

CNEA 387

Preparación de Acth ¹²⁵I ó ¹³¹I

Su utilización en radioinmunoensayo

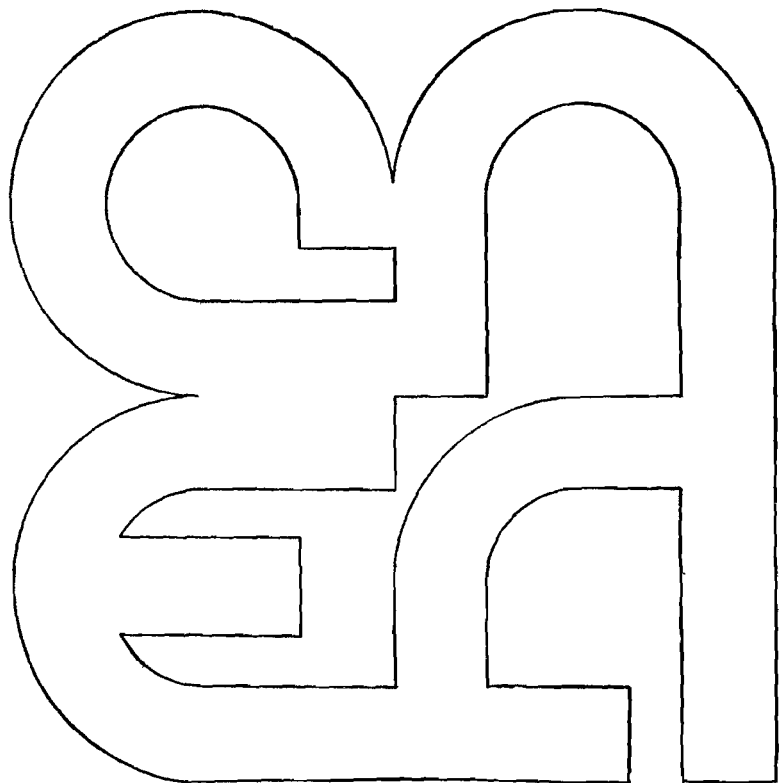
O. D. Bruno
E. L. Quihillalt

A. E. A. Mitta

Comisión
Nacional
de Energía
Atómica

República Argentina

Buenos Aires, 1975



INIS CLASSIFICATION AND KEYWORDS

B13

ACTH
IODINE 125
IODINE 131
CHEMICAL PREPARATION
LABELLING
RADIOIMMUNOASSAY

PREPARACION DE ACTH ¹²⁵I ó ¹³¹I

Su utilización en radioinmunoensayo*

O.D. Bruno**, E.L. Quihillalt y A.E.A. Mittra

RESUMEN

Se describe la preparación de hormona adrenocorticotrófica marcada con I-125 ó I-131. Se describen los métodos que demuestran el comportamiento inmunoreactivo de la hormona.

SUMMARY

Preparation of ACTH ¹²⁵I or ¹³¹I; its use in radioimmunoassay.

The preparation of adrenocorticotropin hormone (ACTH) labelled with ¹²⁵I and ¹³¹I is described.

Test for the determination of the immunoreactive behaviour of the hormone are accomplished.

INTRODUCCION

La preparación de adrenocorticotrofina (ACTH) marcada con ¹³¹I ó ¹²⁵I apta para su uso en radioinmunoensayo del ACTH plasmático debe reunir ciertas condiciones que dependen en parte del isótopo empleado. Así, si se utiliza el ¹³¹I, debe obtenerse una actividad específica (AE) elevada dado el cor-

* Este trabajo se realizó con apoyo del Contrato 814/RB del O.I.E.A.

** Instituto de Investigaciones Médicas, Universidad de Buenos Aires. Miembro de la Carrera de Investigador Científico (CONICET).

to período de semidesintegración (8,04d) de este isótopo; esto es necesario para asegurar condiciones de sensibilidad del dosaje adecuados o sea: pequeña concentración del trazador en el medio pero suficiente número de cuentas que facilite las operaciones de conteo al fin del período de incubación. Si el isótopo utilizado es el ^{125}I la situación difiere en cuanto a que la AE podrá ser más baja dado su período de semidesintegración más prolongado (60 d). En cualquiera de los dos casos (^{131}I ó ^{125}I), otras condiciones indispensables para la buena calidad de la preparación son la de obtener un daño o degradación bajo y un alto nivel de purificación.

