

Pruebas de reconocimiento biológico del AcMo IOR CEA1 marcado con ^{99m}Tc utilizando tumores de adenocarcinoma embrionario

Roberto Koga¹ rkoga@ipen.gob.pe, Anita Robles¹ arobles@ipen.gob.pe,
Bertha Ramos¹ bramos@ipen.gob.pe, Juvenal Sánchez², Gianina Ventocilla²

¹ Instituto Peruano de Energía Nuclear, Planta de Producción de Radioisótopos

² Instituto Peruano de Enfermedades Neoplásicas, Departamento de Patología

Resumen

Convencionalmente para los ensayos de inmunoreactividad se utiliza la cromatografía de afinidad en tiras de ITLC-SG, siendo un método sencillo de análisis, pero por cada ensayo se debe utilizar cierta cantidad de antígeno adenocarcinoma embrionario purificado, lo cual eleva los costos de control. La utilización de tumores para las pruebas de reconocimiento biológico es un ensayo alternativo de bajo costo para la evaluación de la actividad biológica del radiofármaco anti-CEA marcado con ^{99m}Tc. En este trabajo se tuvo como objetivo desarrollar una metodología de control de calidad de este anticuerpo monoclonal (AcMo), logrando obtener un porcentaje de unión específica antígeno-anticuerpo entre el 58.59 y 67.64%, siendo resultados muy similar al trabajo realizado por Zamora et al. que obtuvieron un 63% y Rodhes que obtuvo un 35 a 65% de unión en sus pruebas de inmunoreconocimiento utilizando el método de cromatografía de afinidad con tiras de ITLC-SG.

1. Introducción

El cáncer es un grupo muy amplio de enfermedades que se distinguen por el crecimiento incontrolado de las células anormales que se propagan desde su sitio de origen. Cuando ese crecimiento es incontrolable, el cáncer invade órganos vitales y el resultado es la muerte. Las modalidades de tratamiento contra este tipo de enfermedades son: la cirugía, radioterapia, quimioterapia y terapia hormonal.

El tratamiento convencional del cáncer con agentes quimioterapéuticos y radiaciones ionizantes tiene un índice terapéutico bajo; se dañan todas células proliferantes sin discriminar entre el tejido sano y el tumoral. Desde el punto de vista teórico los anticuerpos, particularmente los monoclonales son moléculas ideales para el marcaje de tumores debido a su capacidad transportadora o portadora y son específicos para tumores.

Los AcMo marcados con radioisótopos pueden matar a las células tumorales a cierta distancia, sin que tengan que unirse a la misma o tenga que llegar a su interior. Esta es la gran ventaja de los anticuerpos monoclonales (AcMo) marcados con radioisótopos (radioinmunomarcados). Cuando se emplea un anticuerpo monoclonal con fines de diagnóstico o terapéutico, es esencial comprobar que en el proceso de marcación no haya dañado la región del mismo que reconoce al antígeno. A esa

capacidad de reconocimiento específico que posee el antígeno por el anticuerpo se le denomina reconocimiento biológico.

2. Materiales y Métodos

Materiales:

Tubos de vidrio 50 x 10mm con tapa
Tubos criogénicos
Homogenizador de células
Centrífuga refrigerada
Baguetas de vidrio
Solución 0.25% de sacarosa
Balanza
Contador de Pozo marca CAMPINTEC
Jeringas de insulina de 1cc.
Placa Petri
Guantes
Contenedor de plomo
Kit liofilizado de anti-CEA 1.2mg
Tumores de Adenocarcinoma embrionario.

3. Metodología

Para el transporte del material biológico:

Colocar las muestras biológicas recién extraídas del colon dentro de los tubos criogénicos, se codifica y se llevan a congelar.

Para transportar la muestra biológica del hospital a la Planta de Producción de Radioisótopos (PPR), se utilizó un termo, el cual contiene gel refrigerante. Posteriormente, las muestras son llevadas a congelar dentro de un cilindro el cual contiene Nitrógeno líquido, hasta su uso.

