

**MARCACION DE LA SERO-ALBUMINA HUMANA  
CON YODO RADIOACTIVO (I-131)**

Resumen del trabajo de tesis presentado por CARMEN CECILIA  
MOTTA O. para optar al título de Químico Farmacéutico.

Presidente de tesis: Dr. ERNESTO BARBOSA.

## INTRODUCCION

*La aceptación creciente de los valores de los isótopos radioactivos en el diagnóstico y en la investigación, así como en la terapéutica mediante fuentes de radiación, han hecho de ellos una herramienta de trabajo de la que muy pocos investigadores pueden prescindir.*

*La química nuclear como una especialización, ha sufrido un gran avance especialmente en los últimos veinte años; aunque muchos químicos han trabajado con materiales radioactivos desde el descubrimiento de la radioactividad en 1896, inicialmente la mayor parte de ellos se dedicaron a la separación y examen de los materiales radioactivos naturales.*

*El entendimiento de que los radiosótopos artificiales, producto directo de la transmutación de los núcleos, podrían ser un auxiliar valioso en la investigación, vino después del descubrimiento de la radioactividad artificial en 1933.*

*Pero más importante aún que cualquiera de esos aspectos son las conclusiones a que se ha podido llegar en base a estos conceptos. La ciencia es fundamentalmente un esfuerzo para construir modelos a través de la imaginación y de las generalizaciones de las ideas ya existentes, pero tales generalizaciones pueden ser de*

poco valor, a menos que puedan usarse para predecir nuevos fenómenos.

*La construcción de tales modelos o explicaciones temporales es la esencia del trabajo científico; con los radioisótopos como cualquier otra ciencia, las oportunidades para abstraer, comprender e interpretar los fenómenos se han multiplicado.*

*Los estudios actuales con anticuerpos, hormonas y muchas proteínas marcadas radioisotópicamente han simplificado la comprensión de los procesos tan complejos llevados a cabo en el organismo animal.*

*Los grandes adelantos en las ciencias básicas por medio del uso de los trazadores radioactivos, ha creado la inquietud en nuestro medio de realizar estudios tendientes a encontrar técnicas de marcación de sustancias con radioisótopos que disminuyen el costo y eliminan su almacenamiento prolongado.*

*Este último aspecto es esencial, ya que el almacenamiento va en deterioro de sus propiedades características, como son la disminución de su actividad específica y la liberación de los átomos marcadores.*

*El presente trabajo se desarrolló en el Instituto Nacional de Cancerología, comprende en su parte general la discusión de los conceptos básicos sobre la estructura química de las proteínas y sobre algunos de los usos y aplicaciones de los isótopos radioactivos.*

*La parte experimental comprende la marcación de la SERO-ALBUMINA HUMANA CON YODO RADIOACTIVO (I-131), por varias técnicas, su identificación electroforética y la elección de la mejor técnica de marcación, de acuerdo al rendimiento obtenido y a la actividad específica alcanzada.*

## LAS PROTEINAS - AGENTES DE ESPECIFICIDAD BIOLÓGICA

Las proteínas, como lo indica su nombre derivado de la palabra griega *proteuo*: yo ocupé el primer lugar; son de importancia primaria en la vida de la célula. Se encuentran en todos los organismos celulares, forman los elementos contráctiles y las enzimas que liberan la energía para la conservación de la vida y se hallan presentes en la sangre realizando funciones de transporte.

Lo que es notable acerca de las proteínas, es que no son solamente el material principal del edificio celular, sino las reguladoras de todas las actividades llevadas a cabo por el aparato viviente.

Para efectuar su función reguladora las proteínas, como enzimas, están dotadas de "especificidad" o sea la habilidad para distinguir entre moléculas diferentes. Esta propiedad más que cualquier otra, es característica del fenómeno de la vida misma. La "especificidad" que poseen las proteínas, no solamente permite la regulación de la multitud de procesos llevados a cabo en la célula, sino que hace que ellas constituyan las bases moleculares de las diferencias que existen entre individuos y entre especies.

Una de las reglas de estabilidad en la naturaleza es que estructura y función están estrechamente relacionadas; para entender las funciones desempeñadas por las proteínas, es necesario conocer en detalle su estructura. En los últimos quince años, una serie de asombrosos descubrimientos se han sumado a los conceptos ya existentes acerca de las estructuras de las proteínas (1, 2, 3).

### PROTEINAS PLASMÁTICAS

Desde los tiempos de la Antigua Grecia hasta el siglo XIX, el hombre sostuvo extrañas teorías respecto a la sangre que impidieron el avance médico por siglos.

En la actualidad tenemos un conocimiento preciso de las diversas funciones que desempeña: eliminación de dióxido de carbono, balance electrolítico del agua y control hormonal, transporte de oxígeno y de muchas otras sustancias esenciales para la nutrición y sistemas enzimáticos.

En el año de 1921 Howe desarrolló un método para la separación de las proteínas del suero en fracciones de globulina y albúmina por medio de la precipitación con sulfato de sodio. La fracción proteínica precipitada la llamó "fracción globulina" y el resto que permanecía en solución la llamó "fracción albúmina".

Por precipitación del suero con sulfato de sodio a concentraciones de 13.5%, 17.4% y 21% obtuvo determinados valores que designó con el nombre de "euglobulinas", "pseudoglobulinas" y "globulina total".

Actualmente se reconoce que la fracción obtenida por procesos de saturación media con sulfato de amonio es una mezcla de proteínas, puesto que la precipitación comienza con concentraciones de sulfato de amonio mucho más bajas que las necesarias para la saturación media (2.05 M), llegando a ser más o menos continua hasta obtener la saturación completa (4.1 M).

El doctor Edwin Cohn de la Escuela de Medicina de Harvard, emprendió por este tiempo un proyecto para estudiar la forma de fraccionar la sangre humana. Había dos tendencias tras la separación de las proteínas del plasma humano. Primero, cada componente *debía* servir alguna función en el proceso biológico del suero. Segundo, cuando un desorden fisiológico era atribuible a la falta de un componente específico del plasma, ese componente *podía* ser aislado e inyectado. Entonces los componentes restantes se utilizaban para el tratamiento de otras deficiencias específicas de la sangre.

En 1941 el doctor Cohn presentó la primera fracción de sangre humana para pruebas clínicas. Esta fue la "*Albumina de Suero Normal*".

La separación de los componentes del plasma es un proceso químico que se basa en la solubilidad de las proteínas. Consiste en una serie de pasos muy similares en cada caso:

1. La proteína se precipita con alcohol y amortiguadores.
2. La proteína precipitada se separa de las proteínas solubles por un proceso de centrifugación.
3. Los precipitados se suspenden en agua.
4. Luego se congelan rápidamente antes de la desecación.
5. La desecación separa el alcohol del precipitado, dejando la proteína seca. Esto se lleva a cabo aplicando un alto vacío al precipitado congelado.
6. Las proteínas desecadas se reconstituyen.
7. La proteína se esteriliza por un proceso de filtración bacteriológica.
8. El excedente que contiene otras proteínas solubles se somete a un proceso de fraccionamiento similar, con el objeto de recuperar las proteínas adicionales del plasma.

Esta operación es parte de lo que se conoce como "Sistema de Cinco Factores Variables". Las proteínas se precipitan usando concentraciones variables de alcohol etílico a baja temperatura, diferentes pH y concentraciones de sal. Estas fracciones obtenidas por el método de Cohn (4) son llamadas:

1. Fracción I
2. Fracción II + III
3. Fracción IV - 1
4. Fracción IV - 4
5. Fracción V

Estas cinco fracciones son luego subfraccionadas por precipitaciones adicionales con etanol, bajo condiciones adecuadas. El material de partida es plasma normal que tiene un pH alrededor de 7.4 y una concentración de sal que le confiere una potencia iónica de 0.16.

FRACCIONES DE LAS PROTEINAS PLASMATICAS,  
SEGUN COHN

| Fracciones<br>electroforéticas           | Fracciones<br>según Cohn | Índice aproxi-<br>mado en el<br>plasma en<br>g/100 ml. | Peso molecular    |
|--|--------------------------|--|-------------------|
| Albúminas séricas . . . . .              | V                        | 3,2  | 69.000            |
| Globulinas - alfa <sub>1</sub> . . . . . | IV-1                     | 0,2  | 200.000           |
|  | IV-4                     | 0,1  | 70.000            |
| Globulinas - alfa <sub>2</sub> . . . . . | IV-6                     | 0,1  | 300.000           |
| Globulinas - beta <sub>1</sub> . . . . . | IV-7                     | 0,2  | 90.000            |
|  | III-0, III-2             | 0,2  | 150.000           |
|  | III-0                    | 0,1  | 500.000-1.000.000 |
|  | III-0                    | 0,2  | 1.300.000         |
| Globulinas - beta <sub>2</sub> . . . . . | III-1                    | 0,2  | 150.000           |
| Globulinas - gamma . . . . .             | II                       | 0,5  | 156.000           |
|  | II                       | 0,1  | 300.000           |
| Fibrinógeno . . . . .                    | I-2                      | 0,2  | 400.000           |

(Tomado de Cohn y col.) J. Am. Chem. Sec., 72, 465 (1950)

1. *Formación de las proteínas plasmáticas.*

Experimentos de perfusión con lisina marcada con C-14, en el hígado aislado vivo, han confirmado que el hígado sintetiza la totalidad de la albúmina y el fibrinógeno y el 80% de las globulinas. Un interesante estudio realizado por Tarver, acerca de la formación de las proteínas del plasma usando metionina marcada con S-35 corrobora lo dicho anteriormente (5). Puesto que la metionina es

un constituyente general de las proteínas tisulares, la proporción de su incorporación dentro de estas proteínas puede usarse para comprender su síntesis.

Los investigadores inyectaron la metionina marcada a perros normales y hepatectomizados y determinaron la incorporación del trazador en las proteínas tisulares y en las fracciones de globulina, albúmina y fibrinógeno del plasma.

La metionina radioactiva no apareció en el fibrinógeno del plasma de los perros hepatectomizados, indicando que el hígado es el único responsable de la formación del fibrinógeno; la rata de incorporación de la metionina en las fracciones de globulina y albúmina del plasma en los perros normales fue 7 y 20 veces más rápida respectivamente, que la de los perros hepatectomizados.

## 2. *Variaciones en las proteínas plasmáticas.*

Las variaciones de las proteínas plasmáticas en estados patológicos, constituyen un tema muy extenso.

Muchas enfermedades se caracterizan por alteraciones en los valores de la albúmina del plasma, globulinas y fibrinógeno; con ninguna o ligera modificación en la cantidad de proteínas plasmáticas totales.

