

informe técnico

Juan C. Cresto, Isidoro L. Dujovne, Diana B. C. de Sabbatini, Carlos F. Knopf, Guillermo O. A. Bruno, Perla I. Castellani, M. M. de Cornet y Salvador F. de Majo

marcación de hormonas proteicas con ^{131}I producido en la Comisión Nacional de Energía Atómica de la República Argentina^(1, 2)

Debido a las ventajas como trazador que el ^{125}I tiene en la marcación de hormonas proteicas, la importancia del ^{131}I en este aspecto ha disminuído en los últimos años. Sin embargo en nuestro país, el costo del ^{125}I y las frecuentes dificultades en la importación de este isótopo sugieren la conveniencia de incrementar el uso del ^{131}I de producción nacional.

La Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA) de la República Argentina produce ^{131}I a escala comercial en el reactor RA3 del Centro Atómico de Ezeiza desde 1973. Este yodo es utilizado en la marcación de Albúmina, Rosa de Bengala, Hipurán, Fibrinógeno, Suero Antirrábico, etc. (1) pero no ha sido exhaustivamente empleado para la marcación de hormonas proteicas. Por estas razones, empleando una metodología económica y fácilmente asequible, se estudió la marcación de Insulina, Glucagón, Hormona de Crecimiento Humano (HCH), Prolactina (PRL) y Hormona Luteinizante (LH), con ^{131}I de producción nacional.

Material y métodos

Insulina de cerdo fue cedida por el Laboratorio Hoechst; Glucagon (lote 258-V016-36) fue obtenido del laboratorio Lilly por gentileza de la Dra. Mary A. Root; HCH¹ (FS/634 A), PRL (V-L-S- 2) y LH (LER 960) fueron cedidos por el National Institute of Health de los Estados Unidos. El ^{131}I INA fue preparado por la CNEA de la República Argentina con una concentración de actividad entre 10,9 y 180 mCi/ml y provisto a través de un subsidio otorgado por la misma Institución. Almidón hidrolizado fabricado por Staley Argentina fue cedido gentilmente por el Ingeniero R. J. Rodríguez; di-

(1) Trabajo realizado en la Unidad de Endocrinología del Hospital de Pediatría "Dr. Pedro de Elizalde" en la Fundación Laboratorio de Investigaciones Pediátricas (FLIP), Montes de Oca 40 (cod. 1270), Buenos Aires, Argentina y en la Gerencia de Radiaciones y Radioisótopos de la Com. Nac. Energía Atómica, Bs. As., Argentina

Las separatas deben ser solicitadas al Dr. Juan C. Cresto en la dirección arriba indicada.

2) Recibida, agosto 14 de 1976, aprobada enero 22 de 1977.

ferentes calidades fueron estudiadas y por su capacidad resolutive fue elegida el tipo "Eclipse F 75".

Todas las drogas utilizadas fueron de grado analítico.

Técnica de marcación: Se utilizó el método de la cloramina T (2) con ligeras modificaciones. A una cantidad de tampón fosfato 0.25 M, pH 7.5 se le agregó 1 mCi de ^{131}I Na, la cantidad necesaria de hormona para obtener la actividad específica deseada y 10 μl (26 μg) de cloramina T (2.625 mg/ml). El volumen final fue de 50 μl y el tiempo de reacción de 15 segundos. La reacción fue detenida con el agregado de 20 μl (48 μg) de metabisulfito de sodio (2.4 mg/ml). Esta técnica general fue variada para algunas hormonas en particular. Para glucagon se utilizó 2.5 μl (6.5 μg) de cloramina T y 5 μl (12 μg) de metabisulfito de sodio y para prolactina se empleó 5 μl (13 μg) de cloramina T y 10 μl (24 μg) de metabisulfito de sodio.

El rendimiento de la reacción fue calculado empleando la cromatoelectroforesis (tampón veronal 0.1 M, pH 8.6) en papel Whatman 3 no cromatográfico (papel de filtro). Este papel requiere de 40 a 80 μl de BEC para una correcta separación entre el origen y la zona de albúmina (BEC-Buffer Especial de Corrida-compuesto de: tampón veronal 0.02 M, pH 8.6; albúmina humana 0.25 % y suero normal de cobayo 1/50) al que se adiciona una ínfima parte del material marcado.

