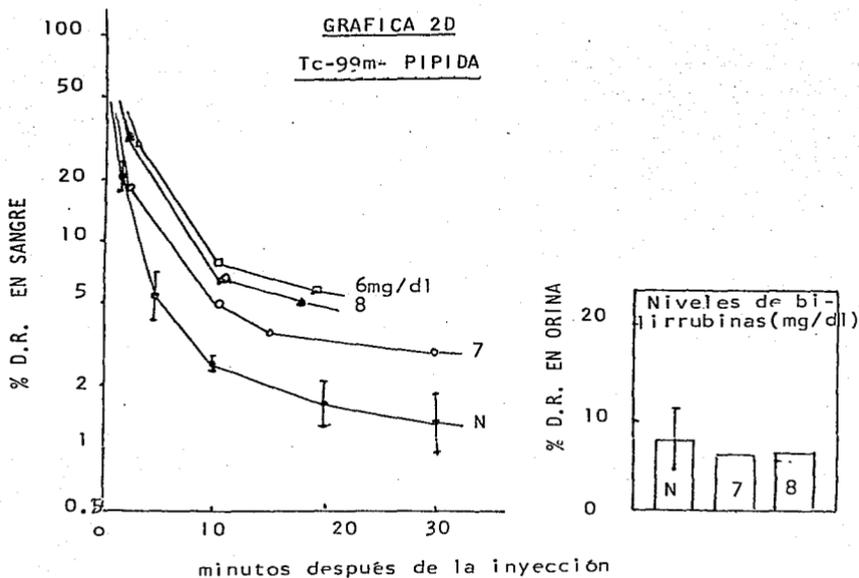
GRAFICA 2E

Tc-99m-BIDA



GRAFICA 2D

Tc-99m- PIPIDA



NOTA: Para el rosa de bengala no reportan gráfica al indicar que con los niveles altos de bilirrubinas éste tarda mucho en excretarse a través del hígado sin un aumento considerable de su excreción por riñones.

De los radiofármacos más utilizados podemos resumir lo siguiente: La sustitución 2,6- dietil en el anillo fenólico (Tc-99m-EHIDA), posee una cinética rápida con un incremento en la especificidad hepatobiliar de aprox. 85%; sustitución p-isopropil (Tc-99m-PIPIDA), posee una especificidad similar pero una excreción biliar más lenta; sustitución p-butil (Tc-99m-BIDA), posee una especificidad más alta con menos de 2% de excreción renal, pero con un tiempo de tránsito hepatobiliar mucho muy lento; sustitución 2,6 diisopropil (Tc-99m-DISIDA ó Tc-99m-DIPA) mostró una cinética similar a la del Tc-99m-EHIDA, con una menor actividad renal y con un incremento menor en la excreción de dicho órgano al aumentar los niveles de bilirrubinas. (12, 24, 33, 34, 47)

Nunn, Loberg y Conley (2), estudiaron la relación estructura-distribución de 33 derivados del HIDA. Midieron la característica lipofílica y la correlacionaron con la unión a proteínas, la especificidad hepatobiliar, cinética intrahepática y extracción renal, encontrando que los sustituyentes orto en el anillo fenólico son menos lipofílicos y afectan el tiempo de tránsito hepatocelular, relación in-

versa con el aumento de tamaño de las cadenas alquílicas y la posición PARA en dicho anillo. Según estos estudios el Tc-99m-3-bromo-2,4,6-trimetil-HIDA (Mebrofenin), tiene la mayor especificidad hepática, tránsito hepatocelular rápido y compete mejor con las bilirrubinas para la excreción hepatobiliar (ver cuadro I). Sin embargo, estudios clínicos (15), muestran una cinética similar para ambos agentes pero un nivel menor de excreción renal para mebrofenin, tanto en pacientes no ictericos como en aquellos en que los niveles de bilirrubinas son elevados. Además, es conveniente considerar que no se encontraron en la literatura estudios de toxicidad en humanos para mebrofenin (incluye bromo en la molécula factible de idiosincracia en la población, que aunque no se han reportado casos de shocks anafilácticos por bromo si ha llegado a producir ligeras alergias que se manifiestan por ronchas en la piel. [49]), punto de suma importancia al recordar que los radiotrazadores hepatobiliares son muy recurridos en pediatría cuando el cuadro presentado es síndrome colestásico neonatal.

Nunn y colaboradores también reportan un tiempo de tránsito hepatobiliar más rápido para el BIDA respecto al DIPA, hecho contradictorio a lo reportado en otros trabajos (11,24).

TABLA I.

EFEECTO DE LOS SUSTITUYENTES EN EL ANILLO BENECICO PARA EL ACLARAMIENTO HEPATOBLIAR DE LOS DIFERENTES DERIVADOS DEL ACIDO IMINODIACETICO.

SUSTITUCION EN EL ANILLO BENECICO.	EXCRECION RENAL (%)	EXCRECION HEPATICA. (%)	TIEMPO MAXIMO. (min)	TIEMPO 50 (min)
2,6-DIMETIL	15.1	63.4	4.7	9.6
2,6-DIISOPROPIL	7.4	89.6	5.9	26.7
p-BUTIL	3.6	86.0	3.0	18.0
3-BROMO-2,4,6-TRIMETIL	1.2	94.8	3.5	5.4
2,6-DIMETIL	15.1	63.4	4.7	9.6
4-CLORO-2,6-DIETIL	2.7	90.1	4.4	21.6
1,2,3-TRIMETIL	17.6	72.6	2.5	4.8
1-BROMO-3-METIL	22.7	64.6	---	---
2,3-DIBROMO	2.4	87.6	5.9	17.0
2,6-DIETIL	8.2	83.8	5.3	9.1

De los estudios reportados en el área de medicina nuclear, se observa un predominante uso del DIPA o DISIDA, mientras que muchos de los hospitales de México continúan utilizando el HIDA, estrechando, en cierta forma, el campo de la centelleografía para diagnóstico hepatobiliar cuando existen elevados niveles de bilirrubinas; algunos optan por utilizarlo solamente para el diagnóstico de colescistitis, mientras que otros toman el riesgo de realizar pruebas con HIDA en pacientes sumamente ictericos.

Además de estos agentes se ha sugerido la posibilidad de marcar sustancias catiónicas capaces de unirse a las sales biliares (35).

Podemos decir que los logros alcanzados en el desarrollo de radiofármacos hepatobiliares utilizados en medicina nuclear son muchos, cada vez más cerca del radiotrazador "ideal", pero el campo de las perspectivas todavía es amplio.

1.2. ALGUNOS ASPECTOS DEL TECNECIO. (2, 28, 50, 51 Y 52)

El Tecnecio (del griego "Technetos"=artificial) fue aislado en 1937 por C. Perrier y E. Segrè, al irradiar molibdeno en el ciclotrón de Berkeley, California. En la actualidad se conocen más de 16 isótopos y seis isómeros nucleares, por supuesto todos radiactivos, con masas de 92 a 107 y vidas medias que oscilan entre cinco segundos para el 103 y 2.6 millones de años para el 97.

Estado Natural: dada la vida media de su isótopo más estable (2.6 millones de años), relativamente corta comparada con las edades del sol (6000 millones de años) y de la tierra (4700 millones de años), es natural que en la actualidad no quede ninguna traza de tecnecio primario en el Sistema Solar: desde su creación tuvo tiempo suficiente para decaer por completo.

En cambio , se ha observado que en la superficie de algunas estrellas más jóvenes que el Sol existe tecnecio en cantidades comparables con las de otros elementos; este dato permite suponer que se encuentran en estado de formación.

Tecnecio-99:

-No. atómico 43, No. másico 99, No. neutrónico 56.

-Metal de transición del grupo VI B de la tabla periódica, entre el manganeso y el renio y su comportamiento químico es más semejante al del renio: forma aniones estables (pertechnetato), sales y heptasulfuros insolubles.

-No. de oxidación: -1, +1, +2, +3, +4, +5, +6, y +7. Los más importantes son : 3,4,7.

-No. de coordinación: 4,6 y tal vez 7.

-Configuración electrónica: (Kr) 5s² 4d⁵ o bien: (Kr) 5s¹ 4d⁶

-Compuestos principales: ácido pertechnetico, pertechnetato, heptóxido de tecnecio, heptasulfuro de tecnecio, dióxido de tecnecio dihidratado; también forma haluros complejos, oxihaluros, hidruros, cianuros, tiocianatos, aminas, fosfinas, arsinas y carbonilos.

Tc-99m:

-Es el radionúclido más usado en todos los laboratorios de radiofarmacia del mundo.

-Obtención: es relativamente fácil por los generadores de molibdeno-tecnecio. Estos pueden ser :

a) de adsorción: debido a la diferente adsorción sobre la alúmina de las sales (molib-

datos y pertecnetatos) en medio alcalino.

b) de sublimación: el heptaóxido de tecnecio sublima a 311°C y el trióxido de molibdeno a 1150°C.

c) de extracción líquida: basados en la diferente solubilidad en solventes orgánicos, como la 2-butanona en medio alcalino.

El molibdeno-99 se puede obtener por:

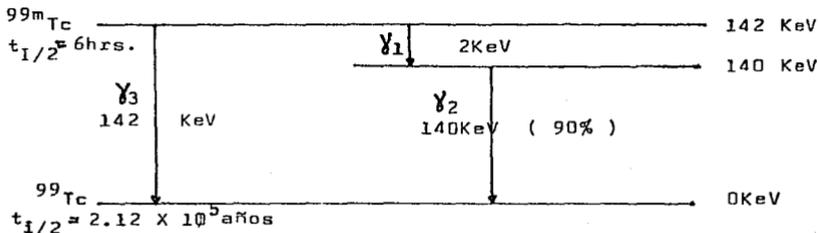
*irradiación: Mo-98 (n,γ)

*fisión del uranio: U-235 (n,f)

*ciclotrón

- Desintegración: por transición isomérica
- Emite radiaciones gamma de 140 KeV (90%)
- Su tiempo de vida media física es de seis horas como se muestra en el siguiente:

ESQUEMA DE DESINTEGRACION



- Se utiliza en forma de pertechnetato y en estado reducido se une a muchas sustancias (radiofármacos)
- Se utilizan soluciones nanomolares.
- Un mCi (37MBq) representa 0.19ng de peso.
- Actividad específica: 5300 millones mCi/g
- Principalmente se reduce con cloruro estanoico
- El principal inconveniente del ^{99m}Tc es que hasta la fecha existe poca información sobre su comportamiento químico

1.2.1. Ventajas del Tc-^{99m} para medicina nuclear:

1. Es de fácil obtención: generador de $\text{Mo-}^{99} - \text{Tc-}^{99m}$
2. Tiempo de vida media física corto (6 horas)
3. La energía de las radiaciones gamma es de 140KeV: fácilmente detectadas y proporcionan imágenes de alta calidad (monoenergético).
4. Desintegración por transición isomérica: sin radiaciones beta, se pueden administrar dosis relativamente altas para efectuar estudios clínicos en menos tiempo y con menor riesgo de exposición.
5. Usado como pertechnetato (máximo estado de oxidación)
6. En forma reducida se une a muchas sustancias que la

tógenas (radiofármacos), realizándose, dicha reducción, por medio de técnicas relativamente sencillas

7. Las cantidades en mCi empleadas permiten hacer estudios dinámicos y cinéticos.

8. Es ideal en pediatría.

1.2.2. Pertecnetato:

Anión con volumen y configuración semejantes al del perclorato y del peryodato, la concentración biológica también es semejante: se concentra en la glándula tiroides (pero no se organifica), en las glándulas salivales y mucosas (gastrointestinal, nasal, etc.). Tiende a acumularse en las lesiones intracraneales que tienen una vascularización excesiva o alteración en la barrera hematoencefálica.

Se ha utilizado desde 1963 en: gammagrafía de tiroides, glándulas salivales, cerebro, placenta, estómago y en estudios de perfusión de riñones, cerebro, corazón, etc.

El 96% se excreta en 100hrs (orina, heces, saliva, sudor).

A. PUREZA: se toman en cuenta varios aspectos:

a) Radionuclídica ausencia de :

Cs-134, Sb-124, Co-60, Rb-86, Zn-65, I-131,
Rb-103, Sr-89, etc.

- b) Radioisotópica: cantidad de Tc-99 presente.
- c) Radioquímica: ausencia de especies de Tc-99m con diferente número de oxidación.
- d) Química: ausencia de aluminio, trióxido de molibdeno, molibdatos, nitratos, cloratos.
- e) Farmacéutica: ausencia de microorganismos, pirógenos, pruebas de toxicidad.
- f) Fisicoquímicas: pH, isotonicidad, color, actividad, etc.

B. CONTROL RADIOQUIMICO: cromatografía en papel Whatman #1 o capa fina; solventes: NaCl al 0.9%, metanol al 65%, acetona, butanona, agua. $R_f=1.0$.

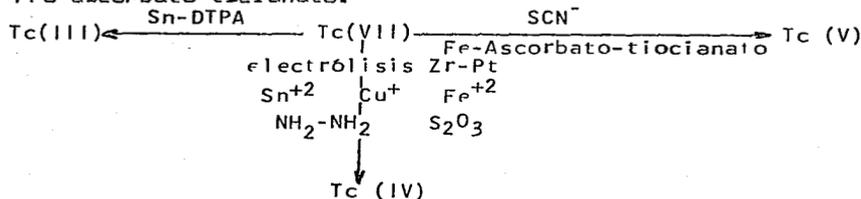
C. REDUCCION DEL PERTECNETATO:

Los agentes reductores que llevan el tecnecio (VII) a tecnecio (III) son el exceso del ión estanoso en presencia de DTPA (ác. dietil-triamino-penta-ácético) y de algunos compuestos de fósforo.

Los agentes usados para llevar el tecnecio a (IV) son:

- electrólisis: crisol de Zr-Pt con HCl y electrodos de Sn.
- metales: Sn (+2), Cu (+1), Fe (+2).
- No metales: HCl, HCl-HI-KI, HCl-ác. fosforoso.

Los agentes reductores que llevan al tecnecio a penta-valente (V) son; HCl conc., tiocianatos de potasio, hierro-ascorbato-tiocianato:



1.2.3. Radiofármacos de Tc-99m:

Los radiofármacos de tecnecio que se han usado en medicina nuclear se pueden clasificar arbitrariamente en:

I. Pertecnetano de sodio

II. Coloides (empleados en gammagrafía hepática, esplénica y sistema retículo endotelial):

1. de azufre-tecnecio
2. bióxido de tecnecio
3. hidróxido de estaño-tecnecio
4. liposomas

III. Coprecipitados metálicos (para g^{*}. pulmonar):

1. Coprecipitados de hierro (III)
2. Coprecipitados de hierro (II)

IV. Compuestos de coordinación en los que el ligante es el nitrógeno:

* g. = gammagrafía

1. DTPA (ác. dietil-triamino-pentacético, para g. cerebral y renal).
2. Piridoxal (g. de vías biliares)
3. Piridoxilidenglutamato (g. de vías biliares).
4. MIDA (metiliminodiacético; g. renal)
5. Derivados del HIDA (g. de vías biliares)

V. Compuestos de coordinación con R-aminoácidos:

1. albúmina (gammagrafia de placenta, estudios radiocardiográficos, determinación de volumen sanguíneo, cisternogammagrafia, etc.).
2. Macroagregados de albúmina (g. pulmonar y flebogammagrafia).
3. microesferas de albúmina (de acuerdo al tamaño se usan para estudios de circulación, g. pulmonar y de SRE).
4. eritrocitos (se usan para estudios dinámicos cardiovasculares, placentogammagrafia y determinación de masa eritrocítica).
5. eritrocitos dañados (g. esplénica).
6. Fibrinógeno (la gammagrafia se realiza

con el fin de localizar trombos en venas).

7. estreptoquinasa (dado que se localiza en trombos en las venas, se usa en flebogammagrafia).
8. caseidina (polipéptido localizado en la corteza renal por lo que se utiliza para gammagrafia de éste órgano).
9. bleomicina (antibiótico que al ser marcado con Tc-99m(Sn) pierde actividad antimicrobiana y se concentra en varios tejidos tipo malignos con actividad antineoplásica).

VI. Polimeros de fósforo-tecnecio (g. ósea):

1. pirofosfato
2. difosfonatos
3. imidofosfatos

VII. Compuestos de coordinación en los que el ligante es el oxígeno:

1. gluconato y glucoheptonato (g. renal).
2. manitol (g. renal).
3. fitato (g. hepática).

4. citrato (g. renal, cerebral y para medir filtración glomerular).

VIII. Compuestos de coordinación en los que el ligante es el azufre:

1. Ac. 2,3-mercaptosuccinico (g. renal).
2. MIBA (2-mercaptobutirico, g. renal).
3. penicilamina (g. hepatobiliar).
4. penicilamina-acetazolamida (g. renal).

1.3. ESTRUCTURA Y BIODISTRIBUCION DE COMPLEJOS Tc-99m-HIDAS

Los agentes utilizados como radiotrazadores hepatobiliares son aniones orgánicos con peso molecular que oscila entre 300-1000g/mol, con un grupo polar bastante fuerte separado de una porción lipofílica. Se cree que el nitrógeno es el elemento que dona sus dos electrones al tecnecio para formar el complejo con seis ligantes en octaedro. Es posible, que el Tecnecio se una a dos moléculas de HIDA, pero se sigue estudiando la naturaleza del complejo. (7 y 33)

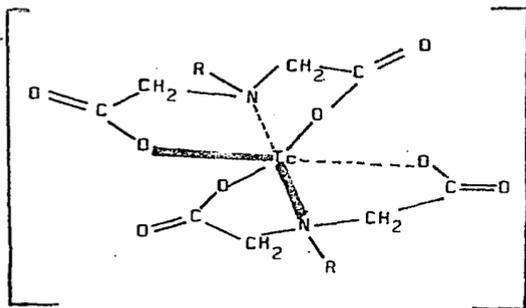


fig. I
Probable complejo
bis- T-99m-imino-
diacetato.