En general, una disminución de la cantidad de albúmina está acompañada por un aumento de la fracción de globulina y viceversa. Las infecciones causan a menudo un marcado aumento en el valor de la gamma - globulina, debido a la formación de anticuerpos.

El fibrinógeno del plasma también se halla aumentado en estados de infecciones agudas, nefrosis, embarazo y después de radiaciones con rayos X; disminuye notablemente en algunas enfermedades hepáticas por la interferencia en su formación.

Se han podido observar enfermedades congénitas raras, como la agamaglobulinemia, en la cual la persona carece de gamma - globulina lo cual la hace susceptible a las infecciones por falta de anticuerpos.

Otro caso anormal es la macroglobulinemia, en este estado patológico se halla presente en el suero una gamma - globulina de alto peso molecular, rica en carbohidratos. Estas macroglobulinas precipitan en frío y se redisuelven al calentarlas, son llamadas por esto "crioglobulinas".

En términos generales, las proteínas plasmáticas disminuyen como resultado de deficiencias en la dieta, hemorragias, nefrosis

y principalmente en enfermedades hepáticas que obstaculizan su formación.

### 3. *Funciones principales de las proteínas plasmáticas.*

Las proteínas del plasma son de importancia vital en el mecanismo fisiológico del organismo. Contribuyen a mantener la viscosidad del plasma y en consecuencia proporcionan la resistencia al flujo sanguíneo en el sistema vascular, lo cual es esencial para la acción eficiente del corazón.

A través de su efecto osmótico regulan la distribución del fluido entre la sangre y los tejidos. Por medio del mecanismo de la coagulación sanguínea proporcionan el control de las hemorragias; contribuyen a la disolución y transporte en la sangre de lípidos, vitaminas liposolubles y varias drogas por medio de la formación de complejos; suministran los anticuerpos, en la fracción de las gamma - globulinas factor indispensable en el control de las infecciones y sirven además como fuente de nutrición para los tejidos del cuerpo.

## **ISOTOPOS RADIOACTIVOS**

Los isótopos radioactivos artificiales, producto de aceleradores de partículas y de reactores nucleares, pudieron obtenerse por primera vez en cantidades significativas a finales de la década de 1940.

Los isótopos son las diversas formas o variedades de un mismo elemento químico que difieren entre sí por su peso atómico. De los varios isótopos de un elemento, los que son radioactivos se caracterizan por su inestabilidad.

Esta inestabilidad se debe a la presencia de energía en exceso, que produce un desequilibrio dentro del núcleo.

Para liberar esta energía y de este modo obtener la estabilidad, el núcleo del átomo emite energía en forma de partículas, llamadas partículas alfa y beta o en forma de ondas electromagnéticas, las llamadas radiaciones gamma o fotones gamma. Las partículas alfa se han usado muy poco en el diagnóstico de las enfermedades, pero las partículas beta han encontrado numerosas aplicaciones de orden médico.

Prácticamente todos los elementos químicos cuando son sometidos al bombardeo con partículas atómicas sufren un cambio físico en el núcleo, produciendo algunas veces un isótopo del mismo

elemento y otras veces un isótopo de un elemento químico diferente (6).

Existen tres métodos principales para la producción de los isótopos radioactivos: a) Isótopos resultantes de la fisión del uranio en las pilas atómicas; b) Isótopos producidos por el bombardeo con partículas neutras, y c) Isótopos producidos mediante el bombardeo con partículas cargadas.

Las aplicaciones más importantes de los isótopos radioactivos se deben a dos propiedades fundamentales de los átomos radioactivos: el comportamiento químico de un átomo radioactivo antes de desintegrarse, es el mismo que el de los otros átomos isotópicos del elemento en cuestión; la radiación emitida por un átomo radioactivo al desintegrarse puede ser detectada.

### 1. *Átomos trazadores.*

Los trazadores son materiales empleados para marcar átomos específicos, organismos vivientes u otras entidades, lo cual permite que las sustancias marcadas sean seguidas en su movimiento físico o en la cinética de sus conversiones. El marcador puede ser un grupo químico de sustitución, un colorante o un elemento radioactivo.

Los átomos trazadores deben reunir ciertos requisitos para que sean útiles en procesos de diagnóstico e investigación. Puesto que los trazadores radioactivos aportan informaciones de importancia en procesos de traslocación, metabólicos y de depósito, no deben ejercer acciones farmacológicas; debe saberse además la toxicidad que pueda tener el compuesto, sus metabolitos y cualquier derivado radioisotópico que produzca; la cantidad del trazador que se administre debe ser pequeña para evitar cualquier disturbio biológico y posibles efectos de radiación (7).

El empleo de los trazadores, en el estudio de las reacciones llevadas a cabo en los organismos vivos tiene dos ventajas esenciales: el compuesto marcado posee el mismo destino metabólico y las mismas propiedades biológicas que el compuesto no marcado, el experimento puede realizarse en el sistema intacto, puesto que la medida de la radioactividad se hace por el efecto externo de los rayos; finalmente como la cantidad del trazador empleado es muy pequeña, no alcanza a producir efectos tóxicos y no altera en consecuencia los procesos biológicos y fisiológicos permitiendo así seguir en detalle el proceso vital que se desea investigar.

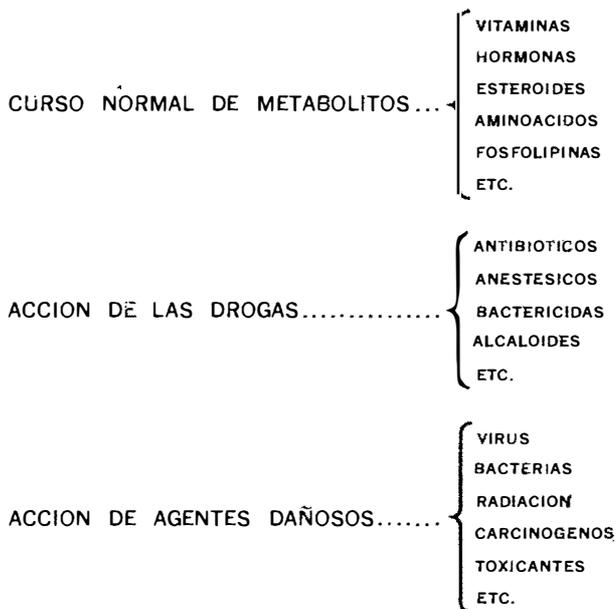


FIGURA 1. Isótopos como indicadores en investigación clínica. (Cortesía de la Comisión de Energía Atómica de los Estados Unidos, U S A E C).

La introducción de los trazadores en el campo de la medicina ha hecho posible resolver varios problemas y revolucionar conceptos en el diagnóstico médico y las ciencias básicas.

En el sentido más amplio estos estudios se dividen en tres categorías:

1 - A) *Estudios por dilución isotópica.*

Algunos de los procesos en los que se emplea la técnica de la dilución isotópica son:

1. Determinación del contenido de agua del organismo.
2. Determinación del sodio intercambiable.
3. Determinación del espacio de cloro.
4. Determinación del volumen sanguíneo y plasmático.
5. Determinación de espacios hormonales y de secreciones hormonales.

### 1 - B) *Estudios de difusión y flujo.*

Los trazadores se han aplicado extensamente en estudios de difusión y flujo para determinar la absorción, distribución y permeabilidad de los iones o moléculas marcados radioisotópicamente:

1. Absorción y permeabilidad de la membrana celular.
2. Potencia cardíaca.
3. Circulación sanguínea, cerebral, hepática, coronaria y renal.

### 1 - C) *Estudios metabólicos.*

En estudios metabólicos se parte de sustratos marcados con átomos radioactivos identificables, los cuales pueden seguirse a través de su camino metabólico. También es posible estudiar procesos dinámicos dentro del "pool" metabólico para establecer la naturaleza de precursores específicos dentro de procesos de síntesis. Estos estudios comprenden:

1. Metabolismo de carbohidratos, lípidos y elementos minerales.
2. Metabolismo, conjugación y excreción de las drogas.
3. Metabolismo hormonal.

#### 2. *Preparación de compuestos marcados.*

Existen tres métodos generales para la obtención de compuestos marcados a saber:

- A) Biosíntesis.
- B) Síntesis química.
- C) Irradiación.

### 2 - A) *Biosíntesis.*

El método de marcación por síntesis biológica comprende tres pasos primordiales: a) La administración del material isotópico a un organismo viviente; b) La conversión por el organismo al compuesto deseado, incorporando el átomo radioactivo en su síntesis, y c) La separación del compuesto marcado en un estado puro.

Este método de marcación tiene algunas desventajas como la obtención de compuestos marcados al azar especialmente cuando se utiliza C\* y H\* radioactivo; además el aislamiento puede ser difícil y la actividad específica obtenida muy baja (8).

### 2 - B) *Síntesis química.*

Es el método usado generalmente para preparar compuestos marcados, mediante moléculas simples de las cuales, una al menos es radioactiva. De este modo se obtienen materiales marcados específicamente (9).

### 2 - C) *Irradiación.*

Este método se basa en la preparación de compuestos marcados mediante activación en la pila atómica o ciclotrón. En esta forma ciertos elementos en el compuesto irradiado son convertidos en isótopos radioactivos de los mismos elementos (10).

## 3. *Importancia de la marcación de drogas con isótopos radioactivos*

El uso de los radioisótopos en Farmacología Experimental como también en medicina y biología, ha simplificado los procesos investigativos.

En general los isótopos pueden usarse como trazadores biológicos si pueden ser detectados en el sistema a niveles que no alteren el equilibrio homeostático. Si la forma química del isótopo es similar a la del elemento presente en forma natural, sufrirá la misma biotransformación que el elemento natural del cuerpo. Un ejemplo ilustrativo de su uso en Farmacología es el de la penicilina radioactiva obtenida por Rowley (11) agregando S-35 a cultivos de *penicilium chrisogenum*. El isótopo se incorpora al grupo amino de la molécula y permite estudiar el mecanismo de absorción, circulación y eliminación de la penicilina.

Ursprung y col. (12) estudiando la diálmelamina marcada con C-14 en el anillo encontraron que además de su efecto anti-secretorio poseía un metabolito activo que tenía efectos vasodilatadores periféricos.

En forma similar Schmid (13) marcando mezclas racémicas de la glutetimida con C-14 e H-3, explicó las diferentes acciones

\* Compuesto marcado.

hipnóticas de la droga de acuerdo al grado de afinidad que poseían los isómeros ópticos de alcanzar un sitio receptor en el cerebro.

