

INSTITUTO NACIONAL DE ONCOLOGIA Y RADIOBIOLOGIA

Preparación de albúmina sérica humana marcada con ^{99m}Tc

Lic. Francisco Zayas, Ing. Natalia Rovnij, Ing. Leo Kronrad

Zayas, F. y otros: *Preparación de albúmina sérica marcada con ^{99m}Tc .*

Se describe la preparación de albúmina sérica marcada con ^{99m}Tc . Se estudia la modificación de un método informado anteriormente y las variables que incrementan la pureza radioquímica. Se logra obtener un micrométodo con resultados equivalentes. Se encuentra que existe adsorción inespecífica de la albúmina no radiactiva al papel cromatográfico, por lo que en la determinación de coloides radiactivos es necesario añadir antes albúmina no marcada. Se observa que la concentración del ion hidronio (H^+) influye en la reducción del pertecnetato por el estaño. Se encuentra que el empleo de eluatos radiactivos filtrados por membranas de 0,22 micras de poro disminuye la formación de coloides radiactivos.

INTRODUCCION

La preparación de proteínas marcadas con radioisótopos, es una tecnología de uso común en medicina nuclear,¹⁻² ya que permite obtener información diagnóstica con gran facilidad.

El radiofármaco de uso más difundido es la albúmina radioiodada,³ la cual se ha empleado en el pasado como trazador para estudios de *pool* sanguíneo, placentografía, etcétera.

El uso de equipos de detección, como la cámara gamma, que en ocasiones no disponen de colimadores de alta energía, lo cual impide el empleo del ^{131}I , ha propiciado la sustitución progresiva del ^{131}I por el ^{99m}Tc .

Licenciado en Bioquímica. Investigador Agregado. Laboratorio de Radiofarmacia del INOR.
Ingeniera Química. Aspirante a Investigadora. Laboratorio de Radiofarmacia del INOR.
Ingeniero Químico. Candidato a Doctor en Ciencias. Instituto de Investigaciones Nucleares de REZ. Checoslovaquia.

Numerosos autores^{4,7} han explorado la preparación de proteínas marcadas con ^{99m}Tc; en general los métodos se basan en dos variantes:

- a) la reducción del pertecnetato radiactivo por el estaño y la adición posterior de albúmina
- o b) la adición de estaño a la albúmina y la administración del ^{99m}Tc radiactivo.

Independientemente de la variante empleada, no existe información uniforme sobre los parámetros óptimos en la preparación de albúminas con ^{99m}Tc ni de las variables que modifican la pureza; se han estudiado fundamentalmente la concentración de estaño y la masa de albúmina, sin contemplar otras variables que pueden modificar la preparación del radiofármaco.

Los objetivos del presente trabajo son:

1. Comparar entre sí diferentes técnicas de marcaje de proteínas con ^{99m}Tc.
2. Estudiar aquellas variables que aumentan el porcentaje de impurezas radioquímicas.

MATERIALES Y METODOS

Inicialmente se compararon algunas preparaciones descritas en la literatura, entre las que se encuentran las de *Eckelman*,⁴ *Pettit*,⁶ *Tran*,⁸ *Me Afee* Wong*,¹⁰ *Kirstein*,ⁿ y *Pettit*¹² original y modificada.

En las preparaciones se utilizó pertecnetato radiactivo obtenido de generaciones (G) ³⁹Mo-^{99m}Tc de las firmas CIS (Francia) e ISOCOMMERZ (RDA), los que poseen actividades máximas de 500 y 200 mCi (18,5 y 7,4 GBq) respectivamente.

Se utilizó albúmina sérica humana (ASH) al 20 % (p/v) de la firma Pharmachin (Bulgaria) y cloruro estannoso dihidratado de la BDH (UK). Las diluciones de la ASH se efectúan con solución salina fisiológica (SSF) producida por el Laboratorio "Adalberto Pesant", del MINSAP.

La pureza radioquímica se controló a través de cromatografía en papel ascendente (CPA) en Whatman No. 1; como solventes se emplearon metiletilcetona (MEC) y etilenglicol (Eg) : agua (1 : 9), ambos de calidad para análisis.

Se estudió la adsorción de la ASH radiactiva al papel Whatman No. 1 en el sistema etilenglicol : agua, para lo cual se adicionaron diferentes masas de ASH fría, es decir, no radiactiva previo a la aplicación del radiofármaco y desarrollo de la cromatografía. Posteriormente se comparó el sistema etilenglicol : agua contra SSF, con el fin de conocer si el fenómeno de adsorción depende del solvente cromatográfico empleado.