Las muestras biológicas pueden almacenarse en nitrógeno hasta por 4 meses sin que pierda su actividad biológica.

Marcación del Kit liofilizado anti-CEA con el ^{99m}Tc :

Retirar del refrigerador un frasco del AcMo anti-CEA liofilizado y dejar que adquiera la temperatura ambiente (18-20°C). Se Coloca el frasco del AcMo dentro de un contenedor de plomo y se le adiciona 1.48 – 1.85 GBq (40 – 50mCi) de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ volumen entre 1 a 5mL. Se incuba por 15 minutos a temperatura ambiente.

Control de reconocimiento biológico:

Se saca las muestras del nitrógeno líquido y se deja descongelar a temperatura ambiente. Luego con la ayuda de una pinza se coloca el tumor en una placa petri y con un bisturí se procede a fraccionar la muestra. Las fracciones son llevadas a un homogenizador celular. Se le agrega 4 a 5mL. de sacarosa al 0.25% y se procede a realizar la trituración para obtener el homogenato celular. Una vez obtenido el homogenato, se reparte 1mL. de hogenato en 4 tubos de vidrio previamente pesados. Luego, las muestras son centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos. Extraer el líquido sobrenadante, pesar los tubos para conocer la masa celular y agregarle 1mL de sacarosa al 0.25% y volver a centrifugar.

Retirar el líquido sobrenadante y 1mL de sacarosa 0.25% y dejar reposar por 24 horas, para que las células puedan rehabilitarse. Luego, a cada tubo se le agrega aproximadamente unos 0.24ugr de AcMo marcado con ^{99m}Tc e incubar a 37°C 1, 2, 4 y 24 horas. Incubar en esas mismas condiciones tubos que solo contiene anti-CEA marcados con ^{99m}Tc (Utilizados como blancos). Luego del tiempo de incubación se mide la actividad en el contador de pozo, luego se lleva a

centrifugar la muestra a 2000 rpm por 10 minutos.

Quitar el liquido sobrenadante y quedarse con el pellets y se mide la actividad. Calcular el % de unión específica mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ Unión específica} = \% \text{ muestra tumor} - \% \text{ muestra blanco}$$

4. Resultados

Para estos ensayos se utilizaron muestras tumorales de cáncer al colon con una concentración de CEA >5 ng/mL para poder realizar estas pruebas; debido que es necesario tener un exceso de antígeno para que el anticuerpo puede unirse a ella sin ningún problema. De los resultados obtenidos en estos ensayos que a la primera hora de incubación del antígeno de CEA con el AcMo marcado con el ^{99m}Tc se obtuvo un porcentaje de unión del 39.67%, incrementándose esta unión hasta un 60.94% a las 24 horas de incubación (Tabla 1).

Tabla 1: Resumen de unión de antígeno marcado vs. Piezas tumorales de cáncer de colon.

1 h	2 h	3 h	4 h	22 h	24 h
39.15%	45.55%	50.97%	51.66%	54.41%	62.67%
39.08%	45.69%	47.54%	52.79%	55.46%	58.53%
40.25%	44.99%	53.09%	53.15%	54.89%	61.61%
39.49%	45.41%	50.53%	52.53%	54.92%	60.94%

Esto se debe a que el ior-CEA1 se va alojando poco a poco en el tumor y a las 24 horas de incubación es donde la mayor cantidad de anticuerpo se une al antígeno del tejido tumoral del colon. (Figura 1).