Respecto a las vitaminas los estudios más importantes se han hecho con la vitamina B-12 la cual se obtiene en forma radioactiva sometiéndola al bombardeo con neutrones en el reactor nuclear, activando el átomo de Co de su molécula.

De los estudios de Folkers (14) se ha podido elaborar una prueba diagnóstica, de la anemia perniciosa, basada en el hecho de que el paciente con esta enfermedad o el gastrectomizado total no absorben la vitamina B-12 administrada por vía oral y en cambio la excretan íntegramente por las heces.

La obtención de alcaloides marcados ha hecho posible estudiar las acciones farmacológicas de la nicotina, morfina y otros alcaloides.

## CONSIDERACIONES GENERALES ACERCA DE LA MARCACION DE PROTEINAS CON I-131

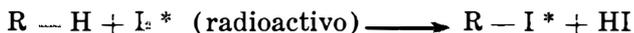
### 1. Método de yodinación.

El yodo es un constituyente de compuestos de gran importancia biológica, el reemplazo del yodo estable con un isótopo determinado de este elemento es a menudo factible. Muchos compuestos que no contienen yodo pueden marcarse con un grupo sustituyente que contenga este elemento o bien con el isótopo radioactivo en forma directa.

Los métodos de yodinación son muy variados y se escogen de acuerdo a la estructura de los compuestos a marcar.

Muchos procesos usan yodo elemental preparado previamente en medio no acuoso o en medio acuoso que contenga yoduro de sodio o de potasio.

La reacción más común con yodo elemental, es una sustitución del yodo por hidrógeno de acuerdo a la siguiente reacción:



Esta reacción se desvía rápidamente hacia la derecha si hay agentes oxidantes tales como ácido yódico, ácido nítrico, persulfatos, los cuales oxidan el ácido iodhídrico formado: HI\*.

El ácido yódico (yodatos) tiene una acción escasa puesto que su reacción con el HI\* produce solamente I<sub>2</sub>\* y agua.

Todos los métodos de yodinación directa utilizan el yodo en el estado de oxidación +1; en la forma molecular libre el yodo

posee la estructura  $I^- - I^+$ . El yodo puede estar en la forma de  $KI$ ,  $I_2$  o puede ser preparado naciente, *in situ*; también puede prepararse momentos antes de usarlo por oxidación del radioyoduro con agentes oxidantes tales como nitrito, yodato o peróxido de H. Los yodatos y el ácido yódico disminuyen la actividad específica en el compuesto marcado porque producen yodo y se usan solamente cuando se necesite portador (15).

## 2. Yodinación de proteínas.

En los métodos corrientemente usados de yodinación de proteínas, solamente la porción catiónica de la molécula de yodo llega a ligarse a la estructura del anillo bencénico de la tirosina en la molécula de proteína, de modo que la eficiencia de la marcación es del 50%.

En la práctica el porcentaje de incorporación del yodo es siempre menor que éste y puede llegar a obtenerse un rendimiento menor si la relación usada de yodo-proteína es menor de un átomo por molécula (16).

Pueden obtenerse valores mayores que éste, si se añaden agentes oxidantes que liberen el yodo del yoduro, pero la mayoría de ellos parece que tengan efectos adversos sobre las propiedades de la proteína marcada.

La marcación con  $I-131$  de la albúmina y de otras proteínas, consiste fundamentalmente en la yodificación de los radicales tirosil de la molécula. Esta puede ser la reacción primaria cuando la cantidad relativa de yodo es pequeña. En las proteínas como la seroalbúmina, que contienen un grupo monotiol ( $-SH$ ), el primer yodo consumido forma un yoduro de sulfenilo, el cual se hidroliza rápidamente y se va perdiendo de la molécula de acuerdo al grado de la marcación.

Los radicales histidil de la molécula de albúmina, también son yodificados pero en un grado mucho menor, cuando se usan grandes cantidades de yodo. Estas reacciones no son importantes en el proceso de marcación; el objetivo en la marcación es introducir el mínimo número de átomos de yodo, de modo que el cambio en la composición de la proteína sea mínimo.

Según Hughes (17), la sero - albúmina se marca introduciendo un átomo gramo de yodo por molécula gramo de albúmina, con un peso molecular de 60.000.

El yodo se incorpora principalmente en el anillo aromático (radicales tirosil) y en grado menor dentro de los anillos imidazólicos de los compuestos histidil.

Si se introducen de 5-10 átomos de yodo por molécula de albúmina, la cisteína y otros aminoácidos se oxidan y destruyen (18). Tales proteínas exhiben características anormales como diferente comportamiento electroforético y propiedades inmunológicas y biológicas diferentes comparadas con la proteína normal.

### 2 - A) *Yodinación directa con monoclóruo de yodo* (Método de A. S. McFarlane).

El método de yodinación con monoclóruo de yodo es ampliamente utilizado en la yodificación de proteínas.

El monoclóruo de yodo (ICl) es un poderoso agente yodificante para numerosos tipos de compuestos, se intercambia efectivamente con el I - 131 para formar monoclóruo de yodo radioactivo ICl - 131.

El radioyodo se añade al monoclóruo de yodo portador, antes o después de la conversión del monoclóruo de yodo a hipoyodito.

Este paso que se caracteriza por la pérdida del color amarillo de ICl, parece ser un prerrequisito para la sustitución del yodo por hidrógeno, en el anillo bencénico de la tirosina. La sustitución se lleva a cabo inyectando un buffer de glicina (pH 9) en la solución de monoclóruo de yodo - 131 justamente antes de mezclarlo con la solución de albúmina. El pH de la solución de albúmina no debe ser mayor de 9.5, puesto que el hipoyodito es inestable por encima de este margen. Usando este proceso se puede lograr una incorporación del 60% de la radioactividad, si la relación molar de monoclóruo de yodo proteína es mayor de dos.

La solución de ICl portador, es muy estable y solo reacciona con las proteínas una vez que el ión hipoyodito (incolore) se ha formado elevando el pH.

Con un pH mayor de 10 este ión es muy inestable, de modo que el cambio en el pH debe hacerse con cuidado, antes de mezclar con la solución de proteína (18).

### 3. *Preparación previa de la proteína para la marcación.*

Las proteínas que se van a marcar deben ser excepcionalmente puras, puesto que cualquier traza de agentes contaminantes interfiere en la yodinación.

Si la proteína contiene trazas de agentes oxidantes, estos toman el isótopo, como también los grupos sulfhidrilo de la albúmina. De este modo la proporción de yodo incorporado a la proteína es

menor. Para evitar esto la proteína se preoxida con yodo libre a un pH de 4-4.5 al cual la substitución no se realiza.

#### 4. *Dificultades debidas a los agentes reductores.*

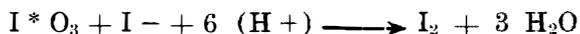
En los procesos de radioyodinación para obtener una máxima eficiencia, las soluciones de yodo deben estar libres de preservativos y de agentes estabilizadores; las soluciones de yodo radioactivo comúnmente vienen con agentes estabilizadores (agentes reductores) los cuales consumen el yodo liberado e impiden así la yodificación.

La presencia de tales agentes se indica por la ausencia de yodo libre al añadir agentes oxidantes a la solución.

Estos agentes contaminantes pueden eliminarse efectuando una cromatografía en papel de la solución del isótopo y eluyendo luego la zona que contenga el isótopo con un solvente adecuado. La recuperación de la actividad en el e'uído a menudo no pasa de un 40%. Un método más adecuado es el de efectuar una destilación de la solución radioactiva añadiendo una traza de portador, acidificando y recibiendo el destilado en una solución de álcali diluído (19).

Las soluciones de yodo radioactivo de alta actividad específica que son viejas o inadecuadamente conservadas pueden contener alguna cantidad de radioyodo como radioyodato, el cual no está en equilibrio con el yoduro y de este modo no es adecuado para la yodinación.

Es aconsejable añadir una pequeña cantidad de ácido antes de añadir el yoduro de modo que ocurra la siguiente reacción:



#### 5. *Remoción del yodo no ligado a la proteína.*

Una operación esencial es la de remover el yodo no ligado a la proteína por medio de una resina de intercambio iónico, por diálisis o por tratamiento con Sephadex.

La resina Amberlita IRA - 400 es aconsejable en este tipo de trabajos como también la gel de Sephadex G-100 (20).

#### 6. *La filtración estéril de las soluciones marcadas es una operación de gran importancia dentro del proceso de marcación.*

La filtración por medio de un filtro bacteriológico o por una membrana Millipore no tiene efectos adversos sobre las propiedades de la proteína marcada. Al efectuar la filtración se debe

añadir alrededor de 150 mg. de albúmina normal para disminuir los efectos de radiolisis.

La solución marcada se almacena en el refrigerador a una temperatura de  $-4^{\circ}\text{C}$ ; de este modo se conserva la solución por tres semanas y se disminuye la liberación de yodo de la albúmina marcada.

## APLICACIONES CLINICAS DE LA SERO - ALBUMINA MARCADA

### 1. *Estudios sanguíneos:*

1. A) Volumen sanguíneo y plasmático.
1. B) Circulación periférica.
1. C) Volumen minuto cardíaco.

#### 1. A) *Volumen sanguíneo y plasmático.*

La determinación del volumen sanguíneo y plasmático por medio de la sero - albúmina marcada se basa en el principio de dilución isotópica.

Este procedimiento consiste en diluir dentro de un sistema líquido, una cantidad conocida del isótopo radioactivo y obtener al cabo de determinado período muestras de esa dilución.

La radioactividad presente en esas muestras, se compara con la radioactividad de un patrón o estándar; de acuerdo con esta relación se conoce el grado de dilución, pudiéndose deducir el volumen del diluyente (21).

#### 1. B) *Estudios de circulación periférica.*

Se pueden verificar estudios sobre el tiempo de circulación periférica por medio de la sero - albúmina marcada, basados en el principio de desplazamiento o flujo del isótopo radioactivo de un lugar a otro del sistema vascular.

La técnica consiste en inyectar la albúmina marcada en una vena del brazo y determinar la aparición de la radioactividad en los pies por medio de un sistema detector colocado allí. Esto indica el equilibrio que alcanza al isótopo con el plasma normal a través de los capilares y la velocidad con que el isótopo deja el lecho capilar.

### 1. C) *Determinación del volumen minuto cardíaco.*

La determinación de la cantidad de sangre bombeada por el corazón por unidad de tiempo, es un parámetro de gran importancia fisiológica.