Depuración: Efectuada la marcación, se le agregó 20 μl de suero humano normal colo-

reado con azul de bromofenol y la hormona marcada fue depurada empleando la electroforesis horizontal en gel de almidón preparativo, siguiendo la técnica de Smithies (3). Para el almidón utilizado, la concentración ideal hallada fue de 11.67 g/100 ml de tampón borato 0.018 M, pH 8.8. Luego de 16 horas de electroforesis a 4°C (tampón borato 0.3 M, pH 8.2) la posición del material radiactivo fue determinada por autorradiografía y la zona correspondiente a la hormona depurada fue cortada y eluida del gel por centrifugación (2100 G a 4°C, luego de ser homogeneizada en 2 ml de tampón veronal 0.02 M, pH 8.6 con albúmina humana 0.5 %). Las hormonas depuradas y eluidas fueron controladas inmunológicamente y redepuradas en Sephadex (adecuado al tipo de hormona) utilizando columnas de 60 ml, corriendo con tampón veronal 0.02 M, pH 8.6 adicionado de albúmina humana al 0.25 %. La electroforesis en gel de almidón preparativo fue también utilizada para calcular la riqueza isotópica del ^{131}I empleando el principio expuesto por Berson y Yalow (4).

Control inmunológico: El control inmunológico se efectuó con exceso de anticuerpo en tampón veronal 0.02 M, pH 8.6 con albúmina humana al 0.25 % y 1 % de suero normal de cobayo. El volumen final de reacción fue de 2 ml; la incubación se efectuó durante la noche a 4°C y la separación de las fracciones libre y unida al anticuerpo se realizó (para una concentración protelca de 0.1 ml de suero/tubo) con una suspensión de carbón-dextrano, en tampón veronal 0.02 M, pH 8.6,

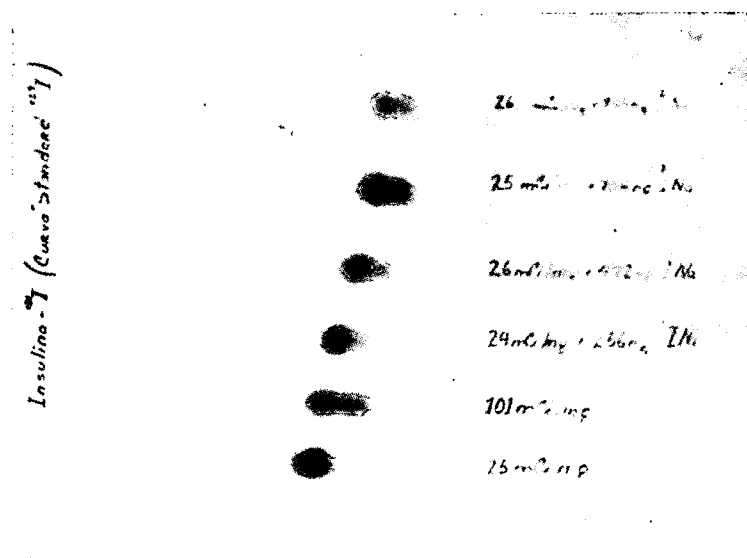


FIGURA 1. — Autorradiografía de una serie de marcaciones de insulina ^{131}I a las cuales se le adicionaron cantidades crecientes de ^{127}I .

Las marcaciones han sido corridas simultáneamente en electroforesis con gel de almidón. Las actividades específicas están indicadas al pie de la figura (25, 101, 24, 26, 25 y 26 mCi/mg) al igual que las cantidades de ^{127}I Na adicionadas (236, 472, 708 y 944 ng). Las actividades totales de cada corrida son iguales, lo que permitió idénticos tiempos de exposición en la autorradiografía y consecuentemente la comparación de las mismas. Se observa que los incrementos en la concentración de ^{127}I Na cambian la intensidad y distribución del número de manchas.

