

Pruebas biológicas del anticuerpo monoclonal IOR-CEA1 marcado con ^{131}I , por el método de la cloramina t, para el diagnóstico precoz de enfermedades relacionadas con el adenocarcinoma embrionario

Roberto Koga¹ rkoga@ipen.gob.pe, Manuel Otero¹ motero@ipen.gob.pe,
José Caballero¹ jcaballero@ipen.gob.pe

¹ Planta de Producción de Radioisótopos –PPR-RAIS – IPEN / Lima-Perú.

Resumen

El CEA es una glicoproteína que se encuentra muy concentrada en el propio tejido tumoral, pero escasamente elevada en el suero. Este marcador es útil en casos de cáncer colorectal, aumentado la concentración del antígeno con relación al estadio de la enfermedad. Una vez estandarizada la técnica de marcación, obteniendo una pureza radioquímica (PRQ) 97.57% con una estabilidad de seis días post-marcación, se procedió a realizar las evaluaciones biológicas de este anticuerpo (distribución biológica (DB), toxicidad aguda, esterilidad y pirógenos) en ratones sanos de la variedad Balb/c. Para las pruebas de DB, después de 24 horas de la inyección del anticuerpo Monoclonal (AcMo), se aloja en mayor concentración en los órganos específicos (intestino, hígado y estómago), siendo el mejor momento para realizar la toma de imágenes. Con respecto a las demás pruebas biológicas se concluye que tenemos un producto estéril, no tóxico y libre de pirógenos.

1. Materiales y Métodos

Anticuerpo monoclonal (AcMo):

IOR-CEA1 de origen murino, utilizado para el diagnóstico y seguimiento con pacientes con cáncer colorectal. Este reactivo fue donado por el OIEA, proyecto ARCAL LII.

Método de marcación:

Materiales:

Na^{131}I 100mCi/mL, para diluir se utiliza Buffer fosfato 0,25M pH=7,5; 2 mg/mL de Cloramina T, 2,4 mg/mL de L-Cysteina, 0,5 – 1,0 mg/mL de IOR-CEA1 todas los reactivos y se diluye con Buffer Fosfato 0,05M pH=7,5.

Método de marcación:

0,5-1,0mCi (5-10uL) de Na^{131}I , dispensado en un tubo de poliestireno, Agregue rápidamente a este tubo de poliestireno 50 a 100uL de una solución Buffer Fosfato 0,25M pH = 7,5. Se homogeniza con la ayuda de un vortex, luego se adiciona 10uL (5 a 10ug) de la solución del AcMo IOR-CEA1, luego agregar 25 μL de Cloramina T e incubar por 60 segundos, para detener la reacción de oxidación se le agrega 50uL L-cysteina.

Luego, se toma toda la solución y se la vierte a una columna PD-10 (previamente ha sido lavada con una solución Buffer Fosfato 0,05M). Una vez colocada la solución dentro de la columna PD-10, se lleva a un calibrador y se mide la actividad (Actividad Inicial).

Posteriormente, se agrega una solución buffer Fosfato 0,05M que contiene 2% de albúmina bovina y se colecta la muestra mililitro por

mililitro, dentro de unos tubos de vidrio, aproximadamente se colectan 20 muestras, cada tubo se lleva al calibrador para poder ubicar la molécula marcada.

Luego, se mide la actividad de la columna PD-10 para determinar el porcentaje de retención que hay en la columna.

a) Prueba de esterilidad

Para la determinación de la esterilidad del producto se utiliza dos medios de cultivos: Caldo Tripticasa de Soya (detección de microorganismos aerobios y mohos) y Caldo Tioglicolato (detección de microorganismos, anaerobios), procedimiento descrito en la USP 24 pp. 1818.

b) Toxicidad aguda

Para determinar la toxicidad aguda del ligando, se inyecta 0.1mL de solución de la molécula marcada, evaluar los ratones por un espacio de 1 a 2 semana.

c) Determinación de endotoxinas por el método de LAL

Se realiza una dilución de 1/200 del AcMo con agua despirogenada, homogenizando con la ayuda de un vortex por espacio de 30 segundos; con una jeringa se toma 0.2 ml se agrega al tubo LAL control negativo e igual cantidad al control positivo. Incubar por 1 hora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1$ en baño maría.

Pasado el tiempo de incubación, el tubo de control positivo debe formarse una fase sólida y el control negativo mantenerse en fase líquido.

d) Distribución biológica

Se trabajo con ratones sanos de la variedad Balb/c, machos, edad aproximada de 6 meses y con un peso promedio de 33g±2.

