

Uso de anticuerpos monoclonales en la detección de la actividad aterogénica de la estenosis carotídea. Significado clínico

Utility of monoclonal antibodies to detect atherogenic activity in carotid stenosis. Clinical relevance

Vicente Riambau - Lourdes Prat* - Pier Luigi Pieri** - Ignacio Carrió* -
Angel Chamorro† - Jaime Mulet

Servicio de Cirugía Cardio-Vascular
(Jefe de Servicio: Dr. Jaime Mulet Meliá)
Hospital Clínico de Barcelona (España)

RESUMEN

Los actuales métodos diagnósticos son insuficientes para detectar los pacientes con estenosis carotídea con riesgo real de ictus. En estudios experimentales previos sugerimos que el uso de radioisótopos específicos contribuiría a detectar la actividad de la placa de ateroma.

Objetivo: Evaluar en humanos un anticuerpo monoclonal químérico denominado Z2D3, marcado isotópicamente, en términos de seguridad y tolerancia, biodistribución, captación y vías de eliminación, así como capacidad de detectar y localizar lesiones ateroscleróticas carotídeas activas.

Material y Métodos: Estudio clínico preliminar. El radiotrazador utilizado fue el ^{111}In -Z2D3 PL-F(ab')₂-DTPA, obtenido a partir de un homogenizado de placas de ateroma humanas. Se han seleccionado 12 pacientes con estenosis carotídea sintomática y programados para endarterectomía. A cada paciente se le administró una sola dosis de 250 μg del radiotrazador marcado con 5.0-5.5 mCi de cloruro de ^{111}In . Se obtuvieron imágenes planares y de SPECT a las 4, 24, 48 y 72 horas p.i. del trazador. A las 48 h. de realizadas las últimas imágenes se practicaron las endarterectomías carotídeas y se procesaron los especímenes para imágenes planares y estudio histopatológico.

Resultados: A las 4 h. p.i. se observó captación significativa a nivel de la placa carotídea. La intensidad de captación disminuyó con el tiempo. No surgieron efectos indeseables.

Conclusiones: El anticuerpo utilizado es útil para visualizar placas de ateroma en humanos. El desarrollo de estas técnicas radioisotópicas tendrán implicaciones en el diagnóstico y pronóstico de estenosis carotídeas y de otras regiones anatómicas, así como en el control y seguimiento de terapéuticas quirúrgicas revascularizadoras y de tratamientos médicos antiaterogénicos.

Palabras clave: Estenosis carotídea; ictus, anticuerpo monoclonal; radioinmunoscintigrafía; actividad aterogénica.

SUMMARY

Actually, there are not any optimal method to detect real risk of stroke in patients with carotid stenosis. We suggested in previous experimental studies that we could detect atherogenic activity by specific radiotracers.

Objective: To evaluate the safety and preliminary efficacy of chimeric monoclonal antibody ^{111}In -Z2D3 PL-F(ab')₂-DTPA, in the detection and localization of carotid atherosclerotic plaque.

Material and Methods: It is a preliminary study designed as a limited enrollment, non-randomized, unblinded, controlled clinical trial. ^{111}In -Z2D3 PL-F(ab')₂-DTPA was obtained from a homogenized human atheromatous plaques. Twelve patients with symptomatic carotid stenosis scheduled to endarterectomy were selected. Each patient received a single injection of Z2D3 PL F(ab')₂-DTPA labeled with 5.0-5.5 mCi of $^{111}\text{Indium}$ chloride. Radioimmunosintigraphic images were obtained at 4, 24, 48 and 72 hours after radiotracer administration. A conventional endarterectomy was done 48 hours after last image. The surgical specimen was analyzed by ex-vivo counting and histopathology. Vital signs, blood and urine samples were obtained at specified intervals during the study.

Results: The most relevant images were obtained at 4

* Medicina Nuclear, Centro de Diagnóstico Deicón, Barcelona (España).

** Medicina Nuclear, Hospedale de Bufalini, Cesena (Italia).

† Servicio de Neurología, Hospital Clínico de Barcelona (España).

hours after injection. The intensity of captation was slowly decreased after this time. No adverse effects were registered. **Conclusions:** ^{111}In -Z2D3 PL-F(ab')₂-DTPA is useful to detect atherosclerotic plaques in humans. Future developments in radioimmunoscintigraphy techniques will have implications as a complementary diagnostic and prediction method, as well as it will become a method to control the progression and regression of atherosclerosis after therapeutic procedures.

