

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA
Y
ORIENTACION FISICA - DEPARTAMENTO DE FISICOMATEMATICA

ANGIOTENSINA II MARCADA CON RADIOIODO:
PREPARACION, PROPIEDADES FISICOQUIMICAS
Y COMPORTAMIENTO BIOLOGICO

HORACIO KURCBART

Tesis Doctoral

Buenos Aires

1972

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA

DEPARTAMENTO DE FISICOMATEMATICAS ORIENTACION FISICA

ANGIOTENSINA II MARCADA CON RADIOIODO:

PREPARACION, PROPIEDADES FISICOQUIMICAS Y COMPORTAMIENTO BIOLOGICO

TESIS

AUTOR: HORACIO KURCBART

DIRECTOR DE TESIS: PROFESOR DR. RICARDO A. CARO

1 9 7 2

A mis padres

A mi esposa

AGRADECIMIENTOS

A la Comisión Nacional de Energía Atómica, al Organismo Internacional de Energía Atómica y al Gobierno Italiano que posibilitaron mi perfeccionamiento en los laboratorios de la Società Ricerche Impianti Nucleari de Italia.

Al Dr. Renato Radicella por haberme dado la oportunidad de perfeccionarme en este tema y por su constante apoyo humano y científico.

Al Dr. Ricardo Alfredo Caro por su asesoramiento y sus inapreciables consejos durante el transcurso de este trabajo.

Al Dr. Umberto Rosa y sus colaboradores de la SORIN, Salsuggia, Italia, que contribuyeron a mi formación en el criterio metodológico de la preparación y evaluación de polipéptidos marcados con radioiodo.

Al personal de la Orientación Física del Departamento de Fisicomatemática de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, y especialmente a la bioquímica Silvia Quiroga y las señoritas Patricia Caro, Matilde Albo y Celia Rivas.

mi sincero reconocimiento.

INDICE

INTRODUCCION GENERAL	1
----------------------	---

CAPITULO I

VALORACION DE IODO EN PREPARADOS DE I-131	10
I-1.- Introduccion	10
I-2.- Parte Experimental	17
I-2-1.- Material	17
I-2-1-1.- Aparatos	17
I-2-1-2.- Reactivos	18
I-2-1-3.- Precauciones	19
I-2-2.- Método	20
I-2-2-1.- Técnica	20
I-2-2-2.- Recomendaciones	21
I-2-3.- Temperatura de Reacción	21
I-2-4.- Tiempo de Reacción	22
I-3.- Resultados	26
I-3-1.- Curva de Calibración	26
I-3-2.- Valoración de Iodo en muestras de ^{131}I "sin portador" de distinto origen	30
I-4.- Discusión	31

CAPITULO II

MARCACION POR EL METODO DE LA CLORAMINA-T	34
II-1.- Introduccion	34
II-2.- Parte Experimental	39
II-2-1.-Material	39
II-2-1-1.- Aparatos	39
II-2-1-2.- Reactivos	40

II-2-1-3.- Precauciones	42
II-2-2.-Método	43
II-2-2-1.- Valoración de Iodo en las Soluciones de Na ¹³¹ I	43
II-2-2-2.- Marcación	43
II-2-2-3.- Determinación del rendimiento de reacción	46
II-2-2-4.- Determinación de residuos tirosínicos mono y diiodados	48
II-3.- Resultados	50
II-3-1.-Marcación de la angiotensina II	50
II-3-2.-Marcación de tirotrofina bovina	53
II-3-3.-Determinación de la proporción de moléculas monoiiodadas y diiodadas	56
II-3-4.-Influencia del envejecimiento de los preparados de ¹³¹ I	61
II-4.- Discusión	64

CAPITULO III

MARCAÇION POR EL METODO DEL MONOCLORURO DE IODO	71
III-1.- Introducción	71
III-2.- Parte Experimental	73
III-2-1.- Material	75
III-2-1-1.- Aparatos	75
III-2-1-2.- Reactivos	75
III-2-2.- Método	77
III-2-2-1.- Preparación de monocloruro de iodo	77
III-2-2-2.- Técnica de marcación	78

III-2-2-3.- Determinación de residuos tirosí- nicos mono y diiodados (MIT y DIT)	79
III-3.- Resultados	79
III-3-1.- Influencia del pH sobre la velocidad de formación de mono y diiodoangiotensina	79
III-4.- Discusión	83

CAPITULO IV

COMPORTAMIENTO BIOLOGICO DE LA IODOANGIOTENSINA II Su preparación por el método electrolítico	87
IV-1.- Introducción	87
IV-2.- Parte Experimental	94
IV-2-1.- Material	96
IV-2-1-1.- Aparatos	96
IV-2-1-2.- Reactivos	97
IV-2-2.- Método	99
IV-2-2-1.- Preparación de angiotensina II mar- cada con ^{125}I	99
IV-2-2-2.- Determinación de residuos tirosíni- cos mono y diiodados (MIT y DIT)	100
IV-2-2-3.- Determinación de la actividad bio- lógica de la angiotensina iodada	101
IV-3.- Resultados	104
IV-3-1.- Iodación de angiotensina II	104
IV-3-2.- Efecto de la intensidad de corriente electro- lítica sobre la marcación de angiotensina II	106
IV-3-3.- Efecto de la intensidad de corriente electro- lítica sobre la velocidad de formación de mono y diiodoangiotensina	106
IV-3-4.- Actividad hormonal de la mono y diiodoangioten- sina II	112

IV-3-5.- Filtración por gel de angiotensina iodada	114
IV-4.- Discusión	116
CONCLUSIONES	123
BIBLIOGRAFIA	128

INTRODUCCION GENERAL

El uso de isótopos radiactivos, ha permitido dilucidar en forma experimental una gran cantidad de problemas bioquímicos, tanto en sus aspectos cualitativos como cuantitativos. Es así como en los últimos años, fue cada vez mayor la aparición de material bibliográfico que se refiere al esclarecimiento de problemas químicos, fisicoquímicos y fisiológicos valiéndose, en forma preponderante, de técnicas experimentales en las cuales, los trazadores radiactivos juegan un papel de fundamental importancia.

La presencia de un isótopo radiactivo, como parte integrante de una molécula involucrada en una reacción metabólica llevada a cabo "in vivo", puede ser utilizada, en muchos casos, para conocer el mecanismo íntimo de la reacción, o también para individualizar estados intermedios de dicha reacción. Con semejante criterio, es posible también analizar el comportamiento de una reacción "in vitro". En efecto, las técnicas con trazadores conforman la base de ciertos procedimientos especiales, utilizados para la determinación de hormonas, vitaminas y otras sustancias presentes en fluidos biológicos y tejidos. La facilidad más notoria que presenta este tipo de técnicas, consiste en analizar datos, obtenidos por medición de la radiactividad presente en cada una de las etapas del proceso.

No resultaron ajenos a este desenvolvimiento los estudios realizados con hormonas radiactivas, ya sea en el aspecto puramente químico (síntesis o degradación), o bien en el aspecto fisiológico (comportamiento "in vivo", interacción metabólica, degradación catabólica, sitio de acción, etc.). Esto ha permitido en muchos casos demostrar en forma original y también corroborando hipótesis previas, los mecanismos y sitios de acción farmacológica, y por último, los mecanismos de actividad fisiológica, secuencia de caminos metabólicos, aislamiento de metabolitos intermedios y compuestos de degradación final.

Un capítulo de suma importancia es el referido a los análisis

"in vitro", realizados con indicadores radiactivos. La facilidad más notoria que presenta este tipo de técnicas consiste en la posibilidad de analizar datos obtenidos por medición de radiactividad, en un material biológico extraído previamente del paciente. Por ello, estas técnicas no implican la incorporación del material radiactivo en el organismo viviente. En la mayoría de estos procedimientos, se recurre a la marcación de la molécula involucrada en el problema, con un isótopo radiactivo. Dicho isótopo puede pertenecer a un elemento ya constituyente de la molécula original, en cuyo caso el proceso de marcación dará como resultado el cambio del isótopo original por otro del mismo elemento constitutivo de la estructura. Así podemos citar, entre los ejemplos más generalizados, la sustitución en moléculas orgánicas de ^{12}C por ^{14}C y, en una larga lista de compuestos, la sustitución del ^1H por el ^3H . En ambos tipos de cambios, la configuración estructural y la fórmula química no se encuentran modificadas, permitiendo en cambio la evaluación cuantitativa de un determinado proceso mediante la medición de la radiación emitida por el isótopo radiactivo empleado. Es común también que la marcación se realice introduciendo un isótopo radiactivo, perteneciente a un elemento extraño a la estructura original. Un ejemplo típico para este segundo caso, y que además nos interesa particularmente, es el reemplazo de un H perteneciente a la molécula original, por un isótopo del yodo. En este caso, los trazadores de preferencia utilizados para la determinación radiactiva resultan ser el ^{125}I o bien el ^{131}I .

Dentro del capítulo a que nos referimos, debemos tener en cuenta la amplia difusión que obtuvo en poco tiempo el radioinmunoensayo. En efecto, ya desde el año 1956, Berson y col. (1) (2) (3) (4) intensificaron los estudios sobre el metabolismo de la insulina, transporte a través de unión con globulinas en circulación sanguínea humana, cinética de reacción entre insulina y anticuerpos de insulina. En todos estos casos se utiliza la insulina marcada con yodo radiactivo como trazador. En 1959 Yalow y col. (5) (6), establecieron definitivamente en sus trabajos de valoraciones biológicas, el método de radioinmunoensayo como mecanismo para la cuantificación de insulina. Aprovecharon para ello la propiedad de la insulina de provocar la formación de

sus propios anticuerpos, cuando se la inyecta a individuos de distinta especie animal, y la facilidad de obtener una reacción inmunológica que permita deducir la concentración de insulina presente en la reacción. Para ello utilizaron insulina marcada con iodo radiactivo como trazador, y partieron de la suposición de que el comportamiento de la insulina marcada es similar al de la hormona nativa.

Otros autores han desarrollado técnicas que, aprovechando la capacidad inmunológica de determinada molécula proteica, permiten su valoración en fluidos biológicos. Una gran parte de estos compuestos interesa fundamentalmente por su actividad hormonal. Se encuentran de esa manera descritos en la literatura métodos para la evaluación de un gran número de hormonas, no solamente de naturaleza proteica o polipeptídica como el glucagón (7) (8) (9) (10), somatotrofina (11) (12) (13) (14), insulina (15), tirotrofina (16) (17) (18) (19) (20) (21), hormona luteinizante (22), gonadotrofina coriónica (23) (24) (25) (26), angiotensina II (27) (28) (29) (30) (31) (32), sino también aquellas de naturaleza esteroidea, tales como aldosterona y testosterona (33) (34) (35) (36) y también AMP cíclico (37). Para estos últimos ejemplos, la base del método consiste en posibilitar la unión de la molécula en estudio con una estructura proteica con características antigénicas (38).

Otro campo en el cual se ha trabajado con moléculas marcadas, aunque quizás con menor intensidad que en el caso anterior, es el referido a las acciones farmacológicas de hormonas (39), como así también estudios sobre su comportamiento metabólico (40) (41).

Conviene en este momento dejar claramente establecido, que existe una diferencia fundamental en el criterio de utilización del ensayo inmunológico, con respecto al del ensayo biológico. En este último caso, se evalúa una respuesta biológica, inducida por una sustancia capaz de estimular los receptores periféricos de un órgano o de un tejido, o bien una reacción metabólica. En cambio, en el ensayo inmunológico, se mide cuantitativamente una reacción inmunoquímica específica, en la que participan uno o más aminoácidos pertenecientes

a una determinada secuencia que constituyen el determinante antigénico. Idealmente, los valores obtenidos por los dos tipos de técnicas resultarían concordantes, cuando el o los grupos activos biológica e inmunológicamente se encuentran en la misma porción molecular. Pero en la práctica frecuentemente se obtienen resultados discordantes.

Los valores obtenidos en ensayos biológicos e inmunológicos pueden ser solamente comparados en un muy pequeño número de hormonas y, en todos los casos, esto es posible gracias a la gran sensibilidad y especificidad con que puede llevarse a cabo el ensayo biológico. Resultan interesantes en este sentido los estudios de interrelación entre la estructura inmunológica y la actividad biológica del ACTH llevados a cabo por varios grupos de trabajo (42) (43). Sin embargo, en líneas generales, los ensayos biológicos aportan resultados con menor precisión que los obtenidos mediante radioinmunoensayo.

Teniendo en cuenta que a este último hecho se agrega, en muchos casos, la simplicidad operativa como factor de decisión en la metodología a emplear, se acepta que el uso de moléculas marcadas está basado, fundamentalmente, en que las mismas deben participar homogéneamente en los procesos en los cuales actúa la molécula no marcada original y que su inclusión, se realiza al solo efecto de poder contar con un mecanismo que brinde una observación cronológica de las etapas en las cuales interviene. El método cumple su cometido total cuando, al mismo tiempo, dicha observación nos permite obtener conclusiones cuantitativas.

Aún tomando como premisa fundamental el análisis efectuado precedentemente, resulta interesante hacer notar que la experiencia recogida por los grupos de investigadores interesados en la aplicación de esta metodología ha permitido, no solamente avanzar en el desarrollo de técnicas en las cuales intervienen las moléculas marcadas con isótopos radiactivos, sino también la visualización y comprensión de todos aquellos problemas surgidos de la realización práctica de las diversas etapas de trabajo.

Tales factores no pueden ser diferenciados en su importancia

de acuerdo a las etapas en las cuales se encuentran involucrados, sino que, en realidad, los problemas que surgen en cada paso de un ensayo experimental conforman un cúmulo de interrogantes que deben ser estudiados con similar intensidad.

Esta consideración surge del hecho que sólo recientemente se han comenzado a plantear en forma pública, los inconvenientes que cada investigador ha encontrado en su tarea. En efecto, en 1966 Rosa y colaboradores (44) llamaron la atención sobre los efectos que se producen en la actividad biológica debidos a una progresiva iodación de la insulina. En particular, dieron énfasis al estudio de la distribución del iodo incorporado al total de residuos tirosínicos y de la posible correlación que existiría entre el decrecimiento de la actividad biológica y la cantidad de iodo presente en la molécula. Con el mismo interés, en 1967 el mismo grupo describió claramente los efectos químicos y biológicos que acompañan a la iodación de albúmina humana (45), tan intensamente usada hasta el presente en diagnóstico clínico y experimental.

En 1970, Rosa y colaboradores (46), describieron en el Symposium de la Sociedad Germana de Endocrinología, los problemas relacionados con la marcación de angiotensina y polipéptidos pequeños, y Kurchart y colaboradores (47), analizando la misma hormona, estudiaron los efectos químicos y biológicos asociados a la iodación de angiotensina II.

Hace muy poco tiempo, en mayo de 1972, relatando sus experiencias personales en el seminario sobre técnicas radioinmunológicas realizado en París, Hunter (48) describió claramente una serie de problemas que son merecedores de un estudio exhaustivo y que, en su conjunto, actúan negativamente en la obtención de resultados experimentales útiles.

En lo que atañe a la marcación de moléculas polipeptídicas, y a su posterior conservación y comportamiento, dicho autor demuestra con ejemplos algunos puntos esenciales. Es interesante mencionar aquí

una de las conclusiones extraídas de los resultados de marcación de gastrina con iodo. En efecto, dicha hormona de PM 2114, por el agregado de un átomo de iodo en su única tirosina, aumenta su peso molecular en 6%, modificando presuntamente su punto isoeléctrico.

En términos generales, es interesante citar también que, cuando una proteína o un polipéptido se iodura con una actividad específica elevada, ocurren disminuciones en la inmunoreactividad. Este hecho, va en desmedro de la naturaleza del sistema de competición que se utiliza en las técnicas radioinmunológicas. Además, algunas alteraciones no pueden ser evitadas simplemente variando la relación iodo/proteína. De cualquier modo, todas las incursiones que se intenten realizar en el tema de la marcación deben forzosamente estar relacionadas al comportamiento de la molécula en los estudios en cuestión.

Otro aspecto que resulta necesario mencionar es el relativo al material radiactivo empleado. Particularmente, en la marcación de hormonas y proteínas, en general se acepta la utilización de ^{125}I o de ^{131}I . La elección de cada uno de ellos está precedida por argumentos en favor y en contra de cada isótopo radiactivo. Nosotros hemos creído necesario analizar, en forma exhaustiva, las características de las muestras radiactivas que se emplean en las marcaciones (49). Resulta interesante señalar que la importancia que el tema merece puede deducirse del hecho que, en forma prácticamente simultánea, Drouet y colaboradores (50) plantearon, a principios del presente año, la interpretación correcta que debe tenerse de las soluciones de iodo radiactivo "sin portador", utilizadas en la marcación de proteínas.

Analizando el panorama que se plantea, resulta más difícil la aceptación de un gran número de conclusiones obtenidas a partir de experiencias en las cuales la sustancia en estudio se encuentra marcada con un radioisótopo. En efecto, en el caso particular de utilización de hormonas marcadas, se mide una cierta actividad y se la correlaciona con una cantidad dada de hormona, la mayor parte de la cual está constituida por moléculas no radiactivas. A menos que, en los estudios de marcación de esa hormona, se demuestre que no se han

alterado las propiedades fisicoquímicas y biológicas (que incluyen su comportamiento y actividad farmacológica así como sus propiedades inmunológicas), dicha correlación no puede considerarse válida.

Debemos admitir que, hasta el momento actual, la literatura cita innumerables trabajos experimentales en los cuales la observación, tanto cualitativa como cuantitativa de un determinado proceso, se logra mediante el uso de una molécula marcada. En cambio, es sumamente pobre el caudal de información que tenemos respecto a las modificaciones, tanto estructurales como de comportamiento, que se observan como consecuencia del agregado de un isótopo radiactivo a una molécula con actividad hormonal.

En efecto, podemos establecer una lista de causas de variación que se relacionan directamente con la iodación:

- 1) La presencia de yodo radiactivo como sustituto del átomo de hidrógeno perteneciente al anillo aromático de la tirosina, puede ser causa de una disminución en la reactividad (48) (51).
- 2) Los reactivos usados en el procedimiento de iodación pueden variar las propiedades antigénicas de la molécula en cuestión.
- 3) El daño a la molécula marcada puede ser realizado por la propia radiación del yodo utilizado, ya sea durante o luego del proceso de marcación.

La validez de los resultados de innumerables trabajos de investigación metabólica, en los cuales son usadas moléculas proteicas marcadas con radioisótopos ajenos a la estructura natural, puede ser seriamente cuestionada si se demuestra que la especie química, obtenida luego de un proceso de marcación, no conserva las propiedades de la sustancia original.

EXPOSICION DEL PLAN DE TRABAJO

Haciendo propia esta orientación filosófica y experimental, nos hemos interesado en el estudio de la marcación y comportamiento posterior de polipéptidos de estructura simple con actividad hormonal.

En especial, hemos analizado con amplitud la marcación, el comportamiento fisicoquímico y la actividad biológica de la angiotensina II. En pequeñas moléculas polipeptídicas, poseedoras de pocos grupos funcionales, la influencia dada por la modificación de ciertos residuos sobre la actividad biológica, tiene una importancia relativamente mayor y puede ser estudiada en condiciones más accesibles que en el caso de moléculas proteicas de alto peso, cuyas conformaciones moleculares y disposición espacial resultan ser más complejas.

La angiotensina II fue elegida para este estudio dado que, siendo un octapéptido de peso molecular 1150, su análisis podría ser representativo del estudio de polipéptidos de bajo peso molecular. Además, su residuo tirosínico es reconocido como esencial para la actividad biológica, y es sabido que la iodación involucra fundamentalmente dicho residuo, transformándolo en un derivado con uno o dos átomos de yoduro en su núcleo fenólico.

En forma parcial, las observaciones recogidas trabajando con angiotensina II se reprodujeron al intentar generalizarlas a casos similares. Para ello, hemos utilizado también la experiencia recogida en la marcación de tirotrofina bovina, hormona también polipeptídica, cuya estructura contiene varios residuos tirosínicos, y a los cuales no podemos, "a priori", adjudicarles comportamientos semejantes desde el punto de vista biológico.

La meta de nuestro trabajo es la de contribuir a una mejor información básica sobre este tipo de compuestos, a los fines de una utilización más racional de los mismos. Para lograrlo, hemos debido abordar el estudio de un conjunto de problemas, que obligaron a introducirnos en diversas disciplinas. Por esto creemos que, a los fines de una mejor comprensión de cada una de las etapas de esta labor, es conveniente realizar en forma separada su consideración experimental y su discusión.

En cuanto a la parte experimental se refiere, fue realizada en los laboratorios del Departamento de Radioquímica del Centro

de Estudios Nucleares, SORIN, Saluggia, Italia durante el año 1969, Laboratorio de Radioisótopos de la Orientación Física del Departamento de Fisicomatemática de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, y los laboratorios del Departamento de Radioisótopos, de la Gerencia de Energía de la Comisión Nacional de Energía Atómica, Buenos Aires, Argentina durante los años 1970, 1971 y 1972.

Esquemáticamente, podemos dividir nuestro trabajo en las siguientes partes:

- Capítulo I: Valoración de Iodo en preparados de I-131.
- Capítulo II: Marcación por el método de la cloramina-T.
- Capítulo III: Marcación por el método del monocloruro de iodo.
- Capítulo IV: Comportamiento biológico de la iodoangiotensina II.
Su preparación por el método electrolítico.

Esperamos que la labor realizada signifique un aporte que contribuya a una aplicación más racional de la marcación de polipéptidos con iodo radiactivo y su posterior utilización experimental.

Es de desear que lo mucho que queda por hacer constituya el motivo de futuras investigaciones.

CAPITULO I

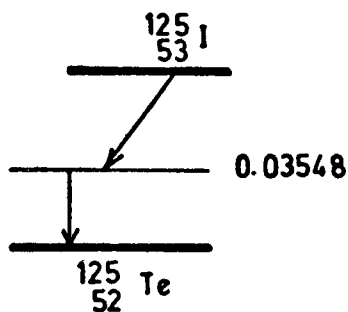
VALORACION DE IODO EN PREPARADOS DE I-131I-1.- INTRODUCCION

En nuestro trabajo experimental hemos utilizado dos isótopos radiactivos del yodo. El I-125 fue utilizado en los estudios de marcación por vía electrolítica, en los análisis de comportamiento biológico de la angiotensina II marcada y en las experiencias de marcación siguiendo el método del monoclóruo de yodo, con las cuales se analizó la influencia del pH en la composición de los preparados obtenidos. Fundamentalmente, para los dos primeros casos, los factores más importantes que decidieron la elección del radioisótopo fueron, por un lado, la comodidad de utilización del producto marcado en un lapso de tiempo bastante prudencial, y por otro lado, la presunción generalmente admitida de que el daño que produce en la molécula orgánica, al emisión γ de baja energía que presenta el isótopo de referencia es relativamente pequeño. El I-131 en cambio fue utilizado en las experiencias de marcación con cloramina-T. De esta manera asimilamos nuestro caso al de un gran número de marcaciones que se efectúan con este método y que se realizan para obtener hormonas marcadas con ^{131}I para ser utilizadas en técnicas de valoración.

Conviene efectuar a esta altura, una breve consideración referente a la utilización del yodo en la marcación. En efecto, cualquiera sea el método elegido, el mecanismo de la reacción de marcación no está condicionado al isótopo que se utilice, ni depende del mismo. En las distintas etapas de nuestro trabajo hemos utilizado tanto el ^{125}I como el ^{131}I como indicadores radiactivos. Las propiedades físicas de uno u otro son marcadamente diferentes. Analizaremos brevemente las propiedades de cada radioisótopo, con el fin de aportar las razones que determinaron su utilización en cada etapa.

El yodo-125, cuyo período de semidesintegración es de 60.2

días según algunos autores (52) y de $58 + 0.13$ días según otros (53), pasa mediante captura electrónica a $^{125}_{52}\text{Te}$, emitiendo además una radiación gamma de 0.03548 MeV. El esquema correspondiente a la desintegración del $^{125}_{53}\text{I}$ es el siguiente:



La transformación finaliza precisamente en el $^{125}_{52}\text{Te}$, isótopo natural y estable del telurio.

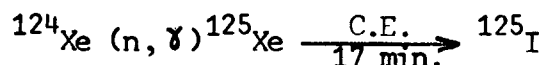
La obtención del $^{125}_{53}\text{I}$ puede realizarse por diversas vías, que enunciaremos esquemáticamente:

1) mediante el uso de aceleradores de partículas:

- a) $^{125}_{52}\text{Te} (p, n) ^{125}_{53}\text{I}$
- b) $^{124}_{52}\text{Te} (d, n) ^{125}_{53}\text{I}$
- c) $^{125}_{52}\text{Te} (d, 2n) ^{125}_{53}\text{I}$
- d) $^{123}_{51}\text{Sb} (\alpha, 2n) ^{125}_{53}\text{I}$

2) mediante el uso de reactores nucleares:

El $^{125}_{53}\text{I}$ se puede obtener en un reactor nuclear, mediante irradiación de $^{124}_{54}\text{Xe}$ con neutrones térmicos, según la reacción:

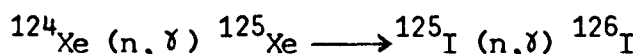


Si en cambio se usa xenón natural como blanco de irradiación, se obtienen además, como productos de reacciones secundarias, toda una serie de isótopos del xenón (54).

^{126}Xe (n, γ)	^{127}Xe	(T 1/2 = 36.41 días)
^{128}Xe (n, γ)	$^{129\text{-m}}\text{Xe}$	(T 1/2 = 8.00 días)
^{130}Xe (n, γ)	$^{131\text{-m}}\text{Xe}$	(T 1/2 = 11.80 días)
^{132}Xe (n, γ)	^{133}Xe	(T 1/2 = 5.27 días)
^{134}Xe (n, γ)	$^{135\text{-m}}\text{Xe}$	(T 1/2 = 15.60 min.)
^{134}Xe (n, γ)	^{135}Xe	(T 1/2 = 9.14 hrs.)
^{136}Xe (n, γ)	^{137}Xe	(T 1/2 = 3.90 min.)

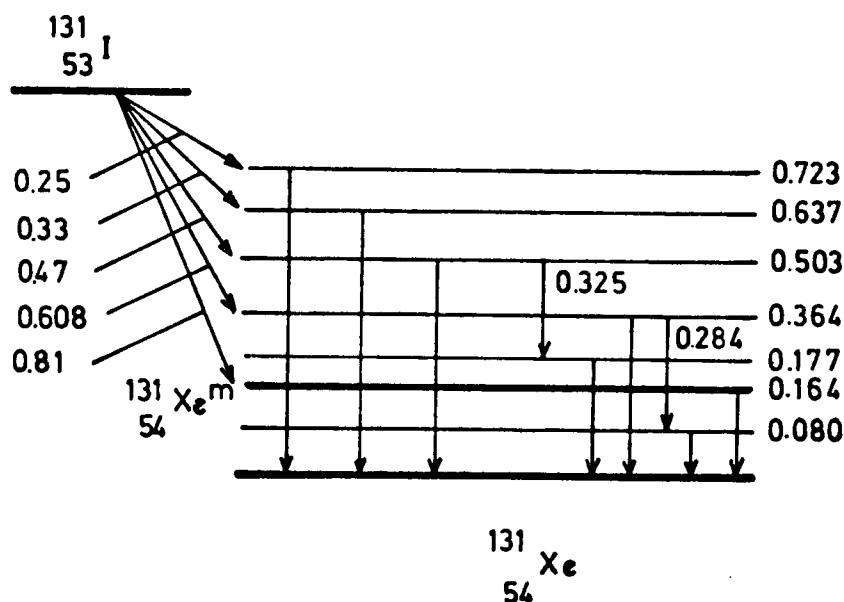
Todos estos isótopos, ya sea "per se" o por sus productos de desintegración, a veces también radiactivos, configuran una importante gama de impurezas radioquímicas. Por esta razón, la producción rutinaria de ^{125}I se realiza por irradiación con neutrones térmicos de xenón altamente enriquecido en ^{124}Xe .

La presencia de ^{126}I en las soluciones de ^{126}I configura otro inconveniente que debemos mencionar; la aparición de esta impureza se debe a la gran facilidad con que puede introducirse un neutrón en el núcleo de ^{125}I . Dado que durante la irradiación de ^{124}Xe con neutrones térmicos se forma ^{125}I , durante el proceso también se producirá ^{126}I por irradiación de los núcleos de ^{125}I formados. Sin embargo, dado que el ^{125}I se forma por desintegración del ^{125}Xe , que a su vez es producido por irradiación del ^{124}Xe , es fácil verificar que se disminuye la formación de ^{126}I irradiando una masa considerable de xenón durante un período de tiempo muy corto. Estableciendo el equilibrio entre estos dos parámetros, se logra mantener el nivel de ^{126}I por debajo del 2 % (55).

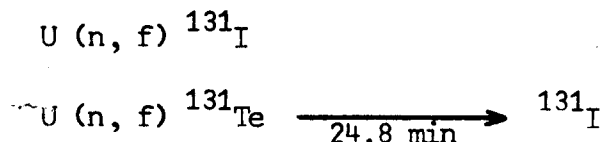


De todo lo analizado hasta el momento, es aceptable admitir que en el ^{125}I así producido las interferencias que pudieran ocasionar las impurezas radiactivas señaladas resultan despreciables y no se justifica tenerlas en cuenta.

No ocurre lo mismo cuando queremos trabajar con ^{131}I . Este isótopo tiene un período de semidesintegración de 8.05 días, y su esquema de desintegración es el siguiente:

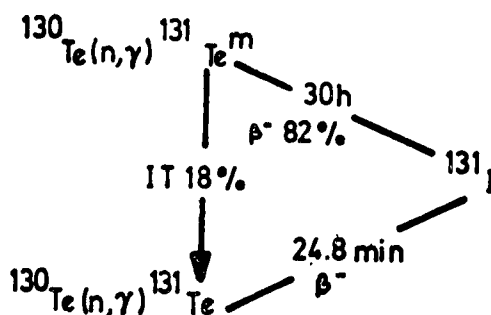


Dos son las vías de obtención. Por un lado la recuperación del ^{131}I a partir de los productos de fisión nuclear, en cuyo caso el rendimiento de obtención es del 2.9 % (54).



Por otro lado el ^{131}I se obtiene por irradiación con neutrones térmicos de telurio, ya sea al estado elemental, ya sea como dióxido, o bien como compuesto soluble.

Independientemente del material utilizado como blanco de irradiación, la reacción es siempre:



Debemos también aquí tener en cuenta que, en el proceso de irradiación, se encuentran involucrados todos los isótopos naturales del telurio, dando como reacciones secundarias otros isótopos del yodo distintos al ^{131}I .

La irradiación de telurio y sus derivados es en la actualidad el proceso elegido en la gran parte de los laboratorios de producción de ^{131}I . Del análisis teórico del procedimiento, surge claramente que en toda solución de ^{131}I se encuentran también el ^{127}I y el ^{129}I , a partir de la activación de ^{126}Te y ^{128}Te respectivamente. A pesar de que, analizado el problema en forma absoluta, la probabilidad de activación de estos isótopos es pequeña, cuando se procura establecer su importancia relativa se observa que la misma adquiere un valor apreciable. Tal es así, que generalmente en la producción de ^{131}I por irradiación de telurio natural mediante neutrones térmicos, se observa que por cada mCi de ^{131}I tenemos aproximadamente 30 ng de yodo total, de los cuales solamente 8 ng corresponden al ^{131}I , mientras que el resto es una mezcla de ^{127}I y ^{129}I . Sin embargo, la cantidad real total del yodo presente por cada mCi de ^{131}I depende de varios factores:

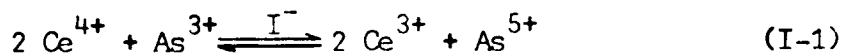
- La historia del proceso de irradiación.
- El tiempo transcurrido entre la finalización de la irradiación y la utilización del radioisótopo.
- La cantidad de yodo presente como impureza en los reactivos utilizados durante el procesamiento del telurio irradiado.

Mientras el primer factor involucra fundamentalmente a las cantidades de ^{127}I y ^{129}I originalmente formados, el segundo factor nos está indicando un cambio paulatino en la actividad específica del ^{131}I , dado que frente a un período de 8.04 días, correspondiente al isótopo de referencia, contamos con el ^{127}I , isótopo estable del yodo, y el ^{129}I con un período de semidesintegración de 1.7×10^7 años. Podemos considerar que su actividad es constante durante el tiempo útil de aprovechamiento de una muestra de ^{131}I . Estos hechos ya fueron considerados por otros autores (56) (57) (58) (59), no sólo desde el punto de vista de la preparación de soluciones de ^{131}I de alta actividad específica, sino también en la obtención de proteínas marcadas con alta actividad específica.

Precisamente, las diferencias que pudieran existir en las concentraciones del elemento correspondiente a distintas partidas de yodo-131, utilizadas en la marcación de polipéptidos, permite apreciar la importancia del conocimiento de la actividad específica real de las soluciones de ^{131}I , ya sugerida por otros autores (56) (57) (58) (59) (60). Este hecho nos indujo a contar con un método de valoración de yodo total que puede ser eficaz, no solamente para su utilización como paso previo a la marcación con yodo, sino inclusive constituir un procedimiento para complementar el control operacional de la producción del radioisótopo.

Por consiguiente, describiremos a continuación la puesta a punto de un micrométodo, que nos permite valorar el yodo en forma de I^- y/o IO_3^- , presente en una muestra de ^{131}I "sin portador". Para ello hemos adaptado a nuestras condiciones de trabajo, la técnica propuesta por Rogina y Dubravcic (61) en base a un trabajo de Sandell y Kolthoff (62).

El método se basa en la acción catalítica de los iones yoduro, sobre la reducción del ión cérico a ceroso, por acción del ácido arsenioso en medio ácido. La reacción, estudiada cinéticamente por Lein y Schwartz (63), puede esquematizarse como sigue:



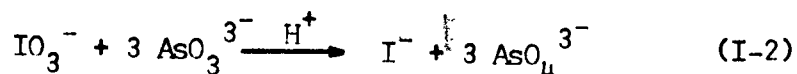
Por lo tanto, la única acción del I^- consiste en acelerar la reacción anterior. A medida que aumenta la cantidad de I^- , aumenta la velocidad de la reacción (I-1).

El progresivo avance de la reacción puede ser determinado mediante el estudio de la desaparición del color característico de la sal órica. Sandell y Kolthoff (64), basándose en el hecho de que la velocidad de la reacción es proporcional a la concentración de ioduro, fijan las condiciones experimentales (concentración de reactivos, acidez y temperatura) y determinan la cantidad de ioduro midiendo el tiempo requerido para la completa desaparición de la coloración amarillenta.

Basándose en la misma reacción química, Chancy (65) mide la concentración del ión órico remanente no reducido, al cabo de un tiempo fijo, en lugar de esperar una decoloración total.