La utilidad clínica de los agentes hepatobiliares está basada en su habilidad para producir imágenes hepáticas que reflejan la funcionalidad de los hepatocitos, perfilando el

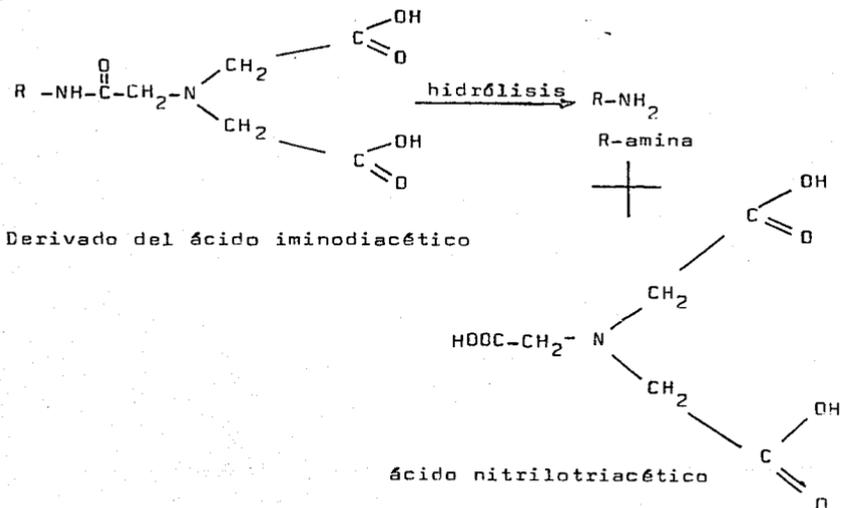
tracto biliar, así como el trazo del flujo biliar. Para efectuar este fin, un radiotrazador debe ser captado por los receptores en la membrana del hepatocito, concentrarse en el mismo y experimentar excreción biliar.

Loberg N.D. et. al. (48), encontraron que el Tc-99m-HIDA es excretado en su forma radioquímica original demostrando, simultáneamente, su estabilidad "in vivo". En dicho trabajo se inyectó a ratones con el contenido de vejiga y vesícula biliar de otros animales (ratones) que habían sido inoculados con Tc-99m-HIDA, observando que la biodistribución era muy semejante para ambos grupos (tabla II).

TABLA II			
BIODISTRIBUCION DE Tc-99m-HIDA ANTES Y DESPUES DE SU EXCRECION A VEJIGA Y VESICULA BILIAR			
Organo	Tc-99m-HIDA	Cont. de vejiga	Cont. de V.B.
higado	1.04	4.79	4.56
riñones	0.64	1.80	0.71
intestino	72.60	53.27	72.97
estómago	0.58	2.43	1.81
bazo	0.40	0.18	0.25

(NOTA: los resultados de la tabla II están dados en porciento respecto a la dosis inyectada. Todos los animales fueron sacrificados una hora después de la inoculación.)

No obstante, es probable, debido a la similitud en la estructura de los derivados del HIDA con la lidocaína, que en los humanos ocurra hidrólisis en la acetanilida. (49)



1.4. GAMMAGRAFIA HEPATOBILIAR. (8, 9, 10 y 52)

La gammagrafia consiste en la reproducción sobre placa fotográfica o radiográfica de la radiación gamma emitida por el hígado después de la inyección de un isótopo radiactivo capaz de ser captado selectivamente por este órgano.

La exploración se realiza, previa inyección del elemento marcador, registrando la radiación que emite cada zona del hígado mediante una cámara gamma, la cual es un sistema de detección de rayos gamma y rayos X que genera una imagen bidimensional del órgano en estudio. El sistema consiste en un detector de cristal de yoduro de sodio activado con talio, al que llegan las radiaciones provenientes del órgano. Entre la fuente de radiación y el cristal se encuentra un colimador de plomo. La señal generada en el cristal del detector es localizada de acuerdo con coordenadas X-Y por medio de tubos fotomultiplicadores (fototubos). Esta información es procesada en el sistema electrónico y proyectada en un tubo de rayos catódicos, acumulada en un sistema procesador de datos (memoria de la computadora), recogida en película fotográfica o radiográfica o conservado en cintas o discos magnéticos para su análisis ulterior

(fig. 2).

Los productos marcados con isótopos radiactivos pueden ser:

- a) captados por la célula hepática y eliminados por la bilis como el I-131 rosa de bengala, los derivados del Tc-99m-HIDA y el Tc-99m-PG;
- b) incorporados al metabolismo celular de síntesis proteica, como Se-75 selenio-metionina o el citrato de Ga-67;
- c) captados por el sistema reticulo endotelial al ser vehiculizados por partículas coloidales de un diámetro entre 200 y 400 amstrongs (radiocoloide de Au-198, Tc-99m e In-113);
- d) permanecer en el espacio vascular como el In-113 o el Tc-99m unido a transferrina.

El empleo de los agentes del grupo "a" permite obtener datos sobre el funcionalismo hepatocelular y la permabilidad de las vías biliares, con su paso rápido a través del hígado existe variación de intensidad de radiactividad en función del tiempo.

En el caso de grupo "c", las suspensiones de radioco-

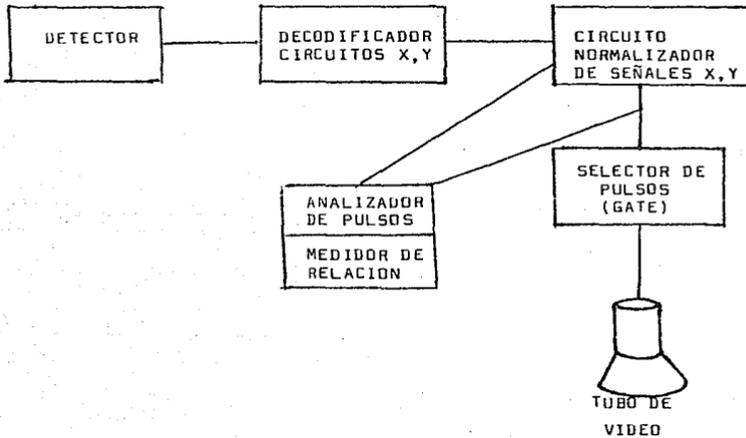


Fig. 2. DIAGRAMA DEL DETECTOR Y COMPONENTES ELECTRONICOS QUE FORMAN PARTE DE LA CAMARA GAMMA.

loides son captadas selectivamente por las células del sistema reticulohistiocitario del hígado. La imagen gammagráfica obtenida no constituye, pues, un índice directo del funcionalismo hepatocelular, pero registra un mapa fiel de la proyección del órgano.

1.4.1. Gammagrafía del hígado y vías biliares normales.

Es preciso conocer la imagen gammagráfica normal en las distintas proyecciones habituales (anterior, lateral y posterior), así como las variaciones morfológicas y fisiológicas en la misma, para interpretar las imágenes patológicas.

En proyección anterior el hígado tiene forma triangular, con lados curvilíneos. Puede reconocerse: una cúpula superior, en la parte alta del lóbulo derecho, que generalmente llega a unos dos centímetros por debajo de la mamila derecha; un pico izquierdo situado alrededor del ángulo xi-foideo, que corresponde al lóbulo izquierdo, y un pico inferior que frecuentemente sobrepasa el borde costal y corresponde a la punta inferior del lóbulo derecho. El borde externo de este triángulo acostumbra a ser convexo y amol-

dado al tórax, y el borde superior es discretamente oblicuo de arriba abajo y de derecha a izquierda, con una convexidad en su zona más externa (cúpula) y una concavidad interna (impronta cardíaca). El borde inferior es oblicuo y sigue aproximadamente el borde costal; presenta una escotadura que marca la separación de los dos lóbulos hepáticos y, en ocasiones, otra en la zona vesicular.

La imagen en proyección lateral tiene la forma de un triángulo rectangular, con ángulo recto pósterosuperior e hipotenusa anterior más o menos convexa. El borde inferior es de forma cóncava, con curvatura de gran radio.

En proyección posterior la imagen es casi idéntica a la frontal, aunque el lóbulo izquierdo se manifiesta menos activo por la interposición de la columna vertebral.

Para el caso de radiofármacos hepatobiliares existe dificultad en delimitar el borde inferior del hígado debido a la radiactividad de la vesícula biliar y las primeras porciones del intestino delgado. Sin embargo, es posible ver con ellos, de forma selectiva, conductos intrahepáticos y extrahepáticos así como vesícula biliar. La actividad

intestinal confirma la permeabilidad del conducto colédoco. (8 y 9).

1.4.2. Anomalías gammagráficas hepatobiliares elementales.

Pueden agruparse en:

- a) escotadura o depresión localizada del contorno hepático.
- b) imagen lacunar o zona fría, por ausencia de radiación, localizada en plena masa hepática.
- c) amputación o ausencia gammagráfica de uno de los ángulos. El déficit de captación afecta a una zona más extensa que en el caso de la escotadura.
- d) zonas hipocaptantes debidas a la disminución de la radiación de una zona del parénquima hepático.
- e) con agentes hepatobiliares la no detección de radiactividad en los conductos intrahepáticos, vesícula biliar e intestino.

La presencia de zonas frías en gammagrafías hepáticas indica que el radiocoloide no ha sido captado por las células de Kupffer, ya sea por ausencia o por alteración funcional de las mismas. Las lesiones tumorales o quísticas determinarán la existencia de zonas lacunales o amputacio-

nes en la imagen gammagràfica, y las hepatopatias difusas, fundamentalmente la cirrosis hepàtica, daràn una imagen de falta de homogeneidad en la captaciòn del isòtopo, debido a la existencia de alteraciones vasculares que dejaràn de perfundir zonas mäs o menos extensas del sistema reticulo-histiocitario.

1.4.3. Interpretaciòn de la gammagrafia patològica.

La patologia del hígado se pone de manifiesto con esta técnica por modificaciones de la morfologia o por alteraciones en la homogeneidad de la captaciòn del isòtopo. Así, los procesos tumorales, carcinoma primitivo o metastàsico del hígado, y los procesos quísticos, quiste hidatidico y absceso hepàtico, se manifiestan, como ya se ha indicado, por imágenes lacunares o amputaciones, siempre que las lesiones tengan un tamaño superior a 2 ó 3 cm de diámetro. En los casos en que las lesiones se localizan en el borde inferior hepàtico, tiene gran valor la correlaciòn entre los datos obtenidos por palpaciòn y los que ofrece la gammagrafia. La cirrosis hepàtica se caracteriza por una imagen de captaciòn poco homogènea, la morfologia del hígado puede estar algo alterada, en el sentido de hepatomegalia o atro-

fia. Los tumores primitivos del hígado o los abscesos con síntesis proteica activa, que se manifiestan como "Áreas frías" con radiocoloides de Tc-99m pueden desaparecer al practicar una nueva exploración inyectando Galio o Selenio-Metionina. Los hemangiomas y los quistes permanecerán como zonas "frías". Las lesiones vasculares y los hemangiomas se pueden poner de manifiesto con In-113 o Tc-99m unido a transferrina.

De manera muy general pueden resumirse las patologías de vías biliares detectadas por centelleografía hepatobiliar:

A. Evaluación anatómica y funcional de la vía biliar:

a) Colestasis.- la diferenciación entre colestasis intrahepática y extrahepática es de capital importancia, pues las colestasis extrahepáticas son ictericias que exigen una terapéutica quirúrgica, mientras las colestasis intrahepáticas son, generalmente, subsidiarias de tratamiento médico y en ellas las intervenciones quirúrgicas representan en principio un riesgo que debe ser evitado. En la gammagrafía hepatobiliar es posible apreciar las características del árbol biliar (principalmente calibre), lográndo-

se, de esta forma, diagnosticar obstrucciones de conductos intrahepáticos y obstrucciones totales o parciales del conducto colédoco.

b) Estudios de ictericias prolongadas del recién nacido. El caso más común es la diferenciación de anomalías congénitas como la atresia de vías biliares de una hepatitis neonatal; en la primera la imagen gammagráfica está caracterizada por una buena extracción por parte del hepatocito del radiofármaco, existe un mínimo decremento de la actividad a lo largo del estudio dinámico, de forma que aún a las 24 horas no es detectada actividad intestinal. En la hepatitis neonatal la imagen es caracterizada por una ausencia de acumulación hepática del trazador.

B. Evaluación anatómica y funcional de la vesícula biliar:

a) Colecistitis aguda (consecuencia de una obstrucción calculosa del conducto cístico seguida de una infección bacteriana de sus paredes).

b) Tamaño y colocación de la vesícula biliar. Existen una serie de anomalías morfológicas, varias congénitas, que podrían dificultar, ocasionalmente, la evacuación de la vejiga biliar o muy rara vez ocasionar colecistitis al per-

mitir la estancación e infección biliar intravesical; las más comunes son: vesícula pèndula o ptòsica o colgante, sifonopatía, tabique y divertículos.

C. Evaluación de traumatismos abdominales.

D. Evaluación post-operatoria del sistema hepatobiliar (por ejemplo un transplante hepático).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los proyectos del departamento de desarrollo de la Gerencia de Materiales Radiactivos del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, comprende la producción de juegos reactivos o núcleo-equipos para su uso en medicina nuclear. Es por ello, que se pretende producir el derivado del ácido iminodiacético que mayores ventajas presente en el diagnóstico de la función biliar cuando es marcado con Tc-99m.

Sin embargo, es necesario partir desde la síntesis de los reactivos debido a la dificultad de importación y alto costo de los mismos; el proyecto, consiste entonces, de las siguientes fases para cada uno de los tres compuestos a comparar (HIDA, DIPA y BIDA):

1. Síntesis y caracterización de compuestos (excepto BIDA).
2. Pruebas de formulación y marcaje con Tc-99m
3. Pruebas de biodistribución en ratones
4. Comportamiento biológico en conejos
5. Pruebas clínicas

Las características in vivo que los reactivos pre---

senten dependeràn de paràmetros fisicoquímicos (especificamente lipoficidad) y efectos estructurales. En estudios realizados previamente, se ha establecido que para derivados del àcido iminodiacètico las posiciones orto, en el anillo bencènico, reducen la actividad lipofílica disminuyendo, a sí, el tiempo de trànsito hepatobiliar. Por otro lado, se ha hecho notar que un incremento en el tamaño de las cadenas alquílicas de los sustituyentes en el anillo bencènico de estos mismos compuestos, es proporcional al aumento de la lipoficidad.

Si un compuesto presenta gran hepatropismo, éste serà capaz de concentrarse en el hígado aùn cuando los niveles de bilirrubinas sean elevados (10-20mg/dl). Este òltimo punto se ha remarcado puesto que es, de suma importancia, obtener una buena imagen centelleogràfica en los casos en que se presenta el paciente icterico.

3. FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA

Los radiofármacos preparados con radionúclidos emisores gamma que son excretados a través del ducto biliar, son útiles en la evaluación de la función hepatobiliar por medio de imágenes centelleográficas (gammagramas), para el diagnóstico de atresia de vías biliares, colecistitis aguda y en la dilatación u obstrucción del tracto biliar (obstrucción por cálculos, cambios en las paredes de los conductos por inflamación o neoplasia, presión de los conductos por quistes o neoplasia, etc.).

Con dicha finalidad se han desarrollado varios complejos de tecnecio-99m; dicho isótopo es seleccionado por su corta vida media física que permite su empleo en dosis de varios milicurios, lo que incrementa las condiciones de conteo y aumenta la calidad de las imágenes centelleográficas. Muchos complejos de Tc-99m han sido propuestos como agentes hepatobiliares, entre ellos se tiene penicilamina, tetraciclina, ácido mercaptoisobutírico, piridoxilidenglutamato y derivados del ácido iminodiacético:

- Ac. (2,6-dimetilfenilcarbamoilmetil) iminodiacético
- Ac. (p-butilfenilcarbamoilmetil) iminodiacético

- Ac. (p-etoxifenilcarbamoilmetil) iminodiacético
- Ac. (p-iodofenilcarbamoilmetil) iminodiacético
- Ac. (2,6-dietilfenilcarbamoilmetil) iminodiacético
- Ac. (2,6-diisopropilfenilcarbamoilmetil) iminodiacético.

Para elegir a los que mayores ventajas ofrecen, es de suma importancia considerar que un buen agente hepatobiliar debe exhibir: a) alta especificidad por el sistema hepatobiliar, b) rápido tránsito a través de dicho sistema, c) alta resistencia para competir con compuestos tales como las bilirrubinas y, d) rápido radiomarcaje con alta pureza radioquímica y estabilidad. Es por ello, que en este proyecto se han elegido, de acuerdo a la bibliografía, tres de los agentes considerados de mayor interés para llevar a cabo su síntesis (excepto BIDA), preparado de nucleoequipos, marcaje y comparación de comportamiento biológico; ellos son:

1. Ac. (2,6-dimetilfenilcarbamoilmetil) iminodiacético (HIDA).
2. Ac. (2,6-diisopropilfenilcarbamoilmetil) iminodiacético (DIPA)
3. Ac. (p-butilfenilcarbamoilmetil) iminodiacético (BIDA).

4. OBJETIVOS

1. Realizar la síntesis y caracterización del HIDA
2. Realizar la síntesis y caracterización del DIPA
3. Describir el método de preparación de los núcleo equipos HIDA-Sn.
4. Describir el método de preparación de los núcleo equipos DIPA-Sn.
5. Describir el método de preparación de los núcleo equipos BIDA-Sn.
6. Realizar pruebas de marcaje con Tc-99m para HIDA, BIDA Y DIPA.
7. Analizar la biodistribución de HIDA, DIPA y BIDA en ratones.
8. Realizar pruebas de comportamiento biológico a través de la obtención de imágenes centelleográficas en conejos.
9. Comparar clínicamente el HIDA, DIPA y BIDA enfatizando en los siguientes aspectos: tiempo de excreción y calidad de las imágenes cuando el paciente presente o no ictericia.
10. Definir cual de los tres derivados del ácido iminodiacético es el que mayor ayuda proporciona al médico en la evaluación de la función biliar.

5. HIPOTESIS:

"Si a) La disminución en el tamaño de las cadenas alquílicas, b) la posición ORTO y, c) posición PARA de los sustituyentes en el anillo bencénico de los derivados del ácido (fenilcarbamoilmetil) iminodiacético, manifiestan biológicamente una reducción de la actividad lipofílica para los dos primeros casos y mayor lipoficidad para el tercero, entonces, en un estudio gammagráfico hepatobiliar el HIDA presentará: a) rápida eliminación hepática y b) pobre concentración en hígado con niveles elevados de bilirrubinas (10 - 20 mg/dl); el DIPA: a) eliminación en hígado más lenta que el HIDA y b) buena concentración en hígado con niveles elevados de bilirrubinas (10 -20 mg/dl); el BIDA a) eliminación en hígado más lenta que el DIPA y b) mejor concentración en hígado con niveles elevados de bilirrubinas (10 - 20 mg/dl)".

