

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

**MARCACION DE INMUNOGLOBULINA G POLICLONAL  
CON TECNECIO 99 METAESTABLE.  
COMPARACION DE DOS METODOS DIRECTOS**

Informe de Tesis

Presentado por

**ANA ISABEL BONILLA ARAGON**

Para optar al titulo de  
**QUIMICA BIOLOGA**

Guatemala, enero de 1994

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

DL  
06  
T(1471)

JUNTA DIRECTIVA DE LA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

DECANA: LICDA. CLEMENCIA DEL PILAR GALVEZ DE AVILA  
SECRETARIO: LIC. JOSE FRANCISCO MONTERROSO SALINAS  
VOCAL I: LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR  
VOCAL II: LICDA. THELMA ESPERANZA ALVARADO DE GALLARDO  
VOCAL III: LIC. MIGUEL ORLANDO GARZA SAGASTUME  
VOCAL IV: BACH. MARWIN ESTUARDO XIMENEZ BOJORQUEZ  
VOCAL V: BACH. SERGIO ESTUARDO ALMENGOR CORZO

DEDICO ESTE ACTO

A DIOS

A MIS PADRES: Dr. Hugo Arturo Bonilla Acevedo  
Estela Aragón Ordoñez de Bonilla  
por su ejemplo y amor.

A MIS HERMANOS: Héctor Enrique y Celia María  
Hugo Arturo y Carol Ileana  
Oscar Estuardo  
Luis Ernesto  
por su apoyo

A MIS ABUELITAS: Isabel, Ana María, Martha y Graciela (QEPD)  
con cariño

A MI FAMILIA EN GENERAL

A MIS AMIGOS

DEDICO ESTA TESIS

A GUATEMALA

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

A LA DIRECCION GENERAL DE ENERGIA NUCLEAR

AL COLEGIO MONTE MARIA

A LA COMUNIDAD COATEPECANA

A MIS CATEDRATICOS Y MAESTROS

A MIS COMPANEROS

## AGRADECIMIENTO

A la Licda. Celestina Portillo de Palma, por su ayuda incondicional.

A la Licda. Carolina Richter de Penados, por su valiosa colaboración.

Al laboratorio de Microbiología del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá.

A todas las personas que colaboraron en la realización de este trabajo.

RECONOCIMIENTO

A LA DIRECCION GENERAL DE ENERGIA NUCLEAR DEL  
MINISTERIO DE ENERGIA Y MINAS DE GUATEMALA  
por haber hecho posible la realizaci3n de este trabajo.

## INDICE

|                             | Pag. |
|-----------------------------|------|
| I. Resumen                  | 1    |
| II. Introducción            | 3    |
| III. Antecedentes           | 5    |
| IV. Justificaciones         | 15   |
| V. Objetivos                | 16   |
| VI. Hipótesis               | 17   |
| VII. Materiales y Métodos   | 18   |
| VIII. Resultados            | 25   |
| IX. Discusión de Resultados | 27   |
| X. Conclusiones             | 29   |
| XI. Recomendaciones         | 30   |
| XII. Referencias            | 31   |
| XIII. Anexos                | 35   |

## I. RESUMEN

Los anticuerpos son inmunoglobulinas producidas por las células plasmáticas derivadas de los linfocitos B en respuesta al ingreso en el organismo de sustancias extrañas o antígenos. Estos anticuerpos, ya sea monoclonales o policlonales, pueden ser marcados con radionucleidos y ser usados en inmunogammagrafia como una técnica de medicina nuclear.

Los métodos de marcación de anticuerpos (generalmente de tipo IgG) involucran en su primera etapa la reducción de los enlaces disulfuro de la proteína generando grupos sulfhidrilo (SH) libres que representan sitios de alta afinidad con el  $Tc^{99m}$ .

Se estudiaron dos métodos de marcación directos utilizando como agentes reductores de la proteína IgG policlonal al 2-Mercaptoetanol (2-ME) y al Acido Ascórbico (AA), y como reductor del  $Tc^{99m}$  el Glucoheptonato- $SnCl_2$ .

La IgG utilizada provenia de sueros de pacientes con osteomielitis, siendo purificada por el método del Acido Caprílico. Se redujeron 5 muestras de IgG de 5 mg/dl con 2-ME y se purificaron por cromatografía de exclusión obteniéndose diferentes alícuotas; así mismo, se redujo 24 muestras de IgG de 2.5 mg/dl con AA, determinándose los grupos SH libres de ambas reducciones por medio de la curva estándar previamente realizada.

Si se observó diferencia significativa (con un alfa = 0.05) entre los métodos, teniendo el 2-ME un rendimiento de marcación de 83.848% y el AA de 76.463%.

Se concluyó que ambos métodos son efectivos si se trabaja con los requerimientos necesarios para la preparación, manipulación y medición de los compuestos, aunque se prefiere trabajar con el AA ya que es un método más sencillo, práctico y no tóxico como el 2-ME.

## II. INTRODUCCION

La Inmunogammagrafía, también denominada Radioinmunolocalización, es una técnica de Medicina Nuclear que se basa en la utilización de Anticuerpos Monoclonales (AcMo) marcados con isótopos radiactivos (1).

La mayor ventaja de la Inmunogammagrafía frente a otras técnicas de diagnóstico por imágenes es su alta especificidad, puesto que se basa en reacciones inmunológicas. Para su realización se precisa la existencia de un antígeno celular asociado a la lesión que se quiere detectar, disponer de un AcMo contra este antígeno, un radiofármaco adecuado para el marcaje de este anticuerpo y una técnica de marcaje que preserve su inmunorreactividad. La administración al paciente del AcMo marcado hace que éste se una al antígeno específico y que la lesión pueda ser detectada mediante imágenes gammagráficas (1).

Existen métodos directos de marcación que involucran en su primera etapa la reducción del anticuerpo, que genera grupos sulfhidrilo libres. Estos grupos son esenciales en la marcación de la proteína con  $Tc^{99m}$  dado que representa sitios de alta afinidad al nucleido (2).

Dentro de los agentes más empleados en la reducción del anticuerpo están el 2-Mercaptoetanol (2-ME) y el Acido Ascórbico (AA) entre otros (2).

El presente trabajo comparó estos dos agentes reductores de los enlaces disulfuro de la proteína IgG y posteriormente se

marcó con Tc99m , determinándose así mismo una metodología adecuada para marcar anticuerpos con Tc99m, con el objeto de ser utilizada en Medicina Nuclear para diagnóstico y tratamiento de neoplasias y otras patologías.

### III. ANTECEDENTES

#### A. Generalidades:

Los anticuerpos son inmunoglobulinas producidas por las células plasmáticas derivadas de los linfocitos B, en respuesta al ingreso en el organismo de sustancias extrañas o antígenos. La región específica del antígeno que reacciona y se une con el anticuerpo se denomina determinante antigénico o epitopo. Un mismo antígeno puede tener varios epitopos, que estimulan a diferentes clonas de linfocitos B, por lo que la respuesta inmunológica dará lugar a la aparición en sangre de una mezcla de anticuerpos, es decir Anticuerpos Policlonales (AcPo) (1).