Key words: carotid stenosis; stroke, monoclonal antibody; radioimmunoscintigraphy; atherogenic activity.

Introducción

En los últimos decenios las indicaciones de endarterectomía carotídea han generado numerosas controversias. Consecuentemente, se han ido sucediendo en la literatura aportaciones basadas en estudios clínicos retrospectivos, estudios sobre la historia natural de la estenosis carotídea, editoriales y consensos sobre los estándares en cirugía carotídea, opiniones aisladas de «reconocidos expertos» y, más recientemente, estudios clínicos multicéntricos, randomizados, prospectivos, tanto americanos como europeos (1, 2).

Existe mayor acuerdo a la hora de aceptar que la endarterectomía carotídea es una terapéutica profiláctica para la prevención de fenómenos isquémicos resultantes de embolia y/o hipoperfusión cerebral relacionados con la estenosis carotídea objeto de la cirugía. Sin embargo, todavía no se han identificado a los pacientes portadores de estenosis carotídea con alto riesgo de «ictus» para los cuales la cirugía carotídea constituyera un auténtico beneficio (3, 4). Los recientes estudios multicéntricos con pacientes sintomáticos y asintomáticos han tenido como objetivo el definir este grupo de riesgo (5). No obstante, los marcadores como el grado de estenosis, la morfología eco-gráfica de la placa y los antecedentes clínicos, no parecen tener suficiente valor predictivo para identificar a los pacientes que se beneficiarían realmente de una endarterectomía carotídea (3, 6). Si bien la controversia es menor cuando nos referimos a pacientes que ya han tenido síntomas isquémicos ipsilaterales, se mantiene un grado mayor de incertidumbre cuando intentamos presuponer el futuro de los pacientes asintomáticos (1, 8).

Nuestro grupo de trabajo hace unos años inició una línea de investigación fundamentada en la siguiente hipótesis: la inmunoescintigrafía ofrecería una nueva perspectiva diagnóstica, complementaria a las ya exis-

tentes, para detectar «actividad aterogénica» y así discriminar placas de ateroma con riesgo de embolizar, progresar o reestenosar después de endarterectomía.

Introducimos, de este modo, un parámetro nuevo que denominamos «actividad aterogénica» (AA) y que definimos como la capacidad biológica de la placa de ateroma de mantener su estado metabólico funcionante y, por tanto, de generar más ateroma.

Es bien conocido que en el complejo proceso de aterogénesis, descrito y revisado por Russell Ross (9), intervienen numerosos mediadores celulares y bioquímicos. Estos mediadores serían potencialmente capaces de actuar como alergenos y estimular la producción de anticuerpos. El objetivo de nuestro estudio es evaluar, en humanos, un anticuerpo monoclonal químérico denominado Z2D3, marcado isotópicamente, en términos de seguridad y tolerancia, biodistribución, captación y vías de eliminación, así como capacidad de detectar y localizar lesiones ateroscleróticas carotídeas activas.

Material y métodos

Desarrollo del Anticuerpo

En un estudio experimental previo, con conejos blancos de Nueva Zelanda, demostramos que una Inmunoglobulina G (IgG) policlonal marcada con ^{111}In era capaz de adherirse a las zonas de mayor actividad aterogénica, siguiendo un patrón de captación superponible al de las lipoproteínas de baja densidad (10). Este hecho experimental constituyó una primera fase de nuestro proyecto. Si la IgG policlonal inespecífica era capaz de unirse a las zonas de ateroma metabólicamente más activas, podríamos obtener resultados similares con un anticuerpo monoclonal específico y fragmentado para ser menos alergizante. De este modo, y a través de una estrecha colaboración con los Dres. Ban-An Khaw y Narula, de la Universidad de Havard, Boston, MA, USA, hemos obtenido el anticuerpo que es objeto de este estudio.