Inyectándole 0.1ml de una solución estéril del IOR-CEA1 marcado con ¹³¹I, por vena caudal a cada ratón, con una actividad de 50 a 100uCi.

Los ratones fueron sacrificados a las 4, 24, 48 y 72 horas post-inyección. Posteriormente realizando la disección, extracción y pesado de los diferentes órganos. Realizando la medición de actividad de los órganos en el contador gamma CANBERRA con detector NaI (TI) tipo pozo. Determinándose posteriormente el porcentaje de dosis de inyección de cada órgano.

2. Resultados

De los siete lotes analizados para los ensayos de esterilidad, se encontró que en ninguno de los lotes hubo crecimiento microbiano (Tabla 1).

Para esta prueba se realizaron tres ensayos, en cada ensayo se utilizó dos ratones de la variedad Balb/C. En el primer ensayo de toxicidad aguda, se inyectó el producto a los ratones y se les observó por espacio de una semana inicialmente, para verificar que el IOR-CEA1 marcado I¹³¹ no causaba algún efecto colateral. Como en la primera semana no se observó ninguna anomalía se decidió extender las observaciones por otra semana más, obteniendo igual resultado.

En las subsiguientes dos pruebas de toxicidad se realiza la observación de los ratones por un espacio de 2 semanas, concluyendo que de las tres pruebas realizadas con el IOR-CEA1 marcado con el ¹³¹I, no se detectó efectos colaterales después de su administración al modelo biológico utilizado y el producto es atóxico y puede ser utilizado en humanos.

Se realizó tres pruebas de distribución biológica; utilizando para cada ensayo un total de 8; un par de ratones para la distribución biológica (DB) a las 4, 24, 48 y 72 horas post-inyección de la molécula marcada.

De los tres controles de distribución biológica realizados se puede observar que la molécula marcada (IOR-CEA1+¹³¹I) tiene un decrecimiento exponencial. En las 4 primeras horas de la post-inyección de la molécula marcada hay una alta concentración en sangre, un 30%, esto se debe a que el CEA es un anticuerpo circulante, que poco a poco se va alojando en los órganos específicos como intestinos (7.46%), hígado (7.36%) y estómago (1.14%).

A las 24 horas de la post-inyección la concentración de AcMo marcado en sangre descende al 19.71%, en intestino tiene un pequeño descenso a (6.12%), en hígado (2.69%) en estómago hay un pequeño incremento (3.28%) y en el resto de órganos se encuentran en concentraciones menores 0.5%. Esto se debe a que el CEA es una glicoproteína emparentada con las inmunoglobulinas y que por sus características se encuentra muy concentrada en el propio tejido tumoral y escasamente elevada en suero, pero en condiciones normales el CEA se produce naturalmente en intestino, estómago e hígado.

A las 72 horas de la post-inyección la concentración de la AcMo marcado es menor al 1% en todos los órganos. Con esto podemos decir que nuestra molécula tiene una buena depuración. (Figura 1).

Tabla 1. Resumen de control de esterilidad.

Lotes	Caldo Tripticasa de Soya	Caldo Thioglycolato	Resultados
1	-	-	Estéril
2	-	-	Estéril
3	-	-	Estéril
4	-	-	Estéril
5	-	-	Estéril
6	-	-	Estéril
7	-	-	Estéril

(-) Sin crecimiento. (+) Con crecimiento

3. Discusión

En los ensayos de Distribución Biológica (DB) nos permite evaluar de forma indirecta la PRQ de nuestro anticuerpo, siendo una etapa esencial para el establecimiento y determinación de la eficacia de todo agente nuevo utilizado para diagnóstico y terapia. Para este ensayo de trabajo con un total de 24 ratones de la de la variedad Balb/c con un peso aproximado de 25g; los análisis se realizaron a las 4, 24, 48 y 72 horas de las post inyección del AcMo IOR-CEA1 marcado con el ¹³¹I. En el cual se pudo observar que en las cuatro primeras horas de haber inyectado el anticuerpo marcado hay una alta concentración de esta molécula en sangre, esto se debe a que la principal vía de transporte de este anticuerpo es mediante el sistema circulatorio y poco a poco se va alojando en los órganos específicos como son el intestino, estómago e hígado, y en menor concentración en los otros órganos (<1%); Después de 24 horas de la post-inyección del anticuerpo en el ratón, la concentración del anticuerpo en sangre descende mientras que

los órganos específicos el descenso el menor siendo el mejor momento para realizar la toma de imágenes gammagráficas, debido a que la emisión radiactivas en los órganos específicos (Intestino, estómago e hígado) se mantiene constante, mientras que en el resto de órganos la actividad de emisión radiactiva es despreciable, y prácticamente a las 71 horas de las post-inyección de la molécula, esta se ha depurado casi en totalidad del organismo del animal de experimentación; por lo que podemos decir que nuestro AcMo IOR-CEA1 marcado con ^{131}I tiene una buena depuración, lo cual es importante ya que no deja residuos radiactivos que sería contraproducente al paciente.

