



CU9700449

8-967

# C I E N - R

BREVE ESTUDIO SOBRE LA BIODISTRIBUCION DEL FACTOR DE  
CRECIMIENTO EPIDERMICO HUMANO RECOMBINANTE (EGF-hr)

BRIEF STUDY ASBOUT THE DISTRIBUTION OF RECOMBINANT HUMAN  
EPIDERMAL GROWTH FACTOR (rh-EGF)

Rodriguez Garcia, J.C.; De Dios D'Espaux, R.  
Bello Garciga, J.L.

\*  
\*\*

\* Instituto Nacional de Endocrinologia, La Habana Cuba

\*\* Instituto Nacional de Oncologia y Radiobiologia, La Habana Cuba

La Habana, Cuba

1997

**POOR QUALITY  
ORIGINAL**

VOL 28 No 13

**Título:Breve estudio sobre la Biodistribución del Factor de Crecimiento Epidérmico humano recombinante. (EGF-hr).**  
**Title:Brief study about the distribution of recombinant human Epidermal Growth Factor (rh-EGF).**

**Autores:**

- Julio César Rodríguez García.  
Lic.Biología.Aspirante a Investigador.  
Instituto de Endocrinología.Zapata y D.Vedado.Habana.Cuba
- José Luis Bello Gárciga.  
Lic.Bioquímica.Investigador Titular.Cdto a Dr.Ciencias.  
Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología.  
27 y E. Vedado.Habana.Cuba.
- Rosa de Dios D'Espaux.  
Lic.Bioquímica.Aspirante a Investigador.  
Instituto de Endocrinología.Zapata y D.Vedado.Habana.Cuba

**Key Word:Iodine 125:M; growth factors:Q1; labelled compounds;  
rats; blood; gamma detection; tissue distribution;  
radioisotope scanning.**

**Subjects Categoriic: C4500**

## **RESUMEN.**

En el presente trabajo se llevó a cabo un estudio de la biodistribución del Factor de Crecimiento Epidérmico humano recombinante (EGFhr) marcado con I-125 para lo cual se administró dicho producto a ratas Sprague Dawley obtenidas del CENPALAB por tres vías diferentes: intramuscular, subcutánea y tópica; observándose la máxima concentración del producto en sangre a las pocas horas de administrado, con una mayor distribución en el plasma con respecto al pellet sanguíneo, haciéndose más lento el aclaramiento plasmático cuando pasamos de la administración intramuscular a la subcutánea y de esta a la tópica. Las mayores concentraciones del producto marcado se observan en hígado, riñón e intestino y su eliminación se realiza fundamentalmente por la orina y las heces fecales aunque no se descartan otras vías.

## **SUMMARY.**

This report describes results of the study about biodistribution of I-125 recombinant human Epidermal Growth Factor (rhEGF). The radiolabelled product was administrated to Sprague Dawley rats in three different ways: intramuscle, subcutaneous and epidermics; the highest concentration of EGF in blood was found 4 hours after rhEGF administration, with a greater distribution in the plasma with regard to cellular pellet. The slowest plasma clearence corresponded to the epidermic administration, while the faster plasma clearence corresponded to the intramuscle administration. The highest concentration of radiolabelled rhEGF was found in liver, kidney and intestine. It was found that radiolabelled EGF is excreted mainly throughout urine and faeces although other excretion pathways could exist.

## **Introducción.**

El descubrimiento de cualquier nuevo aspecto de la regulación de la proliferación y diferenciación celular abre siempre un nuevo camino para la terapéutica del cáncer y en el caso de los factores de crecimiento estamos en presencia de un grupo de biomoléculas cuya relación con el crecimiento neoplásico está bien esclarecido. (1).

La aparición de las técnicas de Ingeniería Genética permitió que se facilitara la evaluación de estos productos como nuevos medicamentos a emplear en una hormonoterapia tisular de nuevo tipo. El EGFhr como factor de crecimiento relacionado con el tejido epitelial, tejido a partir del cual se forman los tumores malignos más frecuentes, ha sido obtenido en nuestro país por las técnicas del DNA recombinante (2) y su uso en la reparación de los epitelios dañados se perfila como importante.

Como es sabido, para la evaluación de los productos obtenidos

por Ingeniería Genética y que sean similares a las sustancias poseedoras de actividad fisiológica, no se han establecido criterios unánimes en el mundo científico, los que se conformaran a medida que nuestros conocimientos sobre estos productos aumenten, de ahí la necesidad de establecer los criterios iniciales para el estudio de la biodistribución del EGF.

