

00576  
5  
6  
29



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química

NUEVO METODO DIRECTO DE MARCADO  
DE IgG CON  $^{99m}\text{Tc}$  PARA LOCALIZAR FOCOS  
DE INFECCION O INFLAMACION

T E S I S

Que, para obtener el grado de:  
Maestría en Ciencias Nucleares

Presenta:

Q.F.B. Laura Meléndez Alafort

Director de Tesis:

Dr. Manuel Navarrete Tejeda



México, D.F.

1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

261037



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.

**El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Radiofarmacia del Departamento de Medicina Nuclear y Clínica de Tiroides del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán " con la asesoría de la Q.B.P. Consuelo Arteaga de Murphy.**

# DEDICATORIA

- A Dios por ser mi guía y apoyo en todo momento.
- A mis Padres, por toda su confianza, comprensión y amor incondicional, que me alienta a seguir adelante día tras día y vencer más fácilmente los obstáculos del camino.
- A mis hermanos Vero, Beto y Erick que me han apoyado en todo momento, transmitiéndome toda su alegría y energía para continuar adelante cuando las cosas no van del todo bien.
- A la Q.B.P. Consuelo Artega de Murphy por todas sus enseñanzas, y generosa ayuda para la realización de este trabajo de tesis.
- A la Q.F.B. Guillermina Ferro y Q.F.B. María Antonia González, por su valiosa amistad y su apoyo incondicional.
- Al Dr. Manuel Navarrete, por su comprensión y ayuda durante el estudio de la Maestría y la elaboración de esta tesis.
- Al M.C. Luis Cabrera, M.C Trinidad y el Dr. Rafael Martínez, por todas sus enseñanzas y consejos, que me ayudaron a mejorar continuamente.
- A la Dra. Guillermina Burillo, Dra. Alicia Negrón, Dra. Martha Sosa, Dr. Mario González y la Dra. Flor de María Ramírez, por que con su ayuda y sugerencias ayudaron a conseguir que este trabajo de tesis alcanzara una calidad satisfactoria

# CONTENIDO

	Página
<b>Capítulo I INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 Introducción	1
<b>Capítulo II ANTECEDENTES</b>	
2.1 Radiofármacos	3
2.1.1 <i>Radiofármaco ideal para el procedimiento de diagnóstico.</i>	4
2.1.2 <i>Radiofármacos de <math>^{99m}\text{Tc}</math>.</i>	5
2.1.2.1 <i>Características del tecnecio</i>	6
2.1.2.2 <i>Generador de <math>^{99}\text{Mo}</math>-<math>^{99m}\text{Tc}</math>.</i>	7
2.1.2.3 <i>Juegos de reactivos para radiofármacos marcados con <math>^{99m}\text{Tc}</math></i>	8
2.2 Inmunoglobulinas	9
2.2.1 <i>Inmunoglobulina G humana (IgG)</i>	10
2.3 Inflamación.	10
2.3.1 <i>Radiofármacos utilizados en la localización de infecciones e inflamaciones</i>	11
2.3.1.1 <i><math>^{67}\text{Ga}</math>-citrato</i>	12
2.3.1.2 <i>Leucocitos marcados</i>	12
I <i>Marcado "in vivo"</i>	13
II <i>Marcado "in vitro:"</i>	13
2.3.1.3 <i>Nanocoloides</i>	15
2.3.1.4 <i>Marcado de anticuerpos monoclonales y policlonales.</i>	15

	Pagina
<i>I Métodos directos para el marcado con <sup>99m</sup>Tc</i>	16
<i>II Métodos indirectos para el marcado con <sup>99m</sup>Tc</i>	20
<i>III Sistema de premarcaje in vivo</i>	20
2.3.1.5 Péptidos quimiotácticos marcados con <sup>99m</sup> Tc	22
2.4 Detección de la radiación	23
2.4.1 Detectores gaseosos	23
2.4.2 Detectores de centelleo	23
2.4.3 Cámara de centelleo o gammacámara	24
<b>Capítulo III DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	
3.1 Objetivos	25
3.1.1 Objetivos generales	25
3.1.2 Objetivos específicos	25
3.2 Material, equipo y reactivos de trabajo	27
3.2.1 Material	27
3.2.2 Equipo	27
3.2.3 Reactivos	27
3.2.4 Animales	29
3.3 Metodología	30
3.3.01 Determinación de la pureza de IgG comercial (" <i>Sandoglobulina</i> ")	30
3.3.02 Determinación de la concentración de los reactivos y condiciones de marcado.	31
3.3.03 Optimización y estandarización del proceso de liofilización	33
3.3.04 Determinación de la estabilidad de la especie <sup>99m</sup> Tc-IgG.	33
3.3.05 Determinación del grado de desnaturalización	33
3.3.06 Determinación de la inmunoreactividad	34
3.3.07 Estudios de biodistribución en ratas sanas	36
3.3.08 Estudios de biodistribución en ratas con sitios de inflamación	36

	Pagina
3.3.09 <i>Estudios de estabilidad</i>	37
3.3.10 <i>Comparación de la formulación obtenida con una formulación comercial</i>	37
<b>Capítulo IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	
4.1 Determinación de la pureza de la IgG comercial ("Sandoglobulina")	38
4.2 Determinación de la concentración de los reactivos y condiciones de marcado.	39
4.3 Optimización y estandarización del proceso de liofilización.	44
4.4 Determinación de la estabilidad de la especie <sup>99m</sup> Tc-IgG.	45
4.5 Determinación del grado de desnaturalización	46
4.6 Determinación de la inmunoreactividad	49
4.7 Estudios de biodistribución en ratas	50
4.8 Estudios de estabilidad	61
4.9 Comparación de la formulación obtenida con una formulación comercial	61
<b>Capítulo V CONCLUSIONES</b>	
5.1 Conclusiones	62
<b>Capítulo VI BIBLIOGRAFÍA</b>	
6.1 Bibliografía	64

# Capítulo I

## INTRODUCCIÓN

En la práctica clínica diaria es común encontrar pacientes con síndrome de fiebre de origen desconocido, debido a la presencia de sitios de infección, la localización de estos sitios es esencial para el tratamiento terapéutico de pacientes críticos.

Actualmente no es posible detectar estos sitios de inflamación con los procedimientos más comunes de obtención de imágenes como tomografía computada, ultrasonido, resonancia magnética y radiografía convencional, debido a que estos se basan en cambios de densidad o composición de los tejidos para definir las lesiones y estos cambios son relativamente tardíos en el proceso inflamatorio. Sin embargo, como se trata principalmente de una acumulación focal de leucocitos, el problema se ha resuelto marcando éstos con radionúclidos emisores gamma para poder ser detectados después por medio de una gammacámara <sup>(1)</sup>.

Esta técnica implica dedicar mucho tiempo al marcado ya que se debe separar los leucocitos autólogos, marcarlos y reinyectarlos al paciente sin dañarlos <sup>(2)</sup>. El marcado de leucocitos tiene como principal desventaja que no todos los departamentos de medicina nuclear cuentan con la infraestructura, ni el personal capacitado para llevar a cabo la manipulación de éstos en condiciones totalmente estériles.

Debido a lo anterior, con el fin de disminuir el tiempo de preparación y el riesgo de contaminación del radiofármaco por manipulación del tejido biológico, en este trabajo de tesis se presenta el desarrollo de una nueva formulación liofilizada de inmunoglobulina G policlonal humana (IgG) para la detección de procesos inflamatorios y/o infecciosos, marcada por un método



directo con  $^{99m}\text{Tc}$ , utilizando como agente reductor el clorhidrato de tris (2-carboxiethyl) fosfina (TCEP-HCl).

La IgG utilizada se obtuvo de un producto comercial de los laboratorios farmacéuticos Sandoz (Sandoglobulina), antes de ser utilizada se le realizaron ensayos de pureza por medio de la prueba de Ouchterlony. Se determinó la concentración óptima y la relación molar de cada uno de los reactivos, así como el tiempo necesario de incubación para llevar a cabo la reducción de los puentes disulfuro de la IgG.

Una vez obtenida la IgG con los puentes disulfuro reducidos, se purificó por medio de cromatografía en columna, utilizando una columna de Sephadex G-25, se agregó el agente transquelante metilen-1,1 difosfonato (MDP) y el reductor de tecnecio, se liofilizó el producto para obtener el juego de reactivos (kit).

El kit liofilizado se marco con  $^{99m}\text{Tc}$ , con una pureza radioquímica mayor al 97%, la especie  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG fue estable después de 6 horas.

Se verificó la inmunoreactividad de la especie  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG por medio de Electroforesis y Western Blot, con lo que se probó que la estructura de la IgG no se modifica durante el proceso de reducción y marcado.

Se hicieron estudios de distribución en ratas wistar sanas y con sitios de inflamación a diferentes tiempos, para comprobar si efectivamente el radiofármaco se localizaba en los sitios de inflamación. Se observó que cuatro horas después de la inyección de la  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG, la diferencia entre la concentración del músculo normal y el músculo inflamado era suficiente para visualizar el sitio de inflamación, por medio de una la imagen utilizando una gammacámara.

# Capítulo II

## ANTECEDENTES

Existen varias técnicas desarrolladas para la obtención de imágenes, que involucran radiación, como la medicina nuclear, radiología, tomografía axial computarizada, ultrasonido, etc, dentro de las cuales ninguna es superior a la otra, sino que se complementan, ya que cada una de ellas aporta una información diferente, por tanto es indispensable tener un criterio para elegir la mejor en cada caso.

Una opción son las imágenes obtenidas por medio de la medicina nuclear ya que aportan un aspecto morfológico semejante en cierto modo a la radiología (expresión de densidades) sin embargo difiere de ésta porque además de proporcionar información sobre la estructura del órgano o sistema en estudio, es posible medir el funcionamiento y la fijación del trazador sobre el mismo.

La medicina nuclear ha sido definida como una especialidad multidisciplinaria dedicada al uso de compuestos radiactivos para el diagnóstico y terapia. Esta condicionada a un proceso de captación activa y selectiva, de ahí que cualquier alteración sea significativa porque se traduce como un déficit funcional. Es posible hacer estudios dinámicos cardiovasculares, de flujo cerebral y de las funciones renales entre otros, sin causar daño al paciente utilizando un sistema detector como una gammacámara.

La aplicación de un procedimiento de medicina nuclear requiere de dos componentes esenciales, un radiofármaco con un grado aceptable de localización en un órgano o tejido determinado y un sistema detector de la radiación con sensibilidad y resolución adecuadas <sup>(3)</sup>. Por tanto los grandes avances de esta disciplina implican la necesidad de diseñar nuevos

radiofármacos cada vez más específicos que permitan realizar exámenes de manera segura y efectiva, debido a que la imagen depende de la capacidad del órgano o tejido para concentrar el material radiactivo.

La distribución de un radiofármaco en un lapso de tiempo esta dada por los factores fisiológicos como el flujo sanguíneo, volúmenes de fluidos vasculares y extravasculares, la actividad metabólica o la presencia de células fagocíticas y por las propiedades fisicoquímicas del mismo (4,5).

## 2.1 Radiofármacos

Un radiofármaco puede definirse como una sustancia química que contiene átomos radiactivos o radionúclidos en su composición y que por su forma farmacéutica, cantidad y calidad de radiación emitida es adecuada para su administración en seres humanos con fines de diagnóstico y/o terapéuticos (6).

Generalmente los radiofármacos son compuestos que no tienen un efecto farmacológico comprobable, y si lo poseen, no se pone de manifiesto porque se utilizan en cantidades trazas con las que no se observa ninguna relación dosis-respuesta. Esta es la principal diferencia que presentan con un fármaco convencional (7).

Para escoger una sustancia con actividad biológica en radiofarmacia, se debe tomar en cuenta su paso a través de la zona fisiológica o anatómica de interés, la distribución y localización en determinado órgano o comportamiento, ya que la captación de un órgano en condiciones normales difiere a la captación en condiciones patológicas y además debe ser seguro con dosis de radiación mínima, no tóxico (3,8).

### 2.1.1 Radiofármaco ideal para diagnóstico en Medicina Nuclear

Para encontrar el radiofármaco ideal ha sido necesario probar, dentro de la medicina nuclear, numerosos agentes radiofarmacéuticos y complejos de un metal de transición radiactivo unido a un ligante (9). Es deseable que los radiofármacos para uso humano reúnan características como:

1. Proporcionar una dosis mínima de radiación al paciente.

2. La radiación emitida debe ser detectada fácilmente y a distancia por instrumentos, el mismo día de ser posible.
3. Tener vida media compatible con el tiempo requerido para rastrear el fenómeno biológico estudiado.
4. Emitir preferentemente un rayo gamma monocromático con energía entre 100 y 300 keV.
5. No emitir ninguna radiación corpuscular.
6. Estar disponible fácilmente y ser económico.
7. Conservarse sin que se contamine.

Un radiofármaco ideal para procedimientos diagnósticos debería reunir todas las propiedades anteriores, sin embargo estos criterios son tan exigentes que el radiofármaco ideal no existe, por tanto el de elección será aquel que ofrezca las mejores propiedades (3,7).

### 2.1.2 Radiofármacos de $^{99m}\text{Tc}$ .

La primera aplicación clínica del  $^{99m}\text{Tc}$  fue efectuada por Harper y colaboradores en 1965 en la Universidad de Chicago, EE.UU., y a partir de ese momento su uso con tales fines fue en continuo crecimiento, llegando a la posición prominente que ocupan actualmente en el campo de los procedimientos diagnósticos en medicina nuclear (9).

El  $^{99m}\text{Tc}$  se considera como el radionúclido "ideal" para marcar fármacos gracias a que reúne las siguientes características (5):

1. Fácil obtención a partir del generador  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99m}\text{Tc}$ .
2. Ausencia de emisión  $\beta$  y su emisión gamma de energía baja de 140 keV, que presenta una adecuada penetración en los tejidos.
3. Vida media corta de 6 horas.
4. Eficiencia con que se detecta.
5. Facilidad y rapidez con que se puede unir o complejar a diversas sustancias, drogas o fármacos para así formar los radiofármacos.
6. Las dosis radiactivas en uso permiten hacer estudios dinámicos y estáticos.

### 2.1.2.1 Características del tecnecio

El tecnecio fue obtenido por primera vez en 1937 por Perrier y Ségre al bombardear molibdeno con deuterones en un ciclotrón. La presencia del tecnecio en forma natural dentro de la corteza terrestre no es muy probable y se ha sugerido que el origen de todo el tecnecio que existe en la tierra es secundario, es decir, que proviene tanto de la fisión del uranio, como de la activación del molibdeno, niobio y rutenio por radiaciones cósmicas de alta energía.

El tecnecio es de color gris claro brillante y se ennegrece con lentitud al oxidarse por el contacto con el aire húmedo, pero no al aire seco; forma redes de cristales hexagonales; es ligeramente paramagnético y se comporta como un superconductor a bajas temperaturas.

Las propiedades físicas del tecnecio se encuentran en la tabla 2.1

TABLA 2.1 PROPIEDADES FÍSICAS DEL TECNECIO

Número atómico	43
Peso atómico	98.913 (98.8, 98.906)
Radio iónico	0.56 Å
Radio atómico	1.36 Å
Densidad	11.50 g/cm. <sup>3</sup>
Punto de fusión	2250 +/- 50 °C
Punto de ebullición	4877°C
Temp. de superconductor	-281.8 °C

El tecnecio presenta estados de oxidación desde -1 hasta +7; la valencia +7 es la más estable, siguiendo la +4 y dentro de los compuestos de coordinación existe en forma estable con valencia de +3, +5 y +6 además de los +7 y +4. Debido a sus múltiples estados de oxidación la química del tecnecio es muy compleja.

Entre los avances tecnológicos que contribuyeron a que alcanzara la posición que actualmente ocupa en la rutina diaria de medicina nuclear se encuentra la producción de generadores de <sup>99</sup>Mo-<sup>99m</sup>Tc que posibilitaron la

disponibilidad a nivel de las clínicas de medicina nuclear y solucionaron los problemas de transportación debido a su vida media corta <sup>(9)</sup>.

### 2.1.2.2 Generador de $^{99}\text{Mo}$ - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .

Un generador de radionúclidos es un sistema que contiene una serie radiactiva, donde el radionúclido hijo está siendo producido constantemente por el decaimiento del radionúclido padre, originando un equilibrio entre los dos. Este equilibrio sólo es afectado por la separación de los dos radionúclidos, que se lleva a cabo comúnmente por la diferencia de solubilidad de los compuestos en un disolvente dado <sup>(3)</sup>.

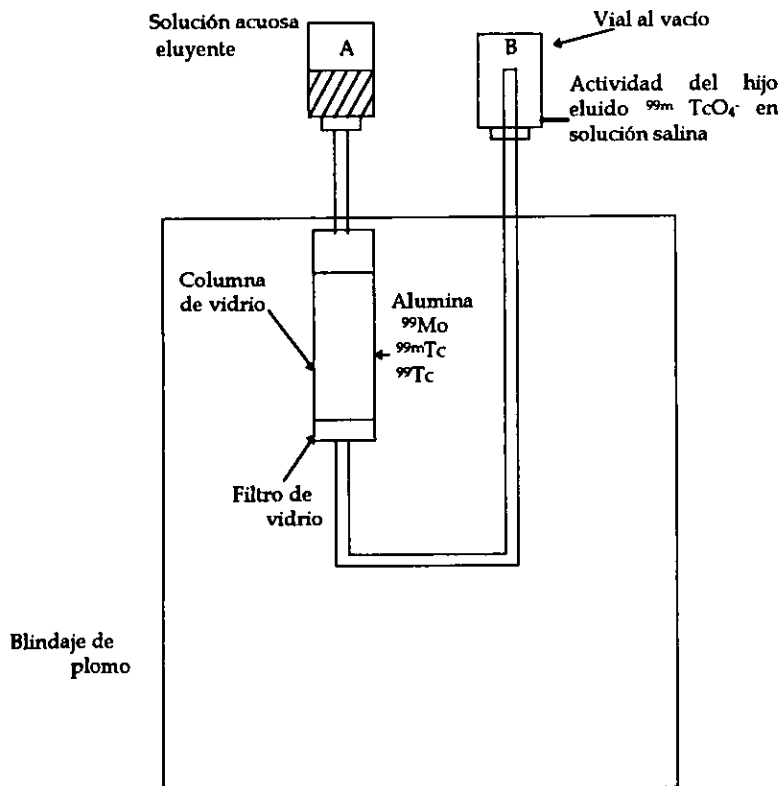


Figura 2.1 Diagrama del generador  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99\text{m}}\text{Tc}$

El generador de  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99\text{m}}\text{Tc}$  es un sistema automático y altamente protegido con un blindaje de plomo, que permite obtener fácilmente una solución de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  en forma de pertecnetato de sodio, estéril y libre de pirógenos.

Consta de una columna cromatográfica de vidrio, provista en su base de un filtro esmerilado, que contiene alúmina, sobre la cual se absorbe el  $^{99}\text{Mo}$  que decae a  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (Figura 2.1). A esta columna se le pasa una solución acuosa eluyente de cloruro sódico al 0.9% que arrastra al pertecnetato (sin arrastrar al molibdato), y que se recibe en un vial estéril y al vacío <sup>(10)</sup>.

### 2.1.2.3 Juegos de Reactivos para radiofármacos marcados con $^{99\text{m}}\text{Tc}$

En medicina nuclear algunos radionúclidos son utilizados en su forma química simple, como el pertecnetato de sodio y otros se encuentran incorporados marcando en una variedad de compuestos químicos, que pueden ser interesantes, debido a sus propiedades fisiológicas, metabólicas, y bioquímicas <sup>(10)</sup>.

La marcado es un procedimiento por el cual un radionúclido (obtenido por irradiación o generador) se incorpora a una molécula más compleja, dando lugar al radiofármaco de interés. Los métodos de marcado son variados, entre ellos se mencionan síntesis química, biosíntesis y reacciones de intercambio <sup>(5)</sup>.

El pertecnetato se obtiene del generador  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99\text{m}}\text{Tc}$  en su máximo estado de oxidación y la mayor parte de los compuestos químicos marcados con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  se lleva a cabo reduciéndolo a  $\text{Tc}^{3+}$ ,  $\text{Tc}^{4+}$ ,  $\text{Tc}^{5+}$  y complejando éstos con el compuesto químico apropiado. El agente más comúnmente usado para reducir el tecnecio es el cloruro estano (SnCl<sub>2</sub>) por presentar algunas ventajas como baja toxicidad, gran poder reductor, y buen rendimiento <sup>(5)</sup>.

Como la vida media del  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  es corta, existía el problema de preparar los radiofármacos poco antes de ser utilizados, que se resolvió con el uso de juegos de reactivos estériles y libres de pirógenos (kits).