Los AcPo se obtienen tras la inmunización de un animal con el correspondiente antígeno, teniendo cierta contaminación con otros antígenos originando una mezcla de anticuerpos con distinta afinidad hacia las diferentes estructuras del antígeno a pesar de su purificación. El desarrollo de la Inmunogammagrafía tuvo lugar en la década de los 70, siendo Goldberg uno de sus iniciadores, quien marcó anticuerpos anti-antígeno carcinoembrionario (anti-CEA) con Iodo  $^{131}$  ( $I^{131}$ ); sin embargo la purificación de los anticuerpos policlonales era muy compleja y la cantidad de anticuerpo que se requería era tan elevada, que la técnica para ser utilizada de forma rutinaria resultaba demasiado complicada (1,4-7).

El desarrollo de la técnica hibridomal por Köhler y Milstein para la producción de AcMo de gran pureza en cantidades

ilimitadas, con una elevada afinidad y especificidad hacia un solo epitopo del antígeno, fue un gran impulso para la Inmunogammagrafia. Esta técnica ha abierto grandes posibilidades en el campo de la investigación, inmunodetección y de la inmunoterapia mediante el marcaje y la utilización de anticuerpos frente a antígenos asociados a tumores, así como a patologías cardiovasculares y procesos infecciosos (1,8-10).

Después de inyectar el anticuerpo intravenosamente, es transportado por la sangre a través del organismo hasta el sitio específico de reconocimiento entre el antígeno y el anticuerpo. Si éste ha sido previamente marcado con un radionucleido emisor gamma, el agente servirá como trazador para detectar el daño; pero si se emplea un radionucleido emisor de partículas alfa ( $\alpha$ ) o beta ( $\beta$ ) se puede utilizar en la radioterapia de dichas patologías, por cuanto las partículas producen daño celular (11-13).

#### B. Inmunoglobulinas:

Los anticuerpos (generalmente del tipo IgG cuando son aplicados para inmunogammagrafia) son el principal componente de la respuesta inmune secundaria. La IgG se halla distribuida uniformemente entre los espacios intra y extravascular y posee una concentración sérica media de 9 mg/ml (1,3).

La estructura de la IgG (Figura 1) está formada por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas unidas por puentes disulfuro. Posee dos enlaces disulfuro intracatenarios en la

cadena liviana, uno en la región variable y otro en la región constante. Similarmente, existen cuatro de los enlaces mencionados en la cadena pesada, la cual es del doble de largo de la liviana. Los sitios de enlaces disulfuro de ambas cadenas son llamados dominios protéicos y cada uno contiene aproximadamente 110 residuos aminoacídicos (1,3,13).

La estructura tipo Y del anticuerpo es mantenida por fuerzas no covalentes, dentro de las cuales se consideran en promedio 35 enlaces disulfuro por molécula de proteína (3).

Los residuos aminoacídicos del dominio variable (V) tanto de la cadena pesada como de la liviana, interactúan entre sí para conformar el sitio de unión al antígeno. La especificidad de dicha interacción está determinada principalmente por tres regiones de gran variabilidad, denominadas regiones hipervariables, incluidas en el dominio (V). La región constante de la cadena liviana (C1), el dominio  $Ch_1$  de la cadena pesada y los dominios variables de ambas, conforman la porción Fab del anticuerpo. Por otra parte, son los dominios  $Ch_2$  y  $Ch_3$  los que darán lugar a la porción Fc de la inmunoglobulina, a través de la cual se unirán a células.

La digestión enzimática del anticuerpo permite obtener determinados fragmentos del mismo, es decir, la digestión de IgG con papaína genera dos fragmentos Fab idénticos entre sí y un fragmento Fc. La acción proteolítica de la pepsina produce un fragmento  $F(ab)_2$ , el cual abarca las dos regiones unidas por la región bisagra, y el fragmento Fc. La inmunorreactividad del

anticuerpo se mantiene después de esta separación (1,13).

### C. Radionucleidos:

Los radionucleidos empleados para radioterapia deben emitir partículas de manera que produzcan alteración a nivel celular que permita suprimir el crecimiento y proliferación de las células malignas. Los radionucleidos utilizados para diagnóstico deben emitir radiación gamma, la cual atraviesa la materia orgánica permitiendo así el diagnóstico; además, deben poseer ciertas propiedades físicas, es decir, emitir fotones de energía entre 50 a 300 Kev (Kiloelectrón voltios) y poseer un periodo de semidesintegración corto no siempre similar al del proceso biológico analizado. Los más utilizados para marcación de proteínas y su utilización en inmunogammagrafía se encuentran descritos en la Tabla No. 1 (13).

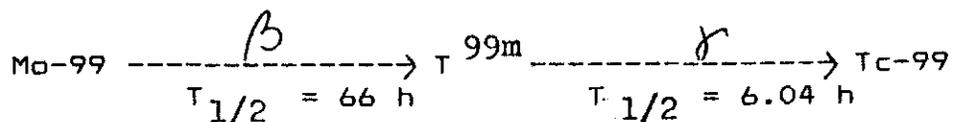
Las moléculas de proteína han sido marcadas por radioiodinación ( $I^{131}$ ) por décadas, y en la actualidad con Indio ( $In^{111}$ ) o Tecnecio ( $Tc^{99m}$ ). Tanto el  $I^{131}$  como el  $In^{111}$  presentan el problema de inestabilidad in vivo, donde el primero presenta una posible deshalogenación, pérdida de sus características en la imagen y una difícil obtención; mientras el segundo presenta una alta acumulación hepática (13,14).

En la actualidad se empieza a trabajar con  $Tc^{99m}$  ya que posee las ventajas de bajo costo, fácil disponibilidad, conveniencia y una dosis de radiación baja (15).

# 1. Radionucleido Tc<sup>99m</sup>:

## a. Características físicas:

El Tc<sup>99m</sup> posee un periodo de semidesintegración ( $T_{1/2}$ ) de 6.04 horas con una energía de radiación gamma de 140 KeV. Su modo de decaimiento es por transición isomérica. Se obtiene de la siguiente manera:



La ausencia de emisión beta permite la administración de cantidades del orden de milicurie (mCi) sin que esto signifique una dosis de radiación significativa para el paciente. Por decaimiento pasa a Tc-99 que es emisor beta pero tiene un  $T_{1/2}$  muy largo de  $2.12 \times 10^5$  años. Sus fotones gamma de 140 KeV, presentan una adecuada penetración de los tejidos, pueden ser detectados con alta eficiencia con detectores de centelleo sólido con cristales de yoduro de sodio (NaI) activados con Talio (Tl) y facilitan la obtención de imágenes centellográficas con una resolución utilizando colimadores de bajo espesor (16).

Todas estas características son la razón de que un alto porcentaje de los radiofármacos utilizados actualmente en Medicina Nuclear sean compuestos marcados con Tc<sup>99m</sup>, ya que sus propiedades son altamente favorables en aplicaciones clínicas tanto para la obtención de imágenes estáticas como para estudios dinámicos (16).

Otra gran ventaja que presenta el  $Tc^{99m}$  es que puede ser obtenido fácilmente en los servicios de Medicina Nuclear en forma estéril, libre de pirógenos y sin portador, por elución de generadores de  $Mo-99 \rightarrow Tc^{99m}$  (16).

b. Características Químicas:

El Tecnecio (Tc) es el elemento número 43 de la tabla periódica; es un metal de la segunda serie de transición, perteneciente al grupo VII B. Se encuentra ubicado entre los elementos Manganeso (Mn) (primera serie) y Renio (Re) (tercera serie), presentando propiedades comunes con ellos, especialmente con el Re (17).