Si se conoce el consumo de oxígeno por unidad de tiempo, determinado directamente, y luego se determina la diferencia del oxígeno arterio-venoso, mezclado entre la sangre venosa y la sangre arterial, se puede calcular fácilmente la cantidad de sangre que debe pasar a través de los pulmones para transportar la cantidad necesaria de oxígeno.

En 1951 se introdujo el uso de la sero-albúmina marcada para determinar el volumen minuto cardíaco, basado en los mismos principios de la técnica de los colorantes, por ser más exacto que los métodos anteriores (22).

La descripción de la técnica (23) usada actualmente es la siguiente:

Se inyectan 10 microcueros de albúmina en la vena del brazo y se hace una punción arterial. Por medio de un tubo de polietileno se lleva la sangre hasta un recipiente donde se reciben 30cc/ minuto.

Un contador de centelleo, acoplado con un sistema de registro, va detectando la actividad de la muestra de sangre a su paso por el tubo.

Se obtiene así una curva de la actividad en la sangre arterial, después de la inyección del trazador. Se observa en ella que la concentración de la actividad en la sangre arterial aumenta rápidamente y luego va disminuyendo.

### 2. *Estudio de localización selectiva de tumores*

#### 2 - A) *Cerebro*

#### 2 - B) *Medula espinal*

2. A) Los primeros experimentos sobre la localización de tumores se desarrollaron con sustancias colorantes. Estos estudios mostraron que las sustancias colorantes se localizaban selectivamente en tejidos cancerosos, no exactamente dentro del cáncer sino en el estroma intercelular, debido probablemente a la alteración de la permeabilidad de los vasos sanguíneos del estroma (24).

La sero - albúmina marcada se inyecta al paciente por vía IV y la medida de la actividad se realiza 6 - 8 horas después. El registro de la actividad se lleva a cabo con un colimador de centelleo, recorriendo diferentes partes del cráneo y desarrollando simultáneamente un "scanning".

2. B) También ha sido usada la sero-albúmina humana para localizar tumores en la médula espinal. Según la técnica de Bauer y Yuhl (25) se inyecta 0.1 millicuries del trazador en el espacio subaracnoideo; la localización del trazador se efectúa por medio de un "scanning" como en el método anterior.

### 3. *Localización de tumores en pulmón e hígado.*

La localización de tumores en pulmón e hígado se realiza con los macroagregados de la albúmina marcada. La sero-albúmina marcada se convierte fácilmente en partículas del orden de 10 a 100 micras por medio de tratamiento con calor y diferentes ajustes de pH.

Los agregados moleculares así formados, retienen el radioyodo más ávidamente que el material sin este tratamiento. Los macroagregados y microagregados de albúmina (10-20 u) son coloides electronegativos estables y no requieren calentamiento adicional o agentes dispersantes para que permanezcan suspendidos en solución salina fisiológica (26).

Las partículas de tamaño mayor de 1.0 micra son atrapadas por los capilares del pulmón. La cantidad de la actividad en el pulmón es proporcional al flujo arterial; normalmente el flujo en la región apical, es menor que en la parte media y baja del pulmón. Después de inyectada la dosis del trazador, se realiza un "scanning" para localizar la presencia de tumores o metástasis en estos órganos.

### 4. *Uso de los macroagregados de radioalbúmina en la visualización de órganos.*

Los macroagregados de albúmina radioyodada se han utilizado para visualizar los órganos junto con el desarrollo simultáneo de un "scanning".

Durante el período de excreción del yoduro ( $T_{1/2} = 10$  horas) el yodo no ligado se comporta como yoduro inorgánico, se concentra en el tiroides, glándulas salivares y estómago (27, 28).

### 5. *Estudios de localización y de diagnóstico:*

- 5. A) Localización de la placenta.
- 5. B) Delineación de efusiones pericardiales.
- 5. C) Diagnóstico de insuficiencia pancreática.

#### 5. A) *Localización de la placenta.*

La localización de la placenta con isótopos radioactivos fue introducida por Browne usando sodio radioactivo. Recientemente Visser y Baker (29), han utilizado la sero - albúmina marcada en estos estudios.

#### 5. B) *Delineación de efusiones pericardiales.*

Estudios realizados por Rejali y col. (30) usando la sero - albúmina marcada, han permitido delinear por medio de un scanning sombras en el corazón debidas a efusiones pericardiales y hacer la distinción entre estas sombras y las ocasionadas por corazones hipertroficados.

#### 5. C) *Diagnóstico de insuficiencia pancreática.*

La insuficiencia pancreática resulta de la digestión defectuosa de las grasas y proteínas, con pérdida excesiva de grasas libres y nitrógeno en la evacuación intestinal. La técnica diagnóstica consiste en administrar un alimento junto con la albúmina marcada; después de 72 horas de la administración se toman muestras de orina, sangre y materias fecales (31).

### M E T O D O A

#### MARCACION DE LA SERO - ALBUMINA HUMANA CON I - 131, SEGUN LA TECNICA DE HERZMAN (32).

#### 1. *Materiales y métodos.*

##### a) Solución de proteína.

La solución de proteína utilizada en el trabajo fue suministrada por Laboratorios Cutter, Solución de Sero - albúmina humana al 20%, Fracción V (8), y viene estabilizada con solución 0,02 M de caprilato de sodio y solución 0,02 M de acetiltriptofanato de sodio (33). Se emplearon 2 ml de esta solución al 20% que contenían 400 mg de proteína y se completó el volumen hasta 5 ml con agua destilada libre de pirógenos, donada por Laboratorios Quibi.

##### b) Solución de NaI - 131.

La solución de proteína se marcó con una actividad de 76 microcuries contenidos en 0.3 ml de solución de NaI - 131. El reactor atómico de Oak Ridge U.S.A., produjo la solución del isótopo utilizada en la marcación.

- c) Como agente oxidante en el proceso se utilizaron 4 ml de agua cloro 0.005 N, recién preparada y titulada con tiosulfato de sodio.

## 2. Técnica.

A la solución del isótopo (b) se le añadió la cantidad anotada de agua de cloro (c), más la solución de proteína (a), por medio de una pipeta Pasteur agitando lentamente.

Esta mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente por dos horas y se pasó luego por una columna de resina de intercambio iónico DOWEX 2 x 8; la resina intercambiadora posee las siguientes características:

Número de mallas: 200 - 400.

Grupo intercambiador: amina cuaternaria tipo 2/Styrol-DVB.

Carácter del grupo: fuertemente básico.

Dimensión de la partícula: 0.05 - 0.10 mm.

Humedad: 35 - 40%.

Grado de enmallamiento  $2 \times 8$ .

La columna de resina se cargó previamente con 10 ml de solución de HCl 0.1 N y se lavó con 200 ml de agua destilada.

El paso a través de la columna remueve el yodo no ligado a la proteína.

## 3. Controles.

### 3. A) Análisis electroforético.

Tomando 10 lambdas de albúmina - I - 131, se efectuaron electroforesis en zona de papel, diariamente, durante 2 - 3 semanas usando un buffer de barbital sódico a pH de 8.6, con el objeto de valorar la estabilidad de la marca isotópica. Este análisis electroforético se llevó a cabo en las siguientes condiciones:

Tanque de electroforesis tipo vertical.

Papel N° 2043 a Mgl.

Tiempo de corrida, 16 horas.

Corriente continua, 106 V.

La tira E - F se secó a la lámpara y se dividió en secciones de 1 cm; la localización de la radioactividad en las secciones del electroforetograma se hicieron en el tubo Geiger-Müller de ventana de mica de  $1.9 \text{ mg/cm}^2$ , calibrado con una fuente de carbono radioactivo (C - 14), emisor beta y acoplado a un sistema detector El Tronics Model 64 SS.

El "plateau" del tubo G - M al cual se efectuaron las lecturas fue de 900 V; las lecturas de la actividad de las secciones de la tira E - F se hicieron por un tiempo de 5 minutos, corrigiendo las CPM respecto al background ambiental.

La localización del desplazamiento de la albúmina - I - 131 en el electroforetograma, se hizo con solución reveladora de azul de bromo fenol al 1% (34), poniendo en contacto las secciones numeradas de la tira E - F con 10 ml de solución reveladora, durante cinco minutos. La zona correspondiente a la albúmina apareció coloreada de azul intenso.

Se lavaron luego las secciones del electroforetograma con agua destilada y se secaron con lámpara.

### 3. B) *Pureza radioquímica.*

La pureza radioquímica se analizó mediante cromatografía ascendente, para determinar la presencia de impurezas como yoduros o yodatos que según la U.S.P. (35) no deben exceder del 5%.

Las condiciones del ensayo fueron las siguientes:

Papel: Whatman N° 1.

Solvente: metanol al 70%.

Tiempo: tres horas en oscuridad.

### 3. C) *Esterilidad.*

La solución de albúmina - I - 131 se esterilizó mediante paso a través de un filtro bacteriológico con placa de vidrio aglomerado, Vidrio Jena 25 G 5 F, diámetro del poro 0,7 - 1.5 micras, con ayuda de vacío y se efectuaron siembras en medios de tioglicolato, Sabouraud y caldo de peptonas.

## M E T O D O B

### MARCACION DE LA SERO - ALBUMINA HUMANA CON I - 131, SEGUN LA TECNICA DE VEALL (36).

#### 1. *Materiales y métodos.*

- a) Solución de yoduro de potasio (2 mg/ml);
- b) Solución de yodato de potasio (1 mg/ml);
- c) Solución de yoduro de potasio al 20%;
- d) Solución de HCl 1N;

- e) Solución de amoníaco 1 N;
- f) Solución de NaI - 131, libre de portador, con una actividad de 87 microcuries contenidos en 0.2 ml;
- g) Solución de proteína; se usaron 2 ml de solución de sero - albúmina Cutter al 20% que contenían 400 mg de proteína y se completó a un volumen de 5 ml con solución salina fisiológica. La solución de proteína se almacenó a una temperatura de  $-4^{\circ}$  C.

## 2. Solución yodificante.

Esta solución se preparó de la siguiente forma: se tomaron 0.5 ml de solución de yoduro de potasio (a) y se le agregaron 0.5 ml de solución de yodato de potasio (b). Esta mezcla se añadió a la solución del isótopo (d) por medio de una pipeta Pasteur, agitando continuamente.

La mezcla se dejó en reposo por 20 minutos y luego se le agregó 0.1 ml de solución de yoduro de potasio (c) y se dejó nuevamente en reposo a temperatura ambiente por 25 minutos.

Transcurrido este tiempo se pasó la solución de proteína marcada por una columna de resina de intercambio iónico AMBERLITA IRA 400, que posee las siguientes características:

Número de mallas: 20 - 50.

Grupo intercambiador: amina cuaternaria tipo 1/Styrol-DVB.

