

Desarrollo de partículas radiomarcadas con aplicación en medicina nuclear*

V. Pereyra Molina¹, M. G. Argüelles^{1,2}

¹Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Buenos Aires

Dirección de Estudios de Posgrado.

Avenida Medrano 951, Buenos Aires (C1179AAQ), Argentina.

E-mail vivipereyra@yahoo.com

^{1,2}Comisión Nacional de Energía Atómica, Centro Atómico Ezeiza.

Unidad de Actividad Radioquímica y Química de las Radiaciones,

Presbítero Juan González y Aragón N° 15, (B1802AYA), Ezeiza, Buenos Aires, República Argentina.

Resumen

Se realizaron pruebas de tratamiento del dolor y la hinchazón producidos por la artritis reumatoidea mediante radiofármacos, a partir de la utilización del ¹⁶⁶Ho. Este radionucleido, cuyas propiedades (periodo de semidesintegración corto, emisión beta de baja energía y baja contribución de emisión gamma) son muy convenientes para aplicaciones terapéuticas, puede ser producido fácilmente por irradiación de ¹⁶⁵Ho en un reactor nuclear. Se realizó la marcación con ¹⁶⁶Ho de moléculas como los macroagregados de hidróxido férrico, microesferas de ácido poliláctico, hidroxiapatita y microesferas de albúmina; se midió el porcentaje de pureza radioquímica y se investigó el comportamiento de cada uno en animales de experimentación.

Abstract

Trials of treatment of the pain and swelling produced by the rheumatoid arthritis were performed using radiopharmaceuticals, from the use of ¹⁶⁶Ho. This radionuclide, whose properties (short half-life, low energy beta emission and low contribution of gamma emission) are very convenient for therapeutic applications, can be easily produced by irradiation of ¹⁶⁵Ho in a nuclear reactor. Labeling with ¹⁶⁶Ho was made with molecules like ferric hydroxide macro-aggregates, polylactic acid microspheres, hydroxiapatite and albumin microspheres; the percentage of radiochemical purity was measured and the performance of each compound in animal models was investigated.

* Trabajo realizado sobre la base de la tesis presentada por V. Pereyra Molina para optar al grado de Magíster en Radioquímica, bajo la dirección de M. G. Argüelles.

Introducción

La utilización de isótopos radiactivos aprovechando sus características especiales ha permitido avances espectaculares en diversos campos de la actividad humana. Una de las formas de utilización de los compuestos radiactivos con fines clínicos es como trazadores radiactivos " *in vitro* " e " *in vivo* ", así se emplean en Medicina Nuclear (Mallol, 1989).

Un radiofármaco es un trazador radiactivo de uso interno que se utilizará en Medicina Nuclear para el tratamiento o diagnóstico de las enfermedades humanas, tiene dos componentes, el radionucleído y un fármaco. La utilidad del radiofármaco está dada por las características de estos dos componentes (Vera Ruiz, 1993). La radioterapia es la aplicación de las radiaciones ionizantes con fines terapéuticos. En la radioterapia por radiofármacos se aprovecha la capacidad de estos trazadores de acumularse en un órgano blanco para irradiarlo selectivamente. Los radionucleídos a ser empleados con fines terapéuticos serán emisores beta, por ser esta radiación de mayor poder ionizante que la radiación gamma y, por tanto, más activos. La selección de un radioisótopo para una aplicación específica requiere que se tengan en cuenta varios factores, entre ellos las características físicas propias del radionucleído, principalmente el tipo y la energía de la partícula emitida y el período de semidesintegración.

El objetivo es depositar en las células malignas la mayor cantidad de energía dentro del plazo más breve posible y evitar que las células sanas reciban una dosis nociva. La energía depositada se cuantifica con un parámetro llamado Transferencia Lineal de Energía (LET), que varía según el tipo de radiación (α , β , γ). Los radionucleídos con potencial terapéutico que han sido estudiados, decaen por una de las siguientes tres categorías de decaimiento: son emisores de partículas β , de partículas α o de electrones Auger.

En la práctica, los radionucleídos emisores de partículas beta y los que decaen por captura electrónica y emiten electrones Auger son los que tienen mejores perspectivas para convertirse en radionucleídos de uso rutinario en medicina nuclear terapéutica. Esto se debe a que tienen pequeños rangos de penetración al tejido, desde micrometros hasta unos cuantos centímetros. Además, algunos de los radionucleídos emisores de partículas β que ofrecen mejores perspectivas emiten simultáneamente radiación γ , permitiendo la toma de imágenes con cámaras gamma, lo que proporciona valiosa información para el cálculo dosimétrico. Varios ya demostraron su aplicabilidad en medicina nuclear terapéutica, mientras otros que están en fases adelantadas de su investigación clínica y están siendo objeto de intensas investigaciones, son mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1: Radionucleídos con características favorables para radioterapia

Radionucleido	T _{1/2}	Energía beta (MeV)	Energía gamma (keV)
³² P	14,3 d	1,71	-----
⁸⁹ Sr	50,5 d	1,49	909
⁹⁰ Y	2,7 d	2,27	2186
¹³¹ I	8,03 d	0,606	364
¹⁶⁵ Dy	2,3 h	1,34	95
¹⁵³ Sm	1,95 d	0,8	103
¹⁶⁶ Ho	1,1 d	1,6	81
¹⁶¹ Tb	6,91 d	0,51	26
¹⁸⁶ Re	1,1 d	1,6	137
¹⁸⁸ Re	16,98 h	2,11	155
⁶⁷ Cu	2,4 d	0,57	185

Los radionucleídos presentados en la **Tabla 1** tienen períodos de semidesintegración cortos, que varían de horas a días; los rangos de penetración en los tejidos de las partículas beta son del orden de milímetros hasta unos pocos centímetros, lo cual se considera una penetración apropiada para tumores de tamaño pequeño a mediano. Gran parte de éstos también emiten simultáneamente rayos gamma con energías apropiadas.