Entre los diferentes factores que modifican la pureza radioquímica se cuenta la masa de ASH, por lo cual se compararon entre sí los métodos de *Tran*⁸ y *Pettit*¹² para masas inferiores a las descritas por dichos autores.

Un factor que se debe considerar en la preparación de radiofármacos de ^{99m}Tc es la antigüedad del generador, para lo cual se emplearon generadores de la RDA, se utilizaron diferentes volúmenes de eluatos cuyo generador tuviera entre 1-3 días y 8-10 días respectivamente, los que se emplearon para el método de *Pettit* modificado.

La concentración hidrogeniónica y la concentración de estaño modifican la pureza, por lo cual se estudiaron ambos factores para el método de Pettit señalado anteriormente.

La presencia de microcoloides radiactivos en el eluato del generador y su influencia en la pureza, se estudió filtrando éste por una membrana de 0,22 micras de diámetro de poro y se comparó contra el propio eluato sin filtrar para diferentes volúmenes del mismo.

RESULTADOS

En la tabla 1 se observa la comparación inicial entre diferentes métodos descritos en la literatura; con excepción del método de Mc Afee, el que presenta una pureza del 15 % en MEC, el resto mostró purezas mayores del 85% para este solvente. Sin embargo, el por ciento de actividad en el punto de aplicación para etilenglicol: agua, el cual corresponde a coloide radiactivo, es elevado para casi todos los autores (sólo en el método de Mc Afee es menor del 5,0%), aunque la pureza en MEC es extremadamente baja, como ya se mencionó.

Tabla 1. Preparación de $^{99m}\text{Tc-Sn-HSA}$ por diferentes autores

Autor	n	% de actividad en el pa	
		MEC	Eg : agua
Pettit (O)	9	86,3	39,0
Tran	8	93,9	50,0
Kirstein	3	90,6	21,4
Mc Afee	3	15,0	4,6
Eckelman	3	98,4	19,3
Wong	3	97,7	28,2
Pettit (M)	6	89,1	42,7

Leyenda: pa: punto de aplicación.

La influencia de la adición de ASH no radiactiva (fría) previo a la aplicación de la ASH marcada con ^{99m}Tc , se muestra en la tabla 2, en la cual se destaca que en ausencia de ésta se encuentra el 24,2 % de actividad en el punto de aplicación; la adición de 5,0 μg de ASH reduce ésta a 9,9 %; el incremento de esta masa de proteína no produce reducciones sustanciales.

Tabla 2. Influencia de la adición de ASH fría en la CPA

μg de ASH	% de actividad en el pa	
	Eg : agua	Eg : agua SSF
0	24,2	A B A B
5	9,9	25,9 43,0 36,3 52,2
10	8,9	n = 7
20	8,8	
30	8,9	
	n = 3	

Nota: A: 5,0 μg de ASH.
B: 0,0 μg de ASH.

La comparación de este efecto de la disminución del por ciento de coloide radiactivo, se desarrolló entre etilenglicol: agua y SSF para experimentos idénticos empleando el método de Pettit. En la propia tabla 2 se observa que para ambos sistemas se producen reducciones ante la presencia de 5,0 μ g de ASH no radiactiva, lo cual demuestra que este efecto es dependiente de la ASH y no del sistema de solvente.

La utilización de diferentes masas de albúmina en el radiofármaco se observa para los métodos de Tran y Pettit en la tabla 3. Se destaca que la disminución de la cantidad de proteínas para el método de Tran afecta la pureza en MEC cuando se emplea 1,0 mg de ASH; el por ciento de coloides detectados en etilenglicol : agua es aproximadamente constante.

Tabla 3. Dependencia entre la masa de ASH y el método empleado

Autor	mg de ASH	% de actividad en el pa	
		MEC	Eg : agua
Tran	200	99,0	34,0
	20	95,0	34,0
	10	93,0	41,0
	1	63,0	33,0
Pettit	1,00	96,9	24,6
	0,50	97,4	22,6
	0,25	95,7	32,6

n = 3

Para el método de Pettit, sin embargo, se nota que no hay cambios en los resultados para MEC, pero hay un incremento en el por ciento de coloides (etilenglicol : agua) para 0,25 mg de ASH.