### **Materiales y Métodos.**

Para llevar a cabo nuestros estudios usamos EGFhr recombinante obtenido en el CIGB y preparado en forma liofilizada en bulbos de 2mg con manitol, los cuales fueron reconstituidos para el trabajo en 2mL de PBS.

Los animales de experimentación empleados fueron: ratas Sprague Dawley obtenidas del CENPALAB y tuvieron libre acceso a la comida y al agua, que fue suplementada con 1 gr de yoduro de sodio/L de agua.

Para los estudios de biodistribución se empleó EGFhr marcado con I-125 en el Laboratorio de Bioquímica del INOR, cada animal recibió cantidades trazas de EGFhr yodado en una dosis de 1mg/Kg de peso, cuando se administró el producto por vías intramuscular y subcutánea. Se realizó un estudio en un tercer grupo de animales a los que se les administró el producto en forma de pomada en una dosis de 100 mg/g de unguento hidrófilo. La cantidad de radioactividad administrada a cada animal fue de 2.5 - 3 millones cpm/min en todas las series experimentales, cada serie experimental estaba compuesta de 4 animales por período de tiempo de recolección de tejidos.

La sangre fue colectada en tubos con 100  $\mu$ l de heparina y las muestras centrifugadas a 1500 rpm durante 20 minutos lavándose 2 veces para evaluar la radioactividad en plasma y en la fracción celular (cpm/ml).

Los órganos para el estudio fueron tomados a partir de los 60 minutos de administrado el producto. Estos órganos fueron pesados y la radioactividad medida en un contador de pozo tipo VA-V-100 acoplado a un contador VA-G-120 de la firma RFT, expresándose los resultados en cpm/g de peso.

Para la recolección de orina y heces fecales, las ratas fueron colocadas en cámara de diuresis de la Iffa Credo, tomándose las muestras a diferentes intervalos de tiempo. Se midió el volumen de orina y el conteo de radioactividad se realizó utilizando todo el volumen recolectado, expresándose los resultados en conteos por minutos (cpm).

El análisis de los resultados se realizó mediante las curvas de aclaramiento del producto en los distintos órganos y se buscó su expresión matemática en forma de un polinomio de segundo grado de la forma  $mx^2+px+q$  aproximación a la curva descriptiva.

## Resultados.

### Administración Intramuscular.

En estos experimentos puede observarse como después de los 10 min de la administración del producto marcado ya éste se encuentra en cantidades notables en la sangre, alcanzando su máxima concentración entre los 30 min y la hora. A las 4h la concentración del producto en sangre ha disminuido en más del 50%, no encontrándose trazas del mismo a partir de las 24h. (Fig. 1). Lo cual se corresponde con lo informado por K.Chool; 1987. (3).

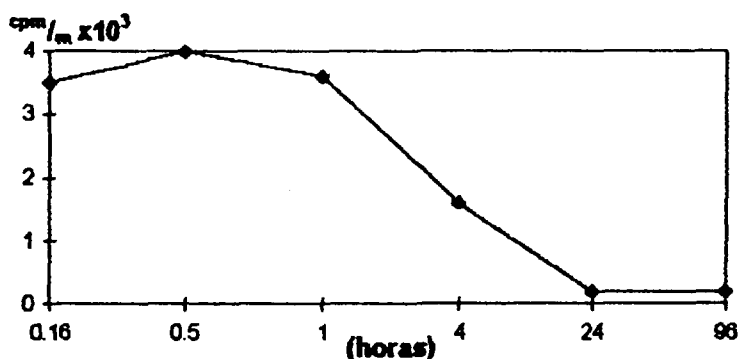


Fig. 1 Variación de la concentración de EGFr en sangre. Vía intramuscular.

La distribución del EGFr es amplia dentro de los órganos parenquimatosos; en todos los órganos la máxima concentración la encontramos a la hora de administrado el producto y va disminuyendo paulatinamente aunque en riñón se conservan altos niveles de radioactividad hasta las 96h de administrado el producto. (Tabla 1). Los órganos que más acumulan en el momento pico son: el riñón, hígado, bazo, pulmón e intestino, en todos ellos la disminución es brusca y muy parecida a la que observamos para la sangre.