Todos los nucleidos del Tc son radiactivos, con períodos de semidesintegración desde 5 segundos ( $Tc^{112}$ ) hasta  $2.6 \times 10^6$  años ( $Tc^{97}$ ). Toda la aplicación biomédica del Tc se basa en el empleo del isótopo  $Tc^{99m}$  (18).

Posee estados de oxidación que van desde -1 a +7. Los estados inorgánicos más estables como ión pertecneciato ( $TcO_4^{-}$ ) con valencia +7 y de dióxido de tecnecio ( $TcO_2$ ) con valencia +4. Los restantes estados de oxidación son inestables y difíciles de obtener, presentándose principalmente bajo forma de complejos de coordinación (18).

La reducción del radionucleido en medio acuoso deberá llevarse a cabo en presencia de un ligando determinado, que logre estabilizar el tecnecio reducido en solución. Para esto se deben considerar factores tales como: el potencial redox del Tecnecio y del agente reductor, el orden en que se mezclan los reactivos, el

pH de la solución, y por último el tiempo y la temperatura de la reacción (13).

#### D. Métodos de Marcación de Anticuerpos:

Las técnicas de radiomarcación de anticuerpos se desarrollaron debido a la reacción antígeno-anticuerpo para fines de diagnóstico y terapia; es por eso que el interés por encontrar radiofármacos más específicos ha ido aumentando (19).

##### 1. Marcación de IgG con $Tc^{99m}$ :

Los métodos de marcación deben modificar en forma mínima la estructura de la proteína (11,13).

Se han descrito varios métodos para incorporar el  $Tc^{99m}$  a la proteína, los cuales se clasifican en dos grandes grupos: aquellos métodos directos en los que la marcación ocurre sobre grupos endógenos de la proteína, y los métodos indirectos, que utilizan un agente quelante exógeno a manera de facilitar y estabilizar la unión del radionucleido al anticuerpo (13,15,19).

Valdés y colaboradores emplearon el  $Tc^{99m}$  para el marcaje de anticuerpos monoclonales (AcMo), donde utilizaron métodos directos e indirectos de radiomarcaje obteniendo un rendimiento de marcación de 95% con el método directo y 45% con el indirecto, lo cual indica el adecuado uso de métodos directos de marcación de anticuerpos con  $Tc^{99m}$ . En estudios recientes donde se han empleado métodos directos de marcación de proteínas, se ha

utilizado el ácido ascórbico (AA) como agente reductor de la proteína IgG, y al ditionito de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) como reductor del  $\text{Tc}^{99\text{m}}$ , siendo utilizados para la detección de focos inflamatorios (5,15).

Los métodos directos involucran en una primera etapa la reducción del puente disulfuro del anticuerpo (IgG), lo cual genera grupos sulfhidrilo libres, el número de ellos es esencial en el rendimiento de marcación ya que son grupos de afinidad del radionucleido (Figura 2). Dentro de los agentes reductores más empleados se encuentran el 2-Mercaptoetanol (2-ME), 2-Ditiotreitol, Acido Ascórbico (AA), y otros (2).

El AA o Vitamina C, es un agente reductor debido a la presencia del grupo dienol ( $-\text{COH}=\text{COH}-$ ) en su estructura. Esta especie puede donar con facilidad átomos de hidrógeno transformándose en el ácido dehidroascórbico, el cual aún posee actividad de vitamina C. Esta propiedad se pierde cuando la molécula reducida se hidroliza generando el ácido dicetogulónico. El AA se oxida fácilmente en exposición al aire y posee un potencial redox normal de +0.127v a pH 5.0. Mientras, el 2-ME pertenece al grupo de los mercaptanos, que son compuestos de azufre que presentan un olor fuerte característico; puede causar náusea y dolor de cabeza; en altas concentraciones produce inconciencia y cianosis, extremidades frías, y acelera el pulso; es irritante severo de piel y ojos. El 2-ME, además, tiene la propiedad de reaccionar con los enlaces disulfuro de la proteína y de esta manera reducirlos (20,21).

Una vez reducida la proteína se procede a reducir el Tc <sup>99m</sup> generalmente en presencia de un ligando orgánico que coordina al Tc <sup>99m</sup> formando un complejo débil lo que facilita su posterior trasquelación con la proteína. Dentro de los agentes reductores del Tc <sup>99m</sup> más empleados se encuentran: Sn(II), ditionito y cloruro férrico, etc. Como ligandos se pueden mencionar: gluconato, glucoheptonato y fosfonato; en general, todas son moléculas que poseen grupos funcionales equivalentes a sitios de alta afinidad por el Tc <sup>99m</sup> (13,22).

Los métodos de marcación directos actúan sobre los fragmentos del anticuerpo, es decir, a Fc, Fab y F(ab'). Estos trozos de la proteína contienen en su estructura enlaces disulfuro, los cuales una vez reducidos representan sitios de alta afinidad por el Tc <sup>99m</sup> (13).

#### E. Control de Calidad:

Una vez que ha sido marcado el anticuerpo, es necesario determinar si no han variado las características de la molécula en cuanto a sus propiedades biológicas, es decir, comparar propiedad de enlace del anticuerpo a su determinante antigénico tanto antes como después de la radiomarcación. Esto puede realizarse a través de técnicas como cromatografía instantánea en capa fina, cromatografía líquida de alta presión (HPLC), precipitación, extracción por solventes, destilación y electroforesis, siendo las cromatografías las de mayor elección por su versatilidad, facilidad y rapidez de realización. La cromatografía instantánea en capa fina utiliza como soporte papel

de sílica gel (ITLC-SG), y como eluyente usa ácido tricloroacético; el eluyente precipita los fragmentos de anticuerpos en el origen y el pertecneciato migra con el frente del eluyente donde se mantiene la reactividad de la proteína, ya que eluye en la misma fracción del estándar (16,19,23,24).

Después de realizada la cromatografía se realiza la medición en un contador de pozo, el cual debe estar previamente calibrado para la efectividad del proceso de marcación y posterior utilización en medicina nuclear.

#### F. Aplicaciones Clínicas:

La oncología fue el primer campo de aplicación de la Inmunogammagrafia. Su mayor ventaja frente a otras técnicas diagnósticas por medio de la imagen es su elevada especificidad. El diagnóstico de las lesiones va a depender de muchos factores, entre los que se encuentran el tamaño del tumor, su vascularización, el grado de infiltración o necrosis, el número de moléculas de antígeno presentes en la superficie celular, la presencia o no de antígeno circulante y su reactividad. También las características del radiofármaco administrado influyen en la detección: la utilización de inmunoglobulinas completas o fragmentos, la capacidad de unión del AcMo con el radionucleido, la clase de radionucleido utilizado, la actividad específica del AcMo marcado, la dosis administrada al paciente, el aclaramiento del AcMo o el tiempo en que se realicen las imágenes gammagráficas (1).

Los tipos de neoplasias que han sido más ampliamente estudiadas mediante Inmunogammagrafia son el carcinoma colorrectal, el carcinoma de ovario y el melanoma. El descubrimiento del Antígeno carcinoembrionario (CEA) como primer antígeno asociado a tumores colorrectales en humanos dio lugar a que los primeros trabajos de Inmunogammagrafia se dedicaran al carcinoma colorrectal (6,10,11,24).