TABLA I

Valores teóricos de marcación de Mono-Iodo-Compuestos con ^{131}I

HORMONA	PESO MOLECULAR	^{131}I	
		(Riqueza isotópica: 100 %)	(Riqueza isotópica: 5 %)
Glucagon	~ 3500	4656 mCi/mg	232.8 mCi/mg
Insulina	~ 6000	2716 " "	135.8 " "
Prolactina	~ 20000	815 " "	40.7 " "
Hormona de Crecimiento humana	~ 21500	758 " "	37.9 " "
Hormona Luteinizante	~ 30000	543 " "	27.1 " "

adecuada a cada hormona. Tres concentraciones fueron usadas: A) carbón activado 100 mg/ml-dextrano 10 mg/ml; B) carbón activado 200 mg/ml-dextrano 10 mg/ml y C) carbón activado 300 mg/ml-dextrano 10 mg/ml. Para glucagon e insulina se efectuó la preparación con 0.05 ml y con 0.2 ml de A; para LH y HCH con 0.4 ml y 0.5 ml respectivamente de B y para PRL con 0.4 ml de C.

Resultados y discusión

La marcación de Insulina con ^{131}I adicionado con cantidades crecientes de ^{127}I permite calcular la actividad específica del ^{131}I con la electroforesis en gel de almidón (fig. 1). Este método tiene un error

próximo al 30 % que depende básicamente de la precisión en la densitometría de las manchas. La riqueza isotópica del ^{131}I estudiado (partida 14/X/75) es de 17,9 %, una de las más elevadas en la serie de marcaciones. No se efectuó densitometría de las autorradiografías en las otras marcaciones de Insulina, pero los cambios de densidad en las manchas son apreciables a simple vista (figura 2). En general se asumió una riqueza isotópica del 5 % como valor mínimo aceptable, calculándose sobre esta base los valores máximos de actividades específicas para mono-yodo-compuestos (tabla I) y las marcaciones hormonales se

TABLA II

Marcaciones efectuadas con ^{131}I producido en la Comisión de Energía Atómica

INSULINA	Actividad específica (mCi/mg)	44	91	116		
	Rendimiento (%)	86	93	93		
	Captación	81	78	62		
GLUCAGON	Actividad específica	35	46	53	149	173
	Rendimiento	48	51	96	86	88
	Captación	38	37	21	23	22
PROLACTINA	Actividad específica	11	21	62	65	73
	Rendimiento	4	8	15	13	15
	Captación	71	70	75	40	58
H. C. H.	Actividad específica	28	30	37	47	76
	Rendimiento	55	21	38	46	66
	Captación	72	60	68	50	67
L. H.	Actividad específica	80	94			
	Rendimiento	34	46			
	Captación	54	48			

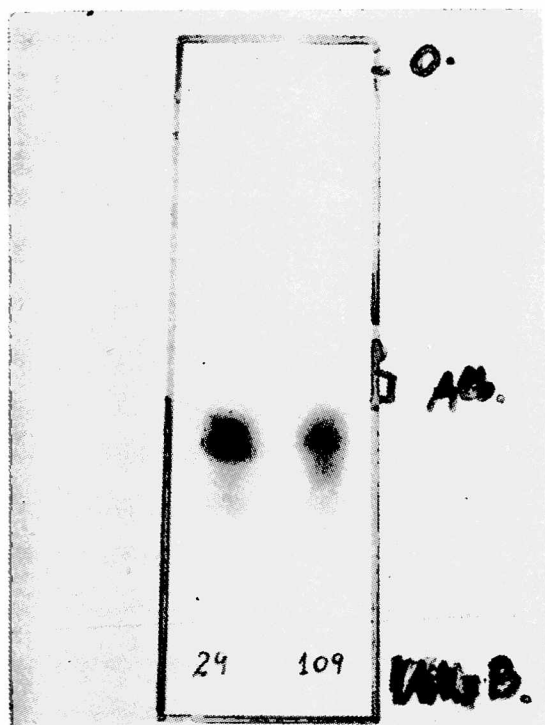


FIGURA 2. — Autorradiografía de dos marcas de insulina con ^{131}I corridas simultáneamente.