órgano	tiempo transcurrido			
	1 hora	4 horas	24 horas	96 horas
corazón	1678+298	745+185	109+52	136+41
pulmón	3441+376	2813+409	187+33	212+38
hígado	3094+551	941+307	204+42	382+130
riñón	21339+4901	11463+405	6734+481	6294+495
I.D	2493+487	1816+784	188+22	231+94
I.G	1799+371	1045+557	111+97	336+209
bazo	2185+997	664+280	86+39	110+55

Tabla.1 Concentración de EGFr en órganos parenquimatosos. Tratamiento intramuscular (cpm/g).

En la piel la máxima concentración de radioactividad/cm coincide con el resto de los órganos disminuyendo rápidamente hacia las 4h. Existen diferencias entre las concentraciones de la piel dorsal y la piel ventral, siendo la primera la que

alcanza mayor nivel de radioactividad (Fig. 2).

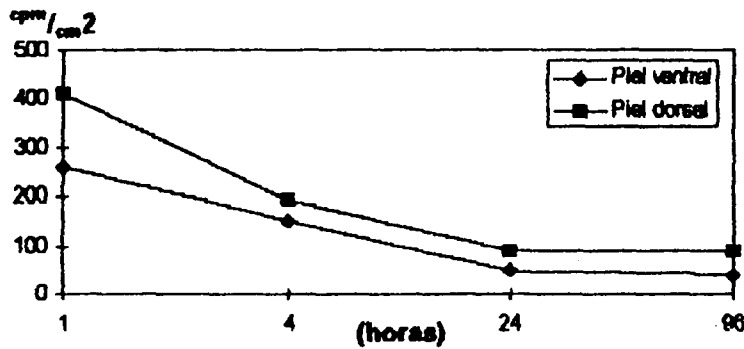


Fig. 2 Concentración de EGFhr en la piel de animales tratados. Administración intramuscular.

En cuanto al tejido muscular (Fig.3) se observa que en el músculo que recibió el producto hay un comportamiento parecido a la piel, la radioactividad en este caso también es baja comparada con los órganos parenquimatosos. El tejido muscular que recibió la inyección muestra una disminución paulatina que refleja el paso del producto al torrente sanguíneo.

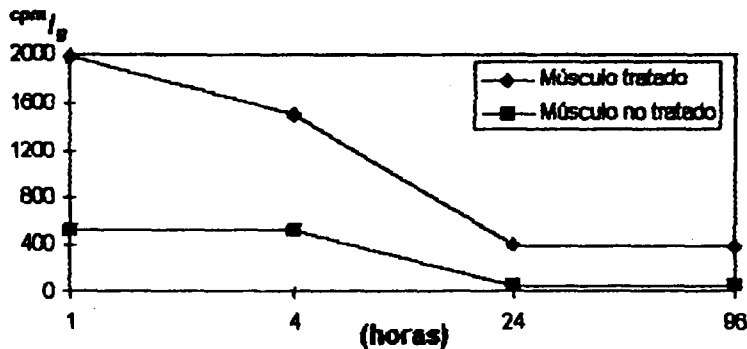


Fig. 3 Concentración de EGFhr en el músculo de animales tratados. Administración intramuscular.

La cinética de disminución del producto en sangre y en los diferentes órganos se describe por una ecuación polinómica de segundo grado de la forma  $mx^2+px+q$  variando los coeficientes en dependencia del órgano.

#### Administración Subcutánea.

La administración del producto en sangre administrado por vía subcutánea muestra una primera fase de absorción donde alcanza su máxima concentración a las 4 horas de la administración, y una segunda fase de eliminación. Este comportamiento se observa tanto en el plasma como en la fracción celular sanguínea aunque la radioactividad medida en células fue inferior como puede verse en la tabla 2.

Tiempo	plasma (cpm/mL)	pellet (cpm/mL)
0.16 horas	324+91	34+21
0.50 horas	632+62	158+12
1.00 hora	1232+263	769+210
2.00 horas	1621+196	1053+39
4.00 horas	2323+143	1922+216
8.00 horas	1652+272	456+104
12.00 horas	735+57	167+24
24.00 horas	180+34	33+7

Tabla 2. Distribución del EGFr en sangre. Administración subcutánea.

La eliminación de éste producto por la orina indica que la mayoría de la dosis administrada se elimina en las primeras 8h después de la administración(Fig.4).