El diagnóstico de la patología infecciosa mediante técnicas de Medicina Nuclear puede realizarse utilizando diferentes radiofármacos. En los últimos años se ha propuesto la aplicación del AcMo BW 250/183 marcado con  $Tc^{99m}$ . Esta es una inmunoglobulina completa que reacciona con el epitopo NCA 95 (antígeno no específico de reacción cruzada) que se halla en la superficie de los granulocitos neutrófilos. Este AcMo reacciona de forma exclusiva con los granulocitos y no lo hace con los demás componentes sanguíneos. La unión a la membrana del granulocito es estable, y no produce lisis celular por la unión antígeno-anticuerpo o mediada por el complemento, donde el anticuerpo no inhibe la viabilidad de los granulocitos (26,27).

Así mismo, el marcaje de IgG policlonal con  $Tc^{99m}$  promete ser una ayuda importante en el diagnóstico diferencial de infección/inflamación bacteriana de afecciones del sistema músculo esquelético (4,28,29).

#### IV. JUSTIFICACIONES

En el Departamento de Medicina Nuclear del Hospital General San Juan de Dios, se pretende establecer la marcación de anticuerpos con  $Tc^{99m}$  para Inmunogammagrafía. Actualmente no se cuenta con ningún método de marcación que se pueda utilizar para marcar anticuerpos, por lo que se creyó necesario evaluar el procedimiento adecuado de reducción y marcación de anticuerpos como un primer paso para el inicio de estudios de Inmunogammagrafía en la evaluación y tratamiento de neoplasias y otras patologías.

Debido a que los costos para adquirir un Anticuerpo Monoclonal (AcMo) en las cantidades requeridas para comprobar un método son muy elevados, se requirió de la utilización de un Anticuerpo Policlonal (AcPo), en este caso de Inmunoglobulina G (IgG) policlonal purificada, ya que el marcaje se realiza de la misma manera y solamente variará el tipo de anticuerpo (mono o policlonal) a la hora de ser aplicado en pacientes, lo cual no se realizó en el presente estudio. Además, se tuvo la disponibilidad de la IgG policlonal en el Departamento ya mencionado.

## V. OBJETIVOS

### A. General:

1. Determinar un buen agente reductor de la proteína IgG para su posterior marcaje con  $Tc^{99m}$ .

### B. Específicos:

1. Evaluar la reducción de los enlaces disulfuro de la proteína IgG con 2-Mercaptoetanol y Acido Ascórbico.
2. Determinar la mayor eficiencia de marcación comparando los porcentajes de marcación con  $Tc^{99m}$  de la IgG reducida con 2-ME y AA.
3. Evaluar la estabilidad del marcaje utilizando los 2 agentes reductores de la proteína.
4. Seleccionar el método de marcación de anticuerpos (IgG policlonales) con  $Tc^{99m}$  más adecuado.

## VI. HIPOTESIS

La eficiencia de marcación de IgG con Tc<sup>99m</sup> es mayor utilizando como agente reductor de la proteína el Acido Ascórbico que el 2-Mercaptoetanol.

## VII. MATERIALES Y METODOS

### A. Universo de Trabajo:

1. 150 mg de IgG policlonal purificada

### B. Medios:

#### 1. Recursos Humanos:

- a. Tesista responsable: Ana Isabel Bonilla Aragón
- b. Asesora: Lic. María Celestina Portillo de Palma
- c. Co-asesora: Lic. Diana Freire de Nave
- d. Lic. Carolina Richter de Penados

#### 2. Recursos Materiales:

- a. Equipos de electrónica nuclear e instrumental del Laboratorio de Radiofarmacia de la Dirección General de Energía Nuclear (DGEN) y Hospital General San Juan de Dios (HGSD).

##### i. Equipo:

- Balanza analítica (Precisión)
- Campana de flujo laminar (Labconco)
- Contador de pozo (Ortec)
- Cuba cromatográfica
- Potenciómetro (Fischer)
- Refrigerador
- Selladora de viales
- Secadora
- Espectrofotómetro (Beckman)
- Centrífuga de alta velocidad (Precisa)
- Agitador (Vortex Genie)

ii. Materiales:

- Jeringas y agujas
- Pipetas
- Gradillas
- Tijeras
- Micropipetas
- Varilla de vidrio
- Contenedores de plomo
- Bata plomada
- Algodón
- Guantes desechables
- Papel para cromatografía instantánea en capa fina impregnado con sílica gel (ITLC - SG)
- Tubos Eppendorf

iii. Reactivos:

- Generador de Molibdeno 99 ( $Mo^{99}$ )  $\rightarrow$   $Tc^{99m}$
- IgG Policlonal Purificada (Método del Ácido Caprílico). Laboratorio de Radioinmunoanálisis, DGEN, HSJD.
- Reactivo de Ellman (Sigma)
- Amortiguador de fosfato salino (PBS)
- Ácido Ascórbico
- 2-Mercaptoetanol
- L-cisteína
- Sefadex G-50
- Metanol (Grado reactivo)
- Etanol (Grado reactivo)

- Amoniaco (concentrado)
- Frascos de Glucoheptonato. Cada frasco contiene:  
52.6 µg de Cloruro de estaño ( $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ); y 20.0  
mg de Glucoheptonato de Calcio.
- Nitrógeno (gas)
- Sefarosa Cl
- Acetona
- Cloruro de sodio (NaCl) 0.85 por ciento

### C. Metodologías:

#### 1. Cuantificación de grupos sulfhidrilo (SH) libres:

En tubos previamente burbujeados con nitrógeno se agregaron alícuotas de 0 a 90 µl de una solución estándar de L-cisteína ( $6.12 \times 10^{-4}$  M; diluida en PBS burbujeado con nitrógeno) y se completaron a 90 µl finales con PBS/ N<sub>2</sub>. Se agregó 10 µl de reactivo de Ellman (10 mg/ml), diluido en un mínimo de metanol y aforado con PBS (pH 7,0; 0,1 M) y 1 ml de PBS (pH 8,0; 0,1 M). Se selló el tubo, se agitó y dejó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se repitió el ensayo para cada muestra. Al término del tiempo se midió la absorbancia a 412 nm y se obtuvo la curva de calibración de absorbancia contra el contenido de grupos SH de cada estándar. Posteriormente se ensayó con 90 µl de cada muestra de proteína reducida y se reprodujo el protocolo descrito. Se interpoló el valor de absorbancia de ellas en la curva estándar, y conociendo la concentración de proteína ensayada se calculó el número de grupos SH libres por molécula (16,19).

## 2. Reducción de IgG:

### a. Con 2-Mercaptoetanol (2-ME):

1 ml de IgG (5 mg/ml) se mezcló con 3.5  $\mu$ l de 2-ME (relación molar 1:1000/Ab:2-ME). Las muestras se dejaron incubar por 30 minutos a temperatura ambiente y se agitaron cada 10 minutos en el agitador.

Al cabo de ese tiempo se purificó la muestra a través de cromatografía de exclusión, usando como matriz Sefadex G-50 y como solvente PBS frío y nitrogenado. Se recolectaron fracciones de 1 ml y se les midió la absorbancia a 750 nm, y luego se calculó la concentración de proteína en cada una de las muestras. Las fracciones se alicuotaron en volúmenes de 0.5 ml y que contuvieran aproximadamente 250  $\mu$ g de IgG. Finalmente las muestras se congelaron a  $-20^{\circ}$  C (16,19).