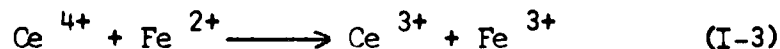
Es evidente que la medición de la concentración del ión órico, efectuada mientras la reacción se desarrolla, puede inducir a obtener un valor afectado de cierto error ocasional. Es en función de ello, que nosotros hemos creído más acertada la elección hecha por Rogina y Dubravcic de interrumpir la reacción, eliminando del medio el remanente de ión órico por transformación en óroso, por medio del ión ferroso.

Si la muestra contiene IO_3^- , éste se reduce a I^- por acción del As^{3+} que se encuentra en exceso en el medio ácido, de acuerdo a la siguiente reacción:

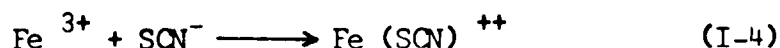


La reacción (I-1) se detiene mediante el agregado, a un tiempo dado que debe ser anterior a la finalización de la reacción, de

un exceso de ión ferroso que reduce al ión cérico remanente, según la reacción:



Por lo tanto, la cantidad de iones férricos, que es equivalente a la de los iones Ce^{4+} aún no reducidos, será tanto mayor cuanto menor sea la cantidad de ioduro que acelera la reacción (I-1). Con el fin de valorar la concentración de iones Fe^{3+} , se agrega un exceso de una solución de KSCN, produciéndose la coloración roja característica del complejo formado, cuyo pico de absorbancia máxima se encuentra aproximadamente a 490 nm.



Por lo tanto, la absorbancia a 490 nm será proporcional a la concentración del ión férrico, y será tanto mayor cuanto menor sea la cantidad de iodo. La concentración de iodo se determina por interpolación en una curva de calibración en la que se representa la absorbancia a 490 nm en función de la concentración de iodo.

I-2.- PARTE EXPERIMENTAL

El método descrito por Rogina y Dubravcic permite la valoración de iodo en forma de ioduro desde 10 ng hasta 1000 ng totales.

Dado el estado crítico que presentan algunos parámetros que intervienen en la reacción, tales como la concentración y el tiempo, resulta necesario fijar las condiciones de la experiencia a fin de poder considerarla reproducible.

I-2-1.- MATERIAL

I-2-1-1.- APARATOS

Espectrofotómetro Bausch y Lomb, modelo Spectronic 20.

Baño termostatzado, modelo Samy.

Jeringas de dispensión automática de volumen prefijado,
Jencons Scientific, Inglaterra.

I-2-1-2.- REACTIVOS

- Acido sulfúrico. Solución al 60 % p/p. Se prepara a partir de ácido sulfúrico 96 %, densidad 1.84, marca Carlo Erba, Milano, Italia, calidad "pro análisis". Se toman 32.6 ml de sulfúrico concentrado y se diluyen a 100 ml agregando el ácido gota a gota sobre 67.4 ml de agua bidestilada fresca. Este procedimiento se realiza en erlenmeyer mantenido en baño de hielo y mezclando por rotación en forma constante.

- Acido arsenioso. Solución 0.1 N en ácido sulfúrico, aproximadamente 0.1 N. Se prepara disolviendo por calentamiento 4.946 g de trióxido de arsénico marca Carlo Erba, Milano, Italia, calidad "pro análisis", en aproximadamente 500 ml de agua bidestilada fresca, acidificada con 10 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Finalmente, la solución se lleva a un litro completando con agua.

- Sulfato cérico amónico. Solución 0.02 N en ácido sulfúrico 1.6 N. Se prepara disolviendo 13.380 g de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 2(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ o 12.765 g de la sal bihidratada en aproximadamente 500 ml de agua bidestilada fresca; se agregan 44 ml de ácido sulfúrico de densidad 1.84 y se completa a un litro con agua. En nuestro trabajo hemos utilizado la sal bihidratada marca Baker, Phillipsburg, N.J., U.S.A., de calidad "pro análisis".

- Tiocianato de potasio. Solución al 4 % p/v. Se obtiene disolviendo 4 g de la droga marca Merck, Darmstadt, Alemania, de pureza "pro análisis", en agua bidestilada reciente y llevando la solución a un volumen final de 100 ml.

- Ioduro de potasio. Solución de 200 $\mu\text{g I}^-/\text{ml}$. Se obtiene disolviendo 261.6 mg de ioduro de potasio marca Carlo Erba, Milano, Italia, de pureza "pro análisis", en aproximadamente 500 ml de agua bidestilada reciente y luego se completa el volumen a 1000 ml con agua. Esta

se considera solución madre a los efectos de su conservación, debiendo efectuar una dilución 1:1000 cada vez que se quiere realizar una curva de calibración. Esta última solución, cuya concentración es de 200 ng/ml, es la adecuada para efectuar la curva de valoración de soluciones de ^{131}I "sin portador".

- Iodato de potasio. Solución de 200 µg de iodo/ml. Se obtiene disolviendo 337.0 mg de iodato de potasio marca Carlo Erba, Milano, Italia, de calidad "pro análisis", en aproximadamente 500 ml de agua bi-distilada fresca y luego se completa a 1000 ml. Esta solución se mantiene en reserva para ser diluida 1:1000 en el momento de realizar una curva de calibración a partir de iodato en lugar de ioduro.

I-2-1-3.- PRECAUCIONES

Con el fin de obtener resultados reproducibles, deben tenerse en cuenta las siguientes precauciones en el uso y conservación de los reactivos:

- Utilizar las soluciones de los reactivos dentro de los 15 días posteriores a su preparación.
- Guardar los reactivos en la oscuridad en frascos de color caramelo, bien tapados.
- Lavar el material con mezcla sulfocrómica caliente, enjuagar abundantemente con agua común y finalmente con agua bi-distilada.
- Preparar todas las soluciones con agua bidestilada, de reciente obtención.

Las extremas precauciones que conviene mantener en la preparación del material y reactivos tienen la doble finalidad de evitar la inhibición de la reacción catalítica, y al mismo tiempo, disminuir al máximo la presencia de iodo como impureza en las determinaciones.

I-2-2.- METODO

Durante las pruebas preliminares efectuadas para poner a punto este método de valoración, hemos encontrado conveniente modificar las cantidades de reactivos a utilizar con respecto al método original, pero conservando las proporciones de sustancias reaccionantes.

I-2-2-1.- TECNICA

Los distintos pasos que componen una experiencia están detallados a continuación:

1) Se coloca en cada tubo una alícuota exactamente medida de la solución de iodo a determinar y se completa a 4.00 ml con agua bidestilada.

2) Se añaden 0.25 ml de AsO_3H_3 .

3) Se añaden 0.25 ml de SO_4H_2 al 60 % p/p.

En este momento se mezcla vigorosamente hasta obtener una solución de densidad homogénea y se deja estabilizar durante 20 minutos a la temperatura elegida.

La solución de sulfato cérico amónico a utilizar se mantiene también a la misma temperatura que los tubos de reacción.

4) Se agregan a cada tubo 0.50 ml de la solución cérico amónica y se agita inmediatamente.

5) Transcurrido un tiempo fijo se detiene la reacción catalítica con el agregado de 0.50 ml de sulfato ferroso amónico.

6) Se agregan 0.50 ml de KSNC ; se observará el color rojo ladrillo característico del sulfocianuro férrico.

7) Dada la sensibilidad del equipo espectrofotométrico con que se trabajó, hemos disminuido la intensidad del color mediante una dilución al medio, es decir, en nuestro caso, se agregan 6.00 ml.

I-2-2-2.- RECOMENDACIONES

Aconsejamos mantener los tubos de reacción a temperatura ambiente durante 45 minutos, para luego efectuar la lectura de transmitancia óptica o absorbancia óptica (según lo que resulta más adecuado) a 490 nm, utilizando un blanco de agua destilada como valor de referencia inicial del equipo de medición. La lectura puede efectuarse en cualquier momento posterior a los 45 minutos enunciados, dado que el color permanece estable en forma satisfactoria.

Dos son los factores que hemos tenido que adaptar a nuestras condiciones de trabajo. Ellos son la temperatura y el tiempo.

I-2-3.- TEMPERATURA DE REACCION

En el trabajo original los autores realizan dos curvas de distintos rangos de concentración de yoduro, para lo cual, en un caso, trabajan a 30°C durante 20 minutos y obtienen calibraciones desde 0 hasta 100 ng de yoduro totales y, en el otro caso, a 20°C durante 8 minutos para un ámbito comprendido entre 0 y 1000 ng.

El ámbito de cantidad de yodo en el cual sospechamos que pudiesen estar ubicadas las muestras a calibrar, teniendo en cuenta que el volumen no se encuentre afectado por un error apreciable y además no involucre la utilización de una cantidad considerable de muestra radiactiva, nos obligó a elegir la segunda de las escalas de trabajo. Ello trajo como consecuencia la imposibilidad de mantener reproducible y estable en nuestro ambiente de trabajo la temperatura de 20°C exigida en la publicación de referencia, al disponer como equipo de estabilización de temperatura un baño termostatzado en contacto con el medio ambiente.

Las pruebas de estabilidad térmica efectuadas con nuestro equipo termostático, en distintas condiciones ambientales, nos permitieron definir la temperatura más baja posible en 26.5°C con una fluctuación no mayor de $\pm 0.2^\circ\text{C}$.

I-2-4.- TIEMPO DE REACCION

Aceptando como valor constante de temperatura 26.5°C, hemos desarrollado la reacción cinética con tres valores de concentración de iodo, que son 0.2 µg, 0.5 µg y 0.8 µg totales, y hemos variado el tiempo transcurrido entre la incorporación de la solución céri-ca amónica y el sulfato ferroso amónico.

Es evidente que, si trabajando con los mismos rangos de concentración y una temperatura de 20°C Rogina y Dubravcic obtienen una curva de extinción óptica que permite detectar con buena sensibilidad pequeñas variaciones en la concentración del iodo, en nuestra situación la mayor temperatura de reacción supone de antemano la conveniencia de situarnos por debajo de los 8 minutos requeridos en la determinación por dichos autores.

A tal efecto hemos estudiado las variaciones que se observan en la lectura final, cuando la reacción se interrumpe a los 4 minutos, 5 minutos, 6 minutos y 7 minutos, encontrando los siguientes valores.

TABLA I-1 a

CONCENTRACION Y VOLUMEN DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS EN LAS CURVAS REALIZADAS A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACION

Tubo	Solución de KI	H ₂ O	Acido Arsenioso	Acido Sulfúrico	Sulfato cérico amónico	Concentración Total
-	200 µgI ⁻ /ml	-	0.1 N	60 % p/p	0.02 N	-
nº	ml	ml	ml	ml	ml	ng
1	1.00	3.00	0.25	0.25	0.50	200
2	2.50	1.50	0.25	0.25	0.50	500
3	4.00	-	0.25	0.25	0.50	800

TABLA I-1 b

LECTURAS ESPECTROFOTOMETRICAS OBTENIDAS A DIFERENTES
TIEMPOS DE INCUBACION

	200 ng		500 ng		800 ng	
TIEMPO	LECTURA					
	T	A	T	A	T	A
min	%	-	%	-	%	-
4	24.9	0.604	59.9	0.223	77.6	0.110
5	31.3	0.505	68.5	0.164	83.3	0.080
6	39.0	0.409	75.3	0.124	87.0	0.060
7	46.3	0.335	80.0	0.097	86.5	0.063

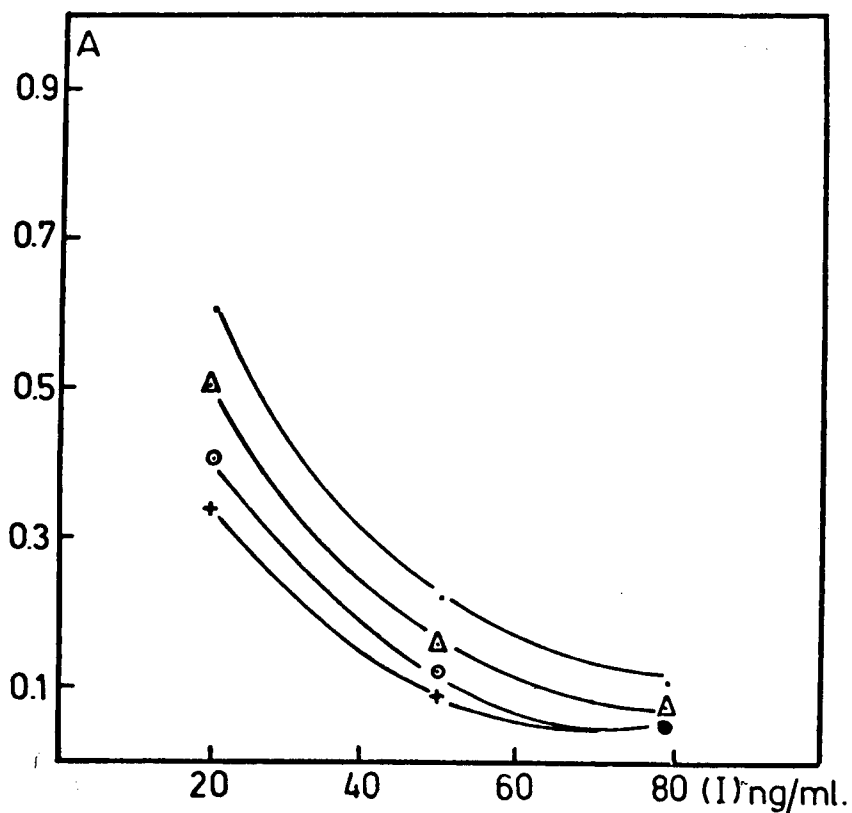


Figura I-1.- Modificación de la reacción cinética para distintos intervalos de tiempo.

Absorbancia óptica en función de la cantidad de iodo presente a temperatura constante.

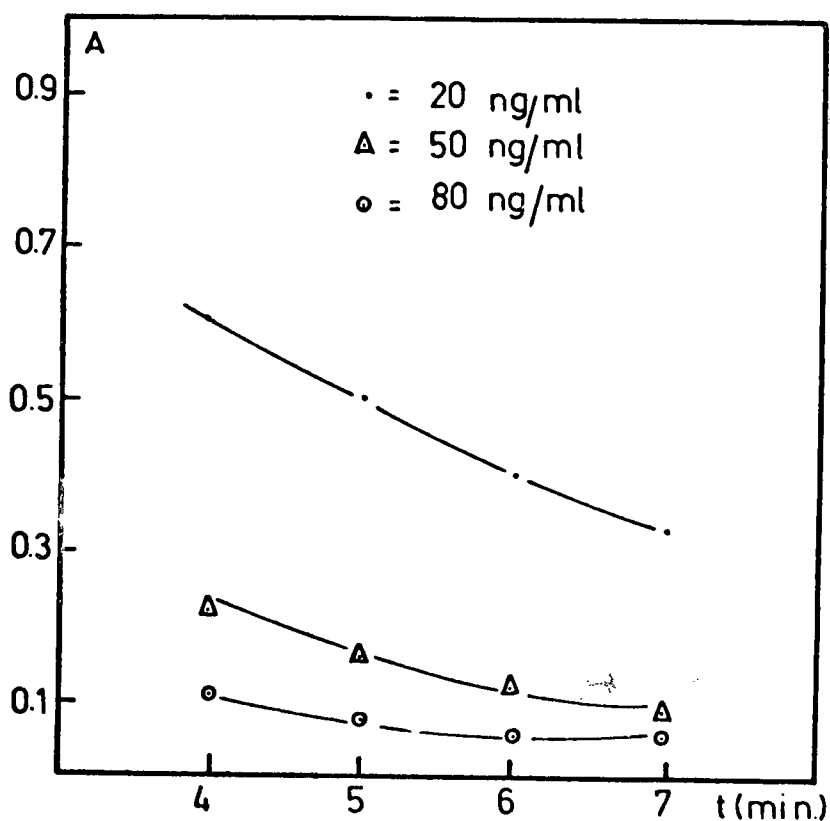


Figura I-2.- Modificación de la reacción cinética para distintas cantidades totales de yoduro presente.

Absorbancia óptica en función del tiempo de reacción a temperatura constante.

En las figuras I-1 y I-2 están indicados los valores obtenidos, en un caso representando la absorbancia en función de la concentración total de yodo para los diferentes tiempos de reacción y, en el otro caso, los mismos datos en función del tiempo para las diversas concentraciones utilizadas.

Aunque el tipo de curva que caracteriza esta reacción cinética no presenta ningún punto de inflexión que indique un cambio sustancial en las condiciones de la técnica, hemos optado por realizar las futuras experiencias manteniendo la reacción durante 5 minutos. Consideramos para ello que se trata de un tiempo que brinda una variación apreciable en la lectura de diferentes concentraciones de yodo, principalmente en la parte correspondiente a los valores bajos de concentración total del mismo.

TABLA I-2

CONCENTRACION, VOLUMEN Y ORDEN DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS
EN UNA CURVA DE CALIBRACION DE IODO TOTAL EN SOLUCION

TUBO	Solucion de KI	H ₂ O	Acido Arsenioso	Acido Sulfúrico	Sulfato amónico	Concentración resultante de I ⁻		Sulfato Ferroso amónico	KSNC	H ₂ O
-	200 µgI ⁻ /ml	-	0.1 N	60% p/p	0.02 N	-		1.5% p/v	4% p/v	-
-	ml	ml	ml	ml	-	ng/ml		ml	ml	ml
1	0.50	3.50	0.25	0.25	0.50	20	incubación a 26.5°C durante 5.00 minutos	0.50	0.50	6.00
2	1.00	3.00	0.25	0.25	0.50	40		0.50	0.50	6.00
3	1.50	2.50	0.25	0.25	0.50	60		0.50	0.50	6.00
4	2.00	2.00	0.25	0.25	0.50	80		0.50	0.50	6.00
5	2.50	1.50	0.25	0.25	0.50	100		0.50	0.50	6.00
6	3.00	1.00	0.25	0.25	0.50	120		0.50	0.50	6.00
7	3.50	0.50	0.25	0.25	0.50	140		0.50	0.50	6.00
8	4.00	--	0.25	0.25	0.50	160		0.50	0.50	6.00

De acuerdo con lo mencionado precedentemente, en la Tabla I-2 se amplía la información indicada en la Tabla I-1, para lo cual se incluye el tiempo de incubación, los reactivos de neutralización y coloración final, así como la escala de concentraciones de iodo como ión yoduro, convenientes para la realización de una curva de calibración patrón.

La sensibilidad de esta técnica hace necesario extremar al máximo las precauciones, para lo cual nos hemos impuesto cuatro condiciones de importancia que respetamos en todo momento:

a) Es fundamental una exacta medición de los volúmenes de los reactivos; para el sulfato óxido amónico y el sulfato ferroso amónico, es aconsejable utilizar pipetas de volumen de descarga automático, con lo cual disminuimos al máximo el error accidental, admitiendo solamente el error sistemático del instrumento.

b) Al hacer la curva de calibración, el sulfato óxido debe ser agregado en intervalos de 20 segundos (trabajando con pipeta automática), y luego la reacción se detiene a los 5.00 minutos.

c) En cada valoración debe hacerse la correspondiente curva de calibración.

d) Conviene hacer cada determinación por triplicado.

I-3.- RESULTADOS

I-3-1.- CURVA DE CALIBRACION

Teniendo presente en todo momento las condiciones detalladas anteriormente, hemos obtenido curvas de calibración en las cuales los puntos representados son promedio de tres determinaciones efectuadas para cada valor.

La escala de lectura que trae el equipo espectrofotométrico utilizado hace conveniente realizar la lectura espectrofotométrica en

unidades de transmisión porcentual y, a partir de dichos datos, obtener los valores de absorbancia.

Las lecturas se realizaron en todos los casos a 490 nm, ajustando el instrumento con un blanco de agua destilada.

A partir de estos datos podemos representar la absorbancia (en nanómetros), en función de la concentración de yoduro presente. Un ejemplo de los resultados logrados en una determinación se puede observar en la tabla I-3.

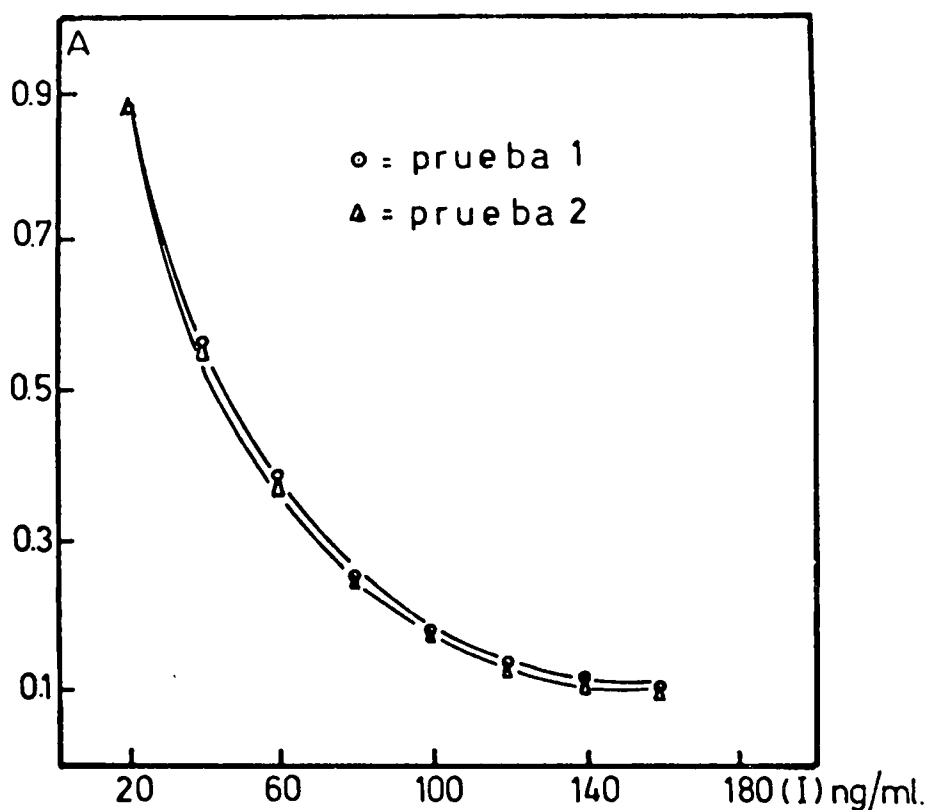


Figura I-3: Curvas de calibración de iodo total en solución.
Absorbancia óptica en función de la cantidad de iodo presente a temperatura constante.

TABLA I-3
LECTURAS CORRESPONDIENTES A UNA CURVA DE CALIBRACION

I ⁻ total	Tubo	Transmi- tancia	Absor- bancia	Tubo	Transmi- tancia	Absor- bancia	Tubo	Transmi- tancia	Absor- bancia	Absorbancia Promedio
µg	nº	T %	A	nº	T %	A	nº	T %	A	A ± A
0.1	1	13.0	0.886	1'	13.0	0.886	1"	13.5	0.870	0.881 ± 0.005
0.2	2	29.0	0.538	2'	29.0	0.538	2"	29.0	0.538	0.538 ± 0.000
0.3	3	43.3	0.364	3'	44.0	0.356	3"	44.0	0.357	0.359 ± 0.002
0.4	4	57.5	0.240	4'	58.0	0.237	4"	57.5	0.240	0.239 ± 0.001
0.5	5	64.0	0.194	5'	66.0	0.181	5"	68.0	0.168	0.181 ± 0.007
0.6	6	71.5	0.146	6'	73.5	0.134	6"	72.5	0.140	0.140 ± 0.003
0.7	7	75.5	0.122	7'	76.0	0.119	7"	77.0	0.108	0.116 ± 0.004
0.8	8	78.0	0.108	8'	78.0	0.108	8"	78.0	0.108	0.108 ± 0.000

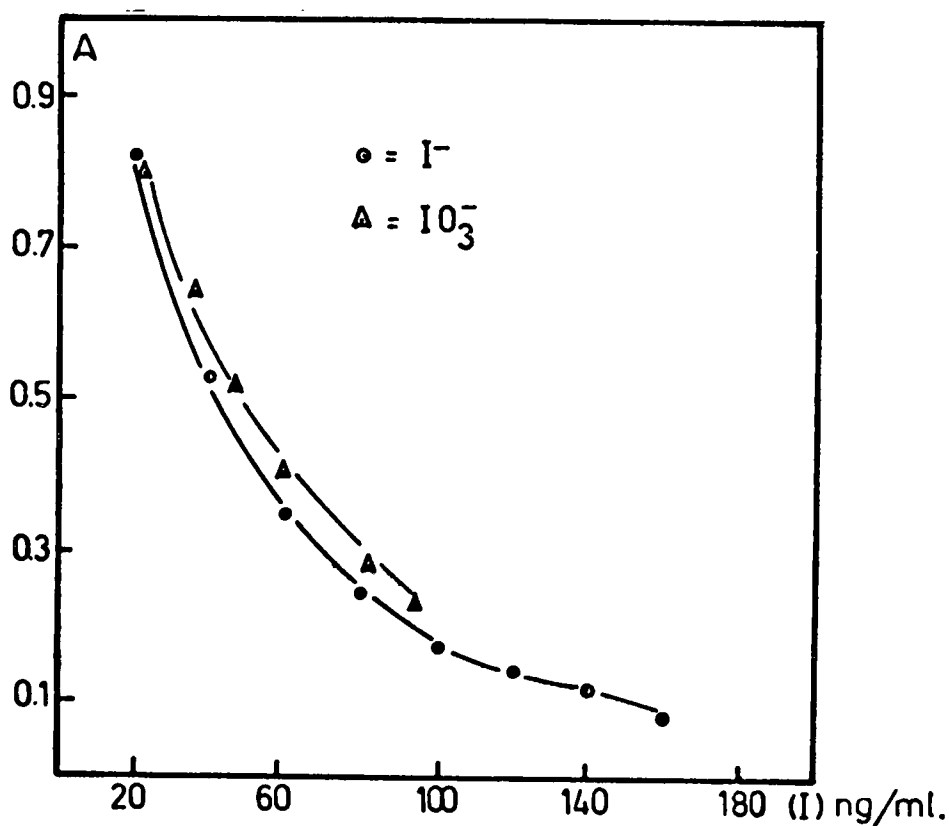


Figura I-4: Curvas de calibración de ioduro e iodato total en solución.

Absorbancia óptica en función de la cantidad de ioduro e iodato presente respectivamente a temperatura constante.

En la figura I-3 están representados los valores correspondientes a dos experiencias efectuadas en diferentes momentos. Las formas de ambas curvas y su superposición, dan prueba clara de la reproducibilidad del método.

Una de las posibles y más frecuentes impurezas que pueden contener las soluciones de Na^{131}I es el iodo pentavalente, en forma de IO_3^- . Teniendo en cuenta que originalmente la puesta a punto del método de valoración se debió a la necesidad de contar con una técnica que nos permitiera conocer en cualquier momento el contenido total de iodo presente en soluciones de ioduro radiactivo, hemos realizado dos curvas simultáneas y en idénticas condiciones experimentales. Una de ellas, tal cual fue descrita anteriormente, utilizando una solución patrón de

KI en concentración igual a 200 μg de I^-/ml , y la otra curva, a partir de una solución patrón de KIO_3 de idéntica concentración de iodo que la anterior. Los resultados obtenidos en una y otra curva se pueden comparar en la figura I-4. Es posible observar que los valores concuerdan satisfactoriamente, dentro de los errores experimentales del método.

I-3-2- VALORACION DE IODO EN MUESTRAS DE ^{131}I "SIN PORTADOR" DE DISTINTO ORIGEN

A través de una parte importante de nuestro trabajo experimental, que está contenido fundamentalmente en el capítulo próximo referido a la marcación de polipéptidos mediante el uso de cloramina-T como agente oxidante, hemos utilizado diferentes muestras de ^{131}I "sin portador". La variedad de las mismas no sólo está referida a su lugar de procedencia, sino también a la partida preparada por la entidad productora del material.

En todas las ocasiones hemos intentado valorar los contenidos reales de iodo al momento de recibir las partidas, realizando, como ya hemos puntualizado anteriormente, la interpolación del valor de la muestra desconocida en una curva de calibración efectuada en forma simultánea.

El dato que nos sirvió de referencia en cada muestra radiactiva fué la concentración de actividad, es decir, la actividad del isótopo expresada en mCi por ml correspondiente a la fecha de preparación de la solución. A partir de ese valor y teniendo en cuenta el fundamento teórico enunciado en la introducción de este capítulo, fué posible determinar el volumen a utilizar en la reacción, de tal manera que, "a priori", pueda estimarse en que ámbito se ubicará el valor final de iodo dentro de la escala correspondiente a la curva de calibración.

TABLA I-4

CONTENIDOS REALES DE IODO EN MUESTRAS DE ^{131}I
 "SIN PORTADOR" DE DISTINTOS ORIGENES

En todos los casos se estudiaron partidas destinadas a la marcación de moléculas orgánicas.

PROVEEDOR	PARTIDA	CONTENIDO REAL DE IODO (ng/ μCi)
A	1	133
	2	525
	3	70
	4	92
	5	133
B	1	270
	2	442
C	1	150
D *	1	95
	2	78
	3	66
	4	110

* C.N.E.A.

I-4.- DISCUSION

Desde el punto de vista de la ejecución práctica del método realizado, conviene discutir algunos detalles técnicos que resultan de importancia para la obtención de resultados reproducibles. La curva de calibración con soluciones patrones de yoduro debe realizarse conjuntamente con cada valoración, a los fines de asegurar que se ha trabajado en idénticas condiciones experimentales.

Cuando se representa la cantidad de iones Ce^{3+} formados en función del tiempo, se obtiene una curva que llega a una meseta, cuya altura es invariable para una concentración dada de ión Ce^{4+} y de ácido arsenioso. Sin embargo, el tiempo necesario para lograr dicha meseta o,

dicho de otro modo, la pendiente inicial de esa curva, depende de la concentración de yoduro y además, en forma muy marcada, de la temperatura a la cual se realiza la reacción. Debido a estas razones, es muy importante trabajar a temperatura constante, por cuanto la reacción se suspende antes de su finalización, es decir, en la primera parte de la curva. Una pequeña variación de la temperatura puede resultar, de acuerdo con este enunciado, en la obtención de datos muy diferentes a lo esperado. Por lo tanto, la temperatura de la reacción y el tiempo de duración de la misma deben elegirse cuidadosamente y mantenerse perfectamente constantes. En esas condiciones, las determinaciones efectuadas por este método tienen un error standard no mayor de $\pm 5\%$, lo que está de acuerdo con el trabajo de Appelby y Spillet (66).

En los ensayos preliminares, realizados con el objeto de fijar la temperatura y el tiempo de reacción óptimos, los valores elegidos (26.5 ± 0.2)°C y 5.00 minutos respectivamente, permiten obtener absorbancias fácilmente determinables en el rango de concentración de yodo usual en las muestras analizadas. En este sentido puede señalarse que, a temperaturas mayores, los tiempos de reacción serían extremadamente cortos, principalmente teniendo en cuenta que las determinaciones por triplicado de cada concentración se realizan en forma consecutiva y, además, cuanto menor sea el tiempo que apliquemos en la reacción, mayor sería la probabilidad de incrementar el error experimental. Por otro lado si trabajásemos a temperaturas menores, tendríamos serias dificultades en realizar la experiencia en el medio ambiente y con baño termostático abierto, pero además y fundamentalmente, las reacciones serían demasiado largas, por lo que resultaría dificultoso asegurar la constancia de la temperatura. Además, en este último caso, utilizando tiempos de reacción menores, las lecturas espectrofotométricas no pueden considerarse fidedignas por cuanto las absorbancias serían demasiado elevadas.

Dado que la impureza radioquímica previsiblemente más importante es el $^{131}\text{I}^-$, hemos efectuado curvas de calibración utilizando

concentraciones conocidas de KIO_3 . Los resultados obtenidos son exactamente equivalentes a los logrados en presencia de I^- , con lo que se comprueba la validez de la reacción (I-2).

En este sentido debe hacerse notar que la cantidad de iodo total formado durante la irradiación de telurio natural, con un flujo determinado de neutrones térmicos, depende del tiempo de irradiación. A su vez, el contenido de iodo total por cada mCi de ^{131}I en una solución de este radioisótopo, en un determinado momento, depende del tiempo transcurrido desde la irradiación (56).

Debemos finalmente señalar que el método elegido reviste importancia práctica en lo que respecta al control de la preparación de soluciones de ^{131}I "sin portador". Por otro lado, el conocimiento del contenido real de iodo de dichas soluciones permite fijar con mayor precisión las condiciones de su posterior utilización en la marcación de polipéptidos o proteínas en general.

CAPITULO II

MARCACION POR EL METODO DE LA CLORAMINA - TII-1.- INTRODUCCION

Existen diferentes métodos mediante los cuales es posible lograr la marcación de sustancias de características proteicas con un isótopo radiactivo. Ya mencionamos al comienzo que las moléculas marcadas se pueden agrupar genéricamente en dos grandes rubros. En el primero, las moléculas se marcan por reemplazo de uno o más átomos de su estructura por isótopos radiactivos del mismo elemento que sustituyen, mediante reacciones químicas y/o biosintéticas. Dentro de este tipo de moléculas marcadas se encuentran también aquellas en las que se introducen dos isótopos radiactivos de diversos elementos. Los dos mecanismos elementales de obtención de dichos compuestos marcados son ya sea el intercambio isotópico, o bien la síntesis orgánica. El ejemplo más típico es el de las moléculas marcadas con ^3H y/o ^{14}C .

El otro rubro comprende todos aquellos procedimientos que conducen a la obtención de sustancias marcadas con un radioisótopos perteneciente a un elemento extraño a la estructura original. Quedaría por aclarar que dentro de estos casos están comprendidas tanto aquellas marcaciones en las cuales existe una sustitución de un elemento por otro, como aquellas en las cuales el elemento extraño radiactivo se agrega a la estructura original, variando su constitución química. Dentro de este último grupo encontramos una amplia variedad de compuestos marcados con ^{131}I o con ^{125}I . Hemos tenido en cuenta muy especialmente todo lo referente a la marcación de moléculas con características proteicas y las consecuencias inmediatas del proceso, para lo cual analizaremos en cada caso los diversos métodos que se utilizan, así como las ventajas o desventajas de cada uno.

La incorporación de ^{131}I a polipéptidos, mediante el empleo de la cloramina-T como agente oxidante (Hunter y Greenwood) (67), se conoce desde hace varios años. Si bien dicha técnica se emplea en forma rutinaria para la marcación de una amplia gama de moléculas, se puede apreciar que,

mediante la aplicación de este método, no siempre los resultados experimentales logrados son reproducibles.