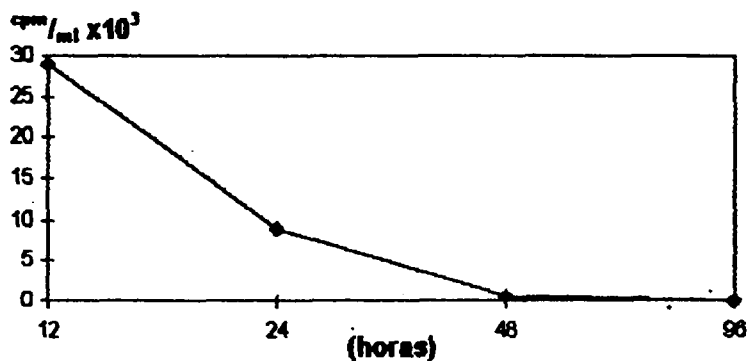


Fig. 4 Variación de la concentración de EGFr en la orina de ratas tratadas. Administración subcutánea.

La distribución en los distintos órganos parenquimatosos (tabla 3) muestra un comportamiento muy parecido al observado en sangre. En riñón los valores decrecen progresivamente mientras en el resto de los órganos se observa una estabilización de los valores hasta las 4h o un incremento de los mismos hacia igual periodo de tiempo, cayendo después bruscamente conteos.

órganos	Tiempo transcurrido					
	1 hora	2 horas	4 horas	8 horas	12 horas	24 horas
hígado	1114+122	1170+182	1289+397	194+20	56+10	7+2
pulmón	1423+188	1122+16	1305+152	460+201	154+33	53+50
corazón	658+163	610+78	987+97	285+46	123+34	103+18
riñón	22339+3257	10567+3346	7395+527	2213+573	1445+63	1087+63
bazo	897+44	734+85	1073+14	311+177	169+37	33+13
cerebro	201+70	117+57	207+73	78+14	122+11	15+10
testículos	164+134	347+24	542+98	191+5	68+8	9+5

Tabla 3. Concentración de EGFr en órganos parenquimatosos. Tratamiento subcutáneo (cpm/g).

En los intestinos vemos como el incremento de la radioactividad es mucho más visible en el intestino grueso. En

el intestino delgado los niveles son inferiores y además existe una tendencia a la disminución a partir de la primera hora que se hace más brusca a partir de las 4 horas (Fig. 5).

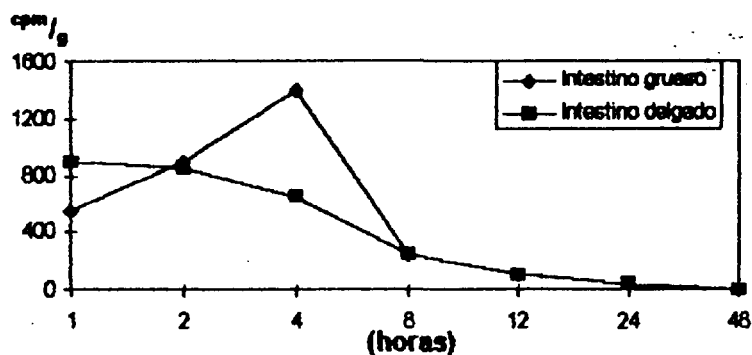


Fig. 5 Variación de la concentración de EGFhr en el intestino de las ratas. Administración subcutánea.

En la piel cercana al sitio de administración se observó un máximo de radioactividad a la hora de administrado el producto, con una caída brusca y progresiva hacia las 2 horas que al parecer refleja el paso de la sustancia a la sangre (Fig. 6).

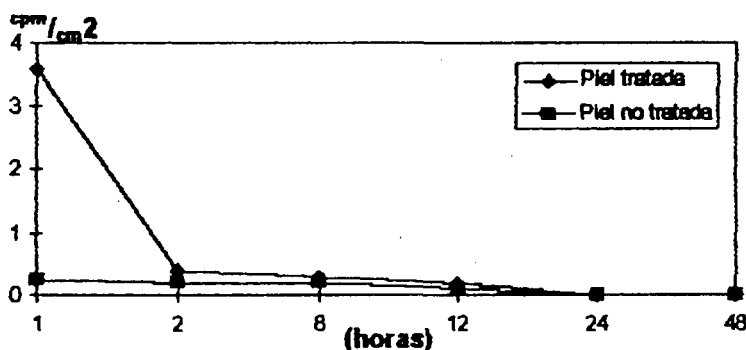


Fig. 6 Variación de la concentración de EGFhr en la piel de las ratas. Administración subcutánea.