6. MATERIAL Y METODOS

6.1. Material

6.1.1. Reactivos

- * 2,6-dimetilanilina (Aldrich 97%).
- * 2,6-diisopropilanilina (Aldrich 97%).
- * Cloruro de cloroacetilo (sigma).
- * Sal disódica del Acido iminodiacético (ICN Pharmaceuticals Inc.).
- * Etanol (J.T. Baker).
- * Acido acético glacial (J.T. Baker).
- * Acetato de sodio (J.T. Baker).
- * Carbón activado (sigma).
- * Acido (p-butilfenilcarbamoilmetil) iminodiacético (BIDA) [obsequiado].
- * Cloruro estanoico anhidro (sigma).
- * Solución salina estéril libre de pirógenos (Travenol).
- * Agua bidestilada estéril y libre de pirógenos (Travenol).
- * Solución de pertecnetato obtenido de un generador Tc-99m obtenido por elución de una columna de óxido de aluminio, que contiene Mo-99

producido por fisión (Getec ININ).

- * Nitrógeno de alta pureza (LINDE).
- * Cloroformo (J.T. Baker).
- * Acetona (J.T. Baker).
- * Acetonitrilo (J.T. Baker).
- * Eter de petróleo (J.T. Baker).

6.1.2. Equipo

- * Balanza analítica digital "Sartorius" 1602 MP
- * Rotavapor-R "Buchi" App. Nr 287106
- * Cámara gamma (anger) Pho/Gamma LFOV "Searle"
- * Aparato para determinar punto de fusión "Fisher Jones".
- * Espectrofotómetro "Perkin - Elmer" modelo 337 tipo rejilla.
- * Liofilizadora "Hull Corporation" modelo BFS12
- * Campana de flujo laminar "Veco" modelo GHFL-A-12
- * Bomba de vacío "Feli-Welch" modelo 1400 doble-sello
- * Parrilla de calentamiento "Corning" PC-351
- * Calibrador de Radioisótopos "Capintec" modelo CRC-10R.
- * Analizador monocanal "Frirseke-Hoepfner"

* Termómetro de -10-150°C

6.1.3. Material

- * Matraz de fondo redondo con junta esmerilada de 250 ml
- * Embudo de adición de 100 ml
- * Recipiente de plástico de 2 litros para baño de hielo
- * Matraz Kitasato de 250 ml
- * Matraz Erlenmeyer de 250 ml
- * Crisol Gooch con membrana de vidrio de poro mediano
- * Pipetas de 2, 5, 10 y 20 ml
- * Vaso de precipitado de 100, 250 y 500 ml
- * Refrigerante recto
- * Matraz bola de 250 ml
- * Papel Whatman No. 1
- * Probetas de 250 ml
- * Equipo de disección
- * Jeringas estériles de 1, 5 y 10 ml
- * Ampolletas estériles de 10 ml

6.1.4. Material biológico:

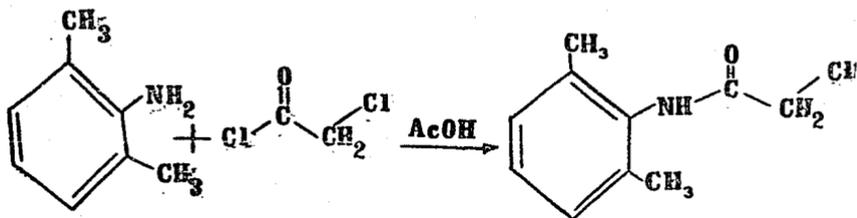
-75 ratones blancos de 25-30g de peso

-4 conejos blancos raza nueva zelanda (2500g)

6.2. Método

6.2.1. Síntesis

HIDA: partió de la reacción entre la 2,6-dimetilanilina con el cloruro de cloroacetilo en ácido acético glaciar para obtener la w-cloro-2,6-dimetilacetanilida que, a su vez, reaccionó con la sal disódica del ácido iminodiacético en un reflujo con etanol absoluto y en una solución de NaOH 1N.

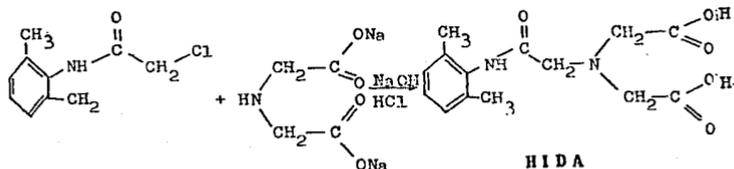


Procedimiento: disolver 2g (0.017 moles) de 2,6-dimetilanilina en 8ml de ácido acético glaciar contenidos en un matraz bola con junta esmerilada al que se le adapta un embudo de adición conteniendo 2g (.017moles) de cloruro de cloroacetilo en 4ml de Acido acético glaciar.

Colocar el sistema en un baño de hielo (10°C) durante 1 hora, tiempo en que se añade el contenido del embudo.

Por separado preparar 20ml de una solución saturada de acetato de sodio y agregarla al matraz de reacción agitando por 30 min. con lo que se forma un precipitado blanquecino cristalino; filtrar y lavar con agua destilada. La recrystalización se lleva a cabo en una suspensión de carbón activado al 2% en etanol caliente, el filtrado obtenido se añade agua destilada en una relación 5:1 con respecto al etanol, formándose, de inmediato, cristales ligeros de color blanquecino se deja en refrigeración unas horas para que cristalice totalmente. (p.f. = 148-149°C).

La siguiente reacción se utilizó para obtener el HIDA a partir del *w*-cloro-2,6-dimetilacetanilida y la sal sódica del ácido iminodiacético:



Procedimiento: disolver 6g (0.03 moles) de la acetanilida en 100ml de etanol absoluto contenidos en un matraz de fondo redondo con dos bocas esmeriladas y añadir 6g (0.03moles) de la sal disódica del ácido iminodiacético disueltos en 75 ml de agua destilada. Adaptar al sistema un refrigerante para reflujo y un embudo de adición conteniendo 20ml de una solución 1.5N de hidróxido de sodio.

Añadir al matraz, gota a gota, la solución de hidróxido de sodio durante 4hrs., tiempo en que el sistema se mantiene en reflujo; continuar dicho reflujo toda la noche.

La reacción se sigue por cromatografía en placa fina con sílica gel, utilizando como sistema de solventes butanol: ácido acético: agua (4:1:1) donde las sustancias se separan de la siguiente forma:

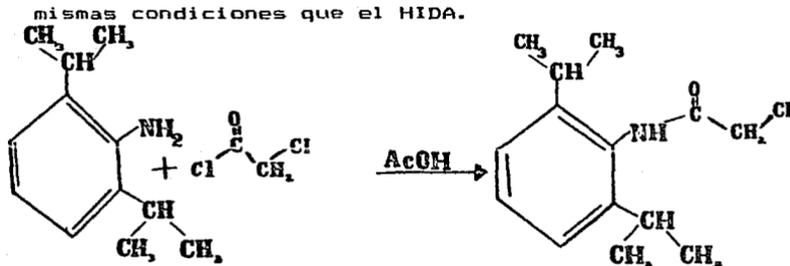
	Rf
Acido iminodiacético.....	0.3
Acetanilida.....	0.9
HIDA.....	0.6

A la mezcla de reacción se le evapora el etanol y la solución restante se ajusta a un pH de 2.8 con ácido clor-

hidrico 6N, el precipitado formado es recristalizado doble vez por disolución en hidróxido de sodio 0.5N y ajustado el pH con HCl concentrado. (p.f. 215-216°C)

6.2.2. Síntesis

DIPA : partió de la 2,6-diisopropilammina en las mismas condiciones que el HIDA.

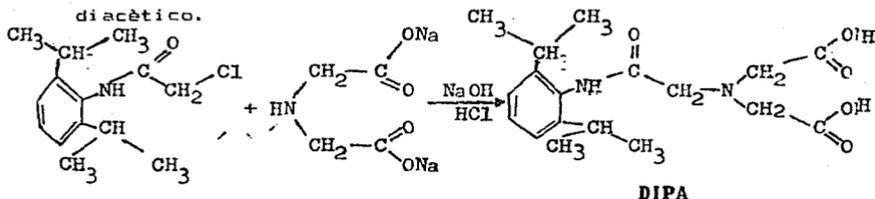


Procedimiento: disolver 51.3 g (0.29 moles) de 2,6-diisopropilamina en 200ml de ácido acético glacial contenidos en un matraz bola de junta esmerilada, al que se adapta un embudo de adición conteniendo 32.7g (0.29 moles) de cloruro de cloroacetilo en 100ml de ácido acético glacial. Colocar el sistema en un baño de hielo (10°C) durante una hora , tiempo en que se añade el contenido del embudo.

Por separado preparar 500ml de una solución saturada de acetato de sodio y agregarla al matraz de reacción agi-

tando por 30 min., con lo que se forma un precipitado amarillo cristalino; filtrar y lavar con tetracloruro de carbono para obtener cristales blancos. Recristalizar con una suspensión de carbón activado al 2% en etanol caliente; al filtrado obtenido se añade agua destilada en relación 5:1 con respecto al etanol, formándose de inmediato cristales ligeros de color blanquecino; se deja en refrigeración unas horas para que cristalice totalmente. (p.f. 134-135°C).

La siguiente reacción es la obtención del DIPA a partir de la acetanilida y la sal disódica del ác. iminodiacético.



Procedimiento: Disolver 50g (0.2moles) de w-cloro 2,6-diisopropilacetanilida en 500ml de etanol absoluto contenidos en un matraz de fondo redondo con dos bocas esmeriladas y añadir 36g (0.2moles) de sal disódica del ácido iminodiacético disueltos en 200ml de agua destilada. Adaptar al sistema un refrigerante para reflujo y un embudo de

adición conteniendo 100ml de una solución 1.5N de NaOH.

Añadir al matraz, gota a gota, la solución de hidróxido de sodio durante 5hrs., tiempo en que el sistema se mantendrá en reflujo; continuar dicho reflujo toda la noche.

La reacción se sigue por cromatografía en placa fina con sílica gel, utilizando como sistema de solventes butanol: ácido acético : agua (4:1:1), donde las sustancias se separan de la siguiente forma:

	Rf
Ac. iminodiacético.....	0.3
Acetanilida.....	0.9
DIPA.....	0.6

A la mezcla de reacción se le evapora el etanol y la solución restante se ajusta a un pH DE 2.8 CON HCl 6N, los cristales formados en NaOH 0.5N y extraídos con éter 3 veces (NaOH 0.5N : éter 3:1 vol/vol). Ajustar a pH 2.5 con HCl concentrado, lavar los cristales con un poco de benceno y recristalizar por disolución en NaOH 0.5N y ajustando a pH 2.5 con ácido clorhídrico concentrado. (p.f. 186-187°).

6.2.3. Preparación de nucleo-equipos HIDA-8n

1. Preparar 25ml de HCl 2N conteniendo 25mg/ml de cloruro estanoso (disolver previamente este en el ácido clorhídrico concentrado) con agua destilada purgada con nitrógeno .

2. Por separado disolver 250mg de HIDA en un volumen aproximado de 15ml de agua, después de adicionadas unas gotas de NaOH 3N para disolver al compuesto y posteriormente ajustar el pH a 6 con HCl 6N.

3. Mezclar la solución "2" con 1ml de la solución "1" y ajustar el pH a 5.5 con NaOH 1N.

4. Agregar a la solución "3" 50mg de pluronic.

5. Ajustar el volumen a 50ml con agua destilada purgada con nitrógeno.

6. Filtrar la solución con Millipore (0.22 micras).

7. Distribuir en ampollitas 2ml por vial y liofilizar

6.2.5. Producción de núcleo-equipos BIDA-Sn

1. A 2.5 ml de HCl agregar 31.25mg de cloruro estano-
so anhidro hasta completa disolución, aforar a 25ml con
agua destilada purgada con nitrógeno.

2. Por separado disolver 250mg de BIDA en un volumen
aproximado de 15ml, después de adicionadas unas gotas de
NaOH 3N para disolver el compuesto y ajustar el pH a 6 con
HCl 6N.

3. Mezclar la solución "2" con 1 ml de la solución
"1" y ajustar el pH a 5.5 .

4. Agregar a la solución "3" 50mg de pluronic.

5. Ajustar el volumen a 50 ml con agua destilada pur-
gada con nitrógeno.

6. Filtrar la solución con millipore (0.22 micras)

7. Distribuir en ampolletas de 2ml/vial y liofilizar

6.2.4. Producción de nucleo-equipos DIPA-Sn

1. A 2.5ml de HCl agregar 62.5 mg de cloruro estanoso anhidro hasta completa disolución, aforar a 25ml con agua destilada purgada con nitrógeno.

2. Por separado disolver 250mg de DIPA en un volumen aproximado de 15 ml, después de adicionadas unas gotas de NaOH 3N para disolver el compuesto y después ajustar el pH a 6 con HCl 6N.

3. Mezclar la solución "2" con 1ml de la solución "1" y ajustar el pH a 5.5.

4. Agregar a la solución "3" 50mg de pluronic.

5. Ajustar el volumen a 50ml con agua destilada purgada con nitrógeno.

6. Filtrar la solución con millipore (0.22 micras)

7. Distribuir en ampolletas 2ml por vial y liofilizar

6.2.6. Marcaje con Tc-99m

Consideraciones previas: el Tc-99m es obtenido de un GETEC, generador de Tc-99m basado en una columna cromatográfica de óxido de aluminio, que contiene Mo-99 producido por fisión. Su diseño permite utilizar un volumen pequeño de eluyente para obtener una alta concentración de Tc-99m, a la vez que produce un alto rendimiento.

a) Tomar un frasco con eluyente de cloruro de sodio al 0.9% y desprender el centro de la retapa de aluminio para limpiar perfectamente con alcohol.

b) Retirar el frasco protector de la cavidad de menor diámetro del generador y colocar en su lugar el frasco con solución eluyente.

c) Retirar el frasco protector de la cavidad de mayor diámetro del generador y colocar en su lugar un frasco al vacío protegido con blindaje de plomo.

d) En unos segundos deberá verse un burbujeo en la solución del frasco con salina, lo cual indica que la elución se está efectuando correctamente, esperar 5 minutos.

e) Retirar el blindaje con el frasco que contiene el tecnecio.

f) Medir la radiactividad de la solución de Tc-99m obtenida del GETEC en un calibrador de dosis.

g) Diluir con NaCl al 0.9% la solución anteriormente obtenida hasta obtener una actividad de 1mCi/ml.

h) Colocar el frasco del nucleo-equipo en un contenedor de plomo.

i) Adicionar en condiciones asépticas 2-4ml de la solución de Tc-99m (en forma de pertecnetato) obtenida del GETEC al nucleo-equipo.

j) Mezclar el frasco del contenedor suavemente y esperar 15' a que el marcaje sea completado.

6.2.7. Determinación de pureza radioquímica (sistemas cromatográficos)

Consideraciones previas: la pureza radioquímica es la proporción del radionucleido presente en una forma química determinada. Las técnicas usuales para su determinación son la cromatografía y la electroforesis. La cromatografía es una técnica que permite separar una mezcla en sus componentes. Su fundamento, en forma muy simplificada, es la migración de una sustancia a través de un medio fijo, fase estacionaria, arrastrada por una fase móvil, a una velocidad que depende, entre otras cosas, de la estructura de la sustancia y de la naturaleza de las fases estacionaria y móvil. Los procesos intervinientes son, entre otros, adsorción, partición, solubilidad, presión de vapor, tamaño molecular y carga iónica.

a) Colocar en tiras de papel de fibra de vidrio impregnadas con sílica gel (2X15cm) una gota del radiofármaco a 1.5cm de uno de los extremos y a 12cm de este punto colocar una marca que indicará el frente del solvente.

b) Introducir dichas tiras en cubas cromatográficas

(probetas de 500ml con tapón de caucho al que se le adapta un gancho para sostener la tira) que contienen como solvente cloroformo-acetona 7:3 , solución salina al 0.9%, metanol al 85% y acetonitrilo-agua 3:1.

c) Cuando el solvente haya alcanzado la marca que indica el frente retirar las tiras dejarlas secar a temperatura ambiente.

d) Cortar las tiras en doce fragmentos (de 1cm) y medir su actividad en un contador de centelleo.

e) Determinar el porcentaje de producto marcado, per-tectetato libre y Tc reducido (dióxido de tecnecio) :

SISTEMA DE SOLVENTE	TcO ₂ (Rf)	TcO ₄ ⁻ (Rf)	Producto marcado (Rf)
Cloroformo-acetona 7:3	0	1	0
Metanol 85%	0	1	1
Acetonitrilo-H ₂ O 3:1	0	1	1
Metil-etil-cetona	0	1	0

6.2.8. Control de esterilidad del radiofármaco

Sembrar 1ml del radiofármaco en medio fluido de tioglicolato y medio de caseína soya, dejar incubar a 37°C y 25°C respectivamente y guardar los medios sembrados por 15 días revisándolos diariamente.

5.2.9. Determinación de pirógenos en radiofármacos

Consideraciones previas: Las sustancias pirogénicas son productos del metabolismo bacteriano, termoestables y filtrables, que no se eliminan con una esterilización convencional como el calor. Las endotoxinas son de bacterias gram negativas y están constituidas por un lipopolisacárido complejo unido a una proteína.

La prueba puede realizarse in vivo (prueba en conejos) o in vitro (prueba de Limulus). La primera consiste en inyectar un mínimo de 10 veces la dosis indicada por Kg de peso en un volumen no menor de 1ml ni mayor de 10ml a un conejo, se le determina la temperatura .