Con la finalidad de obtener un ACTH marcado presentando las características antes citadas, se utilizó la técnica de Hunter y Greenwood (1) con algunas modificaciones: esta técnica ha sido ya empleada para la marcación de otras hormonas proteicas tales como insulina (2) HCH (3) TSH (4) HCG (5) LH (6) PTH (7), en la División Moléculas Marcadas de la Gerencia de Investigaciones de la Comisión Nacional de Energía Atómica.

PARTE EXPERIMENTAL

Todas las operaciones son realizadas empleando material de vidrio siliconado y/o de plástico llevándolas a cabo, en lo posible, a 4°C a fin de reducir las pérdidas por adsorción o degradación del ACTH (8).

MARCACION

En un pequeño tubo de vidrio siliconado conteniendo 2 mCi de $^{131}\text{I}\text{Na}$ (Saclay, Francia) o 0,7-1,0 mCi de $^{125}\text{I}\text{Na}$ (New England Nuclear, USA) disueltos en 25 μl de solución de fosfatos 0,5 M, pH 7,6, se agregan sucesivamente y con gran rapidez (se emplea una jeringa de polietileno de 1 ml a la que se adapta un fino cateter del mismo material): 37,5 μg de Cloramina T (en 25 μl de solución de fosfatos 0,5 M, pH 7,6); 10-15 μl de solución de fosfatos 0,5 M, pH 7,6) 2 μg de h-1-39 ACTH (gentilmente proporcionada por el Dr. Gy Fekete, Medimpex, Budapest, Hungría) de síntesis.

Luego de una rápida mezcla, se transfiere el producto de reacción a un tubo conteniendo 125 μg (en 25 μl de solución de fosfatos 0,5 M, pH 7,6) de metabisulfito de sodio a fin de detener la reacción.

PURIFICACION

Se comienza inmediatamente después de la marcación diluyendo el producto en 1 ml de plasma humano normal fresco a lo que se agrega 7 mg de QUSO - G 32 (gránulos de sílice microprecipitados; Philadelphia Quartz Co., USA); luego de una breve homogeneización sobre Vortex, se centrifuga 10 minutos a 3.000 rpm y se descarta el sobrenadante. El precipitado es lavado con 2 ml de agua destilada volviendo a homogeneizar, centrifugar y descartar el sobrenadante y repitiendo estas operaciones dos veces. Finalmente el ACTH marcado es extraído del QUSO con 2 ml de acetona al 40% en ácido acético al 1% y diluido en 4 ml de solución de veronal sódico 0,02M, pH 8,4, albúmina humana (CNTS, Francia) al 0,3%.

Control de la marcación y purificación

Se realiza mediante corrida cromatoelectroforética de alícuotas de los productos de marcación y purificación (diluídas en plasma humano con azul bromofenol; proporción 1:5), respectivamente, sobre papel Whatman 3MM durante 90 minutos a temperatura ambiente y con una diferencia de potencial de 500 V. Luego de secadas, las tiras son analizadas en un radiocromatógrafo Packard y la importancia relativa de los picos cuantificada por simple recorte de las mismas y pesada en una balanza de precisión.

Control de la inmunoreactividad

Fue llevada a cabo mediante incubación del ACTH marcado en las condiciones habituales de una curva de referencia para dosaje de ACTH plasmático. Esta curva se establece realizando las siguientes mezclas: a) 0,5 ml de plasma humano perteneciente a un sujeto previamente tratado con glucocorticoides (carente por lo tanto de ACTH endógeno conteniendo cantidades progresivamente crecientes de ACTH humano de extracción (gentilmente proporcionado por el Dr. C.H. Li, Universidad de California, USA): 0,4, 10, 20, 40, 60, 100, 200 y 400 pg/tubo; b) 2 ml de una mezcla (preparada inmediatamente antes de su uso) conteniendo ACTH-¹³¹I ó ACTH-¹²⁵I y antisuero anti-ACTH (Dr. R. Depieds, Marsella, Francia) en solución reguladora de veronal sódico 0,02M, pH 8,4, conteniendo mercaptoetanol 0,2%, trasylol (R) 1.000 U/ml y albúmina humana 0,3%. La mezcla es distribuida con una jeringa Cornwall de pipeteo continuo y está preparada de manera a obtener una dilución final del antisuero de 1:450.000 y una concentración final de ACTH marcado de 10 pg/tubo (= 4-5.000 cpm/tubo). El volumen final de incubación es de 2,5 ml.

