

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

Obtención de Parámetros farmacocinéticos mediante el uso de radiofármacos

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA
EVA MARÍA MOLINA TRINIDAD

TUTOR: HELGI JUNG COOK

AÑO: 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

CON TODO MI AMOR A LA MEMORIA DE MI MADRE

FLOR TRINIDAD HERNÁNDEZ DE MOLINA

Lugar donde se desarrolló el trabajo de tesis:

Laboratorio de Radiofarmacia. Departamento de Medicina Nuclear. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán: INCMNSZ.

Laboratorio de producción de radioisótopos. Instituto nacional de Investigaciones Nucleares: ININ.

Laboratorio de Biofarmacia. Facultad de Química. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO: UNAM.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
ÍNDICE DE TABLAS.....	lv
RESUMEN.....	vii
INTRODUCCIÓN.....	1
I. MARCO TEÓRICO.....	3
1.1. FARMACOCINÉTICA.....	3
1.2. DEFINICIÓN DE FARMACOCINÉTICA.....	4
1.3. MODELOS COMPARTIMENTALES.....	4
1.3.1. MODELO ABIERTO DE UN COMPARTIMIENTO.....	4
1.3.2. MODELO BICOMPARTIMENTAL.....	5
1.3.3. MODELOS NO CONMPARTIMENTALES.....	7
1.4. RADIOFARMACOCINÉTICA.....	10
1.4.1. DEFINICIÓN.....	10
1.4.2. MODELOS RADIOFARMACOCINÉTICOS.....	10
Empíricos o de integración directa.....	11
Modelos analíticos.....	13
Modelos compartimentales.....	15
1.4.3. RADIOFÁRMACOS.....	15
1.4.3.1. Clasificación.....	16
Radiofármacos para uso diagnóstico.....	16
Radiofármacos para uso terapéutico.....	16
1.4.4. RADIOFÁRMACOS PARA USO DIAGNÓSTICO.....	16
1.4.5. RADIOFÁRMACOS DE USO TERAPÉUTICO.....	17
1.4.6. APLICACIÓN DE RADIOFÁRMACOS.....	19
1.5. APLICACIONES DE LA RADIOFARMACOCINÉTICA.....	20
1.5.1. APLICACIONES EN CARDIOLOGÍA NUCLEAR.....	20
1.5.2. APLICACIONES EN CÁNCER.....	21
1.6. GENERADORES.....	23
1.6.1. Generador de $^{99m}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$	24

1.6.2. Generador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$	24
1.7. DOSIMETRÍA.....	25
1.7.1. Actividad.....	26
1.7.2. Dosis absorbida.....	26
1.7.3. Dosis equivalente.....	27
1.7.4. Dosis efectiva.....	28
1.8. RADIOFÁRMACOS BAJO ESTUDIO.....	32
1.8.1. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ácido-D-glucárico.....	32
1.8.2. ^{188}Re -3-(2-naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L- Cis- L-Tre-amida) cíclico (2→7) disulfuro (9Cl).....	33
II. HIPÓTESIS.....	36
III. JUSTIFICACIÓN.....	36
IV. OBJETIVOS.....	37
V. FASE EXPERIMENTAL.....	38
5.1. MATERIAL Y REACTIVOS.....	38
5.2. PREPARACIÓN DE $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ÁCIDO-D-GLUCÁRICO.....	40
5.2.1. Marcado.....	40
5.2.2. Formulación.....	40
5.3. CONTROL DE CALIDAD.....	41
5.3.1. Cromatografía en columna.....	41
5.3.2. Cromatografía en papel (ITLC).....	41
5.4. PRUEBAS BIOLÓGICAS.....	42
5.4.1. Prueba esterilidad.....	42
5.4.2. Prueba de pirógenos.....	42
5.5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA CUANTIFICAR $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - ÁCIDO-D-GLUCÁRICO EN PLASMA Y ORINA.....	43
5.5.1. Condiciones de análisis.....	43
5.5.2. Linealidad del sistema.....	43
5.5.3. Linealidad del método.....	43
5.5.4. Precisión del método.....	44
5.5.5. Repetibilidad del método.....	44

5.5.6. Exactitud del método.....	44
5.5.7. Especificidad y estabilidad del ^{99m} Tc-glucarato.....	45
5.5.8. Sensibilidad del método.....	45
5.6. BIODISTRIBUCIÓN.....	46
5.6. ESTUDIO FARMACOCINÉTICO.....	46
5.8. PREPARACIÓN DEL COMPLEJO ¹⁸⁸ Re-3-(2-naftil)-D-Ala-L- Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida) cíclico (2→7) disulfuro (9Cl).....	47
5.9. CONTROL DE CALIDAD.....	48
5.9.1. IDENTIFICACIÓN DEL PÉPTIDO 3-(2-naftil)-D-Ala-L- Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida) cíclico (2→7) disulfuro (9Cl).....	48
5.9.2. IDENTIFICACIÓN DEL COMPLEJO ¹⁸⁸ Re-3-(2-naftil)-D-Ala- L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida) cíclico (2→7) disulfuro (9Cl).....	48
5.9.3. PUREZA RADIOQUÍMICA.....	49
5.9.3.1. Cromatografía en papel (CP).....	50
5.9.3.2. Cromatografía líquida de alta resolución.....	50
5.9.4. PRUEBAS BIOLÓGICAS.....	51
5.9.4.1. Prueba de esterilidad.....	51
5.9.4.2. Prueba de pirógenos.....	51
5.10. CULTIVO CELULAR.....	52
5.11. DESARROLLO DEL TÚMOR EN RATONES ATÍMICOS.....	52
5.12. BIODISTRIBUCIÓN.....	53
5.13. FARMACOCINÉTICA.....	54
5.14. DOSIMETRÍA.....	54
VI. RESULTADOS.....	55
6.1. ESTUDIO DE BIODISTRIBUCIÓN DE ^{99m} Tc-ÁCIDO-D- GLUCÁRICO.....	55
6.1.1. CONTROL DE CALIDAD.....	55
6.2. PRUEBAS BIOLÓGICAS.....	55

6.2.1. Prueba de esterilidad.....	55
6.2.2. Prueba de pirógenos.....	56
6.3. VALIDACIÓN.....	56
6.3.1. Linealidad del sistema.....	56
6.3.2. Linealidad del método.....	57
6.3.3. Precisión del método.....	58
6.3.4. repetibilidad del método.....	59
6.3.5. Exactitud del método.....	59
6.3.6. Especificidad y estabilidad del ^{99m} Tc-glucarato.....	61
6.3.7. Sensibilidad del método.....	62
6.4. ESTUDIO DE BIODISTRIBUCIÓN.....	63
6.5. FARMACOCINÉTICA.....	63
ESTUDIO DEL ¹⁸⁸ Re-3-(2-naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L- Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida) cíclico (2→7) disulfuro (9Cl).	
6.6. CONTROL DE CALIDAD.....	66
6.6.1. Identificación del péptido 3-(2-naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D- Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida) cíclico (2→7) disulfuro (9Cl).....	66
6.6.2. Identificación del complejo ¹⁸⁸ Re-3-(2-naftil)-D-Ala- L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida) cíclico (2→7) disulfuro (9Cl).....	67
6.6.3. Pureza radioquímica del complejo ¹⁸⁸ Re-3-(2-naftil)-D-Ala- L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida) cíclico (2→7) disulfuro (9Cl).....	68
6.6.4. Pruebas biológicas.....	68
6.6.4.1. Prueba de esterilidad.....	68
6.7. DESARROLLO DEL TUMOR EN RATONES ATÓMICOS.....	69
6.8. BIODISTRIBUCIÓN.....	70
6.9. FARMACOCINÉTICA.....	77
6.10. DOSIMETRÍA.....	80
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	83

PARTE I. ^{99m}Tc-ÁCIDO-D-GLUCÁRICO

7.1. CONTROL DE CALIDAD.....	83
7.2. PRUEBAS BIOLÓGICAS.....	83
7.2.1. Prueba de esterilidad.....	83
7.2.2. Prueba de pirógenos.....	83
7.3. VALIDACIÓN.....	84
7.3.1. Linealidad del sistema.....	84
7.3.2. Linealidad del método.....	84
7.3.3. Precisión del método.....	84
7.3.4. Repetibilidad del método.....	84
7.3.5. Exactitud del método.....	85
7.3.6. Especificidad y estabilidad del ^{99m} Tc-ácido – glucarato.....	85
7.3.7. Sensibilidad del método.....	86
7.3.7.1. Concentración mínima cuantificable.....	86
7.3.7.2. Concentración mínima detectable.....	86
7.4. ESTUDIO DE BIODISTRIBUCIÓN Y FARMACOCINÉTICA DEL ^{99m} Tc-ÁCIDO – GLUCARATO.....	86
PARTE II. ¹⁸⁸ Re-3-(2-naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L- Val-L-Cis-L-Tre-amida) cíclico (2→7) disulfuro (9CI).	
7.5. PREPARACIÓN DEL COMPLEJO ¹⁸⁸ Re-3-(2-naftil)-D-Ala- L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida) cíclico (2→7) disulfuro (9CI).....	88
7.6. CONTROL DE CALIDAD.....	88
7.6.1. Identificación del péptido 3-(2-naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D- Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida) cíclico (2→7) disulfuro (9CI).....	88
7.6.2. Formulación del ¹⁸⁸ Re-3-(2-naftil)-D-Ala- L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida) cíclico (2→7) disulfuro (9CI).....	89

7.6.3. Identificación del complejo $^{188}\text{Re-3-(2-naftil)-D-Ala-}$ L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida) cíclico (2→7) disulfuro (9CI).....	89
7.6.4. Pureza radioquímica del complejo $^{188}\text{Re-3-(2-naftil)-D-Ala-}$ L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida) cíclico (2→7) disulfuro (9CI).....	90
7.6.5. Pruebas biológicas.....	91
7.6.5.1. Prueba de esterilidad.....	91
7.6.5.2. Prueba de pirógenos.....	91
7.7. ESTUDIO DE BIODISTRIBUCIÓN EN RATONES.....	91
7.7.1. SELECCIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES.....	91
7.8. DESARROLLO DEL TUMOR EN RATONES ATÍMICOS.....	92
7.9. BIODISTRIBUCIÓN.....	94
7.9.2. Estudio de biodistribución en ratones balb-C.....	94
7.9.3. Estudios de biodistribución en ratones atímicos inducidos de cáncer cervico-uterino.....	95
7.9.4. Estudio de biodistribución en ratones atímicos inducidos de cáncer renal.....	96
7.9.5. Estudio de biodistribución en ratones atímicos inducidos de neuroblastoma.....	96
7.10. FARMACOCINÉTICA.....	97
7.11. DOSIMETRÍA.....	101
VIII. CONCLUSIONES.....	104
IX. REFERENCIAS.....	106

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1 Radiofármacos utilizados en Medicina nuclear	20
2 Características de generadores prototipo de Tungsteno-188/Renio-188.	25
3 Factor de ponderación.	28
4 Resultados de la pureza radioquímica del ^{99m}Tc -ácido-D-glucárico.	55
5 Resultados de la prueba de esterilidad del ^{99m}Tc -ácido-D-glucárico.	55
6 Resultados de la prueba de pirógenos del ^{99m}Tc -ácido-D-glucárico con el método de LAL.	56
7 Parámetros de linealidad.	57
8 Parámetros de linealidad.	58
9 Precisión del método(Datos de actividad promedio en muestras plasmáticas (n=4).	58
10 Precisión del método(Datos de actividad promedio en muestras de orina (n=4).	59
11 Repetibilidad del método, n=3.	59
12 Exactitud del método. Datos obtenidos en muestras de plasma, n=4.	60
13 Exactitud del método. Datos obtenidos en muestras de orina, n=4.	60
14 Precisión y exactitud del método radioquímica utilizado para el análisis de muestras de plasma y de orina.	61
15 Estabilidad del ^{99m}Tc -glucarato.	62
16 Resultados de biodistribución del ^{99m}Tc -glucarato, n=3.	63
17 Parámetros farmacocinéticos promedio del ^{99m}Tc -glucarato en plasma de ratas, determinados por el programa de estimación no lineal <i>Winnonlin</i> para el modelo abierto de dos compartimientos (MADC), bolo I.V.	64

Tabla.	Página
18 Resultados de la pureza radioquímica del ^{188}Re -lanreótido utilizando la técnica de cromatografía en papel ITCL-SG, n=6.	68
19 Resultados del Rf del ^{188}Re -lanreótido utilizando la técnica de cromatografía en papel ITCL-SG.	68
20 Resultados de la prueba de esterilidad del ^{188}Re -lanreótido.	69
21 Resultados de la prueba de pirógenos del ^{188}Re -lanreótido con el método de LAL.	69
22 Resultados de biodistribución del ^{188}Re -lanreótido en ratones atímicos.	70
23 Resultados de biodistribución del ^{188}Re -lanreótido en ratones Balb-C.	71
24 Resultados de biodistribución del ^{188}Re -lanreótido en ratones atímicos inducidos con células HeLa.	72
25 Resultados de biodistribución del ^{188}Re -lanreótido en ratones atímicos inducidos de cáncer renal con células SK 293.	74
26 Resultados de biodistribución del ^{188}Re -lanreótido en ratones atímicos inducidos con células de neuroblastoma.	75
27 Promedio de los parámetros farmacocinéticos del ^{188}Re -lanreótido en muestras de plasma de ratones Balb-C y ratones atímicos inducidos de cáncer cervico-uterino, renal y neuroblastoma(24h); siguiendo un modelo no compartimental utilizando el programa <i>Winnonlin</i> , n=3.	77
28 Actividad acumulada y tiempo medio de residencia promedio de aproximadamente 1.118 MBq inyectados del complejo ^{188}Re -lanreótido en ratones Balb-C y atímicos.	81
29 Estimación de la dosis absorbida por órgano del ^{188}Re -lanreótido en ratones balb-C y atímicos (n=3).	81
30 Dosis de radiación extrapoladas del ^{188}Re -lanreótido para un hombre de 70 Kg de peso.	82
31 Relación tumor/sangre en ratones atímicos inducidos con cáncer cervico-uterino.	97
32 Valores de MRT del ^{188}Re -lanreótido obtenidos por el programa <i>Winnonlin</i> .	98
33 Valores de Vdz del ^{188}Re -lanreótido obtenidos por el programa <i>Winnonlin</i> .	99

Tabla	Página
34 Valores de V_{dss} del ^{188}Re -lanreótido obtenidos por el programa <i>Winnonlin</i> .	99
35 Valores de depuración del ^{188}Re -lanreótido obtenidos por el programa <i>Winnonlin</i> .	99
36 Valores de $t_{1/2 \text{ lambda z}}$ del ^{188}Re -lanreótido obtenidos por el programa <i>Winnonlin</i> .	100
37 Valores de AUC del ^{188}Re -lanreótido obtenidos por el programa <i>Winnonlin</i> .	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura.	Página
1 Modelo bicompartimental abierto.	6
2 Gráfica de concentración en cuentas por minuto (cpm) en función del tiempo (h).	7
3 Estructura molecular del lanreótido.	34
4 Estructura del péptido calculada por DFT y simulada por Cerius.	35
5 Estructura del ^{188}Re -lanreótido calculada por DFT y simulada por Cerius.	35
6 Linealidad del sistema.	56
7 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -glucarato en plasma.	57
8 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -glucarato en orina.	58
9 Especificidad del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -glucarato.	62
10 Perfil farmacocinética del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -glucarato (1.67 kBq/Kg) en ratas siguiendo una administración por bolo I.V.	65
11 Purificación del péptido y del 2-mercaptoetanol por exclusión molecular. Espectro U.V. obtenido por un detector de arreglo de fotodiodos.	66
12 Radiocromatograma del complejo ^{188}Re -lanreótido obtenido por la técnica cromatográfica de exclusión molecular, HPLC.	67
13 Radiocromatograma del complejo ^{188}Re -lanreótido obtenido por la técnica cromatográfica de fase reversa, HPLC.	67
14 Ratón atómico con tumor desarrollado en el dorso del mismo (células HeLa).	69
15 Crecimiento del tumor en 3 ratones atómicos.	70
16 Perfil de distribución del ^{188}Re -lanreótido en muestras de sangre de ratones atómicos normales.	71

Figura.	Página
17 Perfil de distribución del ^{188}Re -lanreótido en muestras de sangre de ratones Balb-C normales.	72
18 Perfil de distribución del ^{188}Re -lanreótido en muestras de sangre de ratones atímicos inducidos de cáncer cervico-uterino con células HeLa.	73
19 Relación de la concentración de tumor/sangre del complejo ^{188}Re -lanreótido en ratones atímicos (n=3).	73
20 Perfil de distribución del ^{188}Re -lanreótido en muestras de sangre de ratones atímicos inducidos de cáncer renal con células SK 293.	74
21 Perfil de distribución del ^{188}Re -lanreótido en muestras de sangre, riñón y tumor de ratones atímicos inducidos de cáncer renal con células SK 293.	75
22 Perfil de distribución del ^{188}Re -lanreótido en muestras de sangre de ratones atímicos inducidos de neuroblastoma humano.	76
23 Perfil de distribución del ^{188}Re -lanreótido en ratones atímicos inducidos de cáncer de neuroblastoma humano.	76
24 Perfil farmacocinético del comportamiento del ^{188}Re -lanreótido en muestras de plasma de ratones atímicos normales.	77
25 Perfil farmacocinético del comportamiento del ^{188}Re -lanreótido en muestras de plasma de ratones balb-C.	78
26 Perfil farmacocinético del comportamiento del ^{188}Re -lanreótido en muestras de plasma de ratones atímicos inducidos de cáncer con células HeLa.	78
27 Perfil farmacocinético del comportamiento del ^{188}Re -lanreótido en muestras de plasma de ratones atímicos inducidos con células SK 293.	79
28 Perfil farmacocinético del comportamiento del ^{188}Re -lanreótido en muestras de plasma de ratones atímicos inducidos de cáncer con células de neuroblastoma.	79
29 Perfil farmacocinético del comportamiento del ^{188}Re -lanreótido en ratones atímicos.	80

RESUMEN

En el presente trabajo se prepararon y evaluaron dos radiofármacos: el ^{99m}Tc -ácido-D-glucárico y el ^{188}Re -3-(2-naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida, cíclico (2→7)-disulfuro (9Cl).

El ^{99m}Tc -ácido-D-glucárico se preparó utilizando: ácido D-glucárico (10 mg/ml), $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.076 mg/mL) y ácido gentísico (0.0076 mg/mL) a pH =4, y se marcó con el $^{99m}\text{TcO}_4^-$ en un solo paso. Se encontró que la pureza radiactiva de la formulación fue mayor a 95% y que ésta, es estable 3 horas después de su preparación, es decir se puede utilizar en este lapso de tiempo.

El estudio de biodistribución se llevo a cabo en ratas *wistar* adultas a las cuales se administró una dosis de 2.345 MBq (63.37 μCi) de ^{99m}Tc -ácido-D-glucárico. Se tomaron muestras durante 26 horas y se analizaron utilizando el método radioquímico previamente validado, encontrándose que el radiofármaco se concentra en corazón y se elimina por vía renal.

Para el estudio de farmacocinética se administró una dosis de 2.04 MBq (55 μCi) de ^{99m}Tc -ácido-D-glucárico y se tomaron muestras hasta las 50 horas. Los resultados muestran que el radiofármaco se ajusta al modelo abierto de dos compartimientos con eliminación de primer orden (MADC). Los valores de los parámetros radiofarmacocinéticos fueron: $V_d = 21.74 \pm 2.71$ mL, $CL = 3.05 \pm 0.35$ mL/h, $t_{1/2\beta} = 18.98 \pm 4.46$ h y $k_{10} = 0.14 \pm 0.02$ 1/h, $k_{12} = 0.59 \pm 0.17$ 1/h, $k_{21} = 0.24 \pm 0.08$ 1/h, $V_{dss} = 74.36 \pm 12.67$ mL, $MRT = 24.35 \pm 5.51$ h.

Para la preparación del ^{188}Re -lanreótido se utilizó la técnica desarrollada en el ININ empleando SnCl_2 0.95 mg/ml, 8 mg/ml de HEDP, a pH = 1 e incubación a ebullición durante 1.5 h. Los estudios de biodistribución y farmacocinética se llevaron a cabo tanto en ratones balb-C, como en ratones atómicos normales y ratones atómicos inducidos con: a) cáncer cervico-uterino, b) cáncer renal y c)

neuroblastoma. A todos ellos se les administró una dosis única de ≈ 2.59 MBq (70 μ Ci), del ^{188}Re -lanreótido y se tomaron muestras de sangre, orina, corazón, pulmón, hígado, bazo, estómago, intestinos, riñón izquierdo, músculo y hueso. Las muestras se cuatificaron empleando un método radioquímico. Los resultados mostraron que la afinidad del radiofármaco, por las células SK293 de cáncer renal y células de neuroblastoma fue baja; sin embargo la unión a células HeLa presentes en el cáncer cervico-uterino fue favorable, lo cual indica que este compuesto podría ser utilizado en el tratamiento de este tipo de cáncer.

Para el estudio farmacocinético, se les administró a los ratones una dosis de 1.118 MBq. de ^{188}Re -lanreótido y se tomaron muestras sanguíneas durante 48 h. Al ajustar los datos a un modelo no compartimental se encontró que los parámetros farmacocinéticos en ratones inducidos de cáncer fueron diferentes a los obtenidos en ratones normales. La vida media fue mayor en los ratones inducidos con cáncer cervico-uterino ($43 \pm 6.84\text{h}$) semejante en ratones inducidos con cáncer renal o con neuroblastoma (17 ± 0.15 h y 16 ± 3.27 h) y menor en ratones atómicos normales (9.38 ± 2.3 h). El tiempo medio de residencia osciló entre 59.49 ± 13.9 h para ratones inducidos con cáncer cervico-uterino 9.05 ± 4.1 h para ratones atómicos normales.

Al calcular la actividad acumulada en ratones atómicos con tumor, se encontró que: $\tilde{A}_{\text{cervico-uterino}} = 336.07$ MBq·h y $D = 13.11$ mGy/MBq; $\tilde{A}_{\text{cáncer renal}} = 16.68$ MBq·h y $D = 0.65$ mGy/MBq; $\tilde{A}_{\text{neuroblastoma}} = 22.57$ MBq·h y $D = 0.88$ mGy/MBq.

Al utilizar el programa OLINDA/EXM se encontró que el modelo de ratón atómico es apropiado para determinar la dosis absorbida en tumor, por lo cual se puede utilizar en estudios preclínicos para evaluar péptidos receptores mediadores en la terapia de radionúclidos.

INTRODUCCIÓN.

Las bases matemáticas de la Farmacocinética se conocen desde hace 70 años y su aplicación en estudios de investigación relacionados con el metabolismo y biodistribución de fármacos ha contribuido al conocimiento de la acción de los mismos.

Desde los años 60 la Medicina Nuclear ha utilizado radionúclidos para prevenir, diagnosticar o bien tratar enfermedades. De aquí que la Radiofarmacocinética estudia la velocidad de los cambios de concentración que presentan los radiofármacos en el organismo en la absorción, biodistribución, metabolismo y la eliminación.

Los radiofármacos son medicamentos que han adquirido gran importancia en la práctica clínica. Contienen biomoléculas orgánicas que se marcan con un radionúclido haciendo que emitan una dosis de radiación utilizada tanto con fines diagnósticos como terapéuticos.

En los radiofármacos de uso diagnóstico, la radiación emitida se utiliza para medir su distribución en un compartimiento biológico, como indicador de una función fisiológica o para obtener una imagen gammagráfica de la acumulación del radiofármaco en un órgano blanco, lo que permite determinar la morfología y/o función de dicho órgano.

Los radiofármacos de uso terapéutico se utilizan en radioterapia dirigida. Éstos están conformados por un péptido y/o biomolécula el cual está unido a un radionúclido que tenga la capacidad de selección en células blanco y cuya radiación sea específicamente dirigida. Durante las últimas décadas se ha observado un gran progreso en la investigación de radiofármacos, de manera tal que el desarrollo y evaluación de los radiofármacos de uso terapéutico y

diagnóstico se ha convertido en uno de los campos más importantes de la radiofarmacia.

Con base en lo anteriormente mencionado, en el presente trabajo se evaluaron farmacocinéticamente dos compuestos:

El ^{99m}Tc -ácido D-glucárico que ha demostrado ser útil para detección temprana del infarto agudo del miocardio y del cual no se conoce su farmacocinética y

Un complejo del ^{99m}Tc -ácido D-glucárico, el ^{188}Re -(3-(2-naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida) ciclico (2 → 7) (9Cl), diseñado para su uso en radioterapia dirigida.

I. MARCO TEÓRICO.

1.1. FARMACOCINÉTICA.

La aplicación de principios farmacocinéticos a la práctica terapéutica presupone la introducción progresiva de fundamentos científicos que permitan relacionar los niveles de los fármacos en los fluidos biológicos, la sangre principalmente, con la respuesta farmacológica y clínica de los tratamientos, asumiendo que la eficacia terapéutica puede garantizarse si se mantienen concentraciones adecuadas del fármaco en el sitio de acción.

El uso clínico de los fármacos plantea una problemática que es la variabilidad. La variabilidad de la respuesta farmacológica obedece a causas muy diversas relacionadas con la situación fisiopatológica del paciente como edad, peso, sexo, factores genéticos, factores ambientales, estados patológicos, y situación clínica entre otros. Así un mismo régimen de dosificación puede resultar efectivo en un paciente e ineficaz o tóxico en otro paciente con características similares. Este problema se acentúa en medicamentos con estrecho margen terapéutico. Lo anterior induce a la necesidad de establecer prácticas de seguimiento de la terapéutica farmacológica a las que contribuye de forma importante la farmacocinética clínica.

Mediante la farmacocinética clínica se pretende resolver problemas terapéuticos que tienen base farmacocinética como, individualización de la posología, detección y control de interacciones, problemas de incumplimiento de la medicación (pacientes crónicos ambulatorios), alteraciones en la biodisponibilidad por cambios en la forma farmacéutica y/o en la vía de administración, resistencia al tratamiento, respuesta ineficaz o tóxica, problemas de toxicidad, entre otros.

1.2. DEFINICIÓN DE FARMACOCINÉTICA.

1.2.1. FARMACOCINÉTICA es el estudio del curso temporal de las concentraciones del fármaco y/o metabolitos en fluidos, tejidos y órganos en el organismo y las relaciones matemáticas necesarias para seleccionar el modelo adecuado al que mejor se ajusten a los datos experimentales obtenidos (Tozer, 1991; Rowland, 2000).

1.3. MODELOS COMPARTIMENTALES.

La interacción de un fármaco con el organismo requiere conocer que le sucede al fármaco (aspectos farmacocinéticos). La descripción de este proceso puede hacerse mediante modelos compartimentales, que consisten en un número finito de unidades abstractas o con un significado fisiológico concreto.

Los modelos tienen un valor descriptivo y predictivo aunados a significados fisiológicos, que se ven reflejados en los parámetros farmacocinéticos intercompartimentales. El establecimiento de un modelo compartimental, con un número mínimo de compartimientos, no es sencillo, dada la dispersión de los datos experimentales, pero se plantean otras alternativas considerando los parámetros menos sensibles a errores experimentales (Pazo, 2001).

1.3.1. MODELO ABIERTO DE UN COMPARTIMIENTO (MAUC).

El modelo utilizado para determinar la farmacocinética de un fármaco se basa en la representación del organismo como un sistema de compartimientos.

El modelo monocompartimental considera al organismo como una sola unidad homogénea. Es útil para el análisis farmacocinético de los datos de concentración

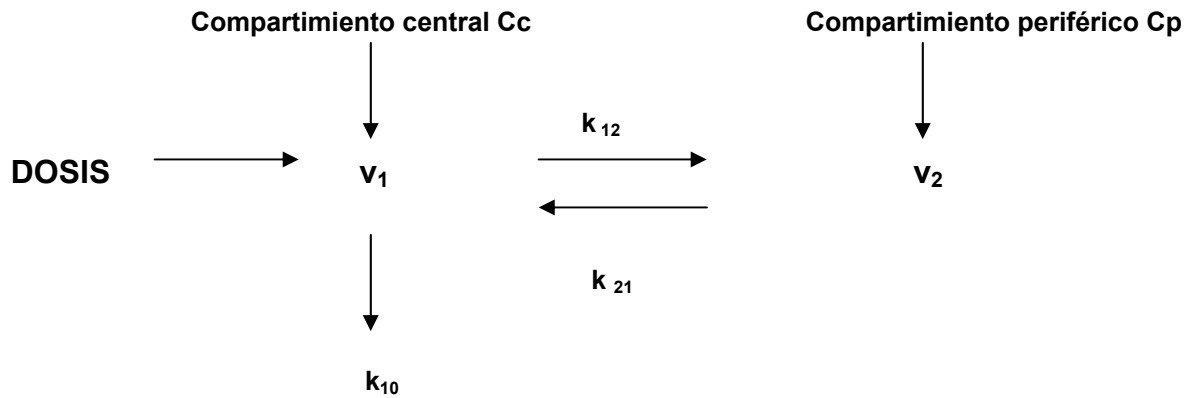
en sangre, suero o plasma, y de excreción urinaria de fármacos que después de su ingreso en la circulación sistémica se distribuyen con rapidez entre el plasma y otros fluidos y/o tejidos del organismo. La eliminación del fármaco se realiza desde el compartimiento central. (Gibaldi y cols., 1992; Tozer, 1991).

1.3.2. MODELO BICOMPARTIMENTAL.

El modelo bicompartimental considera que al administrar una dosis única intravascular, el fármaco llega en forma directa a la circulación sistémica y se distribuye rápidamente entre el torrente sanguíneo y los órganos bien irrigados como el corazón, hígado, riñones y lentamente en los órganos menos irrigados. Al área de distribución de la circulación sistémica se le conoce como compartimiento central **Cc**. Al área espacial de distribución a órganos y tejidos que reciben menor flujo de sangre se le conoce como compartimiento periférico **Cp**.

El modelo bicompartimental se representa por una disminución biexponencial de los niveles plasmáticos en función del tiempo. La concentración del fármaco en sangre disminuye rápidamente en un principio, por la distribución del fármaco en el compartimiento central, después desciende de forma lenta debido a que la fracción del fármaco regresa desde los tejidos hasta el flujo sanguíneo, y porque se elimina o bien se metaboliza, y posteriormente llega a un estado de equilibrio. (Gibaldi , 1992; Tozer, 1991; Rowland, 2000).

Normalmente, en éste tipo de sistemas la eliminación del fármaco se realiza desde el compartimiento central. Ver FIGURA 1:



V_1 = volumen de distribución del Cc

V_2 = volumen de distribución del Cp

k_{12} = constante de distribución, paso del compartimiento 1 al 2.

k_{21} = constante de difusión, paso del compartimiento 2 al 1.

k_{10} = constante de eliminación Cc.

FIGURA. 1. Modelo bicompartimental abierto. (Gibaldi, 1992)

La ecuación que describe este modelo es:

$$C(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} \quad (1)$$

Donde $C(t)$ = es la concentración plasmática a un tiempo t

A y B = son las concentraciones extrapoladas sobre el eje de las ordenadas en la curva de CAF(t)

α = constante de distribución

β = constante de eliminación global

La gráfica que describe el curso de la concentración plasmática en función del tiempo se presenta en la FIGURA 2.