A esta altura conviene aclarar que, a nivel de producción rutinaria de polipéptidos y proteínas marcadas con iodo radiactivo, los métodos del monoclóruo de iodo (68) y de la cloramina-T, han sido los procedimientos de marcación más preconizados. El método del ICl se usa cada vez menos, debido principalmente a que la eficiencia de marcación se hace progresivamente menor a medida que se disminuye la cantidad de proteína utilizada. Por esta razón, se observa una utilización cada vez más intensiva del método de la cloramina-T (67) (69). No obstante ello, también con esta técnica se han observado dificultades que provocaron estudios por parte de algunos autores. Quizás el más importante resulte el trabajo efectuado por Hunter (70), donde llama la atención sobre algunos inconvenientes que se plantean en la marcación.

En efecto, una de las principales causas que pueden ocasionar daños severos a la molécula que se marca es la elevada concentración de cloramina-T (71). En contraposición, una concentración demasiado baja del reactivo oxidante, puede provocar una seria disminución y/o irregularidad del rendimiento de marcación de la proteína. El mecanismo propuesto por el autor para permitir variar la cantidad de proteína y de iodo radiactivo en un extenso rango, a fin de minimizar la concentración de cloramina-T necesaria, y al mismo tiempo predecir el grado de iodación con bastante aproximación, se fundamenta en que la velocidad con que el yoduro se combina con la proteína está relacionada con el potencial "redox" de la mezcla reaccionante. Si bien el método propuesto por Hunter (77), indica las cantidades óptimas de reactivos a utilizar, creemos necesario puntualizar que este procedimiento resulta notoriamente complicado, principalmente para el caso de marcaciones rutinarias.

En el capítulo anterior hemos demostrado que las cantidades totales de iodo presentes en soluciones de ^{131}I utilizadas para la marcación de polipéptidos, pueden ser apreciablemente diferentes y que, además, la actividad específica real de estas soluciones disminuye en

función del tiempo. Resulta evidente que para una determinada cantidad de proteína y de cloramina-T, la presencia de yoduro en el medio resultará variable si utilizamos a lo largo de diferentes experiencias, realizadas a distintos tiempos desde la preparación del ^{131}I , actividades iguales de la misma partida del radioisótopo.

En este sentido consideramos que al efectuar marcaciones, las cantidades de yoduro utilizadas en dos experiencias sólo son exactamente iguales, si el yoduro radiactivo que se aporta a los medios de reacción proviene de la misma muestra y si dichas experiencias son realizadas en forma simultánea. De esta manera logramos eliminar las variaciones en la concentración de yodo presente en la solución de ^{131}I .

Una conclusión implícita en el trabajo de Hunter, y que nosotros compartimos, asignándole además una gran importancia, radica en el hecho de que a fin de mantener la homogeneidad de los preparados marcados, es aconsejable usar no más de 1 o 2 átomos de yoduro por molécula de polipéptido pequeño o proteína respectivamente. Si todos estos átomos fueron radiactivos, resultaría una molécula marcada con una actividad específica lo suficientemente elevada como para provocar fenómenos de radiólisis, debidos a la interacción de la radiación emitida con la sustancia. Por esta razón se prefiere utilizar yoduro portador. En principio, el mismo se encuentra ya presente en la muestra de ^{131}I formando parte del yodo real total, tal cual hemos visto en el capítulo anterior. Si su cantidad se considerase insuficiente, se procederá al agregado de yoduro inactivo al conjunto de reactivos reaccionantes.

En base a estas consideraciones, hemos encarado el estudio de la relación entre la cantidad total de yodo aportada a la reacción y el rendimiento de marcación de los polipéptidos, así como de las características de los productos resultantes. De esta manera intentamos establecer las condiciones óptimas de utilización de preparados de ^{131}I en la marcación de moléculas polipeptídicas.

Debemos, antes de comenzar a relatar la experiencia realiza-

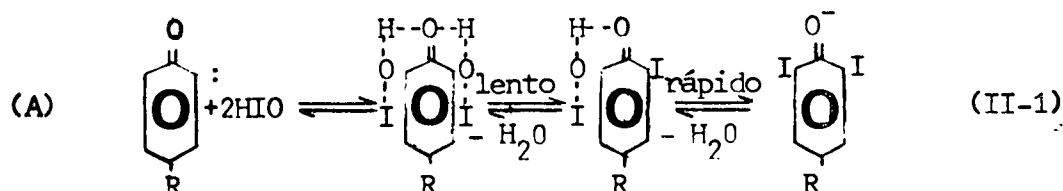
da, dejar aclarado cual es el mecanismo que conduce a la obtención de la sustancia marcada, mecanismo que resulta válido para cualquiera de los isótopos del yodo a utilizar, y, por supuesto, también para la mezcla de los mismos, cualquiera sea la proporción de cada uno en particular.

El fenómeno químico que ocurre durante la iodación, ha sido estudiado hace ya bastante tiempo en forma exhaustiva (72).

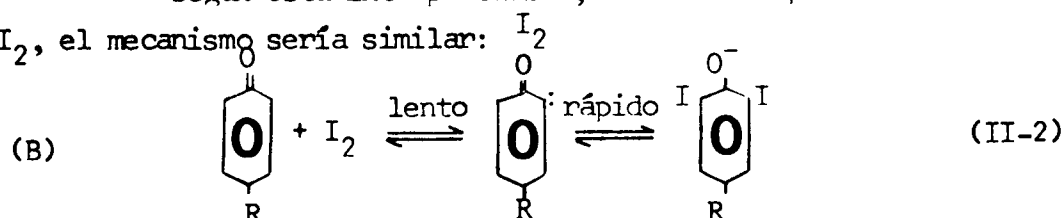
El yodo puede participar en reacciones de sustitución en el anillo bencénico de residuos tirosínicos, en el grupo imidazol de la histidina (73), y en el grupo indol del triptofano (74); también puede oxidar los residuos de cisteína y cistina (73) (74) (75) (76) (77).

En 1945, C.H. Li (78), trabajando con sero-albúmina, ha demostrado que la velocidad de iodación de dicha proteína se encuentra en estrecha relación a la que corresponde a una tirosina libre, cuando el grupo tirosínico involucrado en la reacción es el de mayor asequibilidad. En consecuencia, la interpretación dada por dicho autor (79), acerca de la interacción entre el yodo y la tirosina, se basa en el hecho de que la reacción está condicionada por la formación de moniodotirosina (MIT), dado que esta última, en presencia de yodo, forma instantáneamente el derivado diiodado (DIT).

Esquemáticamente, los pasos serían:

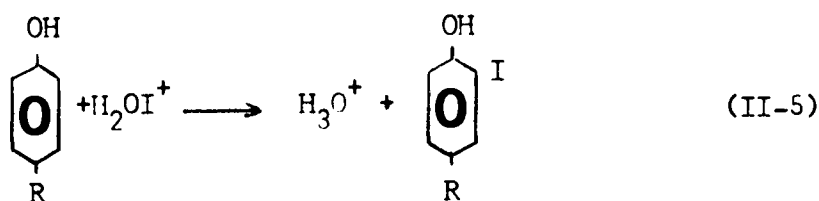
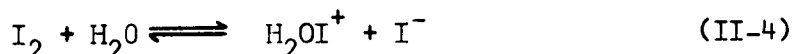
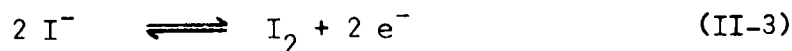


Según esta interpretación, cuando el agente iodante es el I_2 , el mecanismo sería similar:



También surge del modelo propuesto por Li, que el complejo (A) de la ecuación (II-1), resulta más estable que el complejo (B) de la reacción (II-2), debido a la presencia de puentes de hidrógeno. Sin embargo, los resultados obtenidos por Roche y col. (72), especialmente en lo referente a la estabilidad del MIT como intermediario de la iodación total de la tirosina, ponen en duda la validez de la interpretación dada por Li.

De cualquier manera, dejando a un lado en este momento la forma en que participa en la reacción la MIT, podemos decir que se realiza el reemplazo de un átomo de hidrógeno de un núcleo tirosínico (80), por uno de iodo proveniente de un ión H_2OI^+ (81). Este último, se produce como consecuencia de la transformación de I^- a I_2 , por acción del agente oxidante. La reacción global será por lo tanto la siguiente:



Con el fin de realizar el estudio esbozado más arriba, hemos utilizado en una primera instancia, como modelo, la molécula de angiotensina II. Debe señalarse que dicha molécula posee una estructura lineal, y se trata de un polipéptido simple de peso molecular 1150, con un solo residuo tirosínico.

Asp - Arg - Val - Tir - Isoleu - His - Pro - Fenil ala

Posteriormente, con el fin de analizar el problema en una estructura más compleja, efectuamos un estudio similar empleando tirotofina bovina. Dicha molécula tiene un peso molecular aproximado de 25000, y 10 residuos tirosínicos (82). En ambos casos, las experiencias preliminares efectuadas con $10 \mu\text{Ci}$ de Na^{131}I "sin portador", no han demostrado reproducibilidad en los rendimientos de marcación, los cuales, además,

eran relativamente bajos, si se tiene en cuenta la oferta de yoduro frente al total de moléculas polipeptídicas.

Nuestro interés, al efectuar el mismo análisis para moléculas de distintos pesos moleculares y además con diferente grado de complejidad estructural, radicó en la posibilidad de generalizar las conclusiones obtenidas en las marcaciones de angiotensina II con ^{131}I , usando diferentes cantidades de portador.

Estos estudios, también nos permiten llamar la atención, sobre la intensidad con que debe ser encarado el estudio de marcación de cualquier compuesto de naturaleza polipeptídica o proteica, tenga o no actividad fisiológica hormonal.

Por último, en las condiciones señaladas anteriormente, pudimos observar que la incorporación de una pequeña cantidad de una solución recientemente preparada de yoduro de potasio inactivo, mejora sustancialmente el rendimiento de la reacción. En este contexto, hemos estudiado también los efectos producidos por el envejecimiento de los preparados de Na^{131}I sobre el rendimiento de marcación.

II-2.- PARTE EXPERIMENTAL

La técnica seguida en los experimentos que a continuación detallamos, fué realizada, tal como dijimos en la parte introductoria, siguiendo el método de Hunter y Greenwood, que consiste básicamente en incorporar yodo a la molécula polipeptídica, partiendo de I^- y cloramina-T como reactivo oxidante.

II-2-1.- MATERIAL

II-2-1-1.- APARATOS

Fuente de poder Clinicol, con capacidad de variación de la diferencia de potencial entre 200 y 500 V.

Cuba de electroforesis Celogel, con puente de 18 centímetros de largo.

Micropipetas Micro, Long Levy Pipet, Fisher Scientific Co, U.S.A.

Cubas de vidrio de 30 cm x 60 cm con soporte de acero inoxidable para cromatografías descendentes.

Radiocromatógrafo Packard modelo 7201 con sistema sincrónico de integración de áreas.

Estufa de cultivo calibrada a 37°C.

II-2-1-2.- REACTIVOS

- Solución reguladora de fosfatos 0.05 N a pH 7.4. Se preparan para ello las siguientes soluciones:

- a) $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Solución 0.1 M. Se disuelven 1.36 g de la droga en 100 ml de agua bidestilada.
- b) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Solución 0.1 M. Se disuelven 8.90 g de la droga sólida en 500 ml de agua bidestilada. La solución reguladora de fosfatos se obtiene a la concentración deseada mezclando 19.2 ml de a) con 80.8 ml de b).

- Cloramina-T. Solución 3.62 % p/v. Se prepara disolviendo 18.1 mg de la droga en 5 ml de la solución reguladora de fosfatos 0.05 N a pH 7.4.

- Metabisulfito de sodio. Solución 2.4 % p/v. Se prepara a partir de 12 mg de metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) que se disuelven en 5 ml de solución reguladora de fosfatos 0.05 N a pH 7.4.

- Angiotensina II. Solución 0.5 % p/v. Se prepara disolviendo 1 mg de angiotensina II en 0.2 ml de solución reguladora de fosfatos 0.05 N a pH 7.4.

La angiotensina II que utilizamos es sintética (Asp¹, Val⁵-angiotensina II) provista por CIBA de Basilea, Suiza.

-Tirotrofina bovina. Solución 0.5 % p/v. Se prepara de idéntica manera que la solución de angiotensina II.

La tirotrofina bovina equivale a 40 unidades U.S.P. por cada 10 mg de hormona sólida y fué provista para estos estudios por el National Institute of Health de Bethesda, Maryland, U.S.A.

-Solución de Na¹³¹I sin portador. Las diversas muestras de ¹³¹I fueron provistas por CEA-CEN-SORIN (característica de catálogo S-4) de Francia, New England Nuclear (característica de catálogo NEZ-035 H) de Boston, Massachusetts, U.S.A., The Radiochemical Centre, (característica de catálogo IRS-3) de Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra y Comisión Nacional de Energía Atómica (característica de catálogo OI-1310000) de Buenos Aires, Argentina.

En todos los casos las partidas utilizadas fueron las que se aconseja emplear en la marcación de hormonas.

-Solución reguladora de veronal-acetato de sodio-ácido acético 0.1 N pH 8.5. Esta solución se prepara disolviendo 4.4 g de veronal sólido y 4.7 g de acetato de sodio en aproximadamente 500 ml de agua bidestilada. Se adicionan luego 30 ml de ácido acético 0.1 N, y finalmente se completa a 1000 ml con agua bidestilada.

-Solución reguladora tris-ácido maleico-hidróxido de sodio pH 8.2. Se preparan para ello las siguientes soluciones:

- a) Se disuelven 15.0 g de tris [2-amino-2(hidroximetil) propano-1:3-diol] y 14.5 g de ácido maleico en agua bidestilada, en cantidad suficiente para tener un volumen de 250 ml.
- b) Solución de hidróxido de sodio 1 N. Se obtiene disolviendo 40.0 g de NaOH en agua bidestilada en cantidad suficiente para obtener 1000 ml.

La solución reguladora se obtiene mezclando 40 ml de a) más 29 ml de b) y completando a 100 ml con agua bidestilada. Se ajusta el pH a 8.2 con HCl 0.1 N o NaOH 0.1 N según corresponda.

-Pronase. Solución 5 % p/v. Se prepara disolviendo 5 mg de droga en 1 ml de la solución reguladora tris-ácido maleico-hidróxido de sodio pH 8.2.

Se utilizó Pronase grado B, marca Calbiochem de Los Angeles, California, U.S.A.

-Metilmercapto-imidazol. Solución 22 % p/v. Se prepara disolviendo 55 mg de droga en 2.5 ml de la solución reguladora tris-ácido maleico-hidróxido de sodio pH 8.2.

-Butanol saturado con ácido acético 2 M (2:1). Se mezclan en una ampolla de decantación 2 partes de butanol de uso cromatográfico, con 1 parte de solución de ácido acético de uso cromatográfico 2 M. Se agita hasta obtener una emulsión, y se deja en reposo el tiempo necesario para que se obtengan dos fases perfectamente delimitadas. En ese momento se separan ambas fases valiéndose de la ampolla de decantación, obteniéndose por un lado la fase acuosa que es la inferior y primera en decantar, y por otro lado la fase alcohólica que es la superior.

II-2-1-3.- PRECAUCIONES

Con el fin de obtener resultados válidos, es conveniente tener en cuenta los siguientes detalles:

-Todas las soluciones reguladoras deben mantener, desde el momento de su preparación, el valor de pH preestablecido, para lo cual es necesario controlarlas mediante pHímetro luego de su preparación y corregir la diferencia que pudiese observarse. Además es aconsejable repetir dicho control, cada vez que sean utilizadas, con lo cual se constata su correcto estado de conservación.

-Estas soluciones deben permanecer refrigeradas hasta su

utilización. Un correcto uso de cualquiera de estas soluciones obliga a retirarlas del refrigerador y mantenerlas en el lugar de trabajo el tiempo necesario para estabilizar su temperatura con la del ambiente.

-Las soluciones de angiotensina II, tirotrófina bovina, cloramina-T y metabisulfito de sodio, deben ser preparadas momentos previos a su utilización, a fin de evitar su descomposición. Ello justifica que las cantidades a preparar en cada oportunidad sean las mínimas posibles, extremando por tal motivo las medidas tendientes a evitar al máximo cualquier error en los valores de concentración.

-La solución de metilmercapto-imidazol puede ser utilizada durante 15 días, si se tiene la precaución de conservarla en frasco color caramelo y en refrigerador.

II-2-2.- METODO

II-2-2-1.- VALORACION DE IODO EN LAS SOLUCIONES DE Na^{131}I

La actividad específica real de todas las muestras de Na^{131}I utilizadas fue determinada experimentalmente de acuerdo a la técnica que hemos detallado en el capítulo anterior.

II-2-2-2.- MARCACION

Las concentraciones indicadas anteriormente para los reactivos que participan en la reacción de marcación fueron tomadas de un trabajo de Gocke y col. (83).

Se trabaja en todo momento con material de vidrio siliconado, a fin de evitar problemas de adsorción de las hormonas utilizadas, debido a las pequeñas concentraciones que se utilizan.

Los distintos pasos que componen una experiencia de marcación se detallan según el siguiente orden:

1) Se coloca en el fondo de un tubo de hemólisis 5 μ l de la solución del polipéptido a marcar. De acuerdo con el método, utilizamos en la experiencia 25 μ g de hormona, sea angiotensina II o bien tirotrófina bovina.

2) Se incorpora la muestra de iodo a utilizar en la reacción. En cada oportunidad, el volumen correspondiente a ^{131}I "sin portador" fué calculado teniendo en cuenta el decaimiento radiactivo, de manera de contar con actividades del orden de 10 μCi de ^{131}I como trazador de la reacción.

3) Se añaden 100 μ l de la solución de iodo portador en la concentración a utilizar. Las diluciones necesarias para toda la serie de concentraciones de iodo total, correspondientes a una experiencia en la cual se quiere marcar la angiotensina II, se obtienen según el siguiente esquema:

TABLA II-1

PREPARACION DE SOLUCIONES PORTADORAS UTILIZADAS EN
LOS TUBOS DE MARCACION DE ANGIOTENSINA II

Dilución de la Sol. patrón (200 $\mu\text{g/ml}$)	Tubo -	Solución portadora ml	H ₂ O bides- tilada ml	portador en 0.10 ml ng
1:1000	A	0.00	1.00	0
"	B	0.10	0.90	1
"	C	0.30	0.70	3
"	D	0.50	0.50	5
"	E	1.00	---	10
1:100	F	0.15	0.85	15
"	G	0.20	0.80	20
"	H	0.30	0.70	30
"	I	0.40	0.60	40

La preparación de las muestras de portador que fueron utilizadas cuando se trató de marcar la tirotrofina bovina están indicadas en la Tabla II-2.

TABLA II-2

PREPARACION DE SOLUCIONES PORTADORAS UTILIZADAS
EN LOS TUBOS DE MARCACION DE TIROTROFINA BOVINA

Dilución de la Sol. patrón (200 µg/ml)	Tubo -	Solución portadora ml	H ₂ O bides- tilada ml	portador en 0.10 ml ng
1:10	A	0.00	1.00	0
"	B	0.20	0.80	200
"	C	0.30	0.70	300
"	D	0.60	0.40	600
"	E	0.90	0.10	900
original	F	0.12	0.88	1200
"	G	0.15	0.85	1500
"	H	0.18	0.82	1800
"	I	0.20	0.80	2000

4) Se agregan 10 µl de la solución de cloramina-T, tratando que la adición se realice sin que quede parte del reactivo en la pared del tubo. Se comienza a agitar inmediatamente y durante 30 segundos.

5) Se interrumpe la acción oxidante de la cloramina-T, o bien su eventual exceso, mediante el agregado de 80 µl de la solución de metabisulfito de sodio.

Los pasos 1), 2), 3) y 4), se realizan midiendo los volúmenes con micropipetas de escurrido total, en tanto que en el paso 5) se realiza la medición con pipeta de 0.1 ml con graduación de 0.001 ml.

Es conveniente que para los pasos 4) y 5), sean dos las personas que estén dispuestas a efectuarlos, ya que mientras una agrega la solución de cloramina-T y agita constantemente el tubo de reacción durante 30 segundos, la otra se encuentra dispuesta a neutralizar la reacción con el agregado de metabisulfito.

De esta manera, aún cuando la reacción que involucra el I^- , la cloramina-T, y la muestra a marcar, se completa en un tiempo inferior al establecido, hemos preferido sistematizar el agregado del metabisulfito de sodio a fin de descartar un probable error.

II-2-2-3.- DETERMINACION DEL RENDIMIENTO DE REACCION

Una alícuota de la solución final de cada tubo se siembra en papel Whatman nº 1, cortado en tiras de 3 cm x 26 cm. Dicha siembra se efectúa a 6 cm de uno de los extremos y se realiza una electroforesis orientando la corrida hacia el polo positivo de la cuba, a una diferencia de potencial de 12.0 V/cm durante 60 minutos, empleando la solución reguladora de veronal-acetato de sodio-ácido acético 0.1 N, pH 8.6.

Al cabo de este tiempo, la corrida electroforética separa el polipéptido, que queda en la siembra, del ioduro inorgánico remanente en la solución final de reacción. El desplazamiento que corresponde en estas condiciones, es de aproximadamente 10 cm entre el punto de siembra y el pico correspondiente al ioduro. La zona correspondiente al polipéptido está constituida por una mezcla de hormona radiactiva y hormona no marcada. La determinación cuantitativa del rendimiento de la reacción de marcación fue realizada estableciendo el porcentaje de radiactividad de cada uno de los picos. Para ello, previo secado espontáneo de la tira de papel, se registró en un radiocromatografo Packard, modelo 7201, las actividades correspondientes a ambas zonas de la electroforesis. El equipo de referencia consta de dos tubos de medición de radiaciones colimados con distintas aberturas. En nuestro caso hemos utilizado una abertura de 25 mm de ancho por 1 mm de largo, ya que de esta manera se define con la mejor resolución cada zona radiactiva.

Por medio de un sistema mecánico, que actúa a velocidad constante, pasamos la tira de papel entre ambos colimadores y la radiación que a través de ellos llega a los tubos de medición, se suma y amplifica y por último queda registrada (Figura II-1) en un sistema de integración de actividad. Ello permite, no solo observar visualmente la forma y separación de cada pico radiactivo, sino también calcular el porcentaje de yodo unido al polipéptido y el porcentaje de yodo libre, en comparación al total de yodo radiactivo.

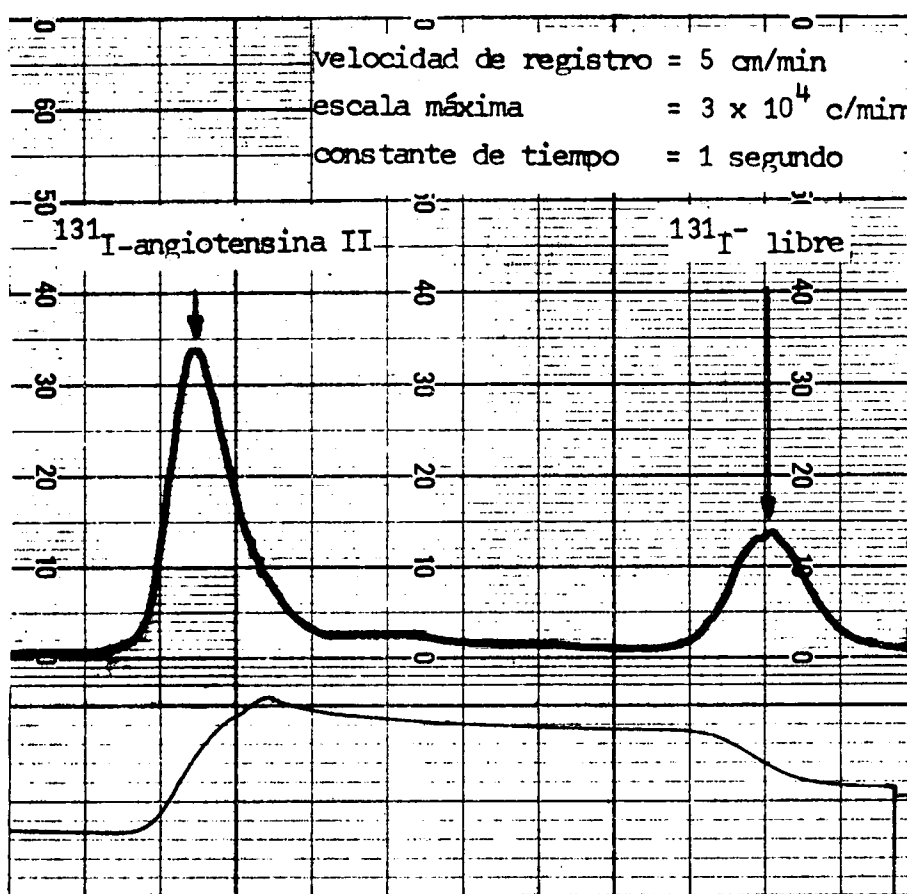


Figura II-1.- Separación electroforética de los componentes radiactivos presentes a continuación de una reacción de marcación de angiotensina II. La imagen corresponde al registro impreso automáticamente por el radiocromatógrafo.

II-2-2-4.- DETERMINACION DE RESIDUOS TIROSINICOS MONO Y DIODADOS

Simultáneamente con el control de la reacción de marcación, se efectúa la hidrólisis total del polipéptido, según el siguiente esquema:

- 1) Se colocan 0.2 ml de la solución radiactiva en el fondo de un tubo de hemólisis.
- 2) Se agregan 0.1 ml de la solución de Pronase al 5 % p/v.
- 3) Con el objeto de proteger el polipéptido marcado de una posible liberación de yodo, se adicionan 0.05 ml de la solución de metilmercapto-imidazol al 20 % p/v.
- 4) Se mantiene la hidrólisis en estufa de incubación a 37° C durante 2 horas, procurando previamente que los distintos componentes incorporados formen una solución homogénea.

Finalizada la incubación, se preparó una cromatografía en papel Whatman nº 1 cortado en tiras de 4 cm x 48 cm, efectuando la siembra del material hidrolizado a 10 cm del extremo que queda introducido en la cubeta, que contiene como solvente butanol-ácido acético 2 M (2:1). La cromatografía es descendente y la saturación de la cuba cromatográfica se efectuó dejando el solvente preparado fresco durante 24 horas previas a la realización de la corrida. Al mismo tiempo, la fase acuosa remanente en la preparación del solvente se depositó en un cristalizador en el fondo de la cuba, para completar el sistema de saturación de la misma.

La corrida cromatográfica se efectuó durante 16 horas. Al cabo de dicho tiempo, el frente del solvente avanza aproximadamente 30 cm de longitud, medidos a partir del lugar de siembra. La ubicación de los distintos componentes del hidrolizado, medida la radiactividad de la tira de papel a través del radiocromatógrafo (Figura II-2), responde a los siguientes valores de Rf:

Ioduro libre	(I ⁻)	=	0.28
Moniodotirosina	(MIT)	=	0.61
Diiodotirosina	(DIT)	=	0.74

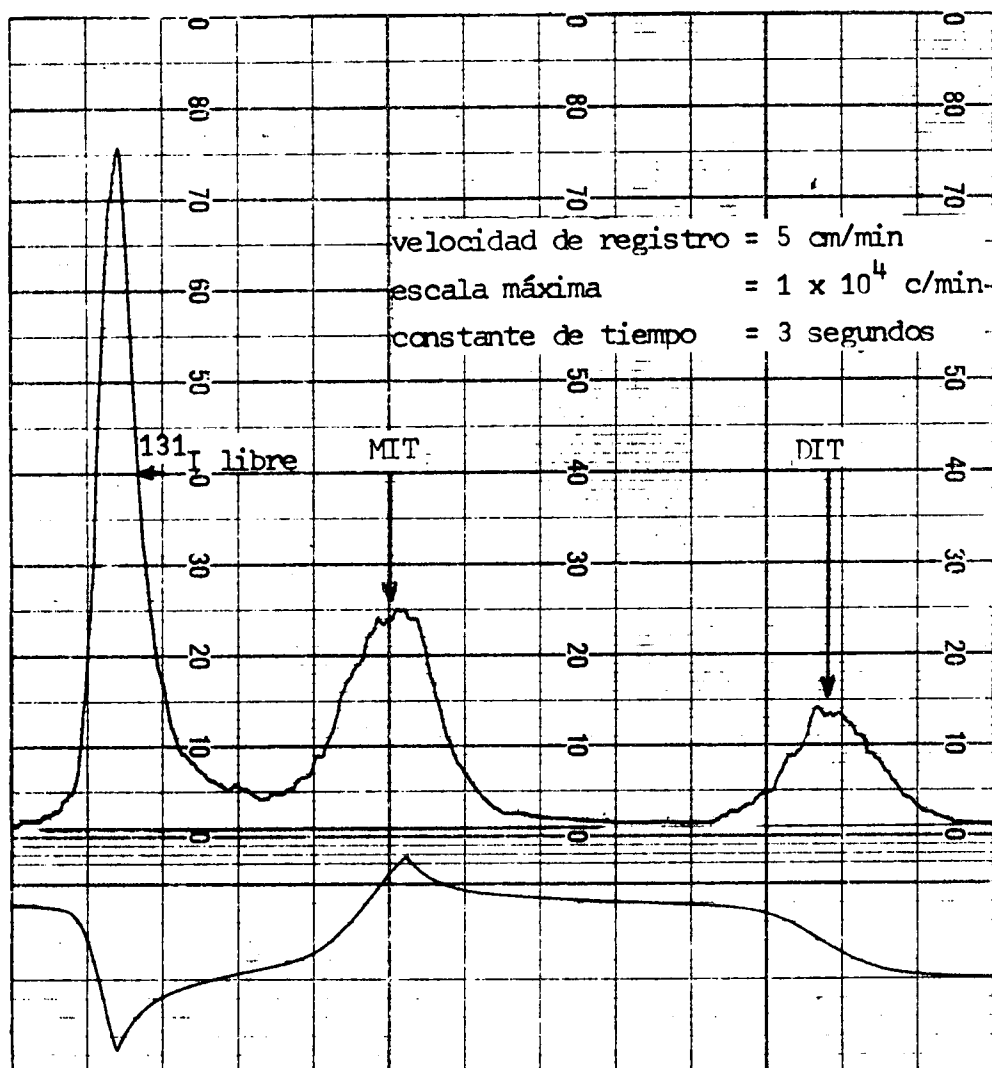


Figura II-2.- Separación electroforética de los componentes radiactivos presentes a continuación de la hidrólisis enzimática de una muestra de angiotensina II marcada. La imagen corresponde al registro impreso automáticamente por el radio-cromatógrafo.

Aunque las dos últimas zonas radiactivas se encuentran relativamente próximas, se las obtiene perfectamente definidas, siguiendo las mismas condiciones de utilización del radiocromatógrafo que en el caso de las mediciones de las tiras electroforéticas.

II 3.- RESULTADOS

II-3-1.- MARCACION DE LA ANGIOTENSINA II

El total de experiencias realizadas para la angiotensina II fueron 20. Cada una de estas experiencias comprende la realización, por triplicado, de marcaciones con nueve cantidades totales de iodo diferentes. Si representamos el rendimiento porcentual de la marcación de angiotensina II con ^{131}I , en función de la relación de nanoátomos-gramo de yoduro por cada nanomol de angiotensina II, obtenemos una curva que alcanza valores de rendimiento porcentual superiores a 90 % y donde la dispersión estadística (error standard) de los diferentes puntos representados es fundamentalmente mayor en los resultados obtenidos en la parte inicial de la curva.

Cabe hacer notar, que no existen variaciones llamativas en los resultados obtenidos utilizando distintas partidas de ^{131}I , siempre que éstas mantengan los requisitos de pureza establecidos para su utilización; tampoco hemos encontrado diferencias al emplear muestras de iodo radiactivo de procedencia variada. Por lo tanto, en los puntos de la curva que se indican en la figura II-3 A, y que son los promedios de las 20 experiencias, no hemos efectuado una discriminación en base al origen de la muestra de ^{131}I utilizada.

En la figura II-3 B, se pueden observar los resultados logrados con muestras de ^{131}I producidas en los laboratorios de la Comisión Nacional de Energía Atómica. Resulta evidente que los datos obtenidos no difieren significativamente de los logrados con preparados de otra procedencia.

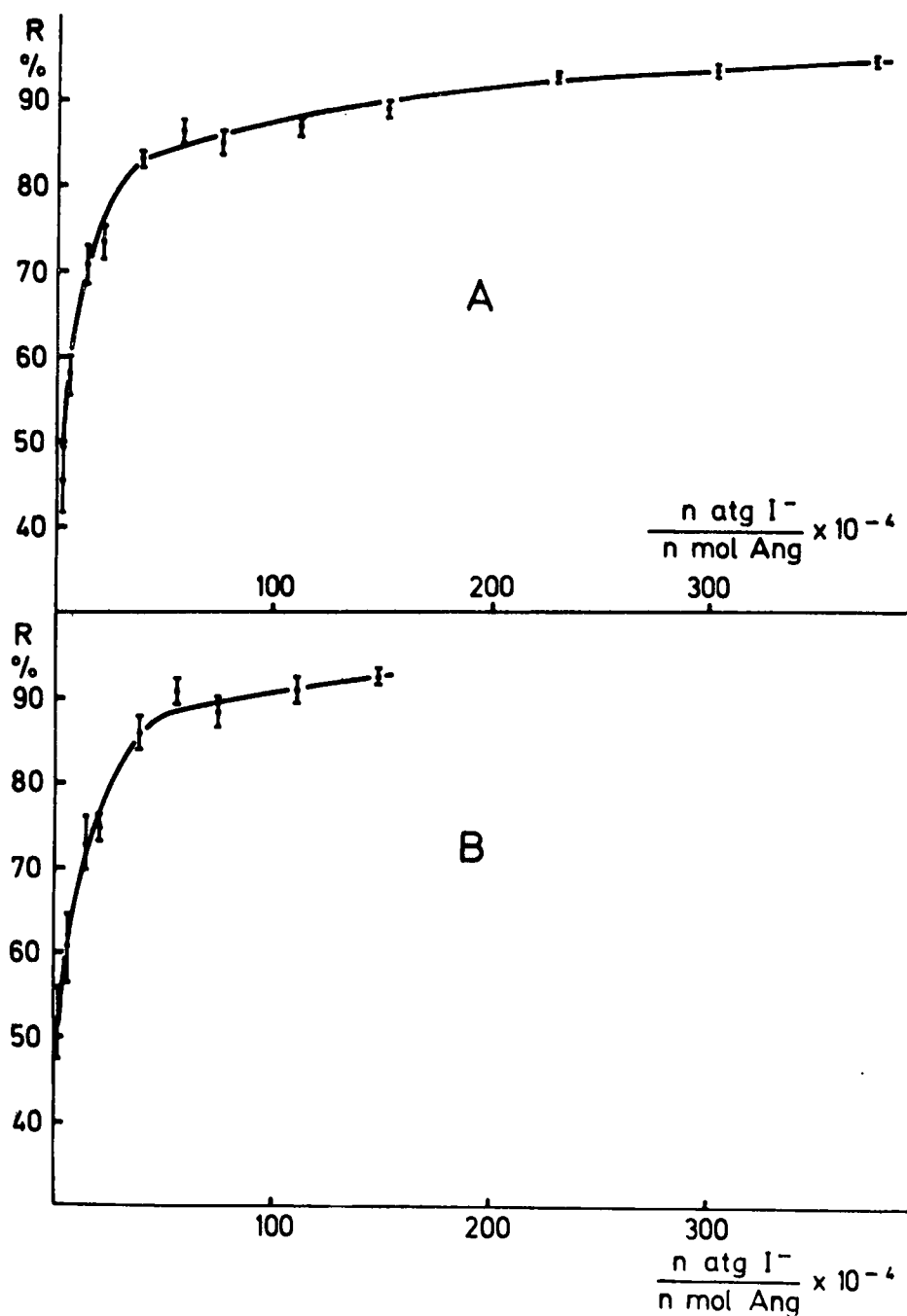


Figura II-3.- Marcación de angiotensina II.