Para el dosaje de ACTH en muestras plasmáticas se realizan operaciones análogas salvo que el ACTH de referencia disuelto en plasma carente de ACTH

endógeno es reemplazado por 0,5 ml del plasma desconocido a determinar. Cada muestra es analizada por duplicado. La degradación del trazador durante la incubación es determinada para la curva de referencia y para cada muestra a dosar por incubación de un tubo control conteniendo todos los reactivos enunciados salvo el antisuero y el ACTH frío.

Luego de incubación a 4°C durante 5-7 días se procede a la separación de la fracción de ACTH libre (L) de aquella unida al antisuero (B) mediante una pastilla de 50 mg de talco (Louis Dreyfus & Rerschtel, París, Francia). Después de centrifugación a 2.000 rpm. durante 30 minutos a 4°C, se separa el precipitado (fracción L) del sobrenadante (fracción U) por simple decantación y ambos son contados durante 10 minutos en un contador Packard. El valor porcentual de (U) con respecto al total (T) es corregido por substracción del por ciento de trazador degradado (no fijado en el talco en ausencia de antisuero). La curva de referencia es trazada y los valores observados para los plasmas a dosar son transportados a la misma deduciéndose así la concentración de ACTH en esos plasmas.

RESULTADOS

Marcación y purificación

La figura 1 muestra un ejemplo del control de marcación y purificación realizado por cromatoelectroforesis. Pueden claramente individualizarse tres picos correspondiendo respectivamente al ACTH radioiodado que permanece en el lugar de la siembra, a la fracción de ACTH degradado que migra al centro de la tira junto a las proteínas plasmáticas y, finalmente, el yoduro radioactivo no fijado que migra más allá del centro de la tira. En el gráfico inferior se observa el pico correspondiente al ACTH ^{131}I , luego de purificar la hormona utilizando QUSO-632.

La tabla 1 sintetiza los resultados obtenidos utilizando ^{131}I . Debe señalarse que la AE fue superior a 600 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ en 9 de las 11 marcaciones y que en 7 de las mismas el daño de marcación se consideró de 0% siendo en las 4 restantes de 9, 11, 15 y 16% respectivamente. Por purificación pudo eliminarse totalmente el daño e yoduros.

En la tabla 2 se observan los resultados correspondientes a las marcaciones realizadas con ^{125}I . Sólo en dos de las seis marcaciones se reveló la existencia de daño (7 y 9%). Como en el caso anterior, la purificación fue satisfactoria.

Es de señalar que sobre el total de 17 marcaciones efectuadas utilizando los dos isótopos, no se observó ningún tipo de correlación entre la AE obtenida y el porcentaje de daño de marcación.

Control de la inmunoreactividad

En la figura 2 se representan los valores obtenidos para la curva de referencia. Puede verse que en ausencia de ACTH de referencia, aproximadamente 30 % del trazador es ligado por el antisuero anti- ACTH y que el agregado de concentraciones progresivamente creciente de ACTH Li induce una caída de U, esta caída es más acentuada para los primeros puntos de la curva lo que se traduce en una pendiente inicial pronunciada que otorga gran sensibilidad al sistema, pudiendo leerse valores de ACTH inferiores a 10pg. El valor de U para el punto O de la curva es de $28,5 \pm 0,41$ (media \pm ES); el valor correspondiente al control de degradación del trazador durante la incubación es de $15,4 \pm 1,2$ (media \pm ES). No se evidenció ninguna diferencia en el comportamiento inmunoreactivo de los dos tipos de ACTH marcado que fueron utilizados.