Estos "kits" son viales que contienen todos los reactivos necesarios y en las proporciones adecuadas para obtener el radiofármaco  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  de interés, con el nivel de calidad requerido para su empleo en humanos. Su procedimiento de marcado es muy sencillo y consiste en agregar la solución de pertecnetato ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ) con la actividad adecuada seguido de una operación sencilla como

agitación, calentamiento, etc., en el momento que se va a utilizar el radiofármaco.

Los principales componentes de estos estuches de reactivos son el agente complejante (ligando) y el agente reductor ( $\text{SnCl}_2$ ), aunque se puede agregar otros componentes como antioxidantes, y/o agentes dispersantes según sea el caso (5,9).

## 2.2 Inmunoglobulinas

Los anticuerpos son un grupo de glucoproteínas presentes en el suero y líquidos orgánicos de todos los mamíferos que son producidos en grandes cantidades por células plasmáticas.

En la mayoría de los mamíferos superiores se conocen 5 clases distintas de moléculas de inmunoglobulinas o anticuerpos: Inmunoglobulina G (IgG), Inmunoglobulina A (IgA), Inmunoglobulina M (IgM), Inmunoglobulina D (IgD) e Inmunoglobulina E (IgE). Difieren unas de otras en tamaño, carga, composición de aminoácidos y contenido de carbohidratos. Además de las diferencias entre las distintas clases, las inmunoglobulinas de la misma clase presentan también algunas diferencias entre sí.

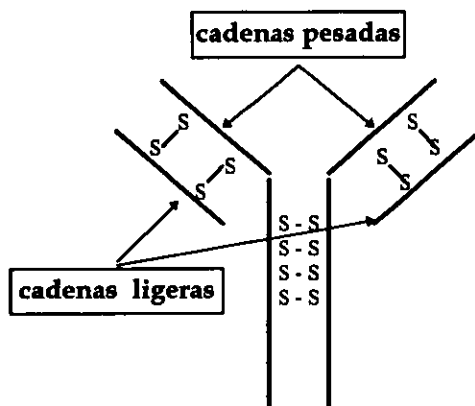


Figura 2.2 Estructura general de las inmunoglobulinas



La estructura básica de las moléculas de todas las inmunoglobulinas está compuesta por dos cadenas polipeptídicas ligeras, idénticas, con un peso aproximado de 25, 000 kDa y por dos cadenas pesadas también idénticas, con un peso molecular de 55,000 a 77,000 kDa, unidas por puentes disulfuro (Figura 2.2). La clase y la subclase de una molécula de inmunoglobulina viene determinada por el tipo de cadena pesada <sup>(11)</sup>.

### 2.2.1 Inmunoglobulina G humana (IgG)

La IgG es la inmunoglobulina principal del suero humano y representa del 70 al 75% del reservorio total de las inmunoglobulinas, se haya distribuida en los espacios intravascular y extravascular, es la predominante en la respuesta secundaria de anticuerpos y es la única que actúa como antitoxina.

Es una proteína monomérica con un coeficiente de sedimentación de 7S y un peso molecular promedio de las cuatro subclases de 146,000 kDa. Las cuatro subclases de la IgG humana (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>) tienen cadenas pesadas llamadas  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$   $\gamma_3$   $\gamma_4$ , las cuales difieren sólo muy ligeramente unas de otras, y existen en las proporciones aproximadas de 66, 23, 7 y 4%, respectivamente <sup>(11)</sup>.

## 2.3 Inflamación.

La inflamación es la reacción del organismo al ser agredido, y probablemente la causa más importante sea la invasión de los tejidos por bacterias, sin embargo otros tipos de daño como el térmico, químico o traumas inducen una reacción inflamatoria similar. Durante esta respuesta, se producen tres acontecimientos principales:

1. Aumento del suministro sanguíneo del área afectada.
2. Aumento de la permeabilidad capilar por retracción de las células endoteliales; esto permite que atraviesen el endotelio moléculas de mayor tamaño que las que lo hacen ordinariamente y de este modo es posible que las inmunoglobulinas lleguen al lugar de la infección.
3. Los leucocitos, sobre todo los polimorfonucleares neutrófilos, y en menor grado los macrófagos, migran desde los capilares hasta el tejido adyacente. Una vez ahí, mediante el proceso denominado quimiotaxis, se dirigen

hacia el lugar de la infección donde se adhieren a las paredes del tejido y fagocitan a las bacterias y a los fragmentos celulares. Los leucocitos que mueren en esta área forman parte del absceso <sup>(12)</sup>.

Un absceso es un área localizada de pus y tejido destruido provocado por la respuesta inflamatoria y que por lo general también contiene bacterias patógenas. Si éste no es tratado, llega a ser una grave amenaza para la vida del paciente.

En la actualidad uno de los problemas que se le presentan al médico es la aparición de fiebres de origen desconocido en algunos pacientes provocada por abscesos difíciles de ubicar. Para tratar de resolver este problema han surgido una gran variedad de técnicas basándose en radiofármacos marcados con radionúclidos emisores gamma para detectar externamente el sitio de la inflamación y/o infección, empleando una gammacámara.

### *2.3.1 Radiofármacos utilizados en la localización de infecciones e inflamaciones*

Cortens y Van der Meer <sup>(13)</sup>, establecieron a principios de los noventas que un radiofármaco para la obtención de imágenes de sitios de inflamación debe cumplir con el siguiente criterio:

- Fácil preparación radiofarmacéutica.
- Amplia disponibilidad y bajo costo del radionúclido y del fármaco.
- Baja toxicidad y sin respuesta inmune.
- Acumulación fisiológica poco significativa en sangre, hígado, bazo, tracto gastrointestinal, hueso, médula, riñones o músculo.
- Rápido lavado del fondo (tejido normal) y del blanco (sitio de infección).
- Rápida detección de focos infecciosos.
- Alta especificidad en la detección de otras causas de inflamación.

En la actualidad existen varios agentes utilizados para la detección de sitios de inflamación y/o infección pero ninguno satisface todos los criterios mencionados.

Al no existir el radiofármaco ideal para la localización de los sitios de inflamación es importante conocer los que ya existen en el mercado y sus propiedades, pues se elige el más adecuado para cada caso dependiendo de su

mecanismo de localización específico y las ventajas que presenta de acuerdo con las características del paciente a tratar.

Los radiofármacos y radionúclidos más utilizados para la localización de tumores se tratarán a continuación.

#### 2.3.1.1 $^{67}\text{Ga}$ -citrato

El primer radionúclido utilizado para la localización de infecciones fue el  $^{67}\text{Ga}$ -citrato que actualmente se sigue empleando, pero su uso es limitado debido a que el tiempo necesario para obtener las imágenes es muy largo (24 a 72 hr. postinyección) y se tiene una relación blanco/fondo muy baja es decir, que la concentración del galio en el sitio de infección no es mucho mayor que la del tejido normal, lo que dificulta la interpretación del estudio.

Otra de las desventajas del  $^{67}\text{Ga}$ -citrato es que normalmente se distribuye en el tracto gastrointestinal lo que hace imposible la localización de abscesos abdominales. Además de tener baja especificidad para detectar infecciones, es un radionúclido producido en un ciclotrón y es de importación, por lo tanto su costo es elevado <sup>(14)</sup>.

#### 2.3.1.2 Leucocitos marcados

En la búsqueda de un nuevo agente para detectar los focos de inflamación y con el antecedente de que un absceso implica acumulación focal de leucocitos, en 1977 Thakur y colaboradores <sup>(1)</sup> marcaron los leucocitos con  $^{111}\text{In}$  obteniendo una especificidad muy alta para la localización de abscesos. Desde entonces, han surgido varias técnicas de marcado con diferentes radionúclidos tratando de mejorar el procedimiento de obtención de células radiomarcadas <sup>(15)</sup>.

El  $^{51}\text{Cr}$  fue el primer emisor gamma en forma de cromato de sodio utilizado en la marcado de leucocitos <sup>(16)</sup>, pero tiene la desventaja de marcar la mayoría de los componentes sanguíneos por lo que no fue muy útil. Después se utilizaron otros radionúclidos como el  $^{67}\text{Ga}$  y el  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  <sup>(17,18)</sup>.

A partir de 1986 casi todas las técnicas para la preparación de células y anticuerpos radiomarcados están encaminadas al uso del  $^{99m}\text{Tc}$  (2), ya que se considera el radionúclido de elección para diagnóstico en la medicina nuclear.

Las técnicas de marcado celular pueden dividirse en dos grupos, marcado *in vivo* e *in vitro* (12).

### I Marcado "in vivo"

Las técnicas de marcado *in vivo* para los leucocitos son poco específicas, marcan a la mayoría de los componentes sanguíneos y provocan una gran cantidad de radiactividad de fondo que hace muy difícil o casi imposible la detección de los sitios de inflamación.

### II Marcado "in vitro:"

El marcado *in vitro* de los leucocitos es la que más se ha desarrollado y de acuerdo al método utilizado se dividen en:

a) *Marcado con  $^{111}\text{In}$ -oxima.*- El Indio forma con la oxima un complejo saturado, neutro y liposoluble capaz de penetrar al citoplasma a través de la membrana celular. Dada la inestabilidad de la especie  $^{111}\text{In}$ -oxima, el indio es atrapado por los componentes intracelulares con mayor afinidad a éste radionucleido, la oxima sale fuera de la célula y el leucocito queda marcado (1).

b) *Marcado con  $^{99m}\text{Tc}$  y agentes Lipofílicos.*- Es la técnica más común, se extrae la sangre del paciente y se coloca en un tubo con un anticoagulante y se separan las células por centrifugación selectiva, o sedimentación por gravedad. Las células separadas son incubadas con un agente lipofílico radiomarcado, lavadas por centrifugación y resuspendidas en plasma o solución salina para su posterior inyección.

Uno de los agentes lipofílicos más utilizados es la hexametilpropilenoaminoxima (HMPAO) marcada con  $^{99m}\text{Tc}$ . Este compuesto desarrollado originalmente como un agente de perfusión cerebral, es liposoluble y fue usado por Peters (2) quien encontró que el HMPAO marca selectivamente los leucocitos. Mortelmans (19) demostró que la función celular de los leucocitos no se afecta cuando se usa este agente para marcarlos. Sin embargo, la desventaja de este método es que se necesita separar a las células antes de marcarlas con el HMPAO por que es un agente inespecífico (20).

c) *Marcado por preestanzación.*- Con este método se preestanziza la membrana celular para facilitar el marcaje, para ello se incuban las células con glucoheptanato de estaño o pirofosfato-Sn seguido de una segunda incubación con pertecnetato.

d) *Marcado por fagocitosis.*- El marcado de leucocitos por fagocitosis usando partículas radiactivas ha sido desarrollada por diversos investigadores desde hace mucho tiempo. English y Andersen <sup>(21)</sup> en 1975 utilizaron azufre coloidal, y Fisher, y colaboradores <sup>(22)</sup> usaron las microesferas marcadas con <sup>99m</sup>Tc. Las técnicas basadas en esta metodología no tuvieron una amplia aceptación, debido a que las propiedades de sedimentación de los radiocoloides usados ocasionaban problemas en la reproducibilidad e interpretación de los estudios <sup>(23)</sup>.

Mc Afee y Thakur <sup>(24, 25)</sup> realizaron estudios sobre agentes radiactivos en solución y en forma de partículas que eran atrapadas por los leucocitos para su marcado *in vitro*, en presencia de otros componentes sanguíneos. Estos estudios no resultaron ser muy exitosos ya que algunas partículas eran completamente fagocitadas como se esperaba, pero otras permanecen adheridas a la superficie de los eritrocitos y las plaquetas por lo que era necesario separar los leucocitos antes de marcarlos.

Con todos estos experimentos se llegó a la conclusión <sup>(12)</sup> de que el agente radiactivo ideal para marcar células debería tener las siguientes características:

- Marcar las células *in vivo*.
- Ser selectivo.
- No salir de las células después de haber sido marcadas ni ser incorporado por el organismo.
- Causar el menor daño posible a las células.
- Emitir radiación gamma para poder ser detectado externamente.
- Tener una vida media compatible con el fenómeno biológico estudiado.

Aún cuando los protocolos de marcado de leucocitos *in vitro* ya están bien estandarizados son poco utilizados en la práctica clínica, debido a que los procedimientos de marcado son muy complejos, pues la mayoría de las

técnicas requieren de la separación de las células sanguíneas para realizar el marcado *in vitro* (26). Por lo tanto, se necesita personal especializado que pueda realizar el trabajo de separar las células, marcarlas y reinyectarlas al paciente en un ambiente totalmente estéril e infraestructura con lo que no cuentan muchos hospitales (27).

### 2.3.1.3 Nanocoloides

Otro de los radiofármacos utilizados para la localización de sitios de infección son los nanocoloides de albúmina (< de 50 nm), que salen de la circulación y entran en el espacio intracelular de los sitios de inflamación debido a un incremento en la permeabilidad vascular.

Las ventajas de los nanocoloides son: fáciles de marcar, proporcionan un diagnóstico rápido con una dosis de radiación al paciente relativamente baja, su costo es bajo y presentan alta sensibilidad para la detección de infecciones o inflamaciones óseas.

### 2.3.1.4 Marcado de anticuerpos monoclonales y policlonales.

La siguiente opción fue el uso de anticuerpos monoclonales antigranulocitos, marcados con  $^{131}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$  y  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  que permitían a su vez la marcado *in vivo* de los leucocitos o granulocitos (28-30).

Las inmunoglobulinas monoclonales para el diagnóstico de infecciones se utilizaron a partir de 1987, cuando se descubrieron antígenos específicos que se presentaban en las zonas de infección y que no tenían reacción cruzada con las células normales. Además, como las inflamaciones agudas se asocian con un incremento en el flujo sanguíneo y la permeabilidad, ayudan a la localización del anticuerpo en el sitio de inflamación (31-33).

Rubin y colaboradores (34) descubrieron que la inmunoglobulina G policlonal (IgG) se acumulaba de igual manera que los anticuerpos monoclonales en los sitios de inflamación/infección y que además era más fácil de obtener. Los estudios en pacientes demostraron una sensibilidad del 91% y una especificidad del 100% para infecciones causadas por microorganismos con pared y sin pared celular (35). También se demostró que tiene un 100% de especificidad y sensibilidad para infecciones osteoarticulares (36, 37).

Al hacer una comparación directa del  $^{67}\text{Ga}$  y la  $\text{IgG-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ , esta última mostró mejor localización y una mayor relación blanco/fondo (38). Otras ventajas que presenta la  $\text{IgG}$  marcada es que los antibióticos y los antiinflamatorios no tienen efecto significativo sobre su localización, puede estar disponible en forma de juego de reactivos "kit" y no requiere marcado *in vivo*, también se pueden obtener imágenes de infecciones no bacterianas, lo cual es una ventaja para los pacientes inmunocomprometidos (39-41).

La primera técnica de marcado de anticuerpos con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  para la localización de focos de infección, fue informada por Thakur y col. (42), obtuvieron un alto rendimiento de marcado y se conservó la inmunoreactividad del anticuerpo marcado. En la actualidad existe en la literatura médica un gran número de artículos que proponen diversas técnicas de marcado de proteínas con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  y de acuerdo a la metodología seguida se han dividido en métodos de marcado directos y métodos de marcado indirectos (27).

#### I Métodos directos para el marcado con $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Para poder llevar a cabo la marcado de anticuerpos por el método directo, necesitan contener monosulfuros o grupos sulfhidrilos resultantes después de la reducción de puentes disulfuro, a los que se les une directamente el  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  reducido ( $\text{Tc VII}$ ), en presencia de un quelato de baja afinidad como el glucoheptanato, tartrato, pirofosfato, o metilen-1,1 difosfonato (43).

La principal ventaja que presenta este tipo de marcado es que pueden producirse "kits" que contengan los agentes reductores, para facilitar el trabajo y disminuir el tiempo de preparación. De acuerdo al agente utilizado para reducir a la proteína, los métodos de marcado directo se dividen en:

a) *Reducción por preestabilización.*- La reducción en presencia de cationes de estaño fue el primer método directo exitoso utilizado principalmente en la preparación del "kit" para el radiomarcado del anticuerpo antitumor de melanoma, desarrollado por Rhodes y colaboradores (44). Se somete el anticuerpo a una reacción de digestión con pepsina, obteniéndose los fragmentos  $\text{F(ab')}_2$  y  $\text{Fc}$ , se separan los primeros y se tratan por 21 horas con una cantidad relativamente grande de cationes de estaño que disocian los puentes disulfuro entre las dos cadenas pesadas (figura 2.3), formando una

mezcla de fragmentos  $F(ab')_2$  y  $Fab'$  que es incorporada en un "kit" para ser radiomarcada. Después se adiciona el pertecnetato a este "kit" y el  $^{99m}Tc$  se une directamente a los grupos sulfidrilos reducidos.

Como el rendimiento de marcaje se encuentra en un intervalo de 70-90% es necesario purificar el anticuerpo pasándolo a través de una columna de intercambio iónico, para remover el pertecnetato y los radiocoloides formados por el exceso de estaño (45).

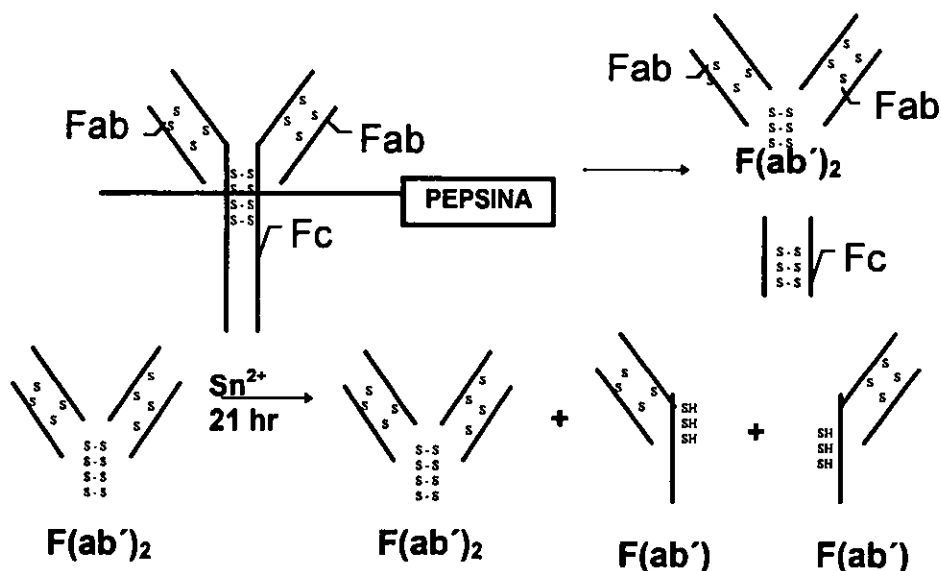


Figura 2.3 Reducción por preestanzación

b) *Reducción de los puentes S-S utilizando Ditiotreitól:* Los fragmentos  $F(ab')_2$  del anticuerpo anti-fibrina se obtienen también mediante el uso de pepsina, después se reducen los puentes disulfuro con ditiotreitól (DTT) produciéndose fragmentos  $Fab'$ , que se agregan a un frasco de vidrio (vial) con glucarato y cloruro estano (Figura 2.4). Posteriormente se adiciona pertecnetato ( $^{99m}TcO_4$ ), para formar el complejo  $^{99m}Tc$ -glucarato que mediante intercambio de ligandos da como resultado el complejo  $^{99m}Tc$ -fragmentos  $Fab'$  con un rendimiento y pureza radioquímica mayor del 90% (46).



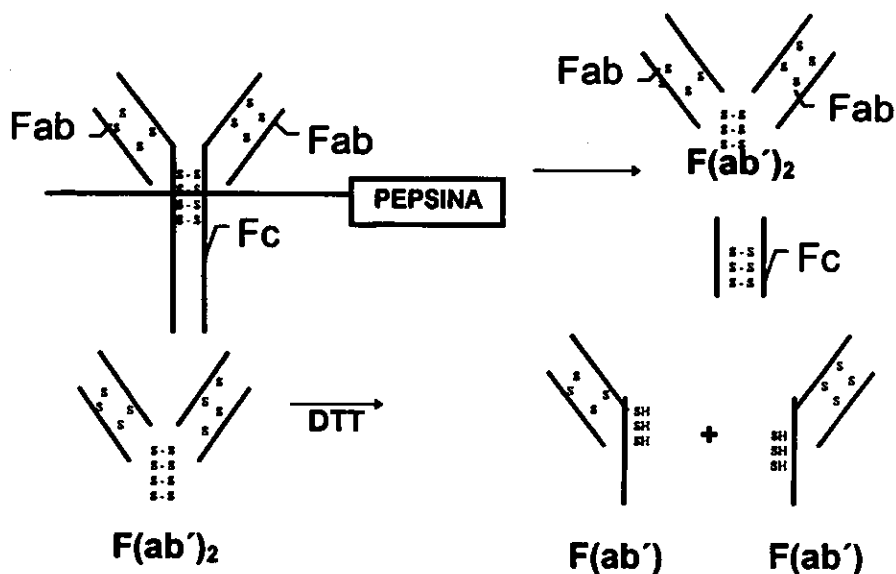


Figura 2.4 Reducción de los puentes S-S utilizando Ditiotreititol

c) *Reducción de los puentes S-S utilizando 2-Mercaptoetanol:* Esta técnica fue desarrollada en 1987 por Schwarz <sup>(47)</sup>. El anticuerpo intacto es tratado con 2-mercaptoetanol lo que provoca la conversión de los puentes S-S a puentes tiol libres, que en presencia de un ligante débil forma un complejo estable de <sup>99m</sup>Tc-anticuerpo por medio de los enlaces <sup>99m</sup>Tc-S como se muestra en la figura 2.5.