Carácter del grupo: fuertemente básico.

Dimensión de la partícula: 0.3 - 1.0 mm.

Humedad: 42 - 48%.

Grado de enmallamiento: 8.

La columna se cargó previamente con 10 ml de solución salina al 10% y se lavó con 200 ml de agua destilada.

## 3. Controles:

- 3. A) Análisis electroforético.
- 3. B) Pureza radioquímica.
- 3. C) Esterilidad.

## M E T O D O C

### MARCACION DE LA SERO - ALBUMINA HUMANA CON I - 131, SEGUN LA TECNICA DE TATA Y RALL (37).

#### 1. *Materiales y métodos:*

- a) Solución buffer de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  -  $\text{CO}_3\text{HNa}$  pH de 9.4;
- b) Solución de yoduro de potasio 0.2 M;
- c) Yodo sublimado 3.6 mg;
- d) Solución del isótopo; 0.22 ml de solución de NaI - 131 libre de portador con una actividad de 1 millicurie de I - 131.
- e) Solución de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  1 M;
- f) Solución de proteína; 0.5 ml de solución de sero - albúmina Cutter al 20% que contenían 100 mg de albúmina.

#### 2. *Técnica.*

A la solución de proteína (f) en 7.2 ml de solución buffer (a) se le agregaron 3 ml de solución de yoduro de potasio (b) y 3.6 mg de yodo sublimado. A esta mezcla se añadió la solución de NaI-131 (d) lentamente por medio de una pipeta Pasteur y a continuación se elevó el pH hasta 10.1 con varias gotas de solución de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  (e) y se dejó la solución de proteína marcada en reposo a temperatura de 2° C por 24 horas.

Transcurrido este tiempo se pasó la solución marcada a través de una membrana de diálisis, con el fin de remover el yodo no ligado a la albúmina.

El proceso de dialización con agua destilada, se realizó por un tiempo de dos horas y la solución dializada se almacenó a una temperatura de 2° C.

#### 3. *Controles:*

3. A) Análisis electroforético.
3. B) Pureza radioquímica.
3. C) Esterilidad.

## M E T O D O D

MARCACION DE LA SERO - ALBUMINA HUMANA CON I - 131,  
SEGUN LA TECNICA DE A. S. McFARLANE (16).

### 1. *Materiales y métodos.*

- a) Solución de proteína; se usó 1 ml de solución de sero-albúmina Cutter al 20% que contenía 200 mg de proteína.
- b) Solución buffer de glicina 1 M a pH de 4.5;  
Se tomaron 19 ml de glicina 1 M en ClNa 0.25 M (7.5 gr de glicina que se llevaron a un volumen de 100 ml con solución de NaCl-0.25 M), y se le agregó 1 ml de solución de HCl-0.1 N; se ajustó el pH a 4.5.
- c) Solución buffer de glicina a pH de 9.0;  
Se tomaron 9 ml de glicina 1 M en ClNa 0.25 M y se le agregó 1 ml de solución de NaOH 1N; se ajustó el pH a 9.0.
- d) Solución de I<sub>2</sub> en KI N/100;  
Se disolvieron 1.35 gr de yodo sublimado en una solución de 2.4 gr de KI en 20 ml de agua y se diluyó hasta 1 litro.
- e) Solución de monocloruro de yodo (solución Stock);  
A partir de esta solución Stock, se prepara la solución de trabaj● con que se marca la albúmina.

*Solución Stock.* Se disolvieron 0.166 gr de KI y 0.106 gr de 10<sub>3</sub>K en 2.5 ml de agua destilada, luego se añadió gota a gota y agitando continuamente 2.4 ml de HCl concentrado y luego 1 ml de CCl<sub>4</sub> y una gota de solución de NaI M/10 hasta obtener un color rosado fugaz. Se llevó la solución a un volumen de 10 ml con agua destilada.

#### *Solución de trabajo.*

Se tomó 1 ml de la solución anterior y se diluyó con 2 ml de NaOH 1 N y 47 ml de agua destilada.

- f) Solución de yodo radioactivo, libre de portador y de agente reductor, en solución N/50 de NaOH.  
Puesto que la solución de I - 131 trae agentes reductores tales como tiosulfato de sodio y sulfito de sodio, se verificó una destilación de la solución del isótopo con el fin de eliminar estos contaminantes que interfieren en la reacción.

### *Destilación de la solución de NaI - 131.*

Se tomó una alícuota de 0.2 ml de solución de NaI-131 que contenía una actividad de 192 microcuries y se le añadieron 6 gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentrado, 50 mg de yoduro de potasio disueltos en 0.1 ml de agua, 1 ml de agua oxigenada al 30% y algunas perlas de vidrio para minimizar la ebullición.

Todo esto se colocó en un aparato de microdestilación QUICK-FIT.

El extremo del condensador estaba sumergido 1/2 cm bajo la superficie de 3 ml de solución de NaOH N/50 que se encontraban en el balón donde se recibió el destilado. Se calentó el aparato de destilación sumergido en un baño de aceite, con suavidad, hasta una temperatura de 134 - 145° C.

### *2. Técnica.*

En un tubo con tapón esmerilado se colocó 1 ml de la solución de proteína (a) se la añadieron 1.5 ml de solución buffer de glicina ácida (b) y suficientes gotas de solución de I<sub>2</sub> en KI (d) hasta un color amarillo permanente, lo que indicó la liberación de yodo. Con este tratamiento se preoxidaron los grupos sulfhidrilo de la albúmina.

La solución de proteína preoxidada se pasó a través de una columna cargada con gel de SEPHADEX G 100 para eliminar el exceso de I<sub>2</sub> y los iones I<sup>-</sup>. Se lavó el tubo donde estaba la solución de albúmina con solución salina fisiológica, se pasó por la columna este lavado y se recibió de la columna en este mismo tubo, lavando la columna con solución salina fisiológica.

El eluido se llevó a un pH de 9, con 1 ml de solución buffer de glicina (c). En otro tubo con tapón esmerilado se colocó el producto de la destilación del NaI - 131 libre de portador y de agentes reductores, que contenía una actividad de 115 microcuries. Se llevó a pH 9 con 9 gotas de buffer de glicina (c) y se le agregó 0.5 ml de solución de trabajo de monocloruro de yodo, se volcó rápidamente dentro de la solución de albúmina preoxidada, se agitó con una pipeta y se dejó en reposo por dos minutos.

Se pasó luego la solución de proteína marcada por otra columna cargada con gel de SEPHADEX G 100 para remover el I - 131 no ligado a la proteína.

Se lavó la columna con 2 ml de solución salina fisiológica y el eluido se pasó por un filtro bacteriológico, diluyendo con 2 ml

de proteína al 20% para disminuir los efectos de radiolisis. Se recibió en un frasco de dosis múltiples y se le agregó 1 gota de alcohol bencílico como preservativo.

### 3. *Controles:*

- 3. A) Análisis electroforético.
- 3. B) Pureza radioquímica.
- 3. C) Esterilidad.

## *RESULTADOS*

### 1. *Método A.*

La medida de la actividad de una alícuota de 0.1 ml de la solución de albúmina I-131, se determinó en el contador de centelleo SCALER 132 B (fabricado por Nuclear Chicago Corporation).

El contador de centelleo se calibró con una fuente de Cs-137 emisor gamma, que estaba acoplado al contador de pozo, donde se introdujo el tubo de ensayo con la muestra a medir.

Las condiciones del SCALER 132 B al efectuar la medida eran las siguientes:

$$\Delta E = 60$$

$$E = 334$$

$$HV = 855$$

$$BKG = 39 \text{ CPM}$$

Donde:

$$\Delta E = \text{ventana}$$

$$E = \text{base para el yodo}$$

$$HV = \text{alto voltaje}$$

$$BKG = \text{background ambiental}$$

A) Las CPM de la alícuota, detectadas en el contador y relacionadas al volumen total de proteína marcada 9 ml que contienen 400 mg de proteína corresponden a una actividad de 8 microcuries de I-131 ligados a la albúmina.

B) En base a la actividad utilizada en el proceso, 76 microcuries y a la cantidad de yodo radioactivo unido a 400 mg de

proteína, 8 microcuries, se calculó la "actividad específica" por mg de proteína, que fue según estos datos de 0.020 microcuries mg.

C) El rendimiento del método se calculó de acuerdo a la actividad específica; según este dato fue de 10%.

D) La relación "átomo gramo de yodo/molécula gramo de albúmina", determinada según la cantidad de proteína marcada 400 mg y la actividad específica obtenida 0.020 microcuries/mg de proteína, fue de 1 átomo gramo de yodo/ $10^6$  moles de albúmina (P. M. = 67.000 gr).

#### E. Análisis electroforético.

El análisis de 13 experimentos electroforéticos (véanse las figuras 2 y 3 y la Tabla número 1), no mostró cantidad apreciable de I-131 en posición diferente a la zona de la albúmina.

#### F. Esterilidad.

Medio de tioglicolato: resultado (—)

Medio de Saboraud: resultado (—)

Caldo de peptonas: resultado (—)

#### G. Pureza radioquímica.

No se detectaron yoduros (RF: 0.9) por medio del análisis radiométrico del cromatograma en el Tubo G-M. Se detectaron yodatos con un Rf de 0.53. La albúmina marcada permaneció en el origen, Rf de 0.

METODO A

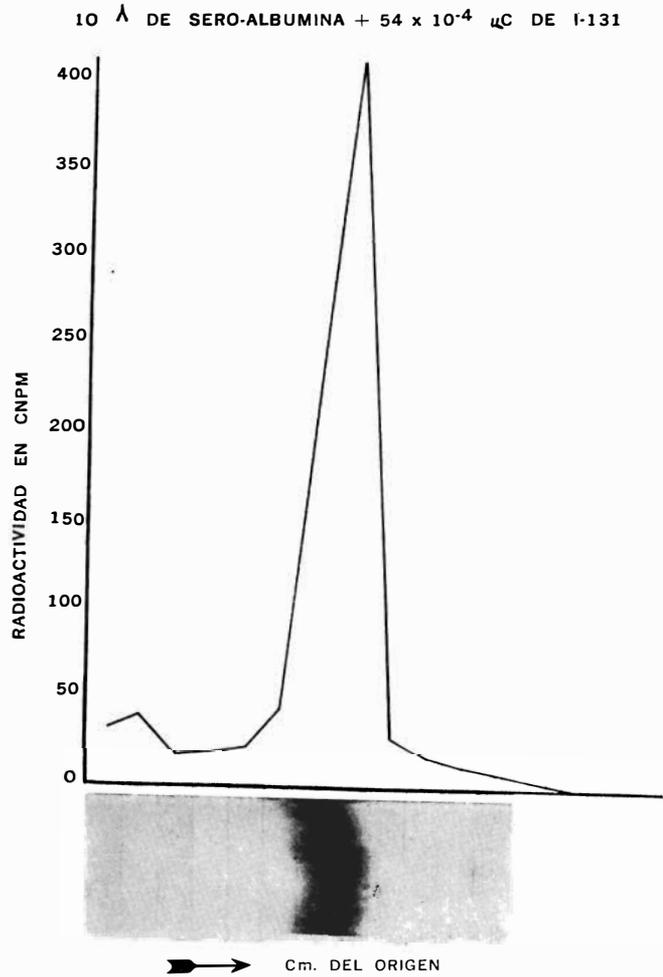


FIGURA 2. Electroforesis en zona de papel, buffer de barbital pH 8.6. Método A. Nótese que la radioactividad migra con la albúmina.