### b. Con Acido Ascórbico (AA):

100  $\mu$ l de IgG (2.5 mg/ml) se hicieron reaccionar con 100  $\mu$ l de AA (10 mg/ml; pH 6.4), ambos reactivos disueltos en solución salina nitrogenada, por una hora a temperatura ambiente (16,19).

## 3. Marcación de la proteína IgG.

Se recostituyó el frasco de  $\text{GH-SnCl}_2$  con 1 ml de solución salina nitrogenada. Se le agregó 1 ml de  $\text{Tc}^{99\text{m}}$  que contuviera 2 millicuries (mCi). Luego se adicionó 50  $\mu$ l del  $\text{GH-SnCl}_2\text{-Tc}^{99\text{m}}$  a cada muestra de proteína reducida con AA y 2-ME. Se agitó la mezcla en el agitador y se dejó incubar por 10 minutos a

temperatura ambiente.

#### 4. Pureza Radioquímica:

Cromatografía instantánea en capa fina (ITLC-SG).

Se colocó el solvente adecuado en la cámara cromatográfica, hasta llegar a una altura de 1-2 cm del fondo del recipiente; se tapó y dejó saturar la cámara.

Se cortó el soporte de ITLC-SG en tiras de aproximadamente 1.5 cm de ancho por 12 cm de largo, se trazó una línea discontinua con lápiz de grafito a 1.5 cm de uno de los extremos y otra línea a 9.5 cm de la línea que marca el punto de aplicación.

Se aplicó la muestra en la línea de origen tratando de no tocar la superficie. El área de la misma debe ser lo menor posible (máximo diámetro = 0.5 cm).

Se colocó la tira cromatográfica en la cámara cuidando que el borde inferior quedara sumergido en el solvente y que el mismo no tocara el punto de aplicación. Cuando el solvente llegó a la línea que marca el frente, se retiró la tira de la cámara y se secó. Se midió el cromatograma con el siguiente procedimiento: Se cortó la tira en secciones de 1 cm comenzando desde 0.5 cm por debajo de la línea de aplicación de la muestra y se midió cada uno de los segmentos en un contador de pozo (16,19).

##### a. Glucoheptonato:

Solvente: acetona y NaCl 0.85%.

b. Proteína:

Solvente: mezcla de etanol-amoniaco-agua en  
relación 2:1:5.

5. Determinación de la Pureza Radioquímica del Glucoheptonato.

(ver inciso 3 y 3.a)

6. Determinación del porcentaje de marcación y pureza radioquímica de la proteína.

(ver inciso 3 y 3.b)

7. Estudio de la estabilidad de la IgG marcada con Tc <sup>99m</sup>.

A la proteína marcada se le evaluaron los porcentajes de marcación a los tiempos 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas.

## Diseño Estadístico:

Se realizaron 24 determinaciones con cada método de reducción y marcación de la proteína obteniéndose el número de muestra de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} N_j &= NC \cdot 2 \\ &= (3.242) \cdot 2 \\ &= 22 \end{aligned}$$

\* con nivel de confianza de alfa = 0.05

Para la metodología A (reducción con 2-ME) se realizaron 5 cromatografías de exclusión de las cuales se obtuvo 5 alícuotas de cada una para tener el número de muestras requerido para el grupo A. Posteriormente, se analizaron ambos métodos (A y B, siendo el segundo el del AA) por medio de la prueba de T-student evaluando sus porcentajes de marcación, y de esta manera se determinó las diferencias entre ambos.

Por último, para la eficiencia de marcación se utilizó la prueba de chi-cuadrado, donde se comparó la diferencia entre los métodos, sumando los eventos que obtuvieron una eficiencia mayor o igual a 85% y los que obtuvieron una eficiencia menor del 85% (Figura No. 5).

## VIII. RESULTADOS

La Tabla No. 2 y la Figura No. 3 presentan los datos obtenidos de la determinación de los grupos sulfhidrilo libres y la curva estándar correspondiente.

La pureza radioquímica del Glucoheptonato-Tc <sup>99m</sup> que se utilizó fue de 95.11% en cloruro de sodio y de 95.41% con acetona.

En la Tabla No. 3 se presenta las concentraciones de las diferentes alícuotas obtenidas de la reducción de la proteína con 2-ME, mientras que las concentraciones de la reducción con AA fueron 2,500 ug/ml para todas las muestras.

Las Tablas No. 4 y 5 indican los porcentajes de marcación de la proteína con Tc <sup>99m</sup> utilizando los dos métodos de reducción, 2-ME y AA, respectivamente, así como las concentraciones de grupos sulfhidrilo libres.

Al comparar los métodos de reducción de la proteína a través de la prueba de T-student con un grado de significancia de alfa = 0.05, se obtuvo en 2-ME una media de 83.848 con una desviación estándar de 8.975, mientras que para el AA se obtuvo una media de 76.463 con una desviación estándar de 6.309 (Tabla No. 6). Así mismo, se obtuvo un coeficiente de variación para la reducción con AA de 8.25% y para la reducción con 2-ME de 10.70%.

Para ampliar el análisis se hizo una correlación entre concentración de proteína reducida y porcentajes de marcación,

(Figura No. 4), con un índice de correlación de 0.011.

Las Tablas No. 7 y 8 indican la estabilidad de la IgG a la 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas después de su marcación tomándose 3 muestras al azar.

La Figura No. 5 presenta los datos obtenidos con la prueba de Chi-cuadrado, donde el valor de  $\chi^2$  es de 11.3438, con una probabilidad de 0.0008 en un alfa = 0.05.

## IX. DISCUSION DE RESULTADOS

Con la realización de la curva estándar para determinar la concentración de grupos SH libres se pudo observar que los resultados fueron lineales (Figura No. 3).

Teniendo una pureza radioquímica del glucoheptonato-Tc  $^{99m}$  de 95 por ciento, la reducción del Tc  $^{99m}$  resultó completa y estable ya que el Cloruro estanoico unido al glucoheptonato y con el medio nitrogenado mantienen estable al Tecnecio.

En la reducción con 2-ME se determinaron diferentes concentraciones de proteína obtenidas de las alícuotas de la purificación con cromatografía de exclusión, siendo éstas muy variables pero con reducciones de grupos SH semejantes.

En la reducción con AA se obtuvo concentraciones de grupos SH bajas, siendo difícil su medición en el espectrofotómetro por la poca variación de color con el reactivo de Ellman. Esta variación pudo deberse a la inestabilidad del AA al ambiente, ya que se trabajó con tiempos casi exactos entre reducción, calibración y marcación pero con ciertos rangos entre cada una, variando los porcentajes de marcación; además, las muestras eran muy escasas y la determinación de grupos SH se realizó con diluciones de las mismas, dando valores espectrofotométricos bajos.

Al evaluar el porcentaje de marcación, desde la primera determinación se pudo observar que la mayor concentración de actividad, en cuentas por minuto, se encontraba al final de la

tira cromatográfica de ITLC, lo cual indica que la proteína marcada migró con la mezcla de solventes (etanol-amoniaco-agua) por ser compuestos de tipo apolar, indicando que hubo buena marcación correcta de la proteína.