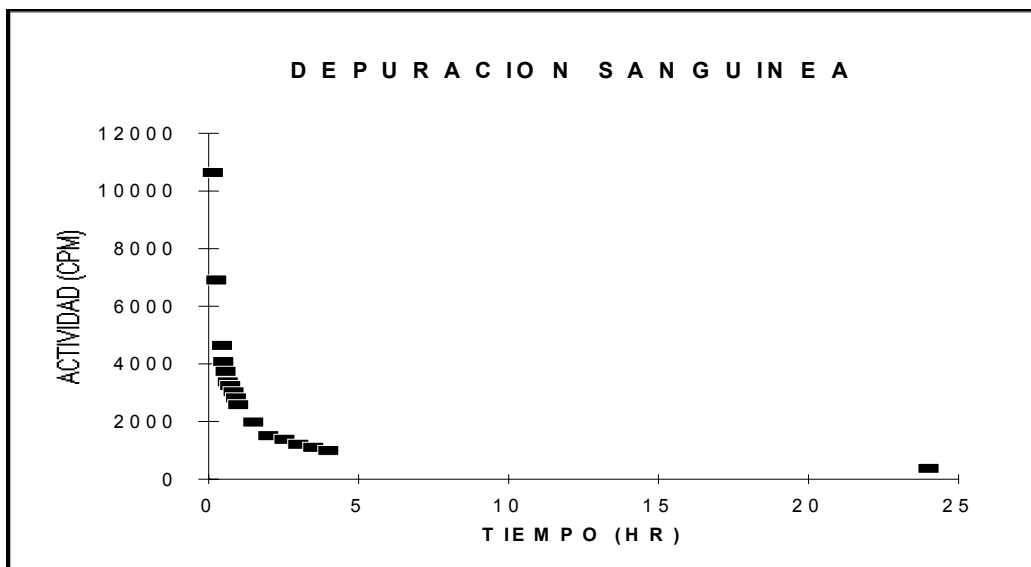


FIGURA 2. Gráfica de concentración de actividad en cuentas por minuto (cpm) en función del tiempo (h).

1.3.3. MODELOS NO COMPARTIMENTALES.

Considerando que el ser humano no está formado por uno o dos compartimientos sino por millones de compartimientos se piensa que las moléculas del fármaco se distribuyen de manera aleatoria en las células del cuerpo. Este comportamiento se analiza con fundamentos matemáticos basados en la probabilidad y en los momentos estadísticos.

El fundamento se basa en lo siguiente: si un fármaco está constituido por millones de moléculas, se considera para la administración de dosis de un fármaco el peso molecular del mismo y el número de Avogadro (6.023×10^{23} moléculas). Así, la administración de las moléculas de un fármaco para llegar a diferentes sitios corporales está en función del tiempo.

El tiempo medio de residencia (MRT) es el tiempo promedio del número de moléculas introducidas (N) que reside en el cuerpo (Gibaldi 1992; Shepard y cols., 1989):

$$MRT = \frac{\sum_{j=1}^N t_j}{N} \quad (2)$$

t_j = es el tiempo medio de residencia de la j iésima molécula (tiempo medido a partir de la introducción del fármaco en el cuerpo y la eliminación del mismo).

Las moléculas se cuentan en grupo. Si n_1 es el número de moléculas con un tiempo promedio en el cuerpo a un tiempo t_1 , el tiempo total de residencia acumulada para un grupo de moléculas es $t_1 n_1$, para dos grupos de moléculas $\frac{(t_1 n_1) + (t_2 n_2)}{n_1 n_2}$ y considerando todas las moléculas administradas de un fármaco, el

MRT es:

$$MRT = \frac{\sum_{i=1}^m t_i n_i}{\sum_{i=1}^m n_i} = \frac{\sum_{i=1}^m t_i n_i}{N} \quad (3)$$

n_i = es el grupo de moléculas en el grupo i ésimo

t_i = es el tiempo promedio en el cuerpo

m = es el número de grupos

N = es el número total de moléculas introducidas.

Considerando la administración de dosis de un fármaco por bolo intravenoso, las moléculas totales de la dosis comienzan su residencia en el cuerpo al mismo tiempo, donde t_i es el tiempo entre la administración del fármaco y la eliminación del mismo. Cuando el número de moléculas eliminadas en ambos grupos (dn) se

acercan relativamente a un valor pequeño, el MRT puede ser expresado por una notación integral:

$$MRT = \frac{\int_0^{Ael_{\infty}} tdn}{N} \quad (4)$$

El límite corresponde al número de moléculas eliminadas de t_0 a t_{∞} . Ninguna de las moléculas pueden ser eliminadas a tiempo cero, solo pueden ser eliminadas a un tiempo infinito total. El número de moléculas eliminadas por todas las vías puede ser expresada en términos de cantidades eliminadas, $Ael = (n) (PM) / \text{No. de Avogadro}$ en donde:

$$MRT = \frac{\int_0^{Ael_{\infty}} t dAel}{Ael_{\infty}} \quad (5)$$

Ael_{∞} = es la dosis del fármaco administrado; integrando en función del tiempo tenemos que:

$$MRT = \frac{\int_0^{\infty} (Dosis - Ael) dt}{Dosis} \quad (6)$$

Ael = cantidad eliminada a un tiempo t .

1.3.3.1. Datos de excreción.

Cuando la fracción intercambiada, f_e , es una constante remanente con respecto al tiempo, la cantidad de fármaco excretado inalterado en la orina se determina así, $Ae = f_e Ael$ y $Ae_{\infty} = f_e Dosis$ (Gibaldi, 1992; Tozer, 1991; Rowland, 2000).

El MRT aparente se puede determinar por datos de excreción urinaria como sigue:

$$MRT = \frac{\int_0^{\infty} (Dosis - Ae) dt}{Ae_{\infty}} \quad (7)$$

Ae = es la cantidad excretada intercambiada a un tiempo **t**.

Ae_∞ = es la cantidad excretada intercambiada a **t_∞**.

1.3.3.2. Datos de concentración plasmática.

Cuando la depuración es constante con respecto al tiempo, la velocidad de eliminación es proporcional a la **Cp** del fármaco, es decir:

$$CpCL = \frac{dAel}{dt} \quad (8)$$

dAel = CpCL dt ; Ael = CL ∫₀[∞] Cp dt. Si se sustituyen estas ecuaciones en la

ecuación (5) se tiene que:

$$MRT = \frac{\int_0^{\infty} tCpCL dt}{\int_0^{\infty} CpCL dt} \quad (9)$$

$$MRT = \frac{\int_0^{\infty} tCp dt}{\int_0^{\infty} Cp dt} \quad (10)$$

MRT = M₁/M₀, por lo que el primer momento es $\int_0^{\infty} tCp dt$, mientras que el

momento cero es el área bajo la curva de cero a infinito.

1.4. RADIOFARMACOCINÉTICA.

1.4.1. DEFINICIÓN.

El organismo es un sistema sujeto a gran cantidad de ajustes finos en órganos bien irrigados como el corazón, riñones e hígado, y se llevan a cabo procesos como la difusión a través de las membranas, unión a proteínas y a receptores celulares, por lo que es necesario realizar estudios de biodistribución y eliminación de los radiofármacos determinando la concentración de la radiactividad en muestras seriadas de sangre, plasma o suero y de orina, comparada con un patrón o testigo igual a la dosis inyectada, se relaciona con la radiación inicial (dosis inicial de radiación) del radiofármaco. Esto se conoce como Radiofarmacocinética.

1.4.2. MODELOS RADIOFARMACOCINÉTICOS.

La Radiofarmacocinética se ajusta a los mismos principios de la farmacocinética, es decir por ejemplo: un modelo radiofarmacocinético es una descripción matemática de la distribución biológica de algún radiofármaco en función del tiempo.

Los modelos radiofarmacocinéticos se dividen en tres tipos:

1. Empíricos o de integración directa.
2. Analíticos o análisis de regresión utilizando ajuste de "mínimos cuadrados".
3. Compartimentales.

Cabe decir, que los procesos biológicos, como el intercambio de cantidades de material entre tejidos siguen una cinética de primer orden (la velocidad de intercambio es proporcional a la concentración de un solo compuesto). Por lo cual,

las curvas de actividad contra tiempo ($A=f(t)$) se ajustan a la suma de exponenciales.

1. Empíricos o de integración directa.

De acuerdo a la metodología de radiotrazadores, se puede obtener una serie de medidas de concentración del radionúclido en los diferentes tejidos y graficarlas en función del tiempo post-administración. Las curvas resultantes de $A=f(t)$ pueden ser caracterizadas como un modelo farmacocinética empírico, ya que esto es una descripción matemática de la distribución del radionúclido incorporado, producto de la medición directa.

Este método se utiliza para el desarrollo de nuevos radiofármacos especialmente durante su evaluación biológica en animales de experimentación como ratones o ratas. La ventaja principal de éste modelo es que no se introducen suposiciones simplificadas respecto a la forma analítica de distribución del radionúclido.

El área bajo la curva de $A=f(t)$ puede ser evaluada por métodos de integración numérica simples y obtener la actividad acumulada (\tilde{A}), parámetro biocinético necesario para el cálculo de la dosis absorbida. La precisión de la integración es dependiente del adecuado cálculo de la fracción (o porcentaje) de actividad administrada en los órganos fuente importantes y en las muestras de excreta. Es de radical importancia tomar suficientes muestras de la distribución y la retención del radiofármaco durante el transcurso del estudio, por lo cual deben de considerarse los siguientes criterios:

- Colectar los picos de captación rápida y la fase de eliminación rápida.
- Realizar el estudio cubriendo al menos un lapso de tiempo de tres vidas medias efectivas del radiofármaco ($3t_{ef}$).
- Considerar al menos dos datos por tiempo.

- Contar 100% de actividad.
- Conocer las principales vías de excreción (orina, heces, exhalación, etc.).

La extrapolación de los datos de los animales a humanos no es una ciencia exacta, pero a veces se puede introducir factores de peso para correlacionar tales datos. La extrapolación puede convertir el % por órgano en el animal a % por órgano en el humano después de corregir la fracción de peso que representa el órgano respecto al peso del cuerpo total en ambas especies:

$$\left[\left(\frac{\%A}{g_{\text{órgano}}}_{\text{animal}} \right) x (kg_{\text{pesototal del cuerpo}})_{\text{animal}} \right] x \left(\frac{g_{\text{órgano}}}{kg_{\text{pesototal del cuerpo}}}_{\text{humano}} \right) = \left(\frac{\%A}{\text{órgano}} \right)_{\text{humano}} \quad (11)$$

El método de integración directa permite calcular la dosis absorbida, cuyo fundamento se basa en la metodología *MIRD* (medical internal radiation dose). Las actividades acumuladas y los tiempos de residencia en todos los órganos se obtienen de los datos biológicos obtenidos de animales.

2. Modelos analíticos.

En este modelo la curva de $A=f(t)$ puede ser ajustada a una función dependiente del tiempo antes de la primera medición y después de la última medición. Como los procesos biológicos siguen una cinética de primer orden las curvas de $A=f(t)$ pueden ajustarse a una suma de exponenciales:

$$q_h(t) = A_{h(j)} e^{\lambda_{h(j)} t} \quad (12)$$

$$q_h(t) = \sum A_{h(j)} e^{\lambda_{h(j)} t} \quad (13)$$

Donde : $q_h(t)$ = es la función de distribución de la región fuente r_h , que es la actividad corregida por decaimiento radiactivo (Bq) en la región fuente r_h al tiempo t post-administración (h) del radiofármaco; $A_{h(j)}$ es la actividad (Bq) para el j-ésimo componente exponencial en la región fuente r_h al tiempo $t=0$; y $\lambda_{h(j)}$ es la constante de eliminación efectiva (h^{-1}) de j-ésimo componente exponencial de la curva $A=f(t)$ en la región fuente, que es la fracción de actividad eliminada por unidad de tiempo para el j-ésimo componente exponencial de la curva $A=f(t)$.

Los datos de $A=f(t)$ al ser graficados producen un segmento lineal para cada componente de la función de distribución $q_h(t)$ y, el número de componentes exponenciales corresponde al número de segmentos lineales identificables y por arreglo de mínimos cuadrados, la función correspondiente.

Dado que la mayoría de los radiofármacos al ser administrados por vía intravenosa, siguen una fase inicial rápida (distribución) seguida de una etapa lenta (equilibrio y eliminación), se puede representar este proceso matemáticamente mediante una función de distribución biexponencial (FIGURA 3):

$$q_h(t) = A_{h(1)}e^{-\lambda_{h(1)}t} + A_{h(2)}e^{-\lambda_{h(2)}t} \quad (14)$$

Donde $A_{h(1)}$ y $A_{h(2)}$ son constantes relacionadas a la actividad inicial ($A_0=A_{(t=0)}=A_{h(1)} + A_{h(2)}$), las constantes de decaimiento $\lambda_{h(1)}$ y $\lambda_{h(2)}$ son indicativas de la rapidez con la que la curva decae en cada compartimiento (fase). Como el primer término del lado izquierdo de (1) es despreciable para tiempos largos, la ecuación (14) se puede aproximar a:

$$q_h(t) \approx A_{h(2)}e^{-\lambda_{h(2)}t} \quad (15)$$

Aplicando el logaritmo natural a ambos lados de la ecuación se tiene:

$$\ln [q_h(t)] = \ln [A_{h(2)}] - \lambda_{h(2)}t \quad (16)$$

Esta es la expresión lineal ($y=mx + b$), la pendiente puede calcularse considerando los puntos para los tiempos grandes, de tal manera que:

$$-m = -\lambda_{h(2)} \quad (17)$$

$$e^b = A_{h(2)} \quad (18)$$

Utilizando las anteriores expresiones la ecuación (14) se puede describir así:

$$z(t) = q_h(t) - A_{h(2)}e^{-\lambda_{h(2)}t} = A_{h(1)}e^{-\lambda_{h(1)}t} \quad (19)$$

Esta ecuación es lineal :

$$\ln [z(t)] = \ln [A_{h(1)}] - \lambda_{h(1)}t \quad (20)$$

Aplicando la regresión lineal sobre todos los puntos :

$$-m = -\lambda_{h(1)} \quad (21)$$

$$e^b = A_{h(1)} \quad (22)$$

Con lo anterior se obtienen los 4 parámetros requeridos para la función analítica (14). Incorporando la función de distribución en la expresión de actividad acumulada (\tilde{A}), \tilde{A} se puede expresar como:

$$\tilde{A}_h(0, \infty) = \int_0^{\infty} e^{\lambda t} q_h(t) dt \quad (23)$$

Evaluando la integral resultante para el modelo biexponencial antes propuesto:

$$\tilde{A} = \frac{A_{h(1)}}{\lambda_{h(1)}} + \frac{A_{h(2)}}{A_{h(2)}} \quad (24)$$

En forma general la ecuación (24) se expresa así:

$$\tilde{A}_h(0, \infty) = \frac{\sum A_{h(j)}}{\lambda_{h(j)}} \quad (25)$$

3. Modelos compartimentales.

En este modelo se considera al sistema biológico como compartimentos interconectados como un ensamble de unidades físicas y químicas. Cada ensamble es una entidad anatómica identificable (Ej. hígado), una entidad fisiológica identificable (Ej. Sistema retículo endotelial) o una entidad física identificable (Ej. Agua del espacio extracelular).

Referirse a una identificable o a un compartimiento discreto es conceptual. Por lo que, un modelo compartimental está caracterizado por el número de compartimientos o por las probabilidades de transición, o velocidades de intercambio, entre los compartimientos, lo cual puede ser representado matemáticamente como un grupo de ecuaciones diferenciales ordinarias acopladas.

1.4.3. RADIOFÁRMACOS.

Un radiofármaco se define como una molécula orgánica que contiene un átomo radiactivo dentro de su estructura y que, por su forma farmacéutica, cantidad y calidad de radiación se utiliza con fines de diagnóstico o terapia. (FEUM, 2004).

Tienen la propiedad de interactuar específicamente con el sistema biológico, no debe de ser tóxico, debe de ser excretado inalterado o en tiempos cortos para evitar problemas de acumulación (acumulación de material radioactivo en el organismo), debe de tener un recorrido biológico notable, es decir, se debe localizar selectivamente en un órgano que, a través de la emisión de la radiación gamma pueda ser evidenciado desde el exterior y la imagen pueda ser utilizada para diagnosticar (análisis por centigrafía, Uhl y cols. 1980; Turner y cols. 1980).

1.4.3.1. Clasificación.

Los radiofármacos se clasifican en:

a). *Radiofármacos para uso Diagnóstico:*

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

- Visualizar la anatomía de un órgano o sistema

- Evaluar el comportamiento fisiológico a nivel de los tejidos
- Analizar a través de su metabolismo el comportamiento bioquímico
- Determinar cuantitativamente sus parámetros farmacocinéticos.

b). **Radiofármacos para uso Terapéutico:**

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

1.4.4. RADIOFÁRMACOS PARA USO DIAGNÓSTICO.

Un radiofármaco de uso diagnóstico está formado por una fuente de radiaciones gamma y un sustrato, el cual es una molécula orgánica capaz de unirse de cualquier forma al radionúclido, emisor gamma. La naturaleza del sustrato depende de la del radionúclido. Si se trata de un no metal, se puede enlazar mediante un enlace covalente.

Un radiofármaco se utiliza con fines de diagnóstico si presenta las siguientes propiedades:

- Debe ser emisor de energía gamma.
- Debe mantener la energía que emite en un intervalo de $100 < \text{energía gamma} < 250 \text{ KeV}$. Tiene que tener un $t_{1/2 \text{ efectiva}} = 1.5 \text{ X duración de la prueba}$.
- Tener una alta resolución de acuerdo al órgano blanco.
- Debe ser reactivo químicamente, no expansivo y rápidamente biodisponible.

La medicina nuclear se inicia con el uso de radiofármacos, que contienen radionúcleos emisores gamma o fotones simples. La mayoría de los fármacos utilizados en medicina nuclear hasta finales de los años 60 eran marcados con ^{131}I , o utilizando un radionúcleo para una molécula específica ($^{201}\text{TlCl}$) que provenían de industrias especializadas.

Desde que se utilizó el ^{131}I que es un emisor gamma se dio la oportunidad de ampliar el uso de moléculas marcadas. Las radiaciones gamma permiten directamente desde el exterior, sin toma de muestra ni manipulación, conocer la radioactividad sobre órganos internos como riñones, hígado, etc.

1.4.5. RADIOFÁRMACOS PARA USO TERAPÉUTICO.

Se considera un radiofármaco de uso terapéutico si posee las siguientes características:

- Debe de mantener una alta energía ($\cong 1 \text{ meV}$). Debe de tener una energía de emisión beta (-).
- En el medio debe de tener una vida media efectiva moderadamente grande (horas o días).
- Debe tener una alta resolución de acuerdo al órgano blanco.
- Debe ser reactivo químicamente, no expansivo y rápidamente biodisponible.
- Debe ser preparado en el lugar en donde va a utilizarse y tener una preparación y control de calidad simple.
- Debe ser seguro para el personal y pacientes que lo utilicen.

Cuando la afinidad de un radiofármaco utilizado en terapia para el tratamiento de cáncer por células tumorales o lugares en los cuales se ha desarrollado una patología es alta, la emisión emitida del radionúcleo daña las células

cancerígenas. La selectividad debe de ser máxima para no irradiar las células sanas, y el complejo no enlazado pueda ser eliminado de forma inalterada y rápida del organismo, directamente por vía renal.

Con la finalidad de aumentar la actividad de receptores específicos respecto a las células tumorales se emplean anticuerpos monoclonales o sus fragmentos, péptidos quimiotácticos o bioespecíficos, hormonas o fármacos con distribución muy específica.

En el caso específico de los anticuerpos monoclonales, la molécula ligando es bifuncional y está formada por dos partes: un terminal con afinidad receptorial y una porción molecular para complejar la fuente radioactiva. Si esta última parte no está presente en el residuo con actividad receptorial puede ser oportunamente introducida, preparando un sustrato semisintético. Es necesario que el complejo conserve la propiedad receptorial de la biomolécula original después de las modificaciones estructurales que tienen lugar al introducir el catión radionuclídico.

Las moléculas con actividad receptorial son consideradas de radical importancia en medicina nuclear y sustituyen en parte las moléculas orgánicas que tienen sólo la propiedad de enlazarse con cationes de radiometales.

Para evitar la pérdida de la actividad receptorial después de la formación del complejo con el catión radionuclídico, se une al anticuerpo un grupo quelante que tenga una mayor afinidad por el radiometal respecto a los otros a sitios coordinantes eventualmente presentes en la molécula, de tal forma que los sitios moleculares con una elevada afinidad antigénica presenten las mínimas variaciones estructurales y conformacionales para poder mantener inalterada la afinidad receptorial. (Horiuchi, 1998; Waibel y cols., 1999; Egli y cols., 1999; Alberto, 1999).

Dentro de los radiofármacos considerados como agentes potenciales para el tratamiento de neoplasias se encuentran los péptidos análogos de la somatostatina marcados con radionúclidos emisores beta (Taylor y cols., 1988; Meléndez y cols., 1999; Waibel, 2000).

Actualmente se han sintetizado una serie de análogos de la somatostatina como receptores de expresión molecular utilizados para terapia. El lanreótido marcado con tritio-90 se une a los 5 receptores análogos de la somatostatina (hSSTR): para hSSTR2, 3 y 4 con alta afinidad y hSSTR1 con baja afinidad. (Virgolini, y cols., 2002).

Los péptidos análogos de la somatostatina se pueden utilizar en tratamientos clínicos marcados con indio-111 para diagnóstico (^{111}In -DOTA- lanreótido) y con el emisor beta tritio-90 para terapia de cáncer (^{90}Y -DOTA-lanreótido).

1.4.6. APLICACIÓN DE RADIOFÁRMACOS.

La tabla 1 muestra algunos de los radiofármacos acorde a su utilidad en la práctica médica en el área de Medicina Nuclear.

TABLA 1. Radiofármacos utilizados en Medicina Nuclear. (Ortega y Jorba, 2001; Cuntz y cols., 1999; Wymenga y cols., 1999; Virgolini, 2005, <http://www.vidal.fr/Medicament/somatuline-15272.htm>.)

<i>Radiofármacos para uso diagnóstico</i>		<i>Radiofármacos utilizados para terapia</i>	
¹¹¹ In-DOTA-lanreótido	Detección de tumores	¹¹¹ Indio-octreoscan	Localiza receptores de somatostatina.
^{99m} Tc-MAG ₃ (mercaptoacetiltriglicina)	Funcionamiento renal	¹⁸ F-glucosa (¹⁸ F-FDG)	Metabolismo de la glucosa.
^{99m} Tc-glucurato	Detección de Infarto al miocardio	¹³¹ I-meta-yodo-bencil-guanidina (¹³¹ I-MIBG)	Caracterización de mecanismos neuronales de captación.
^{99m} Tc-MDP (mutilen-difosfonatos)	Pefusión y metabolismo	¹²⁵ I - lanreótido	Cáncer de mama
^{99m} Tc-HIDA (ácido iminodiacético)	Evaluación de la función hepática	IFN - α - lanreótido	Tumores neuroendocrinos
¹¹ C-deuterodeprenil y FDG	Detección de encefalitis y enfermedad de Creutzfeldt-Jacob	Doxorubicin liposomal	Cáncer ovárico
¹¹ C-Racloprida	Diferenciación de tumores	⁹⁰ Y – DOTA - lanreótido	Cáncer de tiroides
¹⁸ F-FDG (fluorodioxiglucosa)	Estudios de cerebro y corazón	IGF -1- Insulina (Sandostin: acetato de octeotride)	Cáncer varios
^{99m} Tc-HMPAO (hexametil.propilen-aminaoxima)	Estudios de cerebro	⁹⁰ Itrio (coloide)	Artropatías crónicas

1.5. APLICACIONES DE LA RADIOFARMACOCINÉTICA.

1.5.1. APLICACIONES EN CARDIOLOGÍA NUCLEAR.

Los orígenes de la medicina nuclear cardiovascular datan de 1927, cuando Blumgarty y colaboradores, midieron tiempos de circulación en humano inyectando radón gaseoso en una cámara utilizada como detector. Veinte años después, Prinzmatel y colaboradores. determinaron las características del primer paso en un radiocardiograma en sujetos normales y en pacientes con enfermedades cardíacas congénitas. En 1960 las primeras imágenes dinámicas del corazón fueron obtenidas con cámaras de cristal de centelleo. En 1971 la técnica de la válvula de flujo sanguíneo cardíaco para obtener imágenes utilizando radionúclidos se desarrolló, éstas técnicas son no invasivas y solo requieren

de la administración intravenosa del radiofármaco el cual intrínsecamente no causa cambios hemodinámicos (Harvey y cols., 1980).

El ^{99m}Tc emite radiaciones tipo gamma y el sistema más apropiado para la detección de rayos gamma es el detector de centelleo, utilizando un cristal de NaI activado con TI. El tamaño del cristal es proporcional a su eficiencia. En éste caso, en los cristales utilizados en el modelo del pozo la muestra es introducida de manera que el fósforo la rodee, la eficiencia puede ser aumentada hasta en un 50%. (Navarrete y cols. 1993).

1.5.2. APLICACIONES EN CÁNCER.

A nivel mundial el cáncer es considerado como un problema de salud pública y una de las principales causas de muerte.

Dos características del cáncer son su marcada desregulación del ciclo celular y su proliferación constante, que da como resultado el crecimiento de tumores. El cáncer es causado en gran medida por el funcionamiento inadecuado de algunos genes debido a la mutación de algunos de ellos, principalmente proto-oncogenes y los genes supresores de tumores. La importancia de estos genes radica en el hecho de que es suficiente una mutación puntual para que se conviertan en oncogenes y participen activamente en un proceso carcinogénico.

En el 30% de todos los cánceres se han encontrado mutaciones en los genes de la familia **ras**. Estos genes codifican para proteínas conocidas como GTPasas las cuales se encuentran ancladas en la membrana interna de las células desde donde transmiten señales de crecimiento, proliferación y diferenciación cuando son activadas por la unión específica a un factor de crecimiento. Esta señal desencadena una cascada que después de ser transmitida por varias proteínas

llega al núcleo para activar factores de transcripción que ponen en marcha la activación de otros genes.

Para el tratamiento del cáncer se han utilizado diferentes métodos (físicos, químicos, biológicos y genéticos). De acuerdo a los métodos genéticos se sabe que transfiriendo cromosomas completos a células tumorales, a partir de cromosomas o algunos genes, se pueden generar células incapaces de formar tumores, cuando se logra esto se dice que se ha dado una supresión de la tumorigenicidad, que podría ser llevado a la práctica en algún tratamiento contra el cáncer.

Una de las características de las células tumorales que se cultivan *in vitro* que mejor correlaciona con el crecimiento de tumores en animales experimentales de laboratorio es el crecimiento celular con independencia de anclaje. Características de esta índole tienen las células tumorales HeLa (células procedentes de un carcinoma cervico-uterino). Generalmente este tipo de células se utiliza para desarrollar tumores malignos en animales de laboratorio, así como las células SK 293 (células procedentes de un tumor renal) y de neuroblastoma (Schwartz y cols., 1985).

Los genes *ras* forman parte de una familia de los eucariontes, desde levaduras hasta el hombre. En los mamíferos la familia *ras* está constituida por tres proto-oncogenes, H-*ras*, k-*ras* y N-*ras* cada uno de los cuales puede adquirir propiedades oncogénicas, con tan solo tener una mutación puntual, comúnmente esta se produce en el codón 12 o en el codo 61. Las formas mutadas son prevalentes en muchos tumores tanto humanos como de roedores, también han sido implicados en la transformación *in vitro*, así como en la generación de tumores (Solomon, 1984).

Los genes *ras* codifican para proteínas homólogas de 21-kD, después de haber pasado por una compleja reacción post-traducciona se unen internamente a la membrana celular (Grand, y Owen, 1991), desde aquí funcionan como transductores de señales de crecimiento y diferenciación celular acoplándose a otras proteínas a través de una cascada de fosforilación que involucra una red compleja con capacidad para unir nucleótidos de guanina e hidrolizar GTP (Eccleston, 1993). Estas proteínas pueden encontrarse en dos estados gracias a su actividad intrínseca de GTPasa, al estar activas cuando se encuentran unidas a GTP en el proceso de hidrólisis del GTP (Bogusky y McCormick, 1993).

Las mutaciones en el gen *ras* (normalmente en el codón 12) producen una proteína que se encuentra en un estado constitutivamente unido a GTP. Esta forma alterada se encuentra en el 40% de los cánceres humanos (Bos y cols., 1989).

1.6. GENERADORES.

Un generador contiene un sistema en el cual un isótopo madre se desintegra produciendo un isótopo hijo, metaestable, el cual se desintegra con una emisión gamma retardada (Fini, González Rodríguez, 2003).

En 1965, Richards y colaboradores. Obtuvieron el generador de $^{99}\text{Mo} - ^{99}\text{Tc}$, que actualmente constituye el radionúcleo ideal para diagnóstico, utilizado para el 85 % de las investigaciones en medicina nuclear. Considerando esto se han sintetizado una gran variedad de moléculas para complejar el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ de manera adecuada, para ser utilizadas en estudios relacionados con problemas cardíacos, renales, cerebrales, etc.

Un generador está constituido por una columna cromatográfica en la cual el isótopo madre se desintegra según su propio tiempo de vida media, $t_{1/2}$ (^{99}Mo

(67 h), ^{113}Sn (118 d), ^{88}Ge (280 d), ^{132}Te (3.2 d); produciendo el isótopo hijo en forma metaestable : $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (6 h), $^{113\text{m}}\text{In}$ (99.5 m), $^{68\text{m}}\text{Ga}$ (68 m), $^{132\text{m}}\text{I}$ (2.3 h), que a su vez se transforma en una forma estable que emite radiaciones gamma.

El isótopo hijo puede ser separado del isótopo madre con una simple elusión con solución salina fisiológica estéril que permite obtener una solución del radionúclido de interés, el cual puede ser inyectado *in vivo* directamente.

1.6.1. Generador de $^{99}\text{Mo}/^{99}\text{Tc}$.

El generador de $^{99}\text{Mo}/^{99}\text{Tc}$ se forma por la desintegración espontánea del ^{99}Mo . La desintegración espontánea del ^{99}Mo se realiza por emisión de radiaciones beta negativo (β^-) obteniéndose dos isómeros del ^{99}Tc : $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (87%) y ^{99}Tc (13%). El Molibdeno se puede obtener mediante el método de irradiación con neutrones y/o por fisión del uranio-235.

El $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (tecnecio metaestable) se desintegra por transición isomérica (100%) y emite radiación electromagnética de 140 keV de energía (90%) hasta llegar al ^{99}Tc que por radiación β^- se transmuta a ^{99}Ru (Nadezna y cols., 1995).

1.6.2. Generador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$.

El Tungsteno-188 se produce por un reactor mediante la doble captura de neutrones enriquecidos del Tungsteno-186. El ^{188}Re obtenido a partir del Tungsteno-188 tiene un tiempo de vida media de 16.9 h, el cual decae por emisión β^- ($E_{\text{av}} = 764$ keV) con energía gamma de 155 keV (15%) y se forma por decaimiento del ^{188}W por emisión β^- . El uso del generador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ proporciona importantes ventajas para la producción de radionúclidos terapéuticos debido a la emisión de fotones gamma del ^{188}Re apropiados para obtener imágenes representadas en gammagrafías. En la tabla 2 se muestran los

diferentes tipos de generadores obtenidos de esta forma: (August Schubiger y cols., 1992; Knapp, 1997).

TABLA 2. Características de generadores prototipo de Tungsteno-188/Renio-188. (August Schubiger y cols., 1992).