La principal fuente de radioisótopos beta emisores es el reactor nuclear, a partir de reacción (n,γ) , inducida por neutrones térmicos. Cuando el elemento es bombardeado con neutrones, se forma un núcleo compuesto inestable que decae formando el nuevo núcleo con número de masa $A+1$, mientras se libera energía liberada como cuantos γ . El radionucleído resultante tiene la misma naturaleza química que el elemento del que se partió, hecho que limita la actividad específica (Balaban y colaboradores, 1986).

La artritis reumatoidea (AR) es una enfermedad crónica sistémica que afecta principalmente a las articulaciones, con inflamación, dolor, calor y tumefacción y en los casos agudos se presenta con fiebre. Es más frecuente en mujeres de entre 30 y 40 años y se pueden dar casos de remisiones espontáneas que persisten por varios años.

El tratamiento primario para la artritis reumatoidea incluye medicamentos como aspirina, anti-inflamatorios, drogas citostáticas e inmunosupresivas que traen muchos efectos secundarios. Sin embargo, cuando estos medicamentos ya no son exitosos en el control de la inflamación sinovial, se recurre a la sinovectomía quirúrgica. Ésta consiste en la extracción de la parte inflamada de la articulación. Generalmente se espera que la sinovectomía provea 2 o 3 años de paliación sintomática, pero hay una cantidad de problemas asociados con el procedimiento, como por ejemplo el riesgo que significa una cirugía, la anestesia, además es técnicamente difícil, si no imposible, extraer completamente la línea sinovial inflamada.

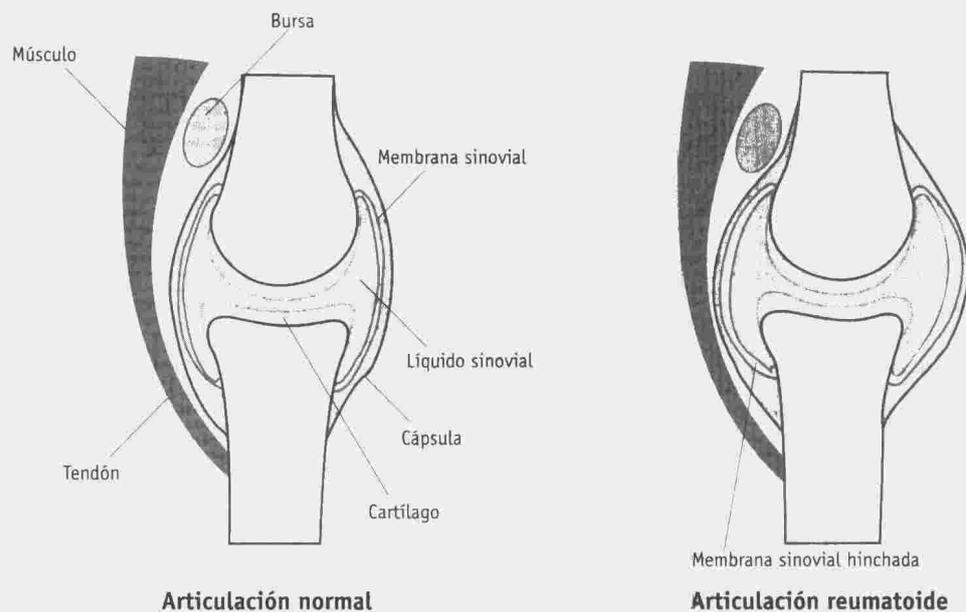


Figura 1. Comparación entre la articulación normal y la articulación reumatoide

El término *radiosinovectomía* significa "restauración" del sinovio por radionucleídos. A través de una aplicación local de agentes radiactivos se hizo un experimento para influenciar el proceso sinovial favorablemente, como una alternativa a la sinovectomía quirúrgica.

En 1963 se utilizó ^{198}Au en forma coloidal como agente para radiosinovectomía, en especial para la articulación de la rodilla. Sin embargo, no se siguió utilizando debido a la dosis no deseada de cuerpo entero, causada por la radiación gamma, y a la difusión de las partículas a los nodos linfáticos y al hígado. En el presente se utilizan emisores β , con una componente mínima o nula de rayos gamma.

La radiosinovectomía consiste en la administración articular de un radionucleído terapéutico, como un emisor beta en forma coloidal o particulada, a la articulación dañada, para reducir la inflamación. Los primeros coloides utilizados fueron preparados con Y-90 y Au-198; menos utilizados fueron los radiocoloides de Er-169, Re-186 y P-32. El radionucleído ideal para radiosinovectomía es un emisor beta puro o con una emisión gamma mínima y con un período de semidesintegración corto. La partícula portadora ideal sería aquella que sea aceptada por el tejido sinovial y pueda ser metabolizada por las enzimas sinoviales; debe formar un complejo estable con el radionucleído, para minimizar la disociación y así evitar la liberación desde la articulación; también debe ser de preparación rápida y no tener propiedades tóxicas o alergénicas.

El uso de ^{166}Ho como radionucleído terapéutico se ha incrementado en los últimos años, en razón de sus características: $T_{1/2} = 26,9$ h, suficiente como para dar la dosis de radiación necesaria; penetración en tejido de la partícula beta ($E_{\text{max}} = 1,84$ Mev) de 8,4 mm, con un promedio de 3,3 mm, ideal para tratamiento de sinovio inflamado de rodilla, el cual es aproximadamente 1-7 mm de espesor, dependiendo de la severidad de la enfermedad. El ^{165}Ho estable, al que se realiza el bombardeo neutrónico, tiene una abundancia de 100 % y una sección eficaz de 64 b, de forma tal que la actividad específica del producto es aceptable (Mumper, 1992).

Idealmente, el método de elección para evaluar los mecanismos patogénicos de la AR, es el estudio de la enfermedad en humanos. Para identificar vías potenciales para futuras intervenciones en AR, son necesarios sistemas de modelos en los cuales pueda ser estudiada una gran variedad de variables. El modelo animal ideal tendría que tener las siguientes características:

- Características clínicas y patológicas similares a las de la AR, con pocas manifestaciones extrañas.
- Susceptibilidad de inducción de la enfermedad en cepas de animales que estén disponibles y no sean caros.
- Acelerada duración de la enfermedad para permitir protocolos de experimentos rápidos.
- Parámetros de actividad de enfermedad y función inmune que sean similar a la AR y puedan ser medibles.
- Severidad e incidencia de la enfermedad.