Rendimiento porcentual de marcación de angiotensina II con ^{131}I (R %) en fun-

- ción de la relación de nanoátomos -gramo de yoduro por cada nanomol de angiotensina II.

Los resultados logrados en el análisis cromatográfico de los productos hidrolizados están representados como la relación porcentual de la actividad de la monoiodotirosina con respecto a la actividad total de monoiodotirosina y diiodotirosina. Dicha relación es equivalente a la relación porcentual de actividad de monoiodoangiotensina, con respecto a la actividad total de las moléculas marcadas, como podemos observar en la figura II-4.

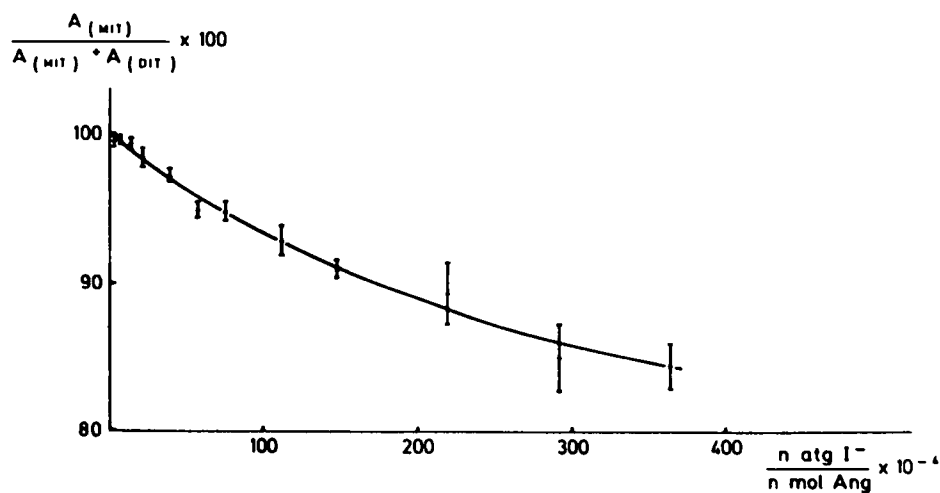


Figura II-4.- Actividad relativa porcentual de monoiodotirosina en angiotensina II marcada.
Relación porcentual de la actividad de la monoiodotirosina con respecto a la actividad total de monoiodotirosina y diiodotirosina en función de la relación de nanoátomos-gramo de yoduro por cada nanomol de angiotensina II.

Como se puede apreciar, la proporción relativa de la actividad de monoiodoangiotensina decrece, en forma poco importante, a expensas del derivado diiodado, cuando se aumenta progresivamente la cantidad relativa de yoduro portador en la marcación.

II-3-2.- MARCACION DE TIROTROFINA BOVINA

Cuando comenzamos a marcar la tirotrófina bovina, partimos de la suposición de que si en alguna medida se reproduce lo observado para el caso de la angiotensina II, nos encontraríamos ante la necesidad de realizar un aporte mayor de átomos de yodo, que el realizado para la angiotensina II. En efecto, debimos tener en cuenta que de la utilización de una molécula de peso 1150 y un solo residuo tirosínico, pasamos a emplear una hormona polipeptídica de peso molecular aproximado a 25000, y que posee 10 residuos tirosínicos. De todas maneras, resulta necesario indicar que en ningún momento se tuvo en claro cuál es la asequibilidad de los residuos tirosínicos en la molécula total, y cuál es la facilidad de incorporación de yodo con respecto a la incorporación de yodo en la angiotensina II.

Bajo estos preceptos, las primeras experiencias involucraron incorporaciones de yoduro portador en los tubos de reacción, del orden de 0 ng hasta 40 ng, con lo cual, a pesar de observar un ligero incremento de los rendimientos de marcación, dicho mejoramiento no resultaba de ninguna manera concluyente. Este resultado es enteramente previsible, si se analizan más a fondo las condiciones de la experiencia.

En efecto, si calculamos la relación molar entre el yodo aportado y la cantidad de hormona utilizada en estas experiencias preliminares, vemos que esta relación resulta tan pequeña que se justificaba incrementar notablemente la cantidad total de yodo aportado a la reacción; finalmente las cantidades límites utilizadas, tal cual vimos en la tabla II-2, varían entre 0 y 2000 ng de yoduro totales.

La curva de rendimiento porcentual de la marcación de tirotrófina con ^{131}I en función de los nanoátomos-gramo de yoduro incorpo-

rados por cada nanomol de tirotrófina se encuentra en la figura II-5, en la que se indican los valores medios logrados con Na^{131}I de las diferentes procedencias indistintamente.

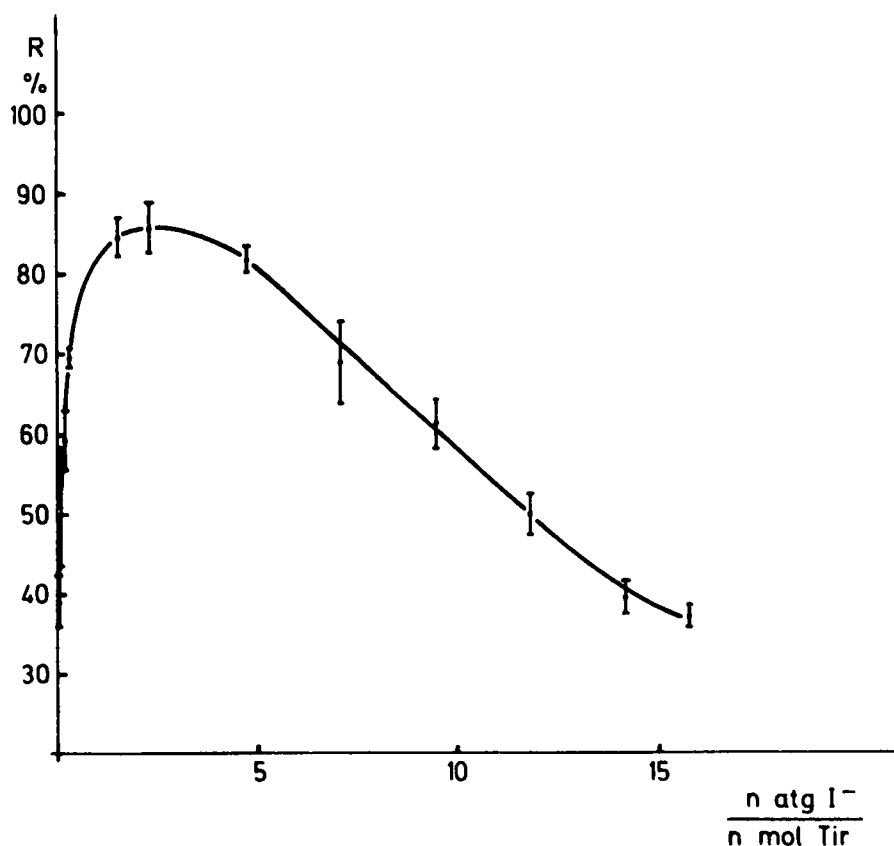


Figura II-5.- Marcación de tirotrófina bovina.

Rendimiento porcentual de marcación de tirotrófina bovina con ^{131}I (R %), en función de la relación de nanoátomos-gramo de yoduro por cada nanomol de tirotrófina bovina.

Se puede apreciar un máximo de rendimiento bastante bien definido, de aproximadamente 85 % para valores comprendidos entre 1.5 y 3 nanoátomos-gramo de yoduro por nanomol de tirotrófina.

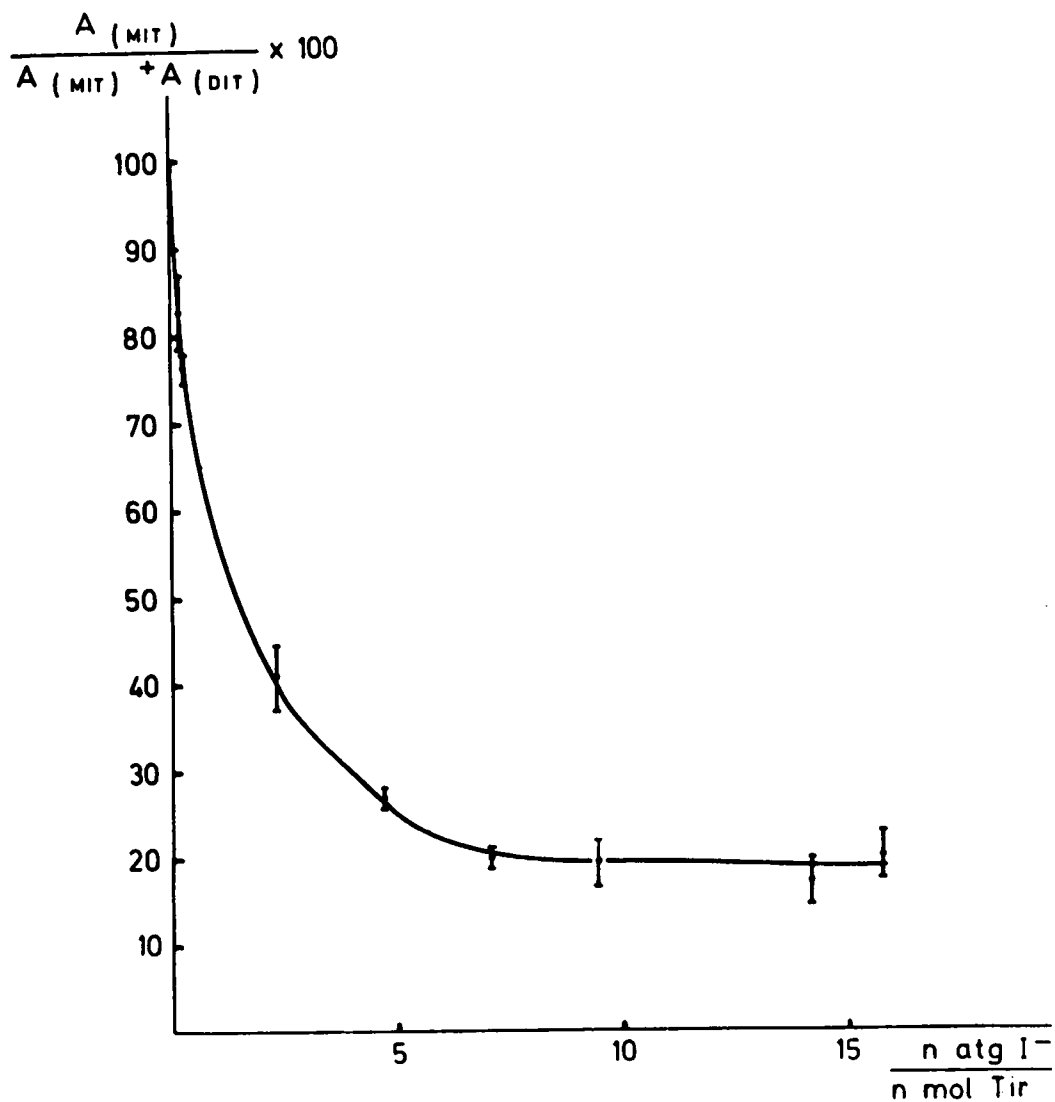


Figura II-6.- Actividad relativa porcentual de monoiodotirosina en tirotrófina bovina marcada.

Relación porcentual de la actividad de la monoiodotirosina con respecto a la actividad total de monoiodotirosina y diiodotirosina en función de la relación de nanoátomos-gramo de yoduro por cada nanomol de tirotrófina bovina.

Por otra parte, en la figura II-6 hemos indicado la relación de la actividad de la moniodotirosina, con respecto a la actividad total de moniodotirosina y diiodotirosina, obtenidas ambas por hidrólisis total del polipéptido.

Puede observarse un descenso significativo de la proporción de la actividad de la moniodotirosina, lo que implica que en la zona de rendimiento máximo, la actividad relativa de moniodotirosina desciende del 50 % al 35 %.

II-3-3.- DETERMINACION DE LA PROPORCION DE MOLECULAS MONIODADAS Y DIIODADAS

Hasta este momento nos hemos interesado con intensidad en el rendimiento de la reacción de marcación y en la proporción de residuos mono y diiodados presentes en la totalidad de residuos tirosínicos.

A los efectos de interpretar nuestros resultados, debemos recordar que se entiende por grado de iodación (G.I.), al número de átomos de iodo incorporados a una molécula proteica o polipeptídica. Resulta importante aclarar que cada residuo tirosínico admite como máximo 2 átomos de iodo. En este sentido corresponde asimilar esta definición a nuestras condiciones experimentales.

El rendimiento de la reacción de marcación se determina a partir de la relación porcentual entre el iodo radiactivo unido a la molécula polipeptídica y el iodo radiactivo total. Aún cuando la presencia de iodo inactivo como portador, signifique que en el total de moléculas marcadas, una parte lo será con iodo radiactivo y otra parte con iodo no radiactivo, estadísticamente la distribución de ambas partes debe ser considerada proporcional en el iodo unido al polipéptido y en el iodo libre. Por lo tanto:

$$\text{Rendimiento de marcación \%} = \frac{\text{iodo unido al polipéptido}}{\text{iodo total}} \times 100$$

$$R \% = \frac{I - \text{polipéptido}}{I_{\text{total}}} \times 100 \quad (\text{II-6})$$

En la práctica esto se reemplaza, en base a lo dicho precedentemente, por la siguiente relación:

$$R \% = \frac{^*I - \text{polipéptido (c/min)}}{^*I - \text{polipéptido (c/min)} + ^*I_{\text{Libre (c/min)}}} \times 100 \quad (\text{II-7})$$

donde *I simboliza el yodo radiactivo.

Conociendo la cantidad total de yoduro presente al momento inicial de la reacción, resulta:

$$G.I. = \frac{\text{n}^\circ \text{ de átomos - gramo de } I^-}{\text{n}^\circ \text{ de moles de polipéptido}} \times \frac{R \%}{100} \quad (\text{II-8})$$

Esta forma de expresar matemáticamente el grado de iodación, es útil cuando queremos analizar, no solamente el rendimiento que se obtiene al cabo de una reacción de marcación, sino, fundamentalmente, el número de átomos de yodo que se han incorporado a cada molécula.

En el caso particular de la angiotensina II, sabemos que existe un solo núcleo tirosínico, por lo que el número de moléculas de polipéptido es equivalente al número de residuos tirosínicos existentes. Admitiendo que las únicas especies que se forman son los derivados mono y diiodados, los límites extremos del grado de iodación que se pueden obtener, van desde G.I. = 0.0 hasta G.I. = 2.0. Esto no significa que al decir que una determinada muestra marcada posee un G.I. = 1, debemos interpretar que el 100 % de las moléculas presentes se encuentren como monoiodadas, sino que existirá una mezcla formada por moléculas no marcadas, moléculas marcadas con un solo átomo de yodo, y moléculas marcadas con dos átomos de yodo. Lo que sí resulta definitorio es que la proporción de cada una en dicha mezcla, nos brinda un promedio ponderado que corresponde matemáticamente a un G.I. = 1.

Podemos ahora calcular el porcentaje de moléculas monoiodadas y el porcentaje de moléculas diiodadas, referidas al total de mo-

l culas de polipéptido presentes. La actividad porcentual de monoiodo tirosina ($A\%_{MIT}$) se calcula a partir de la expresión:

$$A\%_{MIT} = \frac{A_{MIT} \text{ (c/min)}}{A_{MIT} \text{ (c/min)} + A_{DIT} \text{ (c/min)}} \times 100 \quad (\text{II-9})$$

Asimismo, la actividad porcentual de la diiodotirosina ($A\%_{DIT}$) será:

$$A\%_{DIT} = \frac{A_{DIT} \text{ (c/min)}}{A_{MIT} \text{ (c/min)} + A_{DIT} \text{ (c/min)}} \times 100 \quad (\text{II-10})$$

De lo dicho, podemos deducir que:

$$MIA \% \text{ molecular} = A\%_{MIT} \times G.I. \quad (\text{II-11})$$

$$DIA \% \text{ molecular} = \frac{1}{2} A\%_{DIT} \times G.I. \quad (\text{II-12})$$

$$ANG \% \text{ molecular} = 100 - (MIA \% \text{ molecular} + DIA \% \text{ molecular}) \quad (\text{II-13})$$

donde MIA % molecular es el número de moléculas consideradas como monoiodadas en un total de 100.

DIA % molecular es el número de moléculas consideradas como diiodadas en un total de 100.

ANG % molecular es el número de moléculas no marcadas en un total de 100.

Al calcular una cantidad de moléculas, usando como dato la radiactividad medida, estamos estableciendo como condición que dicha medición en cuentas/minuto es proporcional a la cantidad de iodo presente. En el caso de la actividad medida correspondiente al derivado monoiodado, esta premisa es lógica, cualquiera sea la proporción en que se encuentren en esa muestra el iodo activo y el inactivo, si aceptamos una distribución estadísticamente homogénea entre ambas partes, de la misma

manera que ocurre al establecer el grado de iodación.

Debemos tener el mismo criterio al calcular el número de moléculas diiodadas presentes. Pero en este caso corresponde una aclaración ulterior.

Si bien en el caso de los derivados diiodados, la presencia de dos átomos de yodo radiactivo en el mismo residuo tirosínico es poco probable, en especial cuando en el medio contamos con yodo portador agregado, resulta lógico admitir que, estadísticamente, la probabilidad de incorporar yodo radiactivo al residuo tirosínico, se duplica en el caso del derivado diiodado, siempre que ambos componentes marcados, se formen a partir de una única composición homogénea inicial de la solución de yoduro.

De lo mencionado más arriba, se deduce que en el cálculo del porcentaje de moléculas de angiotensina diiodadas (fórmula II-12), la actividad porcentual de MIT debe dividirse por dos, al referirse al valor molecular por ciento.

En las condiciones de trabajo detalladas, nos es imposible discriminar la distribución de ambos tipos de yodo (radiactivo e inactivo) presentes en las tirosinas iodadas, obtenidas por cromatografía del hidrolizado.

El criterio enunciado avala la deducción de las ecuaciones indicadas precedentemente.

Debemos señalar que todas estas consideraciones sólo poseen un sentido estadístico y no pueden aplicarse al tratamiento de una molécula polipeptídica en forma individual.

Sin embargo, debe resultar absolutamente claro que solamente en el caso de moléculas como la angiotensina, que poseen un solo residuo tirosínico, la proporción de moléculas mono y diiodadas se puede calcular unívocamente a partir de la actividad porcentual de MIT y de DIT (fórmulas II-11 y II-12).

Es criterio general (48) considerar que cualquier molécula polipeptídica marcada con iodo radiactivo, empleada como trazador, no debería contener más de un átomo de iodo por molécula, para que su comportamiento resulte asimilable al de su equivalente nativo. Si bien esta condición generalmente se evalúa a partir de una determinación del grado de iodación (que debería ser menor o igual a 1), resulta evidente en base a lo dicho anteriormente, que este solo parámetro no es suficiente para garantizar la ausencia de polipéptidos marcados con más de un átomo de iodo por molécula. Este problema se complica aún más cuando la estructura en estudio posee más de un residuo tirosínico.

Si se efectúa un análisis semejante con la tirotrofina bovina, debemos introducir un factor adicional, derivado del hecho de que dicha molécula posee más de un residuo tirosínico. Es evidente que para asimilar el análisis al efectuado con la angiotensina, deberíamos determinar la proporción de moléculas de tirotrofina marcadas con uno hasta veinte átomos de iodo.

Independientemente del número total de átomos de iodo que tenga incorporado una determinada molécula de tirotrofina, el método experimental nos permite dilucidar solamente la proporción de residuos tirosínicos con 0, 1 o 2 átomos de iodo en su estructura.

Por lo tanto, fué necesario aplicar un criterio restringido y determinar solamente la proporción del número de residuos tirosínicos mono y diiodados, en base molecular de tirotrofina. Para ello es necesario simplemente dividir las fórmulas II-11 y II-12 por el número de residuos tirosínicos presentes en la molécula (T), y el resultado nos proveerá de un valor estadístico de la proporción de residuos tirosínicos mono y diiodados, por cada molécula de tirotrofina.

En consecuencia las expresiones correspondientes a este caso serían:

$$\text{MIA \% molecular} = A \%_{\text{MIT}} \times \frac{\text{G.I.}}{T} \quad (\text{II-14})$$

$$\text{DIA \% molecular} = \frac{1}{2} A \%_{\text{DIT}} \times \frac{\text{G.I.}}{T} \quad (\text{II-15})$$

En el caso específico de la tirotrófina bovina, T es igual a 10.

II-3-4.- INFLUENCIA DEL ENVEJECIMIENTO DE LOS PREPARADOS DE ^{131}I

En las experiencias descritas hasta ahora, se han utilizado en todo momento soluciones de yoduro portador preparadas inmediatamente antes de su uso. En cambio, en algunas experiencias realizadas a tal efecto, hemos empleado solución de yoduro radiactivo proveniente de una misma partida, pero a diferentes tiempos. En este caso, como hemos mencionado precedentemente, la cantidad real de yoduro portador presente en esa solución varía. Este hecho, dio lugar a analizar si realmente el envejecimiento del Na^{131}I pudo haber introducido algún efecto en los rendimientos de marcación, para distintas cantidades reales de yoduro aportados a la reacción.

Se realizaron varias series de marcaciones en las cuales fue utilizada, en más de una oportunidad, una misma partida de Na^{131}I .

Referiremos lo que aconteció con la marcación de la angiotensina II. Hemos analizado los datos obtenidos con dos partidas de yodo, cada una de las cuales fue utilizada en dos experiencias distintas, a intervalos de tiempo similares entre la fecha de preparación del Na^{131}I (dato que invariablemente es provisto por el respectivo productor) y el momento de su utilización.

Los datos se encuentran ordenados en la tabla II-3. En la columna de yodo total hemos tenido en cuenta, en cada caso, el yodo portador y el perteneciente al propio yoduro radiactivo. Este último dato se obtuvo a partir de la valoración de yodo total y el período de semidesintegración del isótopo radiactivo. Así resulta que, para la partida que en la tabla II-3 hemos individualizado convencionalmente como nº 1, la actividad de ^{131}I incorporada a cada reacción, estaba contenida en un volumen en el que la cantidad total de yodo fue de 0.42 ng a la fecha de la experiencia, en tanto que 6 días después, para la mínima actividad incorporada, dicha cantidad correspondió a un total de 0.53 ng de yodo.

TABLA II-3

RENDIMIENTO DE MARCACION DE LA
ANGIOTENSINA II EN FUNCION DEL TIEMPO

PARTIDA *	t	Iodo Total	Rendimiento
-	días	ng	%
1	8	0.42	49.6
		1.42	52.5
		3.42	62.4
		5.42	72.8
		10.42	81.7
		15.42	84.9
		20.42	80.0
1	14	0.53	62.5
		1.53	55.8
		3.53	71.5
		5.53	79.5
		10.53	82.9
		15.53	84.3
		20.53	85.9
2	8	0.55	39.3
		1.55	53.9
		3.55	66.9
		5.55	73.5
		10.55	81.0
		20.55	84.2
		30.55	83.7
2	16	40.55	89.6
		1.1	28.3
		2.1	32.2
		4.1	39.9
		6.1	64.5
		11.1	74.9
		21.1	77.2
		31.1	79.5
		41.1	85.0

* Nomenclatura convencional

En el caso de la partida señalada con el n° 2, vemos claramente que entre una experiencia y la siguiente han transcurrido 8 días, lo que es equivalente a un período de semidesintegración del ^{131}I . Puede deducirse que en ambos casos, hemos utilizado la misma actividad de yodo radiactivo, para lo cual, mientras en el primero el total de yodo fué de 0.55 ng, en el segundo pasó a 1.1 ng debido a la duplicación efectuada en el volumen de muestra del Na^{131}I utilizada.

Un análisis similar hemos efectuado para el rendimiento de marcación de la tirotrófina bovina en función del tiempo. (Tabla II-4).

TABLA II-4

RENDIMIENTO DE MARCACION DE
TIROTROFINA BOVINA EN FUNCION DEL TIEMPO

PARTIDA *	t	Iodo total	Rendimiento
-	días	ng	%
1	5	1.6	45.2
		300	79.4
		600	83.5
		900	78.3
		1200	63.4
		1500	49.0
		1800	37.8
		2000	41.5
1	10	1.6	50.6
		300	83.5
		600	84.3
		900	73.8
		1200	59.3
		1500	51.5
		1800	39.8
		2000	36.0

* Nomenclatura convencional

Conviene aclarar en este caso, que sólo en el primer tubo de cada experiencia (o sea aquel al cual no corresponde agregado de portador), figura la cantidad de iodo aportado por la solución radiactiva. En los restantes tubos, la incidencia ínfima que esta cantidad tiene en el total, nos ha hecho considerar innecesaria su inclusión.

II-4.- DISCUSION

Tal como hemos demostrado anteriormente al' referimos a la valoración del contenido de iodo presente en una muestra de iodo radiactivo, la actividad específica de los preparados de ^{131}I , utilizados en la marcación de polipéptidos, puede ser apreciablemente diferente según las partidas que se utilicen. La posibilidad de determinar experimentalmente ese valor, nos ha permitido, además de establecer un medio auxiliar de contralor de la producción de soluciones de ^{131}I , adoptar un criterio definido que signifique normalizar la metodología de marcación de polipéptidos o proteínas con ^{131}I . Si intentamos trasladar este esquema de trabajo a la utilización de ^{125}I , como isótopo de elección en las reacciones de obtención de polipéptidos marcados, vemos claramente que, ya sea por la forma de su obtención, o por sus propiedades radiofísicas y radioquímicas, las implicancias de una variación en la actividad específica de una muestra resulta despreciable en su utilización. No obstante ello, es razonable suponer que las conclusiones que se obtienen en este capítulo, referentes a la influencia de la cantidad total de iodo sobre el rendimiento de marcación y la naturaleza de los productos obtenidos, pueden ser perfectamente asimilables al caso de este último radioisótopo.

Con respecto a la marcación, es interesante hacer notar, que tal cual como está planteado el método, cualquier pequeña modificación o error en el procedimiento puede variar fundamentalmente el resultado, en especial el que concierne al rendimiento de la reacción. Por lo tanto, cualquier experiencia que encaramos fué realizada por triplicado, con lo cual pudimos descartar valores muy dudosos o bien realizar promedios en los porcentajes de rendimiento, obtenidos a partir de las mediciones de las electroforesis, y también en los porcentajes de componentes mono y diiodados correspondientes al total de moléculas.

las marcadas con iodo, obtenidos en las mediciones de las cromatografías de las muestras hidrolizadas.

Los resultados logrados en nuestras experiencias, confirman la importancia que ya otros autores han adjudicado a la cantidad relativa del yoduro total presente en la marcación de proteínas con ^{131}I , mediante el método de la cloramina-T.

En efecto, tanto Bale y col. (56), como Helmkamp y col. (57), insisten en la importancia que adquiere el conocimiento de la actividad específica real de las soluciones de ^{131}I , cuando se trata de su utilización en la marcación de proteínas, e inclusive, en las limitaciones que pueden existir cuando en el resultado final aparecen productos que actúan negativamente en su aplicación.

Cualquiera sea el método de elección para la obtención de estructuras polipeptídicas marcadas, el proceso básico consiste en la reacción entre el residuo tirosínico presente en la molécula orgánica y el yoduro. El objetivo que se debe tener en cuenta en todo momento, es el de no provocar una modificación funcional en el producto original. En general, hace ya tiempo que se acepta que una proteína con más de dos átomos de iodo por molécula, no conserva las mismas propiedades que la molécula no marcada (48) (84).

Este hecho, que ya fue señalado para proteínas como la albúmina humana (60), nos indica que esta incidencia perniciosa resultará igual, o seguramente mayor, en moléculas de menor peso, o simplemente de estructura polipeptídica más sencilla.

En el caso de la angiotensina, se observan rendimientos elevados y que se mantienen estables, por encima de una proporción de yoduro total relativamente baja $\left[4 \times 10^{-3} \text{ nanoátomos gramo de } \text{I}^- \text{ por nanomol de angiotensina (I}^-/\text{A)}\right]$. Esto da una idea de la facilidad con que se puede incorporar iodo a dicha molécula. Al mismo tiempo, lograr una marcación de rendimiento considerable para la relación I^-/A indicada, implica la incorporación de una cantidad de yoduro tan pequeña que da como resultado un grado de iodación lo suficientemente

bajo como para suponer que el comportamiento de la molécula marcada tenga una diferencia nula o mínima con respecto al polipéptido nativo. En las condiciones en que la cantidad de yoduro agregado es máxima, el grado de iodación no supera un valor de 0.035. Dado que la angiotensina posee un solo residuo tirosínico, el grado de iodación máximo que se puede lograr teóricamente es de 2.0, lo que obviamente indicaría que el 100 % de las moléculas tendrían en su núcleo tirosínico 2 átomos de yoduro incorporados. Aplicando las ecuaciones II-10 y II-12, a los resultados indicados en las figuras II-3 y II-4, se comprueba que la proporción máxima de moléculas de angiotensina con dos átomos de yodo en su residuo tirosínico, con respecto al total de moléculas de angiotensina (marcadas y no marcadas), que corresponde al grado de iodación 0.035, es de 0.27 %. Por lo tanto, la marcación de angiotensina con ^{131}I mediante el método de la cloramina-T, nos permite obtener un preparado cuyas propiedades biológicas serán prácticamente iguales a las de la molécula nativa; dicha afirmación la hacemos fundándonos en los resultados obtenidos en la determinación de actividad biológica de la angiotensina, marcada con 1 o 2 átomos de yoduro, y que analizaremos en detalle en el capítulo IV. De lo dicho hasta ahora, podemos deducir, que es factible lograr un elevado rendimiento de marcación de la angiotensina-II con ^{131}I , usando como agente oxidante la cloramina-T, sin que ello implique una alteración sustancial del comportamiento de la molécula en su posterior utilización, si se trabaja con cantidades de yoduro total comprendidas entre 4×10^{-3} y 4×10^{-2} nanoátomos-gramo de yoduro por nanomol de angiotensina-II.

Quando efectuamos un análisis similar al realizado para la angiotensina, con los resultados logrados con tirotrofina bovina, el problema se complica debido a la presencia de 10 residuos tirosínicos en esta última molécula. En primer lugar, hemos observado que la cantidad total de yoduro debe ser sustancialmente mayor que la utilizada en la marcación de angiotensina.

En efecto, para alcanzar rendimientos cercanos al 85 % en la marcación de una u otra molécula, la relación entre las cantida-

des totales de yoduro que deben ser incorporadas a la reacción, es de aproximadamente 30. Esto implica que la relación entre los nanoátomos gramo de I^- /nanomol de tirotrofina bovina, y los nanoátomos-gramo de I^- /nanomol de angiotensina II, para alcanzar ese rendimiento es de aproximadamente 500. Esta observación sugiere, de por sí, una mayor dificultad de incorporación de átomos de yodo a la molécula de tirotrofina que a la de angiotensina II.

Estimamos que esta mayor dificultad de incorporación, podría deberse a uno o más factores, entre los cuales debería tenerse en cuenta la mayor complejidad estructural de la molécula (estructura terciaria), y el entorno de los distintos residuos tirosínicos.

Si observamos el gráfico correspondiente a la figura II-5, vemos que se alcanza un rendimiento porcentual máximo de 85 %, cuando la proporción de nanoátomos - gramo de I^- / nanomoles de tirotrofina es aproximadamente igual a 2. A partir de ese punto, el rendimiento comienza a disminuir sustancialmente, y si bien el grado de iodación continúa en aumento, no lo hace en forma proporcional a la oferta de yoduro, por lo que la incorporación de una cantidad mayor de yodo se logra evidentemente con más dificultad.

Independientemente de la dificultad con que el yoduro puede llegar a ocupar todos los sitios posibles en una cadena de aminoácidos, cuya estructura resulta más compleja que nuestro caso original de la angiotensina II, las evidencias nos hacen suponer que ante diferentes situaciones, una primera instancia a considerar, será el aumento del rendimiento de marcación en función de la cantidad de yoduro presente. Es muy posible que la relación de nanoátomos-gramo de I^- /nanomoles de la molécula considerada, necesaria para obtener el máximo de rendimiento, será distinta para cada molécula a marcar en particular, y por supuesto, estará supeditada a varios factores, entre los cuales, quizás uno de los más importantes, debe ser la mayor o menor facilidad de introducción del átomo exógeno, en las zonas de las cadenas polipeptídicas donde se encuentran presentes los núcleos tirosínicos. Al mismo tiempo, también es posible, como lo demuestra nuestra experiencia, que cuando dicha relación es muy pequeña, se

puede observar una zona de rápido crecimiento en la curva de rendimiento de marcación. Esta hipótesis nos permite efectuar un análisis crítico de un aspecto de los resultados obtenidos por Glover y Shepard (85). Dichos autores señalan la importancia que tiene el conocimiento de la actividad específica de las preparaciones de Na^{131}I , particularmente cuando las mismas son utilizadas en la iodación de hormonas proteicas, destinadas a radioinmunoensayo. Usando insulina como polipéptido de referencia, logran establecer el rendimiento porcentual de iodación en función de la cantidad de iodo total presente, que a su vez está constituida en cada caso por una cantidad fija de iodo radiactivo y por cantidades variables de iodo no radiactivo. Los valores así obtenidos entre 1 y 12 μg de iodo total, utilizando 50 μg de insulina, se encuentran alineados en una curva decreciente, similar a la zona de pendiente negativa del gráfico de nuestra figura II-5. Aún cuando carecemos de experiencia en la utilización de insulina como hormona a marcar, podemos suponer que los valores de rendimiento obtenidos con menos de 1 μg de iodo total, podrían dar la indicación de un crecimiento en la zona inicial del gráfico. Este análisis, que no implica una crítica al trabajo de dichos autores (85), nos permite en cambio aportar una prueba más en favor de la necesidad de generalizar las conclusiones conceptuales del presente capítulo.