Al analizar los resultados con las pruebas de T-student y Chi-cuadrado ( $\alpha=0.05$ ) se rechazó la hipótesis nula de que los dos métodos evaluados son iguales, por lo que se deduce que existe diferencia entre ellos. De esta manera, ambos métodos no son comparables, ya que los rangos de porcentajes de marcación de cada uno están en 76 y 83% (Tabla No. 6), dando poca variabilidad. Analizando los coeficientes de variación se observa que la reducción con AA fue más precisa que con 2-ME. Se pueden mejorar los resultados utilizando tiempos y concentraciones más exactos.

El índice de correlación entre concentración de proteína y porcentaje de marcación, utilizando al 2-ME, indica que no existe relación entre ambas y que la marcación depende específicamente de la cantidad de grupos SH libres (Figura No. 4).

La IgG-Tc<sup>99m</sup> después de su marcación es estable hasta por 6 horas en ambos métodos (Tablas 7 y 8), por lo que se puede utilizar durante ese tiempo.

Para la marcación de la IgG con Tc<sup>99m</sup> es preferible utilizar como agente reductor de la proteína al AA, ya que es un método más sencillo, práctico y no tóxico al compararlo con el 2-ME.

## X. CONCLUSIONES

1. La marcación de la IgG depende de la concentración de grupos SH libres después de la reducción.
2. Existe diferencia significativa en los porcentajes de marcación de IgG-Tc<sup>99m</sup> después de la reducción con 2-ME y AA.
3. El AA es un agente reductor adecuado de la proteína que requiere cuidado en la exposición al medio ambiente.
4. El 2-ME es un agente reductor adecuado de la proteína que requiere mayor tiempo de trabajo y purificación por ser un compuesto tóxico.
5. La estabilidad de la marcación de la IgG-Tc<sup>99m</sup> permanece hasta por 6 horas utilizando como agentes reductores de la proteína al 2-ME y al AA.
6. El método de marcación de IgG con Tc<sup>99m</sup>, utilizando al AA como agente reductor de la proteína, es más sencillo, práctico y no tóxico al compararlo con el 2-ME.

## XI. RECOMENDACIONES

1. Para la reducción de anticuerpos con AA es necesario realizarlas de manera rápida y precisa para obtener mejores resultados.
2. Al trabajar el 2-ME se deben concentrar las alícuotas purificadas para tener uniformidad en las concentraciones de la proteína.
3. Evaluar la marcación de anticuerpos monoclonales utilizando como agente reductor de los enlaces disulfuro al AA en concentraciones mayores.

## XII. REFERENCIAS

1. Pons F. Inmunogammagrafía. Barcelona: Servicio de Medicina Nuclear, Hospital Clínico, Doc. Tec. 1992. 23p.
2. Thakur ML, DeFulvio JD. Determination of reduced disulfide groups in monoclonal antibodies. Biotechniques 1990; 8:512-516.
3. Roitt IM, Brostoff J, Male DK. Immunology. USA: Gower Medical Publishing Ltd, 1985. 2510p (p.5.3-5.4)
4. Banzo J, et al. Utilidad diagnóstica de la inmunoglobulina G humana policlonal-Tc99m en los procesos infecciosos. Rev Esp Med Nucl 1992; 1:32.
5. Valdés C, et al. Producción, marcaje con I131 y Tc99m y uso de gammagrafía humana de AcMo. Rev Esp Med Nucl 1992; 1:98.
6. Hani H, et al. Indium-labeled anti-colorectal carcinoma monoclonal antibody accumulation in non-tumored tissue in patients with colorectal carcinoma. J Nucl Med 1990; 31:1975-1979.
7. Harlow E, Lane D. Antibodies; A Laboratory Manual. USA: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 726pp.
8. Curso Regional de Capacitación (para América Latina) sobre Avances en Radiofarmacia Hospitalaria. Anticuerpos Monoclonales. Madrid: Organización Internacional de Energía Atómica (OIEA), Doc. Tec 1992. 39p (p.29-31).

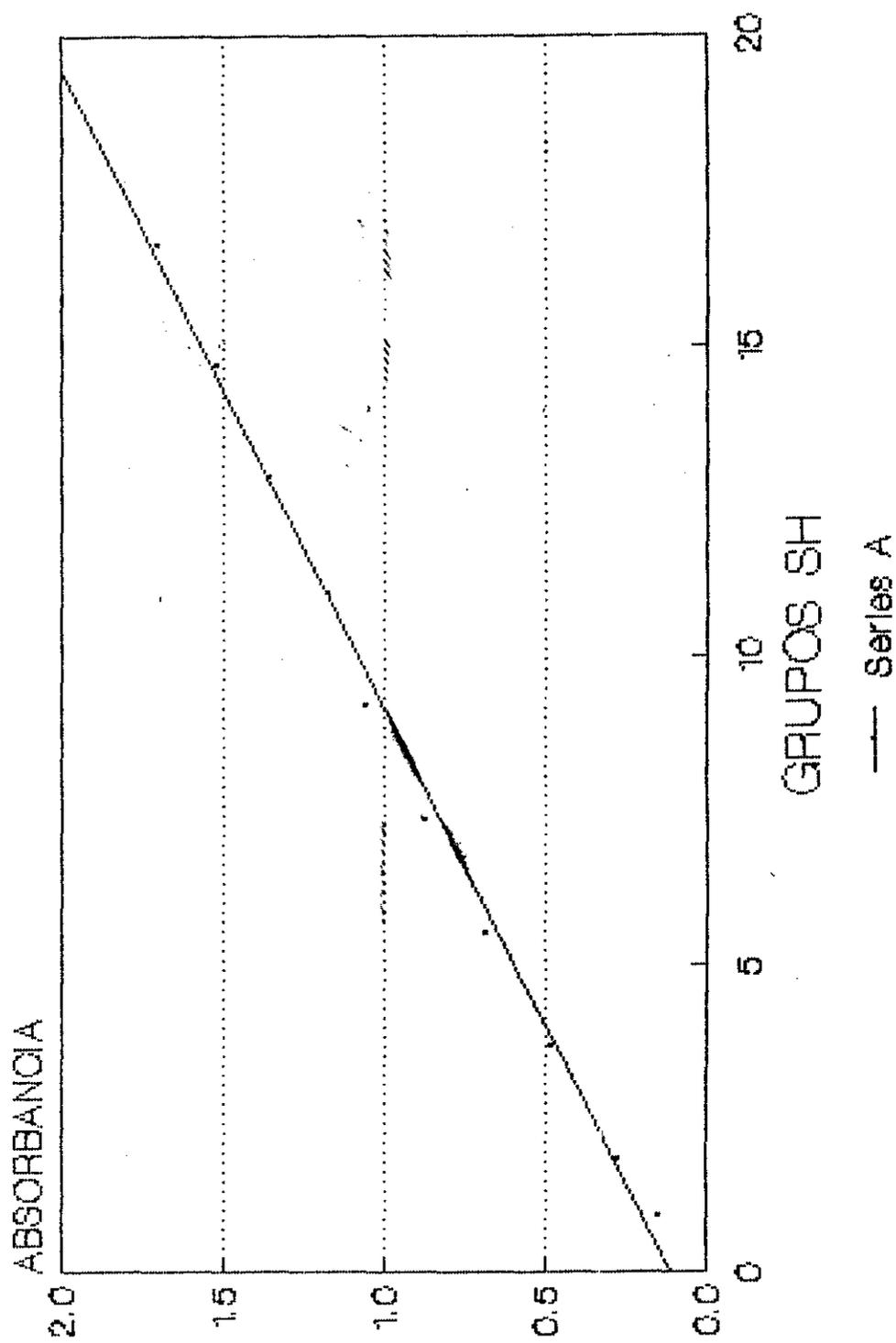
9. Díaz F. Producción y Propiedades de los Anticuerpos Monoclonales. Madrid: OIEA, Doc. Tec. 1992. 4p.
10. Hani AN, et al. In-11-labeled monoclonal antibody immunoscintigraphy in colorectal carcinoma: safety, sensitivity, and preliminary clinical results. Radiology 1990; 175: 163-171.
11. Maguire RT, et al. Immunoscintigraphy of colorectal adenocarcinoma: results with site-specifically radiolabeled B72.3. Ab Immu Radioph 1989; 2:257-269.
12. Curso Regional sobre Avances en Radiofarmacia Hospitalaria. Conceptos Radiofarmacológicos. Madrid: OIEA, Doc. Tec. 1992. 10p.
13. Portillo MC, Rodríguez SR. Comparación de Dos Métodos de Producción de Radiofármacos y Evaluación de Su Calidad. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1987. 11p.
14. Mathew L, et al. Monoclonal antibodies for specific cell labelling: considerations, preparations and preliminary evaluation. Nucl Med Biol 1987; 14:51-58.
15. Thakur ML, et al. Technetium-99m-labeled proteins for imaging inflammatory foci. Nucl Med Biol 1991; 18:605-612.