Existe una variedad de modelos experimentales de AR para:

- Artritis adyuvante
- Inducción de artritis por la pared celular estreptocócica
- Artritis inducida por colágeno
- Artritis inducida por ovoalbúmina
- Artritis inducida por fibrinógeno

Tomando en cuenta las características detalladas, escogimos el modelo de inducción por adyuvante o modelo antígeno-inducido.

Este modelo, originalmente descripto hace más de 35 años, es usualmente inducido con una inyección intradérmica de una suspensión de *Mycobacterium tuberculosis* en aceite. La artritis adyuvante se desarro-

lla dentro de los 11-20 días post-inmunización y parece no tener predilección por sexo (Silberstein y colaboradores, 1992).

Metodología de Desarrollo

El trabajo a realizar puede dividirse en tres partes principales, a saber:

- preparación de un microparticulado adecuado,
- marcación del particulado con distintas técnicas, y
- estudios en animales

El desarrollo de las técnicas utilizadas se detalla a continuación:

Radionucleído

El holmio-166, radioisótopo de un elemento de la serie de los lantánidos utilizado en el estudio, tiene, como se ha mencionado, un período de semidesintegración corto ($T_{1/2} = 26,8$ h), emite partículas beta ($E_{\max} = 1,9$ MeV) y radiación gamma de baja energía ($E = 81$ keV; $i = 6\%$) muy útil para obtener imágenes en una cámara gamma. El radionucleído se obtuvo por captura neutrónica partiendo de un blanco de Ho_2O_3 .

La irradiación se realizó en el Reactor RA-3 del Centro Atómico Ezeiza, Comisión Nacional de Energía Atómica. Se obtuvo una actividad específica promedio de 15 mCi/mg después de 24 h de irradiación con un flujo neutrónico de 10^{13} n/cm² s.

Partículas

Macroagregados de Hidróxido Férrico

Este sistema de partículas se prepara partiendo de una solución de sulfato ferroso; se realiza una co-precipitación con el ^{166}Ho , obteniendo así los macroagregados de hidróxido férrico marcados.

En la estandarización de la técnica se hicieron pruebas en frío para determinar el tamaño de partículas deseado (10-20 μm). Las variaciones sobre el protocolo inicial se hicieron en cuanto al modo de oxidación del Fe (II) a Fe (III):

- **Técnica 1:** precipitación del hidróxido ferroso y oxidación por burbujeo con aire.

Se partió de una solución de sulfato ferroso, por agregado de hidróxido de sodio se obtuvo el precipitado del hidróxido. La oxidación se produjo por burbujeo de aire con jeringa de 10 ml provista de una aguja de 18 1/2. Las partículas o macroagregados de hidróxido férrico se protegieron de la coagulación por agregado de una solución de polivinilpirrolidona (PVP); después del centrifugado se midió el tamaño de las partículas por microscopía óptica.

- **Técnica 2:** en esta técnica se utilizó como reactivo ferroso la sal de Mohr, sulfato ferroso amónico. Los pasos restantes fueron idénticos a los de la técnica 1.

- **Técnica 3:** la oxidación se produjo por agregado de agua oxigenada, que reemplazó al burbujeo con aire.

• **Técnica 4:** por último, en esta variante se partió del sulfato férrico, el sulfato ferroso se oxidó con agua oxigenada, en forma previa a la precipitación del hidróxido.

Sobre la base de los resultados se descartó la técnica 2, ya que no dio buenos resultados. Se siguió trabajando con las otras tres técnicas. Se hicieron otras pruebas en frío, pasando la suspensión de partículas por un sistema de filtros Nylon (MSI inc.) en tándem, en orden decreciente de tamaño: 200 μm ; 20 μm ; 10 μm ; 5 μm .

La medición se hizo por pesada; se pesaron los filtros antes y después y se obtuvieron los porcentajes en cada uno de los filtros.

Los mejores resultados se obtuvieron con la Técnica 1, pero el tamaño de las partículas no era aún el deseado, por lo que se fue observando por microscopía óptica cada paso de la técnica, hasta que finalmente se consiguió el tamaño óptimo, estableciéndose la técnica de la siguiente manera:

■ Reactivos

Se prepararon las siguientes soluciones: Fe^{2+} , como FeSO_4 (Sulfato ferroso heptahidratado, Anhedra) 4 mg/ml en HCl 0,1 N; polivinilpirrolidona, solución conteniendo 16 mg/ml (PVP de BDH Chemicals); polivinilpirrolidona, solución conteniendo 16 mg/ml a pH 9,5; solución fisiológica (NaCl 0,9%, Riedel de Haën).

La solución fisiológica fue esterilizada por autoclave; las soluciones restantes fueron esterilizadas por filtración por membrana (Millipore, 0,22 μm).

■ Preparación

En un frasco, dispuesto dentro de un blindaje de plomo, se colocó 1 ml de la solución de sulfato ferroso y 0,3 ml de la solución radiactiva. En un tubo cónico de centrifuga se colocó 1,1 ml de la solución de hidróxido de sodio 0,4 N y 2,2 ml de solución fisiológica. Se agregó 0,9 ml de la solución radiactiva preparada anteriormente y 1,1 ml de la solución de PVP. La solución fue sometida a aireado, para oxidar al hierro de ferroso a férrico; para esto se utilizó una jeringa de 10 ml con aguja gruesa, se burbujeó en el fondo del tubo repetidas veces hasta que la preparación adquirió un color rojo-naranja.

Se centrifugó por 3 minutos a 1000 rpm, luego se midió la actividad en un calibrador de dosis (Capintec CRC-10). Se descartó el sobrenadante en un recipiente con blindaje y nuevamente se midió la actividad. Se agregó al pellet 5 ml de PVP pH 9,5 y se sometió nuevamente a aireado del preparado, pero esta vez con una pipeta Pasteur, para no modificar el tamaño de las partículas. Se centrifugó y midió la actividad del pellet de la misma forma que la primera vez. Se calculó el rendimiento de marcación como el porcentaje de esta medición con relación a la actividad inicial.