Después de estudiar este método, Mather, Ellison y otros investigadores <sup>(35, 48, 49)</sup> encontraron que un incremento en la reducción por el aumento en la concentración del 2ME, o en el tiempo de incubación, estaba acompañada por un incremento en la eficiencia de marcado del anticuerpo.

d) *Reducción de los puentes S-S utilizando ácido ascórbico:* Thakur y colaboradores <sup>(42)</sup> informaron el uso del ácido ascórbico para la reducción de los puentes disulfuro en una relación molar 3500:1, con una eficiencia de marcado mayor al 95 %, por lo que no es necesario purificar el anticuerpo después de haber sido reducido. Sin embargo otros grupos de investigadores no han podido reproducir los resultados utilizando la misma técnica <sup>(48, 49)</sup>.

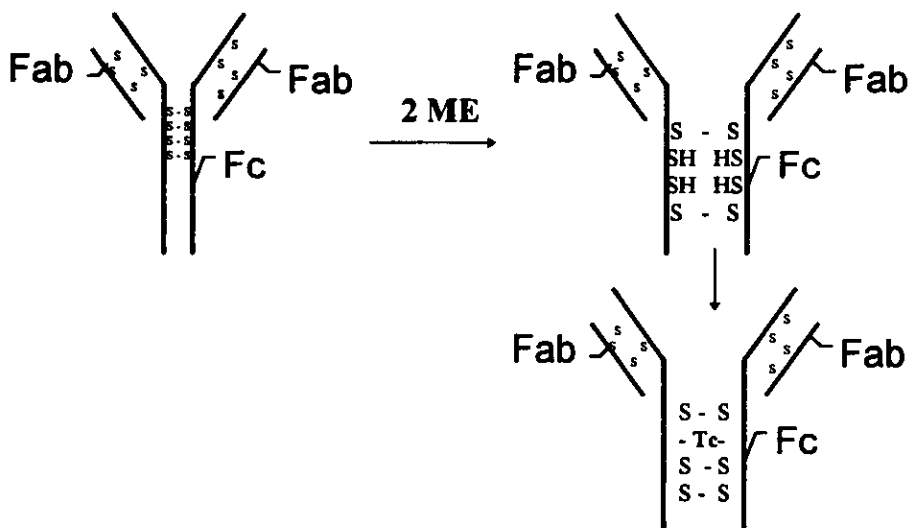


Figura 2.5 Reducción de los puentes S-S utilizando 2-Mercaptoetanol

e) *Reducción por fotoactivación:* Otra forma de marcado directa es la fotoactivación. Stalteri y colaboradores <sup>(50)</sup> desarrollaron un método basado en la irradiación de anticuerpos con luz ultravioleta para reducir los puentes disulfuro la ventaja de este es que no es necesario purificar al anticuerpo marcado.

El procedimiento de reducción y marcado es el siguiente, se coloca el anticuerpo con el agente reductor en presencia de un ligante débil en un vial y se irradia con luz ultravioleta por 15 minutos obteniéndose el "kit", al cual sólo se le agrega el <sup>99m</sup>Tc, se deja reaccionar y está listo para ser utilizado.

f) *Marcado de inmunoglobulinas con fosfinas:* En 1969 Levison <sup>(51)</sup> informó el uso de fosfinas solubles en agua para la reducción de gammaglobulinas. La trishidroximetilfosfina y triscarboxietilfosfina fueron probadas a diferentes concentraciones e incubadas con el anticuerpo que se deseaba reducir por 3 horas a 37 °C, con lo que se llegó a la conclusión de que las fosfinas terciarias solubles en agua son un agente reductor tan efectivo como el 2ME para reducir los puentes disulfuro, con la ventaja de que desnaturalizan menos a la proteína<sup>(52)</sup>.

En la literatura no se ha encontrado la reducción de inmunoglobulinas con fosfinas para marcado de IgG con  $^{99m}\text{Tc}$ .

## II Métodos indirectos para el marcado con $^{99m}\text{Tc}$

En los métodos indirectos de marcado de anticuerpos el  $^{99m}\text{Tc}$  es coordinado por medio de un agente quelante sintético, el cual puede ser conjugado a la inmunoglobulina, antes o después del proceso de radiomarcado.

Para marcar por métodos indirectos inicialmente se trató de utilizar agentes biquelantes, moléculas que tienen dos partes reactivas, con una de ellas se une a la proteína, y con la otra parte forma un quelato con el átomo radiactivo. El primer agente biquelante utilizado fue el anhídrido cíclico del ácido dietilpentaminoacético (DTPA), pero debido a que el  $^{99m}\text{Tc}$  forma un quelato débil con esta molécula, esta especie es poco estable y llega a disociarse fácilmente, visualizándose en la gammagrafía el Tc libre localizado en el intestino y el estómago <sup>(53)</sup>.

En la búsqueda de nuevos agentes biquelantes se encontraron los conjugados que tienen una gran afinidad por el ión metálico radiactivo, algunos ejemplos de ellos son: el conjugado iminotiolado <sup>(54)</sup>, el conjugado diamida disulfuro (DADS) <sup>(55)</sup>, el conjugado mercaptoacetilglicina (MAG3) <sup>(56)</sup> y el conjugado bis (aminoetenotiol) (BAT) <sup>(57)</sup>. Sin embargo, el uso de estos agentes incrementa considerablemente el costo de producción de la proteína o el anticuerpo radiomarcado, por lo que no son accesibles para ser utilizados en la clínica diaria <sup>(58)</sup>.

## III Sistema de premarcaje in vivo

Este sistema se basa en la administración del anticuerpo al paciente, una vez que éste se encuentra localizado en el sitio de interés y la mayoría del anticuerpo ha sido eliminado de la sangre y de los tejidos normales, se inyecta el radionúclido unido a una sustancia que reconoce al anticuerpo; así se logran altas relaciones *sitio de interés/tejido normal*, y se disminuye la dosis de radiación a tejidos normales del paciente <sup>(59-60)</sup>.

En este sistema el anticuerpo debe ser "marcado" por su fracción Fc para ser reconocido por una segunda molécula. Esta "marca" debe poseer las siguientes propiedades:

- La unión de cualquier agente al anticuerpo no debe cambiar su inmunoespecificidad.
- El anticuerpo marcado debe ser estable y mantener su afinidad por el antígeno, sin internalización.
- No deberá haber impedimento estérico para el enlazamiento múltiple.
- La biodistribución y farmacocinética del anticuerpo no deben ser alterados significativamente por la "marca".
- El anticuerpo "marcado" debe expresar una alta afinidad y selectividad por la segunda molécula de reconocimiento.
- La síntesis del anticuerpo "marcado" (bioconjugado) no debe aumentar la inmunogenicidad del anticuerpo solo.

Los agentes más utilizados en el "premarcaje" son:

a) *Conjugado biotina o anticuerpo biotinado.*- Este método se basa en la formación del complejo avidina-biotina, para lo cual se incorporan algunas moléculas de biotina (biotinilización) y se inyecta; una vez que el anticuerpo se encuentra localizado en el sitio de interés, se inyecta la avidina marcada con el radionúclido, para que se lleve a cabo la interacción química *in vivo* <sup>(61)</sup>. La formación del enlace entre la biotina y la avidina es muy rápido, y una vez formado no lo afecta los pH extremos, la temperatura ni los agentes desnaturizantes de proteínas.

La biotinilización solamente incrementa el peso molecular en un mínimo, por lo tanto se pueden incorporar de 2-6 moléculas de biotina sin afectar la inmunoreactividad del anticuerpo, su cinética plasmática, la velocidad de permeabilidad, ni la difusión. Además se utiliza un agente biquelante para unir a la biotina con el anticuerpo que reduce el impedimento estérico de la reacción avidina-biotina <sup>(62-64)</sup>.

b) *Conjugado-estreptavidina o anticuerpo estreptavidinado:* La estreptavidina es otra proteína de la familia de la avidina, está compuesta por cuatro subunidades idénticas y solamente una de ellas se une directamente al anticuerpo. El conjugado estreptavidina-biotina se realiza de igual forma que el de avidina-biotina, la diferencia es que la conjugación de la estreptavidina al anticuerpo incrementa el peso molecular en un 40% del peso molecular del anticuerpo, lo que ocasiona que su farmacocinética sea más lenta <sup>(60, 61)</sup>.

c) **Anticuerpos bifuncionales:** Los anticuerpos bifuncionales o biespecíficos son conjugados de Fab' y Fab con la doble función para reconocer al antígeno de superficie celular y al hapteno lo que le permite unir más fácilmente el radionúclido al sitio de interés <sup>(65)</sup>.

d) **Conjugado Anticuerpo-oligonucleótidos:** El principio de este conjugado es el mismo que en los casos anteriores, se realiza uniendo 3-5 oligonucleótidos (fragmentos de DNA) a cada molécula de anticuerpo, preservando su especificidad, pero tiene la desventaja de que se reduce la inmunoreactividad en un 50% debido al impedimento estérico y a la interferencia de cargas principalmente. Este tipo de conjugados son más inestables *in vitro*, por esta razón deben ser almacenados y manejados con mayor cuidado que otros anticuerpos conjugados <sup>(66)</sup>.

#### 2.3.1.5 Péptidos quimiotácticos marcados con <sup>99m</sup>Tc

Los péptidos son pequeñas cadenas de aminoácidos (fragmentos de anticuerpos) capaces de reconocer un antígeno específico, actualmente existe una tendencia a utilizar péptidos quimiotácticos para la localización de los sitios de inflamación y se supone que por ser de menor tamaño se localizan con mayor facilidad en el sitio de interés que los anticuerpos enteros.

El estudio en animales sugiere que el mecanismo de localización de los péptidos en los sitios de inflamación se debe probablemente a un proceso múltiple:

1. **Permeabilidad aumentada:** Cuando esto sucede como consecuencia del proceso de inflamación, los péptidos se localizan más fácilmente en este sitio debido al bajo peso molecular.
2. **Marcado de las células sanguíneas:** el 25% de la radiactividad circulante está unida a los leucocitos, los cuales pueden localizarse en el sitio de infección.
3. **Marcado de las células en el sitio de infección:** Después de entrar en la región de infección (por el aumento de la permeabilidad) los péptidos marcados se pueden unir a los leucocitos que se encuentren ahí.

Es por esto que los péptidos quimiotácticos marcados con  $^{99m}\text{Tc}$  son también considerados como agentes efectivos para la obtención de imágenes de infección, sin embargo, se necesita investigar más en este campo, ya que aún no está muy explorado (67, 68).

## 2.4 Detección de la radiación

En medicina nuclear es necesario determinar lo más exactamente posible el tipo, la intensidad y la energía de la radiación emitida por los radionúclidos, para lo cual se utilizan algunos detectores de la radiación. Los dos tipos más comunes son los detectores gaseosos y los detectores por centelleo (3).

### 2.4.1 Detectores gaseosos

Los detectores gaseosos se basan en la ionización de las moléculas del gas producida por la radiación, generalmente se utilizan gases inertes o nobles para reducir la posible degradación causada por la ionización e incluso es agregado un gas organico o halógeno que cede fácilmente electrones para recuperar la estructura atómica del detector. Los pares iónicos producidos se colectan como corriente eléctrica, al aplicar una diferencia de potencial entre dos electrodos. La corriente medida es proporcional al voltaje aplicado y la cantidad de radiación emitida por la fuente.

Los detectores gaseosos más comunes son el Geiger Müller (GM) y las cámaras de ionización. La diferencia entre los dos es principalmente, el voltaje de operación aplicado entre los dos electrodos (3, 10).

### 2.4.2 Detectores de centelleo

Este método se basa en la emisión de luz producida por la radiación nuclear en ciertos materiales, como por ejemplo en el cristal de Ioduro de Sodio activado con Talio [(NaI)Tl]. El proceso de centelleo se puede dividir en los siguientes pasos:

- Absorción de la radiación en el centellador produciendo ionización y excitación dentro de él y convirtiendo la energía disipada en fotones de luz visible.
- Absorción de los fotones de luz visible en el tubo fotomultiplicador y su conversión en corriente eléctrica.
- Amplificación y conteo o análisis de los pulsos producidos por el fotomultiplicador en el equipo electrónico.

Los detectores de centelleo los podemos dividir según su estado físico en sólidos y líquidos (utilizados principalmente para emisores de baja energía).

Los detectores sólidos a su vez se pueden dividir en planos y de tipo pozo, la única diferencia que presentan estos últimos con respecto a los planos es que el cristal centellador tiene un hueco cilíndrico, lo que permite aumentar la eficiencia de conteo, ya que evita que parte de la radiación emitida por la fuente, escape del volumen sensible del cristal.

### 2.4.3 CÁMARA DE CENTELLEO O GAMMACÁMARA

La cámara de centelleo o cámara angler básicamente opera de la misma forma que los detectores de centelleo simples. Esta compuesta de un cristal de centelleo de Ioduro de sodio activado con talio (NaI (Tl)) de área grande, acoplado a un arreglo de tubos fotomultiplicadores, los cuales no solo miden la cantidad de luz producida por la radiación gamma, sino que también proporcionan coordenadas  $x$ ,  $y$  de la producción de la luz en el cristal, con lo que construye imágenes de la distribución del radionúclido <sup>(10)</sup>.

# Capítulo III

## Desarrollo experimental

### 3.1 Objetivos

#### 3.1.1 *Objetivos Generales*

1. Utilizar el agente reductor clorhidrato de tris-(2-carboxietil) fosfina (TCEP-HCl), para reducir los puentes disulfuro de la inmunoglobulina G policlonal humana (IgG).
2. Preparar un juego de reactivos ("kit") liofilizado de inmunoglobulina G policlonal humana (IgG, cloruro estanoso  $\text{SnCl}_2$  y metilen-1,1 difosfonato MDP) para marcar con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  en un paso, que pueda ser utilizado en la localización de procesos inflamatorios y/o infecciosos,
3. Comparar el "kit" producido en el Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ) con un "kit" comercial (producido en Argentina) que utiliza como agente reductor el 2-mercaptoetanol (ME).

#### 3.1.2 *Objetivos Específicos*

1. Determinar la relación molar del agente reductor (TCEP-HCl) y la inmunoglobulina (IgG), adecuada para asegurar la reducción de los puentes disulfuro necesarios y llevar a cabo la marcación.
2. Determinar de la concentración del agente reductor del tecnecio ( $\text{SnCl}_2$ ).
3. Seleccionar el agente transquelante ideal para la formulación y su concentración.



4. Optimizar y estandarizar las condiciones y el tiempo de incubación requerido para llevar a cabo la marcación de la IgG por un método directo.
5. Realizar las pruebas de estabilidad *in vitro* de la formulación.
6. Verificar (*in vitro*) que la IgG no haya perdido su inmunoreactividad durante el marcado.
7. Obtención de la formulación liofilizada para el marcado de la IgG policlonal con  $^{99m}\text{Tc}$ .
8. Realizar estudios de biodistribución en animales sanos y en animales con procesos inflamatorios.
9. Comparar la formulación obtenida con una formulación comercial que tiene como agente reductor 2ME.

## 3.2 Material, Equipo y Reactivos de Trabajo

### 3.2.1 *Material*

- Cajas de Petri
- Cama para fijar al animal de laboratorio [Plas-Labs]
- Cámara de gases
- Cepo para inyectar a las ratas [Plas-Labs]
- Columna para cromatografía
- Jeringas de 5 ml y de insulina.
- Material de cirugía
- Micropipetas
- Tanque de gas con CO<sub>2</sub>
- Tubos de cristal
- Vasos de precipitados

### 3.2.2 *Equipo*

- Agitador magnético
- Cámara vertical para electroforesis [Unit SE600, Hoeffler, USA]
- Cámara vertical para transferencia [Unit SE600, Hoeffler, USA]
- Contador de cristal de centelleo tipo pozo [Canberra, UK]
- Espectrómetro UV [Beckman DU-70 ]
- Generador de <sup>99</sup>Mo-<sup>99m</sup>Tc [Getec, ININ]
- Liofilizadora [Virtis]

### 3.2.3 *Reactivos*

- Acetona [Merck]
- Ácido dietilentriamino pentacético (DTPA) [Sigma]

- Agua destilada [Pisa]
- Agua oxigenada [Merck]
- Anti-IgG humana preparado en cabra y conjugado con peroxidasa [Bio-rad Laboratories, USA]
- Azul brillante de coomasie R-250 [Sigma Chemical Co.]
- Azul de bromofenol
- Beta-mercaptoetanol
- Dodecil sulfato de sodio (Merck)
- Fluoruro estano (SnF<sub>2</sub>) [Sigma]
- Gel de agarosa [Bio-rad]
- Geles de poliacril amida
- Glicerol
- Hidróxido de amonio [Merck]
- Hidroxietilen difosfonato (HEDP) [ININ]
- IgG comercial [Sandoglobulina, Sandoz]
- Leche descremada "Svelty" [Nestle, México]
- Marcadores de peso molecular para electroforesis [Bio-rad Laboratories, USA]
- Membranas de nitrocelulosa (NC) de 0.45 mm de poro [Bio-rad, USA]
- Metilen-1,1 difosfonato (MDP) [ININ]
- Sephadex G-25 [Pharmacia Sweden]
- Seroalbúmina humana [Pasteur Mérieux]
- Solución 4 cloro 1 naftol
- Solución amortiguadora de barbital (12 g de barbiturato de sodio y 4.4 g de ácido barbiturico en 1 lt de Agua ) pH=8.2
- Solución amortiguadora fosfato salina 0.15 M pH=7.2 (PBS)
- Solución amortiguadora PBS-tween
- Solución amortiguadora tris-dodecil sulfato de sodio (SDS)-Glicerol
- Solución amortiguadora tris-glicina 0.1 M
- Solución amortiguadora Tris-SDS-metanol
- Solución salina isotónica de cloruro de sodio (NaCl)[Merck]

- Tiras de cromatografía en capa fina (ITLC-SG) [Gelman]
- Trementina
- Tris(2-carboxietil) fosfina (TCEP-HCl) [Pierce USA]

#### 3.2.4 *Animales*

- Ratas Wistar sanas de 145 - 180 g (1 mes aproximadamente)

### 3.3 Metodología

#### 3.3.01 Determinación de la pureza de IgG comercial ("Sandoglobulina")

Primero se le realizó a la IgG humana "Sandoglobulina" fue un ensayo de doble difusión en agar (Ouchterlony) para determinar su pureza y descartar la presencia de otras proteínas del suero que pudieran interferir en los resultados.

Se colocó sobre un gel la inmunoglobulina G "Sandoglobulina" y los anticuerpos contra posibles contaminantes (otras proteínas contenidas en el suero humano), como pueden ser las inmunoglobulina A (IgA) e inmunoglobulina M (IgM), para determinar si se encontraban presentes en la muestra. El ensayo se consideraba positivo si se formaba una banda turbia por la precipitación del complejo antígeno-anticuerpo, que al ser teñida con el azul brillante de coomasie <sup>(69)</sup> se diferenciaba fácilmente aun cuando la concentración del agente contaminante fuera muy baja.

Se prepararon 2 geles de agarosa 2% en amortiguador de barbital con una fuerza iónica de 0.08 y pH=8.2 . Y se colocaron las muestras en el siguiente orden: En el primer gel se colocó en el pozo central "Sandoglobulina", en el pozo 1: anti-IgG humana, en el pozo 2: anti-suero humano preparado en conejo, en el pozo 3: anti-albúmina humana, en el pozo 4: anti-IgA humana, en el pozo 5: anti-IgM humana, y en el pozo 6: anti-suero humano preparado en conejo (Figura 3.1).