16. Cabrejos ME. "Tc99m-IgG" Marcación IgG policlonal con Tc99m. Chile: Universidad Católica Valparaíso, (tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Básicas y Matemáticas) 1992. 44p.
17. Saucedo T, et al. Concentración de Tecnecio 99m del eluido del Generador de Mo99-Tc99m. Buenos Aires: Comisión Nacional de Energía Atómica, Doc. Tec. No. 45, 1976. 269p (p.34-37).
18. Steigman J, et al. Chemistry of Technetium 99m. Sem Nucl Med 1974; 4:269-279.
19. Curso regional sobre Avances en Radiofarmacia Hospitalaria. Marcación de Anticuerpos. Madrid: OIEA, Doc. Tec. 1992. 11p.
20. Irving N, Lewis RJ. Hazardous Chemicals Desk Reference. USA: Van Nostrand Reinhold, 1987. 1084pp (p. 601).
21. Thakur ML, et al. Technetium 99m labeled monoclonal antibodies: evaluation of reducing agents. Nucl Med Biol 1991; 18: 227-233.
22. Thakur ML, DeFulvio JD. Technetium 99m-labeled monoclonal antibodies for immunoscintigraphy. J Immun Meth 1991; 137: 217-224.
23. Okada H, Torres I, Osso JA. Radioiodination of purified monoclonal antibody. Rev Esp Med Nucl 1992; 1:96.
24. Harwood SJ, et al. Human biodistribution of In-111-labeled B72.3 monoclonal antibody. Cancer Res 1990; 50:932s-936s.

25. Hauser W, Cavallo L. Measurement and quality assurance of the amount of administered tracer. In: Rhodes BA, 1977.
26. Lind P, et al. Immunoscintigraphy of inflammatory processes with a Tc99m-labeled monoclonal antigranulocyte antibody. J Nucl Med 1990; 31:417-423.
27. Reuland P, et al. Detection of infection in postoperative orthopedic patients with Tc99m-labeled monoclonal antibodies against granulocytes. J Nucl Med 1991; 32:2209-2214.
28. De la Roche J, Bruns J, Montz R. Primeras experiencias con inmunoescintigrafía con anticuerpos humanos policlonales marcados con Tc99m en el diagnóstico de infecciones ortopédicas. Rev Esp Med Nucl 1992; 1: 32-33.
29. Jimenez-Heffernan A, et al. IgG humana policlonal-Tc99m en la detección de infección/inflamación. Rev Esp Med Nucl 1992; 1:33.