Brevemente, a partir de homogenizado de placas de ateroma obtenidas de arteria de cadáver humano, se sensibilizaron a ratas de laboratorio para la obtención de una línea celular hibridoma denominada Z2D3 productora de una IgM monoclonal de origen murino. Si bien no se conoce con exactitud el antígeno para este anticuerpo, se sabe por técnicas inmunohistoquímicas, que sólo interactúa con células musculares en proliferación. Asimismo, ejerce una reactividad cruzada con lesiones ateroscleróticas experimentales de conejo, lo que ha facilitado el desarrollo de estudios en animales,

previos a los ensayos clínicos. Para optimizar la utilidad de este anticuerpo en humanos, a través de técnicas de ingeniería genética, fue añadido la región constante de una IgG humana al gen del anticuerpo y transfectado a células de mieloma de rata para obtener una IgG quimérica, murina y humana. Para minimizar el potencial alergénico, se fragmentó la IgG resultante con pepsina para obtener la fracción de adhesión antigenica $[F(ab')_2]$. Posteriormente, este anticuerpo resultante sufrió la preparación con ácido dietilenetriamino-pentaacético (DTPA) y con polilisina (PL). Finalmente, el anticuerpo era marcado isotópicamente con cloruro de In¹¹¹. El producto final recibió la siguiente denominación: In¹¹¹-Z2D3-PL-F(ab')₂-DTPA. Los detalles del desarrollo y primeras experiencias en animales están descritos en un reciente artículo del Dr. Narula y cols. que en breves fechas aparecerá publicado (11). El anticuerpo preparado para este estudio fue cedido por gentileza de Scotgen Biopharmaceutical, Inc. Menlo Park, California, USA.

Diseño del estudio

Se trata de un estudio clínico piloto, no randomizado, controlado, puesto que cada paciente constituye su propio control.

Pacientes

Todos los pacientes presentaban una estenosis carotídea considerada para tratamiento quirúrgico. Asimismo, cumplían con los siguientes criterios de selección. Como criterios de inclusión se contemplaron: todos los pacientes debían presentar manifestaciones clínicas y exploración física que denotase la presencia de aterosclerosis carotídea. La estenosis carotídea debía ser confirmada por Eco-doppler o por angiografía. El paciente debía ser candidato a tratamiento quirúrgico. Todos los pacientes debían leer y firmar el consentimiento informado para tomar parte en el estudio. El protocolo de estudio y la hoja de consentimiento estaban aceptados por el Comité Ético del Centro hospitalario donde se realizaba la prueba diagnóstica. Los pacientes podían ser de ambos sexos, mayores de 18 años. Las mujeres no debían ser gestantes ni estar en período de lactancia. Además, fueron excluidos los pacientes que hubieran recibido previamente algún anticuerpo murino o químérico, y los que participasen de otros protocolos terapéuticos.

Plan de trabajo. Parámetros estudiados

Antes de inyectar el radiotrazador se elaboró una historia clínica y se realizó una exploración física completa. Se registraron el peso, la talla y los signos vitales

(presión arterial, temperatura, frecuencia respiratoria y frecuencia cardíaca). Se repitieron los registros de signos vitales a los 5', 15', 30', 60', 90', 120', 240' y 24 horas postinyección. Además, se obtuvieron muestras sanguíneas y de orina para analíticas generales de rutina (hemograma completo, ionograma, glicemia, función renal y hepática, urinoanálisis y sedimento de orina) antes de la administración del trazador y a las 24 horas posteriores. La dosis total administrada del radiotrazador, In¹¹¹-Z2D3-PL-F(ab')₂-DTPA, fue de 250 μ g, correspondiendo a 5.0-5.5 mCi, a través de una vía venosa periférica.

Se registraron imágenes gammagráficas planares utilizando proyecciones anteroposteriores y oblicuas derecha e izquierda de las regiones cervical, tórax y abdomen. Del mismo modo, se obtuvieron imágenes por SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) en cortes coronales, sagitales y transversales de las mismas regiones. Todas las imágenes se obtuvieron a las 4, 24, 48 y 72 horas postinyección. Los resultados gammagráficos fueron interpretados por expertos en Medicina Nuclear, indicando las áreas de anormalidad para ser comparados estos resultados con los obtenidos por Eco-Doppler, angiografía y la pieza de endarterectomía.

Se determinó el aclaramiento plasmático del radiotrazador obteniendo muestras seriadas al minuto, a los 30 y 60 minutos, y a las 24, 48 y 72 horas postinyección.

La endarterectomía carotídea se realizó siguiendo la técnica convencional, dentro de las primeras 48 horas posteriores a la obtención de las últimas imágenes gammagráficas. El especimen quirúrgico fue procesado para el recuento de c.p.m. (centelleos por minuto) y para la obtención de imágenes gammagráficas directas. Además, se sometieron al análisis anatopatológico.