Para comprobar que efectivamente la IgG era un producto humano, que los anticuerpos utilizados estaban en buen estado y reaccionaban contra los antígenos correspondientes, se realizó la prueba en un segundo gel colocando las muestras en el siguiente orden: En el pozo central el anti-suero humano preparado en conejo, en el pozo 1: albúmina humana, en el pozo 2: IgA humana, en el pozo 3: "Sandoglobulina", en el pozo 4: IgG humana purificada, en el pozo 5: "Sandoglobulina", y en el pozo 6: IgM humana. Todas las muestras tenían una concentración de 5 mg de proteína por ml.

Las cajas de petri con los geles se colocaron en una cámara húmeda y las proteínas se dejaron difundir por 48 h. a temperatura de 18 a 25 °C.

Posteriormente los geles se lavaron exhaustivamente con solución salina isotónica y las bandas de precipitación originadas por la formación del complejo antígeno-anticuerpo se tiñeron con azul brillante de Coomasie al 0.025 %.

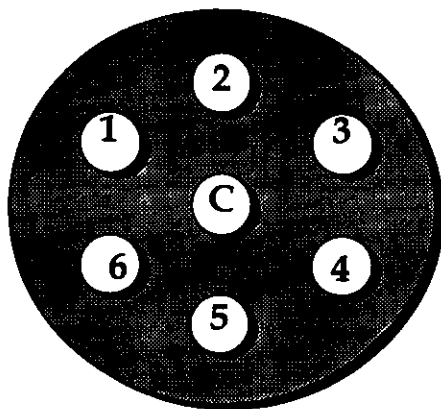


Figura 3.1 Distribución de las muestras en el gel.

### 3.3.02 Determinación de la concentración de los reactivos y condiciones de marcado.

Determinada la pureza de la "Sandoglobulina" se procedió a marcarla reduciendo los puentes disulfuro de la IgG con el clorhidrato de tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP-HCl). Para llevar a cabo la reducción se prepararon las siguientes soluciones.

a) Solución de IgG:

Disolver 133.33 mg de "Sandoglobulina" (equivalentes a 50 mg de IgG) en 1 ml de la solución amortiguador fosfato salina (PBS) 0.15 M pH 7.2 .

b) Solución de fosfina :

Disolver 10 mg de clorhidrato de tris (2-carboxietil) fosfina TCEP-HCl en 1 ml de agua destilada.

c) Solución de MDP con SnF<sub>2</sub> :

Disolver 20 mg de metilen-1,1-difosfonato (MDP) y 1.4 mg de fluoruro estano (SnF<sub>2</sub>) en 10 ml de solución salina.

d) Solución de HEDP con  $\text{SnF}_2$  :

Disolver 20 mg de hidroxietileno-1, 1-difosfonato (HEDP) y 1.4 mg de fluoruro estanoso ( $\text{SnF}_2$ ) en 10 ml de solución salina.

La determinación de las concentraciones molares de los reactivos necesaria, así como las condiciones ideales de reacción para obtener el marcado con la mayor eficiencia posible se llevó a cabo comparando varias formulaciones.

A una cantidad constante de 3 mg de IgG se le agregaron diferentes cantidades de fosfina (0.25 mg, 0.5 mg, 0.75 mg, y 1 mg) y se incubó cada formulación por diferentes de tiempos (5, 10, 15, 20, y 30 min.) a temperatura de 18 a 25 °C.

Una vez terminada la reacción el producto obtenido fue purificado, para eliminar la fosfina que no había reaccionado, por cromatografía en columna de "Sephadex G-25", utilizando una columna 1 cm de diámetro por 9 cm de altura con un volumen muerto de 4.5 ml (22 ml /hr) y utilizando como fase móvil PBS. Se recolectaron 10 fracciones de 1.5 ml y se determinó la concentración de proteínas en cada una, midiendo la absorbancia a 280 nm, con un espectrómetro de UV. Se mezclaron las fracciones con mayor concentración de proteína y se determinó la concentración final en la mezcla por medio de espectroscopía UV.

La cantidad adecuada de reductor del  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  y el agente transquelante ideal se determinaron agregando diferentes cantidades (10  $\mu\text{l}$ , 20  $\mu\text{l}$ , 30  $\mu\text{l}$ , 40  $\mu\text{l}$ , 50  $\mu\text{l}$ , ó 60 $\mu\text{l}$ ) de cada una de las soluciones de  $\text{SnF}_2$  con el agente transquelante (MDP o HEDP) por cada mg de proteína contenido en la mezcla.

Para la obtención del complejo marcado, a cada uno de los tubos que contenían la proteína, el agente transquelante y  $\text{SnF}_2$ , se les agregó 7.4 Mbq (200  $\mu\text{Ci}$ ) de pertecnetato de sodio obtenido del generador  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99\text{m}}\text{Tc}$  y se incubó por diferentes lapsos de tiempo de 18 - 25 °C . Se determinó la eficiencia de marcado de cada formulación a los 15, 30 y 45 min., por microcromatografía ascendente con tiras para cromatografía en capa fina (ITLC SG) en tres solventes acetona, solución salina 0.9% y amoniaco:metanol:agua (1:2:5). Para la cromatografía con el último solvente fue necesario preparar las tiras de ITLC antes de correr la muestra, humedeciéndolas en una solución de albúmina (125 mg de albúmina en 50 ml) y dejándolas secar a temperatura ambiente.

### 3.3.03 Optimización y estandarización del proceso de liofilización

Determinada la concentración de los reactivos y el tiempo de reacción, se liofilizó la formulación para mantener estable el producto por más tiempo. Se propuso un procedimiento de liofilización, para asegurar que se conservaran todas las propiedades químicas, biológicas e inmunológicas de la proteína.

### 3.3.04 Determinación de la estabilidad de la especie $^{99m}\text{Tc}$ -IgG.

Para determinar la estabilidad de la especie IgG- $^{99m}\text{Tc}$  se agregó a la solución de IgG marcada, un ligante fuerte, ácido dietilentriaminopentacético (DTPA) y se determinó el grado de transquelación por medio de cromatografía en capa fina (ITLC-SG).

### 3.3.05 Determinación del grado de desnaturalización

La comprobación de que el procedimiento de marcado no desnaturaliza a la proteína se llevó a cabo realizando por duplicado, una electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida (PAGE), al 5% (gel concentrador) y al 7.5% (gel separador) en condiciones semidesnaturalizantes (con SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol sin calentamiento) de acuerdo a las técnicas descritas en la literatura <sup>(70)</sup>.

Se aplicaron muestras de IgG intacta, IgG reducida con fosfina, IgG reducida con fosfina y purificada por la columna de Sephadex e IgG marcada con  $^{99m}\text{Tc}$ , disueltas en una solución amortiguadora de tris-SDS-glicerol con una concentración de 20  $\mu\text{g}$  por carril y un volumen total de 30  $\mu\text{l}$ . Se utilizó azul de bromofenol al 0.1% como marcador del frente de corrida.

En el mismo gel se colocó una muestra de IgG purificada grado analítico para observar si existía alguna diferencia con la "Sandoglobulina". También se colocó una mezcla de marcadores de alto peso molecular que contenía las siguientes proteínas: miosina (205 kD),  $\beta$ -galactosidasa (118 kD, albúmina sérica bovina (BSA, 85 kD) y ovoalbúmina (OVA, 47 kD) y otros anticuerpos como IgA, IgM en el orden que se menciona a continuación:



Carril 1: marcadores de alto peso molecular Carril 6: IgM humana

Carril 2: Suero humano;

Carril 7: IgA humana

Carril 3: "Sandoglobulina"

Carril 8: "Sandoglobulina" reducida con la fosfina

Carril 4: IgG humana purificada

Carril 9: "Sandoglobulina" reducida después de pasar por la columna de Sephadex G-25

Carril 5: albúmina humana

Carril 10: "Sandoglobulina" marcada con  $^{99m}\text{Tc}$ .

La electroforesis se realizó en una cámara con un voltaje de 100 Volts, una corriente de 30 mA, durante 4 horas a temperatura ambiente (18 - 25°C), y el amortiguador de corrida fue Tris-glicina 0.1 M a pH = 8.3 con dodecil-sulfato de sodio (SDS). Terminada la electroforesis uno de los geles se tiñó con azul brillante de Coomasie al 0.025 %, y el otro se usó para realizar la prueba de Western Blot .

### *3.3.06 Determinación de la inmunoreactividad*

El Western Blot es una prueba muy sensible utilizada para determinar la inmunoreactividad de la IgG marcada.

Después de la electroforesis, todas las muestras con excepción de los marcadores los marcadores de peso molecular fueron colocadas en los carriles del gel y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (NC) de 0.45 mm de poro, en una cámara vertical para transferencia con una solución de Tris-SDS-metanol como amortiguador de transferencia, con voltaje de 100V y corriente de 100 mA, por 2 horas de 18 a 25°C y agitación magnética constante.

Las muestras quedaron colocadas en la membrana como se menciona a continuación:

Carril 1: Suero humano

Carril 6: IgA humana

Carril 2: "Sandoglobulina"

Carril 7: "Sandoglobulina" reducida  
con la fosfina

Carril 3: IgG humana

Carril 8: "Sandoglobulina" reducida  
después de pasar por la  
columna de Sephadex G-25

Carril 4: albúmina humana

Carril 9: "Sandoglobulina" reducida  
después de pasar por la  
columna de Sephadex G-25

Carril 5: IgM humana

Terminada la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa (NC) se bloqueó el área que no contenía muestras, con una solución de leche descremada "Svelty" al 10 % en PBS-Tween, por dos horas a temperatura ambiente y con agitación constante. Después la membrana se lavó 3 veces con PBS-Tween y se realizó la detección del anticuerpo marcado con  $^{99m}\text{Tc}$  incubándola por 2 horas, a 18 - 25 °C, con agitación constante con 20 ml de anti-IgG humana preparado en cabra y conjugado con peroxidasa, diluido 1:1000 en PBS-Tween. Para revelar el sitio donde ocurre la reacción antígeno-anticuerpo entre la IgG marcada con  $^{99m}\text{Tc}$  y el conjugado anti-IgG, se lavó la membrana de NC con PBS-Tween y se sumergió en la solución reveladora de peroxidasa (4-cloro-1-naftol y  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) hasta la aparición de las bandas. La reacción enzimática de la peroxidasa se detuvo sumergiendo la membrana de NC en una caja Petri con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada (70-71).

La prueba se reporta como positiva si al revelar la membrana de NC queda una franja de color azul brillante debido a la formación del complejo antígeno-anticuerpo.

### 3.3.07 Estudios de biodistribución en ratas sanas

Los estudios de biodistribución se realizaron en ratas Wistar sanas, de 145 a 180 g de peso, a las que se les administró una dosis de 3.7 MBq (100 $\mu$ Ci) de  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG por la vena de la cola.

Después de un tiempo establecido postinyección se sacrificó al animal en una cámara de gases con  $\text{CO}_2$ , inmediatamente se tomaron muestras de sangre por medio de punción cardiaca y se extrajeron los órganos de interés (corazón, pulmón, hígado, bazo, riñones, fémur, músculo sano).

Se pesó y determinó la actividad de cada uno de los órganos por medio de un detector de cristal de centelleo tipo pozo. Para evitar el error por decaimiento, se corrigieron las cuentas obtenidas experimentalmente sustituyendo el tiempo que había transcurrido entre la lectura del primer órgano y la lectura del órgano de interés, con la fórmula del decaimiento radiactivo:

$$A = A_0 e^{-\lambda t}$$

Se calculó la concentración del radiofármaco en cada órgano como porcentaje de la dosis por gramo de tejido.

### 3.3.08 Estudios de biodistribución en ratas con sitios de inflamación

Los estudios de biodistribución se hicieron en ratas Wistar sanas de 145 a 180 g de peso, a las cuales se les administró trementina (100 $\mu$ L) intramuscular en el muslo de una de las patas traseras, para producir un sitio de inflamación. Tres días después, ya que el sitio de inflamación era notorio se les administró una dosis de 3.7 MBq (100 $\mu$ Ci) de  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG por la vena de la cola.

Después de un tiempo establecido postinyección se sacrificó al animal en una cámara de gases con  $\text{CO}_2$ , inmediatamente se tomaron muestras de sangre por medio de punción cardiaca y se extrajeron los órganos de interés (corazón, pulmón, hígado, bazo, riñones, fémur, músculo sano, músculo infectado).

Se pesó y determinó la actividad de cada uno de los órganos como se describe anteriormente.

Se calculó la concentración del radiofármaco en cada órgano como porcentaje de la dosis por gramo de tejido.

### 3.3.09 Estudios de estabilidad

Se realizaron pruebas para determinar la vida media de anaquel del juego de reactivos y la estabilidad *in vitro* del complejo  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG por medio de técnicas como cromatografía y espectrofotometría de U.V.

### 3.3.10 Comparación de la formulación obtenida con una formulación comercial

Una vez asegurado que la IgG se marcaba eficientemente, sin desnaturalizarse, y conservando su inmunoreactividad, se comparó la eficiencia de marcado con la de un "kit" de IgG reducida con 2ME, producido y liofilizado en Argentina por la Comisión Nacional de Energía Atómica de ese país.

## Capítulo IV

### RESULTADOS Y

### DISCUSIÓN DE RESULTADOS

#### 4.1 Determinación de la pureza de la IgG comercial ("Sandoglobulina")

Los resultados del ensayo de Ouchterlony para la "Sandoglobulina" se muestra en la figura 4.1.

En la figura 4.1 A se puede apreciar que entre el pozo central que contiene la "Sandoglobulina" y el pozo uno que contiene la anti-IgG humana se formó una banda de precipitación de color azul brillante, indicando que la muestra contiene IgG y que efectivamente es un producto humano como se esperaba (71). En esta figura también se observa la formación de bandas de precipitación entre el pozo central que contiene la Inmunoglobulina y los pozos 2 y 6 que contienen el antisuero humano preparado en conejo. La presencia de las bandas de precipitación indican que la muestra efectivamente es un producto humano.

El hecho de no observar otras bandas de precipitación entre el pozo central y los demás pozos nos indica que la "Sandoglobulina" se encuentra libre de otras proteínas del suero, como la albúmina humana, la inmunoglobulina A y la inmunoglobulina M.

Para comprobar que todos los reactivos estaban en buen estado se realizó una segundo ensayo en gel (figura 4.1 B), en el que se colocó un antisuero humano en el pozo central y se observó la formación de bandas de precipitación color azul en todos los pozos indicando que todas las muestras son productos existentes en el suero humano y se encuentran en buen estado.

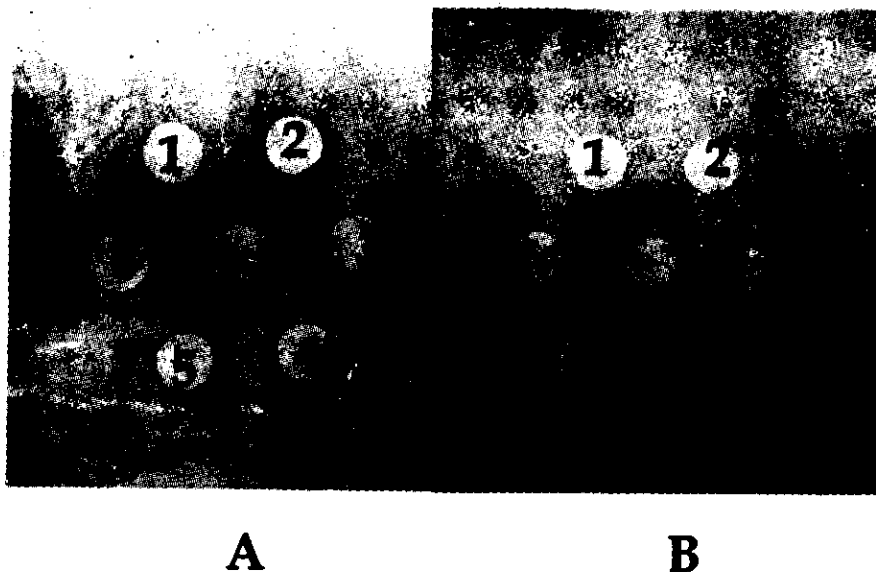


Figura 4.1 Ensayo de Ouchterlony .

A) El pozo central contiene "Sandoglobulina", el pozo 1: anti-IgG humana; el pozo 2: antisuero humano preparado en conejo; el pozo 3: anti-albúmina humana; el pozo 4: anti-IgA humana; el pozo 5: anti-IgM humana; el pozo 6: antisuero humano preparado en conejo. Las bandas de precipitación se formaron entre el pozo central y los pozos 1, 2 y 6. B) El pozo central contiene antisuero humano preparado en conejo; el pozo 1: albúmina humana; el pozo 2: IgA humana; el pozo 3: "Sandoglobulina"; el pozo 4: IgG humana purificada; el pozo 5: "Sandoglobulina"; el pozo 6: IgM humana. Se observan bandas de precipitación en todos los casos.

#### 4.2 Determinación de la concentración de los reactivos y condiciones de marcado.

Para establecer la relación molar adecuada para la formulación, se determinó la eficiencia de marcado de cada una de las formulaciones propuestas de acuerdo con los resultados obtenidos por la cromatografía en los tres solventes, Solución Salina al 9%, Acetona, y una mezcla de  $\text{NH}_4\text{OH}$ : Metanol: $\text{H}_2\text{O}$  en una proporción 1:2:5. (figura 4.2).

El porcentaje de  $^{99m}\text{Tc}$  libre se determinó calculando, el porcentaje de la actividad que existe en el frente de la cromatografía con acetona. El porcentaje de  $^{99m}\text{Tc}$  reducido hidrolizado se determinó calculando el porcentaje de actividad presente en el origen de la cromatografía con la mezcla de solventes.

### SOLUCIÓN SALINA

### ACETONA

### $\text{NH}_4\text{OH}$ : METANOL: $\text{H}_2\text{O}$

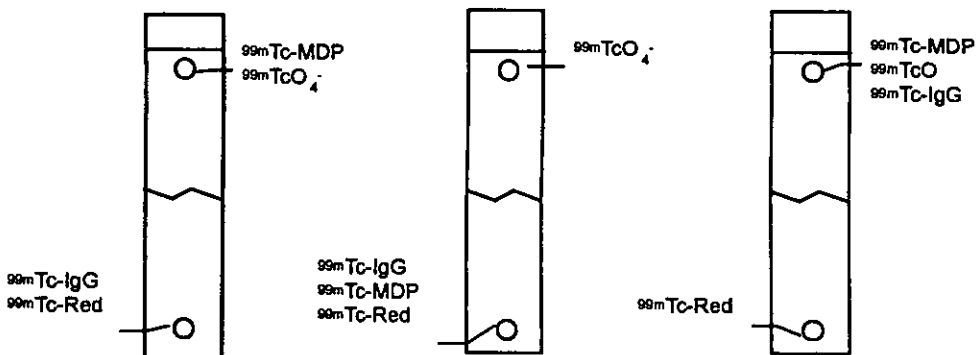


Figura 4.2 Cromatografías de  $^{99m}\text{Tc-IgG}$  con diferente fase móvil

Para determinar el porcentaje de  $^{99m}\text{Tc}$ -agente transquelante (MDP o HEDP) se le restó al porcentaje de actividad obtenido en el frente de la cromatografía con solución salina, el porcentaje de la actividad en el frente de la cromatografía con acetona.

Por último para determinar el porcentaje de  $^{99m}\text{Tc-IgG}$  se le restó al porcentaje de actividad obtenido en el origen en la cromatografía con solución salina, el porcentaje de la actividad en el origen de en cromatografía con la mezcla de solventes.

Los resultados demostraron que la mayor eficiencia de marcado se logra cuando se reducen 3 mg de IgG utilizando de 0.5 a 0.75 mg de TCEP-HCl y se incubaba por un tiempo mayor a 15 min. figura 4.3.

La purificación es un paso muy importante, por que garantiza la eliminación del TCEP-HCl que por ser un agente reductor es tóxico para el organismo. Al purificar el producto por cromatografía en columna la mayor

concentración de la especie  $^{99m}\text{Tc-IgG}$  se encontraba en la cuarta, quinta y sexta fracción, es decir entre 5 y 9 ml de elución, mientras que el TCEP-HCl por tener peso molecular mucho menor que la IgG, permanece en la columna por más tiempo.