Prueba de Limulus: los amebocitos, únicas células que circula por la linfa del Limulus polyphemus, contiene una proteína coagulable que gelifica cuando se pone en contacto con endotoxinas. Este fenómeno fue la base de la aplicación del lisado de amebocitos de Limulus (LAL) como indicador de endotoxinas.

a) Preparación de control positivo: Reconstituir la endotoxina con 5ml de agua (libre) libre de pirógenos, cada ml de esta solución contiene 500microgramos/ml de endotoxina de E. coli, diluir ésta con agua estéril libre de pirógenos hasta obtener una concentración 0.05microgramos/ml y colocar 0.1ml de esta última solución con 0.1ml de LAL, dejar incubar a 37°C por una hora.

b) Preparación del control negativo: Colocar 0.1ml de agua estéril libre de pirógenos con 0.1ml de LAL, dejar - incubar a 37°C por una hora.

c) Preparación del problema: colocar 0.1ml del radiofármaco con 0.1ml de LAL, dejar incubar a 37°C por una hora. Hacer lo mismo con una dilución 1:10 del radiofármaco.

d) Transcurrida la hora, invertir los tubos 180 grados, un gel fijo y firme en los tubos que contienen la muestra, indican la presencia de sustancias pirogénicas.

6.2.10. Ensayo de toxicidad en los radiofármacos.

Consideraciones previas: variaciones en las cantidades del fármaco utilizado o la introducción accidental de sustancias ajenas a la composición pueden producir efectos tóxicos en el paciente cuando se le administra el radiofármaco.

Para evitar esto se realiza la prueba de toxicidad; la misma consiste en la inyección del radiofármaco en ratones y la posterior observación de los mismos por 6 horas como mínimo.

a) Colocar un ratón blanco en el brete adecuado y dilatar las venas de la cola mediante calor.

b) Inyectar por la vena marginal de la cola 0.1ml de cada uno de los radiofármacos.

c) Repetir la operación con cuatro ratones más.

d) Colocar a los animales en una jaula bien ventilada.

e) Aguardar 24 horas para considerar no tóxica la solución administrada, no debiendo para ello morir ningún animal.

NOTA: debe tenerse sumo cuidado de no inocular burbujas de aire que producen muerte por embolia gaseosa.

6.2.11. Biodistribución del radiofármaco

Consideraciones previas: Este dato es de suma importancia pues permite evaluar el comportamiento "in vivo" del radiofármaco inyectado.

Para determinar este parámetro se deben emplear organismos de fisiología perfectamente conocida como ratones, ratas, conejos, etc. Después de inyectar el radiofármaco se debe esperar el tiempo prefijado y se sacrifica el animal. Este tiempo varía según el compuesto a ensayar y está determinado por el momento en el cual la actividad en el órgano blanco presenta la menor variación en función del tiempo.

a) Colocar al ratón en el brete y dilatar las venas de la cola mediante calor.

b) Inocular en la vena marginal de la cola 0.1ml del radiofármaco. Para el HIDA se utilizan 5 ratones y para el BIDA y DIPA 4 ratones.

c) Sacrificar a los animales de acuerdo a los siguientes intervalos de tiempo:

-HIDA a los 2, 5, 10, 15 y 20 min.

-DIPA y BIDA a los 5, 30, 60 y 90 min.

d) Fijar al ratón sobre la bandeja de disección

con la zona ventral hacia arriba y proceder a abrir la cavidad torácica y la intestinal cuidando de no cortar los órganos interiores.

e) Extraer sangre, riñones, estómago, intestino, hígado, bazo, vesícula biliar, pulmones, vejiga y orina.

f) Leer la actividad en una cámara de centelleo para cada órgano y calcular el porcentaje de actividad en cada uno de ellos, teniendo en cuenta que la dosis inyectada surge de la siguiente expresión:

DOSIS INYECTADA: Actividad(hígado) + A(sangre) + A(riñones) + A(estómago) + A(intestino) + A(bazo) + A(vesícula biliar) + A(pulmones) + A(vejiga y orina) + A(resto del cuerpo).

g) Realizar 5 veces las pruebas de biodistribución por fármaco.

NOTA: La dosis inyectada es de 0.01mg/g de peso con una actividad aproximada de 0.05 mCi.

6.2.12. Obtención de imágenes gammagráficas en conejos.

Después de que los radiofármacos hepatobiligres pasaron las pruebas anteriores cada uno fueron inoculado en 4 conejos blancos raza nueva zelanda (identificados como conejos W, X, Y y Z) con el fin de obtener imágenes gammagráficas. Esta actividad fue realizada en el departamento de Medicina Nuclear del Instituto Nacional de Pediatría.

a) El conejo es atado en posición decúbito dorsal en una tabla de madera por las cuatro patas mediante cintas de tela de tal manera que quede inmovilizado durante todo el estudio.

b) Inyectar 0.1ml del material radiactivo (Tc-99m-HIDA, Tc-99m-BIDA ó Tc-99m-DIPA) con una actividad de 1mCi (0.5mg/Kg peso).

c) Desde el momento de la inyección hacer el rastreo mediante una cámara gamma (anger) Pho/Gamma LFOV "Searle" .

d) Con lo anterior obtener una serie de imágenes a diferentes intervalos de tiempo durante una hora: 0, 5, 10, 20, 30, 45 y 60 min.

6.2.13. Pruebas Clínicas

Las pruebas clínicas fueron realizadas en un hospital particular en la ciudad de Puebla en pacientes ictericos ; sólomente fueron comparados HIDA y DIPA, ya que ellos utilizaban al primero en pruebas de rutina y únicamente se interesaron por las ventajas del DIPA.

a) El paciente debe estar en ayunas un mínimo de dos horas.

b) Administrar de 0.1 - 0.5ml del radiofármaco con una actividad entre 1-3mCi por vía intravenosa.

c) Con el paciente en decúbito dorsal obtener 6 imágenes en proyección anterior a intervalos de 5 min. Se sigue con la lateral derecha, oblicua anterior derecha y, finalmente anterior a los 45 minutos.

d) Si en este punto no se detecta radiactividad en los conductos intrahepáticos, vesícula biliar e intestino, obtener imágenes adicionales a intervalos variables; 2, 4, 6, 8 e incluso 24 horas.

e) Cuando el objeto de las imágenes tardías es el de determinar la presencia de radiactividad en el intestino, se realizan tomas del abdomen excluyendo el hígado.

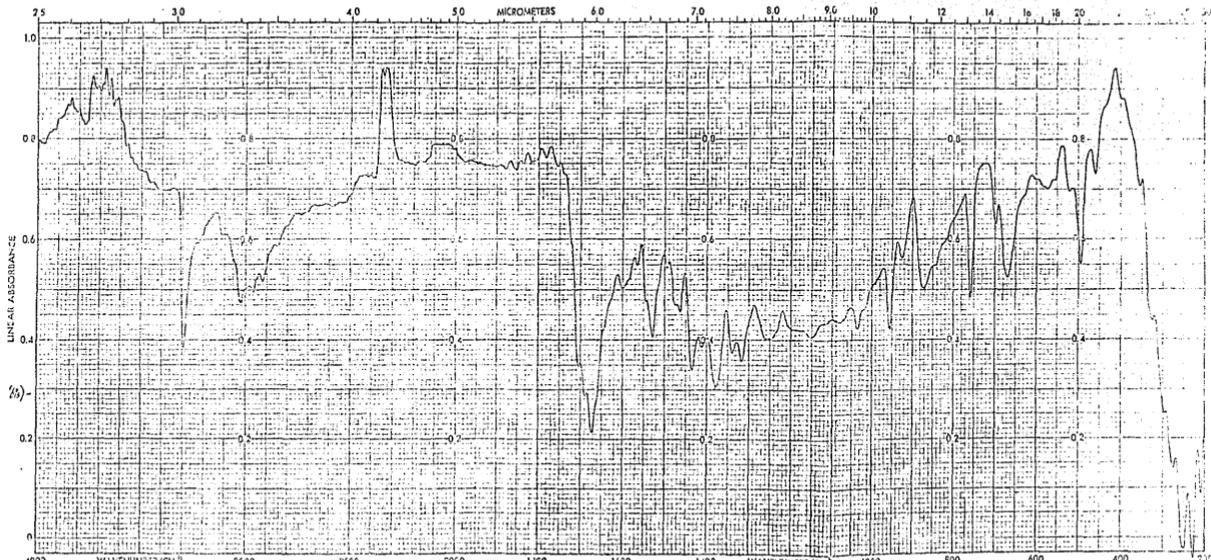
7. R E S U L T A D O S

TABLE III
 RENDIMIENTO Y CARACTERIZACION DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS

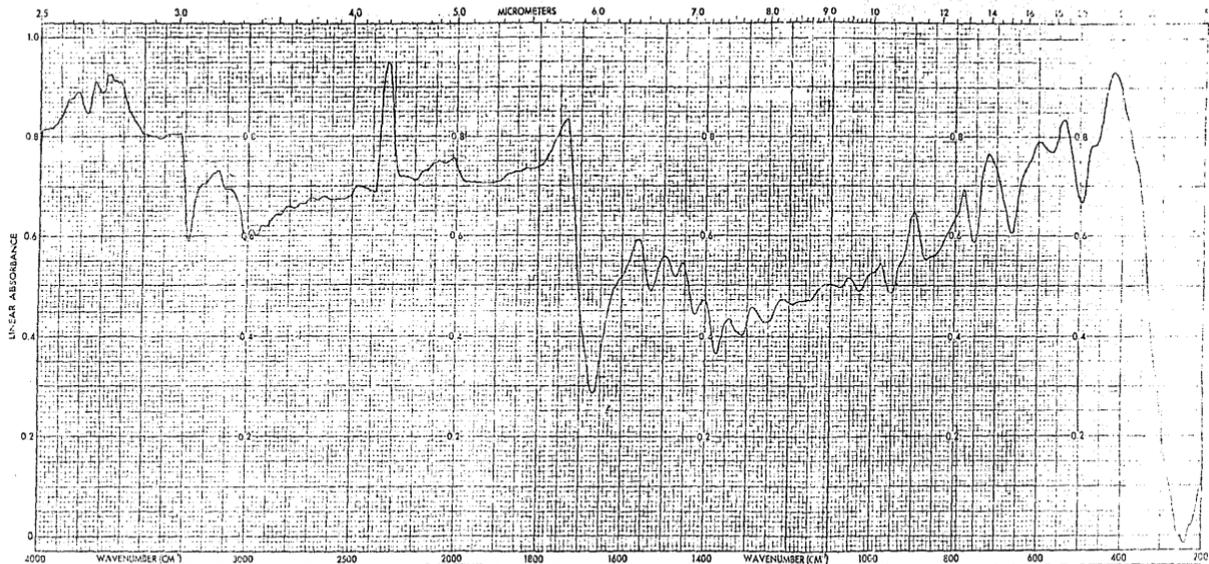
PRODUCTO	p.f. (°C)	RENDIMIEN TO (%)	R.f. (C.C.F.)
w-cloro-2,6-dimetilacetanilida	140-149	92	0.47 (S.S.#BENCENO)
w-cloro-2,6-diisopropilacetanilido	134-135	86	0.44 (S.S. BENCENO)
HIDA	215-216	91	0.3 (S.S. butanol- ác. acético-H ₂ O 4:1:1)
DIPA	186-187	85	0.3 (S.S. butanol- ác. acético-H ₂ O 4:1:1)

S.S.# ; Sistema de solvente

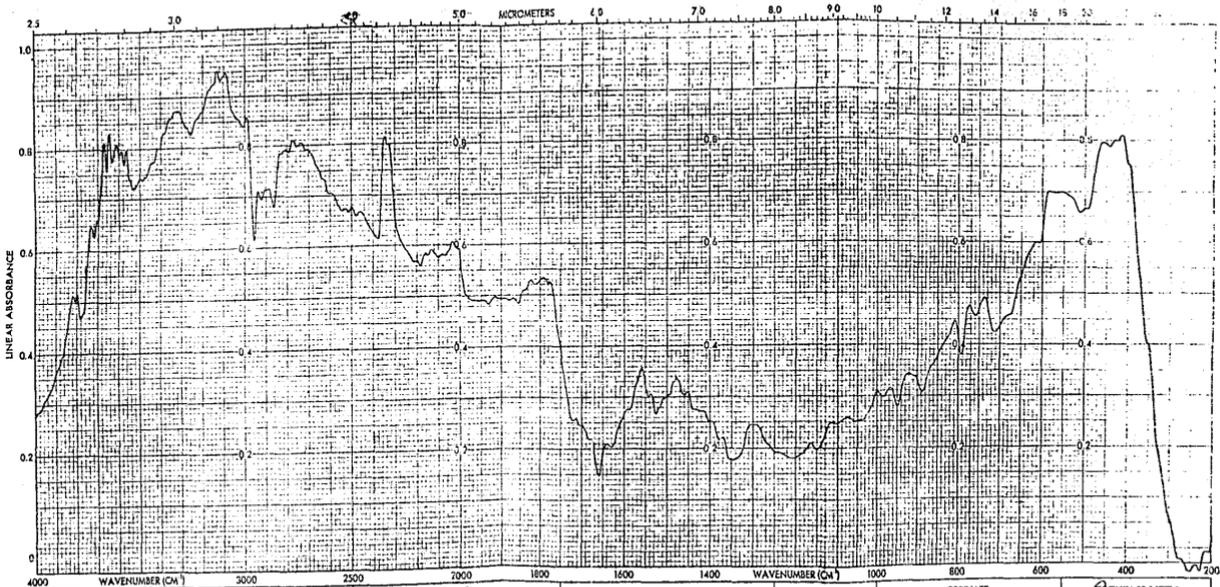
Los productos fueron caracterizados por la comparación de sus espectros de infrarrojo con los de muestras de HIDA y DIPA obsequiados por el centro de SUREQ de Israel, aunque se encontró para el DIPA de Israel un rango de fusión más amplio (p.f. 184-187°C).



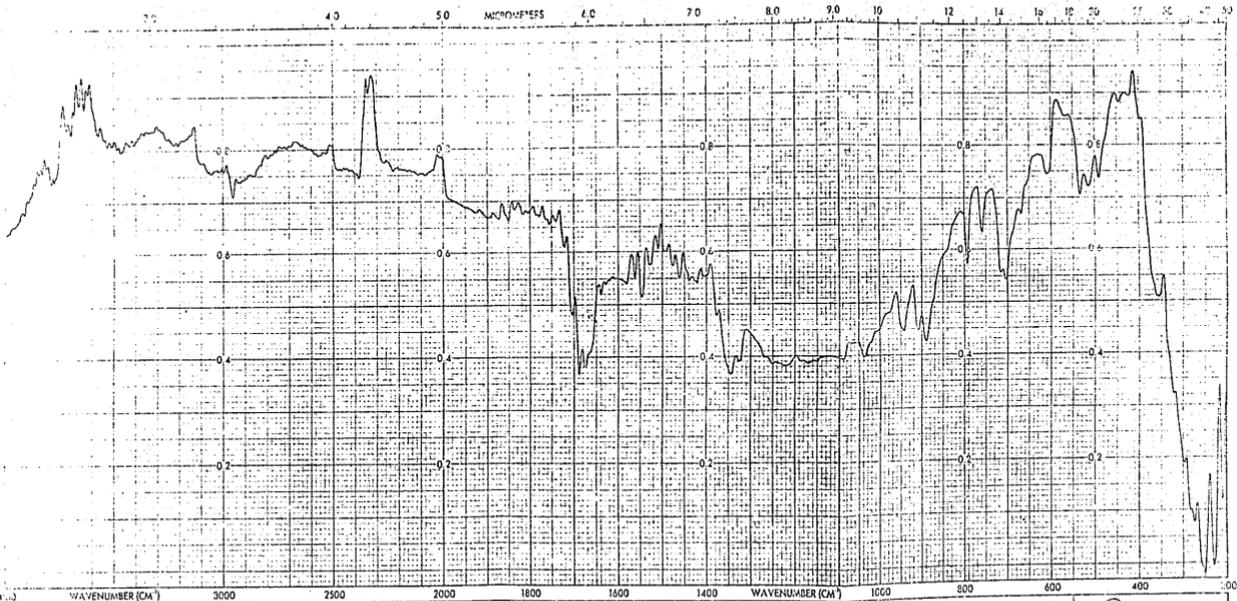
SAMPLE <i>White Stone</i>	WAVENUMBERS <i>1400-6 (Mid)</i>	SOLVENT _____		ABSORBER _____		ORIGINATE _____		OPERATOR <i>HERRIKEN ELJASER</i>	
	CONCENTRATION _____	CELL PATH _____		REF. SCAN <i>N</i>		EXPANSION <i>N</i>			CHANNEL NO. _____
	CHURN <i>4170 G. J. 111 L.</i>	REFERENCE <i>Misc</i>		HIGH LIMIT <i>4000</i>		SUPPRESSION <i>N</i>			DATE <i>2-24-68</i>
	ARCHIVE <i>IR-283B</i>	LOW LIMIT <i>500</i>		TIME DRIVE <i>12</i>		RESPONSE <i>N</i>			REF. NO. _____
WAVENUMBER (CM⁻¹)		WAVENUMBER (CM⁻¹)		WAVENUMBER (CM⁻¹)		WAVENUMBER (CM⁻¹)		REF. NO. _____	



SAMPLE MDA-2: Amical (300) <i>control on shell & some</i>	PREP. BY <i>the same pulverulent</i> <i>3/11/50</i> <i>Regio directe 2/11/50</i>	SOLVENT _____	ABSCISSA _____	SCAN TIME <u>12 min</u>	ORDINATE _____	PREP. BY DATE EXP. NO. <u>31194</u> REF. NO. <u>MDA-2</u>
		CONCENTRATION _____	REP. SCAN <u>12 min</u>	EXPANSION <u>1</u>	RESPONSE <u>1</u>	
		CELL PATH _____	HIGH LIMIT <u>4000</u>	SUPPRESSION <u>1</u>	FOCUS BEAM _____	
		REFERENCE <u>None</u>	LOW LIMIT <u>201</u>	TIME DRIVE <u>12 min</u>	FT. MOTOR <u>1</u>	



SAMPLE Q19A-1 (SOREO) <small>(C.F. 194-170)</small> <small>©KIRK M. & C. J. LEHMAN</small>	REMARKS	SOLVENT	ABSCISSA	ORDINATE	PERKIN ELMER CHART NO. 21159 OPERATOR <i>[Signature]</i> 30484 REF. NO.	
	<i>Acetone IR-283B</i>	CONCENTRATION	REP. SCAN	EXPANSION		EXPANSION
	<i>Deposits direct on KBr.</i>	CELL PATH	HIGH LIMIT	SUPPRESSION		RESPONSE
		REFERENCE	LOW LIMIT	TIME DRIVE		SLIT PROGRAM



REMARKS 2197-2 (MIN) <i>archivo IR-2838</i> H en C, J LEVIN <i>Deposito discato en KBx</i>		ABSORBA CONCENTRATION _____ CELL PATH _____ REFERENCE <i>AIR</i>		SCAN HIGH LIMIT <i>1000</i> LOW LIMIT <i>200</i>		EXPANSION <i>N</i> SUPPRESSION <i>N</i> DRIVE <i>12</i>		SCAN TIME <i>12</i> RESOLVE <i>N</i> SPLIT PROGRAM <i>N</i>		COORDINATE YT _____ ABS _____ PRE. SCALE CHOICE _____		PERKIN ELMER MODEL NO. 283-1752 DATE <i>20-8-86</i> REL. NO. _____
--	--	---	--	--	--	---	--	---	--	--	--	---

TABLA IV.