Luego se resuspendió el pellet con 5 ml de solución fisiológica; se colocó en un frasco, se midió la actividad y se esterilizó en autoclave. Cuando hubo sospechas de que hubiera quedado actividad en el sobrenadante, se repitió el lavado con solución fisiológica.

■ Control del tamaño

La medición del tamaño de las partículas se realizó de 2 formas:

1. En frío: ausencia de radiactividad
2. En caliente: coprecipitación con Ho-166.

Para la medición del tamaño en frío, se realizó la técnica de la misma forma que con material radiactivo, pero se sustituyó a éste por igual cantidad de agua destilada. La medición del tamaño se realizó por microscopía, con un microscopio con ocular micrométrico.

Para la medición en caliente, la solución radiactiva se pasó por una serie de membranas filtrantes de Nylon (MSI inc.), de tamaño decreciente de poro:

100 ; 80 ; 60 ; 40 ; 30 ; 20 ; 10 ; 5 ; 1.2 μm

de la siguiente manera: 1 ml de la suspensión de partículas homogeneizada con una pipeta Pasteur, se filtró por la primera membrana. Se recogió el filtrado en un frasco (con blindaje), se lavó la membrana con 1 ml de agua y se recogió en el mismo frasco. Se pasó al siguiente filtro el contenido total del frasco, en el cual se procedió de la misma manera que con el primer filtro. De esta manera se siguió hasta el filtro de menor tamaño.

Se midieron todos los filtros y todos los frascos; la suma total representó el 100% de la actividad y así se obtuvo el porcentaje para cada filtro.

■ Control de estabilidad

En las pruebas de estabilidad se analizó la liberación del radionucleído de su unión con la partícula. Para esto se reservó la preparación y a 24 h, 48 h y 72 h, se volvió a centrifugar; se midió el sobrenadante y el pellet. Se efectuó un lavado con solución fisiológica y se volvió a centrifugar, se midió el sobrenadante y el pellet.

Toda la actividad debe permanecer en el pellet; no debe haber ninguna liberación de actividad al sobrenadante.

Microesferas de ácido poli L-láctico (PLA)

En este caso se trata de microesferas preparadas con Ho-165 para ser irradiadas posteriormente. En primer lugar, se preparó el complejo acetyl acetato de holmio. Éste se agregó al PLA y se emulsionó en alcohol polivinílico (PVA). Por evaporación controlada del solvente se obtuvieron las microesferas.

Las microesferas así preparadas se irradiaron en el reactor para producir ^{166}Ho .

■ Reactivos

- Ácido Poli(L) Láctico (ICN)
- Alcohol Polivinílico (ICN)
- Cloroformo (Merck)
- Ho_2O_3 (Aldrich)
- Agua desionizada
- 2,4 pentanodiona (Aldrich)
- Amoníaco (Merck)
- HCl (Merck)

■ Preparación del complejo de ^{165}Ho - acetilacetato ($^{165}\text{Ho-AcAc}$)

Se disolvieron 100 mg de Ho_2O_3 en la mínima cantidad requerida de HCl y se diluyó con agua hasta 1,0 ml. Por otro lado se tomó 1,54 ml de acetilacetona y se diluyó hasta 20 ml con agua. Esta solución se agregó, por goteo lento, a la solución de cloruro de holmio. El pH se ajustó a 7 con amoníaco. Se cuidó que el pH no subiera de 8 para evitar la precipitación de $\text{Ho}(\text{OH})_3$.

La mezcla se agitó por 12 horas para asegurar una reacción completa. Se obtuvo un precipitado de acetilacetato de holmio. Se filtró y se secó al vacío por 24 h. Se mantuvo en desecador hasta su uso.

■ Preparación de las Microesferas de PLA - $^{165}\text{Ho-AcAc}$

Se disolvieron 100 mg del complejo $^{165}\text{Ho-AcAc}$ y 200 mg de PLA en 10 ml de cloroformo; esta solución fue lentamente añadida, y con agitación continua, a una solución de PVA al 2% en agua desionizada. Se mantuvo en agitación por 15 minutos; se formó una emulsión que fue transferida a un evaporador rotatorio, a temperatura ambiente, previo agregado de 100 ml de agua desionizada. Una vez que se hubo evaporado todo el cloroformo las microesferas obtenidas se filtraron y se lavaron con 800 ml de HCl 0,1 N para remover el exceso del complejo $^{165}\text{Ho-AcAc}$. Se volvieron a filtrar y se lavaron con agua desionizada. Se dejaron en desecador.

■ Control del tamaño en frío

Se determinó el tamaño de las microesferas por microscopía óptica.

■ Determinación de la concentración de Holmio en las Microesferas por Fluorescencia de Rayos X por Reflexión Total (TRXRF)

En la técnica para el análisis por TRXRF, se utilizó 1 ml de la muestra a la que se agregó 10 μl de galio como estándar interno. Se sembró 10 μl de la mezcla y se evaporó con reflectores de cuarzo. Los estándares de referencia se prepararon diluyendo una solución de holmio de 500 ppm, preparada a partir de Ho_2O_3 calcinado para asegurar la estequiometría del mismo. Los estándares fueron adicionados con igual concentración de galio que las muestras. Se tomaron 10 μl de cada estándar y se trataron de la misma forma que la muestra.

Se tomaron los espectros de la muestra y de los estándares. Para la determinación de la concentración de holmio se midieron los picos de holmio (LX) y galio (KX), realizando una curva de regresión por cuadrados mínimos donde la variable dependiente fue la relación de intensidad $\text{Ho}(\text{LX})/\text{Ga}(\text{KX})$ y la independiente fue la concentración de holmio.

■ Irradiación de las Microesferas de Poliláctico

Se irradiaron las microesferas de poliláctico para los análisis in vitro usando inositol como diluyente y protector contra la radiación. Se hicieron pruebas en las siguientes proporciones:

- 1/3 (Microesferas/Inositol)
- 1/6 (Microesferas/Inositol)
- 1/12 (Microesferas/Inositol)

Las pruebas se realizaron en el Reactor RA-3 del Centro Atómico Ezeiza, a un flujo de 10^{15} n/cm²s

Microesferas de Albúmina

Para obtener las microesferas se formó una emulsión de albúmina de suero humano (HSA) con aceite de oliva. Esta emulsión se calentó para desnaturalizar la HSA; la suspensión luego se enfrió y se filtró para descartar las partículas que no tuvieran el rango de tamaño deseado.