METODO A

CNPM EN LA ZONA DE LA ALBUMINA

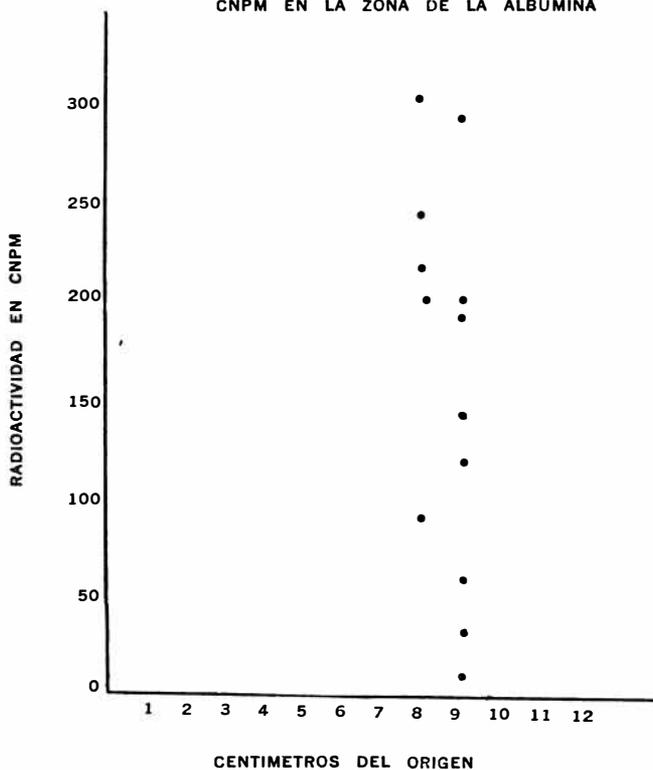


FIGURA 3. — C - NPM de 13 análisis electroforéticos en zona de papel (Véase Tabla N° I).

TABLA N° I

METODO A. C N P M en la zona de la albúmina.

| Tiempo en días | Posición de la albúmina | Microcuries en 10 lambdas | C N P M |
|----------------|-------------------------|---------------------------|---------|
| 1              | 8                       | $59 \times 10^{-4}$       | 302     |
| 3              | 9                       | $54 \times 10^{-4}$       | 295     |
| 4              | 9                       | $50 \times 10^{-4}$       | 210     |
| 5              | 8                       | $42 \times 10^{-4}$       | 208     |
| 6              | 8                       | $38 \times 10^{-4}$       | 247     |
| 8              | 8                       | $35 \times 10^{-4}$       | 223     |
| 9              | 9                       | $39 \times 10^{-4}$       | 118     |
| 10             | 9                       | $23 \times 10^{-4}$       | 126     |
| 11             | 9                       | $21 \times 10^{-4}$       | 140     |
| 12             | 8                       | $19 \times 10^{-4}$       | 93      |
| 15             | 9                       | $17 \times 10^{-4}$       | 54      |
| 17             | 9                       | $15 \times 10^{-4}$       | 38      |
| 21             | 9                       | $12 \times 10^{-4}$       | 13      |

2. Método B.

Se midió la actividad de una alícuota de 0.1 ml de la solución de albúmina — I - 131 en el contador de centelleo SCALER 132 B, calibrado con una fuente de Cs - 137.

Las condiciones del aparato al efectuar la medida eran las siguientes

$$\Delta E = 100$$

$$E = 314$$

$$HV = 740$$

$$BKG = 28 \text{ CPM}$$

A) Las CPM de la alícuota se relacionaron al volumen de la albúmina marcada 6 ml que contenían 400 mg de proteína. La cantidad de I - 131 ligado a la proteína fue de 10 microcuries.

B) De acuerdo a la actividad utilizada en el proceso 87 microcuries y a la cantidad de yodo ligado a los 400 mg de albúmina 10 microcuries, se obtuvo una cantidad específica de 0.025 microcuries/mg de proteína.

C) El rendimiento del método, calculado de acuerdo a la actividad específica obtenida 0.025 microcuries/mg, fue de 11%.

D) La relación "átomo gramo de yodo/molécula gramo de albúmina", determinada de acuerdo a la cantidad de proteína marcada 400 mg y a la actividad específica 0,025 microcuries/mg de proteína, fue de "1 átomo gramo de yodo/ $10^6$  moles de albúmina".

E) Análisis electroforético.

El análisis de 12 experimentos electroforéticos no mostró cantidad apreciable de yodo radioactivo en posición diferente a la

zona de la albúmina. (Véanse las figuras 4 y 5 y la Tabla II).

F) Esterilidad.

Medio de tioglicolato: resultado (—).

Medio de Saboraud: resultado (—).

Caldo de peptonas: resultado (—).

G) Pureza radioquímica.

No se detectaron yoduros (Rf.: 0.9) por medio del análisis radiométrico del cromatograma en el tubo G-M.

Se detectaron yodatos con un Rf de 0.53.

La albúmina marcada permaneció en el origen Rf de 0.

### METODO B

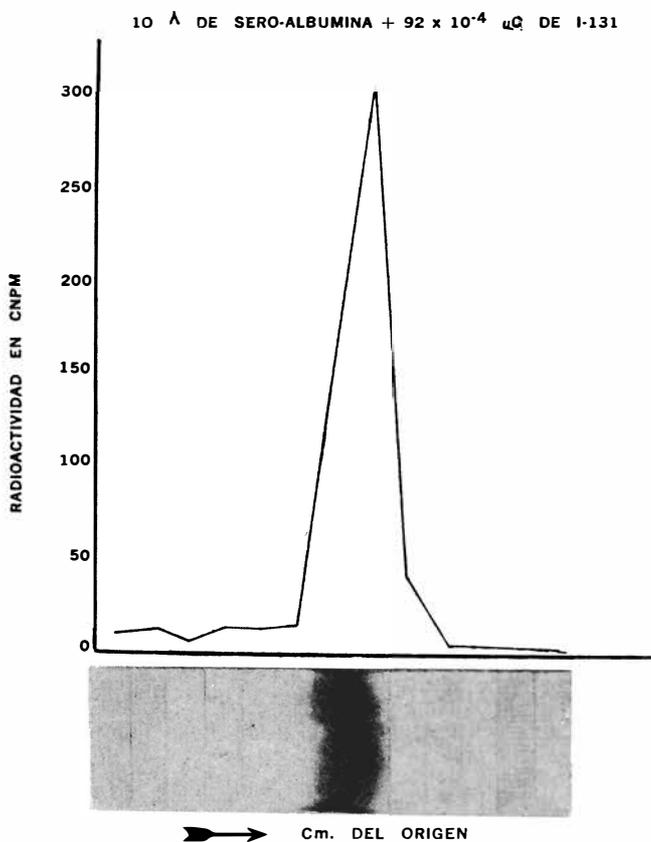


FIGURA 4. Electroforesis en zona de papel, buffer de barbital sódico pH 8.6. Método B. Nótese que la radioactividad migra con la albúmina.

METODO B

CNPM EN LA ZONA DE LA ALBUMINA

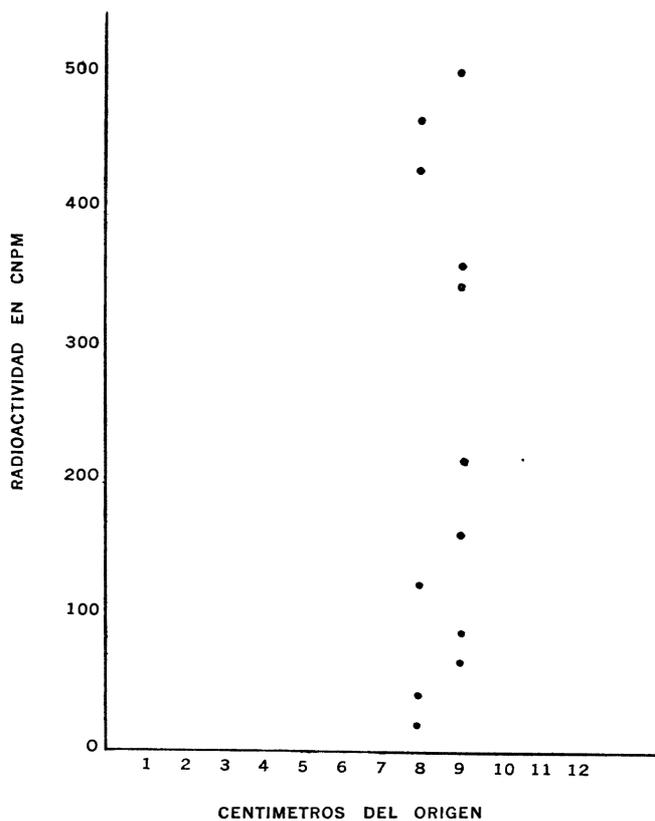


FIGURA 5. CNPM de 12 análisis electroforéticos en zona de papel. (Véase Tabla II).

TABLA N° II  
METODO B. CNPM en la zona de la albúmina.

| Tiempo en días | Posición en la albúmina | Microcuries en 10 lambdas | C N P M |
|----------------|-------------------------|---------------------------|---------|
| 1              | 9                       | $92 \times 10^{-4}$       | 499     |
| 2              | 8                       | $65 \times 10^{-4}$       | 415     |
| 3              | 8                       | $60 \times 10^{-4}$       | 464     |
| 6              | 9                       | $50 \times 10^{-4}$       | 362     |
| 7              | 9                       | $46 \times 10^{-4}$       | 352     |
| 10             | 9                       | $35 \times 10^{-4}$       | 202     |
| 11             | 9                       | $32 \times 10^{-4}$       | 154     |
| 13             | 8                       | $21 \times 10^{-4}$       | 124     |
| 16             | 9                       | $13 \times 10^{-4}$       | 96      |
| 17             | 9                       | $12 \times 10^{-4}$       | 89      |
| 20             | 8                       | $11 \times 10^{-4}$       | 34      |
| 22             | 8                       | $5 \times 10^{-4}$        | 16      |

### 3. METODO C.

Se midió la actividad de una alícuota de 0.1 ml de la solución de albúmina marcada en el contador de centelleo SCALES 132 B, calibrado con Cs - 137.