PRUEBAS CRUZADAS DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SnCl_2 EN LOS NUCLEO-EQUIPOS DE HIDA, DIPA Y BIDA, HACIENDOSE NOTAR EN CADA CASO LA PUREZA DEL MARCAJE.

RADIOFARMACO (pH)	IMPUREZAS RA- DIOQUIMICAS.	SnCl_2 (mg)		
		1	0.2	0.1
Tc-99mHIDA (6.0)	TcO_4^- (%)	3	15.0	20.0
	TcO_2 (%)	7	2.0	0.0
Tc-99mDIPA (5.5)	TcO_4^- (%)	*	1.8	13.0
	TcO_2 (%)	*	0.1	2.0
Tc-99mBIDA (6.0)	TcO_4^- (%)	*	8.0	1.6
	TcO_2 (%)	*	5.0	0.1

* = Inestable la solución de SnCl_2

NOTA: Los nucleo-equipos obtenidos son estériles, libres de ni-
rígenos y no-tóxicos.

TABLA V

RESULTADOS DE LAS CROMATOGRAFIAS EN ITLC Y WHATMAN-1.

Para el HIDA la resolución fue satisfactoria en solución salina, obteniendo un sólo pico con una eficiencia del marcaje superior al 90%.

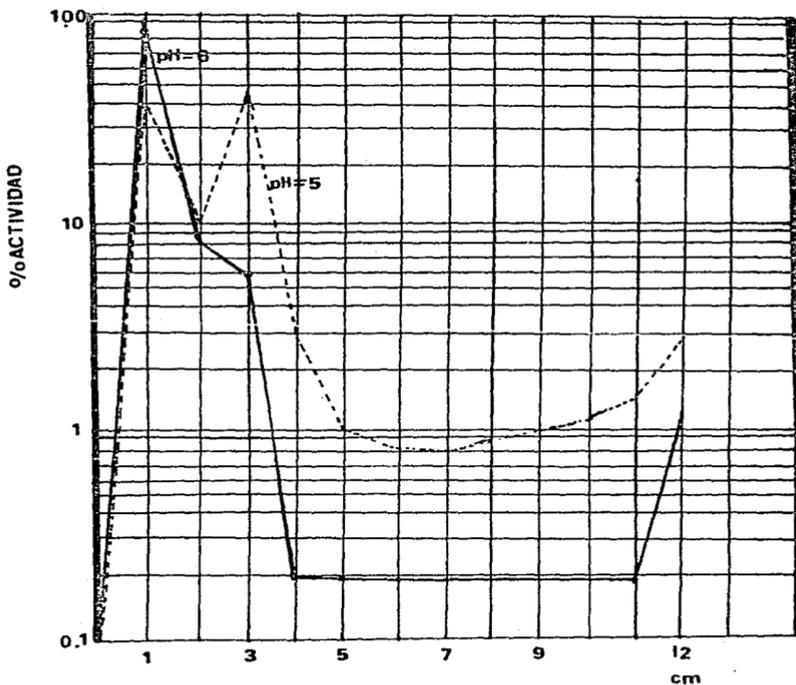
El BIDA y el DIPA no se separan satisfactoriamente en solución salina al 0.9%. Es necesario para estos dos radiofármacos la utilización de dos sistemas; uno para determinar Tecnecio hidrolizado y el otro para determinar Pertecnetato libre, por lo que se utilizaron los siguientes sistemas de solventes:

SISTEMA DE SOLVENTE (ITLC)	TcO ₂ 2 (Rf)	TcO ₂ 4 (Rf)	COMPUESTO (DIPA Y BIDA) (Rf)
CLOROFORMO-ACETONA 7:3	0.0	1.0	0.0
METANOL 85%	0.0	1.0	1.0
ACETONITRILLO-AGUA 3:1	0.0	1.0	1.0
METIL-ETIL-CETONA	0.0	1.0	0.0

Sin embargo, dentro de los sistemas cromatográficos para obtener la actividad del pertecnetato libre (donde el Rf del compuesto es cero), se observaron dos picos cromatográficos que varían con el pH. Dichos picos cromatográficos coalescen en el origen cuando la cromatografía se realiza de la sangre o de la bilis de un ratón previamente inoculado por vía endovenosa con los compuestos marcados (ver gráficas 3, 4 y 5).

CROMATOGRAFIA DE Tc-99m-BIDA A DIFERENTES pH_s

(ITLC Cloroformo- Acetona 7:3)

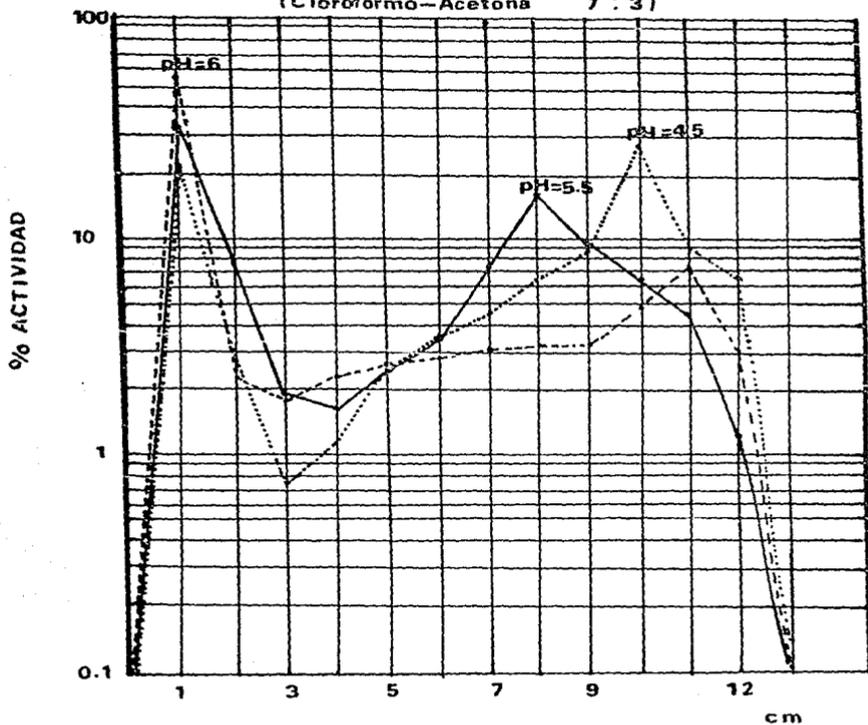


GRAFICA 4.

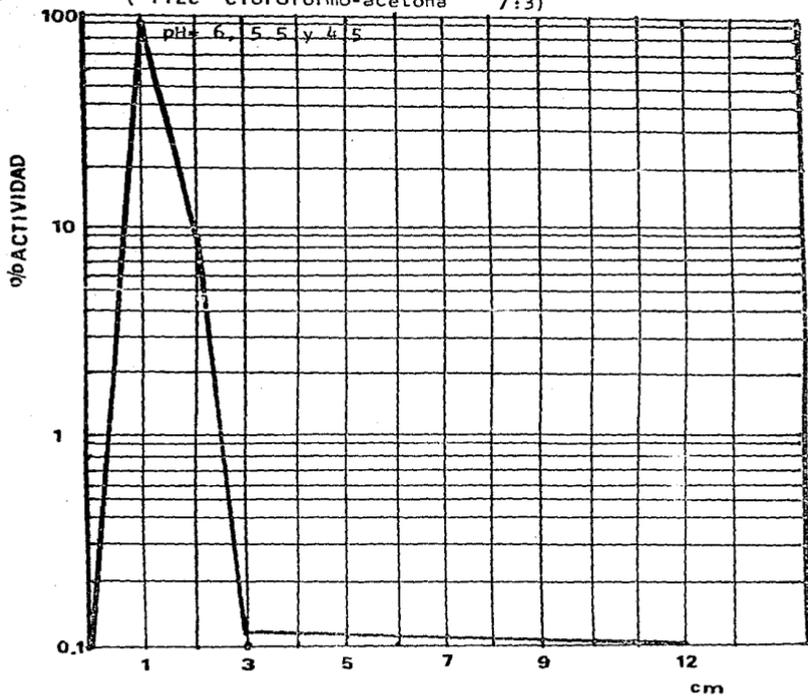
CROMATOGRAFIA DE Tc-99m-DIPA (ITLC)

A DIFERENTES pHs

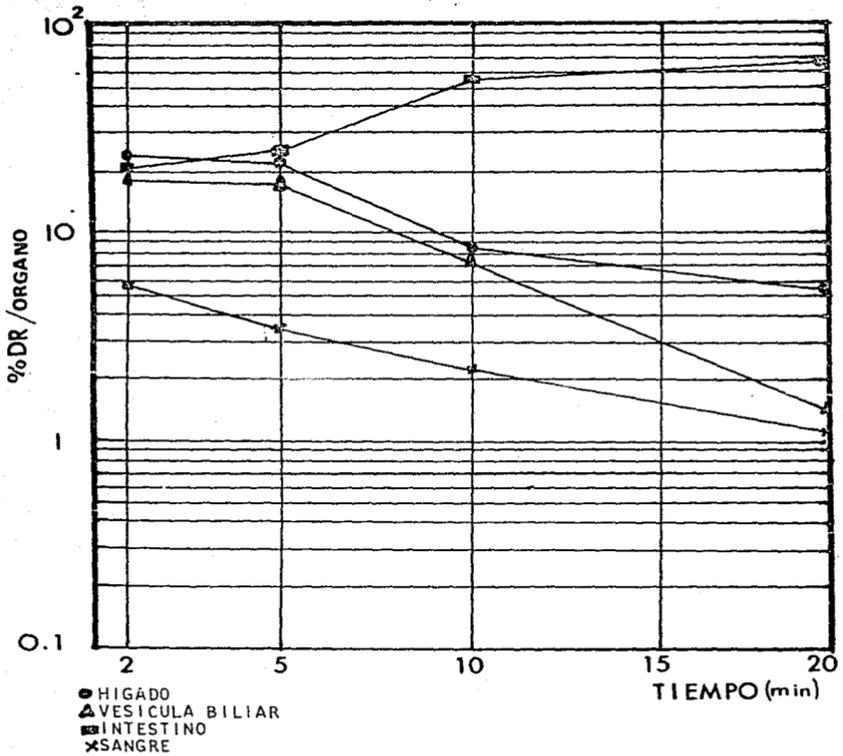
(Cloroformo-Acetona 7 : 3)



GRAFICA 5.
CROMATOGRAFIA DE BILIS Y SANGRE DE RATONES
INOCULADOS CON Tc-99m- DIPA A DIFERENTES pHs.
(ITLC Cloroformo-acetona 7:3)

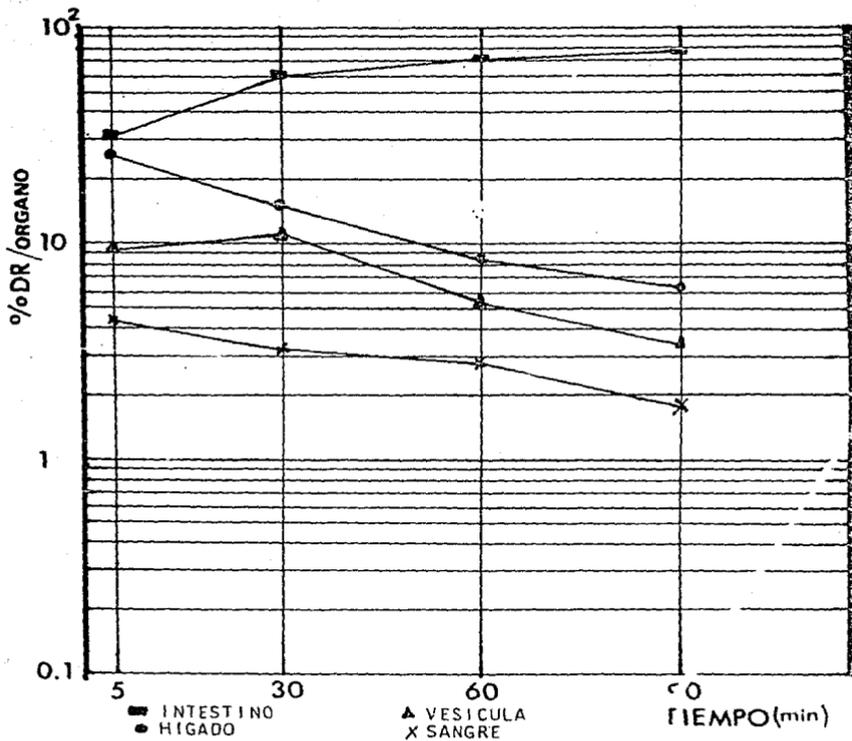


GRAFICA 6.
ACLARAMIENTO HEPATOBILIAR DE Tc-99m-HIDA

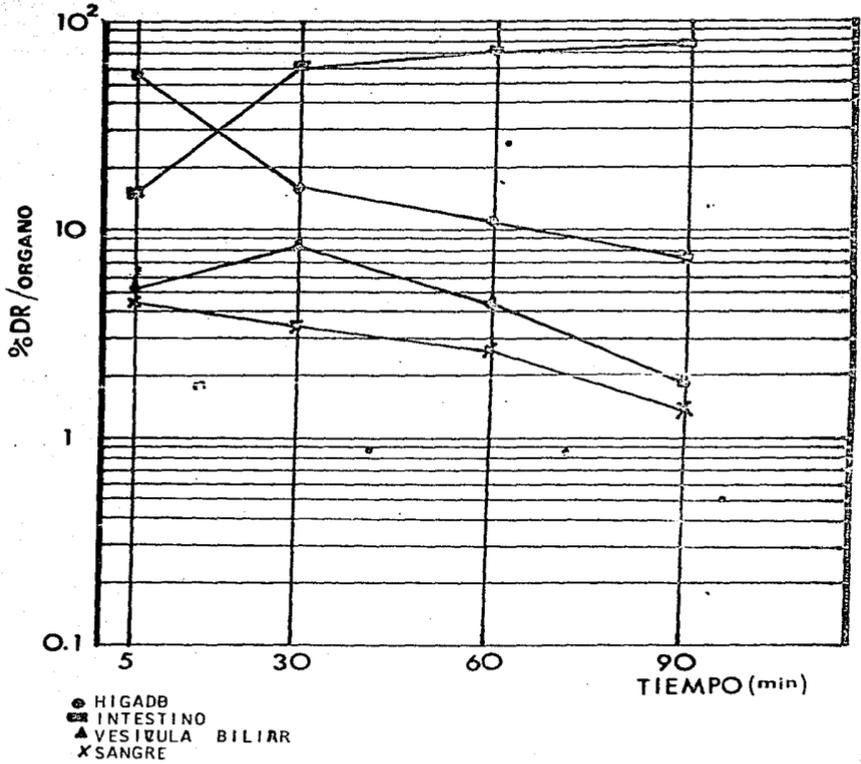


GRAFICA 7.