■ Reactivos

- Aceite de oliva
- Albúmina de Suero Humano al 10% (Immuno AG)
- n-Hexano (Carlo Erba)
- Ciclohexano (Carlo Erba)
- Metil Etil Cetona (Dorwil)

■ Preparación

En un vaso de precipitados de 600 ml se colocaron 200 ml de aceite. El vaso se sumergió en un baño de glicerina y se agregó un agitador mecánico (agitando el aceite). La agitación se inició a 800-900 rpm y se comenzó a agregar la solución de HSA con una jeringa gota a gota (3,2 ml). Terminado el agregado se comenzó el calentamiento hasta 140-160 °C en un intervalo de 40 minutos. Se mantuvo esa temperatura por una hora. Transcurrido ese lapso la suspensión se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con 200 ml de n-hexano. La suspensión obtenida se pasó por una malla filtrante (75 µm). Las partículas se lavaron sucesivamente con 100 ml de ciclohexano, 100 ml de etanol y 100 ml de metilcetona (MEC).

■ Control del tamaño en frío

Se realizó utilizando un microscopio óptico con ocular micrométrico. También se obtuvieron imágenes fotográficas de microscopía electrónica de barrido.

■ Marcación con ¹⁶⁶Ho

La marcación se realizó en 2 pasos:

• Preparación del complejo ¹⁶⁶Ho-citrato

En un frasco con blindaje adecuado se mezclaron 15 mg de ácido cítrico con 1 ml de ¹⁶⁶Ho en HCl 0,1 N, hasta disolución. Se dejó por una hora para la estabilización del complejo.

• Marcación

Se suspendieron 20 mg de microesferas en 1 ml de agua destilada, se agregó una gota de solución 10% de Tween 80. Se colocó el frasco en un blindaje y se agregó 50 µl del complejo ¹⁶⁶Ho-citrato. Se dejó por 30 minutos; en este lapso se agitó en vortex cada 5 minutos. Se agregó 4 ml de solución fisiológica y se centrifugó. Se volvió a lavar con otros 4 ml de solución fisiológica. Se midió la actividad del sobrenadante y del pellet. Finalmente, se resuspendió en 4 ml de solución fisiológica.

■ Control del tamaño en caliente

La solución radiactiva se pasó por una serie de membranas filtrantes de Nylon (MSI inc.), de tamaño decreciente de poro:

100 ; 80 ; 60 ; 40 ; 30 ; 20 ; 10 ; 5 ; 1,2 μm

de la siguiente manera: 1 ml de la suspensión de microesferas se filtró por la primera membrana y se recogió el filtrado en un frasco (colocado dentro de un blindaje adecuado). Se lavó la membrana con 1 ml de agua y se recogió en el mismo frasco. Se pasó al siguiente filtro el contenido total del frasco y se procedió de la misma manera que con el primer filtro. De esta manera se siguió hasta el filtro de menor tamaño.

Se midieron todos los filtros y todos los frascos, la suma total representó el 100% de la actividad y así se obtuvo el porcentaje para cada filtro.

■ Control de estabilidad

En las pruebas de estabilidad se analizó la liberación del radionucleído de su unión con la partícula. Para esto se reservó la preparación y a 24 h, 48 h y 72 h, se volvió a centrifugar y se midió el sobrenadante y el pellet. Se lavó con solución fisiológica y se volvió a centrifugar; se midió el sobrenadante y el pellet.

Toda la actividad debe permanecer en el pellet, no debe haber ninguna liberación de actividad al sobrenadante (estabilidad del 100%).

■ Hidroxiapatita (HA)

Las partículas de HA son preparadas por reacción de nitrato de calcio y fosfato de amonio a pH elevado. Se forma un precipitado voluminoso, se lo separa por decantación y se lo lava con agua caliente, se seca a 150 °C y luego se deja una hora a 240 °C para remover el nitrato de amonio. Se realiza un fuerte calentamiento a 800 °C por una hora.

■ Reactivos

- Nitrato de calcio tetrahidratado (Riedel de Haën)
- Fosfato ácido de diamonio (Berna)
- Agua bidestilada
- Tween 80

■ Preparación

- **Solución A** : se disolvió el nitrato de calcio (2,35 g) en 9 ml de agua destilada, se llevó a pH 12 con amoníaco y se completó a volumen final de 18 ml con agua destilada.
- **Solución B** : se disolvió el fosfato ácido de amonio (0,79g) en 17 ml de agua destilada y se llevó la solución a pH 12 con amoníaco. Se diluyó con agua destilada hasta un volumen final de 27 ml con agua destilada.

Se sometió la solución A a una intensa agitación, mientras se añadió la solución B gota a gota muy lentamente. Se formó un precipitado blanco, se calentó a 100 °C por 10 minutos y se dejó reposar toda la noche. Al día siguiente se filtró con ayuda de un embudo Buchner y se lavó el precipitado con agua ca-

liente. Se pasó el filtrado a una cápsula de porcelana y se secó en estufa a 150 °C. Luego se calentó a 220 °C por una hora, para liberar el nitrato. Finalmente se calentó en mufla a 800 °C por una hora .

■ Control del tamaño en frío

El rango de las partículas se estudió utilizando un microscopio óptico con ocular micrométrico.

■ Marcación con ¹⁶⁶Ho

Se realizó en forma similar a la marcación de microesferas de albúmina.

■ Control de tamaño en caliente

Se realizó en forma similar al efectuado en microesferas de albúmina.

■ Control de estabilidad

Se realizó en forma similar al efectuado en microesferas de albúmina.

■ Estudios en Modelo Animal

Los estudios en animales se dividieron en:

- Retención en ratas
- Retención en conejos normales
- Biodistribución en conejos con artritis experimental

Inducción de artritis reumatoidea en animales de experimentación

El modelo de artritis antígeno inducida es utilizado para inducir la enfermedad en conejos blancos New Zealand. Estos animales exhiben una condición muy similar a la artritis reumatoidea humana por un período de por lo menos 30 semanas. Se produce una inflamación sinovial, ocasionando hipertrofia y la destrucción del cartílago.