Las distintas actividades específicas (29 y 109 mCi/mg) se objetivan fácilmente en la distinta intensidad y distribución de las manchas.

efectuaron sobre la base de estos datos indicativos para evitar los riesgos de sobre-dosificación.

La purificación con gel de almidón permite seleccionar moléculas marcadas con movilidad electroforética similar a las hormonas no marcadas (5,6), facilitando la obtención de compuestos con buena reactividad inmunológica aún luego de marcaciones con actividades específicas mayores que las indicadas en la tabla I. Además permite separar compuestos monoyodados de Insulina (4) y Glucagon (7).

Las captaciones inmunológicas son variables (tabla II) en relación a las distintas hormonas estudiadas y a los antisueros disponibles. Es posible apreciar que algunas hormonas presentan un comportamiento inmunológico correcto en todas las marcaciones (Insulina, HCH y LH) que es dependiente más del comportamiento de la hormona durante la marcación que del yodo utilizado.

Los resultados obtenidos demuestran que el ^{131}I preparado en la CNEA es útil para la marcación de hormonas proteicas, pu-

diendo reemplazar al ^{125}I importado con las ventajas o inconvenientes propios del isótopo utilizado.

Agradecimientos:

Se agradece la colaboración prestada en la preparación de este trabajo a las Dras. María Inés Monzón y Marina Mora Urueña y a la Srta. Ana María Mastrángelo por la preparación del manuscrito.

Resumen

Se marcó Insulina, Glucagon, Hormona de Crecimiento Humano (HCH), Prolactina (PRL) y Hormona Luteinizante Humana (LH). Para ello se empleó la técnica de la cloramina T, utilizando ^{131}I producido en la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA) de la República Argentina. Las concentraciones de cloramina T y metabisulfito de sodio se adecuaron a las distintas hormonas y la depuración de las hormonas marcadas se efectuó por medio de la electroforesis en gel horizontal de almidón con posterior filtración en Sephadex. La técnica con el gel de almidón permitió medir la riqueza isotópica del ^{131}I preparado en la CNEA (17,9%). Las fluctuaciones en la riqueza isotópica nos permitieron asumir un valor mínimo aceptable para marcación del 5%. Los controles inmunológicos se efectuaron con exceso de anticuerpo utilizando la misma solución de trabajo y similar técnica de separación (carbón-dextrano) para todas las hormonas.

Los resultados obtenidos demuestran que el ^{131}I preparado en la CNEA es útil para la marcación de Insulina, Glucagon, HCH, PRL y LH.

Summary

Insulin, Glucagon, Human Growth Hormone (HGH), Prolactin (PRL) and Human Luteinizing Hormone (HLH) were labelled with ^{131}I produced by the Atomic Energy Commission (CNEA) of República Argentina. The chloramine T technique was used for labelling with minor modifications and it was fitted for the individual hormones. Labelled hormones were depurated by horizontal starch gel electrophoresis and secondary gel filtration with Sephadex. Specific activity of ^{131}I (CNEA) was measured by starch gel electrophoresis and 17,9 % was founded in one determination. 5 % was the minor isotopic concentration accepted for labelling. The in-

cubation of all the hormones were carry out in the same working solution and antibody excess was used for immunologic control. Dextran-charcoal technique was developed for bound and free hormone separation.

The results shown the ^{131}I produced by CNEA is usefull for Insulin, Glucagon, HGH, PRL and HLH labelling.

Bibliografía

1. Catálogo CNEA de productos marcados con ^{131}I . Febrero 1976.
2. HUNTER W. M. y GREENWOOD F. C.: Nature 194: 495, 1962.
3. SMITHIES O.: Biochem. J. 61: 629, 1955.
4. BERSON S. A. y YALOW R. S.: Science 152: 205, 1966.
5. YALOW R. S. y BERSON S. A.: Conference on problems connected with the preparation and use of labelled proteins in tracer studies, 1966, 199.
6. YALOW R. S. y BERSON S. A.: Excerpta Medica Series 238: 16, 1970.
7. POMPEO UBERTY M.; KNOPF, C. F., DUJOVNE, J. L.; BRUNO, O. A.; MITTA, A. E. A. y CRESTO, J. C. Rev. Biol. Med. Nucl. 8: 117, 1976.