Se registró cualquier efecto indeseable a lo largo de todo el estudio, siendo el último control clínico el efectuado a las 6 semanas de la administración del radiotrazador.

Resultados

Un total de 12 pacientes fueron seleccionados y estudiados. Todos ellos varones con edades comprendidas entre 45 y 76 años (edad promedio 65 \pm 15 años).

Seguridad y Tolerancia

No se registraron alteraciones significativas de los signos vitales en ninguno de los pacientes estudiados a lo largo de todo el seguimiento. Tampoco fueron

detectadas anomalías en los controles analíticos sanguíneos ni urinarios. No se identificaron efectos secundarios indeseables atribuibles al radiotrazador $\text{In}^{111}\text{-Z2D3-PL-F(ab')}_2\text{-DTPA}$. No se detectaron niveles de anticuerpo anti-Z2D3 circulantes en el plasma de los pacientes estudiados.

Distribución

Transcurrida la primera hora desde la inyección del $\text{In}^{111}\text{-Z2D3-PL-F(ab')}_2\text{-DTPA}$, se detecta su localización en: médula ósea, corazón (actividad circulante), hígado, pulmón, bazo, riñones y vejiga urinaria.

Aclaramiento plasmático y Eliminación

El $\text{In}^{111}\text{-Z2D3-PL-F(ab')}_2\text{-DTPA}$ se elimina vía urinaria, no detectándose en orina a partir de las 4 horas postinyección. El aclaramiento plasmático siguió una curva biexponencial con un $T_{1/2}$ (Tiempo medio) de 920 minutos.

Captación

La captación máxima del radiotrazador se registra a las 4 horas de inyectado. Las zonas de captación gammagráfica son la placa de ateroma y también la médula ósea. La intensidad de captación se atenúa con el tiempo.

Las Figs. 1 y 2 constituyen dos ejemplos claros de captación significativa a nivel de la placa de ateroma carotídea, 4 horas después de inyectado el radiotrazador. El caso de la Fig. 2 es especialmente relevante, puesto que corresponde a un paciente afecto de estenosis carotídea bilateral con reducción de la luz $>70\%$. Clínicamente, el paciente había presentado una embolia central de la retina derecha un mes antes de su ingreso para estudio. La carótida izquierda había permanecido silente desde el punto de vista clínico y sin alteraciones en la tomografía axial cerebral. En las imágenes gammagráficas por SPECT en corte transversal, destaca la captación intensa de la región carotídea derecha, en comparación con una tenue captación carotídea izquierda, traduciéndose una mayor AA en el lado sintomático.

Análisis del especímen

No se consiguieron imágenes gammagráficas de las piezas de endartectomía. Aunque sí se registró actividad isotópica que permitió el cálculo del porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido, siendo de $0,047 \pm 0,007$. El análisis histopatológico de las placas de ateroma carotídeas demostró grados variables de infiltración lipídica, calcificación y células musculares lisas en proliferación.

Discusión

Después de analizar nuestros resultados, podemos concluir que el uso de este nuevo radiotrazador, denominado $\text{In}^{111}\text{-Z2D3-PL-F(ab')}_2\text{-DTPA}$, es seguro y tiene una buena tolerancia en humanos. Además, es útil para detectar AA de placas metabólicamente activas a través de imágenes gammagráficas digitalizadas suficientemente válidas para su interpretación clínica. El mayor inconveniente de esta nueva técnica diagnóstica reside en la imposibilidad de evitar la captación por la médula ósea, pudiendo causar interferencias, sobre todo si se piensa en ampliar su aplicación a otros territorios vasculares.

Como ya se ha señalado más arriba, la captación óptima se produce a las 4 horas y decrece con el tiempo. Ello también se correlaciona con la ausencia de actividad gammagráfica en los especímenes patológicos obtenidos varios días después de la administración del anticuerpo, así como el bajo porcentaje de dosis inyectada en los mismos. Una posible lisis de la molécula del radiotrazador por parte de enzimas proteolíticos circulantes o de la propia placa podría ser responsable del desprendimiento del isótopo. No obstante, el método sigue siendo válido clínicamente, ya que 4 horas es un tiempo moderado y suficiente como para obtener la información necesaria acerca de la AA.