Los materiales utilizados fueron:

- Conejos blancos New Zealand, con un peso entre 2,5-3 kg.
- Ovoalbúmina disuelta en solución fisiológica, esterilizada por filtro Millipore de 0,45 μm y liofilizada.
- Adyuvante completo de Freund (*Mycobacterium butyricum* en aceite de parafina).

Para su uso, la ovoalbúmina fue primero disuelta en solución fisiológica, esterilizada por filtro millipore de 0,45 μm y liofilizada; luego fue reconstituida con agua destilada estéril hasta lograr una concentración de 20 mg/ml. Esta solución de ovoalbúmina fue emulsionada con igual volumen de Adyuvante de Freund, con lo cual quedó una concentración final de 10 mg/ml.

Catorce conejos fueron sensibilizados con 1 ml de esta emulsión, dividido en 5 inyecciones intradérmicas de 0,2 ml cada una, administradas entre las escápulas. A las tres semanas se repitió el programa de sensibilización.

Después de otras 3 semanas los animales fueron sometidos a un " Skin Test " que se realiza para verificar que los animales estén sensibilizados a la ovoalbúmina. Para esto, se preparó una solución de ovoalbúmina con una concentración de 1 mg/dl, se administró 0,1 ml en el margen del pabellón auditivo de cada conejo, a 4 cm del ápice de la oreja. Se midió el calibre de la oreja en el lugar de inyección y la temperatura rectal. Al día siguiente se realizaron las mismas mediciones. Los conejos que fueron sensibilizados debieron presentar una pápula en el lugar de inyección como reacción a la ovoalbúmina, los conejos que dieron el test positivo se incluyeron en el experimento.

Se dividieron los animales en 2 grupos:

- **Grupo Control:** Se indujo la respuesta sinovial en la rodilla del animal para observar el desarrollo de la enfermedad.
- **Grupo Experimentación:** Se indujo la respuesta sinovial en la rodilla del animal y se inyecta el radiofármaco para evaluar la liberación de la rodilla enferma.

En 17 rodillas de animales pertenecientes a ambos grupos, se inició la respuesta sinovial, para esto, cada animal sensibilizado recibió por vía intra-articular en la rodilla, una inyección de 0,3 ml de ovoalbúmina (10 mg/ml). El resto de rodillas se dejaron sanas, sin sensibilización, para tenerlas como control de la evolución normal del animal. El avance de la patología se evaluó por medición del calibre de la rodilla, enrojecimiento, hinchazón y cambio de temperatura en la articulación.

■ Estudios de retención del radiofármaco en animales de experimentación

• En conejos

Para evaluar la retención del radiofármaco en rodilla, se hizo una inyección intra-articular de 0,3 ml del radiofármaco en la rodilla derecha del animal enfermo. A las 4 y las 24 horas se obtuvieron imágenes en cámara gamma usando un colimador de alta resolución (se midieron 500000 cuentas con una matriz de pixels de 128 x 128).

• En ratas

La biodistribución del $^{166}\text{HoCl}_3$ y del radiofármaco se realizó en ratas cepa Wistar, con un peso de 200 – 300 g. Se dividieron a los animales en 2 grupos:

Grupo 1: se inyectó $^{166}\text{HoCl}_3$ en la rodilla derecha de la pata trasera

Grupo 2: se inyectó $^{166}\text{Ho-FHMA}$.

A 24, 48 y 72 horas se hizo una biodistribución, método utilizado en laboratorio para conocer la distribución biológica del radiofármaco que estamos probando. Se tomaron muestras de sangre por punción cardiaca, hígado, bazo, estómago, intestinos, vejiga urinaria, riñones, pulmones. Se midió la actividad de cada órgano en un calibrador de dosis, y el porcentaje de retención en la articulación se obtuvo por diferencia de la actividad en la articulación y la suma de la actividad del resto de los órganos. Se hicieron los respectivos cálculos de decaimiento para cada caso.

Resultados

■ Estandarización de la técnica de obtención de Macroagregados de Hidróxido Férrico

Con las técnicas 1, 3 y 4 se obtienen partículas con tamaños de 5 μm - 40 μm , los cuales se acercan al tamaño óptimo. Con la técnica 2 se obtuvieron partículas con tamaños de 40 -- 60 μm .

La técnica 2 se descartó porque el tamaño de partículas obtenido excedía el tamaño deseado. Con las otras 3 técnicas se hicieron pruebas en frío, pasando la suspensión de partículas por un sistema de filtros en tándem, la medición se hizo por pesada y finalmente se eligió la técnica 1 para el desarrollo de los macroagregados de hidróxido férrico por presentar menor porcentaje de partículas de tamaño mayor al requerido que las obtenidas con la técnica 3.

■ Preparación de ^{166}Ho -Macroagregados de Hidróxido Férrico

Se prepararon las partículas por coprecipitación del ^{166}Ho y el sulfato ferroso, utilizando la técnica elegida en las pruebas realizadas en frío.

Siguiendo la coprecipitación inicial del hidróxido férrico, se observó que la actividad incorporada en el precipitado fue del 98 %, después de la resuspensión con PVP y la centrifugación, más del 90 % de la actividad estaba en el precipitado y el restante 10 % quedó en la solución remanente. Una segunda resuspensión y centrifugación no reduce la actividad en el precipitado. El procedimiento total llevó alrededor de 30 minutos, con un rendimiento final mayor al 90%.

■ Control de tamaño en caliente

Se realizó con el sistema de filtros en tándem: más del 90 % de las partículas se encuentra en un rango de tamaño de 20 micrones.

■ Control de estabilidad

Las pruebas de estabilidad se realizaron a 24, 48 y 72 horas, post – preparación. El pellet fue resuspendido, centrifugado y medido; el precipitado se mantuvo estable y no se perdió actividad en el sobrenadante hasta las 72 horas después de la preparación.

■ Preparación de microesferas de ácido poli L-láctico

Se realizó una prueba inicial de preparación de las microesferas sin la incorporación del holmio, con el objetivo de estandarizar la técnica de preparación de las microesferas y observar su formación por microscopía óptica.