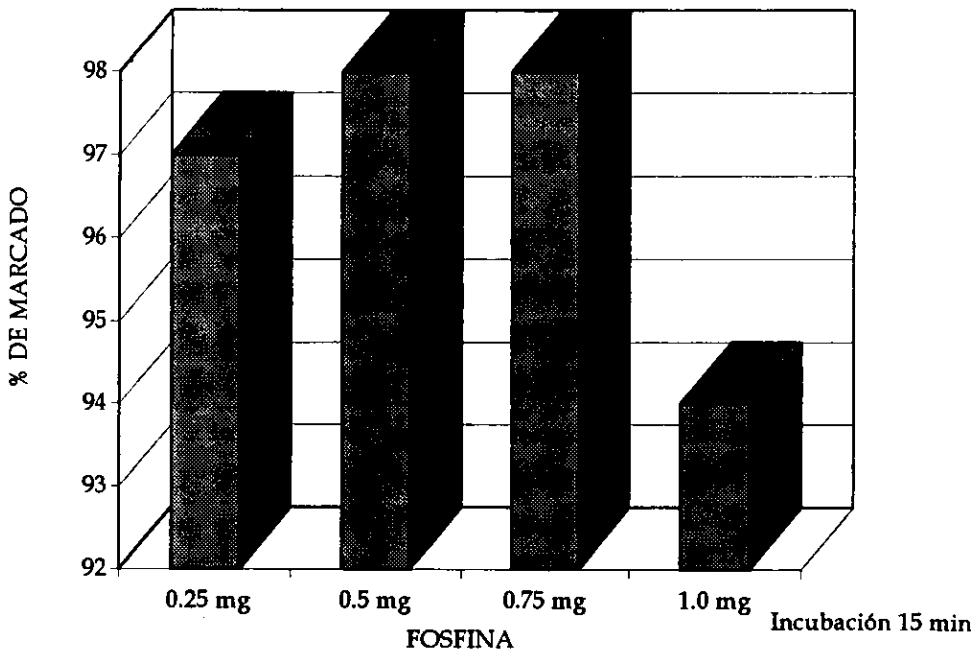


Figura 4.3 Eficiencia de marcado de la especie  $^{99m}\text{Tc-IgG}$  al agregar diferentes cantidades de fosfina para reducir los puentes disulfuro.

El MDP resultó ser mejor agente transquelante que el HEDP, porque aun cuando los dos compuestos son bifosfonatos con afinidad semejante por  $^{99m}\text{Tc}$ , al ser utilizado bajo las mismas condiciones se obtuvo mayor cantidad de la especie  $^{99m}\text{Tc-HEDP}$  que de la especie  $^{99m}\text{Tc-MDP}$ , ambos como subproductos al final del proceso de marcado. Una posible explicación a este fenómeno puede darse en función de las estructuras del MDP y HEDP, ya que el HEDP contiene un grupo oxidrilo más que el MDP como se muestra en la figura 4.4, el cual quizá favorezca la formación de una especie  $^{99m}\text{Tc-HEDP}$  (5) y por lo que



se presenta en mayor concentración al final de la reacción como se observa en la figura 4.5 . Por este motivo sólo se utilizó MDP como agente trasquelante al variar los concentraciones del  $\text{Sn}^{2+}$  por que aun cuando la diferencia es muy pequeña proporciona mayor eficiencia de marcado de la especie  $^{99m}\text{Tc-IgG}$ .

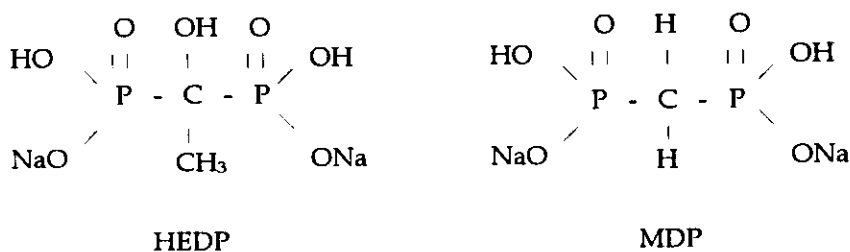


Figura 4.4 Estructura de los agentes trasquelantes

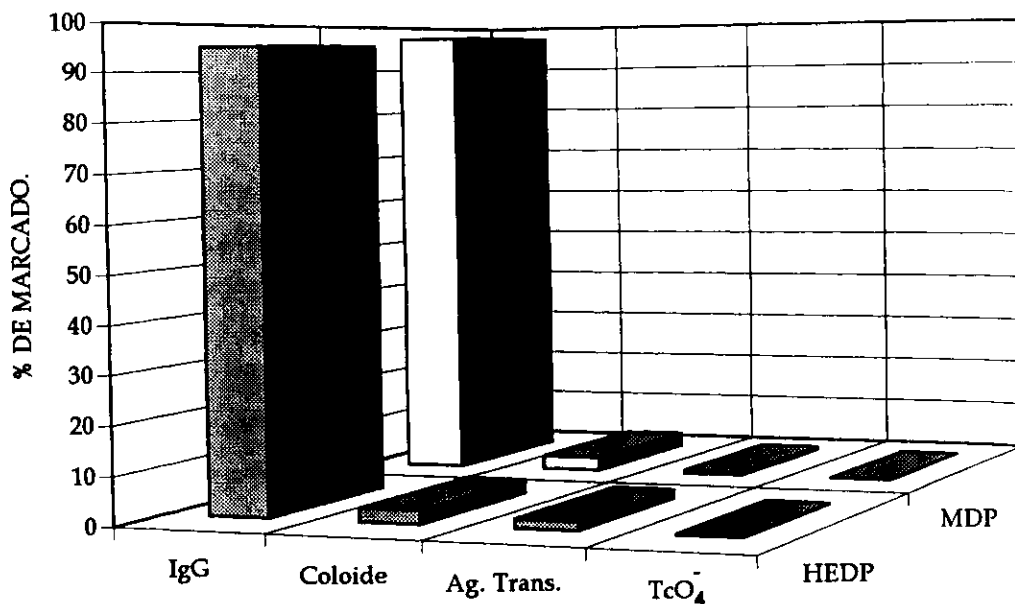


Figura 4.5 Eficiencia de marcado de la especie  $^{99m}\text{Tc-IgG}$  al agregar diferentes agentes trasquelantes (MDP y HEDP)

Al evaluarse la concentración necesaria de  $\text{Sn}^{2+}$  para reducir al pertecnetato, la mayor eficiencia de marcado se obtuvo haciendo reaccionar 0.003 mg de  $\text{Sn}^{2+}$  por cada mg de IgG reducida y purificada. Se observó que aumentando la cantidad de  $\text{Sn}^{2+}$  a 0.006 mg la eficiencia de marcado disminuye, por la formación del complejo  $^{99\text{m}}\text{Tc-MDP}$ , y si se aumenta a 0.01 mg, la eficiencia de marcado disminuye aun más por la formación de coloide como se muestra en la figura 4.6.

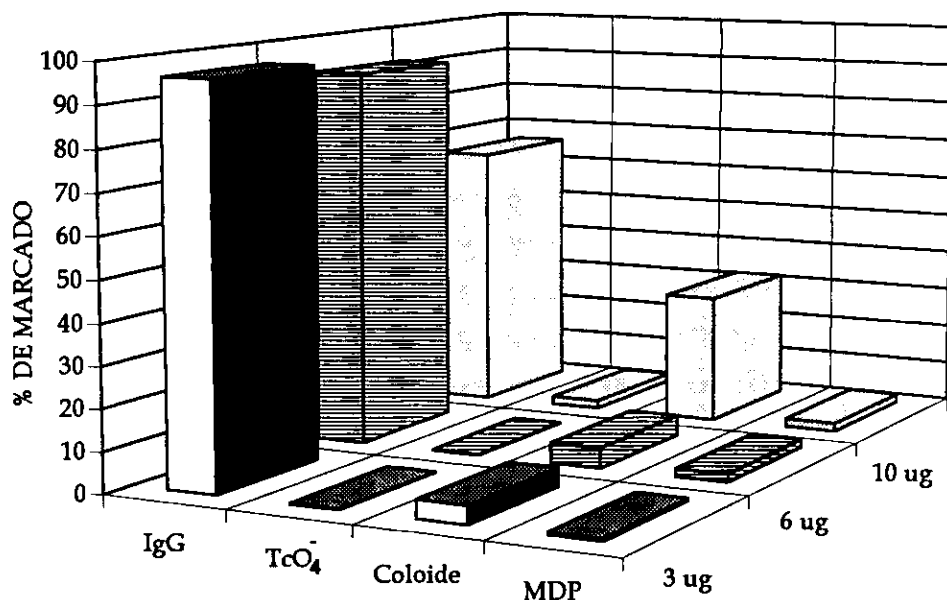


Figura 4.6 Eficiencia de marcado de la especie  $^{99\text{m}}\text{Tc-IgG}$  utilizando diferentes concentraciones del ión estanoso ( $\text{Sn}^{2+}$ )

También se determinó que la concentración de  $\text{Sn}^{2+}$  influye sobre la estabilidad de la especie  $^{99\text{m}}\text{Tc-IgG}$  postmarcado, ya que esta es mayor cuando se utiliza menor cantidad de  $\text{Sn}^{2+}$ . Este fenómeno se comprueba fácilmente en la figura 4.7, donde se observa la disminución drástica en la eficiencia de marcado con 10  $\mu\text{g}$  de  $\text{Sn}^{2+}$  a las 4 h como consecuencia de la formación de coloide.

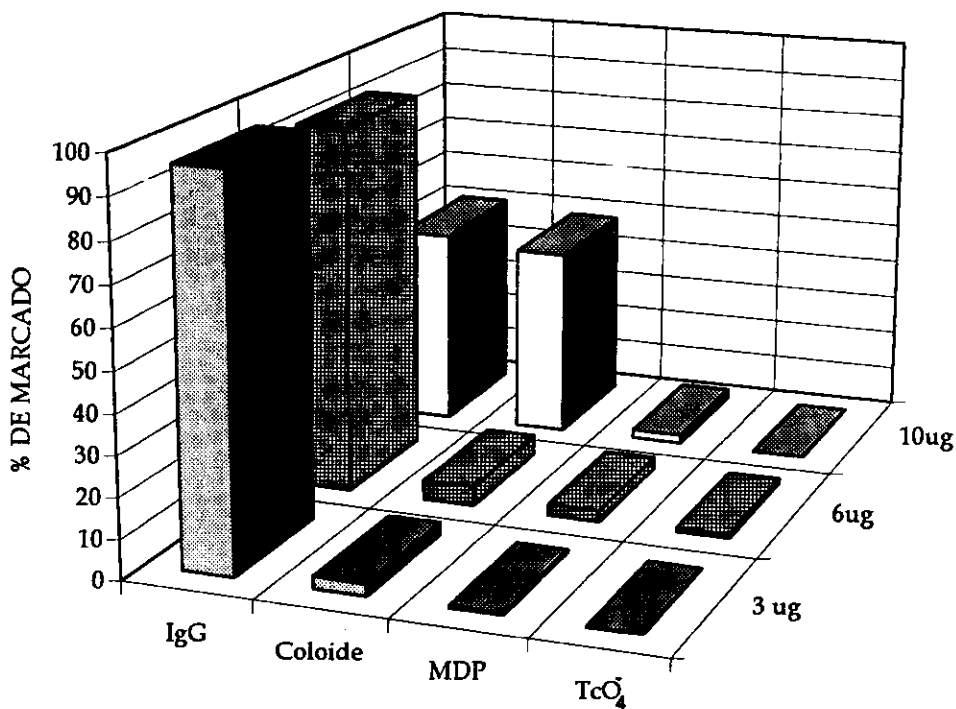


Figura 4.7 Eficiencia de marcado de la especie  $^{99m}\text{Tc-IgG}$  utilizando diferentes concentraciones del ión estano ( $\text{Sn}^{2+}$ ) después de 4hr. del mismo.

### 4.3 Optimización y estandarización del proceso de liofilización

Se comprobó que el proceso de liofilizado de la Sandoglobulina con el agente reductor del tecnecio y el agente transquelante, aumentaba su vida media de anaquel y no afectaba la eficiencia de marcado, ya que el producto liofilizado como el recién preparado presentan la misma pureza radioquímica.

La formulación o juego de reactivos del radiofármaco nuevo que se propone, debe contener la menor concentración posible de los agentes sin disminuir la eficiencia de marcado.

La preparación y marcado del mismo con el fin de obtener la mejor eficiencia se encontró que es la siguiente:

1. Reducir 50 mg de IgG con 8.33 mg de clorhidrato de tris (2-carboxietil) fosfina TCEP-HCl.
2. Incubar por 15 min. y purificar por columna de Sephadex G-25.
3. Colectar varias fracciones, mezclar todas aquellas que tengan una concentración de proteína mayor al 0.5 mg/ml y calcular la concentración final de la muestra por espectroscopía de UV.
4. Agregar 20  $\mu$ L de la solución de MDP con SnF<sub>2</sub> por cada mg de proteína (40  $\mu$ g de MDP y 3  $\mu$ g de SnF<sub>2</sub> por mg de proteína).
5. Depositar alícuotas de 3 mg de IgG en viales de cristal.
6. Liofilizar el producto y mantenerlo en refrigeración.
7. Marcar el kit agregando 370 MBq (10 mCi) de <sup>99m</sup>Tc.

Este método presentó una buena eficiencia de marcado de  $97\% \pm 2.73\%$  (se analizaron 40 viales de lotes diferentes) y su principal ventaja es que requiere de poco tiempo de incubación para reducir los puentes disulfuro de la IgG (15 min), en comparación con otros conocidos, como el de Eckelman que requiere de 24 hr para llevar a cabo la reducción con cloruro estanoso o el de Ferro <sup>(72)</sup> donde se realiza la reducción con 2ME durante 30 min.

#### 4.4 Determinación de la estabilidad de la especie <sup>99m</sup>Tc-IgG

La prueba de transquelación con el DTPA fue negativa <sup>(44)</sup>, ya que al realizar la cromatografía no se encontró <sup>99m</sup>Tc-DTPA. Esto indica que todo el <sup>99m</sup>Tc permanece unido a la IgG aun en presencia del ligante fuerte y sugiere que la estabilidad de la especie <sup>99m</sup>Tc-IgG es muy alta (figura 4.8).

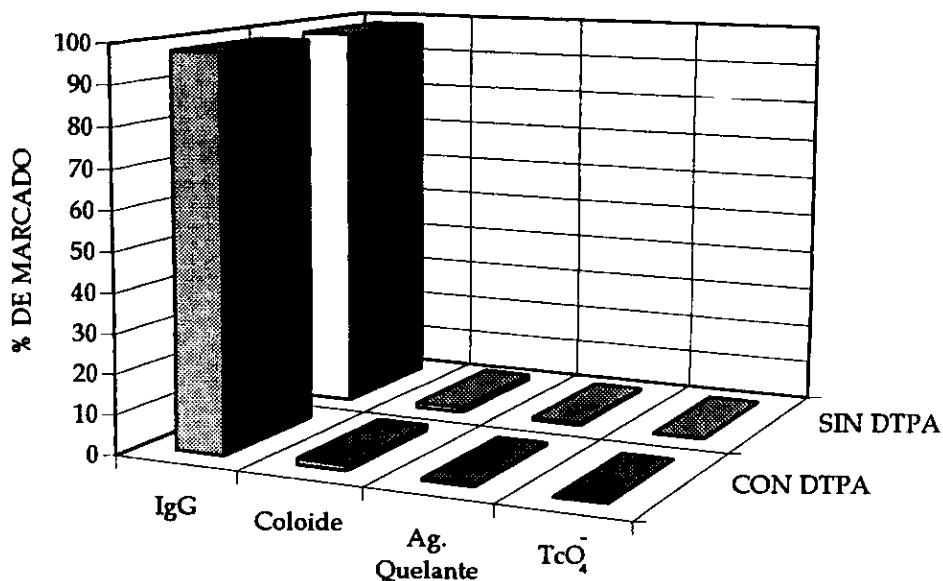


Figura 4.8 Estabilidad del enlace de la especie <sup>99m</sup>Tc-IgG probada con DTPA.

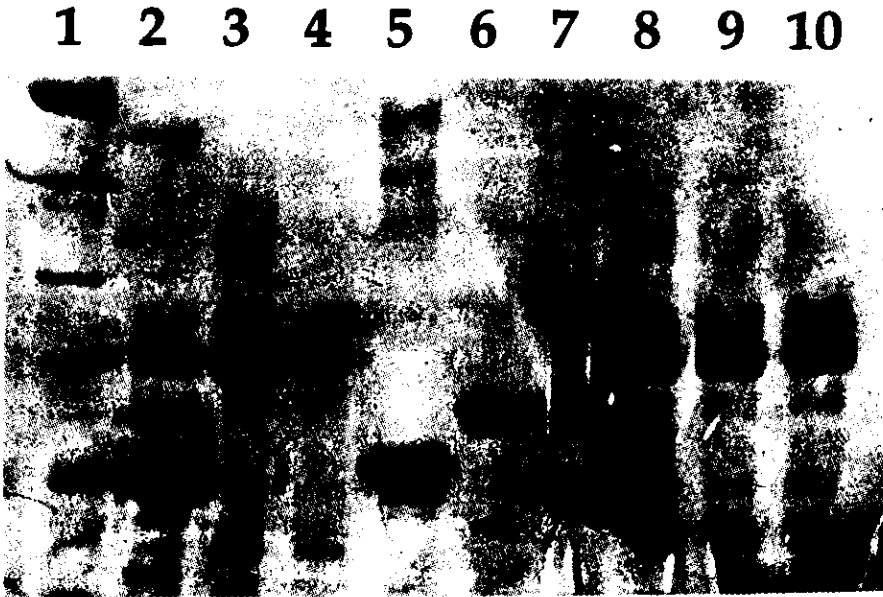
#### 4.5 Determinación del grado de desnaturalización

La figura 4.9, muestra los resultados de la electroforesis en gel de poliacrilamida realizada a la inmunoglobulina (nativa, reducida y marcada). Las especies fueron colocadas de la siguiente manera:

El Carril 1 contiene los marcadores de peso molecular, en el se observan las bandas de color azul características de cada uno de ellos, separadas una de otra, indicando que la electroforesis fue corrida correctamente y que ésta separó a las proteínas de diferente peso molecular eficientemente.

El carril 2, contiene una muestra de suero humano, en el se pueden apreciar varias bandas de color azul correspondientes a cada una de las proteínas presentes en el suero, la intensidad del color de cada banda, es directamente proporcional a la concentración de la proteína que representan en

el suero. Como se esperaba la banda más ancha y de color más intenso representa a la albúmina, por que es la proteína que se encuentra en mayor concentración. En este carril también se observa una banda a la altura de la IgG de color azul brillante pero más tenue, lo que indica que su concentración en el suero es menor que la albúmina.



*Figura 4.9 SDS PAGE de la  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG*

*Carril 1: marcadores de alto peso molecular; carril 2: Suero humano; carril 3: "Sandoglobulina"; carril 4: IgG humana; carril 5: albúmina humana; carril 6: IgM humana; carril 7: IgA humana; carril 8: "Sandoglobulina" reducida con la fosfina; carril 9: "Sandoglobulina" reducida después de pasar por la columna de Sephadex G-25; carril 10 "Sandoglobulina" marcada con  $^{99m}\text{Tc}$ . La concentración de la proteína fue 20  $\mu\text{g}$  por carril.*

El carril 3, contiene "Sandoglobulina", en él se observa una banda muy ancha y de color azul intenso que representa la IgG y otras pequeñas bandas de color mas tenue que proponemos son posibles fragmentos de la misma proteína por que de acuerdo a la prueba de Ouchterlony la "Sandoglobulina" no se encuentra contaminada con otras proteínas.

En el carril 4, se colocó IgG humana purificada (reactivo analítico) para observar si existía diferencia entre ésta y la "Sandoglobulina". Debido a que el reactivo es muy costoso no fue posible colocarlo en la misma concentración, es por esto que las bandas presentan un color azul con diferente intensidad, sin embargo se encuentran a la misma altura. También se observan las bandas de los fragmentos de degradación, con lo que se confirma la pureza de la "Sandoglobulina".

En el carril 5, se colocó albúmina humana, en él se observa la banda a la misma altura que la banda más ancha del carril 2, esto comprueba que efectivamente la proteína de mayor concentración en el suero, es la albúmina.

En el carril 6, se observa una única banda correspondiente a la IgM humana, indicando que esta proteína estaba pura. La ausencia de bandas a esta altura en los carriles que contienen "Sandoglobulina" comprueba que no estaba contaminada con IgM.

En el carril 7 se colocó la IgA humana, al obtenerse las bandas de precipitación a diferente altura de las de la "Sandoglobulina" se comprobó que esta última no contenía IgA, como se puede observar en la figura 4.9.

En los carriles 8, 9 y 10 se colocaron la "Sandoglobulina" reducida con la fosfina, la "Sandoglobulina" reducida y purificada pasando por una columna de Sephadex G-25; y la "Sandoglobulina" marcada con  $^{99m}\text{Tc}$  respectivamente. Estos no presentan bandas diferentes o con diferente intensidad a las de la "Sandoglobulina" antes del marcado, lo cual demuestra que la proteína no se desnaturaliza, no se fragmenta ni produce agregados durante el proceso de reducción y marcado (figura 4.9).