ADSORBENTE	ELUENTE	CARACTERÍSTICAS ESPECIALES	INSTITUCIÓN	REFERENCIA
Alumina	Salina	Buena estabilidad	ORNL	Callahan et al., 1989
Alumina	Salina	Buena estabilidad	Instituto de Medicina, Moscú	Kodina et al., 1990
Oxido de zirconio	MEK	Solvente Volátil	ORNL	Callahan et al., 1989
Gel de Zirconio	Salina	Preparado W-188 con actividad de baja especificidad.	MURR	Ehrhardt et al., 1990
ORNL = Oak Ridge Nacional Laboratory MURR = Missouri University Research reactor				

1.7. DOSIMETRÍA.

En la práctica de la medicina nuclear se administran radiofármacos para diagnóstico y para terapia pero generalmente no se calcula la dosis absorbida por el paciente, y esto es importante ya que, la dosis determinaría el riesgo/beneficio del estudio diagnóstico y del tratamiento.

La dosis absorbida determina el riesgo/beneficio del paciente a quien se le administra el radiofármaco, se calcula con modelos biológicos y matemáticos. El biológico relaciona los datos experimentales de sangre y de orina para obtener la actividad acumulada y el valor del tiempo medio de residencia τ . Con el programa de computación MIRD, aplicando el modelo matemático, la dosis absorbida se obtienen a partir de τ . (Fini y cols., 2003 ; Loevinger y cols., 1991).

1.7.1. Actividad.

La actividad A de un radionúclido es una medida del número de transformaciones nucleares (desintegraciones) por unidad de tiempo de un elemento radiactivo. La unidad de acuerdo al sistema internacional S.I. es el Bequerel (Bq), definido como una desintegración por segundo (dps). La unidad empleada era el Curie (Ci) = 3.7×10^{10} Bq.

El número y tipo de radiaciones emitidas en las transformaciones nucleares, se conoce como esquema de decaimiento. Cada emisión es identificada por su energía E, y por el número de partículas desintegradas.

1.7.2. Dosis absorbida.

Los efectos biológicos de las radiaciones dependen de la energía depositada en la materia.

La dosis absorbida (D) es el cociente dE entre dm , donde dE es la energía promedio depositada de la radiación ionizante en una porción de materia con masa dm . La dosis absorbida debido a las emisiones de radionúclidos internos no siempre es uniforme (Stabin, 1996).

$$D = \frac{dE}{dm} \quad (\text{J/Kg}) \quad (26)$$

Las unidades de la dosis absorbida se expresan en Gray (Gy); 1 Gray = 1 J/Kg. La unidad especial que se utilizaba anteriormente es el rad = $100 \text{ erg/g} = 10^{-2} \text{ Gy}$. $1 \text{ Gy} = 10^2 \text{ rad}$.

La tasa de dosis absorbida dD/dt se define como la cantidad de dosis absorbida por unidad de tiempo por gramo de tejido y se expresa en Gy/min o Gy/h.

La exposición solo depende del campo de radiación en el aire, la dosis absorbida es función del medio irradiado. Conocida la exposición a la que se somete un medio determinado, puede calcularse la radiación absorbida; multiplicándose el valor de la exposición por un factor f que depende de la energía de la radiación y de la naturaleza del medio irradiado.

$$\text{Dosis absorbida} = f * \text{exposición} \quad (27)$$

1.7.3. Dosis equivalente.

El concepto físico de la dosis absorbida no basta para una apropiada correlación con los efectos físicos, pues por tratarse de un valor medio se considera la microdistribución de energía en volúmenes compatibles con el de los blancos sensibles de la célula. La microdistribución depende de la radiación y de las diferencias de radiosensibilidad de tejidos y órganos, este concepto sirve para indicar la dosis máxima permisible para todos los tipos de radiaciones ionizantes y considera los efectos biológicos para diferentes radiaciones y energías.

La ICRP 53 ha introducido el concepto de dosis equivalente (dosis absorbida promedio de un órgano específico considerando el peso del órgano) H_T que se obtiene a partir de la dosis absorbida promedio D_T en un órgano y un factor de peso W_r considerando el tipo de radiación. La dosis equivalente en el tejido T , se expresa como sigue:

$$H_T = \check{D}_T W_r \quad (28)$$

Mediante ensayos radiobiológicos, se ha comprobado que dosis iguales de diferente radiación, absorbidas en el mismo medio biológico y bajo idénticas condiciones, producen efectos diferentes.

1.7.4. Dosis efectiva.

Se define como una medida que indica la combinación de diferentes dosis absorbidas en diferentes órganos, dando una buena correlación con el total de los efectos estocásticos. La dosis efectiva es la suma ponderada de la dosis equivalente en los órganos irradiados. Aquí se considera la radiosensibilidad del órgano irradiado. La razón matemática toma en cuenta un factor de ponderación del órgano W_T .

$$E = \sum_T H_T W_T \quad (29)$$

Los valores de W_T se han obtenido considerando el daño estocástico somático y los efectos hereditarios. En la tabla 3 se muestran algunos factores de ponderación asignados a diferentes órganos (Loevinger y cols., 1991).

TABLA 3. Factor de ponderación.

W_T	0.01	0.05	0.12	0.20
Órgano	Piel Superficie ósea	Esófago Hígado Mama Vejiga Tiroides Resto del cuerpo	Pulmón Estómago Colon Médula ósea	Gónadas

La manera lógica para calcular la dosis promedio es determinando en principio la energía total absorbida por el órgano y dividiendo este valor por la masa del órgano. Como la dosis absorbida se mide en Gy (o rads) y la masa en Kg (o g), la

unidad de energía total absorbida en el órgano es Kg-Gy (o g-rad = 100 erg). Esta cantidad de energía se conoce como dosis integral, la cual es diferente de la dosis acumulada medida en rads.

En la mayoría de los casos es imposible medir directamente la dosis absorbida (D), definida como la energía (dE) depositada por unidad de masa (dm), por lo cual debe de ser estimada mediante modelos biológicos y físicos que representen la situación real.

La dosis absorbida promedio \bar{D} en una región u órgano de interés involucra el concepto de actividad acumulada (\bar{A}), se considera la actividad en función del tiempo y por tanto, \bar{A} representa la captación y retención de la actividad en la región u órgano de interés. Es importante determinar esta actividad desde que el radiofármaco entra al organismo hasta que es eliminado, ya sea mediante la depuración biológica o por decaimiento físico del radionúclido. Los factores dependientes del tiempo incluyen, la captación y la retención de la actividad en los órganos de interés, así como el $t_{1/2}$ efectiva. (Stabin, 1996; Stabin, y cols., 1999; Loevinger y cols., 1991).

Otros factores son independientes del tiempo y consideran la energía del radionúclido; el tamaño y forma de región fuente (región u órgano del cuerpo en donde se acumula la actividad) así como del órgano blanco (región irradiada por la fuente); la distancia entre la región fuente-blanco, la composición del órgano o medio absorbente y del tejido interpuesto.

Por lo anterior la actividad acumulada \bar{A} en los órganos depende de los valores radiofarmacocinéticos y de biodistribución obtenidos del muestreo apropiado de excretas o de tejidos y se calcula por la integración de la actividad del radiofármaco en el órgano fuente o en función del tiempo. La actividad acumulada se relaciona con la actividad inicial o inyectada A_0 para determinar el tiempo

promedio que el radiofármaco reside en una región de interés conocido como tiempo medio de residencia τ .

$$\tau = \tilde{A} / A_0 \quad (30)$$

Los factores independientes del tiempo están incluidos en los factores S que representa la fracción de energía emitida por un radionúclido en el órgano fuente (r_h) que se deposita en el órgano blanco (r_k). Esta es la base de la metodología MIRD (Medical International Radiation Dose), empleada en Medicina Nuclear. Con la intención de simplificar los cálculos dosimétricos en la rutina clínica, se utilizará la siguiente ecuación:

$$S(r_k \leftarrow r_h) = \sum \Delta_i \Phi_i (r_k \leftarrow r_h) \quad (31)$$

$$\bar{D}(k) = \sum_i A_i S_i(r_k \leftarrow r_h) \quad (32)$$

La única variable que contiene la información biológica en la ecuación 32 es la actividad acumulada A_i , se puede determinar experimentalmente o estimar a través de modelos farmacocinéticos para el compuesto de interés. Para incluir la información física y de la geometría (anatomía) restante se ha definido el factor S (ecuación 31).

El factor S incorpora la masa del órgano y la geometría del mismo, la aproximación se efectúa tomando el modelo anatómico del hombre estándar de 70 Kg. Se calculan de manera análoga a lo realizado con las fracciones absorbidas. Detalles internos del fantoma han sido modificados para hacerlo un modelo más realista.

La generación de tablas de factores S ha simplificado la dosimetría clínica, considerando las constantes Δ_i que se determinan con la información proveniente de los esquemas de decaimiento radiactivo, y de las fracciones absorbidas Φ_i .

La biodistribución del radiofármaco y su captación en un órgano específico se visualizan por medio de gammagrafías y la actividad total del cuerpo se puede medir mediante las cpm (cuentas por minuto) que representa la concentración del radiofármaco en plasma o en sangre de una imagen de cuerpo entero.

Con los programas de computación de la misma gammacámara se obtienen los datos de la cinética de los radiofármacos por medio de las regiones de interés (RDI) dibujadas sobre una imagen que pueden ser de forma regular e irregular. Con los paquetes estadísticos comerciales, incluidos en el equipo, se determina el número de píxel (unidad de imagen) contenido dentro de la RDI, el área planar seleccionada, promedio geométrico de las cpm de las vistas anterior y posterior (vista conjugada) así como la desviación estándar de las cpm en cada píxel.

El almacenamiento de las RDI secuenciales permite el análisis eficiente y reproducible de los datos seriados así como el cálculo del tiempo de residencia del radiofármaco en esta región, tiempo que permite calcular la dosis absorbida promedio.

Los modelos matemáticos son complicados y suponen varias situaciones especiales. La metodología MIRD utiliza los datos físicos de la energía promedio de cada una de las partículas del decaimiento del radionúclido y el tiempo medio de residencia τ para calcular la dosis absorbida promedio por los órganos fuente y blanco de un hombre con un peso estándar de 70 Kg. El programa MIRDose simplifica todos estos cálculos matemáticos e incluye, además del modelo del hombre, al de una mujer, una mujer embarazada, y a niños de distintas edades con diferentes pesos (Montoya y cols., 1997; Loevinger y cols., 1991).

El mejor método para estimar la dosis absorbida es obtener cálculos de dosimetría personalizada a priori. Se recomienda un método sencillo con obtención de muestras secuenciales de plasma o sangre y orina con gammagrafías seriadas, en

intervalos pequeños durante las primeras horas y con intervalos mayores durante varios días (cuando el tiempo de vida media efectivo ($t_{1/2}$) > 3).

Después de que el paciente reciba la actividad diagnóstica del radiofármaco y se estime la dosis absorbida (en órganos), el médico nuclear podrá valorar el beneficio del tratamiento terapéutico con el mismo radiofármaco, pero con una actividad debidamente calculada, validada e individualizada.

En el caso del desarrollo de nuevos radiofármacos para diagnóstico o para terapia, se deben de realizar estudios con animales de laboratorio seguidos en voluntarios, y además de los estudios gammagráficos seriados, se recomienda determinar los valores radiofarmacocinéticos con muestras seriadas de sangre, plasma o suero y la recolección de orina o heces de acuerdo con la biodistribución del radiofármaco.

Los datos de dosis absorbida obtenidos le permitirán al médico nuclear determinar la dosificación del radiofármaco a administrar, de acuerdo a la actividad acumulada en los órganos de interés, y la dosis absorbida por el paciente. Así los valores obtenidos de la dosis absorbida permiten valorar la eficacia del tratamiento y el riesgo beneficio de la radiofarmacoterapia en cada paciente.

1.8. RADIOFÁRMACOS BAJO ESTUDIO.

1.8.1. ^{99m}Tc-ácido D-glucárico.

El ácido D-glucárico es el ácido D-glucosárico, $C_6O_8H_{10}$ de peso molecular de 210.1 g/mol, soluble en agua y etanol. Su punto de fusión se encuentra en un intervalo de 125-126 °C, es un ácido dicarboxílico, también conocido como ácido tetrahidroxiapídico, derivado de la glucosa. Su fórmula química corresponde a un ácido de seis carbonos $(HOOC-(CH-OH)_4-COOH)$.

Los núcleo-equipos como el ácido-D-glucárico marcados con ^{99m}Tc o con otros metales, son sustancias artificiales extrañas al organismo; la elección de un adecuado ligando garantiza una distribución específica y localizada en ciertos órganos (Nadezna y cols, 1995).

Existe poca información en la literatura relacionada con el ácido D-glucárico marcado con ^{99m}Tc . Se ha sugerido que penetra en las células por un sistema de transporte semejante al de los azúcares y que se une al núcleo unas horas después de que se presente la muerte celular. En 1966 Straus y colaboradores informaron que el ácido-D-glucárico marcado ^{99m}Tc identifica la muerte celular temprana (Yaoita y cols., 1993).

Los estudios de Ballinger con fibroblastos de ovario de hámster chinos demostraron que existe una concentración del ^{99m}Tc -ácido D-glucárico en las células hipóxicas (Ballinger y cols., 1993).

El poder detectar un infarto recién producido se debe a la rápida biodistribución del radiofármaco en plasma y a la afinidad que existe del mismo por el tejido con necrosis aguda (Wiersema y cols., 2000).

La gammagrafía obtenida con el complejo ^{99m}Tc -ácido D-glucárico es útil para identificar necrosis aguda al miocardio, que se manifiesta con dolor en el pecho (Khaw y cols., 1997; Chagoya, 1997; Zhonglin Liu, 2004).

1.8.2. ^{188}Re -(3-(2-naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida) cíclico (2→7) disulfuro (9CI).

Las imágenes de tumor in vivo utilizando un radiofármaco son una herramienta de diagnóstico importante en los tratamientos de cáncer. La radioterapia dirigida a un tumor requiere de estudios especiales para los diagnósticos iniciales, como los

proporcionados por los anticuerpos específicos para la detección de un tumor. Los fragmentos de anticuerpos unidos al radionúclido tienen el potencial para dirigirse al tumor y penetrar rápidamente en las células dañadas, concentrando las dosis del radiofármaco y destruyendo las células malignas. El uso de péptidos está disponible como un procedimiento del radiomarcado fácil y sencillo para ser aplicado en un hospital. Se pueden utilizar para estudios de biodistribución. Por lo anterior el uso del ^{188}Re puede extenderse fácilmente a casi cualquier proteína o péptido sintético (Fini y cols., 2003).

En particular, el potencial redox de renio es bajo, por lo cual el prerrenato ($^{188}\text{ReO}_4^-$) más difícil de reducir y por tanto más fácil de oxidar. Experimentalmente se involucra la mezcla de proteínas recombinantes con el ^{188}Re -carbonilo. Los experimentos de optimización consideran criterios de evaluación que incluyen la estabilidad de suero o plasma, la retención de bioreactividad y la valoración de la sustitución molar máxima (Robert Schenter y cols., 2004; Ferro y cols., 1999).

Una molécula objeto de diferentes estudios es el lanreótido, derivado análogo de la somatostatina, que contiene 8 aminoácidos unidos a un ciclo, con un puente disulfuro entre dos moléculas de cisteína. El lanreótido es afín a los receptores de somatostatina, y marcado adecuadamente con el $^{188}\text{ReO}_4^-$ ($t_{1/2} = 16.9$ h, $E(\gamma) = 155$ keV), evidencia la expresión de receptores en numerosos tipos de tumores (Stephen Karesh y cols., 1997). La estructura molecular del lanreótido se muestra en la FIGURA 3 mientras que en la FIGURA 4 se muestra la estructura conformacional del mismo basada en la *Teoría Funcional de densidades* (DFT), simulada por Cerius (Arteaga de Murphy y cols., 2001).

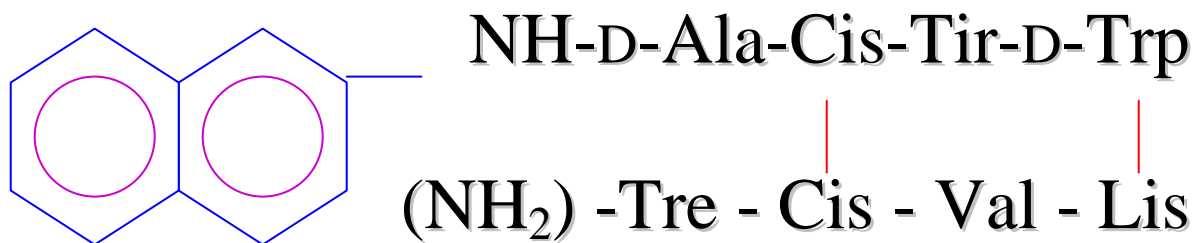


FIGURA 3. Estructura molecular del lanreótido.

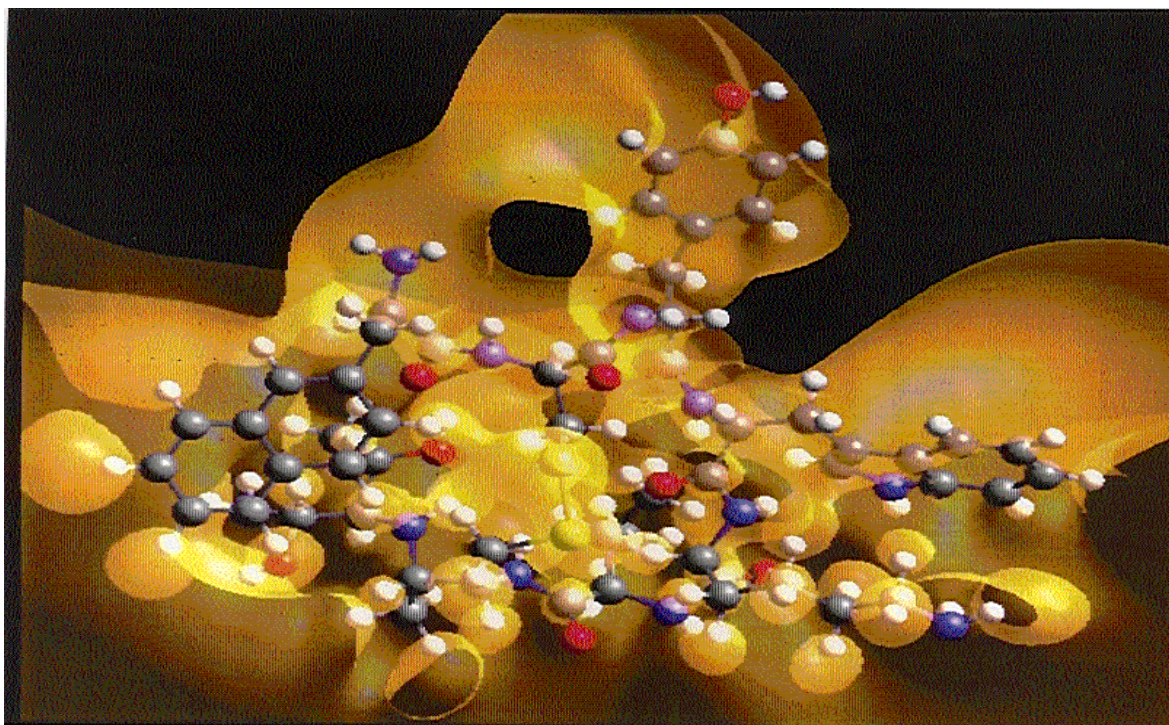


FIGURA 4. Estructura del péptido calculada por DFT y simulada por Cerius (Arteaga de Murphy y cols., 2001).

En la figura 5 se presenta la estructura del lanreótido marcado con ^{188}Re es decir el radiofármaco : ^{188}Re -3-(2-naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-Tre-amida) cíclico (2→7) disulfuro (9Cl).

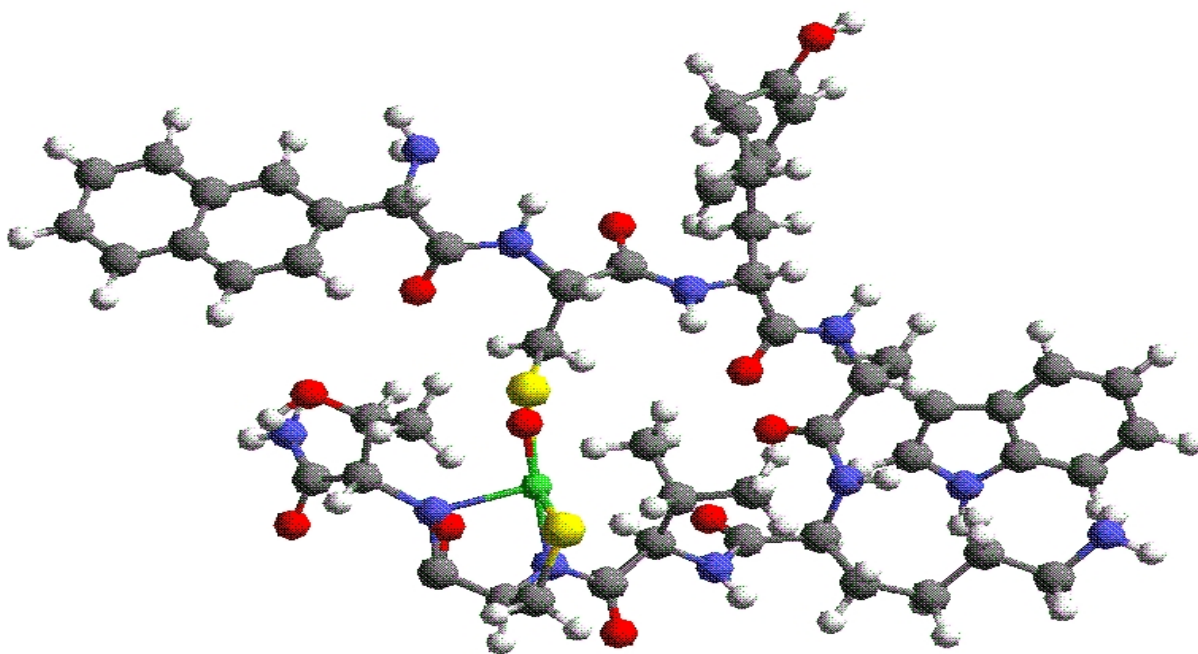


FIGURA 5. Estructura del radiofármaco calculada por DFT y simulada por Cerius ^{(Arteaga de Murphy y cols., 2001).}

A la fecha no existe información acerca de la biodistribución ni de la farmacocinética de este radiofármaco en diferentes tipos de células cancerígenas.

II. HIPÓTESIS:

Los parámetros farmacocinéticos del ^{99m}Tc -ácido D-glucárico permitirán establecer la dosis absorbida adecuada en el modelo fisiológico (rata) y con ello será posible escalar la dosis en humanos.

La medición de niveles plasmáticos del péptido 3-(2-naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida, cíclico (2→7)-disulfuro (9CI) (lanreótido) marcado con ^{188}Re emisor de radiaciones beta negativas, permitirán determinar la disposición del radiofármaco en el organismo y establecer el régimen de dosificación adecuado al calcular la dosis de radiación absorbida en humanos.

III. JUSTIFICACIÓN:

Los radiofármacos representan una alternativa interesante para el diagnóstico y tratamiento de algunas enfermedades. Su ventaja radica en que son selectivos y se pueden utilizar dosis pequeñas, específicas para una enfermedad en particular. En nuestro país el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) y el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zúbiran (INCMNSZ) han desarrollado una serie de radiofármacos entre los que se encuentran el ^{99m}Tc -ácido D-glucárico y el ^{188}Re -3-(2-naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida, cíclico (2→7)-disulfuro (9CI), siendo el primero un compuesto utilizado para detectar infarto al miocardio y el segundo un radiofármaco diseñado para su uso en el tratamiento de cáncer. Considerando que a la fecha no existe información de la farmacocinética y por ende de la dosimetría de estos radiofármacos se justifica el presente trabajo que permitirá ampliar el conocimiento de estos compuestos para su posterior uso en la clínica.

IV. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar la biodistribución y la radiofarmacocinética de los radiofármacos ^{99m}Tc -ácido D-glucárico y ^{188}Re -3-(2-naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida, cíclico (2→7)-disulfuro (9Cl) para determinar la dosimetría de los mismos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Preparar una formulación farmacéutica contenidos en un juego de reactivos para producir los complejos de ^{99m}Tc -ácido D-glucárico y de ^{188}Re -3-(2-naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida, cíclico (2→7)-disulfuro (9Cl).
- Realizar las pruebas de control de calidad de los núcleo-equipos utilizados.
- Validar el método analítico para cuantificar el ^{99m}Tc -ácido D-glucárico en plasma.
 - Realizar estudios de biodistribución biológica en modelos animales de ratas y ratones atímicos de los radiofármacos de ^{99m}Tc -ácido D-glucárico y del ^{188}Re -3-(2-naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida, cíclico (2→7)-disulfuro (9Cl) respectivamente.
- Determinar los parámetros farmacocinéticos y el modelo farmacocinético que explique el comportamiento del ^{99m}Tc -ácido D-glucárico en muestras de plasma de ratas wistar y del ^{188}Re -3-(2-naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida, cíclico (2→7)-disulfuro (9Cl) en muestras de plasma de ratones balb-C para conocer la dosimetría adecuada de cada radiofármaco.

V. FASE EXPERIMENTAL.

El trabajo de investigación se realizó en dos etapas:

a) Preparación, validación y determinación de los parámetros farmacocinéticos de un radiofármaco de uso diagnóstico (^{99m}Tc -ácido-D-glucárico) y la

b) Preparación de un radiofármaco de uso terapéutico (^{188}Re -3-(2-naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida, cíclico (2→7)-disulfuro (9Cl).

5.1. MATERIAL Y REACTIVOS.

MATERIAL.

Tubos de ensayo de 6 y 10 mL

Micropipetas

Pipetas volumétricas de 1,5 y 10 mL

Pipetas pasteur o aspirador

Matraz aforado de 10, 25, 50, 100 y 1000 mL

Gradillas

Jeringas de insulina de 5 y 10 mL

Papel Whatman 3M

Columna Sephadex G-25, (SIGMA), 0.5 x 10 cm

Sílica gel en fibra de vidrio (Helman & Ann Arbor Mich.)

EQUIPO

Cromatógrafo LDC HPLC marca *Waters U.S.A.*

Bomba *Waters* 510, power, operating pressure X 1000 (psi)

Detector de arreglo de fotodiodos *Waters* TM 996

Jeringa de inyección 0.10 ml (100 μ L)
Inyector automático con loop de 20 μ L
Columna C₁₈ de dimetiloctadecilsilil, μ -Bondapack 10 μ m y de 300 X 3.9 mm d.i.
Software *Millenium 2000*
Regulador de voltaje electrónico (*Vogar ER-10*) 120 vac-60 Hz
Espectrofotómetro UV: de luz ultravioleta Beckman, modelo 35
Integrador
Registrador
Colector de fracciones *Waters*
Potenciómetro *Bausch & Lomb, U.S.A.*
Agitador *Vortex, U.S.A.*
Balanza analítica *Mettler H35, U.S.A.*
Centrífuga *Internacional. U.S.A.*
Calibrador de dosis *Capintec, U.S.A.*
Detector de cristal de centelleo tipo pozo(Nal), multicanal (Canberra), U.S.A.
Gammacámara *Siemens MultiSpect 2, U.S.A.*
Computadora PC, U.S.A.
Generador de ⁹⁹Mo-⁹⁹Tc “*GETEC*”. U.S.A
Generador de ¹⁸⁸W-¹⁸⁸Re (Oak Ridge), U.S.A.

MATERIAL BIOLÓGICO

Líneas celulares: Células HeLa (derivadas de cáncer cervico-uterino)
Células SK293 (derivadas de cáncer de riñón)
Células de neuroblastoma humano.

Ratas *Wistar*

Ratones Balb-C

Ratones atómicos

REACTIVOS

Ácido D-glúcarico (C₆O₈H₁₀) utilizado para preparar la formulación grado químico de SIGMA Chem. De Co.

Lanreótido 3-(2-naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida, cíclico (2→7)-disulfuro (9Cl) para preparar la formulación grado químico de Pi-Chem.

Estudio 1. ^{99m}Tc-ácido-D-glucárico.

5.2. PREPARACIÓN DE ^{99m}Tc-ÁCIDO-D-GLUCÁRICO.

5.2.1. Marcado.

El tecnecio 99 metaestable fue obtenido mediante un generador de molibdeno-tecnecio (⁹⁹Mo/^{99m}Tc) GETEC (ININ) y la actividad se determinó empleando un calibrador de dosis Capintec RC-15 con fuente sellada de KI. La proporción molecular del agente reductor (SnCl₂•H₂O) con un agente estabilizador antioxidante (ácido gentísico) se realizó de acuerdo a la cantidad de ácido D-glucárico utilizado, disuelto en 1 mL de solución salina (0.9% NaCl).

5.2.2. Formulación.

El procedimiento fue adicionar 0.0250 mg de ácido gentísico a la solución del glucarato, adicionando cloruro estanoso, pertecneciato de sodio en solución salina, previamente eluido por el generador, y ajustando el pH a 4. La mezcla radiactiva se incubó de 18 a 25 °C durante 10 minutos. La pureza radioquímica se determinó por cromatografía en papel ITLC utilizando papel Whatman, como fase móvil acetona y solución salina fisiológica. También fue determinada por

cromatografía en columna ITLC fibra de vidrio y silica gel donde la fase móvil fue una solución salina con ácido glucárico 0.006 N.

5.3. CONTROL DE CALIDAD

5.3.1. Cromatografía en columna.

Se utilizó como fase estacionaria una columna de Sephadex G- 25 (SIGMA) de 0.5 x 10 cm² y como fase móvil una solución salina (0.9 % NaCl).

1.- El procedimiento consistió en colocar una muestra de la formulación recién preparada del ^{99m}Tc-ácido-D-glucárico en la columna y se hizo eluir en la misma.

2.- Se recolectaron fracciones de 0.5 mL a una velocidad de 0.94 mL/min.

La pureza radioquímica se determinó utilizando 6 formulaciones recién preparadas de ^{99m}Tc-ácido-D-glucárico.

3.- A las fracciones obtenidas del radiofármaco ^{99m}Tc-ácido-D-glucárico se les midió la radioactividad en un detector de cristal de centelleo tipo pozo (Canberra).

4.- Se determinó el porcentaje de los componentes: el ^{99m}Tc-ácido-D-glucárico, complejo puro y la impureza ^{99m}TcO₄⁻ (pertechnetato libre).

5.3.2. Cromatografía en papel (ITLC).

Se utilizaron tiras cromatográficas de silica gel de fibra de vidrio: ITLC (Gelman Sciences, Ann Arbor, Mich. USA) como fase estacionaria. Se utilizó una mezcla de ácido glucárico 0.006 N y solución salina fisiológica al 0.9 % (60:40) como fase móvil.

1.- El procedimiento consistió en tomar una gota de radiofármaco y colocarla en el origen de la tira cromatográfica e introducirla en una cámara cromatográfica. Una vez que el solvente llegó al frente, se retiró de la cámara y se dejó en reposo a temperatura ambiente hasta sequedad completa.

2.- La tira se cortó en 10 segmentos de 1 cm c/u y la radioactividad se midió individualmente en un contador de centelleo con analizador monocanal.

3.- Se determinó el porcentaje del ^{99m}Tc -ácido-D-glucárico.

Para detectar $^{99m}\text{TcO}_4^-$ se utilizó papel *Whatman* como fase estacionaria y como fase móvil acetona.

5.4. PRUEBAS BIOLÓGICAS

5.4.1. Prueba de esterilidad.

1.- Se sembró asépticamente 1 mL del radiofármaco en tubos de ensaye que contenían medio de cultivo líquido de tioglicolato y en tubos con caldo digerido de caseína-soya.

