

REPUBLICA ARGENTINA
COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA



PREPARACION DE BILIRRUBINA I¹³¹

por

Leopoldo L. Camin y Aldo E. A. Mitta



BUENOS AIRES

1970



COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA
DEPENDIENTE DE LA PRESIDENCIA DE LA NACION

PREPARACION DE BILIRRUBINA I¹³¹

Leopoldo L. Camin* y Aldo E. A. Mitta*

RESUMEN

Se describe un método rápido y sencillo de preparación y purificación de bilirrubina I¹³¹.

Como agente oxidante para liberar yodo 131 se utiliza cloramina T y se recurre a la cromatografía en papel para separar y purificar el producto. El rendimiento radioquímico alcanza el 60-70%.

SUMMARY

A fast and simple method for the preparation and purification of bilirubin I¹³¹ is described.

Chloramin T is used for iodine liberation and the product is separated and purified by paper chromatography.

A radiochemical yield of about 60-70% is achieved.

* Comisión Nacional de Energía Atómica

INTRODUCCION

En 1961 Ostrow y colaboradores (1) obtuvieron por biosíntesis bilirrubina marcada con C-14 y Grodsky y colaboradores (2), en 1962, con tritio. En ese mismo año, Greenfield (3) comenzó a utilizar, como agente para el estudio de la función hepática, bilirrubina marcada con yodo 131 en lugar del Rosa de Bengala I-131. La bilirrubina presenta la ventaja de no ser extraña al organismo.

En 1963, Anghileri (4) publicó un método de marcación de bilirrubina I-131 con un rendimiento radiactivo del orden del 7-16%.

El método estudiado y experimentado por nosotros consiste en efectuar la marcación por adición de yodo radiactivo, obtenido por acción de cloramina T (5) sobre yoduro de sodio I-131 y purificar el producto utilizando la cromatografía sobre papel, con lo cual se logra bilirrubina I-131 con un rendimiento radioquímico del 60-70%.

PARTE EXPERIMENTAL

Método de Marcación

En un tubo de centrífuga con tapón esmerilado se colocan 1-10 mCi de yoduro de sodio I-131, libre de portador y de reductor (C.E.N., Saclay, Francia) y en su volumen de 50-100 λ , 2 ml de cloroformo y 50 λ de solución de cloramina T (1mg/ml) recién preparada con buffer fosfato (pH 7,2).

El yodo 131 liberado pasa al cloroformo y se realizan tres extracciones más, con 2 ml de cloroformo cada vez. Esta operación debe efectuarse rápidamente y bajo campana con buen tiraje.

A los extractos clorofórmicos reunidos, que representan 80-90% de la actividad inicial, se les añade 1 ml de solución de bilirrubina en cloroformo (1 mg/ml). Se desaloja el aire con nitrógeno y se deja en la oscuridad durante 45-90 minutos; luego se destapa y se detiene la reacción con 100 λ de tiosulfato de sodio M/10.

El cloroformo utilizado se destila previamente sobre óxido de plata para eliminar la presencia de agentes reductores.

Separación cromatográfica

El cloroformo es evaporado a 40° C dirigiendo una corriente de nitrógeno sobre la superficie y cuando queda aproximadamente un mililitro, se siembra en línea sobre un papel Whatman 3MM, secando con corriente de nitrógeno.

A una cuba cromatográfica se le desaloja el aire con nitrógeno y se la equilibra con el solvente de desarrollo: cloroformo saturado con ácido Clorhídrico 4N.

El cromatograma corre durante 45 en la oscuridad; se seca con nitrógeno, se corta 5 cm debajo del frente y se vuelve a correr en el mismo solvente durante otros 45 minutos; se seca nuevamente con nitrógeno, se corta la fracción de papel que contiene la bilirrubina y se la eluye con cloroformo siempre en atmósfera de nitrógeno y en la oscuridad. El eluido se lleva a sequedad con corriente de nitrógeno, obteniéndose bilirrubina I-131 con un rendimiento radioquímico del 60-70%.

Controles

La actividad se mide en una cámara de ionización Tecniatomic TCS 100. La pureza radioquímica se determina por cromatografía en papel Whatman Nº 1, con los siguientes sistemas:

- 1.- Cloroformo saturado con CIN 4N.
Rf bilirrubina: 0,9-1,0; yoduro y biliverdina: 0.0
Tiempo de desarrollo: 40 minutos
- 2.- Acetato de amonio 0,2N, metanol (2,5: 1), pH 6,1 Rf bilirrubina y biliverdina: 0,0; yoduros: 0,7
Tiempo de desarrollo: 1 hora

La valoración radiométrica de los cromatogramas se realiza en un Radioscanner Packard modelo 7200.

Reacción de Erlich: positiva.

CONCLUSIONES

La bilirrubina es fácil y rápidamente marcada con radioyodo, mejorando el rendimiento al aumentar la relación molar bilirrubina/yodo. Al efecto de acción de masa debe sumársele la menor incidencia del yodo como oxidante.

Por su inestabilidad ante el oxígeno atmosférico y la luz, todas las operaciones deben ser realizadas protegiéndola de esos factores.

La bilirrubina marcada se comporta física, química y biológicamente como la bilirrubina no conjugada, permaneciendo los átomos de yodo unidos

firmemente a la molécula, tal como lo confirma el trabajo de Lozzio y Párriza Campá (6) sobre el efecto inhibitorio de la alil sopropropilacetilcarbamilamida y la alilisopropropilacetamida sobre la glucoronil transferasa hepática en ratas, no habiéndose detectado captación de yodo en tiroides durante el tiempo de duración de la prueba. Esta, y otra experiencia (7), nos permite afirmar que la bilirrubina I-131 puede competir con bilirrubina tritiada o marcada con C-14, debido a la facilidad de marcación, a la alta actividad específica con que es posible marcarla y a la mayor disponibilidad de equipos detectores de I-131 con que cuentan normalmente los servicios de Medicina Nuclear.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- OSTROW, J. D., HAMMAKER, J. R. SCHIMID, R. J. Clin. Inv. 40, 1942 (1961).-
- 2.- GRODSKY, G. M. y col. Am. J. Physiol. 203, 3 (1962).-
- 3.- Greenfield, G. B. Radiology 79 (2) 318 (1962).-
- 4.- ANGHILERI, L. J. Int. J. App. Rad. & Isot. 14, 630 (1963).-
- 5.- HUNTER, W. M. y GRENEWOOD, F. C. Nature 194 (4827) 495 (1962).-
- 6.- LOZZIO, B. y PAHISSA CAMPA, J. (Comunicación privada).-
- 7.- LOZZIO, B. B. y PAHISSA CAMPA, J. (Comunicación privada).-