Las condiciones del aparato al efectuar la medida eran las siguientes

$$\begin{aligned} \Delta E &= 60 \\ E &= 334 \\ HV &= 845 \\ BKG &= 14 \text{ CPM} \end{aligned}$$

A) Las CPM de la alícuota se relacionaron al volumen de albúmina marcada 12 ml que contenían 100 mg de proteína, la cantidad de I-131 ligado a la albúmina fue de 257 microcuries.

B) De acuerdo a la actividad utilizada en el proceso 1 millicurie y a la cantidad de yodo ligado a los 100 mg de albúmina 257 microcuries, se obtuvo "una actividad específica" de 2.57 microcuries/mg de proteína.

C) El rendimiento del método de acuerdo a la actividad específica 2.57 microcuries/mg de proteína, fue de 25%.

D) La relación "átomo gramo de yodo/molécula gramo de albúmina", determinada de acuerdo a la cantidad de proteína marcada 100 mg y a la actividad específica de 2.57 microcuries/mg, fue de 1 átomo gramo de yodo/6.250 moles de albúmina.

E) Análisis electroforético.

El análisis de 10 experimentos electroforéticos no mostró cantidad apreciable de yodo radioactivo en posición diferente a la zona de la albúmina (veanse las figuras 6 y 7 y la Tabla III).

F) Esterilidad.

Medio de tioglicolato: resultado (—).

Medio de Saboraud: resultado (—).

Caldo de peptonas: resultado (—).

G) Pureza radioquímica.

No se detectaron yoduros (Rf.: 0.9) por medio del análisis radiométrico del cromatograma en el tubo G-M.

Se detectaron yodatos con un Rf de 0.53.

La albúmina permaneció en el origen Rf de 0.

### METODO C

10 Å DE SERO-ALBUMINA +  $304 \times 10^{-3}$   $\mu$ C DE I-131

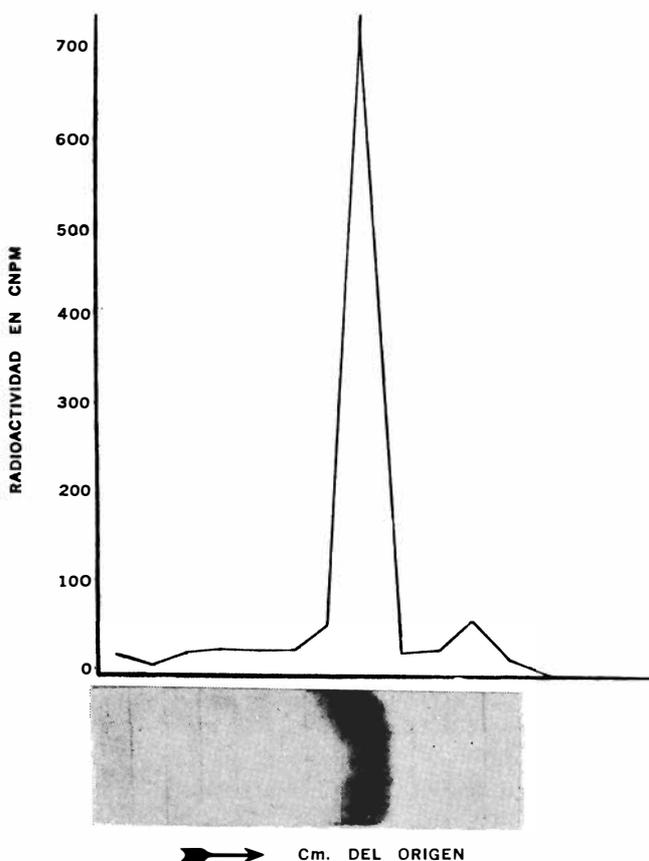


FIGURA 6. Electroforesis en zona de papel, buffer de barbital pH 8.6.

METODO C  
CNPM EN LA ZONA DE LA ALBUMINA

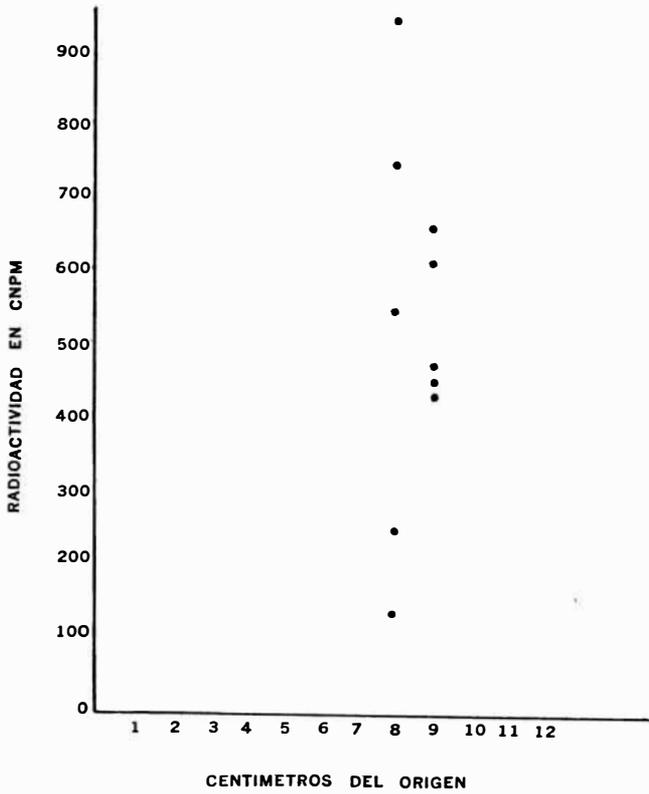


FIGURA 7. CNPM de 10 análisis electroforéticos en zona de papel. (Véase Tabla III).

TABLA N° III  
METODO C. CNPM en la zona de la albúmina.

| Tiempo<br>en días | Posición de<br>la albúmina | Microcuries en<br>20 lambdas | C N P M |
|-------------------|----------------------------|------------------------------|---------|
| 1                 | 8                          | $364 \times 10^{-3}$         | 953     |
| 2                 | 8                          | $334 \times 10^{-3}$         | 741     |
| 3                 | 8                          | $304 \times 10^{-3}$         | 669     |
| 4                 | 9                          | $282 \times 10^{-3}$         | 603     |
| 7                 | 9                          | $183 \times 10^{-3}$         | 551     |
| 8                 | 9                          | $169 \times 10^{-3}$         | 474     |
| 9                 | 9                          | $119 \times 10^{-3}$         | 463     |
| 10                | 9                          | $109 \times 10^{-3}$         | 455     |
| 13                | 8                          | $89 \times 10^{-3}$          | 257     |
| 15                | 8                          | $80 \times 10^{-3}$          | 120     |

#### 4. METODO D.

Se midió la actividad de una alícuota de 0.1 ml de la solución de albúmina marcada en el contador de centelleo SCALER 132 B, calibrado con Cs - 137.

Las condiciones del aparato al efectuar la medida eran las siguientes

$$\begin{aligned} \Delta E &= 100 \\ E &= 314 \\ HV &= 915 \\ BKG &= 22 \text{ CPM} \end{aligned}$$

A) Las CPM de la alícuota se relacionaron al volumen de albúmina marcada 15 ml que contenían 200 mg de albúmina. La cantidad de I - 131 ligado a la albúmina fue de 39 microcuries.

B) De acuerdo a la actividad específica utilizada 115 microcuries y a la cantidad de yodo ligado a la albúmina 39 microcuries, se obtuvo una actividad específica de 0.195 microcuries/mg de proteína.

C) De acuerdo a la actividad utilizada 115 microcuries y a la cantidad de yodo ligado a la albúmina se obtuvo un rendimiento de 33%.

D) La relación "átomo gramo de yodo/molécula gramo de albúmina", se determinó de acuerdo a la cantidad de proteína marcada 200 mg y a la actividad específica obtenida 0.195 microcuries/mg de proteína, fue de 1 átomo gramo de yodo/10.000 moles de albúmina.

E) Análisis electroforético.

El análisis de 11 experimentos electroforéticos no mostró cantidad apreciable de yodo radioactivo en posición diferente a la zona de la albúmina (véanse las figuras 8 y 9 y la Tabla IV).

F) Esterilidad.

Medio de tioglicolato: resultado (—).

Medio de Saboraud: resultado (—).

Caldo de peptonas: resultado (—).

G) Pureza radioquímica.

No se detectaron yoduros (Rf.: 0.9) por medio del análisis radiométrico del cromatograma en el tubo G - M.

Se detectaron yodatos con un Rf de 0.53.

La albúmina marcada permaneció en el origen Rf de 0.

*M E T O D O D*

10  $\mu$  DE SERO-ALBUMINA +  $37 \times 10^{-3}$   $\mu$ C DE I-131

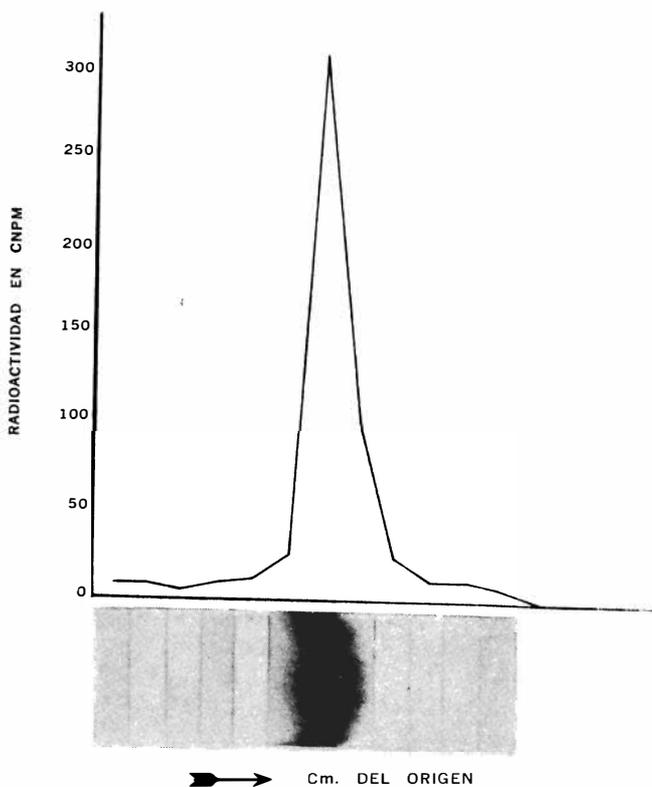


FIGURA 8. Electroforesis en zona de papel, buffer de barbital sódico pH 8.6.