Resultados obtenidos en el dosaje de muestras plasmáticas

La tabla 3 muestra los resultados preliminares obtenidos en un grupo de sujetos normales y en pacientes con diversos trastornos del eje hipotálamo-hipófiso- adrenal, mediante determinación de ACTH sobre una muestra de plasma obtenida entre 8 y 9 horas. (las muestras fueron obtenidas en tubos de vidrio siliconado mantenidos en hielo, conteniendo EDTA 1,0 mg/ml de sangre, centrifugadas a 4° C, separadas y congeladas de inmediato a -20° C). Tanto los valores en sujetos normales como los obtenidos en pacientes afectados de síndrome de Cushing de diferente etiología, post- suprarrenalectomía o en la enfermedad de Addison, concuerdan con los publicados por otros autores (10, 11).

La figura 3 evidencia el efecto de una situación de "stress" (cirugía) sobre la concentración plasmática de ACTH en dos individuos normales del punto de vista endócrino; los valores basales, normales en el pre- operatorio inmediato (58 y 32 pg/ml, se encontraron claramente elevados a 480 y 302 pg/ml respectivamente en el post- operatorio inmediato para retornar a cifras basales normales (23 y 13 pg/ml) 24 horas después de la intervención.

La figura 4 representa el efecto de un estímulo bien conocido, la hipoglucemia inducida por insulina, sobre las concentraciones plasmáticas de glucosa, cortisol y ACTH: siguiendo al medir glucémico (23 mg/100 ml a los 30 minutos) se observa una elevación de ACTH plasmático de 53 pg/ml (basal) a 224 pg/ml (45 minutos), que es seguida por un aumento de la cortisolemia plasmática a 8,0 μ g/100 ml (basal) a 17,0 μ g/100 ul (90 minutos).

Estos resultados evidencian la especificidad del dosaje al demostrar las variaciones esperadas en la concentración de ACTU en diferentes situaciones fisiológicas o fisiopatológicas.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se empleó la técnica de Hunter y Greenwood para la marcación de ACTH con ^{131}I e ^{125}I obteniéndose resultados altamente satisfactorios en lo referente a actividad específica, bajo porcentaje de degradación y alto grado de pureza de la molécula marcada. El control inmunoreactivo demostró que la molécula así marcada conserva su capacidad de ser ligada por un anti-suero específico. Finalmente, los resultados obtenidos en la determinación de muestras basales en sujetos normales o con trastornos del eje hipotálamo-hipofiso-adrenal así como en estudios dinámicos en situación de "stress", demuestran la especificidad del sistema de dosaje. Las preparaciones de ACTH ^{125}I ó ^{131}I según la técnica descrita son perfectamente aptas para su uso en un sistema de dosaje radioinmunológico de adrenocorticotrofina plasmática.

TABLA 1
A.C.T.H. ^{131}I (n = 11)

A.E.	= 487-860 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$
DAÑO	= 0-16 %
PURIFICACION	= No se observa daño ni ioduro

TABLA 2
A.C.T.H. ^{125}I (n = 6)

A.E.	= 335-471 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$
DAÑO	= 0-9 %
PURIFICACION	= No se observa daño ni ioduro

TABLA 3
Resultados preliminares obtenidos

SUJETOS NORMALES:	0-160 pg/ml (n = 20)
S. DE CUSHING POR ADENOMA:	18 pg/ml (n = 1)
S. DE CUSHING POR HIPERPLASIA:	270-580 pg/ml (n = 5)
SUPRARRENALECTOMIA TOTAL POR S. DE CUSHING:	1500 pg/ml (n = 1)
ENFERMEDAD DE ADDISON:	2824 pg/ml (n = 1)