ACLARAMIENTO HEPATOBILIAR DE Tc-99m-DIPA

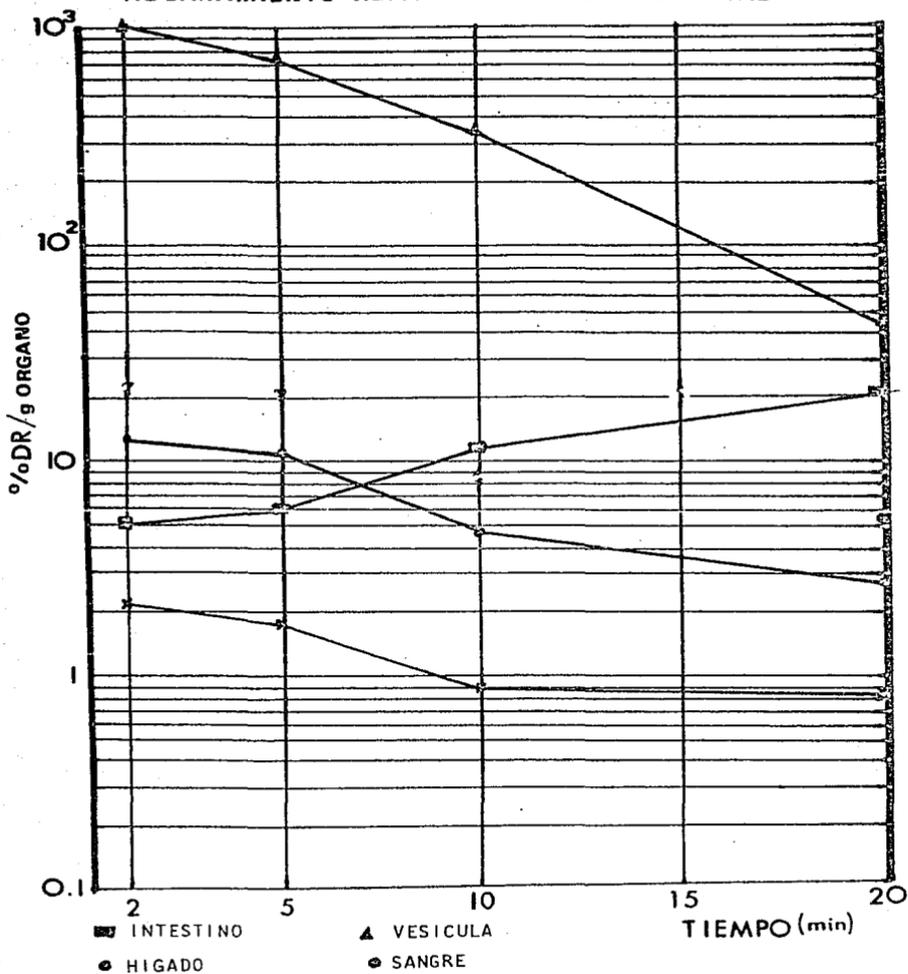


GRAFICA B.
ACLARAMIENTO HEPATOBILIAR DE Tc-99m-BIDA

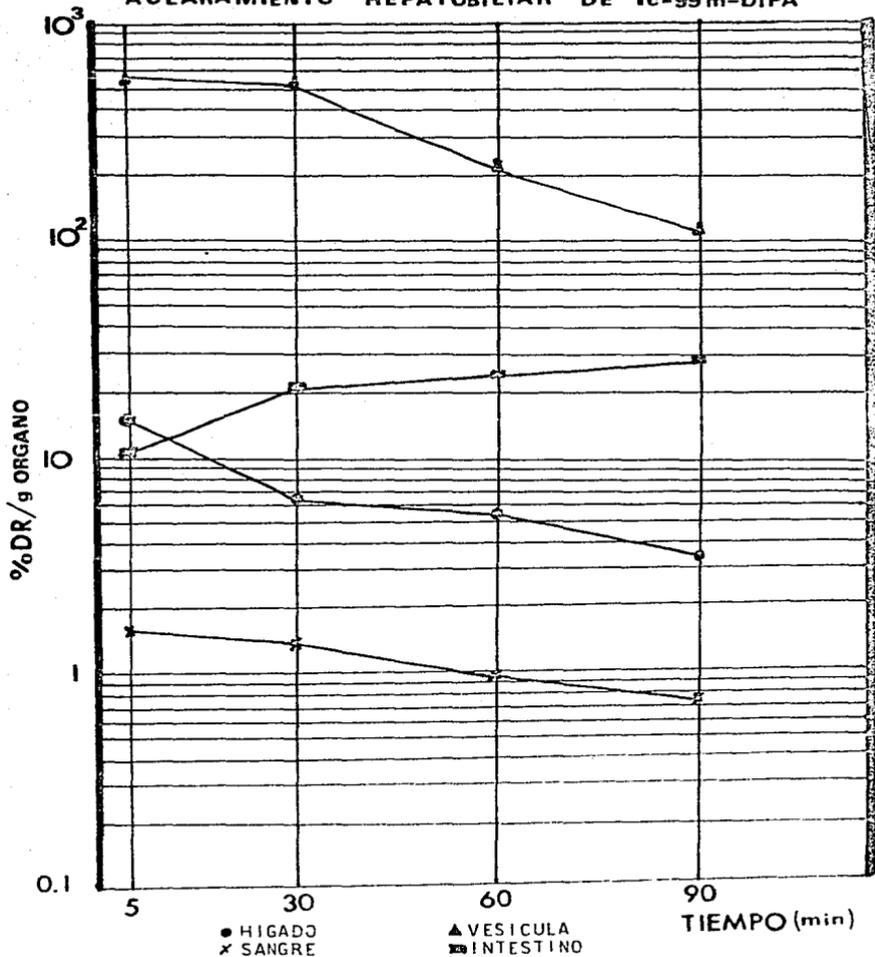


GRAFICA 9.

ACLARAMIENTO HEPATOBILIAR DE Tc-99m-HIDA

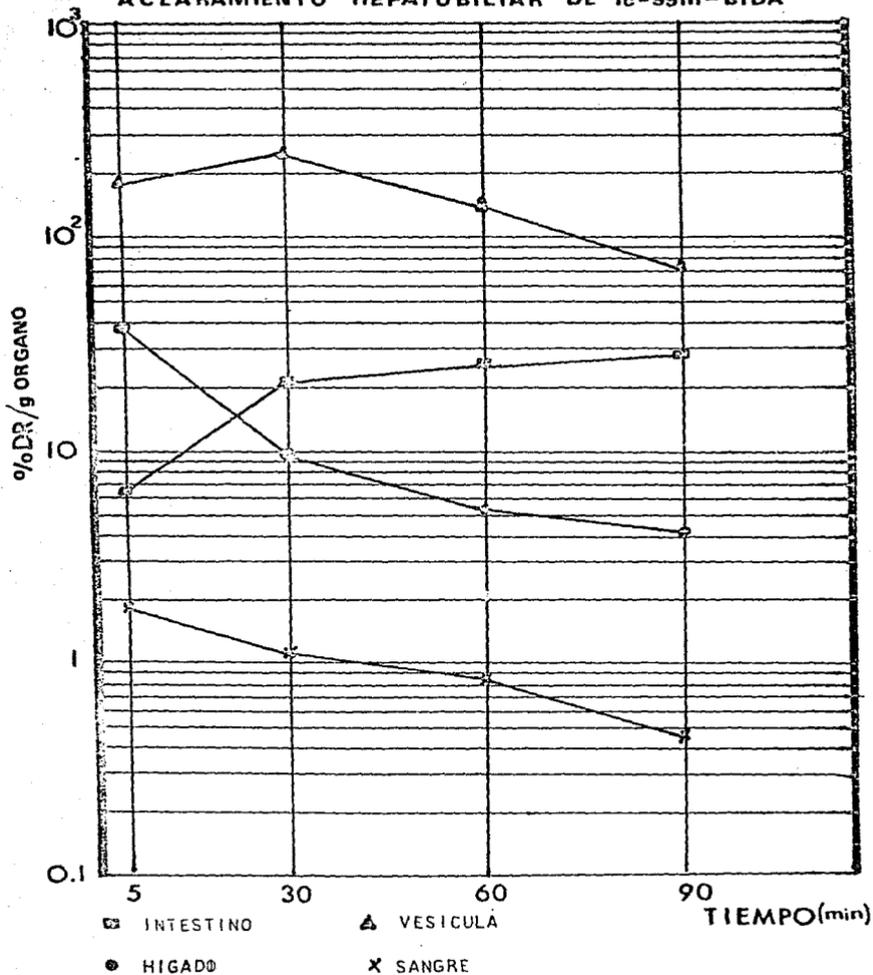


GRAFICA 10.
ACLARAMIENTO HEPATOBILIAR DE Tc-99m-DIPA

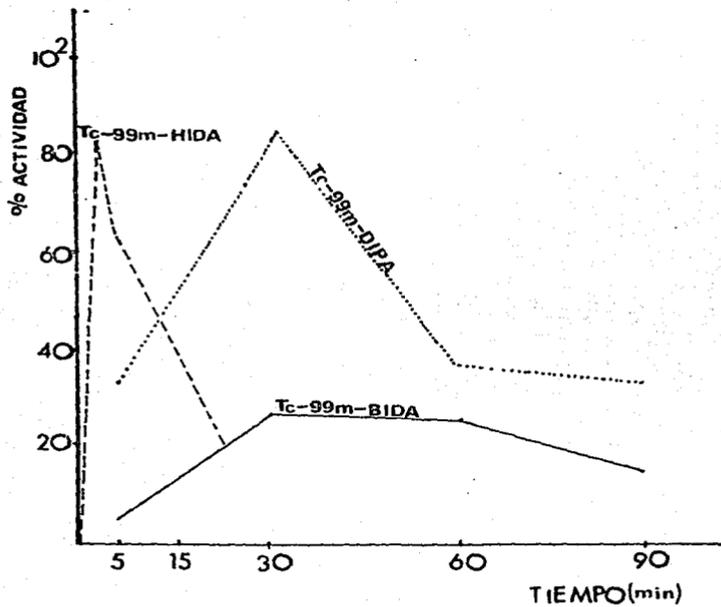


GRAFICA 11.

ACLARAMIENTO HEPATOBILIAR DE Tc-99m-BIDA



GRAFICA 12.
COMPARACION DE LA RELACION VESICULA/HIGADO
DE RADIOFARMACOS HEPATOBILIARES EN RATONES



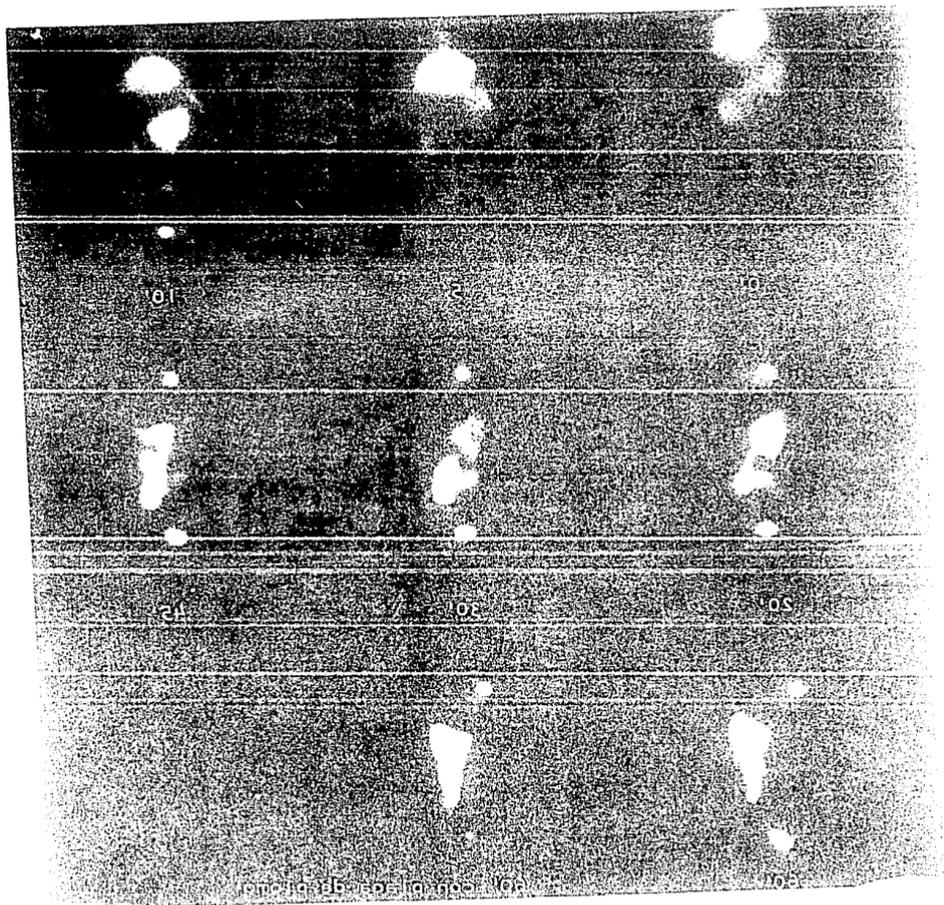


Imagen 1. Gamagrafía hepatobiliar con $Tc-99m$ -HIDA en conejo. Obsérvase la rápida secreción y visualización en la vesícula biliar.

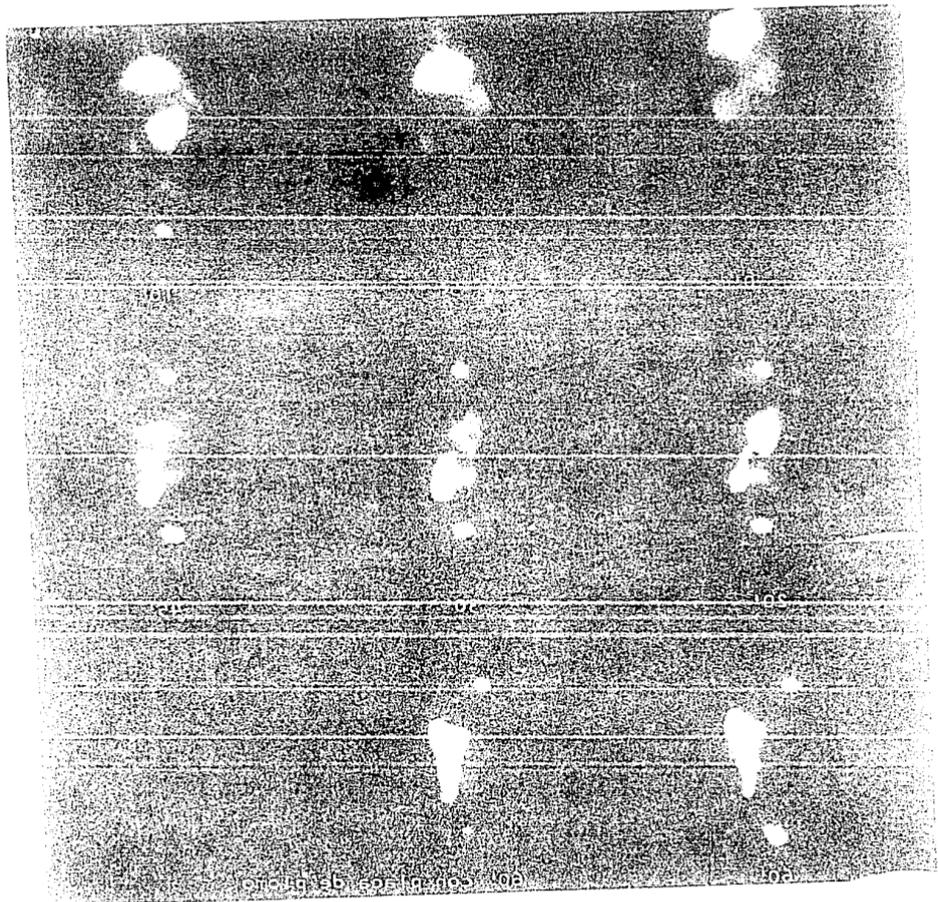


Imagen 1. Gammaografía hepatobiliar con Tc-99m-HIDA
en conejo. Obsérvese la rápida excreción
y visualización de la vesícula biliar.

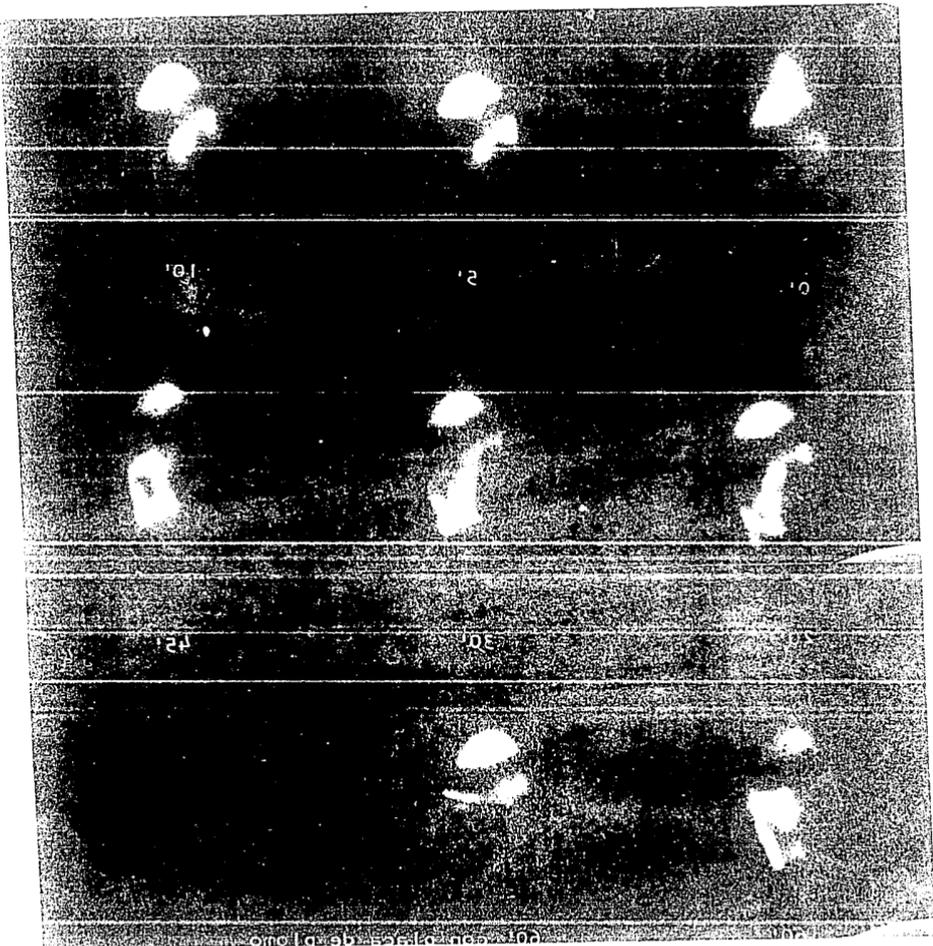


Figura II. Gammagrafía hepatobiliar con ^{99m}Tc -DTPA. Se observa una buena visualización de la vesícula biliar y una excreción más lenta respecto al ^{99m}Tc -DTPA.

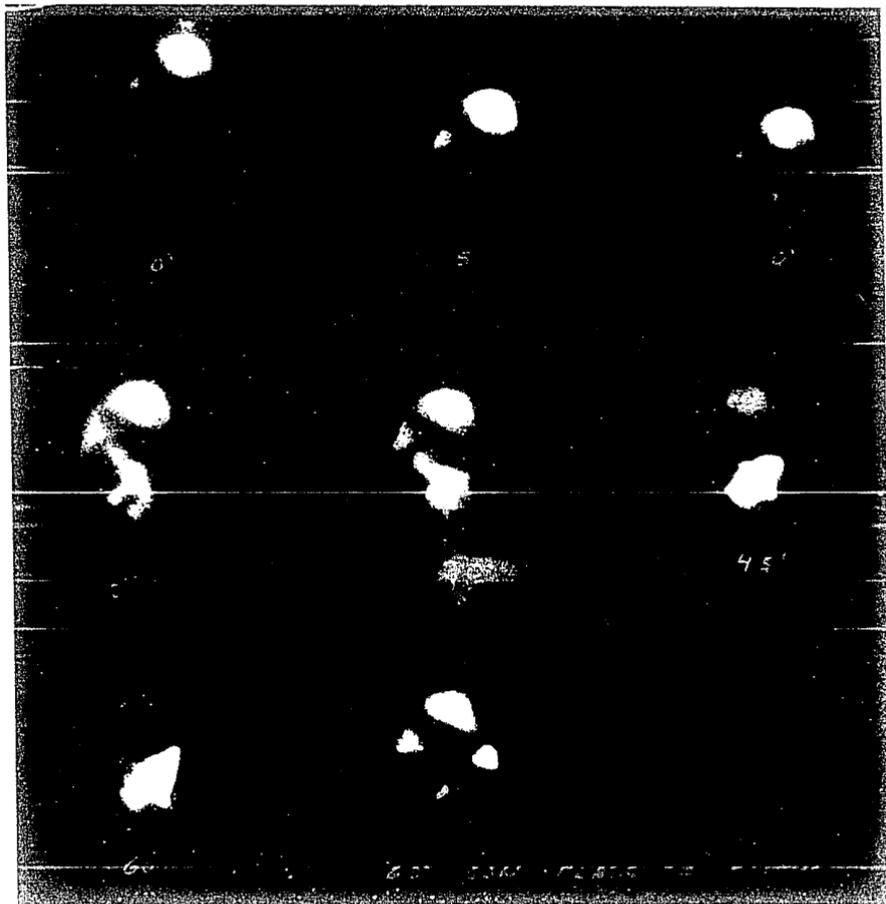


Imagen III. Gammaografía hepatobiliar con ^{99m}Tc -B10A en conejo. Obsérvese la lenta excreción y la no visualización de la vesícula biliar.