Importantes implicaciones se derivan de este estudio. Por ejemplo, la AA detectada mediante el uso de $\text{In}^{111}\text{-Z2D3-PL-F(ab')}_2\text{-DTPA}$ u otro inmunotrazador de similares características, puede constituir un nuevo marcador de riesgo de la placa de ateroma, a añadir a los criterios clínicos, morfológicos y hemodinámicos ya existentes. De este modo, en patología obstructiva carotídea, la aplicación de este parámetro puede contribuir en la identificación de los pacientes afectos de estenosis carotídea con mayor riesgo real de ictus. Además, la posibilidad de detectar la progresión o regresión de la placa de ateroma puede ser útil para la monitorización de los tratamientos médicos y/o quirúrgicos de la estenosis carotídea y de otras localizaciones anatómicas vasculares.

Los recientes estudios sobre las características ecográficas de la placa de ateroma carotídea y su correlación clínico-patológica suponen la existencia de nuevos parámetros que no han sido incluidos en todos los protocolos de los macroensayos clínicos de las lesiones sintomáticas o asintomáticas de carótida. El análisis ecográfico morfológico de la placa de ateroma informa del grado de «riesgo» de una estenosis carotídea, independientemente del grado de reducción de la luz que ésta suponga. Es decir, la estenosis no debe de



Fig. 1A



Fig. 1B

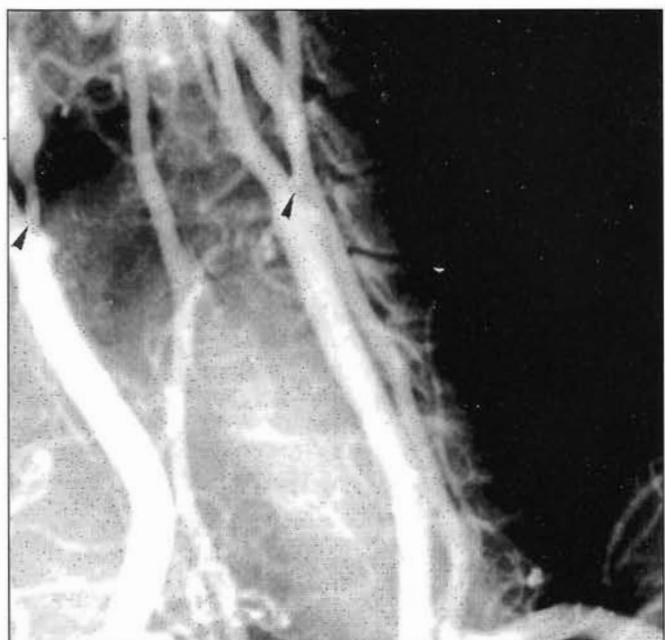


Fig. 2A

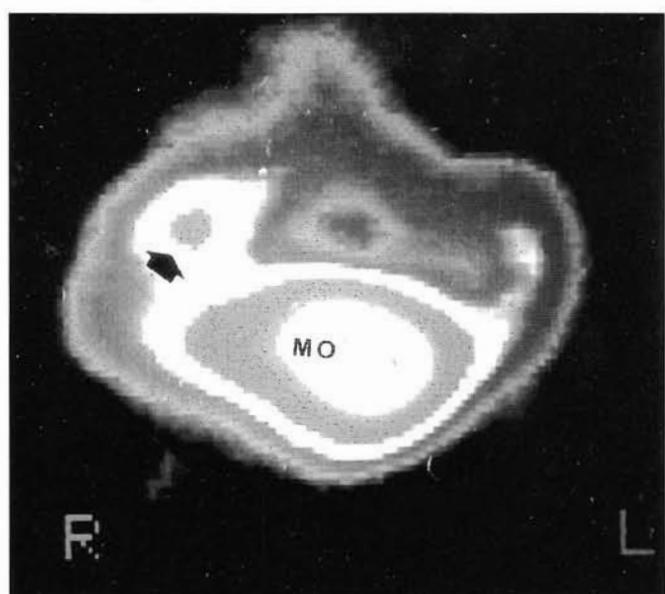


Fig. 2B

Figs. 1 A y B y Figs. 2 A y B. Explicaciones en el texto.

ser el único parámetro a tener en cuenta en el momento de dictar un pronóstico. Este hecho debe de ser contemplado con mayor respeto en los casos de lesiones asintomáticas de carótida (12, 15). En este mismo sentido, la AA puede correlacionarse clínico-patológicamente con las lesiones de carótida. Por este motivo, serán necesarios más estudios clínicos para validar esta técnica diagnóstica y, así, concretar su valor clínico predictivo.