2.- Los tubos con medio de cultivo de tioglicolato se encubaron a 37 °C y los de caseína-soya a 25 °C y se revisaron diariamente durante 14 días posteriores a la incubación. (FEUM: Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaria de Salud. Octava edición. 2004).

5.4.2. Prueba de pirógenos.

La detección de pirógenos del ^{99m}Tc -ácido-D-glucárico se llevó a cabo utilizando la técnica de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) como lo indica la Farmacopea Mexicana y la USP XXIV.

1.- Preparación del control positivo: Se reconstituyó de forma aséptica el frasco que contiene la endotoxina con 5 mL de agua estéril y libre de pirógenos, la concentración es de 500 $\mu\text{g/mL}$. Se tomaron 100 μL de la solución y 100 μL del reactivo de LAL y se colocaron en un tubo de ensaye estéril y apirógeno.

2.- Preparación del control negativo: agua estéril y libre de pirógenos. Se colocaron 100 μL de agua y 100 μL de reactivo de LAL en un tubo de ensaye estéril y libre de pirógenos.

3.- Preparación de la muestra: se colocaron 100 μL del radiofármaco y 100 μL del reactivo de LAL en un tubo de ensaye estéril y libre de pirógenos. Se repitió el procedimiento con una dilución 1:10 del radiofármaco.

4.- Después de incubar los tubos de ensaye a 37 °C durante 60 minutos se invirtieron a 180°C. La presencia de un gel fijo en el control positivo, indica la presencia de endotoxinas bacterianas.

5.5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA CUANTIFICAR ^{99m}Tc -ÁCIDO-D-GLUCÁRICO EN PLASMA Y ORINA.

5.5.1. Condiciones de análisis del detector de centelleo tipo pozo.

Canal ΔE : 2048

Potencial: 1057 voltios

Ventana: 650 -700

Tiempo de lectura: 30 segundos

Área: cuentas por minuto (cpm)

5.5.2. Linealidad del sistema.

Se determinó preparando una curva de calibración de una misma solución estándar de ^{99m}Tc -ácido D-glucárico en solución salina fisiológica utilizando 11 concentraciones realizando análisis por quintuplicado para cada dilución, en tres días diferentes. Intervalo de concentración de 308 – 13,480 Bq (8.34 – 364.34 nCi/mL).

5.5.3. Linealidad del método.

Se determinó preparando una curva de calibración de una misma solución de ^{99m}Tc - ácido D – glucárico en plasma y orina respectivamente, utilizando 7

concentraciones realizando análisis por cuadruplicado para cada dilución, en tres días diferentes. Intervalo de concentración de 1369 – 10,878 Bq (37 - 294 nCi/mL) para plasma y de 1591 – 10,693 Bq (43 - 289 nCi/mL) para orina.

5.5.4. Precisión del método

Para determinar la precisión en un mismo día se analizaron por cuadruplicado muestras plasmáticas y de orina a las que se les adicionó ^{99m}Tc -glucarato a la concentración 91.945 kBq/mL (2.485 $\mu\text{Ci/mL}$); realizando diluciones para llegar a las concentraciones de 2.573, 3.478, 6.328, 8.548, 11.491, 13.387 kBq/mL (69.55, 94.01, 171.05, 231.04, 310.56, y 361.81 nCi/mL) para el estudio en plasma.

Para el análisis en orina se realizaron diluciones a las siguientes concentraciones 2.311, 3.631, 5.938, 7.346, 9.229, 10.326 kBq/ml (62.46, 98.14, 160.49, 198.54, 249.44, y 279.08 nCi/mL).

5.5.5. Repetibilidad del método

Se evaluó durante 3 días, analizando diariamente y por triplicado soluciones de ^{99m}Tc -glucarato a las concentraciones de 1.381, 1.881, 3.315, 5.541, 6.348, 8.249 y 10.488 kBq/mL (37.33, 50.84, 89.60, 149.77, 171.58, 222.95, y 283.45 nCi/mL) para plasma. Para orina (1.248, 1.87, 3.111, 5.19, 6.473, 8.09 y 9.065 kBq/mL (33.73, 50.53, 84.07, 140.27, 174.94, 218.64, y 245.00 nCi/mL).

5.5.6. Exactitud del método

Se prepararon soluciones testigo del ^{99m}Tc -glucarato a las siguientes concentraciones: 2.409, 4.818, 7.227, 9.637, 12.046 y 14.455 kBq/mL (65.11, 130.23, 195.34, 260.46, 325.57 y 390.69 nCi/mL) para muestras de plasma y 3.329, 5.318, 6.648, 8.416, 9.411 y 3.066 kBq/mL (89.96, 143.73, 179.67, 227.47,

y 254.36 nCi/mL) se analizan de acuerdo al porcentaje recuperado en las muestras de plasma y de orina respectivamente.

5.5.7. Especificidad y estabilidad del ^{99m}Tc -glucarato.

Se determinó la especificidad del radiofármaco realizando una cromatografía en columna empacada de Sephadex G-25 *Sigma* de 0.5 cm de diámetro con una longitud de 10 cm, utilizando 200 μL del ^{99m}Tc -glucarato, con fracciones de eluato obtenidas de 0.5 mL.

Se realizó un estudio de estabilidad utilizando el ^{99m}Tc -glucarato preparado de acuerdo a la formulación descrita anteriormente utilizando una concentración de 4.677 kBq/mL (126.4 nCi/mL), determinando el porcentaje de la pureza radioquímica por cromatografía en papel a los siguientes tiempos 1, 2.86 y 20.88 horas después de su preparación.

5.5.8. Sensibilidad del método

La sensibilidad del método se evaluó calculando la concentración mínima cuantificable y la concentración mínima detectable.

1.- Concentración mínima cuantificable.

Para determinar la concentración mínima cuantificable, se analizaron 7 muestras de una solución testigo con ^{99m}Tc -glucarato a una concentración de 13.394 kBq/mL (0.362 $\mu\text{Ci/mL}$), posteriormente se realizó una dilución 1:2 de ésta solución, y se analizaron de nuevo 5 muestras. Este procedimiento se repitió sucesivamente hasta encontrar la concentración a la cual (mediante el decaimiento radiactivo del radiofármaco) las cuentas son al menos 3 veces a las cpm de la radiación ambiental o “ambiente” o “fondo”.

2.- Concentración mínima detectable.

Se analizaron 5 muestras de una solución testigo con ^{99m}Tc -glucarato a una concentración de 13.394 kBq/mL (0.362 $\mu\text{Ci/mL}$), posteriormente se realizó una dilución 1:2 de la misma y se analizaron 5 muestras, así sucesivamente se repitió el procedimiento hasta observar que la concentración manifiesta una respuesta de actividad igual a la del “ambiente”.

5.6. BIODISTRIBUCIÓN.

1.- A 12 ratas wistar normales de 250-330 g de peso se les administró una dosis de 2.345 MBq (63.37 μCi) del radiofármaco ^{99m}Tc -glucarato por vía de administración I.V.

2.- Después se procedió a tomar muestras de sangre a los siguientes tiempos: 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2 y 26 h. para realizar el estudio de biodistribución.

3.- Se sacrificaron las ratas con CO_2 en una cámara de anestesia y se analizó la concentración de ^{99m}Tc -glucarato en los siguientes órganos: corazón, pulmón, hígado, bazo, riñón, estómago, intestino delgado, intestino grueso, músculo, y hueso.

4.- Las muestras se cuantificaron empleando el detector de cristal de centelleo tipo pozo para obtener la respuesta de radiación obtenida en términos de cpm (cuentas por minuto).

5.7. ESTUDIO FARMACOCINÉTICO.

1.- A 78 ratas wistar normales de 250-370 g de peso se les administró una dosis de 2.04 MBq (55 μCi) de ^{99m}Tc -glucarato por vía I.V.

2.- Se procedió a tomar muestras de sangre en tubos heparinizados, utilizando la técnica de punción cardiaca a los siguientes tiempos: 0.6, 0.9, 1, 2, 5, 27.8, 28, 29, 31, 32, 33, 49, y 50 h postinyección. Después se procedió a sacrificarlas con CO₂ en una cámara de anestesia.

3.- Las muestras se centrifugaron a 2500 rpm, se tomaron 2 alícuotas de 0.5 mL de plasma las cuales se diluyeron a 1 mL.

4.- Las muestras se leyeron en el detector de cristal de centelleo tipo pozo, se obtuvo la respuesta de radiación en términos de cpm (cuentas por minuto). Todas las muestras fueron corregidas por decaimiento físico.

Estudio 2. Biodistribución de ¹⁸⁸Re-3-(2-naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida, cíclico (2→7)-disulfuro (9Cl).

5.8. PREPARACIÓN DEL COMPLEJO ¹⁸⁸Re-3-(2-naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida, cíclico (2→7)-disulfuro (9Cl).

El radiofármaco se preparó de acuerdo a la siguiente formulación:

1.- 80 mg de HEDP (hidroxietilendifosfonatos) en 500 µL de ácido clorhídrico 0.5 N y 50 µL de HCl al 30% y llevar al volumen de 1 mL con HCl 0.5 N. La solución se ajustó a pH = 2.0.

2.- Se pesaron 47.6 mg del agente reductor (SnCl₂•2H₂O) y se disolvieron en 10 mL de HCl 0.5 N.

3.- El péptido se reconstituye con 1 ml de agua estéril y libre de impurezas (1mg/mL).

El procedimiento que se siguió fue mezclar 1 mL de HEDP, 2 mL de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 0.5 mL del péptido, (pH 1). Se agregó 1 mL de $^{188}\text{-ReO}_4^-$ (≈ 176 MBq), eluido del generador de $^{188}\text{W-}^{188}\text{Re}$ (Oak Ridge National Laboratory, TN), en 0.9% de solución salina, y se midió la radioactividad usando un calibrador de dosis. La reacción se llevó a cabo a 90 minutos de ebullición. Las concentraciones finales fueron: SnCl_2 0.95 mg/mL, 8 mg/mL de HEDP, a pH = 1 e incubación a ebullición durante 1.5 h.

5.9. CONTROL DE CALIDAD

5.9.1. IDENTIFICACIÓN DEL PEPTIDO 3-(2-naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida, cíclico (2→7)-disulfuro (9CI).

Reducción del péptido.

El péptido con una secuencia de aminoácidos 3-(2-naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida, cíclico (2→7)-disulfuro (9CI) (lanreótido) fue obtenido como un liofilizado (*Sigma Chemical*) de 1.0 mg de péptido dentro del vial. La reconstitución del liofilizado se realizó agregando 1.0 mL de agua estéril y libre de pirógenos (solución péptidica). A 0.5 mL de la solución anterior se le adicionaron 25 μL de 2-mercaptoetanol (2-ME) previamente diluido con agua destilada (1:10). La mezcla se hace reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos por rotación continua, la solución resultante fue purificada en una columna de exclusión molecular ProteinPak 125 (*Waters*) por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH de 7.4 como fase móvil a una velocidad de flujo de 1.5 mL/min. Este sistema produce tiempos de retención de 20-21 minutos y de 8-8.5 minutos para el péptido y el 2-ME respectivamente. Se utilizó un detector de arreglo de fotodiodos HPLC UV.

5.9.2. IDENTIFICACIÓN DEL COMPLEJO ^{188}Re -3-(2-naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida, cíclico (2→7)-disulfuro (9CI).

El procedimiento general para la preparación del complejo ^{188}Re -péptido fue el siguiente: el etano-1-hidroxi-1,1-ácido difosfónico (HEDP) fue sintetizado en el laboratorio de producción de isótopos radiactivos del ININ haciendo reaccionar ácido acético y tricloruro de fósforo siguiendo por una subsiguiente purificación mediante un sistema de destilación a vapor. La destilación se llevó a cabo a 120 °C, la solución obtenida tuvo un pH = 5, el exceso de ácido acético fue eliminado. Se obtuvo un producto semisólido que es el HEDP. El HEDP y 0.5 mg (3 μmol) de ácido gálico (como antioxidante) se disolvieron en 0.5 mL de una solución de cloruro estanoso (SnCl_2 en HCl 0.6 M), el pH fue ajustado a 3 con solución de NaOH 1 M. Después 1.0 mL de péptido reducido (0.25 mg/mL reconstituido en agua destilada) fue agregado a la solución anterior. El generador de $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ (Oak Ridge Nacional Laboratory, USA) fue eluido con solución salina fisiológica al 0.9%, y la radioactividad fue determinada utilizando un calibrador de dosis (Capintec Radioisotope Calibrator, Model CRC-7). La solución de prerrenato (2 mL, \cong 225 MBq/mL), previamente ajustada a un pH = 3 o 4 se añadió al vial conteniendo el péptido. Se midió el pH de la mezcla reactiva y se hizo reaccionar a una temperatura de 92°C durante 90 minutos. Se midió la pureza radioquímica del radiofármaco. Lo anterior se realizó con la finalidad de obtener los cromatogramas para identificar al complejo formado.

5.9.3. PUREZA RADIOQUÍMICA.

La pureza radioquímica se determinó por cromatografía en papel, usando silica gel de fibra de vidrio ITLC (*Gelman Sciences* Ann Arbor, Mich. USA) empleando como fase móvil solución salina al 0.9% para el primer sistema y metanol-HCl 1.0

N (85:15) para el segundo sistema. 24 horas después se evaluó la estabilidad del complejo de renio empleando ITLC-SG.

5.9.3.1. Cromatografía en papel (CP):

Se utilizaron tiras cromatográficas de papel Whatman 3M como fase estacionaria, se marcó uno de los extremos como origen (1 cm) y otro como frente del solvente (10 cm). Se usó metanol en HCl 0.1 M y solución salina fisiológica como fase móvil.

1.- El procedimiento consistió en tomar una gota del radiofármaco y colocarla en el origen de la tira cromatográfica y de inmediato introducirla en una cámara cromatográfica. Una vez que el solvente llegó al frente, se retiró de la cámara cromatográfica y se dejó en reposo a temperatura ambiente hasta sequedad completa.

2.- La tira se cortó en 10 segmentos de 1 cm c/u y la radioactividad se midió individualmente en un detector de cristal de centelleo tipo pozo (*Canberra*).

3.- Se determinó el porcentaje de los componentes: $^{188}\text{ReO}_4^-$, $^{188}\text{ReO}_2$, ^{188}Re .péptido, ^{188}Re -HEDP.

5.3.9.2. Cromatografía líquida de alta resolución.

El control de calidad del péptido fue evaluado realizando un análisis de cromatografía de exclusión molecular HPLC, utilizando una columna de filtración en gel ProteinPak 125 (*Waters*), con un detector de arreglo de fotodiodos. Se utilizó una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH de 7.4 como fase móvil a una velocidad de flujo de 1.5 mL/min. El perfil cromatográfico fue determinado por colección de muestras (colector de fracciones *Waters*) de un volumen de 0.5 mL para contar en un detector externo de NaI (TI) (laboratorios, NML).

5.9.4. PRUEBAS BIOLÓGICAS

5.9.4.1. Prueba de esterilidad.

1.- Se sembró asépticamente 1 mL del radiofármaco en tubos de ensaye que contenían medio de cultivo líquido de tioglicolato y en tubos con caldo digerido de caseína-soya.

2.- Los tubos con medio de cultivo de tioglicolato se encubaron a 37 °C y los de caseína-soya a 25 °C y se revisaron diariamente durante 14 días posteriores a la incubación. (FEUM: Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Salud. Octava edición. 2004).

5.9.4.2. Prueba de pirógenos.

La detección de pirógenos del ^{188}Re -lanreótido se llevó a cabo utilizando la técnica de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) como lo indica la Farmacopea Mexicana y la USP XXIV.

1.- Preparación del control positivo: Se reconstituyó de forma aséptica el frasco que contiene la endotoxina con 5 mL de agua estéril y libre de pirógenos, la concentración es de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se tomaron 100 μL de la solución y 100 μL del reactivo de LAL y se colocaron en un tubo de ensaye estéril y apirógeno.

2.- Preparación del control negativo: agua estéril y libre de pirógenos. Se colocaron 100 μL de agua y 100 μL de reactivo de LAL en un tubo de ensaye estéril y libre de pirógenos.

3.- Preparación de la muestra: se colocaron 100 μL del radiofármaco y 100 μL del reactivo de LAL en un tubo de ensaye estéril y libre de pirógenos. Se repitió el procedimiento con una dilución 1:10 del radiofármaco.

4.- Después de incubar los tubos de ensaye a 37 °C durante 60 minutos se invirtieron a 180°C. La presencia de un gel fijo en el control positivo, indica la presencia de endotoxinas bacterianas.

5.10. CULTIVO CELULAR

Se utilizaron células HeLa, derivadas de un adenocarcinoma de cáncer cervicouterino desarrolladas de la sucesión activa transcripcional del virus del papiloma humano 18 (HPV18) y de los oncogenes E6 y E7 (el Shwartz et al., 1985) las cuales se desarrollan ininterrumpidamente a través del ciclo celular. Las células HeLa crecen a 37°C, con 5% de CO₂, y 100% humedad en un medio modificado de Dulbecco y el medio de Eagle's (DMEM) con 10% suero del bovino nonato y antibióticos (100 unidades/mL de penicilina y 100 g/mL de estreptomicina).

Las células cancerígenas renales, se obtuvieron de células SK293. El tratamiento fue el mismo que se utilizó para el crecimiento de las células HeLa.

Las células obtenidas de neuroblastoma humano siguieron el mismo tratamiento desarrollado para el crecimiento de las células HeLa.

5.11. DESARROLLO DEL TÚMOR EN RATONES ATÍMICOS.

La tumorigenicidad de las células HeLa fue determinada por la inyección subcutánea de 1×10^6 células, las cuales se resuspendieron en 0.2 mL de solución amortiguadora de fosfonatos, y se administraron en el lomo de los ratones atímicos. El desarrollo del tumor se visualizó de 4 a 6 meses. Los tumores ya estaban desarrollados antes de la administración del complejo ¹⁸⁸Re-lanreótido.

El tumor renal implantado en los ratones desnudos fue determinado por la inyección intraperitoneal de 1×10^6 células, resuspendidas en 0.2 mL de solución buffer de fosfonatos. El tumor se desarrollo de 4-6 semanas en los ratones atímicos. Se observaron los sitios de inyección a intervalos regulares para observar la formación del ¹⁸⁸Re-lanreótido.

La presencia del neuroblastoma fue determinada por la inyección subcutánea de 1×10^6 células, las cuales se resuspendieron en 0.2 mL de solución buffer de fosfonatos. Los tumores se desarrollaron de 4 a 6 meses. Se observaron los sitios de inyección a intervalos regulares para ver la aparición de formación del tumor y su progresión. Los tumores se visualizaron antes de la inyección del ^{188}Re -lanreótido.

5.12. BIODISTRIBUCIÓN

Para los ratones desnudos (20.5-26.6 g) normales y con tumores inducidos, se usó el siguiente procedimiento de acuerdo a los procedimientos estándar de alimentación PMI 5001 de las normas y regulaciones del INCMNSZ para los estudios del biodistribución. Se administraron 0.1 mL (2.59 MBq (70 μCi)) de ^{188}Re -lanreótido en la vena caudal.

La biodistribución fue obtenida sacrificando los ratones a los siguientes tiempos (n=3):

- 1.- 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4 y 24 h postinyección (atímicos normales);
- 2.- 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, y 24 h postinyección (Balb-C);
- 3.- 0.083, 0.25, 0.5, 1.5, 3, 4 y 24 postinyección (atímicos inducidos de cáncer con células HeLa);
- 4.- 0.08, 0.25, 0.5, 1.5, 3, 4, 24 y 68 h postinyección (inducidos de cáncer con células SK293) y
- 5.- 0.5, 1, 2, 4 y 24 h postinyección (neuroblastoma).

Se tomaron muestras de sangre, orina, corazón, pulmón, hígado, bazo, estómago, intestinos, riñón izquierdo, músculo y hueso, los cuales se pesaron y se colocaron en tubos de ensaye, se le midió la actividad en un detector de radiaciones tipo pozo (Camberra).

Los cpm se utilizaron para obtener el porcentaje de la dosis por gramo de tejido (% ID/g).

5.13. FARMACOCINÉTICA

Se utilizaron ratones Balb-C normales hembras (22.2-39.9 g) para los estudios radiofarmacocinéticos en animales. Los ratones (6 por cada tiempo) se les administró 1.118 MBq (30.22 μ Ci) del radiofármaco en la vena caudal. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción cardiaca y se colectaron en tubos heparinizados. Las muestras se obtuvieron periódicamente; 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 15, 18, 21.5, 24, 42, y 48 h después de la inyección del radiofármaco. Las muestras fueron centrifugadas y se separaron 3 alícuotas de 0.25 mL de plasma las cuales se diluyeron con 0.25 mL de agua, lo que representa 100% de la dosis inyectada. Todas las muestras se corrigieron considerando el decaimiento físico.

5.14. DOSIMETRÍA

De los datos obtenidos del %A/g en función del tiempo y con los valores de parámetros farmacocinéticos como Área bajo la curva (AUC), tiempo medio de residencia (MRT) se calculó la actividad acumulada (\tilde{A}) y la dosis absorbida (\bar{D}) en animales basándose en la metodología MIRDose. Se extrapoló a los humanos obteniéndose el porcentaje/órgano en base a la fórmula 11 descrita en la parte del marco teórico en el humano por la corrección simple del peso de cuerpo total. Todas las cuentas de la muestra se corrigieron por el fondo y el decaimiento físico.

Para los cálculos dosimétricos se utilizó el código de OLINDA/MXM diseñado para los modelos humanos específicos de los hombres, mujeres y niños de pesos diferentes. Los datos obtenidos en animales se extrapolan al modelo humano.

VI. RESULTADOS.

6.1. ESTUDIO DE BIODISTRIBUCIÓN DE ^{99m}Tc -ÁCIDO-D-GLUCÁRICO.

6.1.1. CONTROL DE CALIDAD.

En la tabla 4 se muestran los resultados de la pureza radioquímica de 6 formulaciones de ^{99m}Tc -ácido-D-glucárico utilizando la técnica de cromatografía en columna y la técnica de cromatografía en papel ITCL.

TABLA 4. Resultados de la pureza radioquímica del ^{99m}Tc -ácido-D-glucárico.

Cromatografía en columna. n=6			Cromatografía en papel. n=6		
Formulación	^{99m}Tc -ácido-D-glucárico	$^{99m}\text{TcO}_4^-$ *	Formulación	^{99m}Tc -ácido-D-glucárico	$^{99m}\text{TcO}_4^-$ *
1	99	3	1	97	3
2	99	3	2	97	3
3	99	3	3	97	3
4	99	2	4	98	2
5	99	3	5	97	3
6	98	2	6	98	2
Media	98.83	2.67	Media	97.33	2.67
D.E.	0.41	0.52	D.E.	0.52	0.52
% C.V.	0.41	19.36	% C.V.	0.53	19.36
Tiempo de retención (min)	3.19	5.04	Rf	0.0	1.0

*impurezas

6.2. PRUEBAS BIOLÓGICAS

6.2.1. Prueba de esterilidad.

En la tabla 5 se muestran los resultados de la prueba de esterilidad aplicada al radiofármaco ^{99m}Tc -ácido-D-glucárico. La prueba se realizó por triplicado.

TABLA 5. Resultados de la prueba de esterilidad del ^{99m}Tc -ácido-D-glucárico

Medio de cultivo	Tiempo transcurrido en incubación	
	Primera semana	Segunda semana
Medio líquido de tioglicolato	Sin crecimiento bacteriano	Sin crecimiento bacteriano
Medio de caldo digerido de caseína-soya	Sin crecimiento bacteriano	Sin crecimiento bacteriano

6.2.2. Prueba de pirógenos

En la tabla 6 Se presentan los resultados de pirógenos utilizando la técnica de LAL (lisado de amebocitos de limulus). Provenientes de formulaciones de ^{99m}Tc -ácido-D-glucárico.

TABLA 6. Resultados de la prueba de pirógenos del ^{99m}Tc -ácido-D-glucárico con el método del LAL.

Tipo de control o muestra	Observaciones
Control negativo	Solución transparente y líquida
Control positivo	Formación de un gel en el fondo del tubo
^{99m}Tc -ácido-D-glucárico	Negativo
Dilución 1:10 de ^{99m}Tc -ácido-D-glucárico	Negativo

6.3. VALIDACIÓN

6.3.1. Linealidad del sistema.

La figura 6 muestra la linealidad del sistema de los valores de respuesta en cuentas por minuto) en función de la concentración de ^{99m}Tc -ácido-D-glucárico en donde el intervalo de concentración del radiofármaco de 308 – 13,480 Bq (8.34 – 364.34 nCi/mL). Mientras que en la tabla 7 se muestran los parámetros de linealidad calculados.

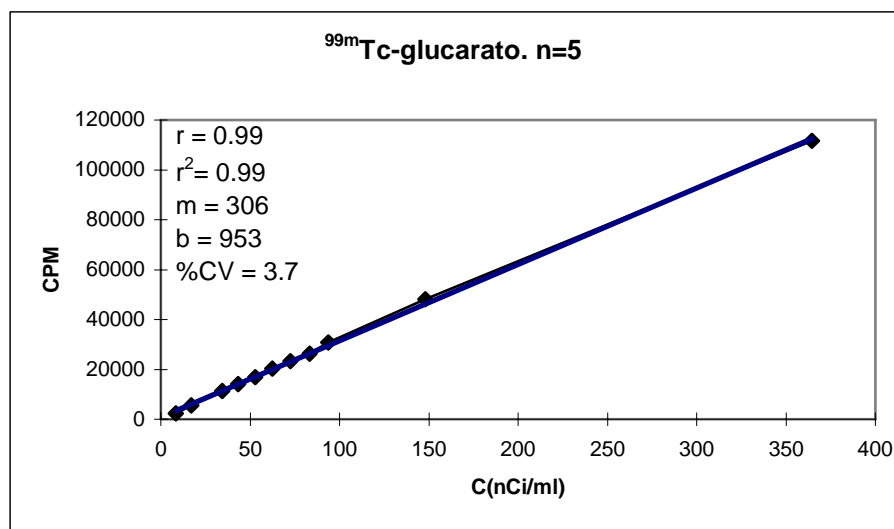


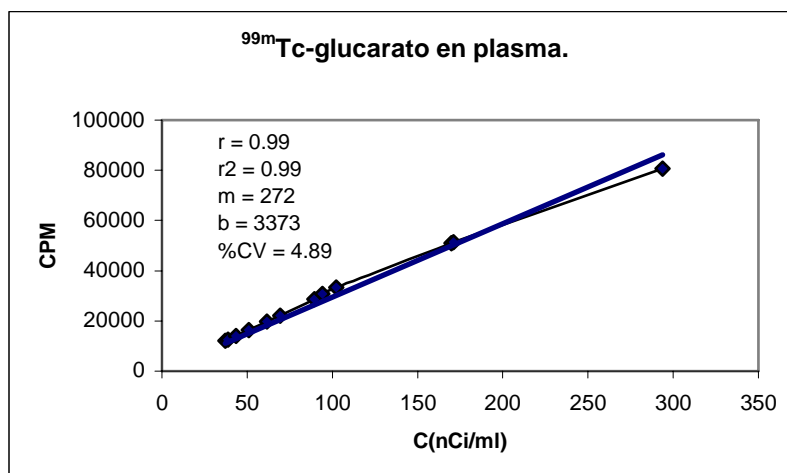
FIGURA 6. Linealidad del sistema.

TABLA 7. Parámetros de linealidad.

Intercepto	953
Pendiente	306
Coefficiente de correlación	0.99
Coefficiente de determinación	0.99
Error estándar de regresión	882
$t_{0,95}$ (teórica)	1.703
$t_{ordenada\ al\ origen}$	5.83
$F_{0,95}$	1.71E-82
$F_{calculada}$	59306
%CV	3.37

6.3.2. Linealidad del método.

En las figuras 7 y 8 se presentan los resultados de la linealidad del método en el intervalo de concentración de 1369 – 10,878 Bq (37 - 294 nCi/mL) para plasma y de 1591 – 10,693 Bq (43 - 289 nCi/mL) para orina. En la tabla 8 Se describen los parámetros de linealidad en ambos fluidos biológicos.

FIGURA 7. ^{99m}Tc-glucurato en plasma.

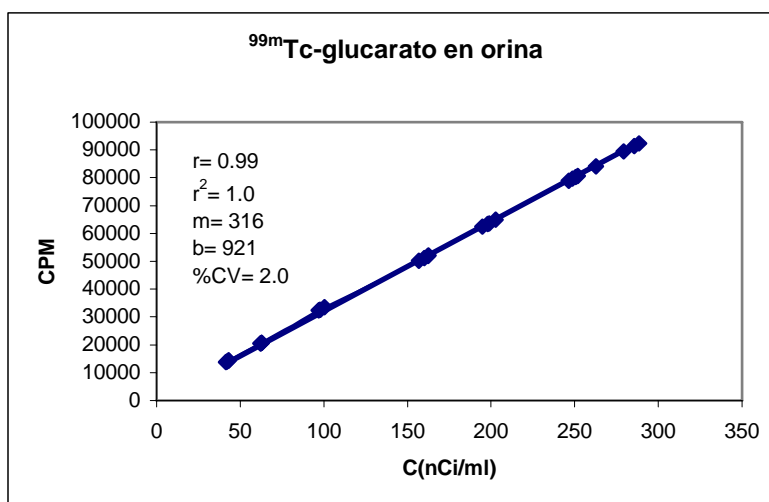


FIGURA 8. ^{99m}Tc -glucurato en orina.

TABLA 8. Parámetros de linealidad.

	Plasma	Orina
Intercepto	3372	921
Pendiente	272	316
Coefficiente de correlación	0.99	0.99
Coefficiente de determinación	0.99	1.0
Error estándar de regresión	2525	853
$t_{0.95}$ (teórica)	1.943	1.943
$t_{ordenada\ al\ origen}$	2.9E-4	2.85E-10
F	5.65E-25	6.32E-61
$F_{calculado}$	3249	1724
%CV	4.89	2

6.3.3. Precisión del método

Los resultados de precisión en muestras de plasma y orina se muestran en las TABLAS 9 y 10.

Tabla 9. Precisión del método.
Datos de actividad promedio en muestras plasmáticas. (n=4)

Concentración (kBq/ml)	Media \pm D.E.	% C.V.
2.573	22133 \pm 1573	7.1
3.478	30828 \pm 1375	4.46
6.329	51404 \pm 892	1.73
8.548	73689 \pm 1662	2.25
11.491	98519 \pm 1932	1.96
13.386	111948 \pm 3779	3.37

Tabla 10. Precisión del método.
Datos de actividad promedio en muestras de orina. (n=4)

Concentración (Bq/ml)	Media \pm D.E.	% C.V.
2.311	20586 \pm 134	0.65
3.631	32774 \pm 538	1.64
5.938	51376 \pm 853	1.66
7.346	63558 \pm 1016	1.60
9.229	79851 \pm 766	0.96
10.326	89338 \pm 3697	4.14

6.3.4. Repetibilidad del método

En la TABLA 11. se presentan los resultados del coeficiente de variación obtenidos en los tres casos. Para verificar la repetibilidad del método entre días, se realizó un análisis de varianza, utilizando como variables de respuesta las cpm.