#### 4.6 Determinación de la inmunoreactividad

Los resultados de las pruebas de Western Blot fueron los siguientes:

En el carril 1 se colocó una muestra de suero humano y sólo se observa una banda teñida de color azul, correspondiente a la IgG, con lo que puede comprobarse que este ensayo es específico.

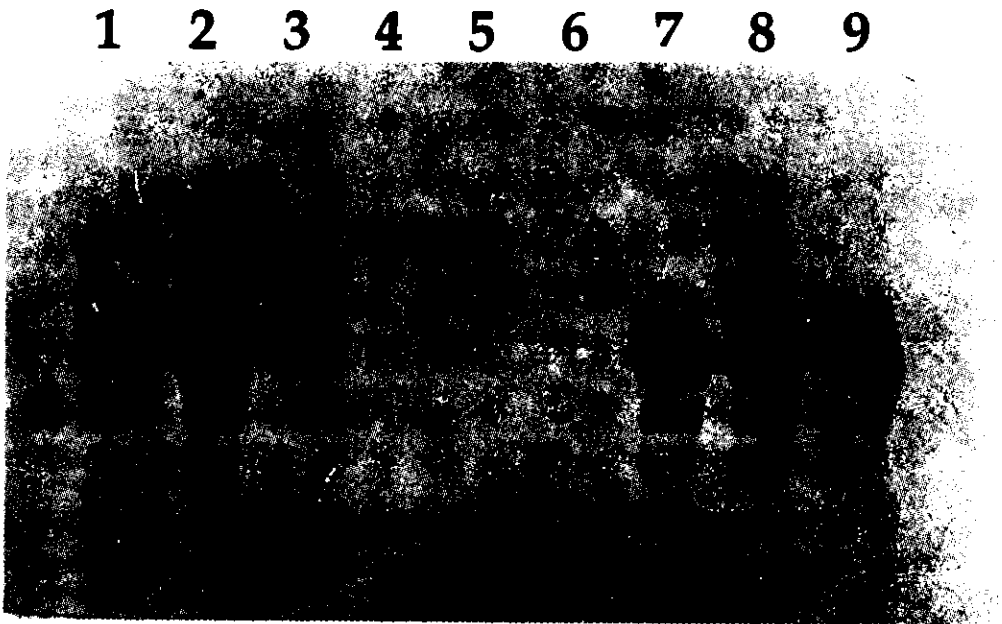


Figura 4.10 Western Blot de la  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG

Carril 1:: Suero humano; carril 2: "Sandoglobulina"; carril 3: IgG humana; carril 4: albúmina humana; carril 5: IgM humana; carril 6: IgA humana; carril 7: "Sandoglobulina" reducida con la fosfina; carril 8: "Sandoglobulina" reducida después de pasar por la columna de Sephadex G-25; carril 9: "Sandoglobulina" marcada con  $^{99m}\text{Tc}$ . La concentración de la proteína fue 20  $\mu\text{g}$  por carril.



En el carril 2 se colocó una muestra de "Sandoglobulina", en el se observan todas las bandas formadas teñidas de un color azul brillante. Con estos resultados se comprueba que las bandas inferiores de menor intensidad eran pequeños fragmentos de degradación de la misma proteína, de otra forma no se habrían teñido con esta técnica tan específica.

En el carril 3 se colocó la IgG humana purificada. Se observaron las bandas de precipitación de color azul a la misma altura que la Sandoglobulina como puede verse en la figura 4.10.

En los carriles 4, 5 y 6 se colocaron albúmina humana, IgM humana y IgA humana respectivamente, y no se observó ninguna banda colorida, esto indica que no se presentó la reacción específica.

En los carriles 7, 8 y 9 se colocaron "Sandoglobulina" reducida con la fosfina, "Sandoglobulina" reducida después de pasar por la columna de Sephadex G-25 y "Sandoglobulina" marcada con  $^{99m}\text{Tc}$ , respectivamente. Se observó que presentaron las bandas color azul en las mismas zonas que la "Sandoglobulina" nativa, lo que indica que la IgG sigue efectuando la reacción específica antígeno-anticuerpo, por lo tanto sus propiedades inmunológicas permanecen intactas aún después del proceso de reducción y marcado (figura 4.10).

## 4.7 Estudios de biodistribución en ratas

Los estudios de biodistribución en ratas sanas se hicieron a diferentes tiempos, a 2, 4 y 24 h postinyección. Primero se realizaron dos horas después de haber sido inyectado la  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG (figura 4.11), sin embargo como gran cantidad del complejo marcado aún se encontraba en circulación, se decidió sólo hacer los estudios de biodistribución en animales, con sitios de inflamación 4 horas y 24 h postinyección, para asegurar que la mayor parte de la  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG se hubiera fijado en el sitio de interés o eliminado por vía renal, y que así la concentración en sangre bajara.

Los resultados de la biodistribución del radiofármaco de cada una de las ratas estudiadas se encuentran en las tablas 4.1, 4.2, 4.3 y 4.4. La información contenida en cada una de las columnas de las tablas es la siguiente:

- Primera: Órgano Analizado.

- Segunda: Peso del órgano en gramos.
- Tercera: Actividad corregida por decaimiento radiactivo (CPM).
- Cuarta: Actividad por gramo de tejido CPM/gr (se calcula dividiendo la actividad corregida entre el peso del órgano).
- Quinta : Porcentaje de Actividad en cada órgano (se divide la actividad por gramo de tejido entre la actividad presente en todos los órganos).

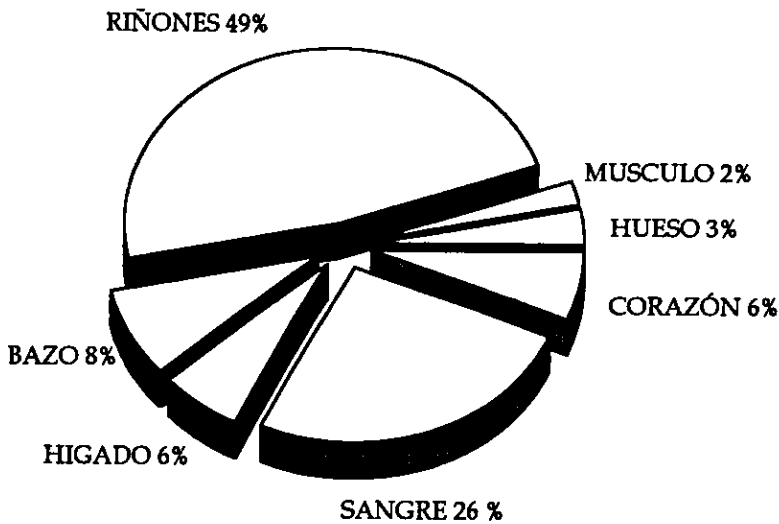


Figura 4.11 Biodistribución de la especie  $^{99m}\text{Tc-IgG}$  en ratas Wistar pasadas dos horas de la inyección ( promedio de 10 ratas).

En la tabla 4.1 se encuentran los datos de la biodistribución de  $^{99m}\text{Tc-IgG}$  después de 4 horas de la administración en ratas sanas. Se observa que la mayor concentración está en sangre y en riñones, ya que si no existen sitios de inflamación o infección, el radiofármaco permanece en circulación hasta su eliminación por vía renal.

Tabla 4.1 BIODISTRIBUCIÓN DE <sup>99m</sup>Tc-IgG EN RATAS SANAS A LAS 4 hr.

ORGANO	PESO (g)	RATA 1 ACTIVIDAD (CPM)	ACT. / ORGANO (CPM/gr)	PORCENTAJE EN CADA ORGANO
Sangre	1,520	572411	376586	14,04%
Corazón	0,398	48033	120839	4,50%
Pulmón	0,495	61085	123453	4,60%
Hígado	2,120	519957	245216	9,14%
Bazo	0,224	26135	116937	4,36%
Riñones	0,697	1047945	1503292	56,03%
Hueso	0,056	3738	66402	2,47%
Músculo Sano	0,462	60214	130305	4,86%
ORGANO	PESO (g)	RATA 2 ACTIVIDAD (CPM)	ACT. / ORGANO (CPM/gr)	PORCENTAJE EN CADA ORGANO
Sangre	1,908	855203	448220	16,06%
Corazón	0,337	41955	124458	4,46%
Pulmón	0,523	61503	117642	4,21%
Hígado	2,086	555422	266274	9,54%
Bazo	0,286	27485	96135	3,44%
Riñones	0,604	966412	1600020	57,33%
Hueso	0,027	2928	108061	3,87%
Músculo Sano	0,396	12008	30309	1,09%
ORGANO	PESO (g)	RATA 3 ACTIVIDAD (CPM)	ACT. / ORGANO (CPM/gr)	PORCENTAJE EN CADA ORGANO
Sangre	2,211	200345	90621	12,46%
Corazón	0,475	13339	28081	3,86%
Pulmón	0,347	9211	26553	3,65%
Hígado	1,412	101059	71592	9,85%
Bazo	0,435	9667	22228	3,06%
Riñones	0,823	383537	465853	64,07%
Hueso	0,064	1149	18062	2,48%
Músculo Sano	0,613	2550	4159	0,57%
ORGANO	PESO (g)	RATA 4 ACTIVIDAD (CPM)	ACT. / ORGANO (CPM/gr)	PORCENTAJE EN CADA ORGANO
Sangre	2,522	1012220	401356	13,38%
Corazón	0,336	26639	79213	2,64%
Pulmón	0,372	48620	130734	4,36%
Hígado	1,124	318628	283376	9,44%
Bazo	0,199	30060	151209	5,04%
Riñones	0,646	1184536	1835067	61,15%
Hueso	0,029	2581	88702	2,96%
Músculo Sano	0,566	17608	31104	1,04%

Tabla 4.1 Cont...

ORGANO	PESO (g)	RATA 3 ACTIVIDAD (CPM)	ACT / ORGANO (CPM/gr)	PORCENTAJE EN CADA ORGANO
Sangre	1,952	424136	217238	15,37%
Corazón	0,479	33387	69659	4,93%
Pulmón	0,248	12705	51252	3,63%
Hígado	2,287	285005	124636	8,82%
Bazo	0,275	15057	54811	3,88%
Riñones	0,865	734846	849337	60,10%
Hueso	0,079	2654	33590	2,38%
Músculo Sano	0,506	6374	12586	0,89%

En la tabla 4.2 se muestran los resultados de la biodistribución a las 24 hr postinyección, en ella se puede observar que la concentración en sangre ha disminuido, pero la concentración en riñones es aún alta por que la  $^{99m}\text{Tc-IgG}$  sigue eliminándose por vía renal.

Tabla 4.2 BIODISTRIBUCIÓN DE  $^{99m}\text{Tc-IgG}$  EN RATAS SANAS A LAS 24 hr.

ORGANO	PESO (g)	RATA 1 ACTIVIDAD (CPM)	ACT / ORGANO (CPM/gr)	PORCENTAJE EN CADA ORGANO
Sangre	0,795	30604	38481	7,12%
Corazón	0,476	5023	10563	1,96%
Pulmón	0,432	6186	14315	2,65%
Hígado	1,146	36486	31849	5,90%
Bazo	0,275	4681	17021	3,15%
Riñones	0,847	350542	414107	76,67%
Hueso	0,087	688	7906	1,46%
Músculo Sano	0,333	1950	5858	1,08%
ORGANO	PESO (g)	RATA 2 ACTIVIDAD (CPM)	ACT / ORGANO (CPM/gr)	PORCENTAJE EN CADA ORGANO
Sangre	2,086	26615	12762	6,49%
Corazón	0,450	2034	4521	2,30%
Pulmón	0,257	1351	5268	2,68%
Hígado	2,127	25433	11956	6,08%
Bazo	0,380	2574	6777	3,45%
Riñones	0,889	133040	149718	76,20%
Hueso	0,066	223	3362	1,71%
Músculo Sano	0,414	880	2127	1,08%

Tabla 4.2 Cont...

ORGANO	PESO (g)	RATA 3 ACTIVIDAD (CPM)	ACT / ORGANO (CPM/g)	PORCENTAJE EN CADA ORGANO
Sangre	1,596	5375	3368	5,60%
Corazón	0,433	500	1155	1,92%
Pulmón	0,415	581	1402	2,33%
Hígado	1,516	4475	2952	4,91%
Bazo	0,233	531	2283	3,80%
Riñones	0,667	30640	45930	76,36%
Hueso	0,059	109	1868	3,11%
Músculo Sano	0,140	167	1190	1,98%
ORGANO	PESO (g)	RATA 4 ACTIVIDAD (CPM)	ACT / ORGANO (CPM/g)	PORCENTAJE EN CADA ORGANO
Sangre	1,449	22405	15467	6,31%
Corazón	0,443	2475	5593	2,28%
Pulmón	0,386	3034	7869	3,21%
Hígado	1,907	36383	19075	7,79%
Bazo	0,300	3518	11739	4,79%
Riñones	0,895	155100	173334	70,77%
Hueso	0,061	354	5809	2,37%
Músculo Sano	0,814	4914	6037	2,46%

En la tabla 4.3 se encuentran los datos de la biodistribución después de 4 horas de la administración de  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG en ratas con procesos inflamatorios. Como en los casos anteriores la mayor concentración se localiza en riñones y sangre pero en menor porcentaje porque el radiofármaco comienza a localizarse en los sitios de inflamación. La diferencia de concentración entre el músculo sano y el inflamado ya es notable.

Tabla 4.3 BIODISTRIBUCIÓN DE <sup>99m</sup>Tc-IgG EN RATAS CON SITIOS DE INFLAMACIÓN A LAS 4 hr.

ORGANO	PESO (g)	RATA 1 ACTIVIDAD (CPM)	ACT. / ORGANO (CPM/g)	PORCENTAJE EN CADA ORGANO
Sangre	1,703	161311	94744	12,60%
Corazón	0,640	15987	24960	3,32%
Pulmón	0,486	17318	35611	4,74%
Hígado	1,641	136151	82988	11,04%
Bazo	0,478	19535	40851	5,43%
Riñones	1,281	559918	437197	58,14%
Hueso	0,073	1100	15004	2,00%
Músculo Sano	0,874	3292	3766	0,50%
Músculo Infectado	1,362	28033	20589	2,74%
ORGANO	PESO (g)	RATA 2 ACTIVIDAD (CPM)	ACT. / ORGANO (CPM/g)	PORCENTAJE EN CADA ORGANO
Sangre	3,536	207931	58806	10,64%
Corazón	0,726	18724	25780	4,66%
Pulmón	0,561	14354	25600	4,63%
Hígado	2,189	107161	48948	8,85%
Bazo	0,518	12298	23765	4,30%
Riñones	1,208	420954	348443	63,02%
Hueso	0,133	1503	11310	2,05%
Músculo Sano	0,760	2573	3387	0,61%
Músculo Infectado	1,089	7489	6879	1,24%
ORGANO	PESO (g)	RATA 3 ACTIVIDAD (CPM)	ACT. / ORGANO (CPM/g)	PORCENTAJE EN CADA ORGANO
Sangre	1,714	532431	310618	16,31%
Corazón	0,583	50596	86801	4,56%
Pulmón	0,255	8464	33207	1,74%
Hígado	1,049	272678	259917	13,65%
Bazo	0,572	24437	42722	2,24%
Riñones	1,184	1301368	1099222	57,73%
Hueso	0,109	4367	39990	2,10%
Músculo Sano	0,490	4718	9628	0,51%
Músculo Infectado	0,719	22810	31720	1,67%

Tabla 4.3 Cont...

ORGANO	PESO (g)	RATA Y ACTIVIDAD (CPM)	ACT/ORGANO (CPM/g)	PORCENTAJE EN CADA ORGANNO
Sangre	4,007	209025	52169	8,85%
Corazón	0,567	11943	21075	3,57%
Pulmón	0,572	15573	27221	4,62%
Hígado	1,761	90483	51385	8,71%
Bazo	0,428	11669	27271	4,62%
Riñones	1,160	440694	379908	64,41%
Hueso	0,111	1137	10221	1,73%
Músculo Sano	0,793	2576	3249	0,55%
Músculo Infectado	0,943	16295	17290	2,93%

En la tabla 4.4 se presenta la biodistribución a las 24 hr postinyección del radiofármaco en ratas con procesos infecciosos. En esta tabla se puede observar que la concentración en sangre es menor en comparación con los casos anteriores, y que la diferencia entre el músculo infectado y el músculo sano es cada vez mayor, sin embargo, la concentración en riñones sigue siendo muy alta debido a que el proceso de eliminación ocurre por vía renal.

Tabla 4.4 BIODISTRIBUCIÓN DE  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG EN RATAS CON SITIOS DE INFLAMACIÓN A LAS 24 hr.

ORGANO	PESO (g)	RATA Y ACTIVIDAD (CPM)	ACT/ORGANO (CPM/g)	PORCENTAJE EN CADA ORGANNO
Sangre	2,228	153551	68913	6,90%
Corazón	0,713	16623	23308	2,33%
Pulmón	0,401	15565	38844	3,89%
Hígado	2,740	165753	60505	6,06%
Bazo	0,515	19787	38451	3,85%
Riñones	1,190	841047	706762	70,75%
Hueso	0,156	2629	16897	1,69%
Músculo Sano	0,744	5545	7455	0,75%
Músculo Infectado	0,749	28366	37872	3,79%

Tabla 4.4 Cont...

ORGANO	PESO (g)	RATA 2 ACTIVIDAD (CPM)	ACT. / ORGANO (CPM/gr)	PORCENTAJE EN CADA ORGANO
Sangre	1,816	17489	9632	5,42%
Corazón	0,542	1910	3523	1,98%
Pulmón	0,117	532	4548	2,56%
Hígado	0,990	16639	16804	9,46%
Bazo	0,493	4561	9243	5,20%
Riñones	1,283	156408	121899	68,60%
Hueso	0,084	267	3165	1,78%
Músculo Sano	0,199	167	840	0,47%
Músculo Infectado	0,349	2807	8046	4,53%
ORGANO	PESO (g)	RATA 3 ACTIVIDAD (CPM)	ACT. / ORGANO (CPM/gr)	PORCENTAJE EN CADA ORGANO
Sangre	3,348	6016	1797	3,68%
Corazón	0,605	462	763	1,56%
Pulmón	0,451	707	1567	3,21%
Hígado	3,105	14781	4760	9,75%
Bazo	0,592	1467	2479	5,08%
Riñones	1,322	46494	35175	72,01%
Hueso	0,178	65	365	0,75%
Músculo Sano	0,588	82	139	0,28%
Músculo Infectado	0,964	1737	1802	3,69%
ORGANO	PESO (g)	RATA 4 ACTIVIDAD (CPM)	ACT. / ORGANO (CPM/gr)	PORCENTAJE EN CADA ORGANO
Sangre	1,675	19748	11790	5,29%
Corazón	0,580	2286	3939	1,77%
Pulmón	0,157	924	5875	2,64%
Hígado	1,366	29555	21641	9,71%
Bazo	0,557	6057	10874	4,88%
Riñones	1,382	214028	154925	69,49%
Hueso	0,149	446	2992	1,34%
Músculo Sano	0,208	349	1675	0,75%
Músculo Infectado	0,410	3786	9246	4,15%



En las tablas 4.5 y 4.6 se pueden apreciar los resultados de la biodistribución y el porcentaje de actividad en cada órgano, de todas las ratas sanas estudiadas a las 4 y 24 hr postinyección respectivamente, así como el promedio de los datos y la desviación estándar de los mismos. En estas tablas se observa como el porcentaje de actividad en todos los órganos disminuye a las 24 hr con excepción de los riñones, esto se debe a que la  $^{99m}\text{Tc-IgG}$  al no encontrar un órgano blanco esta siendo eliminada.

Tabla 4.5 BIODISTRIBUCIÓN DE  $^{99m}\text{Tc-IgG}$  EN RATAS SANAS A LAS 4 hr.

ORGANO	RATAS					PROMEDIO	DESV.
	1	2	3	4	5		
Sangre	14,04	16,06	12,46	13,38	15,37	14,26	1,53
Corazón	4,50	4,46	3,86	2,64	4,93	4,08	0,87
Pulmón	4,60	4,21	3,65	4,36	3,63	4,09	0,40
Hígado	9,14	9,54	9,85	9,44	8,82	9,36	0,29
Bazo	4,36	3,44	3,06	5,04	3,88	3,96	0,90
Riñones	56,03	57,33	64,07	61,15	60,10	59,74	3,66
Musculo Sano	2,47	3,87	2,48	2,96	2,38	2,83	0,66
Hueso	4,86	1,09	0,57	1,04	0,89	1,69	1,99

Tabla 4.6 BIODISTRIBUCIÓN DE  $^{99m}\text{Tc-IgG}$  EN RATAS SANAS A LAS 24 hr.