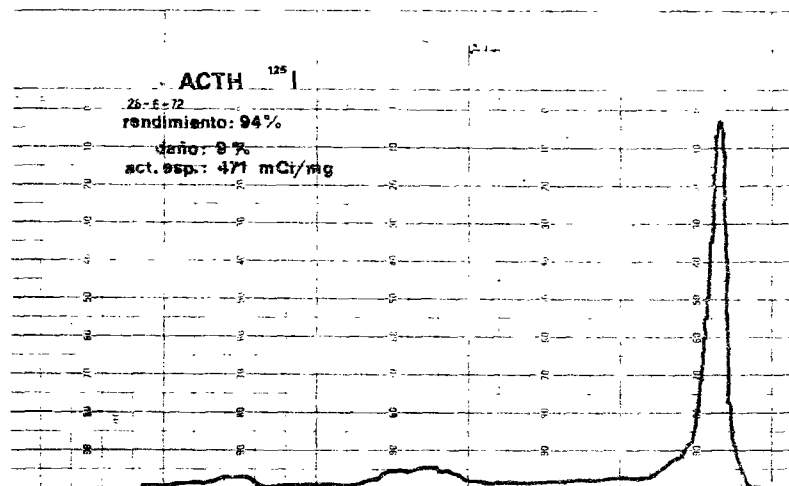


FIGURA 1 a

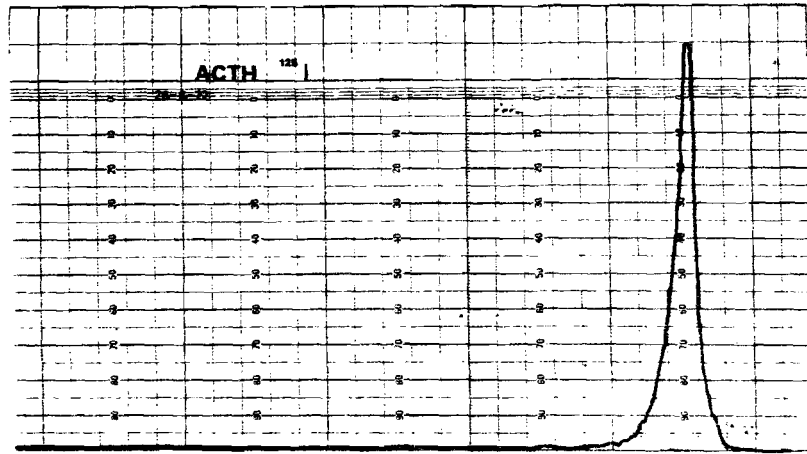


FIGURA 1 b

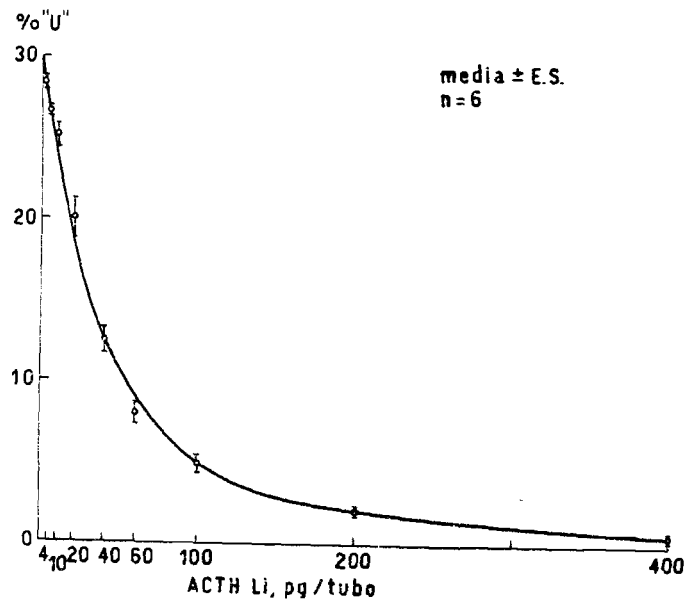


FIGURA 2
Curva de referencia

STRESS QUIRURGICO (colecistectomía)