El empleo de diferentes volúmenes de eluatos (método de Pettit) con generadores de diferente antigüedad, se muestra en la tabla 4; mientras para 0,1 ml de eluato no parece afectarse el por ciento encontrado en MEC, para el etilenglicol : agua se encuentra el 6,0 % más de actividad en el punto de aplicación para el eluato del generador más antiguo. Para 0,5 ml hay gran diferencia entre el eluato obtenido de G1 en comparación a G2 en MEC, para el eluato del generador de mayor antigüedad se nota sólo el 82 % de pureza; esta diferencia (13 %) no se ve en etilenglicol : agua,

Tabla 4. Influencia de la antigüedad del generador en la pureza

ml $^{99m}\text{Tc-O}_4$	% de actividad en el pa			
	MEC		Eg : agua	
	G1	G2	G1	G2
0,1	98,0	96,0	19,3	25,0
0,5	95,0	82,0	18,0	21,2
1,0	81,0	76,0	16,0	20,0

n = 4

Nota: G1 : 1 a 3 días
G2 : 8 a 10 días.

donde sólo se encuentra el 3,0 % de diferencia. Para 1,0 ml de volumen, pese a que la pureza es baja (menor del 90 %), no se destacan grandes diferencias para los eluatos diferentes, sólo que los resultados son superiores ligeramente para el eluato procedente del generador más joven.

En la tabla 5 se muestra la dependencia entre la concentración hidrogeniónica y la pureza; se nota que concentraciones superiores a $2,5 \times 10^{-3}$ mol de hidronio, garantizan más del 90 % de pureza en MEC y la formación de coloides detectada en etilenglicol : agua es alrededor del 10 %. Sin embargo, la disminución de la concentración de hidronio a $5,0 \times 10^{-4}$ mol incrementa ligeramente el por ciento de coloide en la preparación, pero se disminuye hasta el 78,5 % la pureza en MEC.

Tabla 5. Dependencia entre la H^+ y la pureza radioquímica

H^+	% de actividad en el pa	
	MEC	Eg: agua
$5,0 \times 10^{-3}$	96,6	10,3
$2,5 \times 10^{-3}$	91,3	8,7
$1,0 \times 10^{-3}$	83,6	12,8
$5,0 \times 10^{-4}$	78,5	14,8
	n=5	

La influencia de la concentración de estaño se observa en la tabla 6; la disminución a 0,0055 mg/ml de HCl-0,005 mol provoca una caída en la pureza para MEC al 76,5 %, la fracción de coloide no se modifica grandemente, el empleo de concentraciones menores de estaño produce una pureza similar para MEC y disminuye la proporción de coloide en la preparación.

Tabla 6. Influencia de la Sn^{+2} en la pureza radioquímica

mg Sn^{+2} /ml	% de actividad en el pa	
	MEC	Eg: agua
0,0113	96,0	20,5
0,0055	76,5	18,2
0,0027	72,0	12,0
	n=3	

La utilización de ^{99m}TcO , directamente del generador o previamente filtrado a través de membranas de acetato de celulosa de 0,22 micras de diámetro de poro, se observa en la tabla 7. Para 0,1 ml de eluato prácticamente las purezas encontradas son similares; para 0,5 ml, sin embargo, se nota que el por ciento de coloides es francamente superior para el eluato que no se filtró; para 1,0 ml esta situación es similar (sistema etilenglicol : agua), pero además fue muy inferior la pureza en MEC cuando se empleó eluato sin filtrar.

Tabla 7. Dependencia entre la filtración del $^{99m}\text{TcO}_4$ y la pureza

	% de actividad en el pa	
	MEC	Eg: agua
$\text{ml } ^{99m}\text{TcO}_4$ (SF)		
0,1	98,0	21,5
0,5	96,0	24,0
1,0	85,5	14,0
$\text{ml } ^{99m}\text{TcO}_4$ (F)		
0,1	95,0	19,8
0,5	94,0	9,3
1,0	96,0	7,1
	n=3	

DISCUSION

La preparación de ASH con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ es una técnica de rutina en nuestros días, sin embargo, independientemente del método empleado, las impurezas radioquímicas encontradas tienen la misma magnitud.

Al comparar inicialmente diferentes métodos entre sí^{45,8,12} se observaba que la elevada pureza atribuida al radiofármaco en MEC se debía al por ciento elevado de coloide radiactivo, el cual se detectaba en el sistema etilenglicol : agua en el punto de aplicación, mientras en MEC éste queda junto a la albúmina marcada. Aunque se ha mencionado¹³ que para los estudios de *pool* sanguíneo la presencia de un por ciento elevado de coloides no interfiere, es inadecuado el empleo de un radiofármaco con impurezas radioquímicas tan elevadas.