ORGANO	RATAS				PROMEDIO	DESV.
	1	2	3	4		
Sangre	7,12	6,49	5,60	6,31	6,38	0,63
Corazón	1,96	2,63	1,92	2,28	2,20	0,33
Pulmón	2,65	2,68	2,33	3,21	2,72	0,36
Hígado	5,90	6,08	4,91	7,79	6,17	1,20
Bazo	3,15	3,45	3,80	4,79	3,80	0,71
Riñones	76,67	76,20	76,36	70,77	75,00	2,83
Musculo Sano	1,46	1,71	3,11	2,37	2,16	0,74
Hueso	1,08	1,08	1,98	2,46	1,65	0,69

Los resultados de la biodistribución del radiofármaco en cada órgano, de las ratas con sitios de inflamación a las 4 y 24 hr postinyección, así como el promedio de los datos y su desviación estándar se reúnen en las tablas 4.7 y 4.8. En estas se observa como el porcentaje de radiactividad en cada órgano también disminuye con el tiempo, sólo aumenta en los riñones (pero en menor escala que el anterior), y en los sitios de inflamación.

Tabla 4.7 BIODISTRIBUCIÓN DE  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG EN RATAS CON SITIOS DE INFLAMACIÓN A LAS 4 hr.

ORGANO	RATAS				PROMEDIO	DESV.
	1	2	3	4		
Sangre	12,60	10,64	16,31	8,85	12,10	3,20
Corazón	3,32	4,66	4,56	3,57	4,03	0,68
Pulmón	4,74	4,63	1,74	4,62	3,93	1,46
Hígado	11,04	8,85	13,65	8,71	10,56	2,32
Bazo	5,43	4,30	2,24	4,62	4,15	1,36
Riñones	58,14	63,02	57,73	64,21	60,78	3,32
Musculo Sano	0,58	0,61	0,58	0,55	0,58	0,02
Musculo Infectado	2,74	1,24	1,67	2,93	2,15	0,82
Hueso	2,00	2,05	2,10	1,73	1,97	0,17

Tabla 4.8 BIODISTRIBUCIÓN DE  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG EN RATAS CON SITIOS DE INFLAMACIÓN A LAS 24 hr.

ORGANO	RATAS				PROMEDIO	DESV.
	1	2	3	4		
Sangre	6,90	5,42	3,68	5,29	5,32	1,32
Corazón	2,33	1,98	1,56	1,77	1,91	0,33
Pulmón	3,89	2,56	3,21	2,64	3,08	0,62
Hígado	6,06	9,46	9,75	9,71	8,75	1,79
Bazo	3,85	5,20	5,08	4,88	4,75	0,62
Riñones	70,75	68,60	72,01	69,49	70,21	1,49
Musculo Sano	0,75	0,47	0,28	0,75	0,56	0,23
Musculo Infectado	3,79	4,53	3,69	4,15	4,04	0,38
Hueso	1,69	1,78	0,75	1,34	1,39	0,47

Con la biodistribución en animales, se comprobó que es posible detectar los focos de inflamación utilizando la  $^{99m}\text{Tc-IgG}$ , por que aun cuando la actividad en sangre a las 4 hr es alta (figura 4.12), la relación del porcentaje de captación músculo sano, músculo inflamado (1:4), es suficiente para poder detectar fácilmente el sitio de inflamación por medio de una gammacámara.

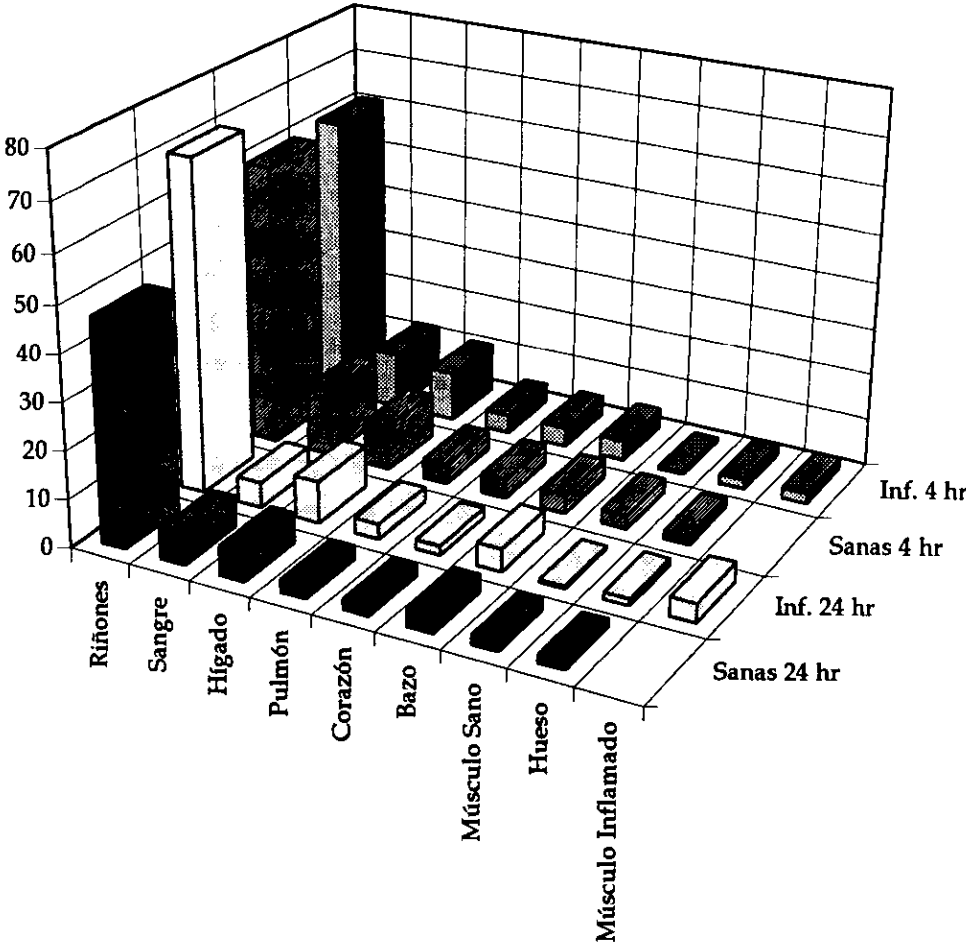


Figura 4.12 Biodistribución de la especie  $^{99m}\text{Tc-IgG}$  en ratas Wistar a diferentes tiempos.

En la figura 4.12 también se observa que la diferencia entre la captación de la  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG aumenta con el tiempo, llegando a ser 7 veces más alta en el músculo inflamado que en músculo sano, 24 hr después de la inyección.

#### 4.8 Estudios de estabilidad

Los estudios de estabilidad demostraron que la vida media de anaquel del juego de reactivos liofilizado y refrigerado es de 2 meses y el producto ya marcado tiene una estabilidad de 6 horas. Estas características hacen factible utilizar la  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG en los estudios de rutina de un servicio de Medicina Nuclear, por que sería posible aplicar al paciente en el momento que lo necesite.

#### 4.9 Comparación de la formulación obtenida con una formulación comercial

Al comparar la eficiencia de marcado del "kit" producido en el INNSZ y con la del "kit" comercial producido en Argentina, por medio de una prueba de "t" de Student pareada, se encontró que no había diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ), ya que el promedio de marcado era del 97 % con una desviación estándar de  $\pm 2.7$ , en los dos casos.

## Capítulo V

### CONCLUSIONES

Con este nuevo método fue posible reducir los puentes disulfuro de la Inmunoglobulina G policlonal humana (IgG) con el clorhidrato de tris(2-carboxietil) fosfina (TCEP-HCL) y marcarla con  $^{99m}\text{Tc}$ .

Con los resultados obtenidos de las pruebas de electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida (PAGE) y Western Blot se demostró que el método de reducción y marcado propuesto en esta tesis no desnaturalizan a la IgG ni afecta sus propiedades inmunológicas.

Una vez estandarizado el método se pudo producir un "kit" liofilizado que se marca fácilmente en un solo paso con  $^{99m}\text{Tc}$ , con una vida media de anaquel de 2 meses y una estabilidad de 6 hr postmarcado y con la misma pureza radioquímica del "kit" comercial producido en Argentina.

En los estudios de biodistribución en ratas con sitios de inflamación, se observó una diferencia importante entre el porcentaje de actividad acumulada en músculo normal y músculo infectado a las 4 horas, que puede ser visualizada fácilmente por medio de una gammacámara, por lo que concluimos que este juego de reactivos será de gran utilidad en la práctica clínica, ya que permitirá la localización de sitios de inflamación/infección, en un período de tiempo menor a 4 hr.

Concluimos que: a) el clorhidrato de tris(2-carboxietil) fosfina es un buen agente reductor para la IgG, b) el método de marcado propuesto en este trabajo resulto ser mejor que los publicados anteriormente en la literatura para marcar Inmunoglobulinas ya que es fácil, reproducible y eficiente como muchos de ellos, pero además tiene la ventaja de que requiere menor tiempo de incubación para llevar a cabo la reducción.

# Capítulo VI

## BIBLIOGRAFÍA

1. Thakur ML, Lavender JP, Amot RN, Silvester DJ and Segal AW. Indium-111 labeled autologous leukocytes in man. *J. Nucl. Med.* 1977; 18: 1014-21.
2. Peters AM, Osman S, Henderson BL, et al. Clinical Experience with  $^{99m}\text{Tc}$ -hexamethylpropylene amine oxime for labeling leukocytes and imaging inflammation. *Lancet* 1986; 2: 946-9.
3. Saha G.B. Fundamentals of nuclear pharmacy. Third Ed. New York: Springer-Verlag, 1990.
4. Gonzalez Z. Factores que afectan la biodistribución de los radiofarmacos. In: Curso de radiofarmacia patrocinado por el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA). Montevideo Uruguay: 1994.
5. Murphy CA. El tecnecio en la medicina nuclear. México: Sociedad Mexicana de Medicina Nuclear, 1989.
6. Heindel N, Burns H, Honda T, Brandy L. The chemistry of radiopharmaceuticals. New York: Masson Publishing, 1978.
7. León A. Generalidades de radiofarmacia. In: Curso de radiofarmacia patrocinado por el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA). Montevideo Uruguay: 1994.
8. Fields T, Seed L. Clinical use of radioisotopes. 2ª Ed. Chicago : The year Book Publisher, 1961.
9. León A. Radiofarmacos del  $^{99m}\text{Tc}$ . In: Curso de radiofarmacia patrocinado por el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA). Montevideo Uruguay: 1994.

10. Kowalsky RJ, Perry JR. Radiopharmaceuticals in nuclear medicine practice. Appleton and Lange Publishing, 1987.
11. Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology. 2<sup>nd</sup> Edition. London: Gower Medical Publishing, 1990.
12. Ferro-Flores G, García RM, González MA. Manual de radiomarcado de células sanguíneas y anticuerpos monoclonales. México: Sociedad Mexicana de Medicina Nuclear, 1994.
13. Datz F, and Morton K A. New radiopharmaceuticals for detecting infection. *Investigative Radiology*. 1993; 28: 356-65.
14. Taylor AT, Datz FL. Gallium imaging in neoplastic and inflammatory disease. In: Taylor AT, Datz FL, eds. Clinical practice of nuclear medicine. New York Churchill Livingstone, 1991; 361-77.
15. Mc. Afee JG, Gagne GM, Subramanian G, et al. Distribution of leukocytes with In-111 oxime in dogs with acute inflammatory lesions. *J Nucl Med*. 1980; 21:1059-68.
16. Eyre HJ, Rosen PJ, Pery S. Relative labelling of leukocytes, erythrocytes and platelets in human blood by chromium-51. *Blood*. 1970; 36: 250-3.
17. Burleson RL, Johnson MC, Head H. In vitro and in vivo labelling of rabbit blood leukocytes with <sup>67</sup>Ga-citrate. *J Nucl Med*. 1973; 15: 98-101.
18. English DK, Anderson BR, Akalin HE. Tc-99m sulphur colloid labeled leukocytes for delineation of abscesses and inflammatory processes. *J Nucl Med*. 1975; 16: 527-59.
19. Mortelmans L, Malbraun S, Stuyck J, et al In vitro and in vivo evaluation of granulocyte labeling with [<sup>99m</sup>Tc]d,1-HMPAO. *J Nucl Med*. 1989; 30: 2022-8.
20. Roodie ME, Peters MA, Danpure HJ, et al Inflammation: Imaging with Tc99mHMPAO-labeled leukocytes. *Radiology*. 1988; 166: 767-72.
21. English DK, Anderson BR, Labeling of phagocytes from human blood with Tc-99m sulphur colloid. *J Nucl Med*. 1975; 16: 5-10.
22. Fisher CH, Scheeffel U, Tsan MF, et al. Leukocytes targeting by phagocytosis of Tc99m human serum albumin microspheres. Use in localisation of experimental abscesses by external scanning (abstract). *J Nucl Med*. 1975; 16:527.
23. Marcus CS, Kuperus JB, Henneman PL, et al. Phagocytic labeling of leukocytes with <sup>99m</sup>Tc-Albumin Colloid for Nuclear Imaging. *Nucl Med Biol*. 1988; 15: 673-82.



24. Mc Afee J, and Thakur ML. Survey of radioactive agents for in vitro labeling of phagocytic leukocytes I. Soluble agents. *J Nucl Med.* 1976; 17: 480-7.
25. Mc Afee J, and Thakur ML. Survey of radioactive agents for in vitro labeling of phagocytic leukocytes II. Particles. *J Nucl Med.* 1976; 17: 488-92.
26. Danpure HJ, Osman S, Carroll MJ. Development of a clinical protocol for radiolabeling of mixed leukocytes with <sup>99m</sup>Tc hexamethylpropyleneamineoxime *Nucl. Med. Comm.* 1988; 9: 465-75.
27. Buscombe J. Radiolabelled human immunoglobulins. *Nucl Med Commun.* 1995; 16: 990-1001.
28. Hoffken KJH, Bosslet K, Schorlemmer HU. Imaging of inflammatory with granulocytes labeled in vivo. *Nuc Med Comm.* 1988; 9:763-9.
29. Mahida Y, Perkins A, Frier M, Wastie M, Hawkey C. Monoclonal antigranulocyte antibody imaging in inflammatory bowel disease: a preliminary report. *Nucl. Med. Comm* 1992; 13: 330-5.
30. Andres R, Schubiger A, Tiefenauer L, Seyybold K, Locher J, March J, Buchegger F. Immunoscintigraphic localisation of inflammatory lesions: Concept, radiolabelling and in vitro testing of granulocyte specific antibody. *Eur J Nucl Med.* 1988; 13: 582-6.
31. Griffiths GL, Goldenberg DM, Jones AL, Hansen HJ. Radiolabeling of monoclonal antibodies and fragments with technetium and renium. *Am Chem Soc.* 1992; 3: (2) 91-9.
32. Mather SJ. Radioiodinated monoclonal antibodies: a critical review. *Appl. Radiat. Isot.* 1986; 37: 727-33.
33. Hnatowich DJ, Layne WW, Childs RL et al. Radioactive labeling of antibody: a simple and efficient method. *Science* 1983; 220: 613-5.
34. Rubin RH, Fischman AJ, Collahan R], et al. <sup>111</sup>In labeled non-specific immunoglobulin scanning in the detection of focal infection. *N Engl J Med.* 1989; 321: 935-40.
35. Calame W, Feitsma H, Ensing G, Goedemans w, Camps J, Furth R, Pauwels E. Detection of a local staphylococcal infection in mice with technetium-99m labeled polyclonal human immunoglobulin. *J Nucl Med.* 1991; 32: 468-74.
36. Sciuk J, Brandau W, Vollet B, Stücker R, Erlemann R, Bartenstein P, Peters P, Schober O. Comparison of technetium 99m polyclonal human immunoglobulin and technetium 99m monoclonal antibodies for imaging chronic osteomyelitis. *Eur J Nucl Med .* 1991; 32: 401-7.

37. Buscombe JR, Lin D, Ensing G, Jong R and Ell PJ. <sup>99m</sup>Tc human immunoglobulin(HIG)- first results of a new agent for the localization of infection and inflammation. *Eur. J. Nucl. Med.* 1990; 16: 649.
38. Rubin RH, Fischman AJ, Needleman M, et al. Radiolabeled, non-specific polyclonal human immunoglobulin in the detection of focal inflammation by scintigraphy: comparison with Gallium-67 citrate and Technetium-99m-labeled albumin. *J Nucl Med.* 1989; 30: 385-9.
39. Serafini AN, Garty I, Vargas -Cuba R, Friedman A, Rauh DA, Neptune M, Landress L, Sfakianakis GN. Clinical evaluation of a scintigraphic method for diagnosing Inflammations/ Infections using indium-111 labeled non-specific human IgG. *J Nucl Med.* 1991; 32: 2227-32.
40. Juweid M, Strauss W, Yaoita H, Rubin RH, Fischman AJ. Accumulation of immunoglobulin G at focal sites of inflammation. *Eur J Nucl Med.* 1992; 19: 159-65.
41. Senda M, Fischman AJ, Weise S, Nathaniel MA; Correia J, Rubin R, Strauss W. Regional perfusion, oxygen metabolism, blood volume and immunoglobulin G accumulation at focal sites of infection in rabbits. *Eur J Nucl Med.* 1992; 19: 166-72.
42. Thakur L, DeFulvio JL. Determination of reduced disulfide groups in monoclonal antibodies. *Biotechniques.* 1990; 8: 512-6.
43. Mather SJ, Ellison D. Reduction mediated technetium-99m labeling of monoclonal antibodies. *J. Nucl. Med.* 1990; 31: 692-7.
44. Rhodes BA, Burchiel SW. Radiolabelling of antibodies with technetium-99m. In Burchiel SW, Rhodes BA, eds. *Radioimmunoimaging.* New York: Elsevier Science, 1983; 207-22.
45. Rhodes BA, Zamora PO, Newell KD, Valdez EF. Technetium-99m labeling of murine monoclonal antibody fragment. *J Nucl. Med.* 1986; 27: 685-93.
46. Paik Ch, Yokoyama K, Reynolds JC, Quadri SM, Min CY. Reduction of Background activities by introduction of diester linkage between antibody and chelating in radioimmunodetection of tumour. *J Nucl Med.* 1989; 30: 1693-1701.
47. Schwarz A & Steinstrasser A, A novel approach to <sup>99m</sup>Tc labeled monoclonal antibodies. *J Nucl Med.* 1987; 28: 721 Abstract.
48. Pimm MV, Rajput RS, Frier Mk, Gribben SJ. Anomalies in reduction-mediated technetium-99m labelling of monoclonal antibodies. *Eur J Nucl Med.* 1991; 18: 973-6.

49. Duran AP, Asurmendi S, D'Orio, Horenstein AL, Castiglia SG. Direct Labeling of monoclonal antibodies with  $^{99m}\text{Tc}$  and Radioimmuno-detection of a murine mammary carcinoma with  $^{99m}\text{Tc}$ -B2C114. *J Nucl Biol Med.* 1994; 38 (Suppl 1 to 4): 33-7.
50. Stateri ME, Mather SJ, Technetium-99m labelling of the anti-tumour antibody PR1A3 by photoactivation. *Eur J Nucl Med.* 1996; 23 (2) : 178-87
51. Levison, Josephson AS, Kirschenbaum DM. Reduction of biological substances by water-soluble phosphines: gamma-globulin (IgG). *Experientia.* 1969; 15: 126-7.
52. Burns JA, Butler JC, Moran J, Whitesides GM. Selective reduction of disulfides by Tris (2-carboxyethyl) phosphine. *J. Org. Chem.* 1991; 56: 2648-50.
53. Paik Ch, Phan LN, Hong JJ. The labeling of high affinity sites of antibodies with  $^{99m}\text{Tc}$ . *Int J Nucl Med Biol.* 1985; 12: 3-8.
54. Joiris E, Bastin B, Thornback JR. A new method for labeling of monoclonal antibodies and their fragments with  $^{99m}\text{Tc}$ . *J Nucl Med Allied Sci.* 1989; 33: 290 Abstract.
55. Fritzberg AR, Abrams PG, Beaumier PC, et al. Specific and stable labeling of antibodies with technetium-99m with a diamide dithiolate chelating agent. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; 85: 4025-9.
56. Dean RT, Weber R, Boutin R, Nedelman MA, Lister-James J. Ester Linker Tc-99m labeled antibody-bifunctional chelator conjugates having enhanced whole body clearance. *J Nucl Med.* 1989; 30: 934.
57. Eisenhut M, Missfeldt M, Matzku S. The labeling of proteins with active esters of new Tc-99m- $\text{N}_2\text{S}_2$  complexes. *Eur J Nucl Med.* 1990; 16: 423 Abstract.
58. Abrams MJ, Juweid M, Kate TC, Schawartz DA, Hauser M, Gaul FE, et al. Technetium 99m Human polyclonal IgG radiolabeled via the hydrazino nicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rats. *J Nucl Med.* 1990; 31: 2022-8.
59. Goodwing DA, Meares CF, McCall M et al. Pre-targeted Immunoscintigraphy of murine tumors with Indium-111 labeled bifunctional Haptens. *J Nucl Med.* 1988; 29: 226-34.
60. Sung C; Van Osdol W. Pharmacokinetic Comparison of direct Antibody targeting with pretargeting protocols based on streptavidin-biotin binding. *J Nucl Med.* 1995; 54: 867-76.