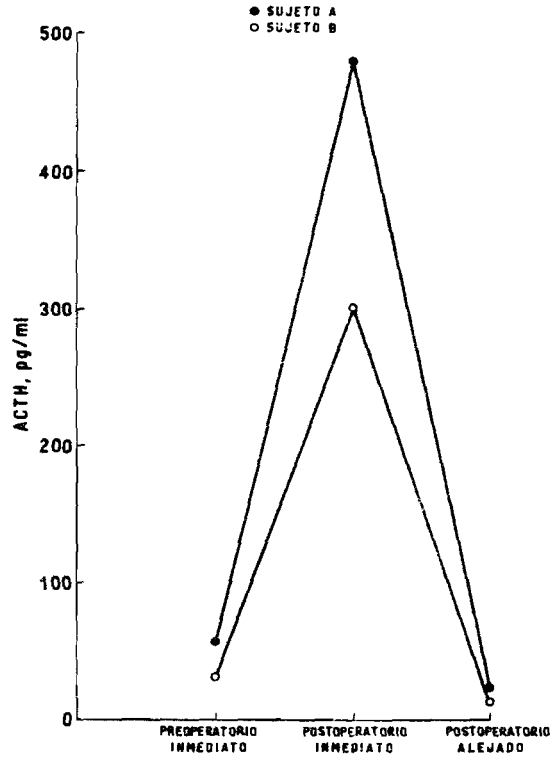


FIGURA 3

Efecto del "stress" quirúrgico sobre la concentración plasmática de ACTH.

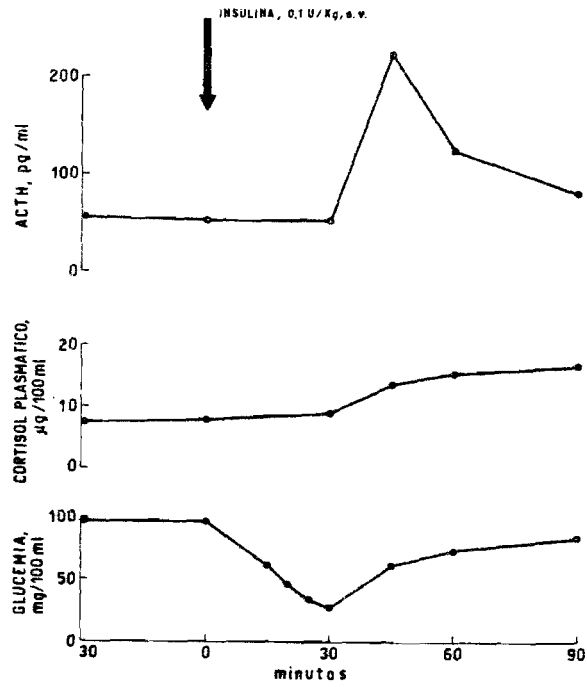


FIGURA 4

Efecto de la hipoglucemia insulínica sobre la concentración plasmática de ACTH.

BIBLIOGRAFIA

- 1) W.M. HUNTER y F.C. GREENWOOD. Nature 194 (1962) p. 495.
- 2) H. ALBANI, J.C. CRESTO, G.N. de NUÑEZ y A.E.A. MITTA. Presentado al III Congreso de ALASBIMN (1970).
- 3) J.C. CRESTO, H. ALBANI, O. DEGROSSI y A.E.A. MITTA. Premio E.J. Varela de la Sociedad Argentina de Biología y Medicina Nuclear (1970/1).
- 4) M.F. de BARMACH, G.N. de NUÑEZ, N. ALTSCHULER y A.E.A. MITTA Informe Nº 346 CNEA, 1973.
- 5) A. TEMPONE, L.E. QUIHILLALT, L. ARRIGHI y A.E.A. MITTA, Informe Nº 317 CNEA, 1972.
- 6) L.H. DUJOVNE, H. ALBANI, G.N. de NUÑEZ, O. DEGROSSI y A.E.A. MITTA a publicar, 1972.
- 7) R.O. ARATA, G.N. de NUÑEZ, C.A. MAUTALEN y A.E.A. MITTA, Informe Nº 332, CNEA, 1972.
- 8) J. LANDON Th, LIVANOV y F.C. GREENWOOD Biochem. J. 105 (1967) p. 1075.
- 9) H.D. PURVES y N.E. STRETT J. Endocr. 41 (1969) p. 491.
- 10) S.A. BERSON y R.S. YALOW, J. Clin. Invest. 47 (1963) p. 2725.
- 11) Ph VAGUE, Ch. OLIVER, Ph. JAQUET y J. VAGUE. Rev. Eur. et. Clin. Biol. 16 (1971) p. 485.