TABLA 11. Repetibilidad del método. n=3

PLASMA								
1			2			3		
C(kBq/ml)	Media \pm D.E.	% CV	C(kBq/ml)	Media \pm D.E.	% CV	C(kBq/ml)	Media \pm D.E.	% CV
1.381	12030 \pm 1308	10.8	1.611	14006 \pm 303	2.16	1.437	12551 \pm 325	2.59
1.881	16296 \pm 2097	12.8	2.279	19767 \pm 523	2.64	2.573	22132 \pm 1573	7.10
3.315	28670 \pm 701	2.44	3.785	33278 \pm 473	1.42	3.478	30828 \pm 1375	4.46
5.541	45010 \pm 1386	3.1	6.281	51017 \pm 358	0.70	6.329	51404 \pm 892	1.74
6.348	55815 \pm 1289	2.3	7.657	63422 \pm 1209	1.91	8.548	73688 \pm 1662	2.25
8.249	70138 \pm 315	0.45	9.529	80582 \pm 608	0.75	11.491	98519 \pm 1932	1.96
10.488	89607 \pm 776	0.87	10.500	88705 \pm 1984	2.24	13.387	111947 \pm 3779	3.37
$t_{\text{experimental}}$	2.93		$t_{\text{experimental}}$	8.35		$t_{\text{experimental}}$	-0.081	
$t_{(0.95, 27, \text{gl})}$	1.943		$t_{(0.95, 27, \text{gl})}$	1.943		$t_{(0.95, 27, \text{gl})}$	1.943	
L C 95%	206 - 222		L C 95%	4916 - 8127		L C 95%	-3476 -3212	
ORINA								
1			2			3		
C(kBq/ml)	Media \pm D.E.	% CV	C(kBq/ml)	Media \pm D.E.	% CV	C(kBq/ml)	Media \pm D.E.	% CV
1.248	10900 \pm 174	1.60	1.571	14064 \pm 295	2.10	1.988	17079 \pm 1444	8.45
1.870	16236 \pm 519	3.20	2.311	20586 \pm 134	0.65	2.794	24092 \pm 258	1.07
3.111	26447 \pm 325	1.23	3.631	32774 \pm 538	1.64	4.514	39687 \pm 725	1.83
5.190	42230 \pm 503	1.19	5.938	51376 \pm 853	1.66	7.585	61754 \pm 1049	1.70
6.473	52573 \pm 246	0.47	7.346	63558 \pm 1016	1.60	9.173	74504 \pm 2662	3.57
8.090	65707 \pm 250	0.38	9.229	79851 \pm 766	0.96	11.637	94523 \pm 1462	1.55
9.065	73630 \pm 704	0.96	10.356	89338 \pm 3697	4.14	13.215	107339 \pm 1385	1.29
$t_{\text{experimental}}$	8.26		$t_{\text{experimental}}$	-0.082		$t_{\text{experimental}}$	9.61	
$t_{(0.95, 27, \text{gl})}$	1.943		$t_{(0.95, 27, \text{gl})}$	1.943		$t_{(0.95, 27, \text{gl})}$	1.943	
L C 95%	3594 - 5976		L C 95%	-3475 - 3208		L C 95%	6350 - 9805	

6.3.5. Exactitud del método

En las TABLAS 12 y 13 se presentan los resultados obtenidos al analizar por triplicado las 6 concentraciones en tres días diferentes.

TABLA 12. Exactitud del método.
Datos obtenidos en muestras de plasma. n=4.

Plasma								
1			2			3		
C_{exp.} (kBq)	C_{est.} (kBq)	% Recuperado	C_{exp.} (kBq)	C_{est.} (kBq)	% Recuperado	C_{exp.} (kBq)	C_{est.} (kBq)	% Recuperado
2.409	1.881	78.08	2.299	2.28	99.15	2.27	2.57	113.61
4.819	3.315	68.80	4.598	3.79	82.31	4.53	3.48	76.79
7.228	5.539	76.64	6.897	6.28	91.07	6.80	6.33	93.13
9.637	6.348	65.87	9.196	7.66	83.27	9.06	8.55	94.35
12.046	8.249	68.48	11.5	10.87	94.57	11.33	11.49	101.46
14.455	10.488	72.55	13.8	12.73	92.30	13.59	13.39	98.50
Media		71.74	Media		90.44	Media		96.31
Desviación estándar		4.87	Desviación estándar		6.54	Desviación estándar		12.05
t_{experimental}		15.56	t_{experimental}		13.59	t_{experimental}		7.89
t_(0.95 5 gl)		2.015	t_(0.95 5 gl)		2.015	t_(0.95 5 gl)		2.015
LC 95%		60.43 - 127	LC 95%		71.53 - 108.25	LC 95%		61.52 - 88.24
% CV		6.79	%CV		7.24	% CV		12.51

TABLA 13. Exactitud del método.
Datos obtenidos en muestras de orina. n=4.

Orina								
1			2			3		
C_{exp.} (kBq)	C_{est.} (kBq)	% Recuperado	C_{exp.} (kBq)	C_{est.} (kBq)	% Recuperado	C_{exp.} (kBq)	C_{est.} (kBq)	% Recuperado
3.329	3.067	92.13	4.073	3.718	93.85	4.598	4.395	95.59
5.318	5.114	96.16	5.942	5.806	97.71	7.637	7.432	97.31
6.648	6.509	97.91	7.923	7.495	94.61	9.196	8.782	95.49
8.416	8.048	95.62	9.163	9.118	99.51	11.496	11.393	99.11
9.411	8.979	95.40	9.911	9.722	98.01	13.794	13.002	94.25
Media		95.46	Media		96.74	Media		96.35
Desviación estándar		2.06	Desviación estándar		2.40	Desviación estándar		1.89
t_{experimental}		53.47	t_{experimental}		40.86	t_{experimental}		40.38
t_(0.95 5 gl)		2.015	t_(0.95 5 gl)		2.015	t_(0.95 5 gl)		2.015
LC 95%		87.38 - 96.95	LC 95%		88.55 - 101.46	LC 95%		87.11 - 99.96
% CV		2.16	%CV		2.48	% CV		1.96

La TABLA 14 muestra un resumen de los resultados de precisión y exactitud del método radioquímico utilizado en muestras biológicas de plasma y orina de rata wistar.

TABLA 14. Precisión y exactitud del método radioquímico utilizado para el análisis de muestras de plasma y de orina.

Concentración (KBq/mL)	Exactitud de la respuesta ^{99m}Tc -glucarato (%)	C.V. ^{99m}Tc -glucarato (%)
<i>Plasma</i>		
Intra-día ($n=4$)		
1.43	99.54	2.15
2.48	99.74	2.43
3.48	100.00	2.79
6.33	100.00	1.73
8.55	100.00	1.95
11.49	100.00	2.15
13.39	100.00	1.70
Inter-día ($n=6$) in 3 días		
1.27	99.13	0.56
2.27	99.39	0.20
3.34	99.32	0.36
6.51	98.27	0.80
8.27	99.78	0.10
10.54	99.89	0.10
13.50	99.80	0.16
<i>Orina</i>		
Intra-día ($n=3$)		
1.25	99.40	0.76
1.87	98.84	2.00
3.11	99.52	0.76
5.19	99.80	0.35
6.47	99.80	0.29
8.09	99.87	0.25
9.06	99.67	0.66
Inter-días ($n=6$) in 3 días		
1.71	98.91	0.40
2.55	98.91	0.82
3.91	99.06	0.50
6.61	99.18	0.37
8.38	99.10	0.25
9.99	99.24	0.54
12.44	99.22	0.33

6.3.6. Especificidad y estabilidad del ^{99m}Tc -glucarato.

Se realizó una cromatografía en columna de Sephadex para determinar la especificidad del ^{99m}Tc -glucarato en plasma y en orina. Los cromatogramas obtenidos se muestran en la figura 9.

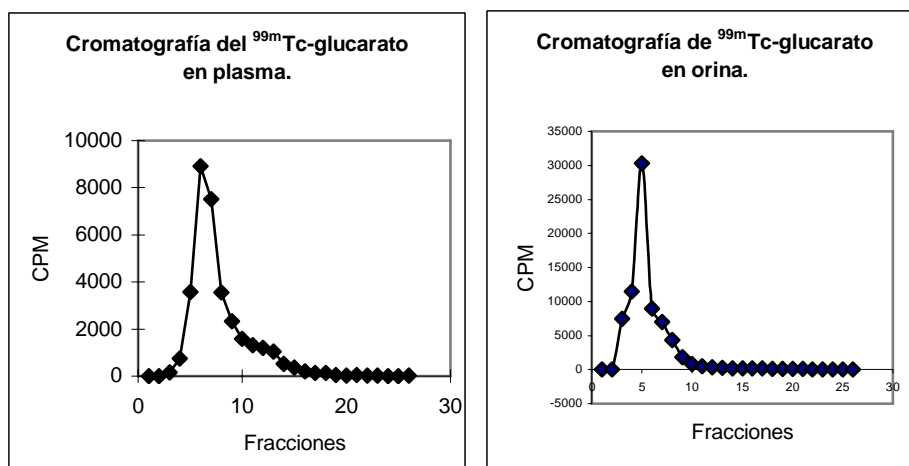


FIGURA 9. Especificidad del ^{99m}Tc-glucurato.

La TABLA 15 muestra la estabilidad del ^{99m}Tc-glucurato a una concentración de 4.677 kBq/mL (126.4 nCi/mL).

TABLA 15. Estabilidad del ^{99m}Tc-glucurato.

Tiempo (h)	^{99m} Tc-glucurato	^{99m} Tc libre
0	98.5	1.5
1	95	5
2.86	95	5
20.88	81	19

Media = 92.37

D.E. = 7.76

% C.V. = 8.4

6.3.7. Sensibilidad del método

6.7.1. Concentración mínima cuantificable.

La concentración mínima cuantificable fue de 2.266 kBq/mL

6.7.2. Concentración mínima detectable.

La concentración mínima detectable fue de 0.304 kBq/mL.

6.4. ESTUDIO DE BIODISTRIBUCIÓN.

Los resultados del estudio de biodistribución en ratas se muestran en la tabla 16. Los valores reportados representan la media aritmética del %A/g del ^{99m}Tc -glucarato para 3 ratas a cada tiempo postinyección.

TABLA 16. Resultados de biodistribución del ^{99m}Tc -glucarato en ratas, n=3.

Porcentaje de la dosis administrada en diferentes órganos y sangre (%A/g).									
Tiempo Postinyección (min.)	SANGRE	CORAZÓN	RIÑONES	ESTÓMAGO	INTESTINO	HÍGADO	BAZO	PULMONES	MÚSCULO
0.08	2.298 ± 0.011	0.779 ± 0.103	4.165 ± 0.001	0.352 ± 0.049	0.747 ± 0.063	0.961 ± 0.022	0.444 ± 0.030	1.096 ± 0.004	0.262 ± 0.006
0.25		0.110 ± 0.005	0.700 ± 0.012	0.080 ± 0.026	0.146 ± 0.026	0.097 ± 0.010	0.064 ± 0.013	0.150 ± 0.010	0.037 ± 0.012
0.5	1.136 ± 0.205	0.546 ± 0.011	10.391 ± 0.370	0.552 ± 0.022	0.560 ± 0.026	0.758 ± 0.001	0.425 ± 0.034	1.467 ± 0.003	0.451 ± 0.007
1	0.604 ± 0.466	0.185 ± 0.118	5.524 ± 4.005	0.274 ± 0.218	0.472 ± 0.322	0.237 ± 0.181	0.139 ± 0.113	0.371 ± 0.198	0.108 ± 0.061
2	0.554 ± 0.047	0.144 ± 0.053	16.125 ± 4.425	0.246 ± 0.058	0.154 ± 0.016	0.305 ± 0.004	0.238 ± 0.032	0.368 ± 0.019	0.070 ± 0.009
26	0.169 ± 0.007	0.088 ± 0.008	14.004 ± 1.211	0.046 ± 0.017	0.032 ± 0.003	0.343 ± 0.031	0.358 ± 0.009	0.140 ± 0.006	0.017 ± 0.003

6.5. FARMACOCINÉTICA.

En la tabla 17 presentan los parámetros farmacocinéticos empleando el programa *Winnonlin*.

TABLA 17. Parámetros farmacocinéticos promedio del ^{99m}Tc -glucarato en plasma de ratas, determinados por el programa de estimación no lineal *Winnonln* para el modelo abierto de dos compartimientos (MADC), bolo I.V.

PARÁMETRO	ESTIMADO	% CV
A ($\mu\text{Ci}/\text{min} \cdot \text{mL}$)	* 3.62 ± 0.50	13.81
B ($\mu\text{Ci}/\text{min} \cdot \text{mL}$)	** 0.92 ± 0.20	21.73
Cp^0 ($\mu\text{Ci}/\text{min} \cdot \text{mL}$)	*** 4.60 ± 0.57	12.50
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0.74 ± 0.19	26.16
$t_{1/2\beta}$ (h)	18.98 ± 4.46	23.51
t_{k10} (h)	4.94 ± 0.84	16.95
k_{10} (1/h)	0.14 ± 0.02	16.97
k_{12} (1/h)	0.59 ± 0.17	28.54
k_{21} (1/h)	0.24 ± 0.08	33.10
Vd (mL)	21.74 ± 2.71	12.49
Vdss (mL)	74.36 ± 12.67	17.04
Cl (mL/h)	3.05 ± 0.35	11.39
AUC ($\mu\text{Ci} \cdot \text{h}/\text{min} \cdot \text{mL}$)	**** 32.75 ± 3.73	11.39
AUMC ($\mu\text{Ci}^2 \cdot \text{h}/\text{min}^2 \cdot \text{mL}^2$)	***** 797.75 ± 251.26	31.50
MRT (h)	24.35 ± 5.51	22.64

* 0.14 kBq/min*ml, ** 34.04 kBq/min*ml, *** 0.17 kBq/ml, **** 1.21 kBq*h/min*ml

***** 29.51 kBq²*h/min²*ml².

En la figura 10 se muestra el perfil farmacocinético del ^{99m}Tc -glucarato en plasma de ratas (1.67 kBq/Kg) después de la administración por bolo I.V.

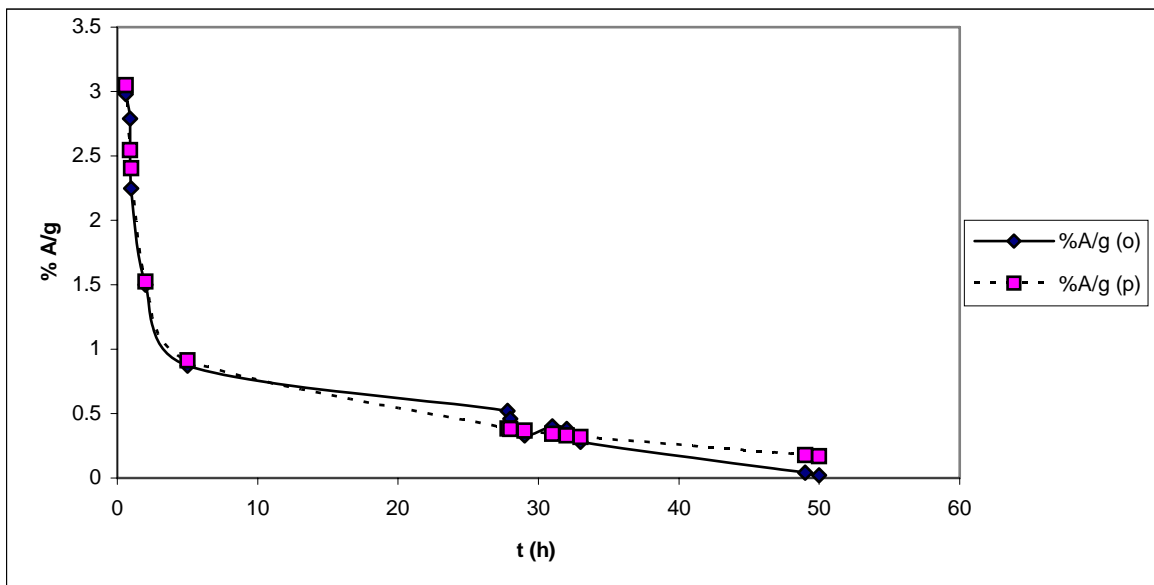


FIGURA 10. Perfil farmacocinético del ^{99m}Tc -glucurato (1.67 kBq/Kg) en ratas siguiendo una administración por bolo I.V. donde (o) = observado y (p) = predicho.

ESTUDIO DEL ^{188}Re -(3-(2-naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida) cíclico (2 → 7) (9CI).

6.6. CONTROL DE CALIDAD

6.6.1. Identificación del péptido 3-(2-naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida) cíclico (2 → 7) (9CI).

En la figura 11 se muestra el perfil cromatográfico del β -(2(naftil)-D-Ala-Cis-Tir-D-Trp-lis-Val-Cis-Thr)-amida obtenido por la técnica de cromatografía de exclusión molecular durante el proceso de purificación del mismo. Los tiempos de retención obtenidos fueron: $T_R = 8.082$ minutos para el 2-mercaptoetanol y $T_R = 20.598$ minutos para el péptido. Se utilizó un detector de arreglo de fotodiodos HPLC para obtener el espectro UV.

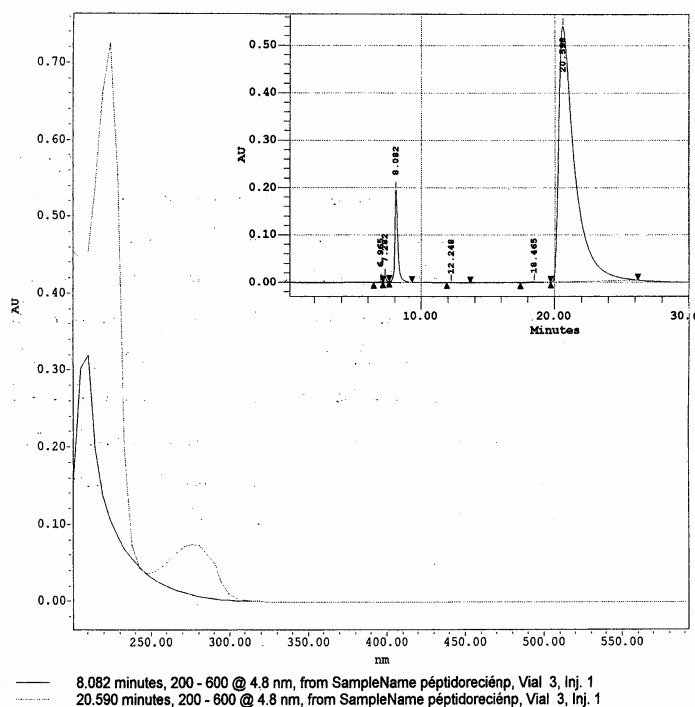


FIGURA 11. Purificación del péptido y del 2-mercaptoetanol por exclusión molecular.

Espectro UV obtenido por un detector de arreglo de fotodiodos. (L. Meléndez and et al., 1999).

6.6.2. Identificación del complejo ^{188}Re -3-(2-naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida) cíclico (2 → 7) disulfuro (9Cl).

En las figuras 12 y 13 se muestran los perfiles cromatográficos del 3-(2-naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida) cíclico (2 → 7) disulfuro (9Cl) utilizando las técnicas de cromatografía por exclusión molecular y fase reversa y un detector de arreglo de fotodiodos HPLC UV.

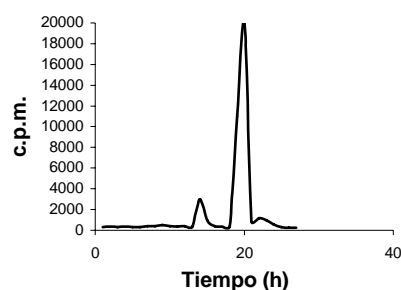


FIGURA 12. Radiocromatograma del complejo ^{188}Re -lanreótido obtenido por la técnica cromatográfica de exclusión molecular, HPLC.

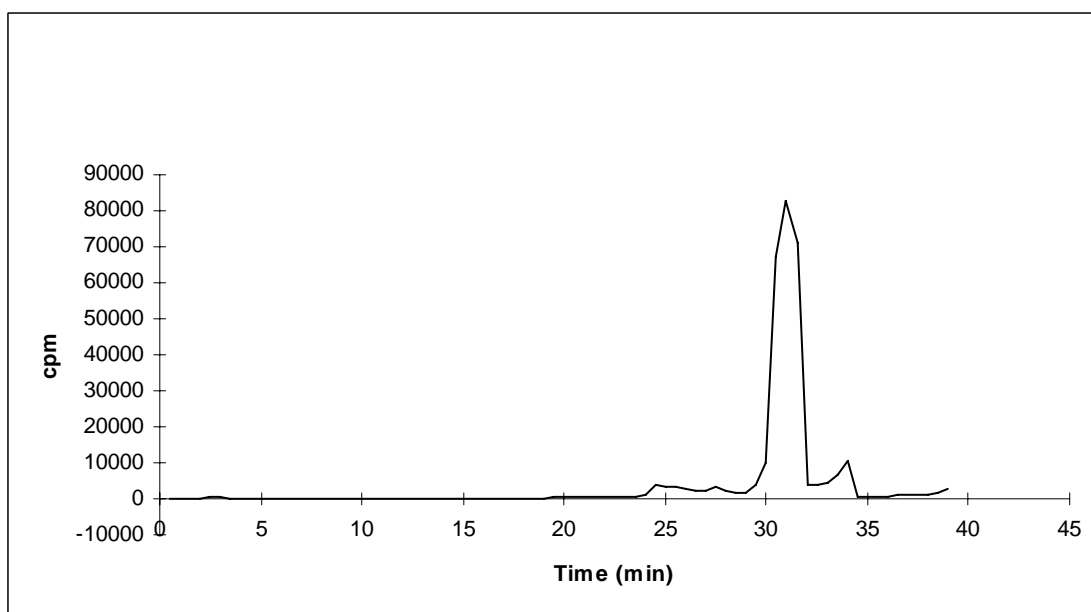


FIGURA 13. Radiocromatograma del complejo ^{188}Re -lanreótido obtenido por la técnica cromatográfica de fase reversa, HPLC.

TABLA 20. Resultados de la prueba de esterilidad del ^{188}Re -lanreótido.

Medio de cultivo	Tiempo transcurrido en incubación	
	Primera semana	Segunda semana
Medio líquido de tioglicolato	Sin crecimiento bacteriano	Sin crecimiento bacteriano
Medio de caldo digerido de caseína-soya	Sin crecimiento bacteriano	Sin crecimiento bacteriano

6.6.4.2. Prueba de pirógenos

Los resultados se muestran en la tabla 21.

TABLA 21. Resultados de la prueba de pirógenos del ^{188}Re -lanreótido con el método de LAL.

Tipo de control o muestra	Observaciones
Control negativo	Solución transparente y líquida
Control positivo	Formación de un gel en el fondo del tubo
^{188}Re -lanreótido	Negativo
Dilución 1:10 de ^{188}Re -lanreótido	Negativo

6.7. DESARROLLO DEL TUMOR EN RATONES ATÍMICOS.

En la figura 14 se muestra una fotografía de un ratón atímico que desarrolló tumor en el lomo al inyectarle células cancerígenas.

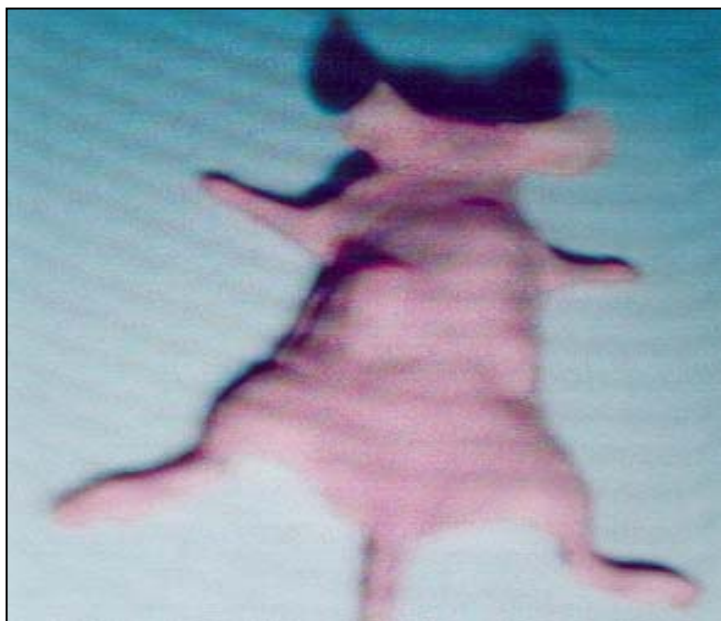


FIGURA 14. Ratón atímico con tumor desarrollado en el dorso del mismo (células HeLa).

En la figura 15 se muestra el comportamiento que se observó durante los días posteriores a la administración de las células cancerígenas en ratones atímicos.

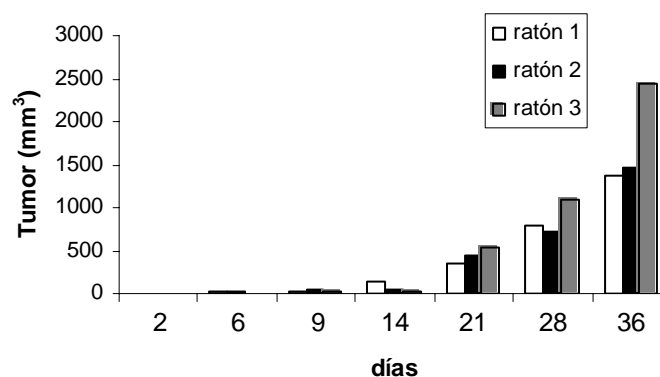


FIGURA 15. Crecimiento del tumor en 3 ratones atímicos.

6.8. BIODISTRIBUCIÓN

En la tabla 22 se muestran los resultados de la biodistribución del ^{188}Re -lanreótido en ratones atímicos normales.

TABLA 22. Resultados de biodistribución del ^{188}Re -lanreótido en ratones atímicos,

Porcentaje de la dosis administrada en diferentes órganos, sangre y orina.							
ÓRGANO	Tiempo postinyección (h)						
	0.08	0.25	0.5	1.5	3	4	24
SANGRE	1.870 ± 0	1.477 ± 0.428	0.588 ± 0.320	0.330 ± 0.036	0.210 ± 0.047	0.0194 ± 0	0.045 ± 0.018
CORAZÓN	0.6 ± 0.035	0.18 ± 0.025	0.13 ± 0.112	0.12 ± 0.012	0.17 ± 0.016	0.25 ± 0.041	0.031 ± 0
PULMÓN	1.62 ± 0.184	0.45 ± 0.042	0.43 ± 0.163	0.23 ± 0.022	0.10 ± 0.054	0.20 ± 0.153	0.07 ± 0.028
HÍGADO	0.84 ± 0.198	0.98 ± 0.11	0.72 ± 0.107	0.56 ± 0.10	0.18 ± 0.102	0.53 ± 0.21	0.16 ± 0.048
BILIS	6.06 ± 0	3.6 ± 1.105				2.35 ± 0	1.75 ± 0.307
BAZO	0.55 ± 0.10	0.16 ± 0.018	0.12 ± 0.016	0.08 ± 0.023	0.05 ± 0.032	0.12 ± 0.001	0.06 ± 0.045
RINÓN	1.85 ± 0.60	0.79 ± 0.032	1.26 ± 0.247	1.01 ± 0.075	0.43 ± 0.12	0.24 ± 0	0.72 ± 0.16
ESTÓMAGO		0.60 ± 0.38	0.95 ± 0.06	0.97 ± 0.093			0.13 ± 0.024
I. DELGADO	1.07 ± 0.078	0.30 ± 0.065	0.23 ± 0.085	0.37 ± 0.069			
I. GRUESO	1.06 ± 0.39	0.22 ± 0.042	0.33 ± 0.014				0.13 ± 0.052
MÚSCULO	0.4 ± 0.085	0.34 ± 0.008	0.20 ± 0.021	0.71 ± 0.223	0.17 ± 0.050	0.26 ± 0.096	0.12 ± 0.021
HUESO	0.29 ± 0.064	1.01 ± 0	0.14 ± 0.014	0.34 ± 0.2	0.05 ± 0.019	0.39 ± 0.23	0.03 ± 0

En la figura 16 se presenta la biodistribución del ^{188}Re -lanreótido en ratones atímicos normales.

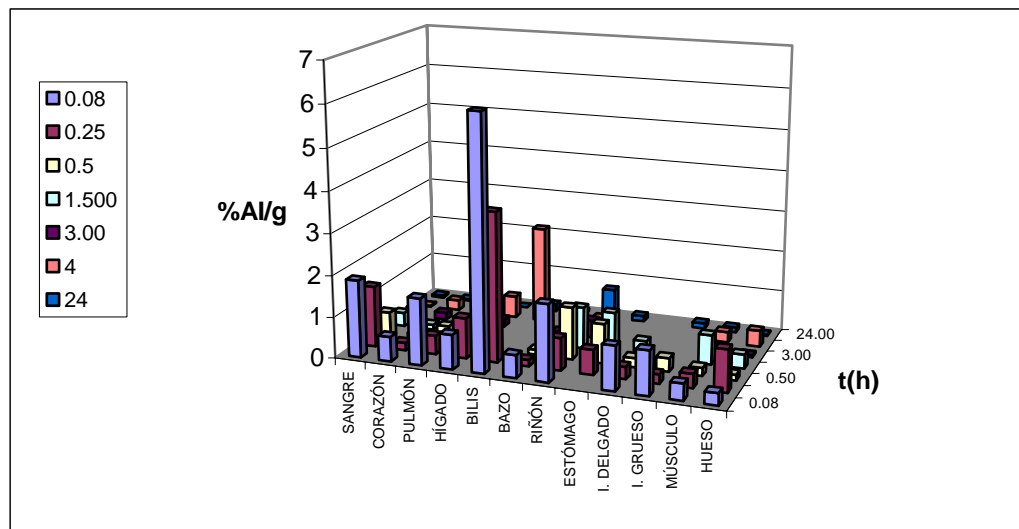


FIGURA 16. Perfil de distribución del ^{188}Re -lanreótido en muestras de sangre de ratones atímicos normales.

En la tabla 23 se muestran los resultados de la biodistribución del ^{188}Re -lanreótido en ratones Balb-C normales.

TABLA 23. Resultados de biodistribución del ^{188}Re -lanreótido en ratones Balb-C.

Porcentaje de la dosis administrada en diferentes órganos, sangre y orina							
ÓRGANO	Tiempo postinyección						
	0.083 h	0.25 h	0.5 h	1 h	2 h	3 h	24 h
SANGRE	4±1.1	2.4±1.3	2.1±1.6	0.8±0.2	0.3±0.2	0.5±0.2	1.2±0.3
CORAZÓN	1.9±0.4	1.2±0.7	0.8±0.4	0.4±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1	0.6±0.2
PULMÓN	3.5±1.9	2.7±1.3	2.8±2.3	1.2±0.4	0.4±0.2	0.5±0.1	1.9±0.8
HÍGADO	20.5±11.3	12.9±9.5	14±7.9	6±1.9	1.8±1.1	1.7±0.4	3.2±1
VESÍCULA BILIAR	48.3±18.6	73.1±4.3	73.5	69.8±14.1	91.1±5.6	90.9±2.1	17±1
BAZO	7.8±12.2	1.4±0.7	1.5±0.8	0.6±0.1	0.3±0.2	0.4±0.1	1.7±0.7
RIÑONES	3.3±0.7	2.9±1.9	2.8±1.6	1.8±0.5	0.9±0.5	1.5±0.3	6.1±1.5
ESTÓMAGO	1.7±0.4	2.7±2.2	5.2±3.4	1.8±1.4	0.5±0.1	0.8±0.2	1.6±0.5
INTESTINO DELGADO	5.4±6.5	3.4±2.7	42.3±23.3	11.9±4	2.3±1.6	1.8±0.4	1.7±0.4
INTESTINO GRUESO	1.4±0.4	3.8±3.8	1.9±1.1	1.4±0.7	0.9±0.9	0.8±0.3	1.7±0.7
HECES	0.5±0.4	0.8±0.6	0.5±0.3	0.4±0.4	0.7±0.8	0.9±0.6	67.3±12
MÚSCULO	0.2±0.3	0.3±0.3	0.2±0.2	0	0.1±0.1	0.1±0.1	0.5±0.3
HUESO	0.5±0.3	0.6±0.8	0.6±0.7	0.8	0.2±0.1	0.2±0.2	0.7±0.6
VEJIGA	1.1±1.3	2.3±2.1	2±0.1	3.6±4.8	0.5±0.1	0.5±0.3	1.4±0.2

En la siguiente figura se muestra la biodistribución del ^{188}Re -lanreótido en tres ratones sanos Balb-C en 24 horas.