Nuestros resultados, indicados en las figuras II-5 y II-6, permiten deducir algunas consecuencias interesantes. En la zona de rendimiento máximo, donde existe una relación de 2 nanoátomos gramo de I^- por nanomol de tirotrófina, el grado de iodación es de aproximadamente 1.7. Teniendo en cuenta que el 50 % de la actividad se encuentra en los hidrolizados, como diiodotirosina, y que la tirotrófina bovina posee 10 residuos tirosínicos, se puede calcular que en el 4.25 % de dichos residuos, se han incorporados 2 átomos de iodo. El mismo cálculo demuestra que para 15.8 nanoátomos-gramo de I^- /nanomol de tirotrófina, que corresponde a un G.I. 5.85, ese valor se eleva al 23.4 %. Dado que la proporción relativamente elevada de residuos diiodados, en la zona de rendimiento de marcación máximo, podría eventualmente alterar el comportamiento de la hormona marcada, estimamos conveniente establecer un compromiso entre el rendimiento de marcación, y la proporción de residuos tirosínicos diiodados. En este sentido, puede de-

terminarse que para un rendimiento de marcación aceptable, como ser 70 %, que se obtuvo con una relación de 0.34 nanoátomos-gramo de I^- /nanomol de tirotrofina, el grado de iodación es de 0.24, y solamente el 0.2 % de todos los residuos tirosínicos que componen la molécula se encuentra bajo la forma de derivado diiodado. Resulta lógico admitir que estas últimas condiciones permiten lograr una hormona marcada más apropiada para su utilización posterior. De lo dicho hasta aquí se desprende claramente que la relación óptima entre el número de átomos de yoduro y el número de moléculas de polipéptido, es independiente de la proporción de $Na^{131}I$ presente en el total de yoduro.

A pesar de que las conclusiones del presente capítulo se extrajeron en base a experiencias en las cuales las proporciones de yoduro radiactivo utilizadas fueron bajas, las mismas mantienen su validez para marcaciones en las que se logran actividades específicas elevadas. En este caso, se obtienen los mismos rendimientos para cantidades iguales de polipéptido, si se trabaja con actividades de ^{131}I tales que, paralelamente, obliguen a disminuir, o en casos extremos eliminar totalmente, el agregado de yoduro portador; todo ello conservando constante la cantidad de yodo total necesario para lograr el resultado adecuado.

Si bien nuestro estudio abarcó moléculas de tamaño y complejidad diferentes, los hechos nos inducen a pensar, que los efectos observados probablemente se produzcan en la generalidad de los casos, por lo que consideramos, que un estudio similar al nuestro debe encararse para cada molécula polipeptídica en particular. Este estudio debe incluir básicamente:

- 1) La determinación de la relación óptima entre el número de átomos de yodo y el de moléculas polipeptídicas presente en la reacción.

- 2) La determinación de la proporción de residuos tirosínicos mono y diiodados, frente al total de moléculas polipeptídicas. Este dato resulta de interés ya que las evidencias dadas por otros autores y nuestra observación para el caso de la angiotensina, que

demostraremos posteriormente, indican que la presencia de dos átomos de iodo en un mismo residuo tirosínico puede disminuir significativamente su actividad biológica.

Independientemente de la importancia que este fenómeno adquiere para cada estructura en particular, nuestros resultados demuestran que la sola obtención de un elevado rendimiento de marcación, no es suficiente garantía para lograr un polipéptido marcado con propiedades adecuadas a su utilización, sino que deben tenerse en cuenta otros factores como los mencionados anteriormente.

Finalmente, los resultados de marcación de la angiotensina II y de tirotrofina bovina, que se encuentran tabulados, y que fueron obtenidos con soluciones de Na^{131}I utilizadas a tiempos diferentes después de su preparación, nos permiten extraer otra conclusión. Se demuestra, en efecto, que el "envejecimiento" de dichas soluciones radiactivas no tiene influencia significativa en el rendimiento y en las propiedades de las moléculas marcadas. Debe destacarse que estos resultados son válidos, si las cantidades apropiadas de soluciones de yoduro de potasio agregadas como portador, son preparadas inmediatamente antes de su uso.

CAPITULO III

MARCACION POR EL METODO DEL MONOCLORURO DE IODOIII-1.- INTRODUCCION

Uno de los puntos de mayor interés a abordar en el estudio de la marcación de un polipéptido resulta, sin duda alguna, el conocimiento de su comportamiento cuando se intenta realizar la incorporación del elemento trazador a distintos valores de pH.

Evidentemente, la necesidad de este estudio surge de las diferentes propiedades fisicoquímicas que la molécula pueda tener, según las condiciones del medio en el cual la sustancia se encuentre.

En el caso particular de la angiotensina II, se conocen diversos trabajos referentes a la conformación y propiedades fisicoquímicas de la molécula en solución.

En efecto, en el año 1962, Smeby y col. (86), a través de estudios de dispersión óptica rotatoria y espectroscopía ultravioleta, sugirieron una conformación tridimensional acorde con los datos físicos y biológicos disponibles (87)(88). A partir de estos resultados surge como importante la presencia de tres grupos funcionales esenciales para la actividad biológica. Ellos son, el grupo carboxílico C terminal de la fenilalanina, y los anillos aromáticos pertenecientes a los aminoácidos fenilalanina y tirosina. Paiva y Paiva (89)(90) y Paiva y col. (91), lograron resultados esencialmente similares, si bien postularon que otros residuos también son importantes para la actividad biológica del polipéptido. En base a tales estudios, podemos relacionar estas conclusiones con el hecho de que uno de los grupos esenciales citados, la tirosina, es precisamente el residuo que se marca con iodo. La facilidad de reacción del residuo tirosínico con dicho elemento, depende de la estructura polipeptídica de la molécula (80).

Es también conocida la influencia que ejercen las cargas de los grupos amino y carboxilo vecinos a la tirosina, en la ionización

del radical hidroxilo del núcleo fenólico (92), como así también el hecho de que en determinadas condiciones (grupo amino y carboxilo no ionizados), el grupo tirosínico perteneciente a la molécula de angiotensina se comporta en forma similar a la tirosina libre (92).

Paladini y col. (93) y Huidobro y Paladini (94), determinaron en 1963 que la actividad presora y ocitósica de la angiotensina, se incrementa cuando las experiencias se realizan en un medio alcalino. El primero de los efectos fue luego confirmado por Méthot y col. (95). La explicación que con mayor probabilidad se adaptaba al fenómeno observado, radicaba en el cambio de la conformación espacial de la molécula, debida al medio.

Posteriormente, en 1968, Fernández y col. (96), siguiendo la misma línea, estudiaron la molécula de angiotensina II en soluciones de distinto pH, con el fin de determinar los cambios conformacionales que la variación del pH trae aparejada. Los resultados de estos trabajos aportan algunas conclusiones importantes para los fines de nuestro estudio. Dado que el polipéptido se encuentra como monómero a cualquier valor de pH (91)(93), las variaciones en las dimensiones moleculares deben ser atribuidas a otros factores distintos de los de asociación. La explicación más razonable es que se producen variaciones en las interacciones electrostáticas entre las cargas de la molécula. En efecto, las formas más compactas se logran por la interacción de las cadenas laterales de los residuos de tirosina y fenilalanina. Una variación considerable de la conformación espacial coincide con la ionización del grupo fenólico del residuo tirosínico.

Todos estos puntos en cuestión nos han inducido a estudiar la marcación del polipéptido a diferentes valores de pH, no ya para conocer las condiciones de mejor rendimiento de la operación, sino esencialmente para dilucidar, cuál es en cada caso la proporción de las distintas especies marcadas que se obtienen.

Para ello, se realizaron diferentes marcaciones de angiotensina II utilizando como isótopo trazador el $^{125}\text{I}^-$, mediante aplicación del método del monoclóruo de yodo, de acuerdo a los lineamientos gene-

rales de la técnica establecida por Springell (97). El método de referencia nos permitió determinar los porcentajes de moléculas mono y diiodadas, para diferentes grados de iodación, trabajando en valores de pH 2.0, 5.0, 7.4 y 9.0.

Cabe aclarar que los cuatro valores de pH elegidos conforman un amplio rango dentro del cual entendemos que las modificaciones que se producen en la incorporación del iodo, son fundamentales y en cierta medida concluyentes.

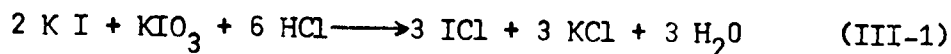
En particular, las marcaciones con monoclóruo de iodo a pH 7.4, fueron realizadas con el doble propósito de observar, por un lado el comportamiento a valor fisiológico, y por el otro lado correlacionarlo con los resultados que se obtuvieron en las marcaciones por vía electrolítica (ver Capítulo IV), para las cuales se trató de respetar dicho valor de pH.

III-2.- PARTE EXPERIMENTAL

La iodación de sustancias de estructura polipeptídica, se realiza generalmente entre los rangos de pH 5 a 10. Sin embargo, existen trabajos en los cuales el procedimiento de marcación se realiza a valores de pH más ácidos (98). En efecto, uno de los métodos enunciados por Ramachandran (98) en su extenso estudio del problema es el que se funda en la gran facilidad con que el hipiodito actúa como agente iodante del fenol, o del grupo fenólico perteneciente a una molécula más grandes.

Aprovechando esta propiedad, Mc Farlane (68) propuso la preparación del $^{131}\text{I}\text{Cl}$ y su utilización en la marcación de proteínas.

En líneas generales, el monoclóruo de iodo puede ser preparado de acuerdo a la siguiente reacción química:

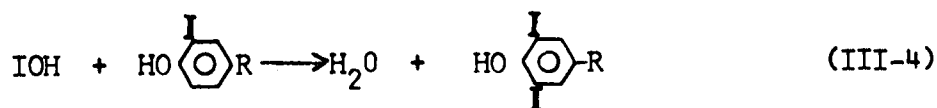
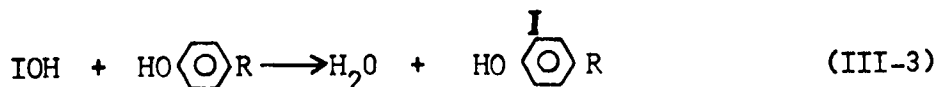


En solución acuosa diluida de pH alcalino, el monoclóruo

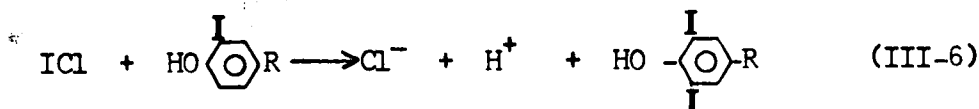
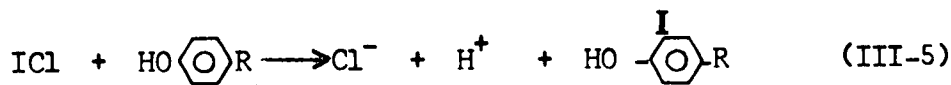
de iodo pasa a ácido hipoiódoso, de acuerdo a la reacción citada por Helmkamp y col. (99):



Subsecuentemente, el IOH reacciona con el residuo tirosínico (98) (99), siguiendo la reacción:



En solución ácida, el ICl actuaría como agente iodante del residuo, según las siguientes reacciones (17):



Para la utilización como trazador radiactivo, el ^{131}ICl o el ^{125}ICl , se obtiene agregando la correspondiente sal sódica del isótopo radiactivo a la solución clorhídrica diluida de ICl. La formación de ^{131}ICl o ^{131}IOH , ocurre por una reacción de intercambio espontánea (100). Con el agregado inmediato de esta solución a la del polipéptido, se obtiene la incorporación del iodo en el residuo tirosínico. Este último paso lo hemos realizado en nuestras marcaciones de angiotensina II, manteniendo la hormona en las siguientes soluciones reguladoras:

- a) 1 M glicina - 1 M HCl (pH 1 - 3)
- b) 1 M CH_3COOH - 1 M CH_3COONa (pH 4 - 5)
- c) 1 M KH_2PO_4 - 1 M NaOH (pH 6 - 7)
- d) 1 M glicina - 1 M NaOH (pH 8 - 10)

La proporción de los componentes en cada mezcla reguladora fue variada, tal cual lo indica Springell (97), con respecto a la que oportunamente recomendara Britton (101), a fin de evitar la elevada

concentración salina.

III-2-1.- MATERIAL

III-2-1-1.- APARATOS

Agitador magnético Fisher de Fisher Scientific, U.S.A.

Fuente de poder Clinicol con capacidad de variación de la diferencia de potencial entre 200 y 500 V.

Cuba de electroforesis Celogel de Milano, Italia, con puente de 18 centímetros de largo.

Cubas de vidrio de 30 cm x 60 cm con soporte de acero inoxidable para cromatografía descendente.

Estufa de cultivo calibrada a 37° C.

Detector de radiación gamma compuesto por:

- a) Sonda preamplificadora y cristal de ioduro de sodio (TI) de 2 x 2 pulgadas, con "geometría de pozo" de 0.15 cm x 0.40 cm.
- b) Espectrómetro Gamma monocanal Nuclear, modelo S.F.P.

III-2-1-2.- REACTIVOS: Todas las drogas utilizadas fueron de pureza "pro-análisis":

- Solución reguladora de fosfatos 0.05 N a pH 7.4.
Su preparación fue detallada en el capítulo II.

- Angiotensina II sintética de CIBA, Basilea, Suiza.

- Solución de ^{125}I provista por CEA-C.E.N.-SORIN (característica de catálogo S-4) de Francia.

- Solución reguladora glicina 1 M - HCl 1 N.

- Solución reguladora ácido acético 1 M-acetato de sodio 1 M.

- Solución reguladora fosfato monopotásico 1 M-NaOH 1 N.

- Solución reguladora glicina 1 M - NaOH 1 N.

- Solución reguladora de veronal - acetato de sodio - ácido acético 0.1 N pH 8.5.

Su preparación fue detallada en el capítulo II.

- Solución reguladora tris-ácido maleico-NaOH pH 8.2.

Su preparación fue detallada en el capítulo II.

- Pronase en solución reguladora tris-ácido maleico-NaOH pH 8.2.

La solución de pronase se prepara de forma tal de respetar una concentración relativa de 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de angiotensina.

- Metilmercapto - imidazol. Solución 22 % p/v.

Su preparación fue detallada en el capítulo II.

- Butanol saturado con ácido acético 2 M (2 : 1).

Su preparación fue detallada en el capítulo II.

- Piridina - ácido acético 2 M (8 : 2 v/v).

- 2,4,6 collidina - ácido acético 2 M (8 : 2 v/v).

- Resina de intercambio iónico Dowex 1 - X 8; 100-200 mesh; forma cloruro.

Como ya hemos señalado anteriormente, las citas dadas en este punto para la preparación de las soluciones reguladoras que se emplearon al solubilizar la hormona a diferentes valores de pH, corresponden a Britton (101) y Springell (97).

III-2-2.- METODO

III-2-2-1.- PREPARACION DE MONOCLORURO DE IODO

Dado que en esta etapa de nuestro estudio, uno de los factores más importantes a tener en cuenta es la correcta utilización del reactivo iodante, hemos creído conveniente detallar la preparación de la solución valorada, su purificación y utilización.

Puesto que la preparación de ICl puede lograrse teniendo en cuenta la ecuación III-1, la solución de ICl 0.02 M en NaCl 2 M se prepara de la siguiente manera:

0.5550 g de KI (equivalentes a 0.00334 moles) se disuelven en agua destilada fresca, junto a 0.3567 g de KIO_3 (equivalentes a 0.00167 moles) y 29.23 g de NaCl . A esta solución se le adicionan 21 ml de HCl concentrado ($D = 1.18$), y se completa finalmente con H_2O destilada hasta un volumen total de 250 ml. Dado que la masa total de KI incorporada es ligeramente superior a la que estequiométricamente corresponde para reaccionar con el KIO_3 , y teniendo presente que comunmente el NaCl trae como impureza una pequeña cantidad de ioduro, la solución así preparada de ICl contiene una pequeña cantidad de iodo libre.

Visto que nuestro interés consistió en obtener marcaciones con distintos grados de iodación, y que ello depende de la cantidad de ICl utilizado (o sea del contenido cuantitativo de iodo en el medio), fue necesario eliminar aquella pequeña cantidad de iodo libre. Para ello se purificó la solución mediante sucesivas extracciones con tetracloruro de carbono, hasta que la fase correspondiente al solvente orgánico se separó incolora. En la práctica, generalmente es suficiente efectuar 5 extracciones con porciones de 10 ml de CCl_4 por vez. Luego de una cuidadosa separación de la última fracción de solvente, se burbujeó en la solución una corriente de aire saturada con vapor de agua, con el objeto de volatilizar el remanente (suspendido y disuelto) de CCl_4 . Eventualmente, para asegurarse la total eliminación de trazas de iodo residual, puede también aerearse la solución por algunas horas.

La molaridad exacta de la solución de monoclóruo de iodo se determinó en una alícuota de la misma, agregándole un exceso de KI y titulando el iodo que se liberó, mediante una solución patrón de tiosulfato.

Una solución preparada en estas condiciones, conservada al abrigo de la luz y en refrigerador, mantiene su molaridad sin variaciones significativas durante 6 meses.

La preparación así detallada respeta los lineamientos dados por Helmkamp y col. (99).

III-2-2-2.- TÉCNICA DE MARCACION

Como hemos dicho anteriormente, nuestras experiencias fueron realizadas marcando la angiotensina II disuelta en soluciones reguladoras de diversos valores de pH, y con diferentes grados de iodación.

La solución de monoclóruo de iodo utilizada en cada experiencia fue obtenida realizando previo a su uso, una dilución al décimo con NaCl 2 M.

Un experimento típico con esta técnica consistió en disolver 0.1 mg de angiotensina en 0.5 ml de solución reguladora (elegida de acuerdo al pH de interés). A continuación, se adicionó agua destilada y monoclóruo de iodo hasta un volumen total de 1 ml. El $^{125}\text{I}\text{Na}$ se mezcló con el ICl, inmediatamente antes de su incorporación a la solución regulada de angiotensina. Al cabo de 5 minutos, la reacción se interrumpió agregando una cantidad fija y en exceso de tiosulfato de sodio. En nuestro caso, 0.1 ml de una solución 1 M de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ fue suficiente. A continuación, se separó una alícuota a fin de determinar mediante electroforesis en papel, el rendimiento del proceso, de acuerdo a la relación entre la actividad de ^{125}I incorporada a la hormona y la actividad de ^{125}I remanente en forma de ioduro.

Finalmente, la angiotensina iodada se eluyó a través de una columna de resina Dowex 1 - 8, 100 - 200 mesh, en forma cloruro, con

el objeto de eliminar el yoduro residual.

III-2-2-3.- DETERMINACION DE RESIDUOS TIROSINICOS MONO Y DIIODADOS (MIT Y DIT)

La evaluación de las proporciones en que se encuentra cada especie iodada al final de la marcación, se realizó por separación cromatográfica de los residuos monoiodados y diiodados, obtenidos luego de la hidrólisis enzimática, siguiendo la técnica detallada en el capítulo anterior.

Es importante recalcar que, debido al tipo de marcación realizada y los distintos valores de pH a los cuales se encontraba disuelta la hormona, hemos analizado no solamente la presencia de residuos tirosínicos marcados, sino también la eventual existencia de otros residuos, primordialmente la monoiódohistidina o la diiódohistidina. Ambas especies poseen ciertas posibilidades de formación cuando se efectúa la marcación en medio de alcalinidad elevada. Para ello, junto a las cromatografías del material hidrolizado, efectuadas usando como solvente el sistema n-butanol saturado con ácido acético - 2 M, también efectuamos cromatografías descendentes durante 16 horas en papel Whatman Nº 1, con los solventes piridina, ácido acético 2 M y collidina - ácido acético 2 M.

III-3.- RESULTADOS

III-3-1.- INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA VELOCIDAD DE FORMACION DE MONO Y DIIDOANGIOTENSINA

Como ya fue dicho al detallar el método empleado para la marcación con ICl , todas las experiencias fueron realizadas manteniendo constante la cantidad de hormona y el volumen total de la mezcla reaccionante. Utilizando volúmenes crecientes de la solución valorada de monoclóruo de iodo, fue posible obtener distintos grados de iodación y poder relacionar los mismos con los diferentes componentes iodados encontrados.

El método original, de acuerdo a Mc Farlane, permite obtener rendimientos superiores al 60 %. Con el objeto de calcular la cantidad de monoclóruo de iodo que utilizamos en cada experiencia, hemos fijado "a priori", la obtención de un rendimiento del 60 % y hemos reproducido las condiciones de cada experiencia 10 veces. Ello nos permitió obtener valores promedio de grados de iodación, dentro de ámbitos de variación estrechos y una dispersión relativamente pequeña.

Aún cuando los grados de iodación calculados abarcaron una serie de valores continuos, el número de experiencias realizadas nos permitió ordenarlos entre 0.20 ± 0.01 y 1.80 ± 0.09 en rangos de 0.20, y despreciar los datos intermedios.

Trabajando en los pH fijados, en casi todas las experiencias el porcentaje de derivados iodados de la histidina fue prácticamente insignificante. Solamente a pH 9.0, su influencia adquiere cierta importancia. En efecto, únicamente cuando las marcaciones fueron realizadas solubilizando el polipéptido en regulador glicina - NaOH, hemos podido observar, de acuerdo a los rendimientos obtenidos, valores de grado de iodación superiores a 2. Debemos recordar que éste debería ser el valor máximo al que se puede llegar en la marcación de la angiotensina II, si solamente se encontrase involucrado el grupo fenólico del residuo tirosínico.

En la figura III-1 pueden observarse los resultados de una experiencia realizada de acuerdo a la técnica detallada. Es evidente que la actividad porcentual de moniodotirosina, varía en función de la cantidad de iodo incorporado al polipéptido, y al valor del pH de la solución. Para un grado de iodación determinado, la actividad porcentual de MIT se hace mínima a pH aproximadamente neutro.

Aunque el análisis "in extenso" del método electrolítico será efectuado en el capítulo siguiente, hemos creído interesante incluir en esta figura la experiencia recogida en marcaciones efectuadas a 100 μ A. De esta manera podemos ver que, en primera instancia, tanto el método electrolítico que se realiza a pH 7.4, como el método

del monoclóruo de iodo efectuado al mismo valor de pH, presentan modificaciones en los porcentajes de MIT relativamente similares. Ello nos permite deducir que, al menos desde el punto de vista fisicoquímico, no existen variaciones que puedan relacionarse con la metodología aplicada, cuando se reproducen las condiciones de pH del medio.

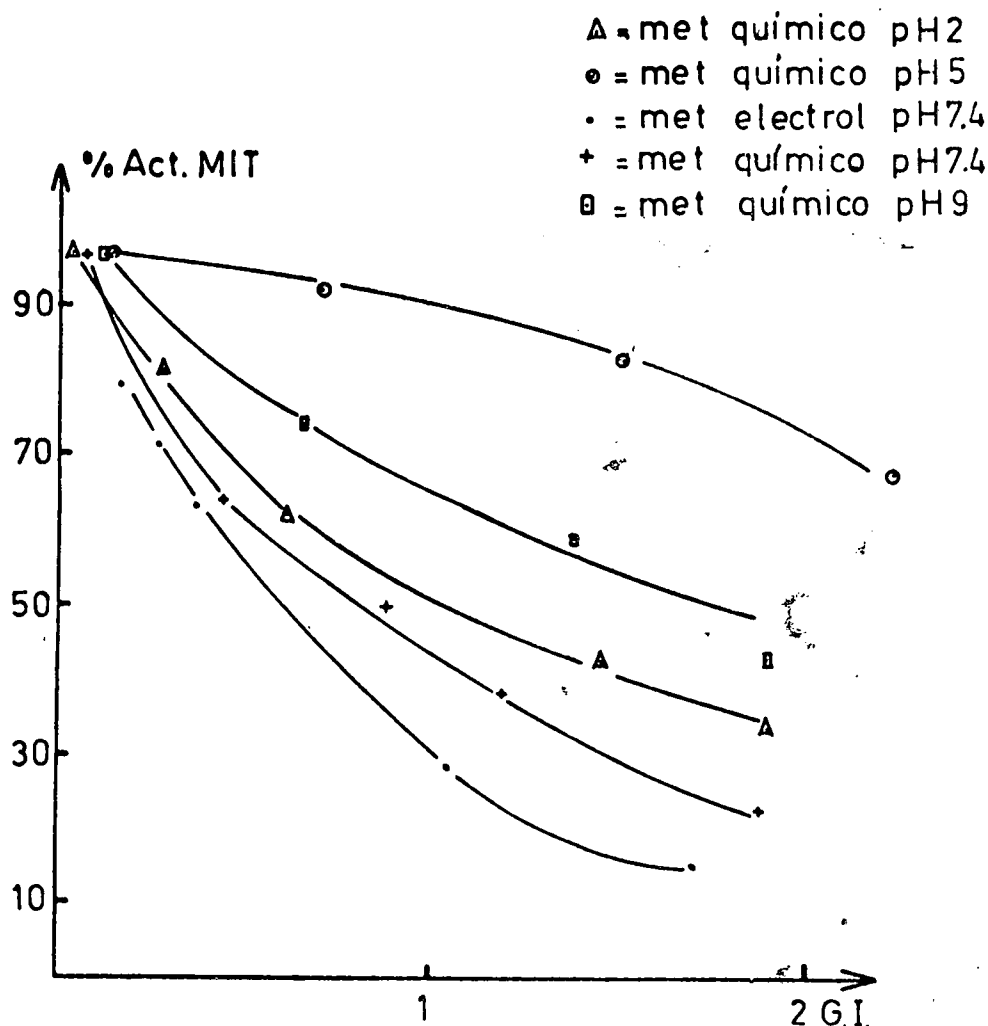


Figura III-1: Actividad porcentual de monoiodo angiotensina (% Act. MIT) en función del grado de iodación (G.I.) para diferentes valores de pH.

En la tabla III-1 están representados los rendimientos de angiotensina monoiodada y diiodada (MIA y DIA respectivamente), con el incremento del grado de iodación para diferentes valores de pH,

tomando el conjunto de los resultados logrados.

Los valores están expresados como el porciento de moléculas de angiotensina monoiodada o diiodada, en el total de moléculas iodadas (angiotensina monoiodada + diiodada).

TABLA III-1

RENDIMIENTOS DE ANGIOTENSINA MONOIODADA Y DIIODADA CON EL INCREMENTO DEL GRADO DE IODACION PARA DIFERENTES VALORES DE pH

GRADO DE IODACION	RENDIMIENTO DE ANGIOTENSINA IODADA							
	pH 2.0		pH 5.0		pH 7.0		pH 9.0	
	MIA	DIA	MIA	DIA	MIA	DIA	MIA	DIA
0.20 + 0.01	91.3	8.7	91.3	8.7	80.5	19.5	95.0	5.0
0.40 + 0.02	85.1	14.9	86.8	13.2	75.8	24.2	90.3	9.7
0.60 + 0.03	78.4	21.6	81.8	18.2	70.5	29.5	85.3	14.7
0.80 + 0.04	71.0	29.0	74.4	25.6	64.7	35.3	79.4	20.6
1.00 + 0.05	62.7	37.3	67.1	32.9	56.1	43.9	73.4	26.6
1.20 + 0.06	55.2	44.8	59.2	40.8	46.7	53.3	65.2	34.8
1.40 + 0.07	47.5	52.5	50.0	50.0	36.5	63.5	53.9	46.1
1.60 + 0.08	37.5	62.5	40.5	59.5	25.0	75.0	42.5	57.5
1.80 + 0.09	21.8	78.2	26.4	73.6	12.9	87.1	28.2	71.8

El efecto del pH es el esperado, si el grupo tirosínico en la angiotensina II es accesible al yodo y los residuos adyacentes no ejercen efecto alguno en la iodación. La interpretación de estos resultados será discutida a continuación.

III-4.- DISCUSION

Mediante la utilización del monoclóruo de iodo como agente iodante, preconizado originalmente por Mc Farlane en el año 1958, hemos logrado estudiar las diferentes condiciones en las cuales se produce la marcación de una molécula polipeptídica pequeña, analizando al mismo tiempo la variación de la reactividad del residuo tirosínico, al modificarse las condiciones del medio en el cual se la ha solubilizado.

Dado que el proceso de iodación de la tirosina, ocurre a través de una unión electrofílica del iodo al anión tirosínico ($R - \text{C}_6\text{H}_4\text{O}^-$), se puede afirmar que la reactividad de dicho anión será función de su concentración y por lo tanto será dependiente del valor de pK_{OH} correspondiente a la disociación del hidroxilo tirosínico.

La dependencia debida al pH, encontrada en la distribución del iodo en las formas monoiodoangiotensina y diiodoangiotensina, puede ser interpretada en base a la variación del pK_{OH} provocada por la introducción del iodo en el residuo tirosínico.

Los valores de pK_{OH} de las tres formas posibles, o sea tirosina libre, moniodotirosina (MIT) y diiodotirosina (DIT) como aminoácido libre, son respectivamente 10.13 (102), 8.20 (103), y 9.36 (104). Todo el proceso puede ser interpretado, en consecuencia, teniendo en cuenta la ecuación de Henderson-Hasselbach. De acuerdo a la misma tenemos que:

$$pH = pK_{[a]} + \log \frac{X_{[b]}}{1 - X_{[b]}} \quad (III-7)$$

donde: $[a]$ expresa la concentración de la fracción disociada de la sustancia en estudio.

$[b]$ expresa la concentración de la fracción no disociada de la misma sustancia.

La ecuación III-7 puede también expresarse de la siguiente manera:

$$\text{pH} = \text{pK} [a] + \log x [b] - \log x [a] \quad (\text{III-8})$$

De acuerdo con estas ecuaciones, tanto la concentración de la forma disociada de la tirosina libre y de la monoiodotirosina, se encuentran influenciadas en forma directa, por el valor del pH al cual se realiza la experiencia. En particular, entre los valores de pH 6.2 y 8.1, la relación entre las formas reactivas MIT - O^- y TIR- O^- es tal que favorece al máximo el proceso:



En cambio, por encima de pH 8.2 la reacción:



comienza a actuar en forma competitiva con la precedente.

En este caso, la velocidad relativa de formación de monoiodoangiotensina y de diiodoangiotensina debe considerarse solamente dependiente del pK_{OH} de la angiotensina y del monoiododerivado respectivamente, puesto que la iodación se realiza cuando el residuo se encuentra en la forma de fenato.

Si se supone que el comportamiento de la TIR-4 es equivalente al de la tirosina libre, los valores de pK_{OH} de la angiotensina II y de la monoiodoangiotensina II son respectivamente 10.13 y 8.20.

El valor real del pK_{OH} de la angiotensina II corresponde a 10.04 (91); este hecho indica que la tirosina, en la molécula de angiotensina II, tiene un comportamiento comparable al de la tirosina libre, cuando los grupos amino y carboxilo no se encuentran ionizados.

Es evidente que la concentración relativa de la forma fenato

de la monoiodoangiotensina, con respecto a la forma fenato de la angiotensina, resulta ser mayor a pH 7.4 que a pH 9. Esto favorece la formación de mayores cantidades de angiotensina diiodada cuando la reacción se efectúa al valor de pH fisiológico que cuando se la realiza a pH 9, cosa que, en nuestro caso, pudo ser demostrada en forma experimental. En cambio, a bajos valores de pH, la diferencia entre el pK_{OH} de las formas no iodadas y monoiodadas de angiotensina afectará la reacción de iodación de manera menos notoria. Sin embargo es evidente que los valores de pH comprendidos entre 7 y 8 son menos favorables, si se desea obtener una molécula marcada con el menor porcentaje de formación del derivado diiodado.

Ello hace imprescindible el estudio exhaustivo de las condiciones de operación y el control de la marcación de forma tal de evitar, o al menos minimizar en lo posible, la formación del derivado diiodado que, como veremos en el próximo capítulo, actúa en forma negativa cuando se quiere utilizar la hormona marcada en experiencias biológicas.

Una de las posibles alternativas, en ese caso, consiste en efectuar la marcación en un medio alcalino.

Los resultados del análisis cromatográfico de las muestras hidrolizadas, realizado con el fin de poner en evidencia la presencia de ^{125}I -angiotensina marcada en el residuo histidínico, demuestran que en las condiciones de reacción preestablecidas, la reactividad de dicho residuo no es significativa comparada con la reactividad del residuo tirosínico.

A pesar de que la fracción de iodo presente en el residuo histidínico se incrementa con el aumento del valor del pH (105)(106), es sabido que la reactividad y facilidad de unión del iodo a dichos residuos no están solamente influenciadas por factores de conformación e interacciones electrostáticas, sino fundamentalmente son dependientes de las propiedades intrínsecas del residuo (107).

Es importante señalar que todo este comportamiento es una

consecuencia directa de las propiedades de las hormonas polipeptídicas que contienen grupos tirosínicos, con poca o ninguna relación estructural con su entorno.

En proteínas de estructura más compleja, la iodación a valores de pH lejanos a la neutralidad puede inducir a una desorganización estructural irreversible, como consecuencia de la introducción del átomo de iodo en un residuo tirosínico que se encuentra parcial o totalmente protegido, cuando la iodación se realiza a pH cercano a la neutralidad.

CAPITULO IV

COMPORTAMIENTO BIOLOGICO DE LA IODOANGIOTENSINA II
SU PREPARACION POR EL METODO ELECTROLITICOIV-1.- INTRODUCCION

Como ya hemos señalado con insistencia, las propiedades biológicas de la mayor parte de las proteínas sufren una progresiva modificación a medida que crece la cantidad de iodo unido al o a los residuos de tirosina (108) (109) (72).

El control de las propiedades biológicas de las proteínas marcadas demuestra que en algunos casos la iodación parece no modificar las propiedades fundamentales de la proteína. En realidad, como consecuencia de todo lo dicho sobre el particular hasta el momento, podemos deducir que estos resultados deben ser aceptados con suma reserva. El problema se presenta indudablemente difícil, desde el momento que la distribución del iodo en la molécula de proteína probablemente no es uniforme. Ello significa que en una preparación, por ejemplo de albúmina iodada con un grado de iodación medio de uno, existen en realidad moléculas que contienen cero, uno o más átomos de iodo. En general debemos admitir que, para el caso de proteínas iodadas, varios factores concurren para provocar una modificación en el comportamiento de la misma. Entre ellos figuran la oxidación de grupos biológicamente significativos, distribución despareja de iodo, desnaturalización de la proteína provocada en o por el ambiente en el cual se desarrolla el proceso de marcación. También debemos tener en cuenta que, tal como se deduce de la bibliografía existente, en muchos casos los métodos utilizados para la iodación resultan con frecuencia irreproducibles (110). En algunos casos, al efecto oxidativo propio del iodo elemental se agregan otros debidos por ejemplo al reactivo oxidante.