61. Schuhmacher J, Kliveny G, Matys R, et al . Multistep tumour targeting in nude Mice using bispecific antibodies and gallium chelate suitable for immunoscintigraphy with positron emission tomography. *Cancer Res.* 1995; 55: 115-23.
62. Paganelli G, Rivas P, Deleiede G, et al. In vivo labeling of biotinylated monoclonal antibodies by radioactive avidin: Strategy to increase tumour radiolocalization. *Int J Cancer.* 1988; 2: 121-5.
63. Paganelli G, Magnani p, Siccardi A, et al. Clinical Application of the avidin-biotin System for tumor targeting In: Cancer therapy with radiolabeled by Goldenberg DM. CRC. 1995; 239-54.
64. Kobayashi H, Sakahara H, Hosono M, et al . Improved clearance of radiolabeled biotinylated monoclonal antibody following the infusion of avidin as chase with decreased accumulation in the target tumor. *J Nucl Med.* 1994; 35: 1677-84.
65. Le Doussal JM, Barbet J, Delage M. Biospecific-antibody-mediate targeting of radiolabelled bivalent haptens: theoretical, experimental and clinical results. *Int J. Cancer.* 1992; 7: 58-62.
66. Bos E, Kuijpers W, Meesters-Winters M, et al . In vitro Evaluation of DNA -DNA hybridization as a two-step approach in radioimmunotherapy of cancer. *Cancer Res.* 1994; 54: 3479-86.
67. Fischman Aj, Pike Mc, Kroon D, et al. Imaging focal sites of bacterial infection in rat with <sup>111</sup>In-labeled chemotactic peptide analogues. *J Nucl Med.* 1991; 32: 482-91.
68. Cortens F and Van der Meer J. Chemotactic peptides: New Locomotion for Imaging of Infection?. *J Nucl Med.* 1991; 32: 491-4.
69. Leslie K, Hay F. Practical immunology. Blackwell Scientific Publications 3a ed. 1989; 233-5.
70. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc Natl Acad Sci.* 1979; 76: 4350-4.
71. Harlow E, Lane D. Immunoblotting In Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York: 1988; 1-86.
72. Ferro-Flores G, Lezama-Carrasco J. A freeze dried kit formulation for the preparation of <sup>99m</sup>Tc-EHDP-MoAb-IOR CEA1 complex. *Nucl. Med. Biol.* 1994; 21: 1013-6.

ESTA TESTE NO DEBE  
 SALIR DE LA BIBLIOTECA

## Phosphine reduced IgG: A new method for $^{99m}\text{Tc}$ labeling immunoglobulins

C. Arteaga de Murphy,<sup>1</sup> L. Meléndez-Alafort,<sup>1</sup> O. Martínez-Rivero,<sup>2</sup> E. Gómez,<sup>3</sup> G. Ferro-Flores<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Radiofarmacia, Departamento de Medicina Nuclear, Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán, INNSZ, México, D. F., México

<sup>2</sup>Laboratorio de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la Habana, Habana, Cuba

<sup>3</sup>Departamento de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán, INNSZ, México, D. F., México

<sup>4</sup>Departamento del Reactor y Materiales Radiactivos, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, ININ, México, D. F., México

(Received September 10, 1996)

A new technetium labeling method for immunoglobulins reduced with tris(2-carboxy-ethyl)phosphine hydrochloride is presented. The Sandoglobulina IgG source was assayed for purity and optimum reagent's concentration and incubation times were determined. It was purified by column chromatography and labelled with  $\text{Sn}^{2+}$  reduced technetium in the presence of MDP. The kit is easy to prepare, labeling efficiency is  $> (97 \pm 1.9)\%$  and stable for 6 hours. The immunoreactivity of the  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG was verified by electrophoresis and Western blot tests. The IgG retained its structure after both the reducing and labeling processes and it was the only labeled species.

### Introduction

In the direct methods for labeling technetium-immunoglobulins, for the detection of bone and joint infection and of inflammatory processes,  $^{99m}\text{Tc}$  binds directly to the exposed sulfhydryl groups resulting after reduction of some of the disulfide bridges within the antibody molecule. The reducing agents that have been used are stannous cation ( $\text{Sn}^{2+}$ ), 2-mercaptoethanol (2-ME), ascorbic acid, dithioerythritol (DTE), and dithiothreitol (DTT). Labeling is performed via  $\text{Sn}^{2+}$  reduction of pertechnetate in the presence of a low-affinity chelating agent. The problems reported are low affinity adventitious binding, non-specific labeling and loss of immunoreactivity.<sup>1-4</sup>

In 1969 LEVISON reported the use of water-soluble phosphines to reduce gamma-globulin. The agents were tris(hydroxymethyl)phosphine and tris(carboxy-ethyl)phosphine. He assayed different concentrations and incubated for 3 hours at 37 °C and concluded that water-soluble tertiary phosphines are "effective and convenient reducing agents for IgG and yield protein products similar to those obtained with 2-mercaptoethanol".<sup>5</sup>

In this research a trialkylphosphine was used as a reducing agent for a human immunoglobulin used at the Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán, México for immunodepressed patients.

### Experimental

Prior to  $^{99m}\text{Tc}$  labeling Sandoglobulina (Sandoz) its purity was assessed by double immunodiffusion agar test. The Ouchterlony test<sup>6</sup> was carried out in 2% agarose gels (Bio-Rad Laboratories) in barbital buffer pH 8.2, ionic strength 0.08. The proteins were allowed to diffuse freely for 48 hours and stained in a 0.025% Coomassie blue R-250 (Sigma Chemical Co.) solution.

The labeling process was started once the purity of the Sandoglobulina was established. The reagent solutions were freshly prepared as follows:

- 30 mg of Sandoglobulina were dissolved in 1 ml 0.15 M pH 7.2 phosphate-saline buffer (PBS),
- 10 mg of tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride, TCEP-HCl, (Pierce, USA) were dissolved in 1 ml distilled water and,
- a freeze dried kit containing 5 mg methylidene-1,1-bisphosphate (MDP), 0.1 mg stannous chloride and 0.025 mg gentisic acid (Baker and Sigma Chemical, USA) was dissolved in 5 ml sterile saline (NaCl 0.9%).

The method used was to keep the amount of Sandoglobulina at 3 mg in all the runs and different amounts of the other reagents and incubation times were determined. The Sandoglobulina and the phosphine (0.25 mg, 0.5 mg, 0.75 mg and 1 mg) were incubated 5-30 minutes at 18-25 °C (room temperature). The mixture was purified with a 1 × 9 cm Sephadex G-25 (Pharmacia, Sweden) column with a void volume of 4.5 ml (22 ml/hr) and eluted with PBS buffer. Nine 1.5 ml fractions were collected. The immunoglobulin concentration of each fraction was determined by UV spectrophotometry (Beckman DU-70 Spectrophotometer) at 280 nm.

A volume (0.01-0.05 ml) of the MDP freshly prepared solution was added to the fraction containing the higher IgG concentration and 7.4 MBq-185 MBq of pertechnetate from the Getec  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99m}\text{Tc}$  generator (Inin, México) was added and allowed to incubate at room temperature for 5-45 minutes.

Radiochemical purity of the  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled Sandoglobulina was determined by ascending minichromatography with Whatman No. 1 paper and with thin layer chromatography strips (ITLC SG, Gelman, USA) with three solvents: pure acetone, 0.9% saline and ammonia : methanol : water 1 : 2 : 5. The ITLC SG strips were pre-treated with a human albumin solution (125 mg in 50 ml) and oven dried at 50 °C. The percent

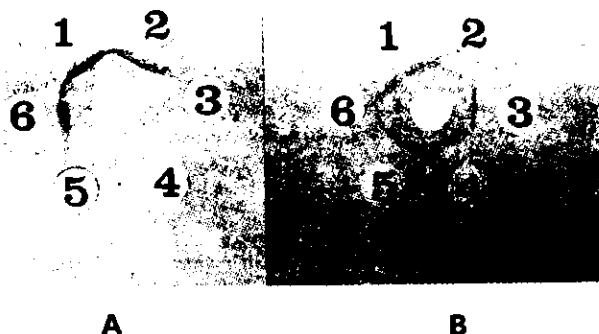


Fig. 1. Agar double diffusion test (Ouchterlony). a) Center well contains Sandoglobulina, well 1 - human anti-IgG; well 2 - rabbit anti-human serum; well 3 - human anti-albumin; well 4 - human anti-IgA; well 5 - human anti-IgM; well 6 - rabbit anti-human serum. A precipitation band can be seen connecting the center with wells 1, 2 and 3. b) Center well contains rabbit anti-whole human serum; well 1 - human albumin; well 2 - human IgA; well 3 - Sandoglobulina; well 4 - human purified IgG - well 5 - Sandoglobulina; well 6 - human IgM. The serum in the center well reacted with all the wells

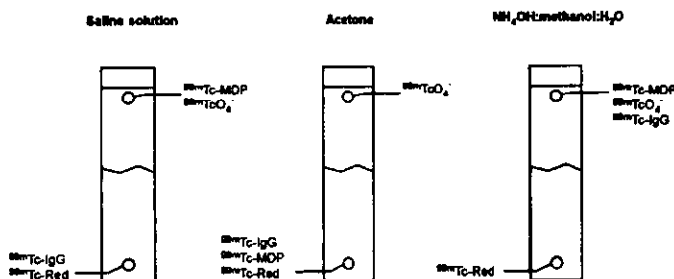


Fig. 2. Optimum labeling conditions

radioactivity at the origin point and at the front line was calculated, averaged and the standard deviation determined. The percent labeled IgG was obtained from the radioactivity at the front of the *ITLC* strip ( $^{99m}\text{Tc}$ -IgG +  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  +  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP) minus the activity at the front of the strip developed in saline ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$  +  $^{99m}\text{Tc}$ -MDP). The free pertechnetate percent corresponds to the radioactivity found at the front line of the paper strip developed with acetone. In the three developing systems the reduced-hydrolyses technetium remained at the origin point. Three of the authors simultaneously carried out all the chromatography tests and the results were averaged ( $n = 24$  or more for any variable).

To test the strength of the union  $^{99m}\text{Tc}$ -protein in front of a strong chelate the labelled IgG was challenged with a

kit of DTPA( $\text{Sn}^{2+}$ ), routinely used in renal studies, and determined by chromatography.

In order to see if Sandoglobulina was denatured in the presence of the phosphine or during the labeling process a discontinuous polyacrilamide gel electrophoresis, (PAGE) in semi-denaturing conditions was carried out in the: (a) whole, (b) phosphine reduced and (c) labeled fractions. A vertical chamber (Electrophoresis Unit SE600, Hoeffer USA) was used with 0.1M pH 8.3 TRIS-glycine-SDS running buffer and 0.1% Bromophenol Blue as the front marker, 100 V and 30 mA at room temperature for 4 hours. Proteins were stained with 0.025% Coomassie Blue R-250 as before.<sup>7</sup>

Western blot (8) was used to determine the  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG antibodies immunoreactivity. After PAGE the proteins

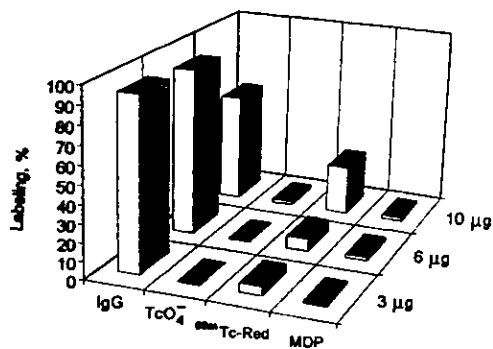


Fig. 3. Labeling efficiency with different  $[\text{Sn}^{2+}]$

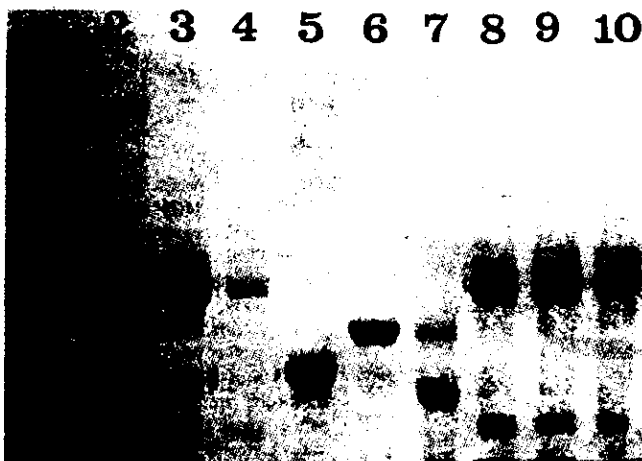


Fig. 4. SDS-PAGE pattern of  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG. Lane 1 - high molecular weight marker; lane 2 - normal human serum; lane 3 - Sandoglobulina; lane 4 - human IgG; lane 5 - human albumin; lane 6 - human IgM (degraded?); lane 7 - human IgA; lane 8 - phosphine reduced Sandoglobulina; lane 9 - reduced Sandoglobulina after passage through Sephadex G-25; lane 10 - labeled Sandoglobulina ( $^{99m}\text{Tc}$ -IgG). Protein concentration was 20 µg/lane

were transferred to a nitrocellulose 0.45 mm pore membrane (Biorad Laboratories) in a Transphor Electrophoresis Unit, TE Series (Hoefer, USA) at 100 V and 100 mA for two hours at room temperature with constant magnetic stirring in TRIS-SDS-methanol buffer. The blocked membrane was incubated with 20 ml of a goat anti-human IgG (g-chain specific) horseradish peroxidase (HRP) conjugate diluted 1 : 1000 in PBS-Tween for two hours at room temperature and reaction sites were developed.

Biodistribution studies were carried out in 5 (200–300 g) uninfected adult Wistar rats. A single dose of 3.7 MBq (100 µCi) of  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG was injected in the tail and two hours later the animals were sacrificed.

The organs were washed in saline, blotted dry, placed in weighed test tubes and the radioactivity was detected in a well type scintillation detector (Canberra UK). The concentration was calculated in percent per gram of organ.

## Results

The Ouchterlony test revealed that Sandoglobulina is essentially free of any other protein besides IgG as shown in Fig. 1.

The optimum labeling conditions were determined by chromatography Fig. 2. Labeling efficiency  $> 97\% \pm 1.9\%$  was obtained when reduced with 0.5 mg, 0.75 mg and 1 mg phosphine and the pertechnetate was reduced with 0.003 mg and 0.006 mg  $\text{Sn}^{2+}$  (Fig. 3). The intervals are wide and therefore the smallest concentration of both reagents were chosen. The recommended method was as follows:

- (1) Sandoglobulina (3 mg) was reduced with 0.05 ml (0.5 mg) phosphine (the two solutions have to be prepared shortly before preparation); incubated for 15 minutes and purified through a chromatography column.
- (2) To the fourth fraction was added 0.015 ml (0.003 mg of  $\text{Sn}^{2+}$ ) of the freshly prepared MDP solution and the volume of pertechnetate containing the desired activity.
- (3) The mixture was incubated during 30 minutes at room temperature.

With this method the labeled IgG was stable ( $> 97\% \pm \pm 1.9\%$ ) ( $n = 24$ ) for 4 hours in liquid form and the DTPA challenge test was negative.

1 2 3 4 5 6 7 8 9



Fig. 5.  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG Western blot. Lane 1 - normal human serum; lane 2 - Sandoglobulina; lane 3 - human IgG; lane 4 - human albumin; lane 5 - human IgM (degraded?); lane 6 - human IgA; lane 7 - phosphine reduced Sandoglobulina; lane 8 - reduced Sandoglobulina after passage through Sephadex G-25; lane 9 - labeled Sandoglobulina ( $^{99m}\text{Tc}$ -IgG). Protein concentration was 20  $\mu\text{g}/\text{lane}$ . Notice that lanes 7-9 are similar to lane 2.

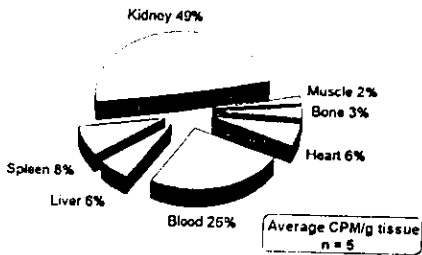


Fig. 6. IgG biodistribution in Wistar rats

PAGE and Western blot analyses of the different species of Sandoglobulina show that  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG maintained its immunological properties during the complete labeling procedure including phosphine reduction Figs 4 and 5.

The  $^{99m}\text{Tc}$ -IgG was distributed in the rats' whole body and higher concentration was seen in blood, liver and kidneys (Fig. 6).

### Discussion

The Sandoglobulina (Sandoz) available in Mexico is a Swiss product from pooled plasma from 8000 donors. Purity (>96%) is obtained by fractionated alcohol cold precipitation. The IgG subclasses correspond to the normal serum subclasses. The vial contains 10 g of sucrose and 6 g human immunoglobulin, >90% monomeric IgG (7S), a small amount of dimeric and polymeric IgG and traces of

IgA, IgM and  $\text{F}(\text{ab})_2$  fragments. These facts may account for the small bands seen in the electrophoretic pattern. SANY<sup>9</sup> reported in 1994 that because of the large number of donors this preparation may have reactivity against external antigens, self-antigens (natural autoantibodies) and auto-antibodies (anti-idiotypic antibodies). As shown in the Ouchterlony test only IgG was present in the Sandoglobulina sample, since no cross-reaction occurred with any other protein.

ECKELMAN<sup>10</sup> reported that in other techniques the antibodies are left with stannous chloride for 21 hours while FLORES<sup>11</sup> uses 2-mercaptoethanol for 30 minutes at room temperature. The alkyl phosphines are thought to be good protein reducers because only a few sulphur bridges are broken. In this study we found that with the tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride the IgG is not denatured after 15 minutes reduction time.

In order to label IgG more easily the kit with the reduced IgG plus  $\text{Sn}^{2+}$  may be lyophilised in sterile vials. It has to be tested in animals with provoked infection or inflammation sites and later the radiopharmaceutical parameters will be determined in volunteers.

In conclusion tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride is a good reducing agent for IgG and this new labeling method takes two hours from beginning to end, is easy, reproducible, and efficient.

This study was partially supported by the Consejo Nacional para la Ciencia y Tecnología (CONACYT) México (Grant No. 10.7).



We are grateful to Griselda DÍAZ, Laura MARTÍNEZ and Víctor ORTÍZ from the Departamento de Fisiología de la Nutrición of the Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán for the Ouchterlony, PAGE and Western blot analyses.

### References

1. A. R. FRITZBERG, D. KASHA, D. ESHMA, L. D. JOHNSON, Proc. Natl. Acad. Sci., 85 (1988) 4025.
2. M. L. THAKUR, J. D. DEPUYIO, Biotechniques, 8 (1990) 512.
3. S. J. MATHER, D. ELLISON, J. Nucl. Med., 31 (1990) 692.
4. BURNS, J. C. BUTLER, J. MORAN, G. M. WHITESIDES, J. Org. Chem., 56 (1991) 2648.
5. M. E. LEVISON, A. S. JOSEPHSON, D. M. KIRSCHENBAUM, Experientia, 15 (1969) 126.
6. K. LESLIE, F. HAY, Practical Immunology, Blackwell Scientific Publications, 3a. ed., 1989.
7. H. TOWAIN, T. STARHELIN, J. GORDON, Proc. Natl. Acad. Sci., 76 (1979) 4350.
8. E. HARLOW, D. LANE, Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988.
9. J. SANY, Current. Opin. Rheumatol., 6 (1994) 305.
10. W. C. ECKELMAN, Eur. J. Nucl. Med., 22 (1995) 249.
11. G. FERRO-FLORES, J. LEZAMA-CARRASCO, Nucl. Med. Biol., 21 (1994) 1013.