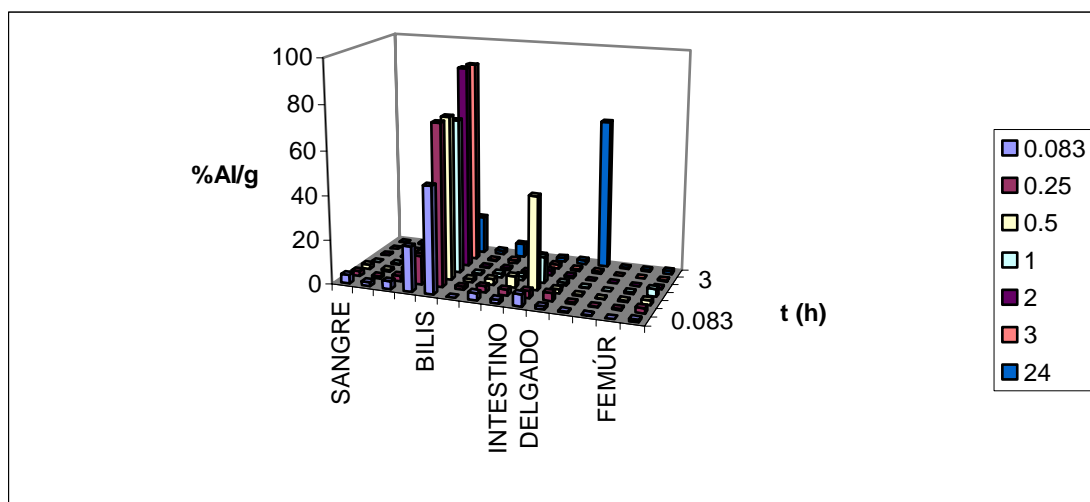


FIGURA 17. Perfil de distribución del ^{188}Re -lanreótido en muestras de sangre de ratones Balb-C normales.

En las tablas 24, 25, y 26 se muestran los valores de %AI/g del ^{188}Re -lanreótido en ratones atómicos inducidos de cáncer con células HeLa, SK 293 y de neuroblastoma.

TABLA 24. Resultados de biodistribución del ^{188}Re -lanreótido en ratones atómicos inducidos con células HeLa.

Porcentaje de la dosis administrada en diferentes órganos y sangre							
ORGANO	Tiempo postinyección (h)						
	0.08	0.25	0.5	1.5	3	4	24
SANGRE		2.3 + 0.28	1.9 + 0.14	1.55 + 0.07	1.23 ± 0.14	1.25 ± 0.49	0.93 ± 0.21
CORAZÓN		0.8 + 0.07	1 ± 0.14	0.85 ± 0.07	0.45 ± 0.07	0.65 ± 0.07	0.6 ± 0.14
PULMÓN			1.4 + 0.10	1.15 ± 0.07	0.85 ± 0.07	1.05 ± 0.35	1.25 ± 0.07
HÍGADO	1.5 + 0.28		2.2 + 0.99		1.3 ± 0	1.6 ± 0.57	1.1 ± 0
BAZO	1.6 + 0.57	0.3 + 0	0.5 + 0	0.5 + 0.07	0.53 ± 0.35	0.55 ± 0.49	0.4 ± 0.14
RIÑÓN		2.85 + 0.35	2.6 + 0.50	1.65 ± 0.78	2.9 ± 0.99	4.45 ± 1.20	3.75 ± 0.21
ESTÓMAGO	3.45 + 0.35	1.55 + 0.21	1.85 + 0.07	2.3 ± 0.07		2.25 ± 0.21	
I. DELGADO	4.45 + 0.35	1.55 + 0.21	0.8 + 0.14	2.25 ± 0.07	0.4 ± 0.14	2.9 ± 0.99	
I. GRUESO		1.6 + 0.57	1.3 + 0.14	1.15 ± 0.07	0.65 ± 0.21	1 ± 0	
MÚSCULO	1.45 + 0.49	0.9 + 0.06	0.75 + 0.21	1.25 ± 0.49	1.55 ± 0.21	1.45 ± 0.21	0.65 ± 0.07
HUESO	1.3 + 0.14	2.95 + 0.35	0.95 + 0.07	2.15 ± 0.07	1.35 ± 0.07	0.9 ± 0.14	1.65 ± 0.07
TUMOR LOMO		1.1 + 0.57	2.05 + 0.07	3.1 ± 0.57	2.15 ± 0.07	2.6 ± 0.28	2.26 ± 0.33

En la siguiente figura se muestra la biodistribución del ^{188}Re -lanreótido en ratones atómicos inducidos de cáncer cervico uterino utilizando células HeLa.

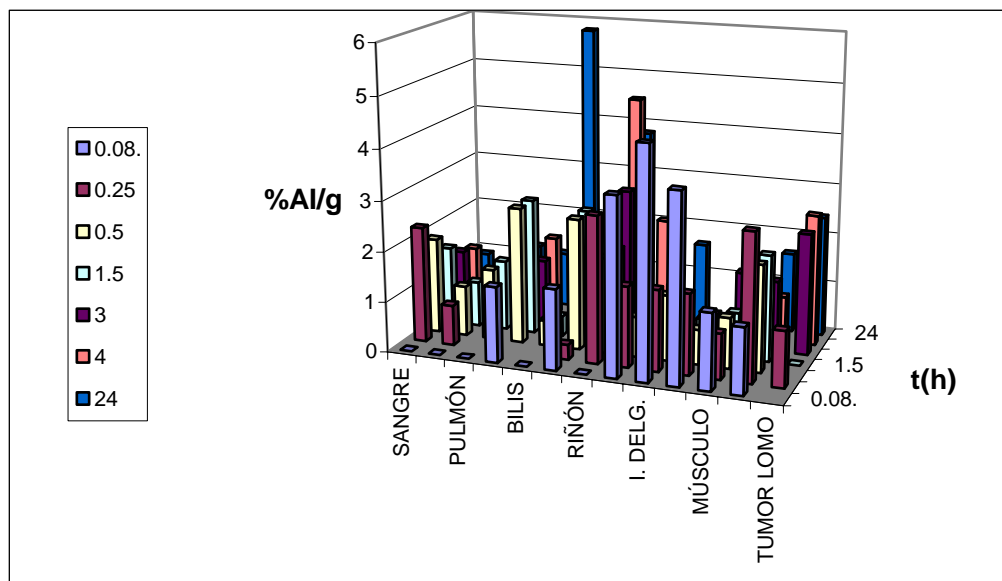


FIGURA 18. Perfil de distribución del ^{188}Re -lanreótido en muestras de sangre de ratones atómicos inducidos de cáncer cervico uterino con células HeLa.

En la siguiente figura se muestra el comportamiento de la relación de concentración tumor/sangre del radiofármaco ^{188}Re -lanreótido en ratones atómicos con cáncer cervico-uterino.

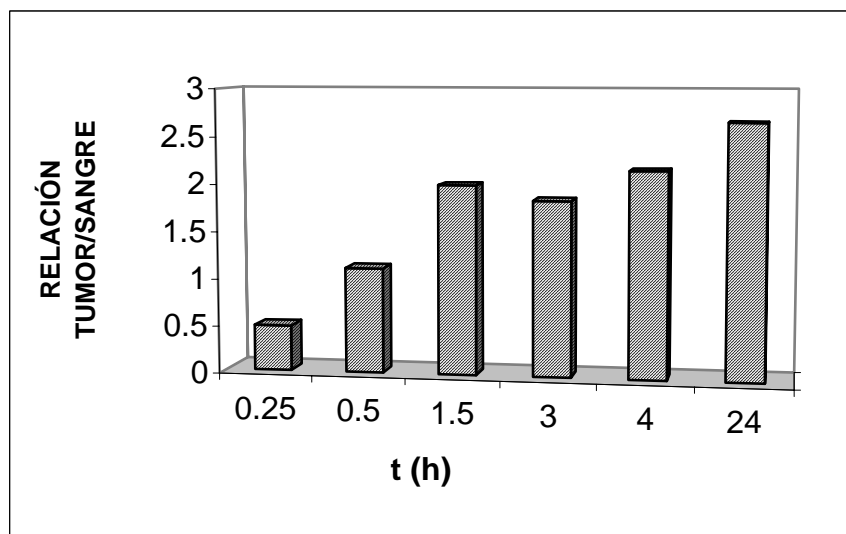


FIGURA 19. Relación de concentración de tumor/sangre del complejo ^{188}Re -lanreótido en ratones atómicos (n = 3).

TABLA 25. Resultados de biodistribución del ^{188}Re -lanreótido en ratones atímicos inducidos de cáncer renal con células SK 293.

Porcentaje de la dosis administrada en %AI/g en diferentes órganos y sangre								
ÓRGANO	Tiempo postinyección (h)							
	0.08	0.25	0.5	1.5	3	4	24	68
SANGRE	-	1.13 ± 0.31	1.29 ± 0.43	0.6 ± 0.11	-	0.44 ± 0.10	0.22 ± 0.05	0.02 ± 0.005
CORAZÓN	0.56 ± 0.20	0.32 ± 0.11				0.26 ± 0.04	0.20 ± 0.12	
PULMÓN	0.235 ± 0.06	0.61 ± 0.14				2.36 ± 0.05	0.25 ± 0.19	0.21 ± 0.02
HÍGADO	0.34 ± 0.14	0.92 ± 0.2		1.4 ± 0.35	2.08 ± 0.05		0.48 ± 0.07	0.27 ± 0.03
BAZO	-	0.15 ± 0.01	0.25 ± 0.06		1.07 ± 0.06	0.25 ± 0.05	0.18 ± 0.01	0.16 ± 0.01
ESTÓMAGO	-	0.57 ± 0.06	0.54 ± 0.05		4.81 ± 0.01	0.76 ± 0.05	0.32 ± 0.05	0.03 ± 0.002
INT.DELG	-	0.21 ± 0.06	0.37 ± 0.04			0.56 ± 0.05		
INT.GRUESO	-	0.20 ± 0.07				0.44 ± 0.04	0.29 ± 0.02	0.11 ± 0.01
RIÑÓN	0.73 ± 0.08	1.62 ± 0.48		3.57 ± 0.32	3.52 ± 1.58	2.20 ± 0.06	1.86 ± 0.03	3.02 ± 0.06
TUMOR	-	0.46 ± 0.15				0.18 ± 0.04		
HUESO	0.45 ± 0.16		0.65 ± 0.10			0.73 ± 0.18	0.84 ± 0.18	
MÚSCULO	-	0.27 ± 0.03	0.51 ± 0.06		0.68 ± 0.09	0.14 ± 0.07	0.15 ± 0.03	-

En la siguiente figura se muestra la biodistribución del ^{188}Re -lanreótido en ratones atímicos inducidos de cáncer renal utilizando células SK 293.

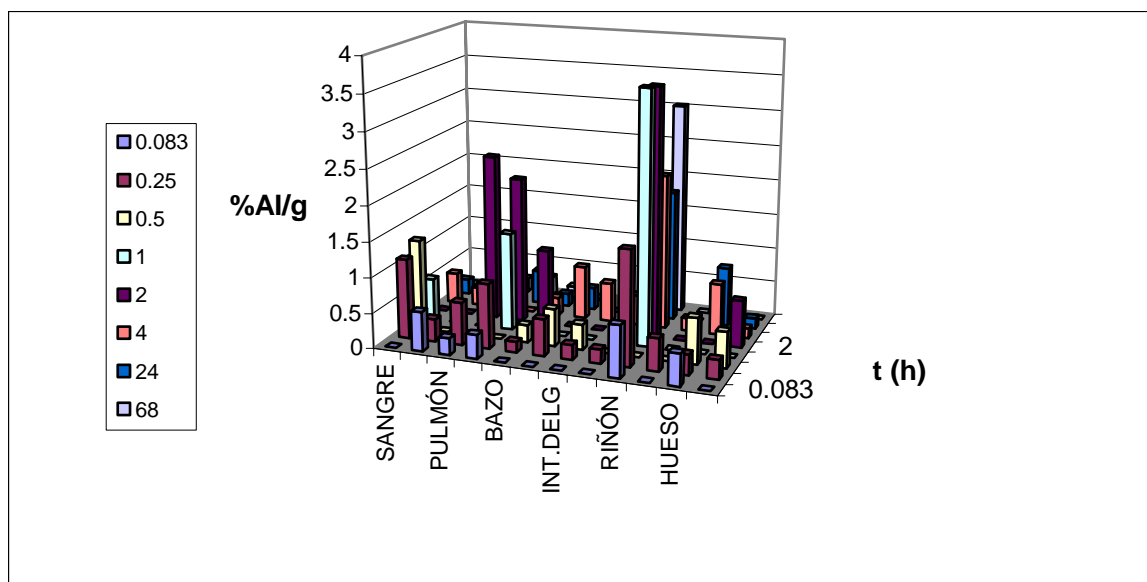


FIGURA 20. Perfil de distribución del ^{188}Re -lanreótido en muestras de sangre de ratones atímicos inducidos de cáncer renal con células SK 293.

En la figura 21 se muestra el comportamiento del radiofármaco ^{188}Re -lanreótido en los ratones atómicos inducidos de cáncer renal (células SK 293).

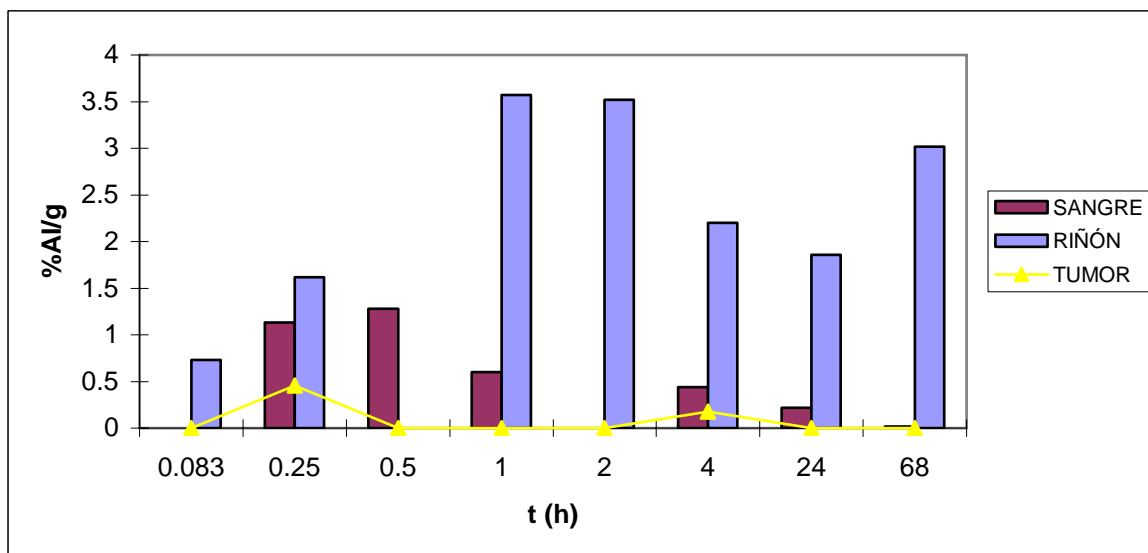


FIGURA 21. Perfil de distribución del ^{188}Re -lanreótido en muestras de sangre, riñón y tumor de ratones atómicos inducidos de cáncer renal con células SK 293.

TABLA 26. Resultados de biodistribución del ^{188}Re -lanreótido en ratones atómicos inducidos de neuroblastoma.

Porcentaje de la dosis administrada en %AI/g en diferentes órganos y sangre					
ÓRGANO	Tiempo postinyección (h)				
	0.5	1	2	4	24
SANGRE	0.47 ± 0.14		0.34 ± 0.10	0.46 ± 0.05	0.16 ± 0.03
CORAZÓN	0.22 ± 0.04		0.12 ± 0.03		
PULMÓN	0.49 ± 0.15	0.66 ± 0.22	0.35 ± 0.05	0.48 ± 0.06	
HÍGADO			1.92 ± 0.43	1.46 ± 0.15	0.36 ± 0.03
BAZO	0.25 ± 0.17		0.08 ± 0.02		
INTEST DELG	6.01 ± 0.5	2.32 ± 0.60	5.77 ± 1.3		
INTEST GRUESO					
RIÑÓN		1.02 ± 0.09	1.24 ± 0.42	1.76 ± 0.29	0.95 ± 0.02
MÚSCULO	0.14 ± 0.03				
HUESO					
HECES					
TUMOR	0.24 ± 0.11	0.22 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.23 ± 0.04	

En la siguiente figura se muestra la biodistribución del ^{188}Re -lanreótido en ratones atómicos inducidos de cáncer de células de neuroblastoma humano.

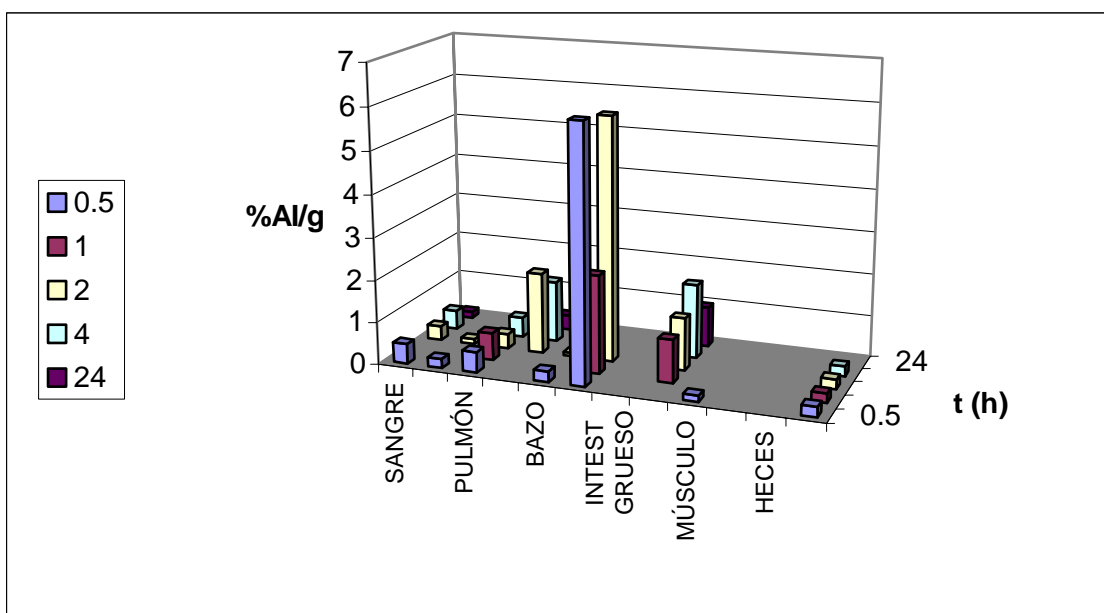


FIGURA 22. Perfil de distribución del ^{188}Re -lanreótido en ratones atómicos inducidos de neuroblastoma humano.

En la figura 23 se muestra el comportamiento del radiofármaco ^{188}Re -lanreótido en los ratones atómicos inducidos de neuroblastoma humano.

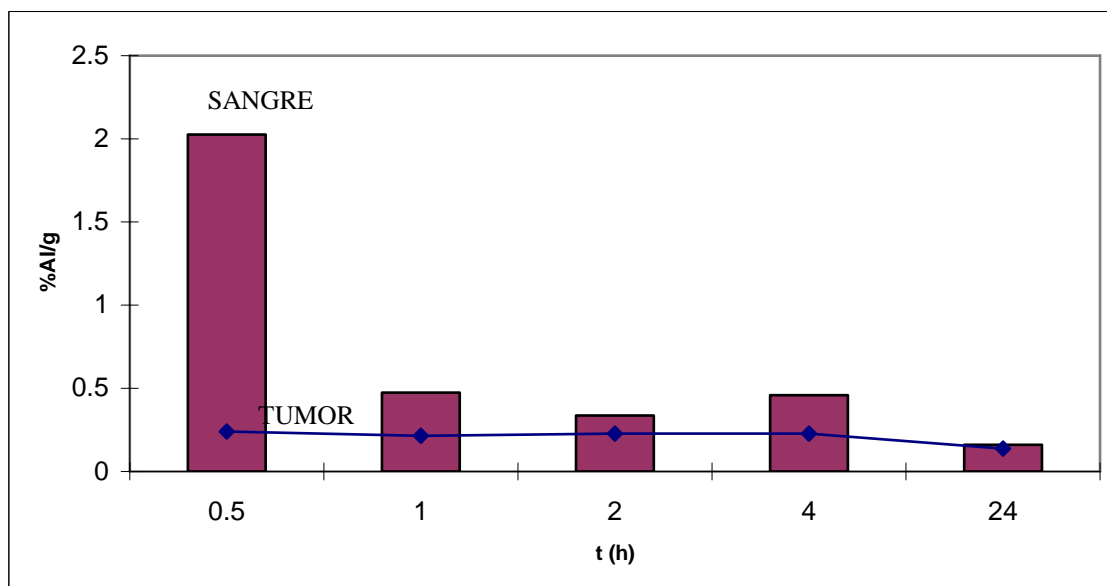


FIGURA 23. Perfil de distribución del ^{188}Re -lanreótido en ratones atómicos inducidos de cáncer de neuroblastoma humano.

6.9. FARMACOCINÉTICA.

En la siguiente tabla se muestran los parámetros farmacocinéticos del ^{188}Re -lanreótido en muestras de plasma de ratones Balb C y en ratones atímicos con cáncer inducido.

TABLA 27. Promedio de los parámetros farmacocinéticos del ^{188}Re -lanreótido en muestras de plasma de ratones Balb-C y ratones atímicos con cáncer cervico-uterino, renal y neuroblastoma (24 h); siguiendo un modelo no compartimental utilizando el programa *Winnonlin* n=3.

Parámetros	BALB/c	Atímicos			
	Normal	Normal	CU	Neuroblastoma	Renal
Vd z (mL)	76.59 ± 10.37	280.08 ± 26.57	72.65 ± 3.54	199.95 ± 3.66	165.47 ± 5.02
Vd ss (mL)	68.41 ± 19.89	187.43 ± 47.96	69.62 ± 10.19	175.45 ± 5.08	153.07 ± 25.35
$t_{1/2 \text{ lambda z}}$ (h)	5.6 ± 2.49	9.38 ± 2.3	43.05 ± 6.84	16.01 ± 3.27	17 ± 0.15
Cl (mL/min)	9.48 ± 3.61	20.70 ± 1.84	1.17 ± 0.37	8.66 ± 1.66	6.75 ± 0.18
AUC _(0→∞) (μCi*h/min*mL*h)	10.55 ± 3.62	4.83 ± 0.58	85.50 ± 13.23	11.55 ± 2.18	14.82 ± 0.32
MRT (h)	7.22 ± 4.08	9.05 ± 4.10	59.49 ± 13.9	20.27 ± 4.38	22.7 ± 3.84

En la figura 24 se muestra el perfil farmacocinético del comportamiento del ^{188}Re -lanreótido en muestras de plasma de ratones atímicos normales.

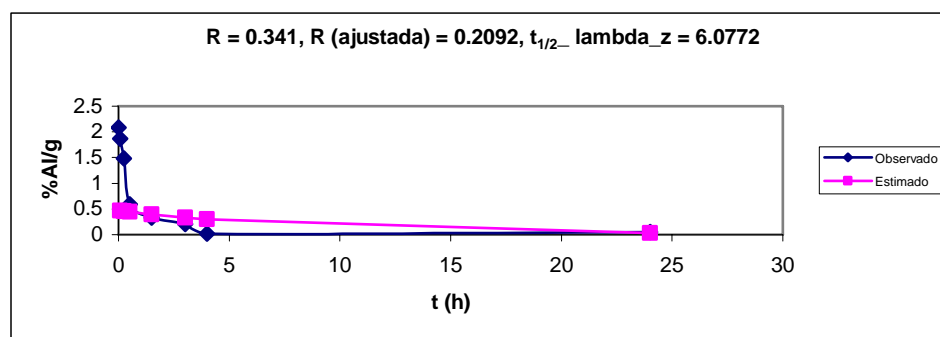


FIGURA 24. Perfil farmacocinético del comportamiento del ^{188}Re -lanreótido en muestras de plasma de ratones atímicos normales.

En la figura 25 se muestra el perfil farmacocinético del comportamiento del ^{188}Re -lanreótido en muestras de plasma de ratones Balb-C normales.

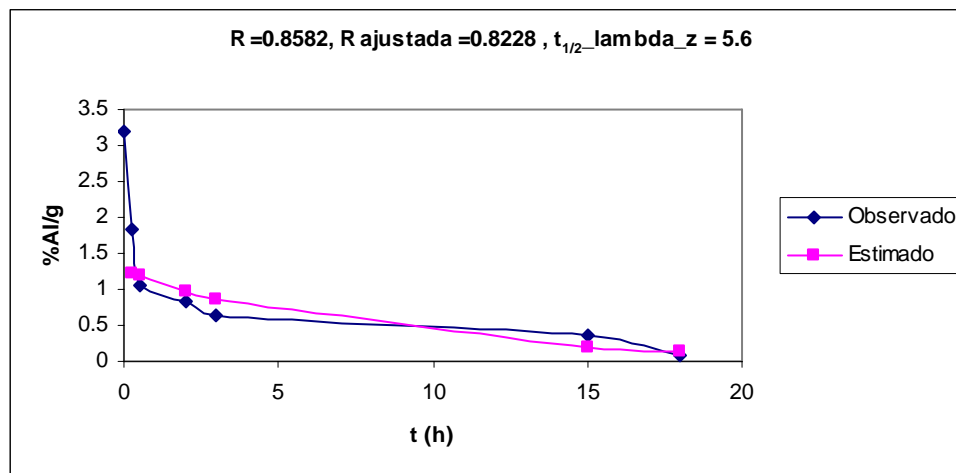


FIGURA 25. Perfil farmacocinético del comportamiento del ^{188}Re -lanreótido en muestras de plasma de ratones Balb-C.

En las figuras 26, 27 y 28 se muestran los perfiles farmacocinéticos del comportamiento del ^{188}Re -lanreótido en muestras de plasma de ratones atómicos inducidos de cáncer cervico-uterino, renal y de neuroblastoma.

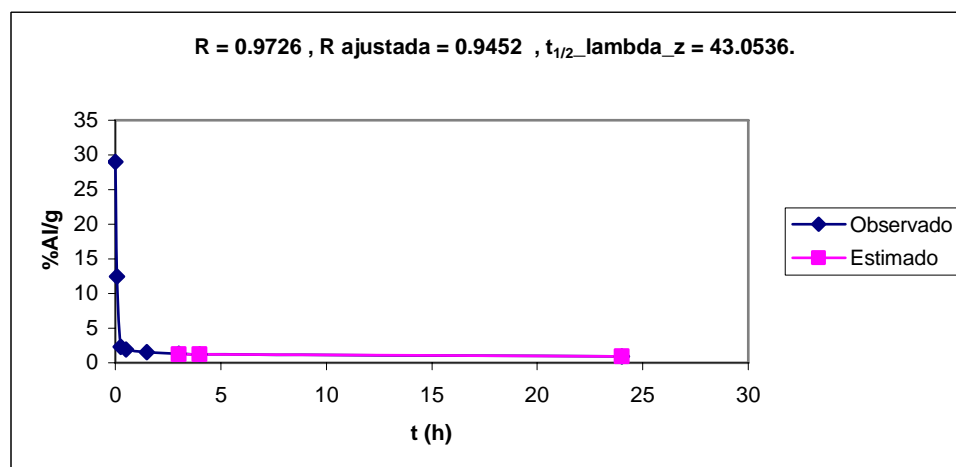


FIGURA 26. Perfil farmacocinético del comportamiento del ^{188}Re -lanreótido en muestras de plasma de ratones atómicos inducidos de cáncer con células HeLa.

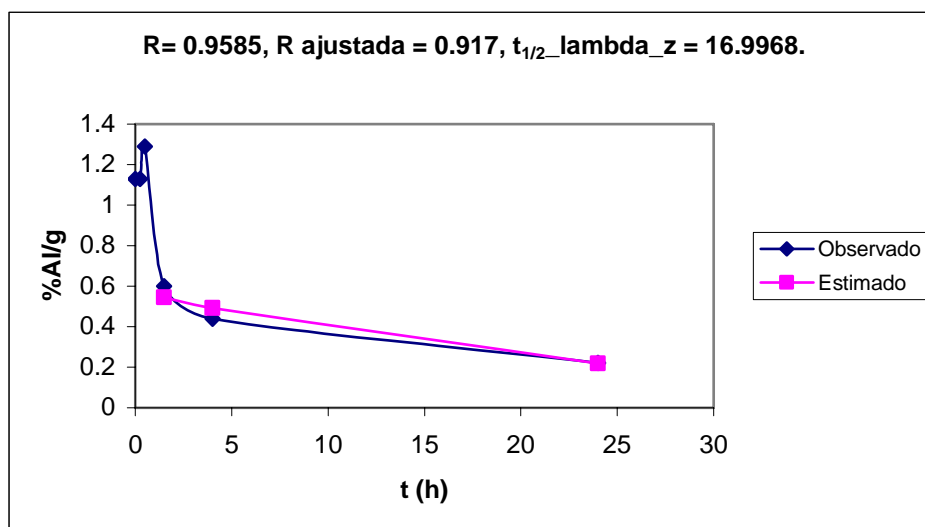


FIGURA 27. Perfil farmacocinético del comportamiento del ^{188}Re -lanreótido en muestras de plasma de ratones atómicos inducidos con células SK 293.

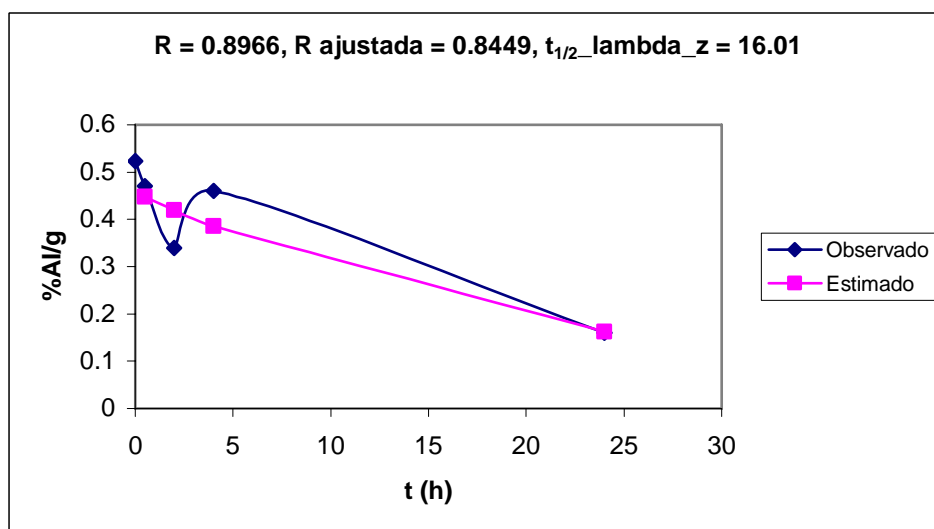


FIGURA 28. Perfil farmacocinético del comportamiento del ^{188}Re -lanreótido en muestras de plasma de ratones atómicos inducidos de cáncer con células de neuroblastoma.