#### Algunas consideraciones sobre la administración tópica del EGFhr.

La administración tópica se caracteriza por una permanencia de la radioactividad por más tiempo en la zona de aplicación.

Como se observa en la Tabla 4 después de 24 horas de administrado el producto se detectan altos niveles de radioactividad debido a la permanencia del EGFhr marcado en la zona de aplicación.

Órganos	Tiempo transcurrido			
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
hígado	309+176	106+29	138+23	110+31
piel sana	119+41	20+5	26+16	24+18
piel tratada	2929+881	318+83	215+103	244+213

Tabla 4. Concentración de EGFhr en algunos órganos de ratas



tratadas por vía tópica (cpm/g).

El paso del producto a la sangre y su distribución en el organismo se puede inferir por los niveles de radioactividad detectados en hígado, que como se sabe es un órgano blanco de este producto.

Como puede observarse en la Tabla 5 la excreción de este producto ocurre tanto por la orina como por las heces fecales, detectándose mayores niveles de radioactividad en orina aunque se mantienen más en las heces fecales a las 72 h de la aplicación.

Tiempo (días)	administración subcutánea		administración tópica	
	( <sup>cpm</sup> / <sub>ml</sub> orina)	( <sup>cpm</sup> / <sub>ml</sub> heces)	( <sup>cpm</sup> / <sub>ml</sub> orina)	( <sup>cpm</sup> / <sub>ml</sub> heces)
1	5285+2608	2612+944	4044+539	848+112
2	3531+2451	2448+96	3851+2590	1574+195
3	481+306	946+94	1884+625	3477+994

Tabla 5. Excreción de EGFhr en ratas.

### Análisis General de los Resultados.

Todo nuevo producto que influya sobre la proliferación y la diferenciación celular constituye un interés especial para la "Oncofarmacología" ya que el estudio de la etiopatogénesis del cáncer es inconcebible fuera de los mecanismos que controlan la proliferación y diferenciación celular.

Especialmente importante son aquellos productos que pueden relacionarse con el tejido epitelial ya que las afecciones neoplásicas del pulmón y colon dentro de los carcinomas son los que más inciden sobre la mortalidad por cáncer y se originan precisamente a partir del epitelio. El EGFhr reúne las dos características antes señaladas, por un lado esta relacionado con los mecanismos de proliferación y diferenciación celular y por otro tiene efectos sobre los tejidos epiteliales (4).

A esta molécula se le ha dado un papel importante en la promoción del crecimiento de carcinomas epidermoides in vivo (5). Además se le ha asignado el papel de promotor en la carcinogénesis química (6) y en la transformación celular provocada por virus y radiaciones (7).

Después de la obtención del EGFhr por la vía del DNA recombinante y de su caracterización química es imprescindible establecer y definir que camino seguir en la evaluación preclínica. Si tomamos en cuenta los criterios de la Comunidad Económica Europea (Abril, 1987), el EGFhr se incluye en el grupo de los productos recombinantes (hormonas, citoquinas y factores de crecimiento) que pueden ser usados en la clínica en cantidades superiores a sus concentraciones fisiológicas siendo necesarios para estos productos realizar estudios farmacocinéticos y de toxicidad en la reproducción y el

crecimiento entre otros.

El análisis de la biodistribución del EGFhr muestra la rapidez de su eliminación, esto podría ser una dificultad ya que su paso por la sangre y los tejidos parece ser muy corto para lograrse el efecto terapéutico deseado.

Los órganos que más acumulan el EGFhr son aquellos que posiblemente estén relacionados con su metabolismo o su eliminación. Se observan altos niveles de radioactividad en órganos como: pulmón, hígado e intestinos dada su naturaleza epitelial, corroborando la presencia de una alta densidad de receptores de EGFhr en los tejidos epiteliales y su relación con las afecciones neoplásicas y las características del hígado como uno de los principales centros de detoxificación del organismo.