ANALISIS DE IMAGENES CENTELLEOGRAFICAS EN CONEJOS

HIGADO

TIEMPO (min)	DIPA			HIDA			BIDA					
	W	X	Y	Z	W	X	Y	Z	W	X	Y	Z
5	6	6	6	6	4	5	5	5	6	6	6	6
10	6	5	5	6	3	4	4	4	6	6	6	6
20	5	4	4	5	1	2	2	2	5	5	5	5
30	4	3	3	4	0	1	1	1	4	4	4	4
45	3	2	2	3	0	0	0	1	3	4	3	3
60	2	1	2	2	0	0	0	1	2	3	2	2

NOTA: W,X,Y y Z= conejos
Escala 0-6

VESICULA BILIAR

TIEMPO (min)	DIPA			HIDA			BIDA					
	W	X	Y	Z	W	X	Y	Z	W	X	Y	Z
5	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
10	0	0	3	3	1	2	3	3	0	0	1	0
20	3	1	3	3	0	3	2	3	1	0	3	0
30	3	2	3	3	0	3	1	3	3	1	3	1
45	2	1	2	3	0	3	0	3	2	1	2	1
60	0	1	2	3	0	3	0	3	1	1	1	0

NOTA: Escala 0-3

VEJIGA

TIEMPO (min)	DIPA			HIDA			BIDA					
	W	X	Y	Z	W	X	Y	Z	W	X	Y	Z
5	0	1	0	1	2	1	1	0	0	0	0	0
10	1	2	1	1	3	2	2	2	1	1	1	1
20	1	2	1	1	3	3	3	3	2	2	2	2
30	2	2	2	1	4	4	4	4	3	2	2	3
45	2	2	2	1	4	4	4	4	3	3	3	3
60	2	2	2	1	4	4	4	4	4	3	3	3

NOTA: Escala 0-4

INTESTINO

TIEMPO (min)	DIPA			HIDA			BIDA					
	W	X	Y	Z	W	X	Y	Z	W	X	Y	Z
5	1	1	0	1	2	1	1	0	0	0	0	1
10	2	2	1	2	3	2	2	2	1	1	1	1
20	3	3	2	3	3	3	3	3	2	2	2	2
30	3	4	3	3	4	4	4	4	3	2	2	3
45	4	4	3	4	4	4	4	4	3	3	3	3
60	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	3

NOTA: Escala 0-4

ANALISIS DE VARIANZA PARA PRUEBAS EN CONEJOS

MODELO:

$$Y_{ijk} = M + F_i + T_j + FT_{ij} + E_k(ij)$$

donde M= media ; F_i = Radlofármaco; T_j = tiempo ; FT_{ij} = Interacción tiempo-radiofarmaco
 $E_k(ij)$ = efecto debido a la variabilidad-; Y_{ijk} = resultado obtenido biológica.

F.V.	P.S.	Pds	S.C.	M.C.
F_i	$i-1$	$i-1$	$\sum Y_{i..}^2 / jk - Y^2 \dots / ijk.$	$SCF_i / g1$
T_j	$j-1$	$j-1$	$\sum Y^2 \dots / ik - Y^2 \dots / ijk$	$SCT_j / g1$
FT_{ij}	$(i-1)(j-1)$	$ij-i-j+1$	$\sum \sum Y_{ij.}^2 / k - Y_{i..}^2 / jk - \sum Y^2 \dots / ik + Y^2 \dots / ijk$	$SCTF_{ij} / g1$
$E_k(ij)$	$(k-1)ij$	$kij-ij$	$\sum \sum \sum Y^2 \dots / k - \sum Y_{ij.}^2 / k$	$SCE_{k(ij)} / g1$

F.V.= Fuente de variación ; P.S.= producto simbólico ; Pds= producto simbólico desarrollado
 S.C.= suma de cuadrados ; M.C.= media cuadrática

TABLA DE LA ESPERANZA MATEMATICA

F_i	$\sigma^2 E$	$\sigma^2 F$
T_j	$\sigma^2 E$	$\sigma^2 T$
TF_{ij}	$\sigma^2 E$	$\sigma^2 TF$
$E_k(ij)$	$\sigma^2 E$	

EFFECTOS

$$F_i: MCF_i / MCE_{k(ij)} = F_{calc.}$$

$$T_j: MCT_j / MCE_{k(ij)} = F_{calc.}$$

$$FT_{ij}: MCTF_{ij} / MCE_{k(ij)} = F_{calc.}$$

REGLA DE DECISION: Si $F_{calc.} > F_{tablas}$ el efecto estudiado es significativo, de lo contrario las diferencias son debidas a la variabilidad biológica

NOTA: F= estadístico
 $\alpha = 0.05$

TABLA VII

-80-

RESULTADOS DEL ANALISIS DE VARIANZA PARA LAS GAMMAGRAFIAS EN CONEJOS

1. LAS DIFERENCIAS OBSERVADAS EN LA EXTRACCION HEPATICA ENTRE EL DIPA Y EL BIDA NO SON ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS.
2. LAS DIFERENCIAS OBSERVADAS EN LA EXTRACCION HEPATICA PARA EL HIDA RESPECTO AL DIPA Y BIDA SON ESTADISTIGAMENTE SIGNIFICATIVAS.
3. LA CINETICA DE ELIMINACION PARA EL HIDA, DIPA y BIDA ES DIFERENTE, BONDE EL HIDA SE ELIMINA EN MENOR TIEMPO, MIENTRAS QUE EL BIDA ES QUIEN LO HACE MAS LENTO.
(EFECTO DEL TIEMPO ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVO EN INTESTINO E HIGADO)
4. LAS DIFERENCIAS OBSERVADAS EN LA CONCENTRACION EN INTESTINO HASTA LOS 60 min. ENTRE EL HIDA y DIPA NO SON ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS, MIENTRAS SI LO ES PARA EL BIDA RESPECTO A LOS DOS ANTERIORES.
5. LAS DIFERENCIAS OBSERVADAS EN LA VISUALIZACION DE LA VESICULA BILIAR ES DIFERENTE PARA LOS TRES RADIOFARMACOS Y LA ELIMINACION NO DEPENDE DEL RADIOTRAZADOR SINO DE LA VARIABILIDAD BIOLOGICA.
6. LAS DIFERENCIAS OBSERVADAS EN LA VISUALIZACION DE LA VEJIGA PARA LOS TRES RADIOFARMACOS ES ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVO.

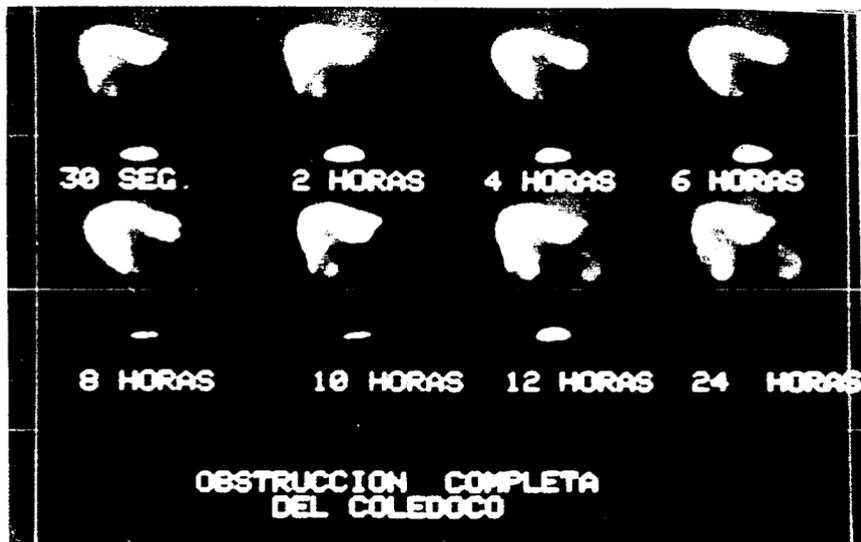


Imagen IV. Gammagrafía hepatobiliar con Tc-99m en humano. Obsérvese la falta de excreción del material radiactivo al intestino después de 24 hrs., lo que implica una obstrucción completa del coledoco.



Imagen V. Colecentellografía con Tc-99m-HIDA y con Tc-99m-DIPA en humano. Obsérvese que la visualización de la vesícula biliar es más delimitada en sus bordes con Tc-99m-DIPA que con Tc-99m-HIDA, debido a la rápida excreción de este último del ducto biliar.



Imagen VI. Colecentellografia con Tc-99m-HIDA en humano.

8. DISCUSION DE RESULTADOS

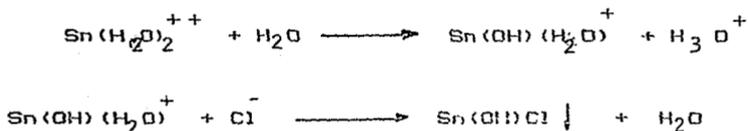
Con el método de síntesis para HIDA y DIPA que aquí se presenta es posible obtener buenos rendimientos (85-92%) con la pureza deseable. Dado que la síntesis consistió en la formación de la acetanilida correspondiente seguida de la adición de la sal disódica del ácido iminodiacético fue posible, en ambos casos, eliminar fácilmente subproductos (como los resultantes de la oxidación de la anilina aromática o la hidrólisis de la acetanilida) con la simple recristalización y el lavado de los cristales usando solventes de baja polaridad (CCl_4) como ocurrió con el DIPA.

La pureza fue evaluada con el corto rango de punto de fusión y la cromatografía de sílica gel en capa fina que revelaba un solo producto. Dado que el ININ no cuenta con el equipo para espectroscopía de RMN así como análisis elemental, los productos fueron caracterizados mediante la comparación de sus espectros de infrarrojo con los de HIDA y DIPA obsequiados por el centro nuclear de SOREQ Is---rael.

Otra alternativa para la síntesis de los derivados del ácido iminodiacético que también podría ser rápida y sencilla consistiría en hacer reaccionar el anhídrido del ácido nitrilotriacético con la correspondiente anilina.

Se eligió para las formulaciones de nucleo-equipos al cloruro estanoso como agente reductor por las ventajas que representa el uso de "kits instantáneos", ya que otros métodos para reducir el pertecnetato requieren de procedimientos adicionales como es el caso del HCl, donde el fármaco debe ser calentado y posteriormente adicionársele un buffer para poder ser inoculado al paciente. Al quedar el estafio integrado en la formulación liofilizada actúa como reductor en el momento en que el producto es hidratado con el pertecnetato en solución salina; sin embargo, es importante la cuidadosa preparación de las soluciones de SnCl_2 antes de la liofilización con el fin de evitar tanto la oxidación como la hidrólisis del mismo que puedan afectar el marcado de las moléculas; esto es, el ión estanosos en solución tiende a oxidarse en poco tiempo a ión estánico, como no hay prueba concluyente de la existencia del hidróxido estánico simple $\text{Sn}(\text{OH})_2$, se ha postulado que éste su-

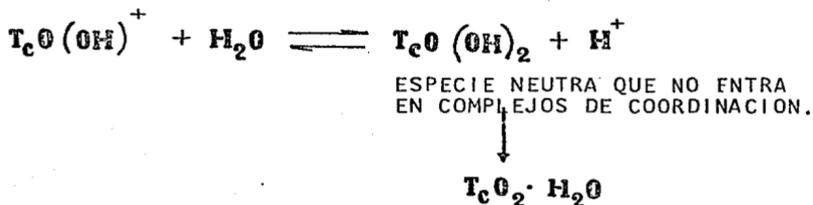
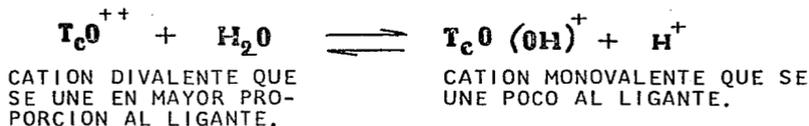
fre hidrólisis formándose el ión estanato hidratado $[\text{Sn}(\text{OH})_6]^{2-}$ que correspondería al compuesto teórico: $\text{H}_2\text{Sn}(\text{OH})_6$. La oxidación fue evitada utilizando una atmósfera de nitrógeno al momento de preparar las formulaciones. No obstante, las soluciones acuosas de la sal (SnCl_2) se enturbian por efecto de la hidrólisis teniendo lugar la formación de cloruro básico:



Este enturbiamiento se evitó no excediéndose a un pH mayor de 6 cuando se ajustaban las soluciones al pH final.

La cantidad agregada a los fármacos de SnCl_2 es específica para cada uno de ellos pese a la similitud en su estructura química, ya que en solución presentan notable diferencia de viscosidad (este dato estaría íntimamente relacionado con su diferente lipoficidad). Las cantidades óptimas del agente reductor fueron elegidas de la bibliografía (3,4,29,34), encontrando la cantidad de ión estanoso donde la pureza radiactiva fuera por lo menos del 90%

evitando, de esta forma, un exceso de pertechnetato libre (no reducido) y/o tecnecio coloidal (hidrolizado) como subproductos del marcaje:



Las cantidades de estaño óptimas que se refirieron para cada caso fueron corroboradas al realizar un experimento cruzado con las tres concentraciones de SnCl_2 (0.1, 0.2 y 1mg) y los tres fármacos (HIDA, DIPA y BIDA), concluyéndose que se trabajaría por vial las siguientes cantidades de cloruro estano: HIDA 1mg, DIPA 0.2mg, BIDA 0.1mg (Tabla IV).

La pureza radioquímica del DIPA y BIDA se creyó en un momento dudosa con el hallazgo de picos cromatográficos

cos que no se presentan en las regiones de pertechnetato libre o tecnecio hidrolizado y que además variaban con el pH de la formulación (pronunciándose más a pH bajos [gráficas 3 y 4]); sin embargo, la biodistribución no era afectada cuando se hacían las pruebas biológicas en los ratones, hecho que nos llevó a realizar cromatografías de bilis y sangre 20min después de inocular a los ratones con formulaciones de DIPA a pH de 6, 5.5 y 4.5, observando que en los tres casos los picos coalescían en el origen (gráfica 5). De acuerdo con Fritzberg, Nunn A.D. y colaboradores (1 y 34) la identidad de un segundo pico cromatográfico que no altera el comportamiento biológico de los compuestos es una pregunta que aún permanece. Una posibilidad la reflejaría la estructura propuesta por Loberg y Fields en cuanto a la formación de complejos con dos iminodiacetatos y un tecnecio (fig. 3) pero probablemente con cambios en los grupos cloro, acuo o hidroxí en siete o más estructuras de coordinación; el incremento del pH esperaría como resultado un desplazamiento de cloro si los iones cloruro fueran parte del complejo, así mismo, si un grupo acuo fuera parte de la estructura. Este punto podría explicar la rápida conversión del segundo componente a una sola estructura a pH más alto.

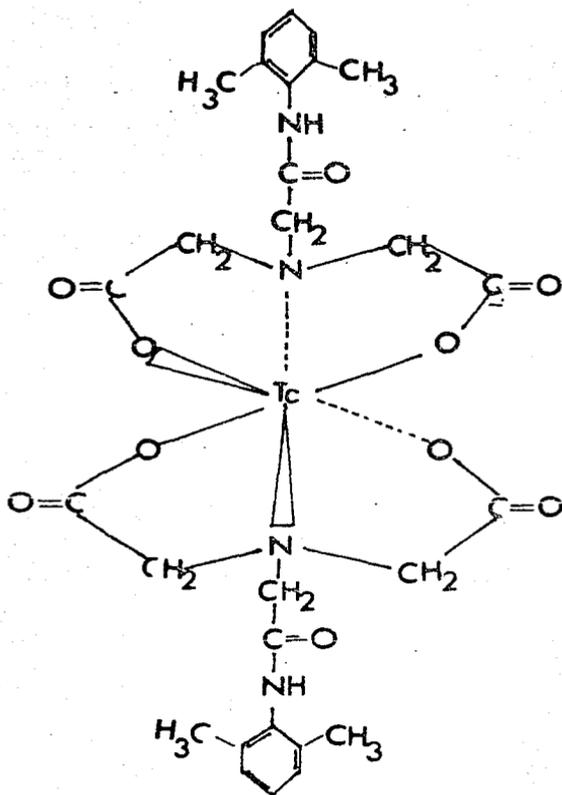


fig. 3

PROBABLE COMPLEJO DE COORDINACION Tc-99m-

Se aprecia en la biodistribución en ratones que efectivamente la actividad de los tres fármacos se concentra en órganos de interés (hígado y vesícula) corroborándose su eliminación por presencia de radiactividad en intestino, factor indicativo de que pueden utilizarse para estudios dinámicos en la evaluación de la función hepatobiliar. El aclaramiento por órgano para HIDA, DIPA y BIDA (gráficas 6, 7 y 8), muestra una excreción mucho más rápida del primero respecto del segundo y tercero y una cinética de eliminación para el DIPA y BIDA muy semejante. Al analizar el aclaramiento por gramo de órgano (gráficas 9, 10 y 11) y la relación vesícula/hígado (gráfica 12) puede establecerse que el DIPA mantiene el mismo nivel que el HIDA, es decir, una relación de concentración de actividad aproximadamente ochenta veces mayor en vesícula biliar que en hígado, aunque a diferentes tiempos, ya que el pico máximo para el HIDA se localiza a los 5 min, mientras que para el DIPA es a los 30 minutos; este último tiempo coincide con el BIDA, pero aquí la relación antes mencionada es aproximadamente 25 : 1. La importancia de estos datos radica principalmente en la calidad de la imagen gammagráfica puesto que con el HIDA y el DIPA se logrará observar mejor los detalles del árbol biliar al haber una notable variación de intensidad

déactividad entre hígado y vesícula.