Debemos tener presente también el inconveniente que trae aparejado la distribución no uniforme del iodo en la molécula marcada. Este fenómeno es tanto más probable cuanto mayor es el número de núcleos tirosínicos presentes y también cuanto más similares son las asequebilities de los diferentes núcleos de una misma molécula. En este caso,

el problema suele minimizarse si se mantiene la incorporación de iodo a la proteína en un valor pequeño, con lo cual resulta evidente que en el control de las propiedades biológicas del compuesto marcado las variaciones que se observan pueden no tener mayor significado.

También es interesante hacer notar la poca confianza que puede atribuirse a los análisis físicos o fisicoquímicos habituales, ya que éstos, en general, solamente permiten revelar alteraciones de la molécula entera y no las que se producen en la zona correspondiente al sitio activo, lo que implica la modificación radical del comportamiento biológico de la proteína.

Sin embargo, los métodos analíticos clásicos adquieren mayor significado a medida que la estructura molecular resulta menos compleja. Es así que en pequeñas moléculas polipeptídicas, poseedoras de pocos grupos funcionales, la influencia de la modificación de ciertos residuos sobre la actividad biológica puede estudiarse en mejores condiciones que en el caso de proteínas de peso molecular elevado, cuya configuración estructural es más compleja debido a la disposición espacial y/o a su conformación molecular.

Basándonos en estos antecedentes, podemos estructurar un estudio funcional del problema en dos importantes análisis:

a) medida de los efectos químicos y físicos provocados por el fenómeno de iodación y, en los casos posibles, valoración del grado de no uniformidad de la distribución del iodo en la estructura molecular.

b) cuantificación del comportamiento biológico del polipéptido iodado, valiéndose para ello de métodos biológicos suficientemente precisos y significativos en lo que a reproducibilidad de resultados se refiere.

La relación que se obtiene en los resultados experimentales surgidos de estos dos grandes enfoques debería permitirnos establecer qué fenómenos, debidos a la iodación, son realmente responsables

de las alteraciones en las propiedades biológicas y, en definitiva, entre qué límites resulta admisible considerar a la molécula iodada como un verdadero indicador del correspondiente polipéptido nativo.

El estudio experimental indicado en el punto a), se puede realizar utilizando el método de marcación propuesto por Rosa (111) y Rosa y col. (112). El fundamento del método consiste en provocar la electrólisis en una solución de ioduro de potasio, marcado con iodo radiactivo, en presencia del polipéptido.

Este método permite la liberación de cantidades de iodo perfectamente controladas por medio de una corriente de electrólisis constante sobre una solución de KI, en la cual se encuentra solubilizada la proteína. El agente de iodación es específicamente el I^+ ; su concentración en la solución, en cada instante, puede ser regulada por un sencillo control de la corriente administrada; de esta manera puede evitarse la presencia de un agente oxidante. Puesto que la oxidación en el ánodo de iones ioduro puede lograrse con altos valores de corriente, incluso en soluciones de KI extremadamente diluidas, este método permite la preparación de proteínas marcadas de alta actividad específica, con un pequeño contenido de iodo.

Quando se emplean muy pequeñas cantidades de iodo, hecho que ocurre en la generalidad de los casos en que se preparan proteínas marcadas, la iodación se efectúa predominantemente en el o los residuos tirosínicos más accesibles de la molécula proteica; sin embargo, otros residuos, tales como cistina y cisteína, pueden encontrarse comprometidos en el proceso oxidativo. El método electrolítico, al permitir una estricta regulación de la cantidad de iodo elemental en contacto con la proteína, disminuye al máximo esta consecuencia lateral de la reacción.

Independientemente de la cantidad total de ioduro presente en la solución, para un tiempo dado, la cantidad de iodo liberado en el ánodo, que como dijimos anteriormente es función de la corriente aplicada al sistema, nos permite calcular el comportamiento ideal de marcación, frenando la reacción en el momento en que teóricamente su-

ponemos haber obtenido el grado de iodación deseado.

Resumiendo, las principales ventajas que presenta el método son:

1) la formación de iodo elemental en la solución puede ser controlada a través de la corriente de electrólisis.

2) quedan excluidos del procedimiento de marcación los oxidantes químicos que generalmente son utilizados para liberar iodo elemental a partir de la solución de ioduro. Cabe recordar al respecto los medios originales propuestos por diversos autores para lograr el proceso oxidativo del iodo: KIO_3 (113) (114), ácido nítrico (108), peróxido de hidrógeno (115), persulfato de amonio (116) y cloramina-T (117). Desafortunadamente, en todos estos métodos de marcación, el agente oxidante se encuentra en contacto directo con la solución que contiene el polipéptido a marcar y es capaz por sí mismo de provocar los fenómenos de desnaturalización antes mencionados.

3) la concentración de KI que se utiliza puede variarse en relación a la concentración de ioduro radiactivo, a fin de obtener actividades específicas preestablecidas para el producto marcado final.

4) la iodación de la sustancia a marcar se realiza entre valores de pH 6 a 8, y en presencia de medio salino fisiológico, con lo que nos encontramos en condiciones similares a las de los fluidos biológicos.

Con relación al punto 1) es interesante aclarar que el control de la formación de iodo elemental nos permite evitar el incremento de concentración del mismo, con lo cual se eliminan prácticamente las reacciones secundarias de oxidación que aparecen cuando la relación entre la cantidad de iodo elemental y polipéptido presente es muy superior a la unidad (118).

Es interesante destacar que la utilización de la angioten-

sina II en el estudio de este procedimiento de marcación, obedece en primer lugar al hecho de conocerse perfectamente su estructura, por lo que es posible tomarla como modelo de lo que acontece con un polipéptido de bajo peso molecular y estructura simple; en segundo lugar, y éste es quizás el motivo más importante, está demostrado que su residuo tirosínico es esencial para que la molécula tenga actividad hormonal. Finalmente, el tercer detalle a tener en cuenta es que existen algunas observaciones anteriores acerca de la influencia de la iodación sobre la actividad biológica de la angiotensina.

Con respecto al primer motivo, podemos mencionar que los estudios efectuados hasta el presente por varios grupos de autores, han permitido no solamente su aislamiento de fluidos biológicos (119) (120) (121), sino también la dilucidación de su estructura y conformación (86) (91) (92) (96) (122).

En cuanto a su actividad hormonal, Riniker (123) ha hecho un exhaustivo estudio relacionando la estructura química con el comportamiento bioquímico de la angiotensina II; por otra parte Bumpus y Smeby (124) han establecido claramente la relación entre estructura y actividad biológica. Resulta significativo hacer notar que gran parte de estos trabajos, al igual que el que nosotros encaramos, han sido realizados gracias a la posibilidad de obtener el polipéptido por vía sintética y por la similitud del comportamiento entre éste y la hormona natural.

El tercer aspecto que fué tenido en cuenta, está basado en las observaciones hechas por Barbour y Bartter (125), Wolf y col. (126), y Mendlowitz y col. (127). A pesar de que en dichos trabajos el principal objetivo ha sido la preparación de angiotensina marcada para la investigación metabólica, la atención puesta en el control de la reacción de iodación no parece suficiente, con lo que se descuida un importante aspecto del problema.

Es en base a todas estas consideraciones que hemos estudiado la obtención de angiotensina II iodada bajo diferentes condiciones, comprobando al mismo tiempo, la actividad biológica de las distintas

especies químicas así formadas.

Por último, cabe tener en cuenta que existe una serie de moléculas polipeptídicas de pesos moleculares y cantidad de aminoácidos similares, que poseen todas determinadas funciones hormonales. De alguna manera el conocimiento del comportamiento de la angiotensina II marcada pretende ser, si no un modelo, al menos un ejemplo inicial de cómo deben estudiarse y cuales son las consecuencias que se observan cuando se quiere disponer de un compuesto polipeptídico con función hormonal, marcado con iodo, para ser utilizado en experimentación clínica o bioquímica aplicada.

En cuanto al estudio experimental indicado en el punto b), es posible realizarlo si se encuentra, para el compuesto activo que se quiere analizar, un método que nos brinde variaciones significativas en relación a los cambios provocados a la sustancia en estudio. Al respecto existen diversos mecanismos para cuantificar biológicamente la hormona en solución. Entre los primeros métodos experimentados, figuran los que se basan en la variación de presión sanguínea producida al administrar, por vía endovenosa, angiotensina II en diferentes animales de experimentación. Así podemos encontrar los trabajos de Shipley y Tilden (128) o de Skeggs y col. (129) utilizando ratas, y los de Page y Helmer (130) o Valle y col. (131) en los que se usan gatos. Otros autores demuestran estrecha concordancia entre el nivel de angiotensina y la secreción de catecolamina por parte de las glándulas adrenales (132).

Finalmente, encontramos también los métodos que se basan en la contracción del músculo liso aislado. Al respecto, se han ensayado segmentos de músculo liso de distintos órganos y de distintas especies animales (133) (134) (135) (136) (137). De todos los métodos señalados en estos trabajos, el último demuestra que el músculo de útero de rata es el más sensible pero no es específico. Con el fin de minimizar esta falta de especificidad, Regoli y Vane (138) han encontrado que ciertas porciones de intestino de diversas especies animales responden con gran sensibilidad a la acción del polipéptido hormonal, al tiempo que se puede observar una buena diferenciación

en la acción de compuestos análogos. En efecto, bajo las condiciones en que se efectúan los ensayos, la porción de órgano aislado es sensible a la angiotensina, pero relativamente insensible a la 5-hidroxi-triptamina, histamina y otras sustancias presentes en la sangre. Al mismo tiempo las bradikininas y catecolaminas no interfieren en el ensayo con angiotensina.

Todas estas consideraciones son de fundamental importancia cuando se trata de realizar el análisis de actividad biológica de la angiotensina presente en fluido plasmático. Aunque en nuestro caso, las muestras utilizadas, tanto como patrones o como desconocidas, provienen de una preparación sintetizada químicamente, en la cual no se encuentran dichas interferencias, hemos optado por el empleo del método de Regoli y Vane, dado que la sensibilidad del mismo permite detectar diferencias de concentración de angiotensina en el rango de valores que son considerados fisiológicos. Al mismo tiempo, también se obtiene una buena diferenciación cuando muestras de igual contenido hormonal (expresado en concentración) presentan distinta potencialidad biológica.

En este sentido merece señalarse que a diferencia de la mayor parte de las hormonas, donde la presencia de varios grupos tirosínicos permite la obtención de mezclas complejas de diferentes especies moleculares, la mayoría de las hormonas pequeñas de naturaleza polipeptídica, tales como la angiotensina II, contienen un único grupo tirosínico, y solamente los derivados análogos mono y diiodados pueden individualizarse frente a la especie original a partir de una muestra marcada. La probabilidad de que el derivado diiodado de un polipéptido pequeño sufra una desorganización estructural severa, comparada con la molécula nativa, es muy grande. Esto puede dar como resultado una disminución muy importante de su inmunoreactividad y actuar en forma negativa en la realización práctica de la determinación de la hormona por radioinmunoensayo, debido a una pérdida significativa de la sensibilidad cuando el polipéptido así marcado es utilizado como trazador (139).

En el caso de la angiotensina II, investigaciones previas (140) han demostrado que el análogo diiodado retiene solamente un pe-

queño porcentaje de la actividad antigénica en comparación con la hormona nativa. Este hecho, avalado por las afirmaciones similares que se hacen con respecto a la actividad biológica, está demostrando que la "topografía" de la molécula en la vecindad de los sitios antigénicos se encuentra ampliamente afectada por la entrada de dos átomos de yodo en el grupo tirosínico.

Aún cuando entre las condiciones en que generalmente se mantiene la validez del radioinmunoensayo, no figura un requerimiento de absoluta identidad en términos de inmunoreactividad entre la sustancia marcada y la correspondiente hormona nativa, los resultados del ensayo deben ser interpretados con mayor precaución en el caso de los polipéptidos pequeños. La forma diiodada puede ser tenida en cuenta como una fuente potencial de perturbación, cuando se buscan las condiciones óptimas de trabajo, y su formación en el curso de la marcación debe minimizarse de la misma manera en que se trata de evitar la "sobreiiodación", en el caso de hormonas más complejas.

Debe señalarse así mismo que el derivado diiodado es menos estable en su conservación, debido a la formación de impurezas radioquímicas derivadas de la presencia de dos átomos de yodo en la molécula, las que se incrementan si ambos son radiactivos.

IV-2.- PARTE EXPERIMENTAL

Dado que el aparato utilizado en las marcaciones electrolíticas reviste una relativa novedad, por lo menos en nuestro medio, creemos oportuno describirlo con cierto detalle. (ver figura IV-1).

El mismo consiste en una celda de vidrio (I) que contiene un crisol de platino (II) con capacidad para 13 ml; un anillo elástico de cobre plateado (III), fijo en el fondo de la celda de vidrio, permite efectuar la conexión al circuito elástico externo (IV). El sistema se mantiene cubierto con una tapa esmerilada a la cual se le han efectuado tres perforaciones, para permitir el pasaje del cátodo, del electrodo del pHmetro, y para efectuar el agregado de reactivos y la extracción de muestras.

El cátodo es un alambre de platino (V), que se encuentra alojado en un tubo de vidrio (VI), cerrado en su base inferior mediante una membrana de diálisis (VII).

En la figura IV-2 hemos representado el circuito de alimentación eléctrica.

En nuestras experiencias, la corriente eléctrica fija se obtuvo utilizando un coulombímetro, mediante el cual la corriente constante obtenida tenía una variación máxima de $\pm 1\%$, y una escala de valores útiles comprendida entre 0.03 mA y 3 mA.

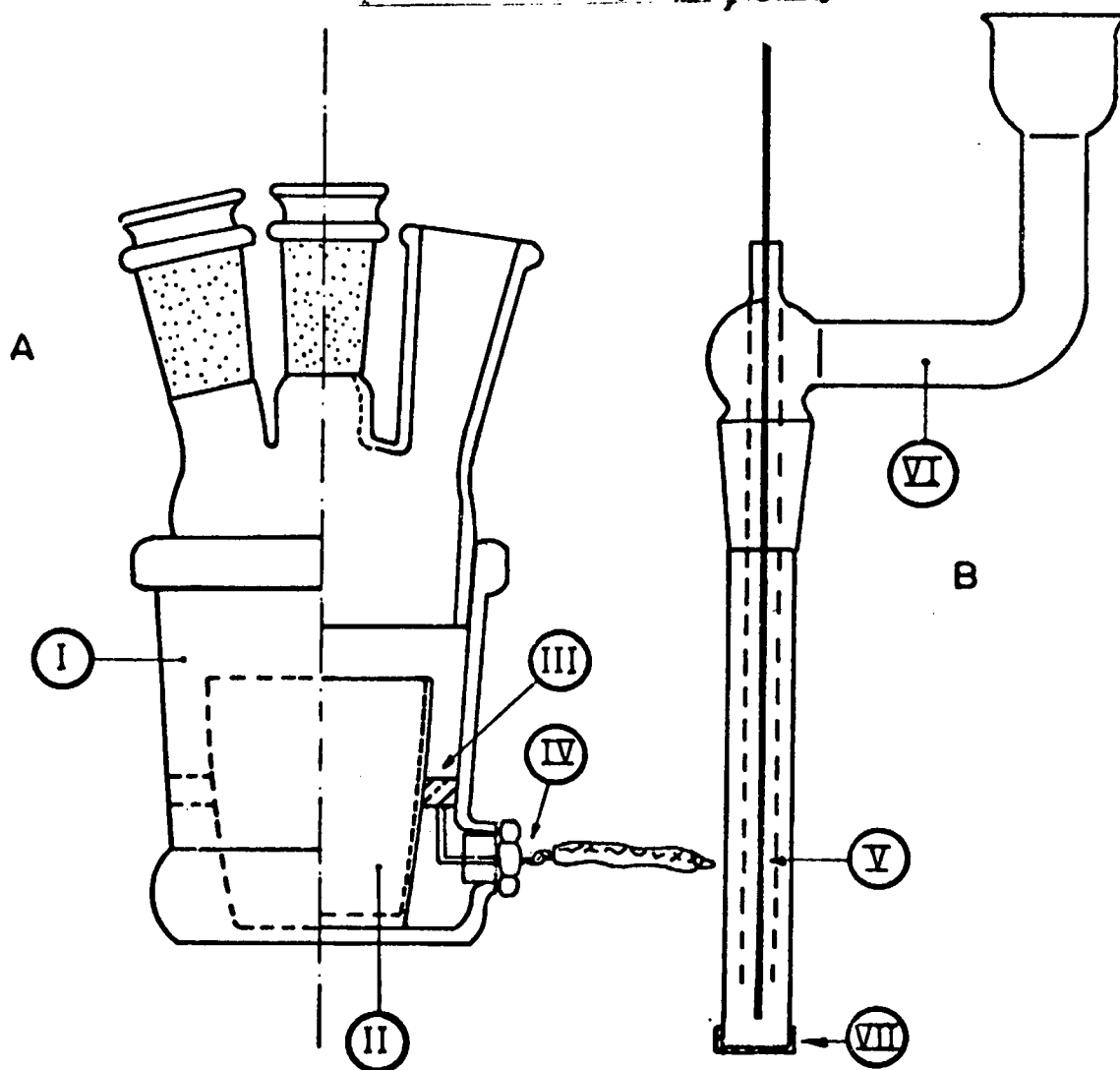


Figura IV-1: Celda electrolítica empleada en la preparación de angiotensina II marcada con yodo

- A) (I) - Recipiente de vidrio pyrex
 (II) - Crisol de platino
 (III)- Anillo elástico de cobre plateado
 (IV) - Conexión al polo (+) del circuito de alimentación
- B) (V) - Cátodo de platino
 (VI) - Tubo de vidrio que aloja al cátodo
 (VII)- Membrana de diálisis

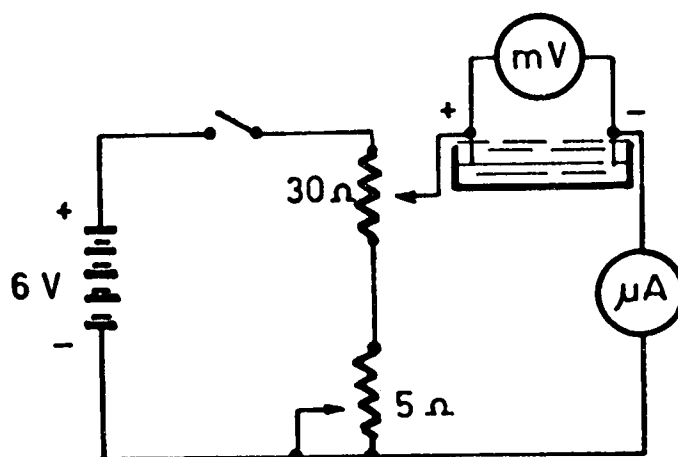


Figura IV-2: Esquema del circuito eléctrico de alimentación

IV-2-1.- MATERIAL

IV-2-1-1.- APARATOS

Celda electrolítica, cuyas características han sido descritas en el punto IV-2.

Coulombímetro Metrom Herisan modelo E211A, capaz de producir corriente eléctrica constante desde 0.03 mA hasta 3 mA con una variación máxima de $\pm 1\%$.

Agitador magnético Fisher, de Fisher Scientific Co, USA.

Fuente de poder Clinicol con capacidad de variación de la

diferencia de potencial entre 200 y 500 V.

Cuba de electroforesis Celogel de Milano, Italia, con puente de 18 centímetros de largo.

Cubas de vidrio de 30 cm x 60 cm con soporte de acero inoxidable para cromatografía descendente.

Estufa de cultivo calibrada a 37°C.

Detector de radiación gamma compuesto por:

- a) Sonda preamplificadora y un cristal de ioduro de sodio (TI) de 2 x 2 pulgadas con "geometría de pozo" de 0.15 cm x 0.40 cm.
- b) Espectrómetro gamma monocanal Nuclear modelo S.F.P.

Baño termostatzado modelo Samy mantenido a 37° C.

Kimógrafo accionado por mecanismo de relojería con velocidad variable y palanca frontal en contacto íntimo a un vibrador eléctrico.

Tubo de gas carbónico con manómetro y válvula de regulación de flujo.

Columna cromatográfica de precisión Sephadex modelo K 9/60 de 60 cm de largo por 0.9 cm de diámetro interno, de Pharmacia Fine Chemicals de Uppsala, Suecia.

IV-2-1-2.- REACTIVOS

Todas las drogas utilizadas fueron de pureza "pro análisis".

- Solución reguladora de fosfatos 0.05 N a pH 7.4.
Su preparación fué detallada en el capítulo II.

- Angiotensina II solución 0.10 % p/v.

Se prepara disolviendo 11.94 mg de angiotensina II de 83.7 % de sustancia activa, en 10 ml de una solución reguladora de fosfato 0.05 N conteniendo 0.15 M de NaCl y 2 mM de KI. La angiotensina II que utilizamos es sintética (Asp¹, Val⁵ - angiotensina II) provista por CIBA de Basilea, Suiza.

- Solución de ¹²⁵I provista por CEA.-C.E.N.-SORIN (característica de catálogo S-4) de Francia.

- Solución reguladora de veronal - acetato de sodio - ácido acético 0.1 N pH 8.5.

Su preparación fue detallada en el capítulo II.

- Solución reguladora tris - ácido maleico - hidróxido de sodio pH 8.2.

Su preparación fue detallada en el capítulo II.

- Pronase en solución reguladora tris - ácido maleico - hidróxido de sodio pH 8.2.

La solución de pronase se prepara de forma tal de respetar una concentración relativa de 100 µg/mg de angiotensina.

- Metilmercapto-inimidazol. Solución 22 % p/v.
Su preparación fue detallada en el capítulo II.

- Butanol saturado con ácido acético 2 M (2:1).
Su preparación fue detallada en el capítulo II.

- Solución fisiológica Krebs.
Se prepara solubilizando en agua destilada 6.9 g de NaCl, 0.35 g de KCl, 0.55 g de CaCl₂, 6 H₂O, 0.16 g de KH₂PO₄, 0.29 g MgSO₄ · 7 H₂O, 1 g de glucosa y 2.1 g de NaHCO₃.
Estas cantidades corresponden a 1 litro de preparación.

- Resina de intercambio iónico Dowex 1x8; 100-200 forma cloruro.

- Sephadex G-25 fino para fraccionamiento, comprendido en el rango de 100 a 5000 de peso molecular. Provisto por Pharmacia Fine Chemicals de Uppsala, Suecia.

- Piridina - ácido acético 2 M (8:2 V/V).

- 2, 4, 6 collidina - ácido acético 2 M (8:2 V/V).

Las precauciones detalladas en el punto II'-2-1-3 del capítulo II referentes a la correcta utilización de los reactivos que intervienen en las experiencias de marcación con la cloramina-T, son válidas para los reactivos empleados en las experiencias realizadas con el método electrolítico.

IV-2-2.- METODO

IV-2-2-1.- PREPARACION DE ANGIOTENSINA II MARCADA CON ^{125}I

A la solución de angiotensina II preparada de acuerdo al detalle anterior se le incorpora 0.1 mCi de ^{125}I .

En estas condiciones, 5 ml de la solución se colocan en la celda electrolítica y se somete a una corriente constante. En nuestro caso fueron efectuadas experiencias a distintos valores de intensidad de corriente, que oscilaron entre 10 y 3.000 microamperes. Dada la estabilidad de comportamiento que se observó con la hormona en las distintas condiciones en que fue usada, hemos considerado aceptable mantener el sistema a temperatura ambiente durante el tiempo que dura la experiencia. Al mismo tiempo, teniendo en cuenta que el yodo se libera sobre la superficie anódica, resulta indispensable mantener la homogeneidad del medio, para lo cual se mantiene la solución en agitación constante mediante el uso de un alnico y el correspondiente agitador.

A intervalos convenientes se retiró de la celda electrolítica una alícuota con el objeto de determinar, mediante electroforesis sobre papel, el porcentaje de yodo unido al octapéptido.

La concentración de angiotensina II en la solución final se obtuvo a partir de la valoración de nitrógeno total empleando el método de Kjeldhal, adaptado para la escala microquímica, propuesto por Mann (141).

A partir de los datos así obtenidos, se calculó el grado de iodación (G.I.), que se expresó, tal cual vimos ya en el capítulo anterior, como el número de átomos - gramo de iodo por cada mol de angiotensina.

IV-2-2-2.- DETERMINACION DE RESIDUOS TIROSINICOS MONO Y DIIODADOS (MIT Y DIT)

Con el fin de determinar la proporción de moléculas de angiotensina II mono y diiodadas, y teniendo en cuenta que cada molécula posee un solo residuo tirosínico, se realizó la digestión enzimática del octapéptido iodado, con pronase en solución 0.15 M tris-HCl a pH 8, durante 2 horas a 37° C. El pronase fue usado a una concentración de 100 µg por mg de polipéptido. Además, se adicionó metilmercapto-imidazol hasta una concentración final no mayor de 0.01 M, con el objeto de prevenir la deiodación del residuo tirosínico.

El hidrolizado se analizó por cromatografía descendente sobre papel Whatman N° 1, durante 16 horas, utilizando como solvente n-butanol saturado con ácido acético - 2 M. Las manchas correspondientes a monoiodotirosina y a diiodotirosina se localizaron por autorradiografía y posteriormente se cuantificó la actividad correspondiente. En las condiciones dadas, menos del 3 % de la radiactividad permanece en el origen y el 90-95 % corresponde a los aminoácidos radiactivos (MIT y DIT).

Con el objeto de descartar la existencia de histidina iodada (142) se realizó cromatografía sobre papel, empleando 2 solventes diferentes: piridina-ácido acético 2 M (8:2 V/V) y 2,4,6 collidina-ácido acético 2 M (8:2 V/V).

IV-2-2-3.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LA ANGIOTENSINA IODADA

Tal como hemos dicho anteriormente, la determinación de la actividad biológica de diversas preparaciones de angiotensina marcada, fue realizada siguiendo la técnica de Regoli y Vane, usando como órgano aislado la porción ascendente del colon de rata.

Para ello se eligieron ratas de la cepa Wistar de peso comprendido entre 150 y 200 g. Inmediatamente después de anestesiado con éter, se desangró el animal seccionándole la arteria carotídea y se seccionó la fracción adyacente al intestino ciego con estricciones diagonales. Se lavó interna y externamente con solución fisiológica de Krebs, y se suspendió verticalmente en un baño de 20 ml de capacidad conteniendo la misma solución. El extremo inferior del segmento muscular se fijó al fondo del recipiente, mientras que el extremo superior se sujetó a la vara inscriptora de un kimógrafo. El movimiento del órgano se registró manteniendo una relación de amplificación en la palanca frontal de 10 x, siendo el peso del tejido de 2 a 3 g. La inercia mecánica del sistema se disminuyó mediante el acoplamiento de un vibrador a la palanca del kimógrafo. El baño se gasificó usando una mezcla de O_2 y CO_2 (95:5 v/v) y se mantuvo a 37° C mediante un termóstato regulador.

En las condiciones detalladas, el músculo mantiene una actividad basal que se registra; se la considera correspondiente al cero de concentración de la hormona en el medio. El agregado al baño de un volumen conocido de solución de angiotensina, provoca una contracción en el músculo que se verifica por el movimiento de la palanca y la inscripción en el papel del kimógrafo.

Se considera que el sistema opera correctamente cuando las variaciones observadas en sucesivas respuestas mantienen correlación (estadísticamente) con la concentración de hormona presente en cada experiencia.

La actividad hormonal de la angiotensina II y de sus deriva-

iodados se comparó con la de una solución patrón de angiotensina II. Los derivados iodados fueron obtenidos marcando la hormona con iodo en la celda electrolítica. Al cabo del tiempo teórico de electrólisis, la corriente fue interrumpida y analizado el rendimiento de incorporación, mediante una separación electroforética de la angiotensina iodada y el iodo libre, de idéntica forma que la correspondiente al punto IV-2-2-1.

Finalizada la reacción electrolítica, la muestra se purificó pasándola a través de resina de intercambio iónico, con el objeto de eliminar el iodo inorgánico residual. Para ello se preparó una pequeña columna de vidrio de 0.8 cm x 2.0 cm conteniendo resina de intercambio aniónico (Dowex 1 - 8; 100 - 200 mesh; en forma Cl^-), lavada previamente con una solución de ácido clorhídrico 10^{-3} N y agua destilada. Una vez depositada la muestra en la superficie superior de la columna se permitió la elución libre del líquido, eliminando de esa manera la mayor parte de ioduro libre residual que quedó retenido. La solución final contiene más del 95 % de la angiotensina II y menos del 1 % del Na^{125}I . Junto a cada muestra destinada a determinaciones de actividad biológica, se realizó un blanco de reactivos que también era purificado finalmente de manera similar a su equivalente marcado.

Debemos tener en cuenta que, aunque en cada oportunidad hemos partido de una actividad pesada de polipéptido, los sucesivos pasos involucrados en el procedimiento pudieron dar lugar a pérdidas de muestra. Dado que las respuestas biológicas se obtuvieron a diluciones muy elevadas de la hormona, es lógico pensar que un error original en la cantidad de muestra utilizada podía propagarse en forma significativa. Hemos tratado de minimizar este inconveniente, determinando la concentración final de cada solución de angiotensina a utilizar, a través de la realización de un micro - Kjeldhal, tanto para la muestra incógnita como para aquella utilizada como referencia.

La cuantificación de la actividad biológica de cada muestra se determinó realizando en cada caso entre 5 y 10 ensayos cuyo

promedio representa el valor correspondiente a dicha muestra. El promedio fue obtenido para soluciones de concentración igual a 1.0, 2.0 y 4.0 ng/ml por cada preparado, y también para su correspondiente blanco de referencia. La actividad biológica se calculó haciendo uso de la relación lineal entre la respuesta del órgano aislado y el logaritmo de la dosis.

Resulta interesante hacer notar que, luego de efectuar diluciones sucesivas de las preparaciones destinadas a medición de actividad biológica, se constató que no existe pérdida evaluable de la muestra radiactiva en solución, aún en concentraciones del orden de 10 ng/ml de solución reguladora de fosfatos. Esta comprobación demuestra que, aún en diluciones tan elevadas de hormona, no existe retención en las paredes de los recipientes debido a problemas de adsorción y como consecuencia se evitó la utilización de albúmina u otras sustancias protectoras que pudiesen provocar presuntamente interferencias en las determinaciones biológicas con órgano aislado.

Al mismo tiempo, a fin de poder utilizar las distintas preparaciones de ^{125}I -angiotensina II durante un tiempo considerable, se analizaron las muestras conservadas a -20°C mediante electroforesis y cromatografía, previa hidrólisis durante los 30 días siguientes a su preparación, sin observar cambios en la cantidad de iodo unido al octapéptido ni variación en la distribución interna de las diversas especies.

Por último, resulta interesante mencionar que en las preparaciones que se efectuaron para ser usadas en pruebas biológicas, hemos utilizado en todos los pasos soluciones preparadas a partir de agua bidestilada y apiretogénica, con el objeto de evitar en lo posible la acción de agentes extraños incontrolables que pudiesen alterar los resultados finales.

IV-3.- RESULTADOS

IV-3-1.- IODACION DE ANGIOTENSINA II

La electrólisis representa un excelente medio de incorporación de iodo en moléculas proteicas o peptídicas, bajo condiciones reproducibles. Es posible además, para una determinada concentración de proteína, encontrar el valor de intensidad de corriente para el cual la descarga de yoduro constituye el paso limitante del proceso, de modo tal que el iodo se incorpora a la proteína a una velocidad constante, que depende de la intensidad de corriente de electrólisis. Este hecho presenta dos importantes ventajas:

- a) no hay exceso de iodo elemental.
- b) tomando alícuotas de la mezcla reaccionante a diferentes intervalos de tiempo, es posible obtener muestras de proteínas con cantidades crecientes de iodo.

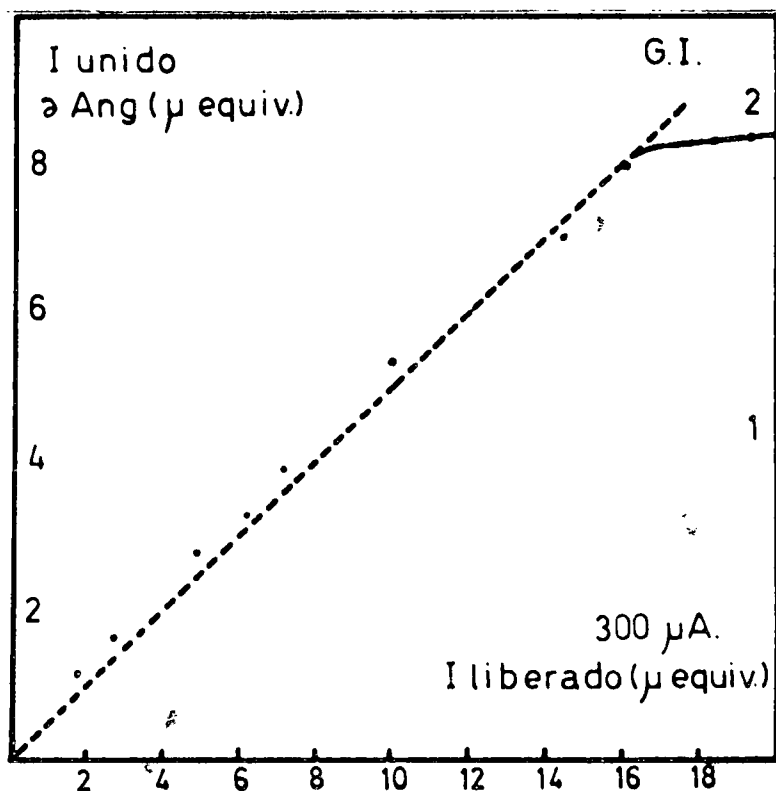


Figura IV-2: Iodación electrolítica de angiotensina II a 300 µA.

En el caso de la angiotensina II en concentración de 1 mg/ml a pH 7.4, se puede afirmar que las condiciones antedichas son satisfechas con valores de intensidad de corriente de hasta 300 μ A, correspondientes a la descarga de 0.18 μ -equiv/min de iodo elemental, tal cual queda indicado en la figura IV-2.

La mezcla reactiva es la siguiente: angiotensina II, 5 mg; NaCl, 90 mg; KI, 1.66 mg; volumen total 5.0 ml.

Los equivalentes de iodo formados fueron calculados en base al 100 % de rendimiento de la corriente utilizada.

El grado de iodación se encuentra expresado en la ordenada de la derecha como los μ -equivalentes de iodo unido por μ -mol de angiotensina II.

Manteniendo fijo el valor de pH de la solución, se comprueba que la incorporación de iodo a la molécula polipeptídica corresponde, dentro de los límites de error experimental, a la descarga teórica de iodo molecular.

En las concentraciones de angiotensina II y de ioduro de potasio con que se realizaron todas las experiencias, la aparición del elemento inorgánico oxidado a hipiodito constituye un factor limitante de la linealidad de incorporación del iodo, que adquiere mayor importancia a medida que se incrementa la intensidad de corriente en el procedimiento.

Las pruebas efectuadas a 300 μ A muestran que al cabo de 100 minutos de corriente de descarga de iodo, se llega a un "plateau" vecino al grado de iodación igual a 2.