Dado que la masa de albúmina de casi todos los métodos apuntados anteriormente era muy elevada, se modificó el método de Pettit original (O) y se concibió un micrométodo (M), el cual a pesar de emplear volúmenes y masas inferiores, se comportó con resultados semejantes al original.

Pese al empleo de las soluciones burbujeadas con N_2 y la utilización de cloruro estannoso recién preparado, el por ciento de coloides permaneció elevado para los métodos descritos en la literatura. Para determinar si la actividad encontrada en el punto de aplicación era o no coloidal, se aplicó ASH fría; ésta disminuyó la fracción de coloides para 2 sistemas de solventes diferentes, lo cual apuntaba a que en realidad se producía una adsorción de la ASH marcada en ausencia de ASH fría, que existía además una masa saturante (es decir, a partir de la misma) y el incremento de ésta no disminuía más la adsorción de la ASH marcada.

Por el interés que representa el mareaje de anticuerpos monoclonales¹⁴ con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y debido a las pequeñas cantidades en masa que se emplean en los estudios de radioinmuno-detección, se evaluó la influencia de emplear masas decrecientes para 2 métodos, lo que demostró que puede o no existir de acuerdo con el método, una dependencia directa entre la masa de albúmina y el por ciento de pureza encontrado en MEC y etilenglicol : agua; mientras para el método de Tran existe una dependencia directa, para el método de Pettit no, lo cual apunta que las proporciones en las que aparecen los diferentes componentes en cada método son las que determinan el incremento o disminución del coloide radiactivo y del pertecnetato para un método dado.

El empleo de los generadores $^{99\text{m}}\text{Tc}$ durante toda su vida útil, es decir, mientras posean un nivel de radiactividad utilizable, es una práctica común en Medicina Nuclear. Sin embargo, se encontró que para el generador más antiguo se producían disminuciones de la pureza en MEC cuando se incrementaba el volumen, lo que sugiere la presencia de algún agente que altera la reducción del pertechnetato por el estaño; esto debe corroborarse para otros radiofármacos de naturaleza similar.

El empleo de ácido clorhídrico tiene como fin mantener un pH lo suficientemente ácido, de modo que evite la aparición de estaño coloidal en la disolución del cloruro estannoso. Sin embargo, el empleo de medios muy ácidos puede afectar las proteínas, por lo cual es necesario encontrar una solución de compromisos, esto es, la mayor acidez con la menor afectación de las proteínas, pero se observó que el medio ácido influye además en la reducción del $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ por el estaño, ya que en el medio de menor acidez aparece un incremento del pertechnetato radiactivo, lo que sugiere la necesidad de una concentración hidrogeniónica determinada para completar el proceso de reducción y por tanto, de enlazamiento del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ a la proteína.

El estaño, por su parte, también se encuentra en una solución de compromisos. Su incremento en masa disminuye el $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ libre, pero incrementa el coloide radiactivo. Se demostró que existen concentraciones críticas, por debajo de las cuales la reducción es incompleta, pero por encima de las mismas se eleva el por ciento de coloides en la preparación.

La presencia de microcoloides en el eluato del generador de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ se ha descrito anteriormente,¹⁵ sin embargo, como el por ciento de éstos es extremadamente pequeño, poca atención se le ha prestado a los mismos. El empleo de eluatos filtrados por membranas de 0,22 micras de diámetro de poro no es frecuente en Medicina Nuclear; pero dado que estos microcoloides del eluato pueden estimular la formación de coloides en el radiofármaco, se acometió la comparación para diferentes volúmenes de! mismo, lo que demostró que la influencia está dada por el volumen de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ empleado. Para volúmenes pequeños casi no influye, pero en la medida que el volumen se incrementa su contribución es mayor, siempre que no se filtre, y llega a producir en proporción el doble de coloides radiactivos. Este es un hallazgo importante, el cual debe ser verificado para otros radiofármacos del $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

CONCLUSIONES

1. Se logró la preparación de albúmina marcada con $^{99\text{m}}\text{Tc}$, de forma tal que contiene menos del 10 % de pertechnetato libre y el por ciento de coloides es inferior a 15.
2. Para conocer realmente la fracción de coloides radiactivos en cromatografía en papel, es necesaria la adición de albúmina fría, con el fin de reducir la adsorción inespecífica de la albúmina marcada.
- 3- . El empleo de eluatos provenientes de generadores de mayor antigüedad, puede influir en la pureza radioquímica del radiofármaco.

4. La concentración hidrogeniónica parece influir en el proceso de reducción del pertechnetato radiactivo.
5. La presencia de microcoloides en el eluato de los generadores, puede incrementar el por ciento de impurezas radioquímicas de la preparación.