Se disolvió el ácido poliláctico en cloroformo y fue añadido lentamente a la solución de alcohol polivinílico; se cuidó mucho la parte de la evaporación, ya que es un paso importante para la formación de las microesferas. Primero se realizó la evaporación a baja temperatura y luego se estandarizó la evaporación a temperatura ambiente en el evaporador rotatorio, cuidando que no quedara nada de cloroformo en la solución, porque se podían redisolverse las microesferas y bajar el rendimiento.

Una vez que se alcanzó la formación correcta de las microesferas, se procedió a la preparación de las mismas con el complejo $^{165}\text{Ho-AcAc}$.

Se procedió primeramente a la disolución del Ho_2O_3 en HCl , cuidando en todo momento el pH del preparado para evitar la precipitación de $\text{Ho}(\text{OH})_3$.

Una vez obtenido el complejo $^{165}\text{Ho-AcAc}$, se hizo la prueba de disolución en cloroformo; hubo disolución

completa por lo tanto se procedió a la preparación de las microesferas siguiendo la técnica detallada en Metodología.

Se obtuvieron las microesferas de poliláctico con un rendimiento de 54 %.

Control de tamaño en frío

El control de tamaño se realizó por microscopía óptica utilizando las microesferas de poliláctico sin irradiar; el tamaño de las microesferas en un 90 % no sobrepasó los 20 μm , tamaño ideal para nuestro propósito. Una fotografía de las microesferas puede observarse en la Figura 2.

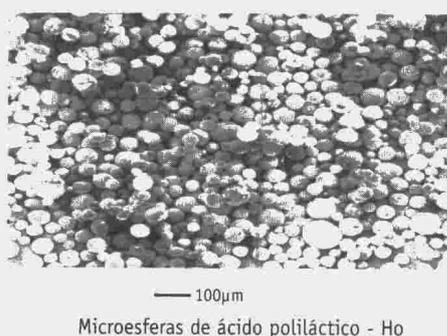


Figura 2. Microesferas de Poliláctico (Fotografiadas en Microscopio de Barrido Electrónico)

■ Determinación de la concentración de Holmio en las Microesferas por Fluorescencia de Rayos X por Reflexión Total (TRXRF)

Para la determinación de la concentración de holmio en las microesferas, se dividió la muestra en 2 partes:

- 1 Parte sólida: Microesferas de Poliláctico
- 2 Parte Líquida: Sobrenadante

Con cada una de ellas se realizaron espectros para la determinación de la concentración, se midieron los picos de holmio (muestra) y galio (estándar) y se determinaron las concentraciones.

El espectro de las microesferas de polilactico se muestra en la Figura 3.

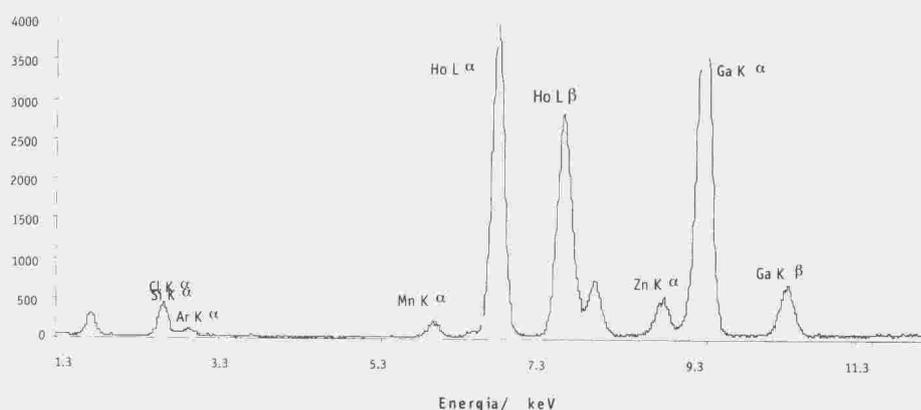


Figura 3. Espectro de la muestra 1 realizado por TRXRF

Los resultados de las mediciones en los espectros se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultado de las mediciones realizadas por TRXRF

Muestra	ppm de Holmio	Concentración de Holmio (%)
Muestra 1	60	75
Muestra 2	20	25

Como observamos en la tabla, nuestra muestra tiene un 75% de holmio incorporado en las microesferas; el restante 25% quedó en el líquido sobrenadante.

■ Irradiación de las microesferas de poliláctico

La irradiación se realizó en el reactor RA-3 del Centro Atómico Ezeiza a un flujo neutrónico de 10^{13} n/cm²s. Para proteger a las microesferas de la radiación se utilizó Inositol como diluyente, primero en una proporción de 1/3 (Microesferas/Inositol) y se las irradió por 6 horas. Se obtuvieron malos resultados, ya que todas las microesferas se fundieron en el can de irradiación; se probó entonces con dos proporciones más, 1/6 y 1/12, las cuales tuvieron el mismo tiempo de irradiación.

Con la proporción 1/6 la masa recuperada fue del 24 % y el color cambió a marrón, con la proporción 1/12 la masa recuperada fue de 73 % y también cambió a color marrón.

Los resultados obtenidos de las irradiaciones fueron los siguientes:

• Primera Irradiación

A los 5 días post-irradiación, se observaron los siguientes picos gamma:

⁸²Br: 221,5; 554,2; 619,3; 698,6; 776,4; 827,8; 1044,4; 1317,4; 1475,0

¹³³Ba: 276,0; 302,4; 355,8; 383,8

¹⁹⁸Au: 411,8

²⁴Na: 1368,8

A los 12 días post-irradiación se encontraron pequeños picos de ⁵¹Cr, ⁴⁶Sc, ⁶⁵Zn y ⁶⁰Co.

• Segunda irradiación

A los 3 días post-irradiación se detectaron los mismos picos gamma encontrados en la primera irradiación.

A los 13 días post-irradiación se encontraron pequeños picos de ⁵¹Cr, ⁸²Br, ⁴⁶Sc y ⁶⁰Co.

■ Preparación de microesferas de albúmina

Se prepararon siguiendo la técnica detallada en Metodología y se realizaron los controles necesarios.