En la figura 29 se muestra el perfil farmacocinético del ^{188}Re -lanreótido en plasma de ratones atómicos (1.118 MBq/Kg) después de una administración I.V. El análisis se realizó empleando el ajuste no compartimental.

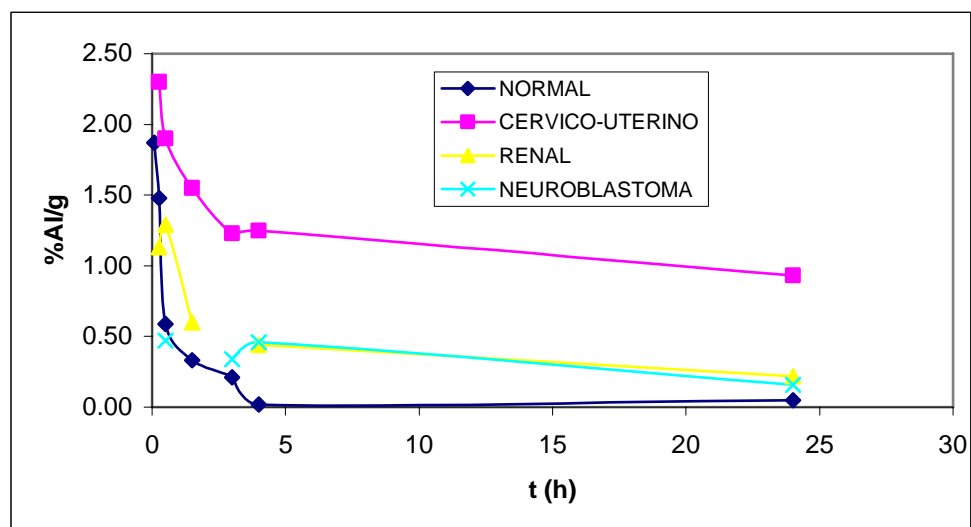


FIGURA 29. Perfil farmacocinético del comportamiento del ¹⁸⁸Re-lanreótido en ratones atómicos.

6.10. DOSIMETRÍA

En la siguiente tabla se muestra los resultados de la dosis acumulada (\tilde{A}_h) y del tiempo medio de residencia (τ_h) en los órganos mencionados para el estudio de biodistribución del ¹⁸⁸Re-lanreótido en ratones atómicos, siguiendo la siguiente ecuación (Stabin, 1996; Stabin, y cols., 1999; Loevinger y cols., 1991).

$$\tilde{A} = \int_0^t A_h(t) dt \quad \text{y} \quad \tau_h = \frac{\tilde{A}_h}{A}$$

TABLA 28. Actividad acumulada y tiempo medio de residencia promedio de aproximadamente 1.118 MBq inyectados del complejo ^{188}Re -lanreótido en ratones Balb-C y atímicos. (n = 3).

Órgano	Balb-C		Atímicos							
	Normal		Normal		Carcinoma cervico-uterino		Carcinoma renal		Neuroblastoma	
	Actividad acumulada (MBq h)	MRT (h)	Actividad acumulada (MBq h)	MRT (h)	Actividad acumulada (MBq h)	MRT (h)	Actividad acumulada (MBq h)	MRT (h)	Actividad acumulada (MBq h)	MRT (h)
Sangre	328.72	3.3	111.36	1.11	300.5	3	90.76	0.91	35.08	0.35
Corazón	130.01	1.3	36.33	0.36	83.9	0.83	32.87	0.33	8.34	0.08
Pulmón	318.9	3.2	76.05	0.76	142.28	1.42	98.37	0.983	48.57	0.49
Hígado	1474.31	14.7	97.39	0.97	20.1.15	2	134.18	1.34	91.75	0.92
Bazo	311.54	3.1	27.97	0.28	100.58	1	50.53	0.51	8.10	0.08
Riñones	473.45	4.7	154.55	1.55	451.37	4.51	405.25	0.41	121.92	1.22
Músculo	34.34	0.3	53.97	0.54	196.25	1.96	42.68	0.43	3.43	0.03
Femúr	88.31	0.8	55.19	0.55	277.2	2.77	72.86	0.73	-	-
Estómago	350.79	3.5	65.01	0.65	311.54	3.11	52.99	0.53	-	-
Intestino	1979.65	19.8	91.01	0.91	480.81	4.81	52.99	0.53	345.89	3.46
Tumor	-	-	-	-	336.07	3.36	16.68	0.17	22.57	0.23

En la tabla 29 se muestran los valores de la dosis absorbida por la actividad administrada del ^{188}Re -lanreótido en los diferentes órganos de los ratones balb-C y atímicos.

TABLA 29. Estimación de la dosis absorbida por órgano del ^{188}Re -lanreótido en ratones balb-C y atímicos. (n = 3)

Órgano	Dosis absorbida por dosis inyectada (mGy/MBq)				
	Balb-C	Atímicos			
	Normal	Normal	Carcinoma cervico-uterino	Carcinoma renal	Neuroblastoma
Sangre	18.41	6.24	16.83	5.08	1.96
Corazón	57	15.91	36.75	14.40	3.65
Pulmón	82.6	19.70	36.85	25.48	12.58
Hígado	100.25	6.62	13.67	9.13	6.24
Bazo	53.9	4.84	17.40	8.74	1.40
Riñones	133	43.43	126.84	113.88	34.26
Músculo	0.89	1.40	5.10	1.110	0.09
Femur	79.6	49.79	250.03	65.72	-
Estómago	126.3	23.40	112.15	19.08	-
Intestino	98.98	4.55	24.04	2.65	17.29
Tumor	-	-	13.11	0.65	0.88
Dosis efectiva_{total}		175.88	652.77	265.92	78.35

En la tabla 30 se denota la dosis de radiación absorbida extrapolada para un hombre de 70 Kg de peso (Stabin, M.G., 1996; Stabin, M.G. y cols., 1999; Loevinger R. y cols., 1991).

TABLA 30.
DOSIS DE RADIACIÓN EXTRAPOLADAS DEL ^{188}Re -LANREÓTIDO PARA UN HOMBRE DE 70
Kg. DE PESO.

ÓRGANO	VALOR ESTIMADO DE N MBq-s	DOSIS DE RADIACIÓN mSv/MBq
BAZO	0.00535	6.64E-05
RIÑONES	0.0643	4.8E-04
HUESO, CORTICALES	0.94	7.49E-03
HUESO, TRABECULAR	0.526	1.84E03
HÍGADO	0.165	1.98E-03
INTESTINO DELGADO	0.123	1.42E-05
ESTÓMAGO	0.0411	4.54E-03
MÉDULA ÓSEA		7.49E-03
OSTEOCITOS		1.84E-03
VEJIGA		1.37E-04
ADRENALES		1.54E-05
CEREBRO		1.44E-05
VESÍCULA BILIAR		0.0
PARED INTESTINAL SUPERIOR		3.39E-04
PARED INTESTINAL INFERIOR		1.42E-05
PULMONES		3.41E-04
TIROIDES		1.40E-04
MÚSCULO		1.41E-05
PANCREAS		1.50E-05
PIEL		2.73E-05
TESTÍCULOS		0.0
TIMO		1.38E-05
DOSIS EFECTIVA		1.82E-02

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

PARTE I.

^{99m}Tc-ÁCIDO-D-GLUCÁRICO.

7.1. CONTROL DE CALIDAD

El valor de marcado del radiofármaco con $^{99m}\text{TcO}_4^-$ utilizando la técnica de cromatografía en columna fue de 98.83 ± 0.41 %. Al utilizar la técnica de cromatografía en papel el valor fue de 97.33 ± 0.52 %. Dado que el resultado se encuentra en el intervalo del 95 al 99% se demuestra que la eficiencia del marcado es confiable. (Tabla 4)

7.2. PRUEBAS BIOLÓGICAS

7.2.1. Prueba de esterilidad.

En base a los resultados obtenidos en la tabla 5 el radiofármaco cumple con la prueba de esterilidad especificada para el control del mismo. (FEUM, 2004).

7.2.2. Prueba de pirógenos.

En la tabla 6 se observa que el producto cumple con los requisitos que marca la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM, 2004).

7.3. VALIDACIÓN

La validación de un método analítico se refiere a la evaluación cuantitativa del error indeterminado que es inherente al mismo y se debe demostrar antes de llevar a cabo un estudio de farmacocinética.

La forma o pasos a seguir para validar un método analítico no es uniforme y la información de literatura es variada. El seleccionar cuales serán los parámetros a

validar en un método depende de las necesidades de cada laboratorio, de la aplicación que tenga el método, de los requerimientos oficiales y en algunos casos del criterio del laboratorio que lo realiza, en este caso el objetivo de la primera parte de esta investigación fue determinar la eficiencia del detector de cristal de centelleo tipo pozo con la finalidad de conocer los parámetros farmacocinéticos del radiofármaco ^{99m}Tc -glucarato en un modelo fisiológico en ratas (FDA, 2003).

7.3.1. Linealidad del sistema

De acuerdo a la tabla 7 el coeficiente de variación fue menor de 5% ($3.37 \pm 0.75\%$), el valor de correlación fue $r = 0.99$ y $r^2 = 0.99$, por lo que se cumple el criterio para considerar que el sistema es lineal en el intervalo de concentraciones de 308 – 13,480 Bq (8.34 - 364.34 nCi/mL).

7.3.2. Linealidad del método.

En las figuras 2 y 3 se observa que el coeficiente de determinación tanto en plasma como en orina es de 0.99 lo cual indica que el método es lineal en el intervalo de concentraciones estudiadas.

7.3.3. Precisión del método

De acuerdo a la tablas 9 y 10, el coeficiente de variación es menor de 10% ($4.89 \pm 0.2\%$) en plasma y $2 \pm 0.11\%$ en orina, lo que se demuestra que el método es preciso en ambos fluidos biológicos.

7.3.4. Repetibilidad del método

A partir de los resultados mostrados en la tabla 11, se observa que los intervalos de los coeficientes de variación a las diferentes concentraciones en plasma fueron: 0.45 – 12.8 % en el primer día, 0.70 - 2.64 % en el segundo día, y 1.74 – 7.10 % en el tercero, lo cual indica que el método es repetible.

Al hacer el análisis estadístico, se encontró que los valores de $t_{\text{experimental}}$ fueron: 2.93, 8.35 y - 0.081 para los días 1, 2 y 3 respectivamente. Dado que el valor de $t_{\text{tablas}} = 1.943$; se demuestra que el método es repetible en el intervalo de concentraciones de 1.381 – 13.387 kBq/mL (37.33 – 362 nCi/mL).

Al evaluar la repetibilidad en orina se encontró que el intervalo de los coeficientes de variación fue de 0.38 a 3.20 en el primer día con una $t_{\text{experimental}} = 8.26$, en el segundo día 0.65 a 4.14. Al hacer el análisis estadístico, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre días, lo que muestra que el método es repetible en el intervalo de 1.248 – 13.22 kBq/mL.

7.3.5. Exactitud del método

De acuerdo a los resultados de las tablas 12, 13 y 14 se observa que el coeficiente de variación es menor del 2% por lo que se cumple el criterio de exactitud.

7.3.6. Especificidad y estabilidad del ^{99m}Tc -glucarato.

De acuerdo a los cromatogramas obtenidos en plasma y en orina del ^{99m}Tc -glucarato (figura 4), los picos obtenidos son específicos para el radiofármaco.

La Tabla 15 muestra la estabilidad del ^{99m}Tc -glucarato a una concentración de 4.677 kBq/mL (126.4 nCi/mL). Este parámetro se evaluó en función de la pureza radioquímica del radiofármaco. Dado que se determina el mismo día de su uso, el valor debe ser mayor al 95%. En este caso el valor fue 98.5%. De acuerdo a la función de decaimiento radiactivo, conforme pasa el tiempo la pureza radioquímica disminuye, por esta razón cuando se prepara el radiofármaco se debe utilizar de inmediato.

7.3.7. Sensibilidad del método

7.3.7.1. Concentración mínima cuantificable.

Al determinar la concentración mínima cuantificable se encontró que esta fue de 2.266 kBq/mL (61.24 nCi/mL).

7.3.7.2. Concentración mínima detectable.

La concentración mínima detectable del ^{99m}Tc -ácido-D-glucárico registrada por cromatografía en columna fue 0.304 kBq/mL (8.213 nCi/mL).

7.4. ESTUDIO DE BIODISTRIBUCIÓN Y FARMACOCINÉTICA DEL ^{99m}Tc -GLUCARATO.

Aún cuando el ^{99m}Tc -ácido-D-glucárico se ha utilizado especialmente para la detección de infarto al miocardio, (Yaokita H. y cols., 1993, Khaw B.A. y cols., 1997, Chagoya V. y cols., 1997, Strauss H.W. y cols., 1996, Ballinger James R. y cols., 1993. Wiersema A.M. y cols., 2000) en la actualidad no existe información acerca de la farmacocinética de este compuesto.

Los resultados del estudio de biodistribución en ratas (tabla16) muestran que el radiofármaco llega rápidamente al torrente sanguíneo y se distribuye en los diferentes órganos del cuerpo (tabla 16). Dado que el porcentaje de actividad por gramo de tejido (%A/g) de ^{99m}Tc -ácido-D-glucárico es mayor en riñón, ello indica que la principal vía de eliminación es renal.

Al calcular los parámetros farmacocinéticos mediante el programa *Winnonlin* (tabla 17) se encontró que el radiofármaco se ajusta a un modelo abierto de dos compartimientos. El volumen de distribución (Vd) que trata de una constante de proporcionalidad que relaciona la radiación del radiofármaco captada en el organismo con la concentración del mismo en plasma en cualquier tiempo durante la fase de biodistribución, fue 21.74 ± 2.71 mL. Dado que el volumen

sanguíneo de una rata es aproximadamente 58 mL/kg de peso (Taylor y cols., 1988), (18.44 mL para una rata de 318 g), el volumen obtenido representa el volumen plasmático total. El valor de volumen del radiofármaco en estado estacionario: $V_{d_{ss}} = 74.36 \pm 12.67$ mL indica que el compuesto se distribuye en el volumen total de plasma.

Los valores de las microconstantes de transferencia ($k_{10} = 0.124 \pm 0.02$ h⁻¹ $k_{12} = 0.59 \pm 0.17$ h⁻¹ y la $k_{21} = 0.24 \pm 0.08$ h⁻¹) indican que existe mayor afinidad del radiofármaco por el compartimiento 2 (periférico) que por el 1 (central).

Como el valor de $\beta = 0.036$ h⁻¹ es menor que k_{10} , se comprueba que la eliminación del radiofármaco se realiza predominantemente a partir del compartimiento central.

El valor de depuración (Cl_{total}) fue de 3.05 ± 0.35 mL/h. Al calcular la depuración renal utilizando los datos de la cantidad excretada a las 24 h (1021.5 MBq/g (90.4 μ Ci/g)), el valor encontrado fue $Cl_{renal} = 2.76$ mL/min. Lo cual comprueba que la principal vía de eliminación es la renal.

Los valores de vida media del ^{99m}Tc-ácido-D-glucárico fueron $t_{1/2k_{10}} = 4.94 \pm 0.83$ h y $t_{1/2\beta} = 18.98 \pm 4.46$ h. Estos valores son diferentes al valor de la vida media del radionúclido (^{99m}TcO₄⁻), 6.02 h, ya que este último representa un valor físico y los obtenidos experimentalmente representan valores biológicos. Con esta información se calculó el $t_{1/2efectivo} = 2.15$, que es un valor absoluto que representa la relación del $t_{1/2físico}$ y $t_{1/2biológico}$ ($t_{1/2efectivo} = t_{1/2biológico} - t_{1/2físico} / t_{1/2físico}$). Este valor es un dato importante que permite calcular la dosis absorbida del radiofármaco en la rata.

PARTE II.

7.5. **PREPARACIÓN DEL COMPLEJO ^{188}Re -(3-(2(naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-lis-L-Val-L-Cis-L-Tre)-AMIDA CICLÍCO (2→7) DISULFURO (9CI).**

Para preparar la formulación se llevó a cabo una reacción para formar el complejo ^{188}Re -(3-(2(naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre)-amida cíclico (2→7) disulfuro (9CI) utilizando el péptido (3-(2(naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre)-amida cíclico (2→7) disulfuro (9CI) (lanreótido) reportado con anterioridad por Taylor y colaboradores (1988) y el $^{188}\text{ReO}_4^-$. Para el marcado se aplicó un método directo redox utilizando cloruro estanoso (Meléndez-Alafort, Ferro-Flores, Arteaga –Murphy y cols. 1999).

La reacción se realiza a pH = 1, ya que a éstas condiciones el $^{188}\text{ReO}_4^-$ en presencia de SnCl_2 se reduce a $^{188}\text{ReO}_2^-$ y ^{188}Re (cambiando su grado de oxidación) lo que permite la unión con el octapéptido (3-(2(naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre)-amida cíclico (2→7) disulfuro (9CI) (lanreótido) y el rompimiento del enlace covalente de la cisteína para formar el complejo de ^{188}Re -(3-(2(naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre)-amida cíclico (2→7) (9CI).

7.6. **CONTROL DE CALIDAD**

7.6.1. **Identificación del péptido 3-(2(naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre)-amida cíclico (2→7) disulfuro (9CI).**

Para la identificación del -(3-(2(naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre)-amida cíclico (2→7) (9CI) (figura 7), se aplicó el método basado en la reducción intrínseca de un puente bisulfuro en la biomolécula mediante el uso de un agente reductor (2-mercaptoetanol).

7.6.2. Formulación del ^{188}Re -3-(2(naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre)-amida cíclico (2→7) disulfuro (9Cl).

La formulación utilizada contiene una biomolécula reducida con ácido gentísico, cloruro estanoso y HEDP, que dan lugar a una radiobiomolécula específica después de la reducción con $^{188}\text{ReO}_4^-$. Este mecanismo se lleva a cabo dentro del vial: reducción del prerrenato - Sn^{2+} en presencia de un ligando débil etano-1-hidroxi-1,1-ácido difosfónico (HEDP, agente quelante).

El método aplicado para obtener el radiofármaco ^{188}Re -3-(2(naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-lis-L-Val-L-Cis-L-Tre)-amida cíclico (2→7) disulfuro (9Cl) es adecuado, ya que, a temperatura de ebullición no existe desnaturalización del péptido utilizado, esta es una de las ventajas del método utilizado, además de que el pH de la formulación preparada no interfiere en la formación del complejo.

Se encontró que el rendimiento del radiopéptido aumenta con la concentración de HEDP, ya que la cantidad de HEDP estabiliza el prerrenato reducido, el cual puede ser fácilmente reoxidado a $^{188}\text{ReO}_4^-$. Así mismo, el rendimiento del ^{188}Re -lanreótido aumenta con el calentamiento a 37°C y a 92 °C. Otros investigadores (Jong de et al., 1997; Thakur et al., 1997; Zamora et al., 1997) reportan que la reacción se puede llevar a cabo a 92 °C y 100 °C sin que ello disminuya las propiedades biológicas del péptido, sin embargo, el procedimiento debe ser validado para cada una de las biomoléculas de interés.

7.6.3. Identificación del complejo ^{188}Re -3-(2(naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-lis-L-Val-L-Cis-L-Tre)-amida cíclico (2→7) disulfuro (9Cl).

El perfil radiocromatográfico mostró los siguientes tiempos de retención, 8.5 a 10 minutos equivalente al prerrenato, 18 a 19 minutos para el radiopéptido y fragmentos del radiopéptido (péptidos hidrolizados) de 26 a 27 minutos. Se puede

observar que la fragmentación de péptidos fue baja debido a las condiciones ácidas (pH = 3). El tiempo de retención del péptido disminuyó 2 minutos con respecto al péptido no marcado, lo que puede explicarse por la agregación del péptido con el HEDP, ya que a pHs bajos el grupo amino del péptido está protonado lo cual promueve algunas interacciones con las moléculas del HEDP conocido como enlace cruzado.

El complejo de ^{188}Re -3-(2(naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre)-amida cíclico (2→7) disulfuro (9Cl) preparado por el método directo de marcado vía HEDP, fue estable durante 24 horas y no se observó degradación debida a la radiólisis, es decir no se observó presencia de radicales libres, iones hidróxilos (OH^-) e iones hidronio (H_3O^+) en agua, lo cual concuerda con lo reportado por L. Meléndez y col., 1999. donde mencionan que la estabilidad puede estar asociada con la presencia de HEDP.

7.6.4. Pureza radioquímica del complejo ^{188}Re -3-(2(naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-lis-L-Val-L-Cis-L-Tre)-amida cíclico (2→7) disulfuro (9Cl).

El método utilizado para la identificación del radiofármaco ^{188}Re -lanreótido empleando el péptido análogo de la somatostatina 3-(2(naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-lis-L-Val-L-Cis-L-Tre)-amida cíclico (2→7) disulfuro (9Cl) mostró que la pureza radioquímica fue 97.3 ± 1.3 % (tabla 18) empleando 0.95 mg/mL de SnCl_2 , 8 mg/mL de HEDP, pH = 1 e incubación a ebullición durante 1.5 h.

Para determinar la pureza radioquímica del radiofármaco fue necesario utilizar dos medios: solución salina fisiológica al 0.9% y metanol ácido, ya que en el primer medio se identificaban el $^{188}\text{ReO}_4^-$ y el ^{188}Re -HEDP, en el segundo se identificaba el ^{188}Re -lanreótido. En la tabla 19 se muestran los valores de Rf obtenidos al realizar la cromatografía en papel ITCL-SG para cada especie de renio ($^{188}\text{ReO}_4^-$, $^{188}\text{ReO}_2$, ^{188}Re -lanreótido y ^{188}Re -HEDP).

7.6.5. Pruebas biológicas

7.6.5.1. Prueba de esterilidad.

En la tabla 20 se confirma que la prueba de esterilidad aplicada al radiofármaco en estudio valida el uso del mismo. (FEUM, 2004).

7.6.5.2. Prueba de pirógenos

Los resultados mostrados en la tabla 21 indican que el radiofármaco en estudio fue confiable para ser utilizado en estos estudios. (FEUM, 2004).

7.7. ESTUDIO DE BIODISTRIBUCIÓN EN RATONES.

7.7.1. SELECCIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES.

Se señala que aproximadamente en el 30% de todos los cánceres se han encontrado mutaciones en los genes de la familia *ras*. Estos genes codifican para proteínas conocidas como GTPasas las cuales se encuentran ancladas en la membrana interna de las células desde donde transmiten señales de crecimiento, proliferación y diferenciación cuando son activadas por la unión específica a un factor de crecimiento. Esta señal desencadena una cascada que después de ser transmitida por varias proteínas llega al núcleo para activar factores de transcripción que ponen en marcha la activación de otros genes.

En el presente trabajo se emplearon las células HeLa por ser uno de los cultivos *in vitro* que mejor correlaciona con el crecimiento de tumores en animales experimentales (Shwartz y cols., 1985). Estas células (células procedentes de un carcinoma cervico-uterino) tienen ciertas características de crecimiento como la capacidad de invadir tejidos circundantes, así como la habilidad de liberarse y de entrar en el torrente sanguíneo o en vasos linfáticos, es decir, crecimiento celular

incontrolado o metástasis en animales de laboratorio inmunosuprimidos como lo son los ratones atómicos (Willuda y cols., 2001; García-Salinas y cols. 2001).

Por otra parte los genes *H* y *K ras* originalmente fueron aislados de sarcomas murinos (DeFeo y cols., 1981; Chang y cols., 1982). *N ras* fue primero identificado en una línea celular humana de neuroblastoma (Shimizu y cols., 1983), por tal razón estas líneas celulares se utilizan en el desarrollo de tumores en animales para fines de investigación (en este caso en ratones atómicos).

Las células SK293 son células obtenidas a partir de líneas celulares involucradas en tumores en donde aparecen los genes *H ras*. De acuerdo a estudios en donde se involucran los genes *ras* se establece que las proteínas *ras* son modificadas a nivel postraducciona y estas modificaciones son esenciales para su localización en la membrana. Las modificaciones postraduccionales de estas proteínas involucran el corte de tres aminoácidos de la parte carboxilo terminal, farnesilación de la cisteína en la nueva terminación carboxilo, palmitolación de otra cisterna localizada cerca del segmento carboxilo terminal y fosforilación (Hancock y cols., 1989).

7.8. DESARROLLO DEL TUMOR EN RATONES ATÓMICOS.

El principal atributo de los tumores malignos es su capacidad de diseminación fuera del lugar de origen. La invasión de los tejidos vecinos puede producirse por extensión, infiltración o a distancia, produciendo crecimientos secundarios conocidos como metástasis. La localización y vía de propagación de las metástasis varía en función de los cánceres primarios. En este caso se desarrolló el tumor en la parte dorsal de los ratones atómicos.

Los resultados obtenidos al inocular las células HeLa a ratones atímicos mostraron que a las 6 semanas post-inyección se apreció desarrollo del tumor en el lomo de los ratones y a las 36 semanas después, el tumor se había desarrollado considerablemente.

En el caso de las células cancerígenas renales el tumor se desarrolló en el líquido amniótico de los ratones, 30 semanas después de la inoculación de células cancerígenas renales SK293 a los ratones. El volumen promedio de líquido amniótico obtenido fue de 2.7 mL.

En el caso de la inducción en ratones atímicos con neuroblastoma, se desarrolló un tumor sólido, el cual se empezó a desarrollar a las 4 semanas después de la inyección de 1×10^6 células 200 KD en el lomo de ratones atímicos.

En el caso de los ratones inducidos con neuroblastoma (ver figura 21 y tabla 26) la captación del radiofármaco fue mínima (0.23 %A/g). Ello podría deberse a que el lomo del animal no fue el lugar más apropiado para inducir este tipo de tumor, ya que se sabe que la transmisión de señales de crecimiento, proliferación y diferenciación celular es inespecífica en este sitio (I. Novak-Hofer and et al., 2004). Además de que el mecanismo de acción con el $^{188}\text{Re-3-(2(naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-lis-L-Val-L-Cis-L-Tre)-amida cíclico (2}\rightarrow\text{7) disulfuro (9Cl)}$ consiste en la unión a las células 200 KD que se encuentran en la superficie de las proteínas de las células del neuroblastoma y éstas no se encuentran presentes en ese lugar. Otra posibilidad podría ser que no existe afinidad del radiofármaco por las células del neuroblastoma.

7.9. BIODISTRIBUCIÓN.

7.9.1. Estudio en ratones atímicos normales.

En la figura 16 se puede observar que el radiofármaco se biodistribuye homogéneamente en los órganos más irrigados como en el hígado e intestino así como en sangre. En la gráfica se observa claramente que éste complejo se elimina por riñón y por bilis.

De acuerdo a la tabla 22, se puede observar que, después de la administración del ^{188}Re -lanreótido en ratones atímicos normales la mayor captación en el riñón de $1.85 \pm 0.60\%$ y $1.26 \pm 0.25\%$ a los 5 minutos y a los 30 minutos de su administración. Así mismo en bilis la concentración fue de $3.6 \pm 1.1\%$ a los 15 minutos.

El ^{188}Re -lanreótido se distribuye en hígado observándose un valor de %A/g de $0.98 \pm 0.11\%$ a los 15 minutos después de ser administrado. A partir de las 1.5 horas el %A/g es menor debido a la alta irrigación de este órgano.

7.9.2. Estudio de biodistribución en ratones balb-C.

En la tabla 23 se puede apreciar la biodistribución del ^{188}Re -3-(2-naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida, cíclico (2→7)-disulfuro (9Cl) en ratones balb-C. En órganos como el hígado se aprecia que a los 30 minutos existe un porcentaje considerable ($14 \pm 7.9\%$) y va disminuyendo con respecto al tiempo como se esperaba. En bilis se aprecia un porcentaje de $91.1 \pm 5.6\%$ a las 2 horas, en riñón se encontró el mayor porcentaje del radiofármaco a las 24 horas ($6.1 \pm 1.5\%$). FIGURA 17.

7.9.3. Estudio de biodistribución en ratones atímicos inducidos de cáncer cervico-uterino.

Con lo que respecta a la biodistribución observada del ^{188}Re -3-(2-naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida, cíclico (2→7)-disulfuro (9Cl) en ratones atímicos inducidos de cáncer con células HeLa se encontró que existe captación apreciable del radiofármaco en el tumor sólido a las 1.5 h ($3.1 \pm 0.57\%$).

De los datos de la tabla 24 se puede observar que la distribución en hígado no se modifica con el tiempo, apreciándose un %A/g mayor a los 30 minutos postinyección. Otros órganos como el corazón, bazo y pulmón presentan el mismo comportamiento. En el riñón la captación del ^{188}Re -lanreótido es específica, el mayor %A/g se aprecia a las 4 horas, siendo casi la misma cantidad a las 24 horas. En intestino (delgado y grueso) como se esperaba se aprecia mayor captación.

En la figura 18 se observa que la captación del ^{188}Re -lanreótido en el tumor desarrollado en los ratones atímicos fue alto. El comportamiento del radiofármaco en sangre fue similar al de los ratones normales.

Al evaluar la relación tumor/sangre en función del tiempo (figura 15), se encontró, que existe una relación de proporcionalidad con respecto al tiempo. Ello puede deberse a que el complejo ^{188}Re -lanreótido se une a las células dañadas vía receptores específicos como son los receptores conocidos como receptores subtipos de la somatostatina hSSTR (Kreenning y cols., 1993, Reubi y cols., 2000).

7.9.4. Estudio de biodistribución en ratones atímicos inducidos de cáncer renal.

En la tabla 25 se observa que a las 3 horas los órganos que presentaron la mayor captación del ^{188}Re -lanreótido fueron: hígado (2.08 ± 0.05 %A/g), en el estómago (4.81 ± 0.01 %A/g), riñón (3.52 ± 1.58 %A/g) y pulmón (2.36 ± 0.05 %A/g). En otros órganos como bazo e intestinos no se encontró una captación apreciable.

7.9.5. Estudio de biodistribución en ratones atímicos inducidos de cáncer de neuroblastoma.

Al evaluar la biodistribución del ^{188}Re -lanreótido en ratones atímicos inducidos con neuroblastoma humano (tabla 26), se encontró que, a pesar de que el tumor está desarrollado, no existe captación del radiofármaco en el mismo. Así mismo se encontró que la captación del radiofármaco mantiene un valor constante del %A/g en tumor con respecto al tiempo, lo cual indica que la afinidad por los sitios receptores en sangre y en otros órganos no es específica, o bien llega al sitio y allí se mantiene. El perfil de distribución (figura 22) muestra que el %A/g en intestino delgado es alto, lo que muestra que este compuesto se elimina por bilis, comprobando nuevamente, que las vías de eliminación del radiofármaco son la renal y la enterohepática.

Al determinar la relación de %A/g de tejido / %A/g sangre se encontró que en los órganos en los que existe mayor concentración son: hígado y riñón, estómago a 24 horas, bazo a los 30 y 90 minutos, tumor a las 4 y 24 horas. Lo anterior se explica por la vascularidad del tejido hepático.

Tabla 31. Relación tumor/sangre en ratones atómicos inducidos con cáncer cervico uterino.