SUMMARY

Zayas, F. et al.: *Preparation of ^{99m}Tc labeled serum albumin.*

Preparation of ^{99m}Tc labeled serum albumin is described. The modification of previously reported method is studied, as well as variables which increase radiochemical purity. Attainment of micromethod with similar results is achieved. It is found that there is nonspecific adsorption of nonradioactive albumin to chromatographic paper, therefore, is necessary in the determination of radioactive colloids to add previously nonlabeled albumin. It is observed that hydronium (hydrogen ion, H³) concentration influences on pertechnetate reduction by tin. It is found that radioactive eluates filtered through membranes of 0,22 micron pore decreases radioactive colloid formation.

RÉSUMÉ

Zayas, F. et al.: *Préparation d'albumine sérique marquée au ^{99m}Tc .*

Les auteurs décrivent la préparation d'albumine sérique marquée au ^{99m}Tc et étudient la modification d'une méthode rapportée auparavant, ainsi que les variables qui augmentent la pureté radiochimique. Ils parviennent à obtenir une microméthode avec des résultats équivalents. Il est observé qu'il existe une adsorption non spécifique de l'albumine non radioactive au papier chromatographique; aussi faut-il premièrement ajouter de l'albumine non marquée dans la détermination de colloïdes radioactifs, il est noté que la concentration de l'ion hydrogène (H⁺) influe sur la réduction du pertechnetate par l'étain. Il est enfin observé que l'emploi d'éluates radioactifs filtrés à travers de membranes dont les pores mesurent 0,22 microns, diminue la formation de colloïdes radioactifs.

BIBLIOGRAFIA

1. *Crispell, K. R. y otros:* Studies of plasma volume using human serum albumin with radioactive iodine 131. J Clin Invest 29: 513, 1950.
2. *Taplin, G. V. y otros:* Suspensions of radialbumin aggregates for photoscanning the liver, spleen, lung and other organs. J Nucl Med 5: 529, 1964.
3. *Taplin, G. V y otros:* Preparation of colloidal suspensions of human serum albumin ^{131}I for estimating liver blood flow and reticuloendothelial systems functions in man. UCLA School Me Report 481, 1961.
4. *Eckelman, W. C.; P. Richards:* Instant ^{99m}Tc compounds. J Nucl Med 10: 245, 1971.
5. *Persson, R. B. R.; K. Liden:* Labelling of serum albumin with ^{99m}Tc . Int J Appl Rad Isot 20: 241, 1969.
6. *Pettit, W. A. y otros:* Characterization of tin-technetium colloid in technetium-labeled albumin preparation. J Nucl Med 19: 387, 1978.
7. *De Suárez, A. H. F. y otros:* Normas para la preparación y control de radiofarmacos de ^{99m}Tc . Acta Bioq Clin Lat 10: 53, 1976.
8. Tran, P.T.:R Wasnich: Practical nuclear pharmacy. Ed. By Golderg, 1979, P.36
9. Mc Afee, J.G. y otros : ^{99m}Tc labelled serum albumin for scintillation scanning of the placenta, J Nucl Med 5: 936, 1964.
10. Wong, D.W y otros: A rapid chemical method of labeling human plasma proteins with ^{99m}Tc -pertechnetate at pH-7,4. Int J Appl Rad Isot 29: 251, 1978.

R.CM.

MAYO, 1988

11. *Kirstein, M. y otros*: A new method for labelling fibrinogen with ^{99m}Tc . Proc Third World Congress Nucl Med Biol Aug 29-Sept. 2, 1982. P. 242.
12. *Pettit, W. A. y otros*: Improved protein labelling by stannous tartrate reduction of pertechnetate. *J Nucl Med* 21: 59, 1980.
13. *Eckelman, W. C. y otros*: Radiolabelling of antibodies. *Canc Res* 40: 3036, 1980.
14. *Order, S. E.*: Monoclonal antibodies: Potential role in radiation therapy and oncology. *Int J Rad Onc Biol Phys* 8: 1193, 1982.
15. *Shukla, S. K. y otros*: Ion exchange paper chromatography of Tc(IV), Tc(V) and Tc(VII) in hydrochloric acid. *J Chromatog* 21: 92, 1966.

Recibido: 6 de septiembre de 1985
Aprobado: 8 de diciembre de 1985

Lic. *Francisco Zayas*
Calle E no. 29. Vedado
Municipio Plaza de la Revolución
Ciudad de La Habana
Cuba