Como puede observarse en la figura IV-2, la reacción de sustitución ocurre a una velocidad constante y procede de acuerdo al requerimiento estequiométrico de la iodación de la tirosina, es decir, la mitad del iodo descargado se incorpora a la proteína. Esto, unido al hecho de que el grado de iodación máximo es de 2 átomos por

molécula, prueba que la tirosina es el único residuo involucrado en la iodación. Las cromatografías del producto final hidrolizado confirman la ausencia de histidina iodada. No se detectan pérdidas de iodo durante los experimentos y los resultados obtenidos en cinco pruebas mantienen buena concordancia con una dispersión menor del 5 %.

IV-3-2.- EFECTO DE LA INTENSIDAD DE CORRIENTE ELECTROLITICA SOBRE LA MARCACION DE ANGIOTENSINA II

La iodación de la angiotensina fue estudiada a diversos valores de intensidad de corriente electrolítica para un mismo valor de pH (7.4) y para concentración de polipéptido constante (1 mg/ml).

El mismo fenómeno descrito para las experiencias con 300 μ A de intensidad de corriente electrolítica, puede observarse trabajando a 100 μ A, sólo que en este caso el tiempo necesario para obtener resultados similares se triplica.

En las experiencias realizadas con intensidades inferiores a 100 μ A, no se intentó llegar al "plateau" dado el tiempo requerido, mientras que a corrientes varias veces superior (3.000 μ A), luego de un primer intervalo de tiempo en el cual el iodo proteico es proporcional a la descarga teórica, comienza a evidenciarse la falta de yoduro libre en el medio debida a oxidación, dada la elevada velocidad de descarga en el ánodo.

IV-3-3.- EFECTO DE LA INTENSIDAD DE CORRIENTE ELECTROLITICA SOBRE LA VELOCIDAD DE FORMACION DE MONO Y DIIDOANGIOTENSINA

Las cantidades relativas de monoiodoangiotensina y diiodoangiotensina, formadas en el curso de una iodación progresiva de angiotensina II a pH 7.4, fueron analizadas, extrayendo a diferentes tiempos muestras de 100 μ l de la solución contenida en la celda electrolítica. Cada muestra se sometió a hidrólisis enzimá-

tica, y la mono y la diiodotirosina fueron determinadas a partir de la radiocromatografía del hidrolizado. Esto permite calcular las cantidades de mono y de diiodoangiotensina presentes en las muestras. La angiotensina nativa se evaluó por diferencia.

La reproducibilidad del método permite, dentro de ciertos márgenes extremos, predecir la composición en MIA y DIA (monoiodo angiotensina y diiodoangiotensina II) de una determinada muestra de ^{125}I -angiotensina, conocida la corriente de descarga y el grado de iodación obtenido.

Para ello, conociendo los valores de iodo proteico (rendimiento de la experiencia) y la relación de actividad entre la MIA y DIA, es factible establecer los porcentajes moleculares en que se encuentran presentes en la mezcla.

En la tabla IV-1 se encuentran tabulados los valores obtenidos en una marcación. En este ejemplo en particular se efectuó la experiencia a 300 μA de intensidad de corriente electrolítica, obteniendo alícuotas de la mezcla reaccionante desde 5 minutos de iniciada la reacción hasta 180 minutos.

TABLA IV-1: RESULTADOS OBTENIDOS A PARTIR DE UNA MUESTRA MARCADA UTILIZANDO
UNA CORRIENTE ELECTROLITICA DE 300 μ A

T min	% Rendimiento (I)	% Act MIT (II)	% Act DIT (III)	G.I. (IV)	% Moléculas MIA (V)	% Moléculas DIA (VI)	% Moléculas ANG (VII)
5	7.0	78.9	21.1	0.16	12.6	1.7	85.7
10	11.2	71.4	28.6	0.26	18.6	3.7	77.7
15	16.7	70.1	29.1	0.38	26.9	5.5	67.6
20	16.9	69.0	31.0	0.39	26.9	6.1	67.0
25	14.0	62.8	37.2	0.32	20.1	6.0	73.9
50	29.1	53.4	46.6	0.67	35.8	15.6	48.6
75	45.3	28.5	71.5	1.04	29.6	37.2	33.2
125	74.2	19.0	81.1	1.71	32.4	69.3	-
180	74.0	16.2	83.8	1.70	27.6	71.2	1.2

- (I) porcentajes relativos de ^{125}I -angiotensina, calculados a partir de la radioelectroforesis de cada una de las alícuotas aisladas durante la marcación.
- (II) porcentajes relativos de la actividad de MIT calculados a partir de los radiocromatogramas efectuados con las muestras hidrolizadas:

$$\% \text{ Act. MIT} = \frac{A_{\text{MIT}} (\text{c/min})}{A_{\text{MIT}} (\text{c/min}) + A_{\text{DIT}} (\text{c/min})} \times 100$$

- (III) porcentajes relativos de la actividad de DIT calculados a partir de los radiocromatogramas efectuados con las muestras hidrolizadas:

$$\% \text{ Act. DIT} = \frac{A_{\text{DIT}} (\text{c/min})}{A_{\text{MIT}} (\text{c/min}) + A_{\text{DIT}} (\text{c/min})} \times 100$$

- (IV) calculado teniendo en cuenta que:

$$\text{G.I.} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de átomos } ^{125}\text{I} - \text{gramo de } ^{125}\text{I} \times \text{R} \%}{\text{n}^\circ \text{ de moles de angiotensina} \times 100}$$

- (V) calculado teniendo en cuenta que:

$$\% \text{ moléculas MIA} = \% \text{ Act. MIT} \times \text{G.I.} \quad (\text{II-10})$$

- (VI) calculado teniendo en cuenta que:

$$\% \text{ moléculas DIA} = 0.5 \times \% \text{ Act. DIT} \times \text{G.I.} \quad (\text{II-11})$$

- (VII) calculado teniendo en cuenta que:

$$\% \text{ moléculas de Ang} = 100 - (\% \text{ moléculas MIA} + \% \text{ moléculas DIA}) \quad (\text{II-12})$$

Los resultados obtenidos a 300 μA están representados en la fig. IV-3, donde se puede observar la variación de las tres frac-

ciones moleculares calculadas en función del grado de iodación del polipéptido, por lo que podemos deducir que para cada grado de iodación existe una población molecular heterogénea.

La proporción de angiotensina mono y diiodada a grados de iodación crecientes, se encuentra en estrecha concordancia con el modelo estudiado para la N-acetiltirosina por Mayberry y col. (143). Esto implica que el residuo tirosínico es accesible y que el ingreso del iodo al núcleo fenólico es escasamente o de ninguna manera inhibido por los residuos vecinos.

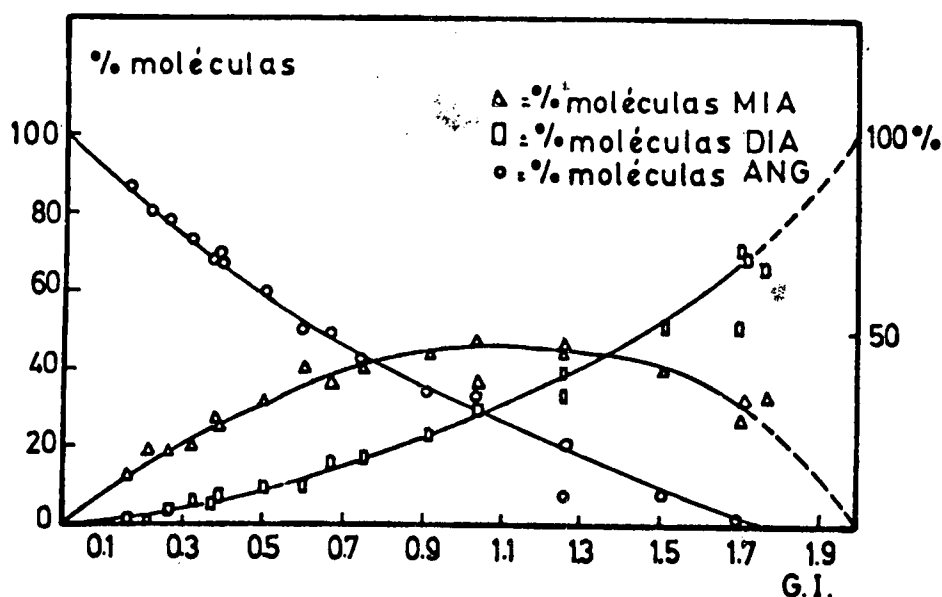


Figura IV-3: Composición porcentual de angiotensina marcada en función del grado de iodación

Los resultados que se observan en la figura IV-4 muestran que, incrementando la intensidad de corriente, o sea, aumentando la velocidad de generación de iodo elemental en el electrodo, crece la cantidad relativa de angiotensina diiodada y, correlativamente, decrece la cantidad de angiotensina monoiodada para el mismo grado de iodación. Esto confirma resultados logrados anteriormente (45), según los cuales altas intensidades de corriente favorecen la formación de

grupos tirosínicos diiodados; probablemente esto se relaciona con el hecho de que la reacción ocurre a nivel de la superficie del electrodo.

En la figura IV-4 a y IV-4 b se representan respectivamente los valores de angiotensina monoiodada y diiodada (como porcentaje molecular), en función del grado de iodación para las distintas corrientes de electrólisis empleadas en el proceso de marcación.

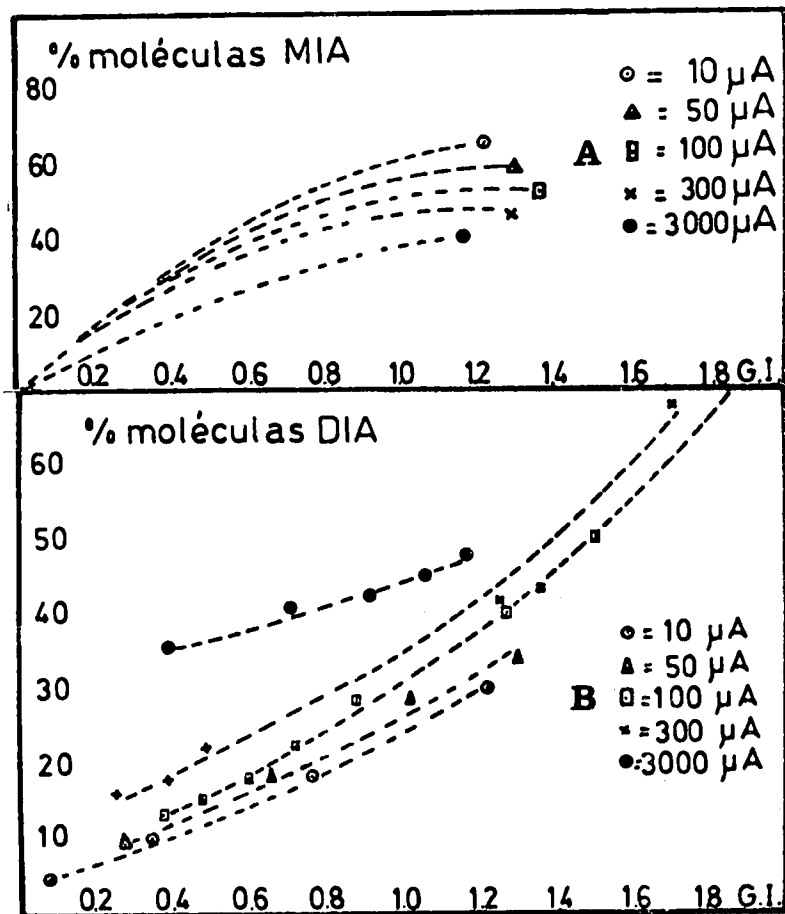


Figura IV-4 a y IV-4 b: Por ciento de angiotensina monoiodada y diiodada, con referencia a la cantidad total de moléculas iodadas presentes en la muestra de angiotensina: $(\text{diiodo angiotensina} / \text{mono} + \text{diiodo angiotensina}) \times 100$, para diferentes valores de corriente electrolítica.

IV-3-4.- ACTIVIDAD HORMONAL DE LA MONO Y DIIDO ANGIOTENSINA II

La actividad biológica de la ^{125}I -angiotensina II se determina con referencia a una prueba en blanco de angiotensina II realizada simultáneamente.

Cuatro muestras de angiotensina II, conteniendo cantidades crecientes de iodo, fueron preparadas por electrólisis a pH 7.4, y luego se ensayaron sus actividades biológicas. Las concentraciones de angiotensina no iodada, así como la de sus monoiodo y diiodo derivados, se muestran en la tabla IV-2.

TABLA IV-2

ACTIVIDAD HORMONAL DE LA ANGIOTENSINA IODADA

Los datos representan el promedio de diez análisis individuales con un 90 % de confiabilidad.

MUESTRA	Grado de iodación Promedio	Composición Porcentual**			Actividad*** Hormonal Porcentual
		ANG	MIA	DIA	
I	0.50+0.03	57.3+0.03	35.5+1.4	7.2+0.7	84.7
II	1.27+0.07	9.5+2.2	54.1+1.8	36.4+1.2	55.0
III	1.30+0.07	7.1+2.2	55.7+1.2	37.1+1.8	55.9
IV	1.87+0.10	7.4+8.8	22.4+3.3	75.0+8.1	31.0

* Expresado como átomos de iodo por molécula

** Expresado como porcentaje de moléculas de cada especie

*** Actividad hormonal residual por comparación con una solución patrón de angiotensina II

Puede observarse que cuando el grado de iodación aumenta, la actividad biológica de la hormona disminuye. Una muestra de angiotensina conteniendo un promedio de 1.87 átomos de iodo por molécula,

presenta una actividad relativa de 31 % con referencia al octapéptido nativo.

Debemos hacer notar que cualquiera de las muestras marcadas que se obtuvieron presentaron las tres especies de angiotensina posibles y, además, resultó imposible una separación cuantitativa de las mismas que asegurara su correcta utilización en las determinaciones biológicas. No obstante ello, resulta evidente que los resultados presentados en la tabla IV-2, permiten el cálculo de la actividad biológica de la monoiodo y de la diiodoangiotensina. Para ello debe postularse que la actividad biológica medida para una muestra determinada de angiotensina iodada, resulta de la suma de las contribuciones de cada una de las especies moleculares presentes en dicha muestra, o sea angiotensina no marcada, monoiodoangiotensina y diiodoangiotensina. Ante esta presencia podemos decir que:

$$B = X_0 B_0 + X_1 B_{MIA} + X_2 B_{DIA} \quad (IV-1)$$

donde: B es la actividad biológica medida experimentalmente.

X_0 , X_1 y X_2 representan las concentraciones molares de cada una de las especies presentes en la mezcla.

B_0 , B_{MIA} y B_{DIA} representan las actividades biológicas de la angiotensina no iodada, de la monoiodoangiotensina y de la diiodoangiotensina respectivamente.

Dado que las actividades biológicas de las muestras marcadas fueron obtenidas experimentalmente con referencia a una solución de angiotensina nativa, a la cual debemos adjudicarle un valor de actividad igual al 100 %, la ecuación (IV-1) podemos expresarla de la siguiente manera:

$$\text{valor experim. B} = \% \text{ Ang.} \times 100 + \% \text{ MIA} \times B_{MIA} + \% \text{ DIA} \times B_{DIA} \quad (IV-2)$$

Tratándose de una ecuación con dos incógnitas, en la cual los valores de B_{MIA} y B_{DIA} son desconocidos, se calculan dichas incógnitas analizando de a pares los resultados incluidos en la Tabla IV-2. En efecto, la similitud de los resultados obtenidos utilizando en el cálculo distintos pares de valores, con un contenido diferente de las tres especies de angiotensina, indica que no existe interferencia mutua en la respuesta del sistema biológico, lo que confirma la validez de la fórmula enunciada.

De tal manera, el ajuste de los parámetros mediante el método de los cuadrados mínimos, utilizando para ello una computadora IBM 360/44, permitió calcular que la actividad biológica de la monoiodoangiotensina y de la diiodoangiotensina son respectivamente:

$$B_{MIA} = 70.0 \%$$

$$B_{DIA} = 20.9 \%$$

IV-3-5.- FILTRACION POR GEL DE LA ANGIOTENSINA IODADA

Con el objeto de tratar de poner a punto un método de separación entre la monoiodoangiotensina y la diiodoangiotensina, se recurrió al fraccionamiento mediante Sephadex.

La filtración de angiotensina iodada se realizó pasando la muestra a través de una columna de Sephadex G-25 de 520 mm x 9 mm, previamente acondicionada con solución reguladora tris 0.01 N a pH 7.4.

El flujo de la solución reguladora se mantuvo aproximadamente a un valor de 10 ml/hora; se recogieron fracciones de 1 ml determinándose la radiactividad presente en cada una de ellas. Como era de esperar, se obtuvo un solo pico (figura IV-5). Las fracciones 26 al 31, 32 al 35 y 36 al 42 fueron unificadas y sometidas a hidrólisis enzimática. Posteriormente se determinó por radiocromatografía sobre papel el contenido de mono y diiodotirosina en la zona anterior, central y posterior del pico eluido, respectivamente.

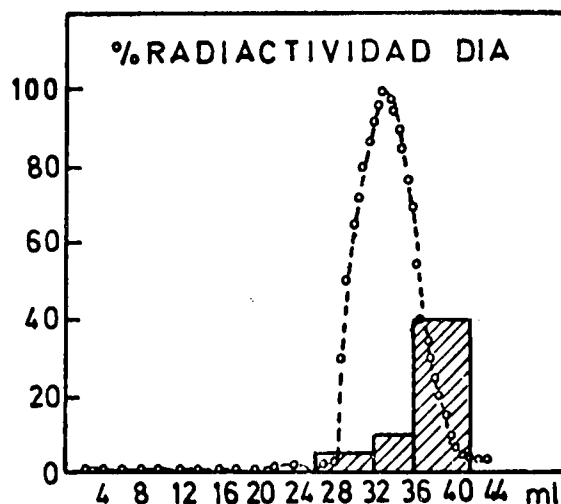


Figura IV-5: Diagrama de elución de angiotensina iodada a través de una columna de Sephadex G-25. La actividad medida por cada mililitro de eluido está expresada en unidades arbitrarias.

En comparación con la muestra original de angiotensina iodada, cuya composición fue de 80 % del derivado monoiodado y 20 % del compuesto diiodado, podemos observar que la zona anterior y central del pico se encuentra notoriamente enriquecida en angiotensina monoiodada (94.5 % del derivado monoiodado y 5.5% del diiodado en la fracción anterior; 90 % del derivado monoiodado y 10 % del diiodado en la fracción central). Por otro lado, la fracción posterior del pico se encuentra enriquecida en diiodoangiotensina (60 % del derivado monoiodado y 40 % del compuesto diiodado). El experimento se repitió con la misma muestra de iodoangiotensina, a la cual se agregó una cantidad equimolar del polipéptido nativo. El eluido, en este caso, se analizó espectrofotométricamente y se descartó la contribución de la iodoangiotensina, evaluada sobre la base de la radiactividad medida. Esta doble experiencia fue reproducida 10 veces y los valores porcentuales enunciados anteriormente representan los promedios observados para cada especie marcada. En base a los resultados obtenidos, se demostró que el orden de elución responde en todos los casos al siguiente:

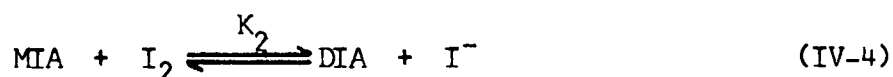
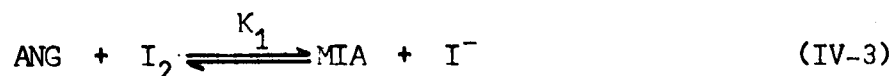
te esquema:

- 1°) angiotensina
- 2°) monoiodoangiotensina
- 3°) diiodoangiotensina

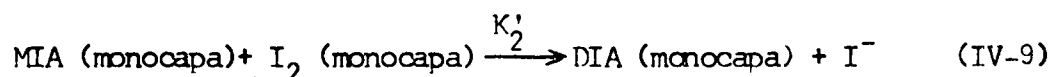
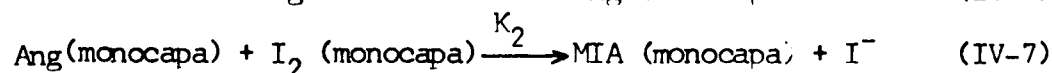
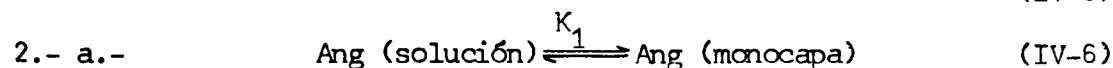
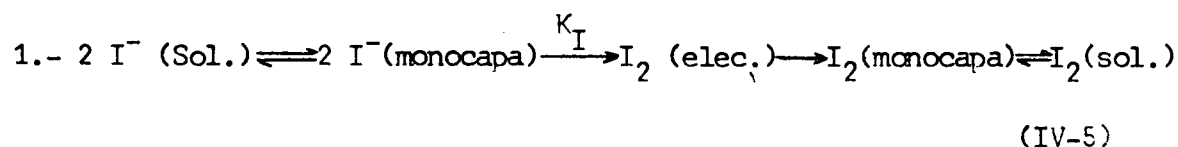
IV-4.- DISCUSION

Los fines perseguidos en esta parte de nuestro trabajo experimental fueron logrados empleando un método de marcación que permite la incorporación de iodo en la molécula, en las posiciones orto y orto-orto' del núcleo fenólico de la tirosina. La técnica de marcación por vía electrolítica, como ya fue demostrado en trabajos precedentes por los autores del método, permite la incorporación del iodo radiactivo en forma gradual y controlable. Los resultados obtenidos en las experiencias de marcación, en función de la cantidad de iodo liberado por unidad de tiempo y en función del tiempo a valores de intensidad de corriente constantes, permiten concluir que, además de presentar indiscutibles ventajas desde el punto de vista preparativo, permite la obtención de angiotensina iodada en condiciones bien definidas y reproducibles. Simultáneamente, resulta interesante hacer notar que, en condiciones óptimas, es posible unir cuantitativamente el iodo al residuo de tirosina evitando cualquier posible reacción secundaria. Por otro lado, las relaciones existentes entre el iodo liberado en el electrodo y el incorporado a la molécula polipeptídica, cuando se trabaja a diversos valores de intensidad de corriente, permiten determinar "a priori", cual es el rango dentro del cual dicha incorporación cuantitativa puede cumplirse, de acuerdo al objetivo de la experiencia.

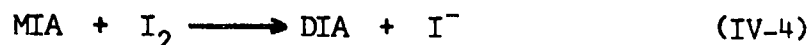
Las experiencias efectuadas a valores de corriente de 10, 50, 100, 300 y 3000 μ A, muestran que la distribución del iodo bajo las formas de monoiodoangiotensina y diiodoangiotensina, está en estricta dependencia con la corriente misma, aún cuando se observa una perfecta correspondencia entre el iodo unido a la angiotensina II y el iodo liberado en el electrodo. Tal resultado aparenta estar en desacuerdo con las leyes estequiométricas que rigen la reacción:



Ciertamente, cualquiera sea la concentración de iodo que se forma debido a la descarga del ioduro en el ánodo, los valores de las constantes K_1 y K_2 continúan invariables y las concentraciones para cada instante de las formas MIA y DIA deben ser constantes para cualquier valor de corriente, siempre que la reacción se verifique en fase homogénea. La aparente anomalía puede ser explicada, admitiendo que la reacción de iodación ocurre en una monocapa, en la inmediata vecindad de la superficie del electrodo. Se pueden esquematizar los siguientes pasos, dejando preestablecido que los términos solución, monocapa y electrodo que figuran como subíndices, quieren ejemplificar no ya un estado físico, sino exclusivamente la zona en la cual se localiza la sustancia en cada momento. En ese sentido, el término solución está indicando la presencia de la sustancia en cuestión, en la zona de máxima homogeneidad de la mezcla reactiva; el término monocapa corresponde a la zona de máxima vecindad a la superficie del electrodo; y el término electrodo a la zona correspondiente a la superficie del electrodo propiamente dicho.



En el caso en que $K'_1 \gg K_1$ estamos seguros que la reacción se desarrolla en fase homogénea. Si esta condición no se verifica, se presenta una heterogeneidad en las concentraciones de angiotensina y su derivado monoiodado. Por lo tanto, si la liberación del iodo en el ánodo ocurre con una velocidad superior al proceso de redifusión de la angiotensina, desde la monocapa adyacente a la superficie del electrodo hacia el resto de la solución, se puede suponer un enriquecimiento de la forma MIA en la vecindad del ánodo, con el consiguiente favorecimiento de la reacción:



De cualquier manera, es probable que el efecto combinado de la velocidad de difusión y el potencial del electrodo, pueden influir en la concentración relativa de los residuos reactivos (Tyr - O^- y monoiodo Tyr - O^-) en la superficie del electrodo.

Aún cuando la técnica de marcación electrolítica fue desarrollada para ser utilizada en un rango de pH comprendido entre 6 y 8, recientemente Yovanovic y col. (144) han logrado, trabajando a pH 10, marcar albúmina humana con iodo, con un rendimiento del método superior a 90 %. No obstante ello, desde nuestro punto de vista, en tales condiciones la iodoalbúmina formada difícilmente pueda ser aprovechada en experiencias biológicas, dada la enorme proporción de DIA formada.

La característica versatilidad y controlabilidad del método, hacen del mismo un instrumento óptimo para el estudio de la iodación del polipéptido, dada la necesidad de un control seguro de la cantidad del iodo elemental involucrado en la reacción.

Los resultados presentados indican que la angiotensina II, cuyo residuo tirosínico posee solamente un átomo de iodo, retiene una actividad hormonal importante. En cambio, el derivado diiodado presenta una actividad biológica marcadamente inferior. Estos resultados se evidenciaron perfectamente, usando la porción ascendente del colon de rata como un órgano específico para el ensayo biológico de la angiotensina. Las ventajas e inconvenientes de esta técnica fueron discuti-

dos por Regoli y Vane (138). Sin embargo, puesto que el ensayo de comportamiento biológico fue realizado siempre en ausencia de otras sustancias biológicamente activas, es razonable suponer que la mayor parte de las posibles causas de error citadas por dichos autores puede desestimarse.

Los estudios realizados sobre análogos sintéticos de la angiotensina II, indican que los requerimientos estructurales de algunos aminoácidos en el polipéptido, son importantes para una significativa actividad biológica. La tirosina en posición 4 es uno de los residuos esenciales. Es por lo tanto sorprendente que la entrada de un átomo de iodo en el núcleo aromático de la Tyr-4, puede ocurrir sin la disminución sustancial de la actividad hormonal del polipéptido, puesto que dos son los efectos principales asociados a la iodación del grupo tirosínico.

1) Siendo el tamaño del átomo de iodo comparable al del núcleo benzénico, el grupo tirosínico sustituido puede interferir estéricamente con su entorno inmediato.

2) El pK del OH fenólico está sustancialmente disminuido. La conversión de angiotensina en su derivado monoiodado dará como resultado, por lo tanto, la duplicación del tamaño de la cadena lateral de la Tyr-4, con una disminución del pK_{OH} en alrededor de 2 unidades.

Por otro lado, todos los resultados disponibles acerca de la conformación tridimensional de la molécula de angiotensina II, sugieren que su grupo tirosínico tiene poca relación estructural con su entorno inmediato.

Los experimentos de iodación referidos en el presente trabajo, sugieren que las posiciones "orto" del anillo aromático de la tirosina-4 son accesibles al iodo, dado que las velocidades relativas de formación de la monoiodoangiotensina y de la diiodoangiotensina en la mezcla de reacción son muy semejantes a las correspondientes a la formación de moniodotirosina y de diiodotirosina. Además, los estudios de espectrofotometría ultravioleta efectuados por Smeby y col.

(86), muestran que el grupo fenólico en la angiotensina II debe estar en una posición tal, que no pueda interaccionar con otros grupos iónicos vecinos. Sin embargo, la gran actividad hormonal retenida por la monoiodoangiotensina, prueba que el grupo tirosínico puede asumir una configuración espacial compatible con su incremento de tamaño, sin provocar alteraciones en la disposición espacial correcta de los otros grupos funcionales y además laterales del octapéptido.

El efecto de iodación en la angiotensina II puede también ser discutido en términos de la ionización del OH fenólico. La presencia del anillo fenólico en posición 4 en la cadena peptídica, es un prerrequisito esencial para que la angiotensina tenga actividad hormonal, puesto que la sustitución de la Tyr-4 por la fenilalanina (124), trae como consecuencia una pérdida completa de la actividad biológica.

En este sentido, es importante mencionar que Craig y col. (122), en estudios de diálisis, observaron que la molécula de angiotensina adquiere una disposición considerablemente más extendida en solución alcalina. Esto fue atribuido a la disminución sustancial de la interacción entre los anillos aromáticos de la fenilalanina y la tirosina, debido a la ionización del OH fenólico. Por otra parte, los mismos autores postulan que la angiotensina nativa a pH fisiológico tiene una forma compacta, cuyo radio axial se aproxima a su valor mínimo. Para que esta forma sea estable, se requiere que el OH fenólico no esté disociado.

Esta condición no se verifica en el caso de la monoiodoangiotensina y de la diiodoangiotensina, ya que sus pK_{OH} , como vimos en el capítulo anterior, se encuentran reducidos en casi 2 a 4 unidades respectivamente, comparados con la angiotensina nativa (145). Por lo tanto, puede esperarse que en la angiotensina iodada tenga lugar una expansión molecular, debida a la ionización de un grupo tirosínico a pH fisiológico.

Una interpretación particular merece el intento que hemos realizado, a fin de aislar las distintas especies marcadas que se encuentran en una muestra de iodoangiotensina II.

Es conocido el hecho de que el método de filtración por gel permite obtener solamente una información limitada cuando se trabaja con peptidos pequeños. Sin embargo, en nuestros experimentos hemos observado sistemáticamente, que la monoiodoangiotensina y la diiodoangiotensina se elúan con posterioridad a la angiotensina. Este hecho puede atribuirse a varias razones: interacción iónica con el gel, lo que produce una débil adsorción; mayor hidratación en solución; modificación de la forma. Precisamente, el orden de elución obtenido en los experimentos de filtración realizados a través de gel de Sephadex, podría reflejar la diferencia de la forma molecular existente entre la angiotensina y sus derivados iodados, en concordancia con lo expuesto anteriormente.

Si esta sugestión es correcta, alrededor del 30 % de monoiodoangiotensina y 75 % de diiodoangiotensina están en la forma expandida a pH 7.0 - 7.5, asumiendo valores de pK_{OH} de 8.2 para la molécula monoiodada y de 6.4 para la diiodada. Es interesante mencionar que esta proporción de las formas expandidas de la molécula de angiotensina mono y diiodadas, corresponde aproximadamente a la disminución de la actividad biológica, cuando la angiotensina pasa al monoiododerivado (30 % de disminución) y al diiododerivado (80 % de disminución).

Si la actividad biológica residual de las especies iodadas puede ser así explicada, el razonamiento anterior podría constituir una interpretación racional de la función del grupo tirosínico en el polipéptido activo.

Desde un punto de vista práctico, el fraccionamiento del pico de elución permite el enriquecimiento de la angiotensina marcada en monoiodoangiotensina, que es el derivado biológicamente más activo. En este sentido, resulta interesante señalar que recientemente Gandolfi y col. (146), lograron separar satisfactoriamente angiotensina II monoiodada, empleando para ello la filtración a través de Sephadex G-25.

Independientemente del análisis efectuado anteriormente, una consecuencia de relevancia práctica de nuestro estudio, consiste en la

posibilidad de preparar una muestra de radioiodoangiotensina II que conserva una actividad hormonal importante.

Para ello se requiere el control de la reacción de iodación, de manera tal de reducir al mínimo o evitar la formación del derivado diiodado, efectuando la marcación en solución alcalina.

Sin embargo, es evidente a partir de los resultados obtenidos, que, aún bajo las condiciones más favorables, no se puede preparar una angiotensina II radioiodada, adecuada para estudios metabólicos, a menos que el nivel de incorporación del elemento inorgánico se conserve por debajo de 0.2 a 0.3 átomos de iodo por molécula de angiotensina.

Según nuestro conocimiento, en los experimentos con angiotensina marcada referidos en la literatura, el portador estaba principalmente constituido por el derivado diiodado inactivo. Esto confirma los estudios de Barbour y Bartter (125), en los cuales se concluye que los experimentos sobre metabolismo y distribución biológica, referidos por Wolf y col. (126), y por Mendlowitz y col. (127), han sido realizados con una angiotensina marcada que podría haber perdido casi toda su actividad hormonal. En este sentido, conviene insistir, tanto desde el punto de vista práctico como conceptual, en la necesidad de estudiar exhaustivamente y en comparación con las moléculas nativas, el comportamiento fisicoquímico y biológico de las proteínas o polipéptidos que se marcan con iodo radiactivo, para su utilización en estudios metabólicos, de distribución o actividad biológica, etc., como indicadores radiactivos de la molécula original.

CONCLUSIONES

Los argumentos expuestos en la presente conclusión, nos permiten recalcar la importancia que adquiere el estudio exhaustivo de las condiciones de preparación de una molécula proteica marcada, así como el conocimiento de su posterior comportamiento. Esto último es sumamente necesario, no solamente en los casos en que los preparados hormonales marcados con iodo se utilicen en determinaciones de actividad biológica, sino también cuando se encuentran involucradas reacciones de naturaleza inmunológica.

Esta afirmación, realizada en un momento del desarrollo científico en que se encuentran en expansión las técnicas radioinmunológicas, tiene por finalidad llamar la atención sobre las implicancias que en su aplicación puede tener un conocimiento parcial o incorrecto de la preparación de la molécula a utilizar como trazador de la reacción.

Con nuestro trabajo, hemos intentado conocer las condiciones de preparación de angiotensina II radioiodada, así como las propiedades y comportamiento biológico de la hormona marcada.

Ello nos ha enfrentado con un conjunto de problemas cuya resolución permite conocer perfectamente cuales son las condiciones metodológicas óptimas de la marcación y las consecuencias que sobre su utilización posterior ejercen dichas condiciones.

Desde un punto de vista estrictamente radioquímico, es posible conocer las conveniencias y dificultades que se presentan en la elección del isótopo del iodo a emplear. El ^{125}I , como elemento trazador, brinda una mayor homogeneidad en las cantidades reales de iodo utilizadas en la marcación de hormonas con distintas muestras del isótopo en cuestión. En contraposición, el empleo del ^{131}I aporta al sistema, generalmente, cantidades reales de iodo diferentes en cada oportunidad, aún cuando las reacciones de marcación se realicen utilizando actividades similares. La consecuencia inmediata de este hecho es la significativa diferencia que se observa cuando se reproducen marcaciones con

iguales concentraciones de actividad en las muestras de iodo, pero con actividades específicas dispares.