<i>Tiempo (h)</i>	<i>Tumor/sangre</i>	<i>Tumor/músculo</i>
0.25	0.48	1.22
0.5	1.08	2.73
1.5	2	2.48
3	1.75	1.39
4	2.08	1.79
24	2.43	3.48

La tabla 31 muestra los resultados de la relación “target/non target” (células blanco/otras células) al administrar el radiofármaco a ratones inducidos con cáncer cérvico uterino. Se puede observar que la relación es alta y lo que indica que la concentración del ^{188}Re -lanreótido en el tumor es específica, mientras que en las células de cáncer renal y en neuroblastoma no existe una afinidad específica del ^{188}Re -lanreótido. En el caso de ratones inducidos con cáncer cervico-uterino la relación tumor / músculo fue mayor que la relación tumor / sangre. Dado que el tumor se desarrolló en el lomo donde existe mayor masa muscular la captación del radiofármaco es mayor en ese sitio.

7.10. FARMACOCINÉTICA.

Los perfiles de concentración del ^{188}Re -lanreótido en función del tiempo (figuras 24, 25, 26, 27, 28 y 29) demuestran que el radiofármaco sigue la misma tendencia de distribución y eliminación en ratones normales e inducidos.

Los valores de tiempo media de residencia que se presentan en la tabla 32 muestran que el tiempo medio de residencia (MRT) del radiofármaco es mayor en ratones atómicos inducidos de cáncer cervico-uterino que el obtenido en ratones normales e inducidos con cáncer renal y neuroblastoma.

TABLA 32. Valores de MRT del ^{188}Re -lanreótido obtenidos por el programa *Winnonlin*.

Parámetro farmacocinético	Balb-C	Atímicos			
	Normal	Normal	CU	Neuroblastoma	Renal
MRT (h)	7.22 ± 4.08	9.05 ± 4.10	59.49 ± 13.9	20.27 ± 4.38	22.7 ± 3.84

Los valores de MRT encontrados en ratones inducidos de cáncer son mayores a 17.51 h (Pedraza y cols., 2001) en ratones atímicos, lo cual puede deberse a la captación favorable del péptido en el tumor sólido (Células HeLa), lo cual alarga el tiempo medio en el organismo. Se sabe que una de las características de los tumores sólidos es la retención de los radiofármacos en el sitio donde se une a las células cancerígenas, prolongando su permanencia en ese lugar; siempre y cuando exista una afinidad específica en los sitios receptores, como es el caso de las células HeLa presentes en el cáncer cervico-uterino.

Considerando que el volumen total sanguíneo de un ratón Balb-C es de 78 mL/Kg de peso corporal (Revueltas M.E. y Delgado Buenrostro N., 1990) (1.87 mL para un ratón de 24 g), se podría señalar que el ^{188}Re -lanreótido se biodistribuye en líquidos intercelulares y extracelulares (Ver tabla 33).

En el caso de ratones atímicos inducidos con cáncer renal y neuroblastoma el valor de V_d fue mayor que el obtenido en ratones atímicos normales lo cual indica una biodistribución diferente en los diferentes tipos de cáncer. Debido a la captación del radiofármaco en el tumor, el volumen es menor en los ratones inducidos con cáncer. Al comparar los valores se encontró que los ratones con cáncer cervico-uterino presentan el menor volumen de distribución, lo cual puede deberse a la mayor captación del radiofármaco en el tumor. En el caso de los ratones con neuroblastoma y con cáncer renal, el volumen fue semejante, lo cual comprueba nuevamente la menor captación del radiofármaco en estos tipos de cáncer.

TABLA 33. Valores de V_dz del ^{188}Re -lanreótido utilizando el programa *Winnonlin*.

Parámetro farmacocinético	Balb-C	Atímicos			
	Normal	Normal	CU	Neuroblastoma	Renal
Vd z (mL)	76.59 ± 10.37	280.08 ± 26.57	72.65 ± 3.54	199.95 ± 3.66	165.47 ± 5.02

En relación al valor de V_{dss} (tabla 34) se encontró que existe una diferencia significativa entre ratones atímicos normales y ratones atímicos inducidos de cáncer cervico-uterino. En ratones balb-C el volumen de distribución en estado estacionario fue menor que el obtenido en ratones atímicos inducidos con cáncer renal y neuroblastoma. Finalmente el valor de V_{dss} disminuye en los ratones inducidos con cáncer debido a la captación del fármaco en el órgano.

TABLA 34 Valores de V_{dss} del ^{188}Re -lanreótido utilizando el programa *Winnonlin*.

Parámetro farmacocinético	Balb-C	Atímicos			
	Normal	Normal	CU	Neuroblastoma	Renal
Vd ss (mL)	68.41 ± 19.89	187.43 ± 47.96	69.62 ± 10.19	175.45 ± 5.08	153.07 ± 25.35

Los valores de depuración (tabla 35) en ratones atímicos normales fueron mayores que en ratones balb-C. Al comparar los valores con los obtenidos en ratones inducidos de cáncer cervico-uterino, renal y neuroblastoma se encontró la siguiente relación en los valores de depuración: $CL_{\text{cervico-uterino}} < CL_{\text{neuroblastoma}} < CL_{\text{renal}}$. La disminución en depuración de ratones inducidos de cáncer cervico-uterino se puede explicar por la afinidad del radiofármaco por las células HeLa.

TABLA 35. Valores de depuración del ^{188}Re -lanreótido utilizando el programa *Winnonlin*.

Parámetro farmacocinético	Balb-C	Atímicos			
	Normal	Normal	CU	Neuroblastoma	Renal
Cl (mL/min)	9.48 ± 3.61	20.7 ± 1.84	1.17 ± 0.37	8.66 ± 1.66	6.75 ± 0.18

Al comparar los valores de depuración con el obtenido en ratones atómicos normales, y los inducidos con los diferentes tipos de cáncer, se encontró que en todos los casos, la depuración fue menor. Ello puede deberse a la disminución del flujo sanguíneo en este tipo de enfermedad.

Con lo que respecta a la vida media se puede observar claramente en la tabla 36 que existen diferencias en $t_{1/2 \text{ lambda} z}$ entre los diferentes grupos: en ratones con cáncer cervico-uterino $> t_{1/2 \text{ lambda} z}$ en ratones con cáncer renal $> t_{1/2 \text{ lambda} z}$ en ratones con neuroblastoma $> t_{1/2 \text{ lambda} z}$ en ratones atómicos normales $> t_{1/2 \text{ lambda} z}$ para ratones balb-C. Se puede apreciar que los ratones con cáncer tienen una vida media mayor que los ratones normales, lo cual se explica porque el tiempo en el cual se mantienen el radiofármaco en el organismo es mayor en especial en los que existe mayor afinidad por las células receptoras como es el caso de los ratones con cáncer cervico-uterino.

TABLA 36. Valores de $t_{1/2 \text{ lambda} z}$ del ^{188}Re -lanreótido obtenidos por el programa *Winnonlin*.

Parámetro farmacocinético	Balb-C	Atómicos			
	Normal	Normal	CU	Neuroblastoma	Renal
$t_{1/2 \text{ lambda} z}$ (h)	5.6 ± 2.49	9.38 ± 2.3	43.05 ± 6.84	16.01 ± 3.27	17 ± 0.15

Considerando las características específicas del ^{188}Re -lanreótido y tomando en cuenta el proceso de decaimiento radiactivo del radionúclido y del tipo de radiación medida se tomaron muestras hasta 48 h en ratones balb-C y durante 24 h en ratones atómicos. De acuerdo a los resultados registrados en las tablas 27 y 36 se puede observar que el $t_{1/2 \text{ lambda} z} \leq t_{1/2 \text{ radionúclido}}$ (17 h), excepto el $t_{1/2 \text{ lambda} z}$ calculado en ratones atómicos inducidos con cáncer cervico-uterino.

En la tabla 37 se muestran los valores del parámetro farmacocinético área bajo la curva (AUC) que representa un término de eficiencia relativa de un fármaco en el organismo. De acuerdo a lo obtenido experimentalmente se encontraron diferencias en el área bajo la curva en ratones balb-c y ratones atímicos inducidos de cáncer cervico-uterino, lo cual podría deberse a que el radiofármaco es captado en mayor proporción en ratones atímicos con tumor sólido de cáncer cervico uterino, donde probablemente existe mayor afinidad vía receptores específicos (hSSTR) hacia las células dañadas.

TABLA 37. Valores de AUC del ¹⁸⁸Re-lanreótido utilizando el programa *Winnonlin*.

Parámetro farmacocinético	Balb-C	Atímicos			
	Normal	Normal	CU	Neuroblastoma	Renal
AUC_(0→∞) (μCi*h/min*mL*h)	10.55 ± 3.62	4.8 ± 0.58	85.50 ± 13.23	11.55 ± 2.18	14.82 ± 0.32

7.11. DOSIMETRÍA

Para calcular la dosis absorbida, es importante conocer la actividad acumulada (\tilde{A}). La actividad acumulada \tilde{A} depende de los valores de los parámetros farmacocinéticos y de la biodistribución en los diferentes órganos y tejidos y se obtiene matemáticamente por la integración de la actividad del radiofármaco en el órgano fuente en función del tiempo.

La fórmula que se utilizó para este cálculo fue la siguiente:

$$\tilde{A} = \int_0^t A_h(t) dt$$

Estos conceptos son la base de la metodología MIRD que utiliza los datos físicos de la energía promedio de cada una de las partículas del decaimiento y el tiempo medio de residencia para calcular la dosis absorbida promedio por los órganos fuente y órgano blanco de un hombre con un peso estándar de 70 Kg. En la tabla 28 se resumen los valores calculados de la actividad acumulada y el tiempo medio

de residencia promedio donde se puede apreciar que el valor de \bar{A} calculado en ratones inducidos de cáncer cervico-uterino es mayor con respecto a los otros debido a que existe una mayor captación o afinidad del ^{188}Re -3-(2-naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida, cíclico (2→7)-disulfuro (9CI).

Para la estimación de la dosis absorbida en el tumor, nosotros asumimos, por analogía, que una vez que el compuesto se captura en el tumor, no hay ninguna eliminación biológica en este sitio (Hiranoy cols., 1995, 1997; Horiuchi y cols., 1998), bajo estas condiciones, $\bar{A}_{\text{tumor}} = 1.44 A_0 t_{1/2}$. Los valores de dosis absorbida se obtuvieron a partir de los datos extrapolados del gráfico de masa del tumor vs. "S". (Stabin, 1996; el Stabin y cols., 1999).

De los datos de dosis absorbida del ^{188}Re -lanreótido en los órganos estudiados (tabla 29) se calculó la dosis por órgano específico y se encontró que la dosis absorbida fue $D_{\text{CU}} = 13.11 \text{ mGy/MBq} > D_{\text{neuroblastoma}} = 0.88 \text{ mGy/MBq} > D_{\text{renal}} = 0.65 \text{ mGy/MBq}$. Nuevamente se aprecia que la dosis absorbida es mayor en ratones atómicos inducidos con cáncer cervico-uterino.

Para el cálculo de %A/g de los órganos del ratón referidos al peso de los órganos de un hombre de 70 Kg de peso se utilizó la siguiente fórmula: $[(\%A/g/g_{\text{órgano}})_{\text{animal}} \times (\text{peso del animal})] \times (g_{\text{órgano}}/\text{peso del humano}) = (\%/órgano)_{\text{humano}}$.

Para obtener la dosis absorbida en humanos se extrapolan los datos de \bar{A} y el τ_h obtenidos en ratones (OLINDA/MXM). Los datos extrapolados de un animal biocinético al realizar un escalamiento a humanos se consideran como datos preliminares que proporcionan la base para llevar adelante los tratamientos clínicos si los resultados son favorables (Stabin, 2003). En la tabla 30 se resumen los valores determinados de las dosis de radiación del radiofármaco ^{188}Re -

lanreótido extrapoladas para un hombre de 70 Kg de peso, expresadas en mSv/MBq (mGy/MBq).

Para determinar los valores de dosis absorbida en humanos en el caso del intestino grueso y delgado, debido a que en los animales bajo estudio no se diferenciaron estos órganos, se consideró ambos intestinos como uno solo, tomando en cuenta su distribución de acuerdo al volumen (la masa) intestino delgado y grueso del ratón respectivamente para posteriormente extrapolar los datos para el cálculo en humanos.

La dosis de radiación absorbida seleccionada para el modelo humano y calculada utilizando el programa OLINDA fue baja para el cuerpo total $19.8 \text{ E-}02 \text{ mSv/MBq}$ (mGy/MBq), riñones $4.8 \text{ E}04 \text{ mSv/MBq}$ (mGy/MBq) y hueso $9.33 \text{ E}03 \text{ mSv/MBq}$ (mGy/mBq). A pesar de que existe captación del ^{188}Re -lanreótido en tumores, la eliminación biliar podría producir dosis absorbidas efectivas grandes durante el tratamiento de cáncer en seres humanos, debido a que las dosis efectivas determinadas en ratones fueron altas (por ejemplo: $D_{\text{efectiva CU}} = 652.77 \text{ mGy/MBq}$ en ratones) como se muestra en la tabla 29.

Los resultados, obtenidos en el presente trabajo muestran que el Re lanreótido es un radiofármaco promisorio para el tratamiento del cáncer cervico-uterino, por lo que está por realizarse un estudio clínico con este radiofármaco en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de Nutrición Salvador Zubirán.

VIII. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que:

El método analítico utilizado para la cuantificación del radiofármaco ^{99m}Tc -glucarato en sangre y orina demostró ser preciso y exacto y puede ser utilizado en estudios de biodistribución y radiofarmacocinética.

La formulación desarrollada en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán conteniendo ácido D-glucárico y $^{99m}\text{TcO}_4^-$ cumple con las especificaciones indicadas en la FEUM 2004 para las pruebas biológicas así como con la pureza radioquímica en donde se comprobó que no más del 3% representaban impurezas como ^{99m}Tc libre y $^{99m}\text{TcO}_2^-$.

Los estudios de biodistribución en rata indican que el radiofármaco ^{99m}Tc -glucarato es específico para corazón y el mecanismo de eliminación del complejo es por vía renal.

La cinética del ^{99m}Tc -glucarato se ajusta a un modelo abierto de dos compartimientos (MADC) con eliminación de primer orden y vida media promedio de 18.98 h.

El método utilizado para desarrollar la formulación del ^{188}Re -lanreótido en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares: ININ cumple con las especificaciones marcadas en la FEUM 2004 respecto a radiofármacos listos para su uso. Así mismo cumple con las pruebas de control de calidad y de estabilidad.

El compuesto ^{188}Re -3-(2-naftil)-D-Ala-L-Cis-L-Tir-D-Trp-L-Lis-L-Val-L-Cis-L-Tre-amida, cíclico (2→7)-disulfuro (9Cl), (^{188}Re -lanreótido) es afín a las células HeLa cultivadas de cáncer cervical humano. Su especificidad se debe a que el

radiofármaco se une a receptores de la somatostatina: hSSTR1, 2, 3 y 4 con alta afinidad y hSSTR 5 con baja afinidad.

En las células de SK293 y las células del neuroblastoma humano implantadas en los ratones atímicos, la captación del complejo no fue específica lo que indica que la afinidad del radiofármaco hacia los sitios receptores (hSSTR, receptores subtipos de somatostatina) es baja.

Los estudios de biodistribución comprueban que la captación del ^{188}Re -lanreótido es específica en tumores sólidos tipos carcinomas como el cáncer cervico-uterino, no así para neuroblastoma y cáncer renal.

Se propone a este radiofármaco como agente terapéutico potencial que puede ser utilizado para el tratamiento de cáncer cérvico-uterino. Es necesario realizar estudios clínicos in situ para avalar los resultados.

Las vías de eliminación del ^{188}Re -lanreótido son la renal y biliar.

La farmacocinética del ^{188}Re -lanreótido se obtuvo realizando un ajuste de datos con el modelo independiente no compartimental y con los parámetros farmacocinéticos obtenidos se logró calcular la dosis de radiación absorbida del ^{188}Re -lanreótido en ratones, permitiendo realizar un escalamiento en humanos para conocer la dosis de radiación absorbida efectiva ($1.82\text{E}-02$ mSv/MBq (mGy/MBq)) considerada como referencia en tratamientos clínicos posteriores. El escalamiento se logró mediante el uso del programa de lenguaje Java (Sun Microsystems) conocido como OLINDA/EXM (Niveles de dosis internas en órganos) en el cual se involucran funciones exponenciales avalado por la FDA. Este programa involucra el uso de fantomas que consideran la metodología MIRD, la masa de los órganos involucrados, y ecuaciones relacionadas con los mismos. En este caso, conociendo el tiempo medio de residencia MRT y el peso de varios

órganos fuente extrapolados a un hombre de 70 Kg de peso se calculó la dosis absorbida en diferentes órganos blanco.

IX. REFERENCIAS.

Alberto R., Schibli R., Waibel , Abram U., and Schubiger P. A. *Basic aqueous chemistry of $[M(OH_2)(3)(CO)(3)](+)$ ($M = Re, Tc$) directed towards radiopharmaceutical application.* Coord. Chem. Rev. (1999). 192: 901-919.

Arteaga de Murphy C., Pedraza-López M., Ferro-Flores G., Murphy-Stack E., Chávez-Mercado L., Ascencio J. A., García-Salinas L., Hernández-Gutiérrez S. *Uptake of ^{188}Re - β -naphthyl-peptide in cervical carcinoma tumours in athymic mice.* Nuclear Medicine and Biology. (2001) 28:319-326.

Ballinger James R. *Effect of hipoxia on the accumulation of Technetium-99m-glucarate and Technetium-99m-gluconate by chinese Hamnster Ovary cells in vitro.* The J. Nucl. Medicine. (1993) 34,2. February. 242-245.

Bogusky, MS. And McCormick, F. *Protein regulating ras and Its relatives.* Nature. (1993). 366 (643-654).

Bos JL. *Ras oncogenes in human cancer: a review.* Cancer Res. (1989) 49: 4682-92.

Cuntz M.C., MD, Edward A. Levine, MD, Thomas M. O'Dorisio, MD, James C. C. Watson, MD, Dawn A. Wray, MS, MA. Gregory D. Espenan, and et al. *Intraoperative Gamma Detection Of ^{125}I -lanreotide in Women With Primary Breast Cancer.* Annals of Surgical Oncology, (1999). 6(4):367-372.

Chagoya V. *Secuential changes of energy metabolism and mitochondrial function in myocardial infarction induced by isoproterenol in rats: a long-term and integrative study.* Can. J. Physiol. Pharmacol. (1997). 75: 1300-1311.

Chang EH, Gonda MA, Ellis RW, Scolnick EM, and Lowy DR. *Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey murine sarcoma viruses*. Proc Natl Acad Sci. (1982). 79:4848-52.

DeFeo D, Gonda MA, Young HA, Chang EH, Lowy DR, Scolnick EM, and Ellis RW. *Analysis of two divergent rat genomic clones homologous to the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus*. Proc Natl Acad Sci. (1981). 78:3328-32.

Eccleston JF, Moore KJ, Morgan L, Skinner RH, and Lowe PN. *Kinetics of interaction between normal and praline 12 Ras and the GTPase-activating proteins, p120-GAP and neurofibromin. The significance of the intrinsic GTPase rate in determining the transforming ability of ras*. J. Biol Chem. (1993). 268: 27012-9.

Egli A. , R. Alberto, L. Tannahill, R. Schibli, U. Abram, A. Schaffland, R. Waibel, D. Tourwe, L. Jeannin, K. Iterbeke, and P.A. Schubiger *Organometallic Tc-99m-aquaion labels peptide to an unprecedented high specific activity*. J. Nucl. Med. (1999). 40 (11): 1913-1917.

Ferro, F.G., Pimentel, G.G., González .Z.M., Murphy, C.A., Meléndez, A.L., Tendilla, J.I., Crofft, B.Y. *Preparation , biodistribution and dosimetry of ¹⁸⁸Re-labeled MoAb ior CEAL and its F(ab')₂ fragments by avidin-biotin strategy*. Nucl. Med. Biol. (1999). 26, 57.

FEUM: *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. Secretaria de Salud. Octava edición. (2004). 793 – 835.

- Fini A., González Rodríguez y González Cordero M. *Aplicaciones farmacológicas de la radiactividad*. Instituto di Scienze Chimiche, Università di Bologna. Centro de Química Farmacéutica, ciudad de la Habana Cuba. (2003). 4 – 6.
- Food and drug Administration. *Guidelines for the Clinic evaluation of Radiopharmaceutical Drugs*. U.S. Department of Health and Human services. (2003).1-10.
- Food and Drug Administration. *Guidence for Industry Bioanalytical Methods Validation for Human Studies*. U.S. Department of Health and Human Services. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). (1998). 14-28.
- García-Salinas L., Ferro-Flores G., Arteaga-Murphy C., Pedraza-López M., Hernández-Gutiérrez S., Azorín-Nieto J. *Uptake of the ¹⁸⁸Re(V)-DMSA complex by cervical carcinoma cells in nude mice: pharmacokinetics and dosimetry*. *Applied Radiation and Isotopes*. (2001). 54: 413 - 418.
- Gibaldi Milo, Perrier Donald. *Farmacocinética*. Editorial Reverté. (1992). 10-22, 43. Universidad de Barcelona, España.
- Grand RJ, and Owen D. *The biochemistry of ras*. *Biochem J*. (1991). 279: 609–31.
- Hancock JF, Magee AI, Childs JE, and Marshall CJ. *All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated*. *Cell*. (1989). 57:1167-77.

- Harvey J., Berger, M. D. et al. *Radionuclides assesment of left and right ventricular performance*. Radiology Clinics of North America. December. (1980). 18, 3: 441-451.
- Horiuchi, K., Saji, H., Yokohama. A. *Tc(V)-DMS Tumor localization mechanism: a pH-sensitive Tc-(V)-DMS: enhanced target/nontarget ratio by glucose-mediated acidosis*. Nucl. Med. Biol. (1998). 25, 549.
- ICRP 53. *Radiation Dose to patients from radiopharmaceuticals addeundum*. International Comision of Radiological Protection. Oxford (1998). 80: 1 – 10.
- Khaw B. A., et al. *Avidity of technetion glucarate for the necrotic myocardium: in vivo in vitro assesment*. J. Nucl. Cardiol. (1997). 4: 283-290.
- Knapp, F.F., Beets, A.L., Guhlke, S., Zamora, P.O., Bender, H., Palmedo, H. Biersack, H.J. *Availability of rhenium-188 from the alumina-based tungsten-188/rhenium-188 generator for preparation of rhenium-188-labeled radiopharmaceuticals for cancer treatment*. Anticancer Res. (1997). 17: 1783.
- Krenning, E. P., Kwekkboom, D. J., Bakker, W. H., et al. *Somatostatin receptor scintigraphy with $^{111}\text{In-DTPA-D-Phe}^1$ and $^{123}\text{I-Tyr}^3$ -octreotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients*. Eur. J. Nucl. Med. (1993): 20, 716-731.
- Loevinger R, Budinger TF, et al. *MIRD Primer for Absorber Dose Calculations*, Revised edition. The society of Nuclear Medicine, New York, (1991). 12 – 36.

- Meléndez, A.L., Ferro, F.G., Murphy, C.A., Pedraza, L.M., González, Z.M., Tendilla, J.I., García, S.L. *Labeling peptides with rhenium-188*. Int. J. Pharm. (1999). 182: 165.
- Montoya MC, Sepúlveda MJ, Murphy CA y cols. *^{99m}Tc-alendronato, una nueva opción para la gammagrafía ósea*. Rev. Invest Clín (1997). 49: 373 – 377.
- Nadezna, M.V., Tatiana, N.M. and Ljiljana, P.V. “*Coordination complexes of technetium as model compounds for radiopharmaceuticals*”. J. Serb. Chem. Soc. (1995). 60: 641 – 661.
- Navarrete M., Cabrera Luis. *Introducción al estudio de los radioisotopos*. Universidad Nacional Autónoma de México . Facultad de Química. Sección Nuclear. México, D.F. (1993).117-120.
- Ortega Aramburu Xavier, Jorba Bisbal Jaime. *Radiaciones ionizantes. Utilización y riesgos, 2ª edición, Tomo II, ediciones UPC*. (2001). 600.
- Pazo Carracedo Serafín. *Farmacocinética de los medicamentos. Nuevos métodos y criterios para su evaluación*. Edición Díaz de los Santos. Madrid, España. (2001). 60 – 63
- Revueltas M.E. y Delgado Buenrostro N. *Manejo de animales de laboratorio*. FES-Cuautitlán, Cuautitlán Izcalli, UNAM. Estado de México . (1990). 4-11.
- Reubi, J. C., Schar, J. C., Wasser, B., Wenger, S., et al. *Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes SST1-SST5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and therapeutic use*. Eur. J. Nucl. Med. (2000). 27: 273-82.

- Robert Schenter, (509) 376-3935. (2004). reschenter@webtv.net.
- Rowland, Malcolm. *Clinical Pharmacokinetics*. Concepts and Applications. Third edition.. USA. (2000). 479 – 485.
- Schubiger P. August and Gerrit Westera. *Progress in Radiopharmacy*. Kluwer Academic Publishers. U.S.A. (1992). 76-79.
- Schwartz, E., Freese, U.K., Gissmann, L., Mayer, WE., Roggenbuck, Stremmlau, A., Hausen, H. *Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells*. Nature (1985). 314: 111.
- Shimizu, S., Birnbaum, D., Ruley, M.A., Fasano, O., Suard, Y., Edlund, L., Taparowsky, e., Golfarb, M., and Wigler, M. *Structure of ki-ras of the human lung carcinoma cell line Calu-1*. Nature (1983). 304: 497-500.
- Shepard Theresa A., Lockwood Graham F., Aarons Leon J., and Abrahams David I. *Mean Residence Time for Drugs Subject to Enterohepatic Cycling*. Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics. (1989), Vol. 17. 3: 327-345.
- Solomon, D. J. *Expression of cellular oncogenes in human malignancies*. Science. (1984). 224 :256-262.
- Stabin, M.G. MIRDose: *The personal computer software for use in internal dose assessment in nuclear medicine*. J. Nucl. Med. (1996). 37: 538.
- Stabin, M.G., Tagesson, M., Thomas, S.R. *Radiation dosimetry in nuclear medicine*. Appl. Radiat. Isot. (1999). 50: 73.

Stephen Karesh, PhD. *Radiphamaceuticals*. Department of Radiology/Section of Nuclear medicine. *Loyola University Medical Education Network*. Loyola University Chicago, (1997). 1 - 20.

Strauss H. W. *Myocardial perfusion imaging: Perspective from a turbulent twenty five years*. Q. J. Nucl. Med, (1996). 40: 20-26.

Taylor J.E., A.E. Bogden. J. P. Moreau, D.H. Coy, In vitro and in vivo inhibition of human small cell lung carcinoma (NCI-H69) growth by a somastotatin analogue, *Biochem. Biophys. Res Commun*. (1988). 153: 81-86.

Tozer N. Thomas. *Concepts basic to pharmacokinetics*. *Pharmac. Ther.* 1991. 12:109 -131.

Turner, J., Schwartz, K., Logic, J., et al. *Detection of residual jeopardized myocardium 3 weeks after myocardial infarction by exercise testing with thallium-201 myocardial scintigraphy*. *Circulation*. 1980. 61: 729.

Uhl. G.S., Hicckman, J.R., Jr., and Kay, T.D. *Multiple gated acquisition thallium scintigrams with computer enhancement: Improved sensitivity in asymptomatic men with abnormal treadmill test*. (Abstract). *Am. J. Cardiol*. 1980. 45:46B.

Virgolini, I., Traub, T., Novotny, C., Leiner, M., Fuger, B. *Experience with indium-111 and yttrium-90-labeled somatostatin analogs*. *Curr Pharm Des*. (2002). 8:1781-7.

Virgolini Irene Johana M. D. *Chair of the experimental Nuclear Medicine*. Department of Nuclear Medicine University of Vienna Währinger Gürtel 18-20, AKH, ebene 3L Austria. 2005 : 1,2.

- Waibel R., Alberto R., Willuda J., Finnern R., Schibli R., Stichelberger A., Egli A., Abram U., Mach J. P., Pluckthun A., and Schubiger P. A. *Stable one-step technetium-99m labeling of His-tagged recombinant proteins with a novel Tc(I)-carbonyl complex*. Nature Biotech. (1999). 17 (9): 897-901.
- Waibel R. , I. Novak-Hofer, R. Schibli, P. Blauenstein, E. Garcia-Garayoa, R. Schwarzbach, K. Zimmermann, R. Pellikka, O. Gasser, A. Blanc, M. Bruhlmeier, and P. A. Schubiger. *Radiopharmaceuticals for targeted tumor diagnosis and therapy*. Chimia. (2000). 54 (11): 683-688.
- Wiersema A. M. et al. *Early assessment of skeletal muscle damage after ischemia-reperfusion injury using Tc-99m-glucarate*. Cardiovascular Surgery. (2000). 8: 186-191.
- Willuda J., A. Honegger, R. Waibel, P. A. Schubiger, R. Stahel, U. Zangemeister-Wittke, and A. Pluckthun. *High thermal stability is essential for tumor targeting of antibody fragments: Engineering of a humanized anti-epithelial glycoprotein-2 (epithelial cell adhesion molecule) single-chain Fv fragment*. Cancer Res. (1999). 59 (22): 5758-5767.
- Willuda J., S. Kubetzko, R. Waibel, P. A. Schubiger, U. Zangemeister-Wittke, and A. Pluckthun *Tumor targeting of mono-, di- and tetravalent anti p185HER-2 miniantibodies multimerized by self-associating peptides*. (2001).
- WinnonIn. *Programa de computación: Ajuste no-lineal: Measures of fit*. CIA PHARSIGHT, (2000).

Wymenga A.N.M., B. Eriksson, P.I. Salmela, M.B. Jacobsen, E.J.D.G. Van Cutsem, R.H. Fiasse, M.J. Välimäki, J. Renstrup, E. G. E. de Vries, and K.E. Öberg.. *Efficacy and Safety of Prolonged-Release Lanreotide in Patients With Gastrointestinal Neuroendocrine Tumors and Hormone-Related Symptoms*. Journal of Clinical Oncology, (April), (1999). 17: 1111-1117.

Yaoita H. Uehara T., et al. *Distribution of deoxyglucose and Technetium-99-m-glucarate in the acutely ischemic myocardium*. J. Nucl. Med. (1993). 34: 1303-1308.

Zhonglin Liu, MD; Harrison H. Barrett, PhD; and et al. *High-Resolution Imaging with ^{99m}Tc-Glucarate for Assessing Myocardial Injury in Rat Heart Models Exposed to Different Durations of Ischemia with Reperfusion*. J. Nuclear Medicine (2004). 45: 1251-1259.

ABREVIATURAS

MAUC	Modelo abierto de un compartimiento
Cc	Compartimiento central
Cp	Compartimiento periférico
MRT	Tiempo medio de residencia
Ã	Actividad acumulada
%A/g	Porcentaje de actividad por gramo de tejido
MIRD	Medical Internal Radiation Dose
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
keV	Kiloelectrón volt
meV	Milieletrón volt
Bq	Bequerel
Ci	Curie
Gy	Gray
ICRP	Comisión Internacional de Protección Radiológica
RDI	Regiones de interés
DFT	Teoría funcional de densidades
ININ	Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares
INCMNSZ	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición "Salvador Zubirán"
HEDP	Hidroxietilendifosfonatos
LAL	Lisado de amebocitos de limulus
MADC	Modelo abierto de dos compartimientos
mSv/MBq	Milisievert/megabequerel