Finalmente, este estudio constituye un ejemplo más de lo que la Medicina Nuclear, desde una perspectiva anatómo-funcional, ha aportado y sigue aportando al diagnóstico y pronóstico de la Patología Vascular (16).

BIBLIOGRAFIA

- CAPDEVILA, J. M.; VILA R.; RUBIO, F.: Lesiones asintomáticas de carótida. En: RC de Sobregrau Ed. Tratamiento de las Lesiones Vasculares Asintomáticas, Barcelona: *J. Uriach & Cia.*, 1995; pp:103-120.
- MOORE, W. S.; BARNETT, H. J. M.; BEEBE, H. G.; BERNSTEIN, E. F.; BRENER, B. J.; BROTT, T., et al: Guidelines for Carotid Endarterectomy. A Multidisciplinary Consensus Statement From the Ad Hoc Committee, American Heart Association. *Stroke*, 1995; 26:188-201.
- RANKE, C.: Risk of stroke in asymptomatic carotid stenosis [letter]. *Lancet*, 1995; 345:721.
- MARKUS H.: Risk of stroke in asymptomatic carotid stenosis [letter]. *Lancet*, 1995; 345:721.
- Risk of stroke in the distribution of an asymptomatic carotid artery. The European Carotid Surgery Trialists Collaborative Group. *Lancet*, 1995; 345:209-212.
- BROTT, T.; TOMSICK, T.; FEINBERG, W.; JOHSON, C.; BILLER, J.; BRODERICK, J., et al: Baseline Silent Cerebral Infarction in the Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study. *Stroke*, 1995; 25:1122-1129.
- HALLIDAY, A. W.; THOMAS, D.; MANSFIELD, A.: The Asymptomatic Carotid Surgery Trial (ACST). Rationale and Design. *Eur J. Vasc. Surg.*, 1994; 8:703-710.
- Clinical Advisory: Carotid Endarterectomy for Patients with Asymptomatic Internal Carotid Artery Stenosis. *Stroke*, 1995; 25:2523-2524.
- ROSS, R.: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993; 362:801-809.
- PRAT, L.; TORRES, G.; CARRIÓN, I.; ROCA, M.; RIAMBAU, V.; BERNA, L., et al: Polyclonal 111In-IgG, 125I-LDL and 125I-endothelin-1 accumulation in experimental arterial wall injury. *Eur. J. Nucl. Med.*, 1993; 20:1141-1145.
- NARULA, J.; PETROV, A.; BIANCHI, C.; DITLOW, C. C.; LISTER, B. C.; DILLEY., et al: Noninvasive Localization of Experimental Atherosclerotic Lesions with Mouse/Human Chimeric Z2D3 F(ab')₂ Specific for the Proliferating Smooth Muscle Cells of Human Atheroma: Imaging with Conventional and Negative Charge-modified Antibody Fragments. *Circulation*, 1995; (in press).
- MIRALLES, M.; SANTISO, A.; GIMÉNEZ, A.; RIAMBAU, V.; SÁEZ, A.; CAIROL, M. A.: Duplex carotídeo: correlación angiográfica e histopatológica. *An Circ. Vasc.*, 1992; 1:117-121.
- Carotid Artery Plaque Composition: Relationship to Clinical Presentation and Ultrasound B-mode Imaging. European Carotid Plaque Study Group. *Eur. J. Vasc. Surg.*, 1995; 10:23-30.
- CAVE, E. M.; PUGH, N. D.; WILSON, R. J.; SISSONS, G. R. J.; WOODCOCK, J. P.: Carotid Artery Duplex Scanning: Does Plaque Echogenicity Correlate with Patient Symptoms? *Eur. J. Vasc. Surg.*, 1995; 10:77-81.
- MARINEL·LO, J.; ALOS, J.; CARREÑO, P.; OLBA, L.; ALEXANDER, C.: Placa de ateroma carotídea: Estudio prospectivo de su evolución en función a su tipaje hemodinámico. *Angiología*, 1995; 3:151-158.
- RIAMBAU, V.: Estudios Isotópicos en Cirugía Vascular. En: I. Carrió, M. Estorch y Ll. Bernà eds. Estudios Isotópicos en Medicina. Barcelona: *Springer-Verlag Ibérica*, 1992; pp:231-240.