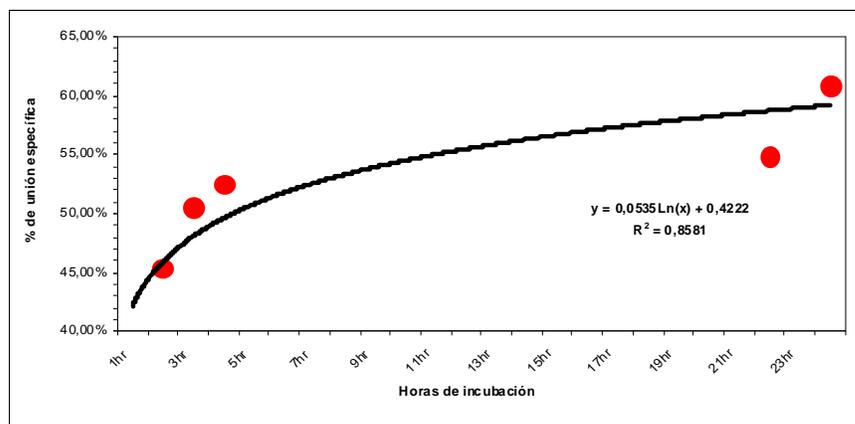


Figura 1. Comportamiento del unión ior-CEA1 marcado con ^{99m}Tc vs. Muestras de tejido tumoral de cáncer de colon.

5. Conclusiones

Se ha demostrado que el tiempo de incubación influye en los resultados del reconocimiento biológico entre el tejido tumoral del cáncer al colon con el AcMo ior-CEA1 marcado con ^{99m}Tc . Durante la primera hora de marcación se obtiene un porcentaje de unión de 39.49% incrementándose este porcentaje de unión llegando a un máximo de 60.94% después de 24 horas de incubación, este valor es muy semejante a los obtenidos por Zamora *et al.* del 54 al 63% de unión, pero ellos utilizaron las prueba de inmunoreactividad por cromatografía en capa fina en papel utilizando antígeno purificado de CEA, esta misma técnica también esta descrita en el manual de preparación, control de calidad de radiofármacos para inmunocentellografía, basados en anticuerpos monoclonales, ARCAL LII – OIEA.

La diferencia entre una y otra técnica, es que para las pruebas cromatográficas en tiras se deben utilizar antígenos purificados de CEA con una pureza > 95%, lo cual elevan considerablemente los costos del ensayo.

Es por ello que se desarrolló otro tipo de ensayo, en el cual se aprovecha las biopsias de cáncer de colon obtenidas en los hospitales, el cual es una fuente natural de antígeno CEA, abaratando los costos de este ensayo. La finalidad de este trabajo no es reemplazar la metodología de los ensayos de control de calidad de reacción inmunoreactividad del AcMo ior-CEA1 marcado con el ^{99m}Tc ; sino el de proponer

una metodología de control alterno de menor costo para poder realizar dichos ensayos.

6. Referencias

- [1]. Ramos B., Robles A. *Optimización del ensayo de inmunoreactividad por el método de cromatografía de afinidad en capa fina para anticuerpo monoclonales marcados con ^{99m}Tc* . En: Instituto Peruano de Energía Nuclear. Informe Científico Tecnológico 2003, Lima, Perú, 2004. p. 53-56.
- [2]. Ferro G., Alvarez E., *et al.* *Manual sobre preparación de y control de calidad de radiofármacos para inmunocentellografía, basados en anticuerpos monoclonales*. ARCAL LII.-OIEA 2001.
- [3]. Haisma H., Pinedo H., Silva C., Boven E. *Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies directed against intracellular antigens*. Journal Immunological Methods 154(1):55-60, 1992.
- [4]. Rhodes B., Buckelew J., Pant K., Hinkle G. *Quality control test for immunoreactivity of radiolabeled antibody*. Biotechniques 8(1): 70-75, 1990.
- [5]. Lidmo T., Boven E., Cuttitta F., Fedorko J., Bunn P. *Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation binding at infinite antigen excess*. Journal of Immunological Methods 72: 77-79, 1984.
- [6]. Zamora P., Sass K., Cardillo A. Lambert C.; Budd P.; Rodees B.; *Affinity Thin-layer chromatography test of the immunoreactive fraction of radiolabeled antibodies*. Biotechniques 16(2), 1994.