■ Control de tamaño en frío

Se hizo un control de tamaño en frío por microscopía óptica, más del 70 % de las microesferas está en un rango de tamaño de 20 μ m. Las fotografías en microscopio de barrido electrónico se indican en la Figura 4.

■ Marcación de las microesferas de albúmina

■ Control de tamaño en caliente

La mayoría se encuentra en los filtros de 20 μm .

■ Control de estabilidad

Se hicieron pruebas a 24, 48 y 72 horas de la marcación y se obtuvo un 99 % de estabilidad hasta las 72 horas.

■ Estudios en Modelo Animal

• Estudios de retención en conejos

Se obtuvieron imágenes en cámara gamma a 4 y 24 horas de la inyección. En el tiempo estudiado no hubo liberación de actividad desde el sitio de inyección.

• Estudios de retención en ratas

Se realizaron pruebas con 20 ratas cepa Wistar a las que se les hizo una inyección intra-articular primero con $^{166}\text{HoCl}_3$ y obtuvimos los valores de liberación y retención en articulación que se indican en la Tabla 3:

Tabla 3. Pruebas de retención en ratas con $^{166}\text{HoCl}_3$

Hora	Porcentaje de retención (%)
48	24,3
72	25,85

Luego se hicieron pruebas inyectando las partículas y se hicieron mediciones a las 24, 48 y 72 horas. Los resultados se indican en la Tabla 4.

Tabla 4. Pruebas de retención en ratas con $^{166}\text{Ho-FHMA}$

Hora	Porcentaje de retención (%)
48	100
72	100

Conclusiones

- En la preparación de las partículas, los materiales más apropiados para obtener un tipo de partículas adecuado (5-20 μm) fueron los macroagregados de hidróxido férrico y las microesferas de poliláctico, ambos con 90 % de rendimiento.
- La mejor técnica para la obtención de macroagregados de hidróxido férrico fue la oxidación por burbujeo con aire.
- El mayor rendimiento de marcación se presentó en los macroagregados de hidróxido férrico con un porcentaje mayor al 90 %.
- La hidroxiapatita alcanza un rendimiento de marcación del 83 % con una relación actividad/masa de 1:1. Las microesferas de poliláctico y las microesferas de albúmina presentan un rendimiento del 75 % y 35 % respectivamente.
- Los macroagregados de hidróxido férrico tienen el mayor porcentaje de estabilidad de marcación con respecto al tiempo (100 % a las 72 horas).
- Tomando en cuenta los parámetros de tamaño de la partícula, rendimiento de marcación y estabilidad del radiofármaco, el material más adecuado para el trabajo con modelos animales consiste en macroagregados de hidróxido férrico.
- En las pruebas con animales, las pruebas de retención del radiofármaco en conejos no mostraron liberación de actividad desde la articulación a 4 y 24 horas.
- Las pruebas de biodistribución en ratas no mostraron liberación de actividad en un período de estudio de 72 horas.
- No existe diferencia en las pruebas de retención del radiofármaco entre modelos animales sanos y enfermos.
- Las pruebas con $^{166}\text{HoCl}_3$ en modelos animales muestran un porcentaje de retención del 25,85 % a las 72 horas.

Discusión

En la estandarización de la técnica de obtención de macroagregados de hidróxido férrico, la oxidación por burbujeo con aire presentó los mejores resultados con un 90 % de partículas dentro del rango apropiado de tamaño. Las otras tres técnicas presentaron un elevado porcentaje de partículas de tamaño superior al límite máximo requerido.

Las microesferas de poliláctico presentan un 90 % de distribución de partículas entre 5 y 20 micras. Las microesferas de albúmina tienen un 25 % de partículas con un tamaño superior a 20 micras al igual que las partículas de hidroxiapatita.

El rendimiento de marcación para las partículas de hidróxido férrico fue mayor al 90 % con una estabilidad del 100 % hasta las 72 horas. Las microesferas de poliláctico presentaron un rendimiento del 75 % de incorporación de ^{165}Ho . Sin embargo, después de la irradiación se logró recuperar un 73 % de la masa inicial. El rendimiento de marcación para las microesferas de albúmina fue del 35 % con una estabilidad del 60 % hasta las 72 horas, finalmente las partículas de hidroxiapatita presentaron un rendimiento de marcación del 83 % con una estabilidad del 99 % hasta las 72 horas.

Para realizar las pruebas con modelos animales se eligió la partícula con mejores características en cuanto al tamaño, rendimiento y estabilidad. Se seleccionaron los macroagregados de hidróxido férrico como las partículas más adecuadas para la preparación del radiofármaco por estudiar. Sin embargo, las microesferas de poliláctico son la segunda opción más interesante para posteriores estudios.

Se trabajó con modelos animales sanos y enfermos experimentalmente sin encontrar diferencia en cuanto a las pruebas de retención del radiofármaco; estas pruebas se realizaron por biodistribución y usando una gamma cámara planar. Se realizó una prueba con $^{166}\text{HoCl}_3$ sin partículas como control para las pruebas de retención, observando un porcentaje bajo de retención (25,85%); por lo tanto vemos la utilidad de nuestras partículas como un medio apropiado para la permanencia del radiofármaco en el interior de la membrana sinovial de la articulación de la rodilla.

Estos resultados pueden ser utilizados como un punto de partida para estudios en pacientes con un seguimiento clínico adecuado.

Referencias

BALABAN, A.; GĂLĂTEANU, I.; GEORGESCU, G.; SIMIONESCU, L. (1986) Labeled compounds and radiopharmaceuticals, John Wiley & Sons.

MALLOL, J. (1989) Radiofarmacia. Editorial Interamericana-McGraw Hill, España.

MUMPER, J. (1992) Formation and stability of lanthanide complexes and their encapsulation into polymeric microspheres. *J Phys Chem* 96, 8626-8631.

SILBERSTEIN, E. B.; ABDELHAMID, E. H.; KAPILIVSKY, A. (1992) Phosphorus-32 radiopharmaceuticals for the treatment of painful osseous metastases. *Seminars in Nuclear Medicine* 12, 17-27.

VERA RUIZ, H. (1993) Radiofármacos como agentes terapéuticos en la atención y tratamientos médicos. *Boletín OIEA* 1, 24-27.