**FIGURA No. 3**  
**CURVA ESTANDAR DE L-CISTEINA**  
**PARA DETERMINAR GRUPOS SH LIBRES**



**FIGURA No. 4**  
**GRAFICA DE CORRELACION ENTRE**  
**CONCENTRACION Y % DE MARCACION CON 2-ME**

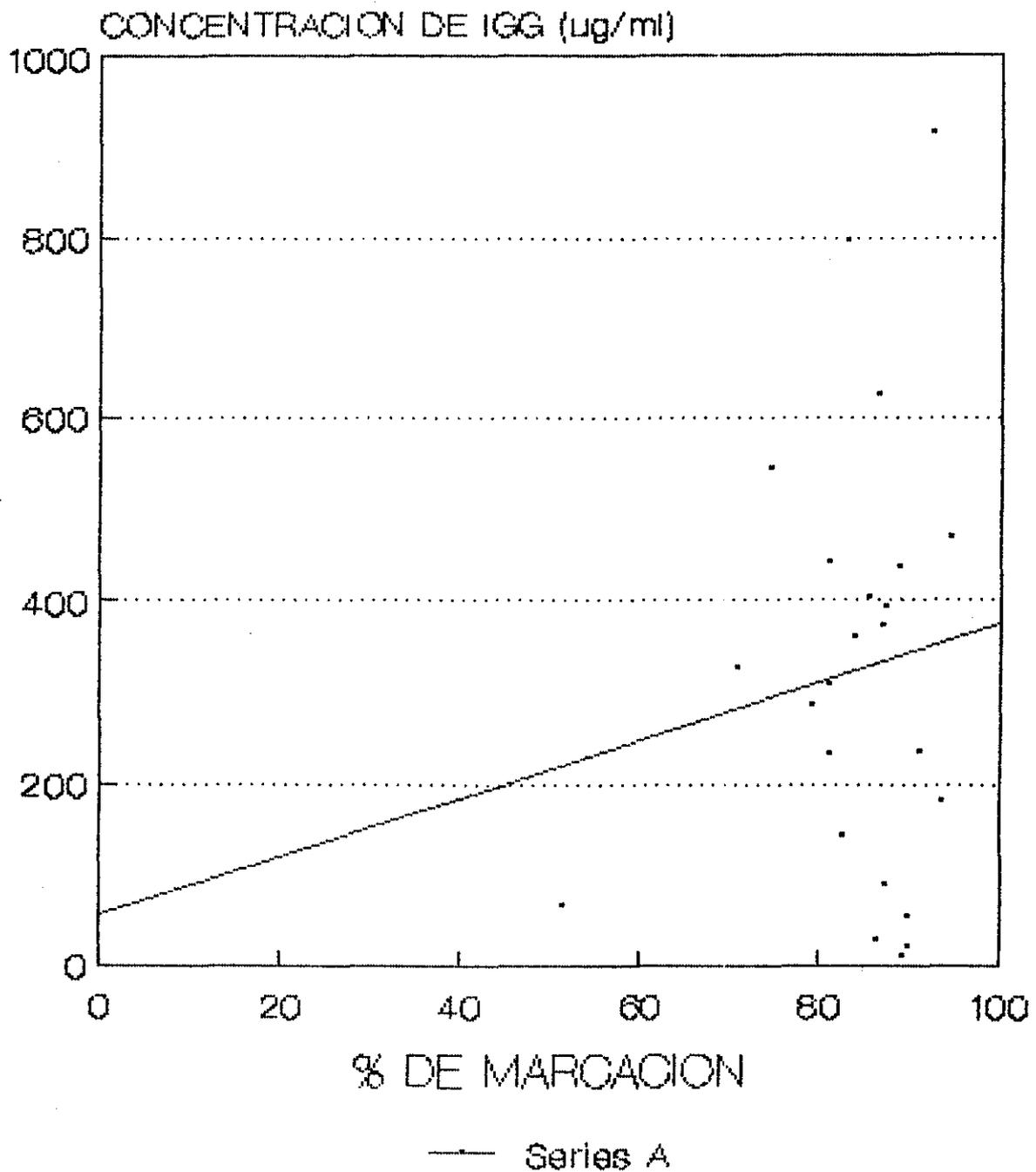


FIGURA No. 5

TABLA 2 X 2  
PRUEBA DE CHI-CUADRADO  
RENDIMIENTO DE MARCACION

|   | VALORES |       |
|---|---------|-------|
|   | AA      | 2-ME  |
| MAS DE 85%                                      | 2.00    | 14.00 |
| MENOS DE 85%                                    | 22.00   | 10.00 |
| CHI-CUADRADO = 11.3438<br>PROBABILIDAD = 0.0008 |         |       |

TABLA No. 1

CONSTANTES FISICAS DE LOS RADIONUCLEIDOS  
EMPLEADOS EN LA MARCACION DE ANTICUERPOS

| NUCLEIDO | T 1/2   | ENERGIA DE EMISION (kev) | RADIACION   |
|----------|---------|--------------------------|-------------|
| I-131    | 8.04 d* | 364                      | beta, gamma |
| I-125    | 60.0 d  | 35                       | gamma       |
| Tc-99m   | 6.04 h* | 140                      | gamma       |
| In-111   | 2.80 d  | 173                      | gamma       |

\* d = DIAS  
h = HORAS

TABLA No. 2

DATOS PARA LA CURVA ESTANDAR DE L-CISTEINA

| NO. TUBO | GRUPOS SH | ABSORBANCIA |
|----------|-----------|-------------|
| 1        | 0.92      | 0.14        |
| 2        | 1.84      | 0.27        |
| 3        | 3.68      | 0.48        |
| 4        | 5.53      | 0.68        |
| 5        | 7.37      | 0.87        |
| 6        | 9.21      | 1.05        |
| 7        | 11.00     | 0.17        |
| 8        | 12.90     | 1.35        |
| 9        | 14.70     | 1.52        |
| 10       | 16.60     | 1.70        |

TABLA No. 3

CONCENTRACION DE ALICUOTAS DE IGG  
DESPUES DE SU REDUCCION CON 2-ME

| No. DE MUESTRA | CONCENTRACION |
|----------------|---------------|
| 1              | 328.20        |
| 2              | 543.50        |
| 3              | 626.00        |
| 4              | 404.60        |
| 5              | 287.00        |
| 6              | 797.00        |
| 7              | 308.10        |
| 8              | 90.10         |
| 9              | 10.01         |
| 10             | 142.00        |
| 11             | 361.10        |
| 12             | 29.00         |
| 13             | 233.60        |
| 14             | 393.80        |
| 15             | 435.80        |
| 16             | 470.20        |
| 17             | 65.69         |
| 18             | 442.80        |
| 19             | 371.80        |
| 20             | 20.02         |
| 21             | 913.00        |
| 22             | 54.96         |
| 23             | 181.60        |
| 24             | 235.10        |

TABLA No. 4

GRUPOS SULFHIDRILLO Y % DE MARCACION  
EN LA REDUCCION CON 2-ME

| GRUPOS SH | % DE MARCACION |
|-----------|----------------|
| 2.33      | 70.58          |
| 2.51      | 74.35          |
| 1.92      | 86.00          |
| 12.70     | 85.15          |
| 10.80     | 78.94          |
| 10.80     | 82.77          |
| 12.00     | 80.90          |
| 12.00     | 87.02          |
| 2.00      | 89.00          |
| 15.80     | 82.94          |
| 0.35      | 83.60          |
| 0.28      | 86.00          |
| 15.80     | 80.70          |
| 20.30     | 87.10          |
| 20.30     | 88.60          |
| 0.20      | 94.20          |
| 0.11      | 51.20          |
| 20.30     | 80.90          |
| 21.50     | 86.80          |
| 18.90     | 89.40          |
| 20.30     | 91.90          |
| 24.30     | 89.60          |
| 23.10     | 93.30          |
| 24.90     | 90.90          |

TABLA No. 5

GRUPOS SULFHIDRILO Y % DE MARCACION  
EN LA REDUCCION CON AA

| GRUPOS SH | % DE MARCACION |
|-----------|----------------|
| 19.10     | 71.66          |
| 16.80     | 73.67          |
| 32.80     | 73.77          |
| 3.61      | 82.90          |
| 3.23      | 79.89          |
| 3.61      | 84.67          |
| 3.61      | 83.14          |
| 3.14      | 84.52          |
| 96.10     | 71.40          |
| 2.50      | 76.40          |
| 0.56      | 66.00          |
| 0.28      | 72.00          |
| 0.09      | 69.50          |
| 0.93      | 69.00          |
| 0.56      | 67.10          |
| 0.25      | 81.50          |
| 10.50     | 70.90          |
| 1.39      | 72.10          |
| 0.25      | 78.30          |
| 0.25      | 77.20          |
| 0.25      | 87.10          |
| 0.24      | 74.70          |
| 0.25      | 85.30          |
| 0.25      | 81.60          |

TABLA No. 6

DATOS DE LA PRUEBA DE T-STUDENT

| GRUPO | MUESTRAS | MEDIA  | DESV STD | ERROR STD | COEF VAR |
|-------|----------|--------|----------|-----------|----------|
| AA    | 24       | 76.463 | 6.309    | 1.288     | 8.25     |
| 2-ME  | 24       | 83.848 | 8.975    | 1.832     | 10.70    |

TABLA No. 7

ESTABILIDAD DE MARCACION DE IGG HASTA 6 HORAS  
AGENTE REDUCTOR 2-ME

| MUESTRA | PORCENTAJE DE MARCACION |        |         |         |         |         |         |
|---------|-------------------------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|
|         | 0 HORAS                 | 1 HORA | 2 HORAS | 3 HORAS | 4 HORAS | 5 HORAS | 6 HORAS |
| 1       | 89                      | 82     | 78      | 79      | 76      | 79      | 84      |
| 2       | 79                      | 78     | 77      | 77      | 76      | 83      | 83      |
| 3       | 87                      | 79     | 83      | 87      | 85      | 89      | 87      |

TABLA No. 8

ESTABILIDAD DE MARCACION DE IGG HASTA 6 HORAS  
AGENTE REDUCTOR AA

| MUESTRA | PORCENTAJE DE MARCACION |        |         |         |         |         |         |
|---------|-------------------------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|
|         | 0 HORAS                 | 1 HORA | 2 HORAS | 3 HORAS | 4 HORAS | 5 HORAS | 6 HORAS |
| 1       | 72                      | 81     | 68      | 73      | 67      | 87      | 86      |
| 2       | 80                      | 89     | 90      | 83      | 70      | 76      | 78      |
| 3       | 85                      | 88     | 87      | 89      | 89      | 90      | 86      |