Este fenómeno, que se mantiene en términos despreciables cuando se utiliza el trazador radiactivo en actividades muy bajas complementandolo con portador isotópico, adquiere gran significado cuando la marcación tiene por objeto obtener un polipéptido marcado con alta actividad específica.

Un ejemplo de lo dicho puede encontrarse en los resultados logrados en la marcación de tirotrófina bovina, cuando la cantidad real de iodo presente en el momento de la reacción es notoriamente diferente de una oportunidad a la otra.

El método catalítico de valoración nos brinda el conocimiento del valor real de iodo presente en una muestra radiactiva. La concordancia que esos datos tienen con los resultados logrados en la preparación de hormonas radiactivas de alta actividad específica, justifica el interés en el conocimiento de la concentración real original del elemento inorgánico. Al mismo tiempo, no podemos olvidar que cualquier pequeña modificación o error en el procedimiento de marcación, puede variar fundamentalmente el resultado y en especial, la distribución de residuos tirosínicos mono y diiodados en la muestra obtenida.

Desde otro punto de vista, el conocimiento de la masa de iodo que se utiliza y más específicamente, la relación entre el número de átomos de iodo y moléculas de hormona permite conocer, en primera instancia, con que facilidad los núcleos fenólicos de los residuos tirosínicos presentes en una molécula proteica pueden incorporar iodo.

Aunque las relaciones óptimas entre cantidad de iodo y hormona, involucradas en marcaciones mediante el método de la cloramina-T, fueron encontradas para dos polipéptidos distintos, las conclusiones que se obtuvieron probablemente resulten válidas en la generalidad de los casos.

El carácter polipeptídico que presenta la angiotensina II en su estructura molecular, hace sumamente importante el conocimiento de las modificaciones que sufren, tanto la hormona nativa como su correspondiente derivados, según sean las condiciones del medio en el cual se la solubiliza.

En efecto, la marcación efectuada en medios de diferentes pH, nos permitió observar diferencias sustanciales en la formación de los derivados iodados del residuo tirosínico. La reactividad de dicho residuo en forma aniónica (nucleo aromático como fenato), es función directa de su concentración. Es evidente que desde el punto de vista cuantitativo, tanto la reactividad del residuo tirosínico como el de su derivado monoiodado, serán dependientes del valor de pK_{OH} de cada una de esas especies moleculares. Estos valores, al mismo tiempo, están influenciados por el valor de pH en el cual mantenemos el sistema. El proceso de iodación de la tirosina ocurre a través de una unión electrofílica entre el yodo y el anión tirosínico. Es fundamental por lo tanto, interpretar bajo este enfoque, la mayor o menor facilidad de formación de la monoiodoangiotensina y de la diiodoangiotensina al modificar las condiciones de la marcación.

Los resultados logrados con el método oxidativo del monoclóruo de yodo en medios de distinto pH, se correlacionan perfectamente con los valores que la literatura da para los pK_{OH} de la tirosina y de la monoiodotirosina. Esta concordancia tiene significado si, como hemos dicho anteriormente, se relaciona el comportamiento de la TIR-4 (en la angiotensina) con el comportamiento de la tirosina libre.

Esta premisa aparenta ser lícita ya que, el valor de pK_{OH} de la angiotensina II es muy parecido al de la tirosina libre, cuando los grupos amino y carboxilo no se encuentran ionizados. Al mismo tiempo en nuestro trabajo hemos demostrado que la angiotensina diiodada se logra con mayor facilidad, cuando la reacción de marcación se realiza a pH fisiológico, que cuando la misma se lleva a cabo en un medio francamente alcalino.

Es interesante tener presente que este comportamiento, es común en moléculas polipeptídicas en las cuales la interacción entre el o los residuos tirosínicos y el resto de la estructura es insignificante.

La importancia que adquiere la metodología de marcación de la angiotensina II y la correspondiente composición en derivados iodados, resulta evidente con la demostración lograda en las determinaciones de actividad biológica. De ellas surgen que, en tanto la moniodoangiotensina conserva gran parte de la actividad biológica original (70 % aproximadamente), la diiodoangiotensina retiene solamente el 20 % de dicha actividad.

Los resultados logrados midiendo la actividad biológica de la hormona marcada, mantiene cierta concordancia con los porcentajes de las formas expandidas de ambos derivados marcados a pH fisiológico, según surge del orden de elución de las tres especies moleculares a través de gel de sephadex.

Tenemos que recalcar lo importante que resultó, para el logro de nuestros objetivos; contar con el método de marcación electrolítico que permite variar, en forma controlada, el grado de incorporación de iodo en la estructura original de la molécula polipeptídica.

Esta aclaración adquiere gran significado, si tenemos en cuenta que la evaluación del comportamiento biológico fue posible usando preparados con grados de iodación y porcentajes de cada especie molecular perfectamente conocidos.

Existen hasta el momento actual suficientes indicios de que la pérdida de propiedades biológicas y/o quizás inmunológicas, debidas a la presencia de derivados diiodados, no ocurre solamente en el caso de la angiotensina II. Probablemente estos fenómenos se observen en otras estructuras polipeptídicas de igual o mayor complejidad.

En cambio, la posibilidad de obtener derivados monoiodados, permitiría su utilización como moléculas trazadoras de manera satisfactoria.

Una de las formas de obtener tales derivados sería, como vimos anteriormente, marcando en un medio alcalino. Al respecto debemos tener presente que, en proteínas de estructura más compleja, la iodación en medios de pH lejanos a la neutralidad, puede traer como consecuencia una desorganización estructural irreversible. El inconveniente anotado puede ser debido exclusivamente al medio, o bien ser consecuencia de la introducción de iodo en residuos tirosínicos que se encuentren parcial o totalmente protegidos desde el punto de vista estructural.

Consideramos en este sentido que, aún cuando el tema que hemos abordado no puede considerarse agotado, los resultados logrados, al tiempo de aportar datos para una mejor utilización de la angiotensina II marcada con iodo, resultan suficiente prueba de los argumentos expuestos, en la introducción general, como nuestra filosofía de trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Berson, S.A., Yalow, R.S., Bauman, A., Rothschild, M.A., Newerly, K.: Insulin - I¹³¹ metabolism in human subjects: demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects.- J. Clin. Invest.: 35, 170-190, 1956.
- (2) Berson, S.A.: Résumé of conference on insulin activity in blood and tissue fluids.- National Inst. of Health, Bethesda, Md.- Levine, R., Anderson, E., Eds.- Mayo 9-10, 1957.
- (3) Berson, S.A., Yalow, R.S.: Kinetics of reaction between insulin and insulin - binding antibody.- J. Clin. Invest.: 36, 873-874, 1957.
- (4) Berson, S.A., Yalow, R.S.: Isotopic tracers in the study of diabetes.- Advances in biol. and med. Phys.: 6, 349-430, 1958.
- (5) Yalow, R.S., Berson, S.A.: Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods.- Nature: 184, 1648-1649, 1959.
- (6) Yalow, R.S., Berson, S.A.: Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.- J. Clin. Invest.: 39, 1157-1175, 1960.
- (7) Unger, R.H., Eisentraut, A.M.: The role of endogenous glucagon in blood. Glucose regulation in man.- J. Clin. Invest.: 41, 1406-1407, 1962.
- (8) Unger, R.H., Eisentraut, A.M., Mc Call, M.S., Keller, S., Lang, H.C., Madison, L.L.: Glucagon antibodies and their use for immunoassay for glucagon.- Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.: 102, 621-623, 1959.
- (9) Unger, R.H., Eisentraut, A.M., Mc Call, M.S., Madison, L.L.: Glucagon antibodies and an immunoassay for glucagon.- J. Clin. Invest.: 40, 1280-1289, 1961.

- (10) Unger, R.H., Eisentraut, A.M., Mc Call, M.S., Madison, L.L.: Demonstration of the hormonal status of endogenous glucagon.- Ciba Foundation Colloq. on Endocrinol.: 14, 212-224, 1962.
- (11) Schalch, D.S., Parker, M.L.: A sensitive double antibody immunoassay for human growth hormone in plasma.- Nature: 203, 1141-1142, 1964.
- (12) Cerasi, E., Della Casa, L., Luft, R., Roovete, A.: Determination of human growth hormone (HGH) in plasma by a double antibody radioimmunoassay.- Acta Endocrinológica: 53, 101-120, 1966.
- (13) Boden, G., Stuart Soeldner, J.: A sensitive double antibody radioimmunoassay for human growth hormone (HGH); levels of serum HGH following rapid tolbutamide infusion.- Diabetologia: 3, 413-421, 1967.
- (14) Catt, K., Niall, H.D., Tregear, G.W.: Solid-phase radioimmunoassay of human growth hormone.- Biochem. J.: 100, 31 c-33 c, 1966.
- (15) Hales, C.N., Randle, P.J.: Immunoassay of insulin with insuline-antibody precipitate.- Biochem. J.: 88, 137-146, 1963.
- (16) Hamolsky, M.W., Stein, M., Freedberg, A.S.: The thyroid hormone-plasma protein complex in man. II. A new in vitro method for study of "uptake" of labelled hormonal components by human erythrocytes.- J. Clin. Endocrinol.: 17, 33-44, 1957.
- (17) Mitchell, M.S.: The resin uptake of radiothyroxine in sera from non-pregnant and pregnant women.- J. of Clin. Endocrinol. and Metab.: 18, 1437-1440, 1958.
- (18) Herbert, V., Gottlieb, C.W., Lau, K.S., Gilbert, P., Silver, S.: Adsorption of I^{131} -triiodothyronine (T_3) from serum by charcoal as an in vitro test of thyroid function.- J. Lab. and Clin. Med.: 66, 814-821, 1965.

- (19) Braverman, L.E., Foster, A.E., Mead, L.W.: The charcoal T_3 (Liothyronine) ratio. An in vitro test of thyroid function.- J. Am. Med. Ass.: 199, 469-472, 1967.
- (20) Selenkow, H.A., Saravis, C.A., García, A.M.: Immunobiologic studies on the molecular individuality of thyrotrophin and luteinizing hormone.- Acta Endocrinol.: 51, 32-42, 1966.
- (21) Odell, W.D., Wilber, J.F., Utiger, R.D.: Studies of thyrotrophin physiology by means of radioimmunoassay.- Recent Progress on Hormone Research.- Academic Press, New York: 23, 47-85, 1967.
- (22) Wide, L., Gemzell, C.A.: Immunological determination of pituitary luteinizing hormone in the urine of fertil and postmenopausal women and adult men.- Acta Endocrinol.: 39, 539-546, 1962.
- (23) Lunenfeld, B., Isersky, C., Shelesnyak, M.C.: Immunologic studies on gonadotropins. I. Immunogenic properties and immunologic characterization of human chorionic gonadotropin preparations (HCG) and their homologous antisera.- J.Clin. Endocrinol. and Metabolism : 22, 555-563, 1962.
- (24) Brody, S., Carlström, G.: Studies on the determination of human chorionic gonadotropin by complement fixation.- Scand. J. Clin. Lab. Invest.: 13, 683-693, 1961.
- (25) Brody, S., Carlström, G.: Immuno-assay of human chorionic gonadotropin in normal and pathologic pregnancy.- J. Clin. Endocrinol. and Metabolism.: 22, 564-574, 1962.
- (26) Midgely, A.R., Pierce, G.B. Weigle, W.O.: Immunobiological identification of human chorionic gonadotropin.- Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.: 108, 85-89, 1961.

- (27) Vallotton, M.B., Page, L.B., Haber, E.: Radioimmunoassay of angiotensin in human plasma.- *Nature*: 215, 714-715, 1967.
- (28) Catt, K.J., Cain, M.C., Coghlan, J.P.: Measurement of angiotensin II in blood.- *The Lancet*: November 11, 1005-1007, 1967.
- (29) Boyd, G.W., Landon, J., Peart, W.S.: Radioimmunoassay for determining plasma-levels of angiotensin II in man.- *The Lancet*: November 11, 1002-1005, 1967.
- (30) Catt, K.J., Coghlan, J.P.: Generation and use of antibodies to angiotensin II.- *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*: 45, 269-282, 1967.
- (31) Goodfriend, T.L., Ball, D.L., Farley, D.B.: Radioimmunoassay of angiotensin.- *J. Lab. & Clin. Med.*: 72, n° 4, 648-662, 1968.
- (32) Gocke, D.J., Gerten, J., Sherwood, L.M., Laragh, J.H.: Physiological and pathological variations of plasma angiotensin II in man.- *Circulation Research*: XXIV-XXV, Supplement I, I-131-I-146, 1969.
- (33) Abrahams, G.E.: Solid-phase Radioimmunoassay of estradiol-17- β .- *J. Clin. Endocrinol. and Metab.*: 29, 866-870, 1969.
- (34) Corker, C.S., Exley, D., Naftolin, F.: Assay of 17 β -oestradiol by competitive protein binding methods.- *Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology: 2nd Symposium Steroid Assay by Protein Binding.*- Ed. E. Diczfalussy: 305-320, 1970.
- (35) Midgley, A.R., Niswender, G.D.: Radioimmunoassay of steroids.- *Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology: 2nd Symposium - Steroid Assay by Protein Binding.*- Ed. E. Diczfalussy: 320-331, 1970.

- (36) Mikhail, G., Wu, C.H., Ferin, M., Vande Wiele, R.L.: Radio-immunoassay of estrone and estradiol.- Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology: 2nd Symposium - Steroid Assay by Protein Binding.- Ed. E. Diczfalussy: 347-358, 1970.
- (37) Steiner, A.L., Kipnis, D.M., Utiger, R.D., Parker, C.: Radio-immunoassay for the measurement of adenosine 3', 5', cyclic phosphate.- Proc. nat. Acad. Sci. USA: 64, n° 1, 367-373, 1969.
- (38) Erlanger, B.F., Beiser, S.M., Borek, E., Edel, F., Leiberman, S.: The preparation of steroid-protein conjugates to elicit antihormonal antibodies.- Methods in Immunology e Immunochemistry: 1, 144-150, 1967.
- (39) Mendlowitz, M., Wolf, R.L., Gitlow, S.E., Naftchi, N.E.: Angiotensin II. Studies in hypertension.- Circulation: XXV, 231-236, 1962.
- (40) Barbour, B.M., Bartter, F.C.: Angiotensin labelled with I¹³¹ and with tritium.- J. Clin. Endocr.: 23, 313-314, 1963.
- (41) Khairallah, P.A., Page, I.H., Bumpus, F.M., Smeby, R.R.: Angiotensin II; its metabolic fate.- Science: 138, 523-525, 1962.
- (42) Aubert, M.L.: Specificity of radioimmunoassay.- Symposium of Protein and polypeptide hormones, part III, May 19-25, 1968.- Excerpta Medica International Congress Series: n° 161, 585-588, 1969.
- (43) Landon, J., Girard, J., Greenwood, F.C.: The specificity of a radioimmunoassay for human plasma ACTH.- Protein and Polypeptide Hormones, part I.- International Congress Series n° 161.- Ed. M. Margoulies: 29-31, 1968.

- (44) Rosa, U., Massaglia, A., Pennisi, G.F., Rossi, C.A., Cozzani, I.: Correlation of chemical changes due to iodination with insulin biological activity.- Conference on problems connected with the preparation and use of labelled proteins in tracer studies.- Pisa, January 17 - 19, 1966
- (45) Rosa, U., Pennisi, F., Bianchi, R., Federighi, G., Donato, L.: Chemical and Biological effects of iodination on human albumin.- *Biochim. Biophys. Acta*: 133, 486-498, 1967.
- (46) Rosa, U., Scassellati, G., Vancheri, L.: Problems connected with the labeling of angiotensin and small polypeptides.- *Immunological Methods in Endocrinology*, 16 th Symposium of the German Endocrine Society: Ulm, February 1970.
- (47) Kurbart, H., Coli, A., Vancheri, L., Rosa, U.: Chemical and biological effects associated with the iodination of angiotensin II.- *Biochim. Biophys. Acta*: 230, 160-169, 1971.
- (48) Hunter, W.M.: Preparation and assessment of ^{131}I or ^{125}I labelled hormones for use in radioimmunoassay procedure.- *Techniques Radioimmunologiques, Séminaire Hôpital Saint-Antoine, Paris 15-19 mai 1972.*- Ed. INSERM-FRANCE: pp 17-36, 1972.
- (49) Kurbart, H., Quiroga, S., Caro, R.A., Radicella, R.: Microdetermination of iodine in "carrier-free" ^{131}I solutions.- *Radioanalytical Chemistry*. (En prensa).
- (50) Drouet, J., Hegesippe, M., Meriadec, B.: Marquage par l'iode radioactif des hormones proteiques pour usage radioimmunologique. *Techniques Radioimmunologiques, Séminaire Hôpital Saint-Antoine. Paris 15-19 mai 1972.*- Ed. INSERM-FRANCE: pp 523-532, 1972.
- (51) Greenwood, F.C., Hunter, W.M., Glover, J.S.: The preparation of ^{131}I -labelled human growth hormone of high specific radioactivity.- *Biochem. J.*: 89, 114-123, 1963.

- (52) Lederer, C.M., Hollander, J.M., Perlman, I.: Tables of isotopes.- New York, 1967.
- (53) Richmond, C.R., Findlay, J.S.: Half-life of ^{125}I .- Hlth Phys: 12, 865, 1966.
- (54) International Atomic Energy Agency: Radioisotope Production and Quality Control.- Techn. Rep. Serie 128. IAEA, Vienna, pp. 228, 1971.
- (55) Harper, P.V., Siemens, W.D., Lathrop, K.A., Brizel, H.E., Harrison, R.W.: Iodine-125.- Nippon Isotope Kaigi Hobunshu: 4, 902, 1961.
- (56) Bale, W.F., Helkamp, R.W., Davis, T.P., Izzo, M.I., Goodland, R.L., Spar, L.L.: High specific activity labeling of protein with ^{131}I .- University of Rochester, Atomic Energy Project: UR-604, 1962.
- (57) Helkamp, R.W., Contreras, M.A., Bale, W.F.: The determination of total iodine in I-131-Iodide preparations of high specific activity.- University of Rochester, Atomic Energy Project: UR-ENG 49-3, UC-48, Biology and Medicine: TID-4500, 27 th. ed., 1964.
- (58) Arino, H., Kramer, H.N.: Determination of specific activity of ^{131}I solutions via an iodide electrode.- Nuclear Applications: 4, 356-360, 1968.
- (59) Berson, S.A., Yalow, R.S.: Iodoinsulin used to determine specific activity of iodine-131.- Science: 152, 205-207, 1966.
- (60) Hallaba, E., Drouet, J.: ^{131}I -labelling of human serum albumin by the iodine monochloride and chloramine - T methods.- Int. J. Appl. Radiat. Isotopes: 22, 46-49, 1971.
- (61) Rogina, B., Dubravcic, M.: Micro-determination of iodides by arresting the catalytic reduction of ceric ions.- The Analyst:

78, 594-599, 1953.

- (62) Sandell, E.B., Kolthoff, I.M.: Chronometric catalytic method for the determination of micro quantities of iodines.- J. Am. Chem. Soc.: 56, 1426, 1934.
- (63) Lein, A., Schwartz, N.: Ceric sulfate-arsenious acid reaction in microdetermination of iodine.- Anal. Chem.: 23, 1507-1510, 1951.
- (64) Sandell, E.B., Kolthoff, I.M.: Microdetermination of iodine by a catalytic method.- Microchim. Acta: 1, 9-25, 1937.
- (65) Chaney, A.L.: Improvements in determination of iodine in blood.- Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.: 12, 179-181, 1940.
- (66) Appelby, A., Spillet, R.E.: Cerium (IV); Arsenite reaction in microdetermination of iodine for specific activity measurement.- The Radiochemical Centre, Amersham, Buckinghamshire, RCC-M 210, Unclassified, 1967.
- (67) Hunter, W.M., Greenwood, F.C.: Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity.- Nature: 194, 495-496, 1962.
- (68) Mc Farlane, A.S.: Efficient trace-labelling of proteins with iodine.- Nature: 182, 53, 1958.
- (69) Mc Conahey, P.J., Dixon, F.J.: A method of trace iodination of proteins for immunologic studies.- Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.: 29, 185-189, 1966.
- (70) Hunter, R.: Standardization of the chloramine-T method of protein iodination.- Proc. Soc. Exp. Biol. Med.: 133, 989-992, 1970.
- (71) Hunter, W.M.: The preparation of radioiodinated proteins of high activity, their reaction with antibody in vivo: The Radioimmuno-

assay.- Handbook of Experimental Immunology. Ed. Weir, D.M.
Davis, Pennsylvania: pp 608-654, 1967.

- (72) Roche, J., Michel, R.: Natural and artificial iodoproteins.-
Advances in Protein Chem.: 6, 253-296, 1951.
- (73) Bauer, H., Strauss, E.: Protein-iodine interaction, iodination
of nitroglobin.- Biochem. Z.: 284, 231-237, 1936.
- (74) Ramachandran, L.K.: Protein-iodine interaction.-' Chem. Rev.:
56, 199-218, 1956.
- (75) Putman, F.W.: The chemical modification of proteins.- The Pro-
teins, 1/B. Ed. Neurath-Bailey, New-York: pp 893-972, 1953.
- (76) Olcott, H.S., Fraenkel-Conrat, H.: Specific group reagents for
proteins.- Chem. Rev.: 41, 151-197, 1947.
- (77) Lughes, W.L., Straessle, R.: Preparation and properties of serum
and plasma proteins. Iodination of human serum albumin.- J. Am.
Chem. Soc.: 72, 452-457, 1950.
- (78) Li, C.H.: Iodination of tyrosine groups in serum albumin and
pepsin.- J. Am. Chem. Soc.: 67, 1065-1069, 1945.
- (79) Li, C.H.: Kinetics and mechanism of 2,6-di-iodotyrosine formation.-
J. Am. Chem. Soc.: 64, 1147-1152, 1942.
- (80) Herriot, R.M.: Reactions of native proteins with chemical reagents.-
Advances in Protein Chemistry: 3, 169-225, 1947.
- (81) Hughes, W.I.: The chemistry of iodination.- Ann. N.Y. Acad.Sci.:
70, 1-19, 1957.
- (82) Shone, B., Brown, D.M., Howard, S.M., Pierce, G.: Bovine, human
and porcine thyrotrofina: Molecular wights, amino and carboxyl-
terminal studies.- Archives of Biochemistry and Biophysics: 126,

456-468, 1968.

- (83) Gocke, D.J., Gerten, J., Sherwood, L.M., Laragh, J.M.: Physiological and pathological variations of plasma angiotensin II in man. Correlation with renin activity and sodium balance.- Supplement I to Circulation Research: XXIV-XXV, 131-145, 1969.
- (84) Mc Farlane, A.S.: Radioisotope techniques in the study of protein metabolism.- Tech. Rep. Ser. n° 45, IAEA, Vienna, 1965.
- (85) Glover, I.S., Shepherd, B.P.: Determination of iodine-131 specific activity by protein iodination.- Nature: 212, 285-286, 1966.
- (86) Smeby, R.R., Arakawa, K., Bumpus, M.F., Marsh, M.M.: A proposed conformation of isoleucyl⁵-angiotensin II.- Biochim. Biophys. Acta: 58, 550-557, 1962.
- (87) Page, I.H., Bumpus, F.M.: Angiotensin.- Physiol. Revs.: 41, 331-390, 1961.
- (88) Bumpus, F.M., Khairallah, P.A., Arakawa, K., Page, I.H., Smeby, R.R.: The relationship of structure to pressor and oxytocic actions of isoleucine⁵-angiotensine octapeptide and various analogues.- Biochim. Biophys. Acta: 46, 38-44, 1961.
- (89) Paiva, T.B., Paiva, A.C.: The oxytocic activity of synthetic angiotensinamide.- J. Pharmacol. Exptl. Therap.: 130, 177-182, 1960.
- (90) Paiva, A.C., Paiva, T.B.: The photo-oxidative inactivation of angiotensinamide.- Biochim. Biophys. Acta: 48, 412-414, 1961.
- (91) Paiva, T.B., Paiva, A.C., Scheraga, H.A.: The conformation of angiotensin II in aqueous solutions.- Biochemistry: 2, 1327-1334, 1963.
- (92) Vilallonga, F., Pouchan, M.: Ionization of tyrosyl group in angiotensin II.- Biochim. Biophys. Acta: 75, 449-452, 1963.

- (93) Paladini, A.C., Delius, A.E., Fernandez, M.T.F.: Potentiation of the pressor effects of angiotensin in alkaline solution.- *Biochim. Biophys. Acta*: 74, 168-170, 1963.
- (94) Huidobro, H.V., Paladini, A.C.: Effects de l'actinomycine D sur le développements normal et sur les modifications expérimentales de la morphogénèse de l'œuf de l'oursin *Paracentrotus lividus*.- *Experientia*: 19, 572, 1963.
- (95) Methot, A.L., Meyer, P., Biron, P., Lorain, M.F., Lagrue, G., Milliez, P.: Hepatic inactivation of angiotensin.- *Nature*: 203, 531-532, 1964.
- (96) Fernandez, M.T.F., Delius, A.E., Paladini, A.C.: Influence of pH on the conformation of angiotensin II and analog peptides.- *Biochim. Biophys. Acta*: 154, 223-225, 1968.
- (97) Springell, P.H.: Reaction of iodine with insulin and fibrous insulin.- *Biochim. Biophys. Acta*: 63, 136-149, 1962.
- (98) Ramachandran, L.K.: Protein - iodine interaction.- *Chem. Revs.*: 56, 199-218, 1956.
- (99) Helmkamp, R.W., Goodland, R.L., Bale, W.F., Spar, I.L., Mutschler, L.E.: High specific activity iodination of γ -globulin with iodine-131 monochloride.- *Cancer Research*: 20, 1495-1500, 1960.
- (100) Hallaba, E., El-Asrag, H.: ^{131}I -labelling of tyrosine by iodine monochloride.- *International J. App. Rad. and Isot.*: 21, 107-112, 1970.
- (101) Britton, H.T.S.: Hydrogen ions.- Ed. Chapman and Hall Ltd., London: vol. 1, pp 301, 1942.
- (102) Martin, R.B., Edsall, J.T., Wetlaufer, D.B., Hollingworth, B.R.: A complete ionization scheme for tyrosine, and the ionization

- constants of some tyrosine derivatives.- J. Biol. Chem.: 233, 1429-1435, 1958.
- (103) Herriot, R.M.: Identification of mono - iodotyrosine from iodinated pepsin.- J. Gen. Physiol.: 31, 19-26, 1947.
- (104) Gemmill, Ch. L.: The apparent ionization constants of the phenolic hydroxyl groups of thyroxine and related compounds.- Arch. Biochem. Biophys.: 54, 359-367, 1955.
- (105) Li, Ch. H.: Kinetics of reactions between iodine and histidine.- J. Am. Chem. Soc.: 66, 225-227, 1944.
- (106) Brunings, K.J.: Preparation and properties of the iodo-histidines.- J. Am. Chem. Soc.: 69, 205-208, 1947.
- (107) Wolff, J., Covelli, I.: Factors in the iodination of histidine in proteins.- European J. Biochem.: 9, 371-377, 1969.
- (108) Berson, S.A., Yalow, R.S., Schreiber, S.S.: Tracer experiments with iodine¹³¹-labeled human serum albumin: distribution and degradation studies.- Clin. Invest.: 32, 746-768, 1953.
- (109) Pressman, D., Sternberger, L.A.: The relative rates of iodination of serum components and the effect of iodination on antibody activity.- J. Am. Chem. Soc.: 72, 2226-2233, 1950,
- (110) Steinfeld, J.R., Paton, R.R., Flick, A.L., Milch, A.R., Beach, F.E., Tabern, L.D.: Distribution and degradation of human serum albumin labeled with iodine-131 by different techniques.- Ann. N.Y. Acad. Sci.: 70, 109-121, 1957.
- (111) Rosa, U.: Bruxelles conf. on preparation and storing of labelled molecules.- EUR Proc. 1625 e, 1954.

- (112) Rosa, U., Scassellati, G.A., Pennisi, F., Giagnoni, P., Riccioni, N., Giordani, R.: Labelling of human fibrinogen with ^{131}I by electrolytic iodination.- *Biochim. Biophys. Acta.*: 86, 519-526, 1964.
- (113) Francis, G.E., Mulligan, W., Wormall, A.: Labeling of proteins with I^{131} , S^{35} and P^{32} .- *Nature*: 167, 748-751, 1951.
- (114) Veall, N., Pearson, J.D., Hanley, T.: The preparation of iodine-132 and iodine -131 labeled human serum albumin for clinical tracer studies.- *Brit. J. Radiol.*: 28, 633-635, 1955.
- (115) Mc Farlane, A.S.: Labelling of plasma proteins with radioactive iodine.- *Biochem. J.*: 62, 135-143, 1956.
- (116) Gilmore, R.C., Robbins, M.C., Reid, A.F.: Labeling bovine and human albumin with I^{131} .- *Nucleonics*: 12, 65-68, 1954.
- (117) Reith, W.S., Tampion, W.: Preparation of ^{131}I -3-Monoiodotyrosine and ^{131}I -3-5- Diiodotyrosine of very high specific activity.- *Nature*: 197, 180-181, 1963.
- (118) Lavine, T.F.: The iodometric determination of cysteine.- *J. Biol. Chem.*: 109, 141-145, 1935.
- (119) Bumpus, F.M., Page, I.H.: Preliminary studies on the structure of angiotensin.- *Science*: 119, 849, 1954.
- (120) Skeggs, L.T., Marsh, W.H., Kahn, J.R., Shumway, N.P.: Purification of hypertensin.- *J. Exptl. Med.*: 100, 363-370, 1954.
- (121) Kuether, C.A., Haney, M.E.: Purification of angiotonin (hypertensin).- *Science*: 121, 65-66, 1955.

- (122) Craig, L.C., Harfenist, E.J., Paladini, A.C.: Dialysis studies. VII. The behavior of angiotensin, oxytocin, vasopressin, and some of their analogs.- *Biochemistry*: 3, 764-769, 1964.
- (123) Riniker, B.: Recent work on the chemistry and biochemistry of angiotensin II.- *Metabolism*: 13, n° 10 part 2, 1247-1255, 1964.
- (124) Bumpus, F.M., Smeby, R.R.: Importance of amino acid side groups for biologic activity of angiotensin II. *Circulation*: XXV, 183-185, 1962.
- (125) Barbour, B.H., Bartter, F.C.: Angiotensin labelled with I^{131} and with Tritium.- *J. Clin. Endocrinol.*: 23, 313-314, 1963.
- (126) Wolf, R.L., Mendlowitz, M., Gitlow, S.E., Naftchi, N.E.: The metabolism of angiotensin II.- *Circulation Res.*: 11, 195-208, 1962.
- (127) Mendlowitz, M., Wolf, R.L., Gitlow, S.E., Naftchi, N.E.: Angiotensin II. Studies in Hypertension.- *Circulation*: XXV, 231-236, 1962.
- (128) Shipley, R.E., Tilden, J.H.: A pithed rat preparation suitable for assaying pressor substances.- *Proc. Soc. Exp. Biol.*: 64, 453-455, 1947.
- (129) Skeggs, L.T., Kahn, J.R., Marsh, W.H.: A method of assaying small amounts of hypertensin.- *Lab. Invest.*: 2, 109-114, 1953.
- (130) Page, I.H., Helmer, O.M.: Crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from reaction between renin and renin activator.- *J. Exp. Med.*: 71, 29-42, 1940.

- (131) Valle, J.R., Prado, E.S., Prado, J.L.: Bioassay of hypertensin in pithed rats and cats based on a four - point design.- *Acta Physiol. Lat. Amer.*: 2, 251-262, 1952.
- (132) Feldberg, W., Lewis, G.P.: The action of peptides on the adrenal medulla. Release of adrenaline by bradykinin and angiotensin.- *J. Physiol.*: 171, 98-108, 1964.
- (133) Collins, D.A.: Influence of tetraethylammonium on responses of isolated intestine to angiotonin and other substances.- *J. Pharmacol. Exp. Ther.*: 94, 244-248, 1948.
- (134) Picarelli, Z.P., Kupper, R., Prado, E.S., Prado, J.L., Valle, J.R.: Assay of renin and hypertensin with the isolated guinea - pig - ileum.- *Circulation Res.*: 2, 354-358, 1954.
- (135) Page, I.H.: Difference in the activating effect of normal and hypertensive plasma on intestinal segments treated with renin.- *Amer. J. Physiol.*: 130, 29-33, 1940.
- (136) Prado, J.L., Valle, J.R., Picarelli, Z.P.: Observations concerning the unitage system and sensitivity of some biological preparations to hypertensin.- *Acta Physiol. Lat. Amer.*: 4, 104-120, 1954.
- (137) Ludueña, F.P.: Acción de los preparados de hipertensina sobre los musculos lisos.- *Rev. Soc. Argent. Biol.*: 16, 358-375, 1940.
- (138) Regoli, D., Vane, J.R.: A sensitive method for the assay of angiotensin.- *Brit. J. Pharmacol.*: 23, 351-359, 1964.
- (139) Ekins, R.P., Newman, G.B., O'Riordan, J.L.: Theoretical aspects of "saturation" and radioimmunoassay.- *Radioisotopes in Medicine: In vitro studies. Proceedings of a Symposium held at the Oak Ridge Associated Universities. November 13-*

- 16: AEC Symposium Series 13, pp 59-100, 1967.
- (140) Lin, S., Ellis, H., Weisblum, B., Goodfriend, T.L.: Preparation and properties of iodinated angiotensins.- Biochem. Pharmacol.: 19, n° 3, 651-662, 1970.
- (141) Mann, L.T.: Spectrophotometric determination of nitrogen in total micro-kjeldahl digest.- Analytical Chemistry: 35, n°13, 2179-2182, 1963.
- (142) Covelli, I., Wolf, J.: Iodination of the normal and buried tyrosyl residues of Lysozyme.I. Chromatographic Analysis.II. Spectrophotometric Analysis.- Biochemistry: 5, 860-871, 1966.
- (143) Mayberry, W.E., Rall, J.E., Bertoli, D.: Kinetics of iodination. I. A comparison of the kinetics of iodination of N-Acetyl- L - Tyrosine and N-Acetyl -3- iodo -L- Tyrosine.- J. Amer. Chem. Society: 86, 5302-5307, 1964.
- (144) Jovanović, V., Nemoda, Dj., Lwin, K.: An effective electrolytic iodination of human serum albumin at alkaline pH.- International J. Appl. Rad. Isotopes: 23, 242-244, 1972.
- (145) Perlman, R.L., Ederlhoch, H.: The formation of diiodotyrosine in iodinated human serum albumin.- J. Biol. Chem.: 242, n° 10, 2416-2422, 1967.
- (146) Gandolfi, C., Malvano, R., Rosa, U.: Preparation and immunoreactive properties of monoiodinated angiotensin labelled at high specific activity.- Biochem. Biophys. Acta: 251, 254-261, 1971.