Al realizar las gammagrafías en conejos, encontramos que efectivamente el HIDA se elimina más rápido si-
guiéndole el DIPA y finalmente el BIDA (tabla VII), esto
corroborra la parte de la hipótesis en que se postula que la
disminución del tamaño de las cadenas alquílicas y las po-
siciones ORTO de los sustituyentes en el anillo bencénico
de los derivados del ácido (fenilcarbamoilmetil) iminodia-
cético manifiestan biológicamente una reducción de la acti-
vidad lipofílica, mientras que la posición PARA incrementa
la misma.

Lo anterior también se refleja al observar que la excreción
por vejiga (menor especificidad hepática) en orden decre-
ciente es HIDA, DIPA y BIDA; dicho orden es el mismo para
la visualización de la vesícula biliar.

Las pruebas clínicas fueron realizadas en un hos-
pital particular en la ciudad de Puebla, donde sólo se in-
teresaron por las ventajas del DIPA respecto al HIDA
en cuanto a la competición por bilirrubinas (ellos utiliza-
ban al HIDA en pruebas de rutina) y, efectivamente encon-

traron mejores imágenes con el DIPA cuando los pacientes presentaban ictericia. Las imágenes se consideraron como archivo privado del hospital, por lo que sólo se obsequiaon tres gammagrafias. En la primera (imagen IV) se muestra un estudio con DIPA-Tc-99m de un paciente con ictericia (bilirrubinas 9mg/dl) donde se observa claramente la concentración hepática del Radiofármaco sin excreción intestinal por lo que fácilmente se diagnostica obstrucción completa del colédoco. En la segunda imagen (imagen V) se le realizan estudios colecentelleográficos a una persona que tiene niveles de bilirrubinas de 6mg/dl observándose una mejor visualización al utilizar DIPA-Tc-99m que HIDA-Tc-99m, ya que en éste último la concentración hepática es menor observándose mucho más una parte del riñón que la vesícula biliar. La tercera imagen (imagen VI) muestra un examen a un paciente no icterico donde el HIDA proyecta una fiel imagen de la vesícula biliar. A la fecha el hospital antes mencionado y otros más continúan comprando el DIPA al ININ.

Finalmente podríamos decir que el HIDA sería el fármaco de elección para la observación del árbol biliar (por su rápida excreción) no siendo utilizado con niveles

altos de bilirrubinas puesto que se eliminaría en su mayor parte por riñones no habiendo buena visualización hepatobiliar. El BIDA se recomendaría cuando fuese primordial determinar permeabilidad de ductos hepáticos y colédoco en pacientes ictericos; tal sería el caso de atresia de vías biliares (el radiofármaco compite efectivamente con las bilirrubinas por la excreción biliar). Sin embargo, por sus propiedades fisicoquímicas el DIPA es factible de ser utilizado en los casos en que se recomendaría tanto HIDA como BIDA (el DIPA se excreta más rápido de los hepatocitos que el BIDA y puede concentrarse en éstos aún con niveles altos de bilirrubinas).

9. CONCLUSIONES

1. De acuerdo con los resultados presentados, la pureza con que se obtienen el HIDA y el DIPA a partir de la correspondiente anilina para formar con cloruro de cloroacetilo la acetanilida y, finalmente, haría reaccionar con la sal disódica del ácido iminodiacético, es adecuada para ser utilizada en la formulación de nucleo-equipos para medicina nuclear.

2. La cantidad de cloruro estano agregada a cada nucleo-equipo debe ser específica para cada radiofármaco, estando más ligada ésta a las propiedades fisicoquímicas del compuesto que a la actividad (cantidad de Tc-99m) con que se desea trabajar.

3. La identidad del segundo pico cromatográfico que no altera el comportamiento biológico de los compuestos probablemente se deba a la formación de un complejo con dos iminodiacetatos y un tecnecio en los que participan grupos cloro, acuo o hidroxilo en siete o más estructuras de coordinación, de tal manera que cuando se incrementara el pH los grupos cloro o acuo fueran desplazados del complejo.

4. Los sustituyentes en el anillo bencénico de los derivados del Acido iminodiacético determinan la lipoficidad del compuesto siendo ésta incrementada por la posición PARA y el aumento en el tamaño de las cadenas alquílicas, mientras que sufrirá una disminución con las posiciones ORTO.

5. La cinética en las pruebas biológicas corrobora las ventajas del DIPA respecto al HIDA y BIDA en cuanto a una mejor visualización del árbol biliar que éste último y una mejor competición con las bilirrubinas que el HIDA.

6. A nuestro criterio el DIPA continúa siendo el radiofármaco hepatobiliar de elección pese a los artificios cromatográficos que presenta.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Fritzberg Alan R. and Lewis David: "HPLC analysis of Tc-99m iminodiacetate hepatobiliary agents and question of multiple peaks". J Nucl Med 21: 1180-1184, 1984.
2. Nunn D. Adrian, et. al.: "A structure -distribution -relationship approach leading of the development of Tc-99 mebrofenin". J Nucl Med 24: 423-430, 1983.
3. Subramanian G., Mc Afee, J., et.al.: "The influence of structural changes on biodistribution of Tc-99m labeled N-substituted IDA derivatives". J Nucl Med 18: 624, 1977.
4. Ryan, J., Cooper, M., Loberg, M., Harvey, : "Technetium 99m labeled N-(2,6-dimethylphenylcarbamoymethyl) iminodiacetic, Tc-99m-HIDA, a new radiopharmaceutical for hepatobiliary imaging studies". J Nucl Med 18: 995-1002, 1977.
5. Callery PS, Faith WF, Loberg MD, et al: "Synthesis and tissue distribution of technetium 99m and carbon-14 labeled N-(2,6-dimethylphenylcarbamoymethyl) iminodiacetic acid". J Med Chem 19: 962, 1976.
6. Burns H.D., Sowa DT, Marzili LG: "Improved synthesis of N- (2,6-dimethylphenylcarbamoymethyl) iminodiacetic acid." J Phar Sci 67: 1434, 1976.
7. Murphy A. Consuelo: "El Tecnecio, Monografía" Bajo el patrocinio de la Soc. Mexicana de Medicina nuclear, 1979.
8. Ferreras V.P. y Rozman C.: "Medicina Interna", 9a., ed., Ed. Marín, España, 1978.
9. Caride Vincent J.: "Manual de procedimientos de medicina nuclear", Salvat editores, España, 1985.
10. PHARMACOPEIA USP XX 15a. ed.
U. S. Pharmacopeial Convention Inc., 1980

11. Hernández M., Rosenthal L.: " A cross-over - study comparing the kinetics of Tc-99m-labeled diisopropyl and p-butyl-IDA analogues in patient" Clin Nucl Med 5: 159-165, 1980
12. Klingensmith W. C. et. al. " Clinical comparison of Tc-99m-diisopropyl-IDA and Tc-99m-diethyl-IDA for evaluation of the hepatobiliary system" Radiology 128: 793, 1978
13. Weissmann H. S., et. al.: "Tc-99m-diisopropyl -- iminodiacetic acid : The best overall colescintigraphic radionuclide for the evaluation of hepatobiliary disorders" J Nucl Med 21: p18, 1980.
14. A., Rosenberg N., et. al.: " Multicenter trial of Tc-99m DISOFENIN: a new hepatobiliary agent for imaging jaundiced and non-jaundiced patients" J Nucl Med 21: 18, 1980
15. Klingensmith W. C., Fritzberg A.R., et.al.: "Clinical evaluation of Tc-99m-trimethylbromo-IDA and Tc-99m-diisopropyl-IDA for hepatobiliary imaging" Radiology 146: 181-184, 1983.
16. Shani J.J., Sarel O., et.al.: "Comparative Cardiac Effects of Three Hepatobiliary Radiopharmaceuticals in dog" J Nucl Med 23: 337-341, 1982.
17. Delprat GD Jr: "Studies on liver function: re sa bengal elimination from blood as influenced by liver injury" Arch Intern Med 32: 401-410 , 1923.
18. Taplin GV, Meredith DM, Kade H. : "Radioactive (I-123-tagged) rose bengal uptake excretion test for liver function using external gamma-ray scintillation" J Lab Clin Med 48: 2156-2167, 1969.
19. Tubis M, Krishnamurthy BT, Endow JS, et. al.: " Tc-99m penicillamina , a new cholescintigraphic agent" J Nucl Med 13: 652-654, 1972.
20. Baker RJ, Bellon JC, Ponal PM: "Tc-99m-piridoxylidengluconate: a new hepatobiliary radiopharmaceutical: J Nucl Med 16: 720-727, 1975.

21. Baker RJ, Bellen JC : " Tc-99m biliary scanning agent based on pyridoxal: Effect of de aminic acid component on labeling and biological distribution" J Nucl Med 4: 85-91, 1977.
22. Chiotellis E., Subramanian G.: " Preparation of Tc-99m labeled pyridoxal amino acid complexes and their evaluation" J Nucl Med 4: 29-41, 1977.
23. Kato M., Hazue M: "Tc-99m(Sn)pyridoxylidenediamine Preparation and biologic evaluation" J Nucl Med 19: 397-406, 1978.
24. Klingensmith WC, Fritzberg AR, et.al: "Clinical comparison of Tc-99m-parabutyl-IDA and Tc-99m-diethyl-IDA for imaging the hepatobiliary system" Radiology 128: 793, 1978.
25. Yeh S.H., et. al. " Technetium-99m-HIDA hepatic lobar distribution and retention ratios in the detection of intrahepatic calculi: J Nucl Med 21: p19, 1980.
26. Colletti P., Siegel ME, et.al.: " Hepatobiliary scintigraphy in trauma" J Nucl Med 24: p8, 1983.
27. Lecklitner MY, Fluonoy JB, Ware RA : " Hepatobiliary imaging: Pyeloureterectasis" J Nucl Med 24 : 450-451, 1983.
28. Ramirez M.A., Bulbulian S. : "El Tecnecio, creación humana" Ciencia y Tecnología No. 67, 129 (1986).
29. Subramanian G., McAfee JB, et. al. " The influence of structural changes on biodistribution of Tc-99m labeled N-substituted derivatives" J Nucl Med 18: 624, 1977.
30. Savitch I, Michael C.K. et.al.: " Uptake of Tc-99m diisopropyliminodiacetic acid by hepatocellular carcinoma" J Nucl Med 24: 1119-1122, 1983.
31. Koroshetz AM, Lee EGL, et.al. "Hepatobiliary imaging in papillary stenosis" J Nucl Med 24: p8, 1983.

32. Hopkins Johns: "Relationships between molecule structure and biliary excretion of Tc-99m HIDA and HIDA analogs" J Nucl Med 18: 624, 1977.
33. Brian W., Subramanian G, et.al. "An evaluation of Tc-99m-labeled hepatobiliary agents" J Nucl Med 18: 455-461, 1977.
34. Nunn AD, Schramm E.: "Analysis of Tc-HIDAs and factors affecting their labeling rate, purity and stability" J Nucl Med 22: p52, 1981.
35. Franzens Karl " Hepatic clearance Mechanism of Tc-99m N-(acetanilido)-iminodiacetic acid derivatives" J Nucl Med 21: 1110, 1980.
36. Herry JY, Brissot P, et.al. : " Evaluation of the liver transplant by Scintigraphy" J Nucl Med 21: 657-659, 1980.
37. Robert KZ, Jerome AG, et.al. : " Tc-99m HIDA scintigraphy in segmental biliary obstruction" J Nucl Med 22: 456-458 , 1981.
38. Keeffe E, Lieberman DA, et. al." Diagnosis of sclerosing cholangitis (SC) by Tc-99m-DISIDA spect imaging" J Nucl Med 26: p94, 1985.
39. Gerhold JP, Klingsmith WC, et.al.:" Diagnosis of biliary atresia with hepatobiliar imaging" J Nucl Med 22: 91, 1981.
40. Karube Y, Kono A, et. al.:"Anew series of Tc-99m labeled hepatobiliary tracers: N'-acyl and N'-sulfonyl ethylenediamine-N,N'-diacetic acids" J Nucl Med 22: 619-627, 1981.
41. Leonard JC, Hitch DC, et.al. " Experience with dynamic imaging utilizing DIDA in the differentiation of neonatal hepatitis, biliary atresia, and patent biliary system in infants " J Nucl Med 22: 37, 1981.

42. Nunn AD, Loberg MD, et.al." The development of a new cholescintigraphic agent, Tc-99m SQ 26,962 using a structure-distribution relationship approach" J Nucl Med 22: 51, 1981.
43. Klingensmith WC, Spitzer VM, et. al." The non fasting and postprandial Tc-99m diisopropyl-IDA hepatobiliary study " J Nucl Med 22: 7, 1981.
44. Krishnamurthy GT, et.al. : " Detection, Localization, and quantitation of degree of common bile duct obstruction by scintigraphy" J Nucl Med 26: 726-735, 1985.
45. Antar MA, Benerjee SN : " Synthesis and biological distribution of a new hepatobiliary agents (Tc-99m-NIBC)" J Nucl Med 22: 51, 1981.
46. Manfredi DL, Schaumburg J: " The role of Tc-99m scintigraphy in the surgical management of esophageal reflux" J Nucl Med 22: 7, 1981.
47. Jansholt AL, Vera DR, Krohn KA, et. al.:" In vivo Kinetics of hepatobiliary agents in jaundiced animals. IInd International Symposium on Radiopharmaceuticals. March 19-22. Seattle, Washington. Am J Roentgenol 132: 492, 1979 (abst).
48. Loberg MD, Cooper M, Harvey E, et. al: "Development of new radiopharmaceuticals based on titanium of iminodiacetic acid J Nucl Med 17:633, 1976
49. Katsung BS: "Farmacologia básica y clinica" ed. El Manual Moderno, México, 1984.
50. Eckelman W.C., Isaacst H.S., et.al. " The chemistry of Technetium labeling of radiopharmaceuticals by electrolysis" J Nucl Med 15: 25, 1973.
51. Eckelman W.C., Leenson S.N.: " Radiopharmaceuticals labelled with Technetium", Int Journal of Applied Radiation and Isotopes 28:67, 1977.
52. Glenn F.K. "Radiation detection and measurement", John Wiley and Sons, Michigan, USA, 1979.

ANEXO 1
PROPIEDADES DE LAS RADIACIONES NUCLEARES Y SU INTERACCION CON
LA MATERIA

La aplicación práctica de las radiaciones nucleares en la Biología, Medicina, Química e Industria es cada vez mayor.

La radiación puede estar constituida por un haz de partículas o de ondas electromagnéticas. Sin embargo, cuando se mencionen partículas o fotones, se hará referencia a la radiación en general. En muchos laboratorios también se trabaja con protones y otros núcleos más pesados.

Las principales propiedades de las radiaciones utilizadas se resumen en la siguiente tabla:

RADIACION	MASA (uma)	CARGA	ENERGIA	ALCANCE		ORIGINA EN
				AIRE	APROX. AGUA	
alfa	4.00387	+ 2	3-8Mev	2-8cm	20-40ml	núcleos pesados
beta(-)	5.485×10^{-5}	- 1	0-5Mev	0-10m	0-1mm	núcleos con alta relación n/p.
beta(+)	5.485×10^{-5}	+ 1	0-5Mev	0-10m	0-1mm	núcleos con baja relación n/p.
neutrones.	1.008986	no tiene	0-10Mev	0-100m	0-1m	Reacciones nucleares.
Rayos X	no tiene	no tiene	ev-100 Kev	mm - 10m	u - cm	Transiciones entre orbitales.
Rayos gamma	no tiene	no tiene	10kev-10Mev	cm-100m	mm-10cm	Transiciones nucleares.

ANEXO 2.

LIMITACION DE DOSIS PARA PERSONAL OCUPACIONALMENTE EXPUESTO Y
PARA EL PUBLICO.

Se considera que un límite es el valor de una magnitud que no ha de ser superado. Un nivel de referencia es el valor de una magnitud que sirve para decidir una conducta determinada.

El límite de equivalente de dosis efectiva anual para individuos del público es de 5 mSv (0.5 rem) para los efectos estocásticos (*). Para los no estocásticos (*), el límite es de 50 mSv (5 rem). Cuando se deba estar expuesto por periodos prolongados (esto es, muchos años), el valor medio anual del equivalente de dosis efectivo se procurará que sea de 1 mSv (0.1 rem).

Estos límites no se aplican a las dosis originadas por exposición médica, ni por la radiación natural.

A continuación se enuncian los valores típicos de las dosis requeridas para producir distintos efectos. Cabe señalar que estos valores corresponden a una irradiación aguda; la misma dosis suministrada en un periodo prolongado, no produce el efecto indicado.

De los valores anteriores puede verse que una dosis de 0.5 Sv distribuida a lo largo de un año, es muy inferior a la requerida para producir algún efecto no estocástico (*).

(*). Los efectos no estocásticos son aquellos para los cuales existe una dosis umbral y el efecto depende de la dosis recibida; esto es, entre más fuerte es la dosis, más severo es el efecto. Para los efectos estocásticos no existe una dosis umbral y su severidad no depende de la dosis, aunque la probabilidad de que se presenten sí depende de la dosis.

ANEXO 2 (CONTINUA).

ORGANO	EQUIVALENTE DE DOSIS (Sv).	EFECTO
Cuerpo entero	0.25	Minima dosis detectable por análisis de cromosomas pero no por biometria hemática.
	0.5 - 0.75	Minima dosis aguda fácilmente detectable.
	0.75 - 1.25	Vómito en el 10 % de los casos.
	1.5 - 2.0	Claros cambios hematológicos y malestar transitorio.
	3.0	Dosis letal media.
PIEL	0.5	Sólo cambios cromosómicos.
	5.0	Eritema transitorio, caída de pelo transitorio.
	25.0	Ulceración temporal, caída permanente.
	50.0	Ulceración permanente
	500.0	Necrosis.
OVARIO	2.0	Esterilidad temporal.
	8.0	Esterilidad permanente
TESTICULO	0.5	Esterilidad temporal.
	8.0	Esterilidad permanente
CRISTALINO	6.0	Cataratas.
HIGADO	15.0	Hepatitis.
PULMON	22.0	Fibrosis, inflamación