Según Martínez⁽⁵⁾ el área que ha despertado mayor interés en los últimos años ha sido el uso del IOR-CEA1 en el monitoreo de pacientes con enfermedades al colón y recto; la elevación de este marcador en pacientes asintomáticos, permite detectar recidivas cinco meses antes de que aparezca los síntomas.

En la actualidad, existe mayor interés por la aplicación de AcMo marcados con radioisótopos en tratamiento biológico de las células cancerosas, la modalidad de tratamiento todavía es controvertida, porque a pesar de que las células sean atacadas o destruidas, su regeneración de las mismas es rápida mientras se van eliminando las células cancerígenas. Esto se debe a que la localización de un AcMo es gradual, este

anticuerpo circula por el torrente sanguíneo y se va alojando poco a poco en la superficie del tumor y con ayuda de la radiactividad va matando a esta célula de forma específica.

La utilización de AcMo para radioinmunoterapia (RIT) esta todavía en la fase de investigación y desarrollo en muchas partes del mundo, pero esta mostrando que tiene un futuro promisorio por su eficacia en el tratamiento de tumores hematológico y será más ampliamente empleada en un futuro muy próximo en la terapia de tumores sólidos.

4. Referencias

- [1]Arista A., Sturiale C., *et al.* *Intralesional administration of ^{131}I labelled monoclonal antibodies in the treatment of malignant gliomas.* Acta Neurochirurgica 135:159-162, 1995.
- [2]Colturato M.; Muramoto E., *et al.* *Labelling of vasoactive intestinal peptide (vip) with 131 -iodine. Preliminary biological distribution studies in animal.* Alasbim Journal. 2003. En: <http://www.alasbimjournal.cl/alasbimn>,
- [3]Guide radioiodination techniques. ^{125}I . Amersham Life Science: 59-61, 1993.
- [4]Harlow E., Lane D. *Antibodies a laboratory manual.* Cap. 9:329-329, 1988.
- [5]Martinez E., Marcos M., *et al.* *Marcadores tumorales circulantes con valor pronóstico.* Anales Sis. San Navarra vol.24 (supl. 1): 53-61, 2000.

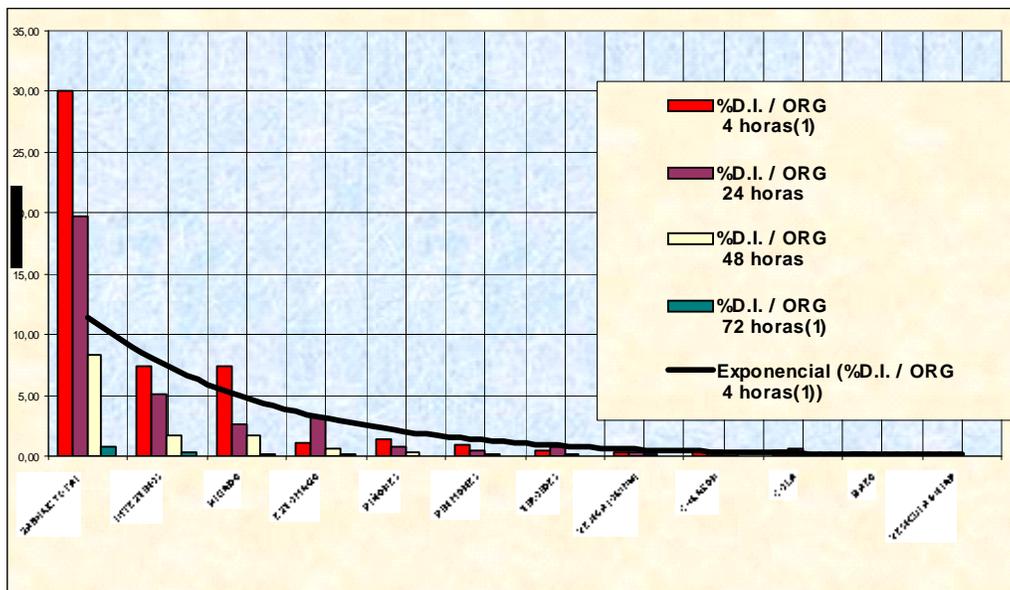


Figura 1. Resumen de las pruebas de distribución biológica del IOR-CEA1 marcado con el ^{131}I .