Los altos niveles de radioactividad registrados en riñón indican la presencia de una alta densidad de receptores de EGFhr con una alta afinidad por el producto ya que se mantienen altos niveles de radioactividad aún después de 96 h de administrado el producto a diferencia del resto de los órganos parenquimatosos donde los niveles reportados en igual período de tiempo son de 20-30 veces inferiores. Estas altas concentraciones registradas en riñón se deben también a la velocidad del flujo sanguíneo por este órgano. No obstante estos altos registros se plantea que la capacidad de unión intrínseca del EGFhr es mayor en hígado que en riñón (3). En cuanto a los órganos blanco, nuestros datos coinciden con los del trabajo citado anteriormente.

Si analizamos los niveles de radioactividad medidos en la orina y las heces fecales, vías por las cuales se elimina el producto, observamos que la concentración del producto por ambas vías de eliminación se mantiene más en el tiempo en la administración tópica, por lo que podríamos afirmar que esta vía brinda más tiempo de circulación teniendo en cuenta además que el paso del producto al torrente sanguíneo es más lento ya que este se debe atravesar la epidermis donde se conoce existe un alto número de receptores. Este aspecto podría ser de utilidad para mantener cierta concentración aumentada del producto, como tanto se ha deseado obtener.

En nuestro estudio no se detectan altas concentraciones de EGFhr en testículos, las cuales aumentan hasta las 4 h de administrado el producto y disminuyen posteriormente de manera progresiva sin alcanzar jamás las concentraciones registradas para otros órganos. Se ha señalado que la disminución de EGFhr que acompaña a la sialectomía (8) conduce a una disminución de la cantidad de espermatozoides en el epidídimo y del contenido de DNA en los tejidos testiculares y que estas alteraciones se revierten cuando se administra EGFhr por vía exógena, a pesar de que en el testículo hay producción de EGF-

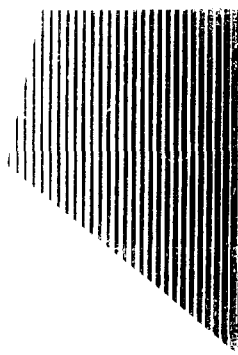
libre, postulándose el papel del EGFhr en la regulación de la fertilidad masculina. Las bajas concentraciones de EGFhr en testículo es otro índice de que es muy probable que el efecto de ésta molécula se deba más a los mecanismos que desencadena en la célula que a su concentración tisular en un momento dado.

### **Conclusiones.**

1. El aclaramiento plasmático es más lento cuando pasamos de la administración intramuscular a la subcutánea y más aún cuando pasamos de esta última a la tópica.
2. El EGFhr se encuentra en mayores concentraciones en hígado, iriñón e intestino de los animales tratados.
3. La eliminación del EGFhr se realiza por la orina y las heces fecales, aunque pueden haber otras vías.

### **Bibliografía.**

- 1-Pérez, R.; Lage, A. Los factores de crecimiento y sus relaciones con la transformación maligna. *Interf. y Biot.*:3, 179-206. 1986.
- 2-Gray, A.; Dull, T.J.; Ullrich, A. Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128000 molecular weight protein precursor. *Nature*:303, 722-725. 1983.
- 3-Chool, K. Kinetic analysis of in vivo receptor-dependent binding of human epidermal growth factor by rat tissues. *J. Of Pharm.Sci.*:7, 200-207. 1987.
- 4-Cherington, P.V.; Smith, B.L.; Pardee, A.B. Loos of epidermal growth factor requirement and malignant transformation. *Proc.natl. Acad. Sci. USA.*:76, 3937-3941. 1979.
- 5-Ozawa, S. Stimulation by EGF of the growth of EGF receptor-hiperproducing tumor cells in athymic mice. *Int.J.Cancer*:40, 706-710. 1987.
- 6-Turkington, R.W. Stimulation of mammary carcinoma cell proliferation by epithelial growth factor in vivo. *Cancer Res.*:47, 403-406. 1969.
- 7-Fisher, P.B. Epidermal Growth Factor, like tumor promoters, enhances viral and radiation-induced cell transformation. *Carcinogenesis*:2, 183-187. 1981.
- 8-Tstsumi, O. A physiological role or epidermal growth factor in male reproductive function. *Science*:233, 975-977. 1986.



**CIE**

**CENTRO DE INFORMACION  
DE LA ENERGIA NUCLEAR**

Calle 20 No. 4113 e/ 18A y 47, Playa

Telf.: 22-7527. Fax: 331188.

E mail: cien @ceniai cu