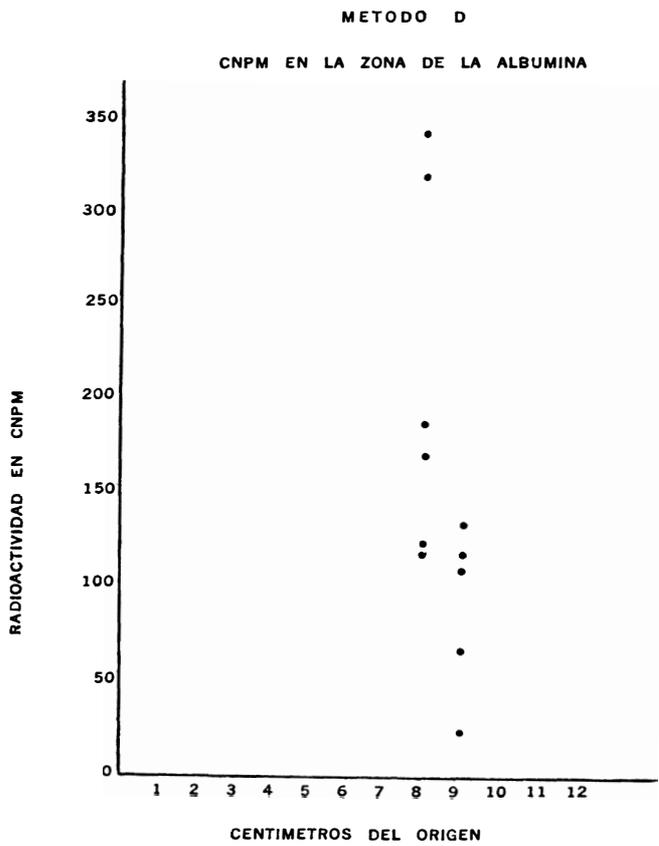


FIGURA 9. C N P M de 11 análisis electroforéticos en zona de papel. (Véase Tabla IV).

TABLA N<sup>o</sup> IV  
 METODO D. CNPM en la zona de la albúmina.

| Tiempo en días | Posición de la albúmina | Microcuries en 10 lambdas | C N P M |
|----------------|-------------------------|---------------------------|---------|
| 1              | 8                       | $40 \times 10^{-3}$       | 344     |
| 2              | 8                       | $37 \times 10^{-3}$       | 309     |
| 3              | 8                       | $33 \times 10^{-3}$       | 152     |
| 4              | 8                       | $31 \times 10^{-3}$       | 161     |
| 7              | 8                       | $28 \times 10^{-3}$       | 125     |
| 8              | 9                       | $26 \times 10^{-3}$       | 126     |
| 9              | 9                       | $24 \times 10^{-3}$       | 130     |
| 11             | 9                       | $22 \times 10^{-3}$       | 115     |
| 12             | 9                       | $20 \times 10^{-3}$       | 129     |
| 15             | 9                       | $16 \times 10^{-3}$       | 61      |
| 16             | 9                       | $14 \times 10^{-3}$       | 50      |

### DISCUSION DE LOS RESULTADOS.

En los métodos A y B la eficiencia en la marcación fue muy semejante; el rendimiento obtenido y la actividad específica alcanzada en el método B fue algo mayor en base a la misma cantidad de albúmina marcada, 400 mg.

Según Stenfield (38) la desventaja en el uso de soluciones I<sub>2</sub> en KI es que el I-131 presente como yoduro, alrededor de la mitad del total, no toma parte en la yodinación.

El rendimiento en la marcación según el método C fue muy inferior al obtenido en el método D, no obstante haberse empleado una cantidad de I-131 casi 10 veces mayor.

Además el proceso es más lento pues se necesita dejar la solución en reposo 24 horas, lo cual no sucede usando el método D. Esto es importante en el caso de que se necesite efectuar una marcación rápida para utilizar el trazador en el momento.

Si se dispone de I-131 libre de agentes reductores, especial para yodinación de proteínas, preparado en Saclay, Francia o en Amershan, Inglaterra, el método se simplifica considerablemente pues ya no es necesario efectuar destilación del isótopo.

Se obtiene una mayor actividad específica diluyendo lo menos posible el isótopo; según McFarlane las soluciones deben ser lo más reducidas posibles con este objeto.

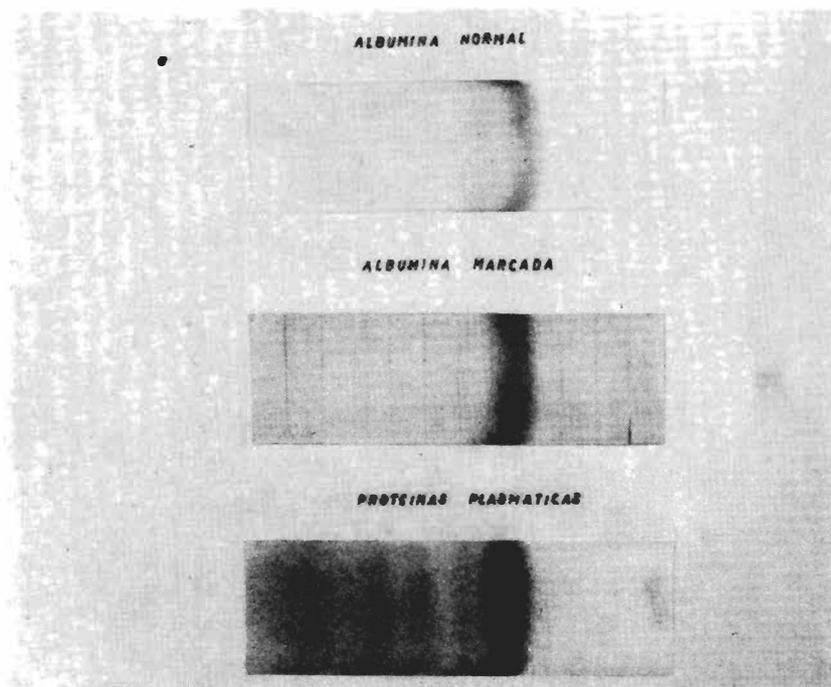


FIGURA 10. Comparación de la migración electroforética de la albúmina marcada con la albúmina normal y las proteínas plasmáticas.

### CONCLUSIONES

1. Observando el comportamiento electroforético de la albúmina marcada en todos los experimentos realizados durante 2-3 semanas se observa que el proceso de marcación no alteró las propiedades de migración de la albúmina. (Figuras 2, 4, 6 y 8). La posición de la albúmina marcada en el electroforetograma en zona de papel es similar a la posición de migración de la albúmina normal migrando entre la posición 8 y 9 a partir del origen (Figura 10).
2. La incorporación del yodo a la albúmina fue estable durante un tiempo de 2-3 semanas. En ninguno de los experimentos electroforéticos se detectó cantidad apreciable de I-131 no ligado, o en posición diferente a la zona de la albúmina. (Figuras 3, 5, 7 y 9).
3. El proceso de esterilización no alteró las propiedades de la albúmina en ninguno de los experimentos realizados.

4. La cantidad de yodatos, como impureza permitida, no pasó del límite estipulado por la U. S. P. 5% según puede observarse por el Rf de los yodatos.
5. Se obtiene un rendimiento mayor utilizando cantidades pequeñas de albúmina, según se deduce del método C.
6. La actividad específica obtenida está en relación directa a la cantidad de I - 131 usado en la marcación, como puede deducirse observando el método C.
7. El rendimiento en la marcación aumenta considerablemente utilizando I - 131 libre de portador y de agentes reductores, comparando los métodos C y D (Figura 11).
8. Utilizando yodo radioactivo libre de agentes reductores se puede emplear menor cantidad de actividad y obtener un rendimiento mucho mayor, como se observa en el método D.
9. La relación átomo gramo de yodo/molécula gramo de albúmina está en relación con la cantidad de albúmina marcada, pequeña cantidad, y la cantidad del isótopo utilizado, alta actividad (Tabla V).
10. Según estos datos la técnica de McFarlane es la más efectiva en la marcación de la sero - albúmina en I - 131.  
La técnica de Tata y Rall es más ventajosa que las técnicas de Herzman y Veall.

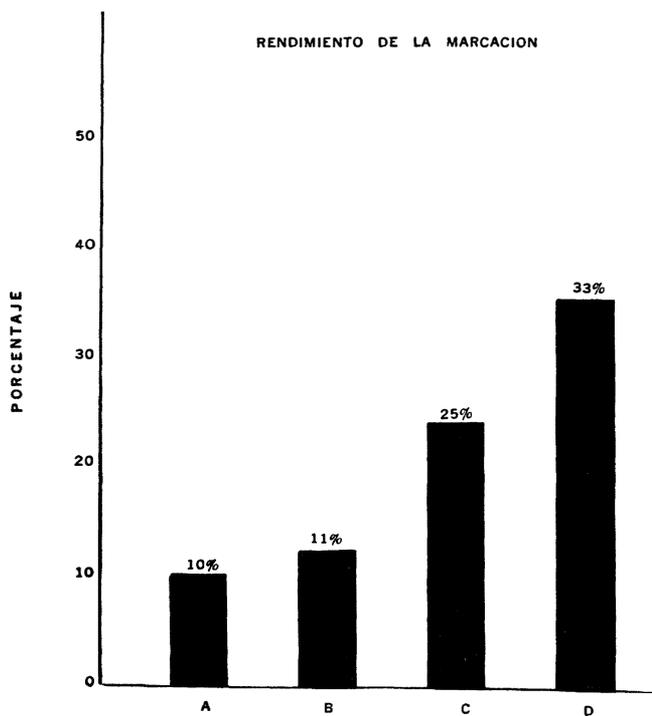


FIGURA 11. Rendimiento obtenido en las diferentes técnicas de marcación de la albúmina con I-131.

TABLA N° V

|                 | Albúmina<br>marcada | Actividad<br>utilizada | Yodo ligado<br>a la proteína | Volumen<br>total | Actividad<br>específica | Rend. | At. gr. de I/<br>mol. gr. de alb.   |
|-----------------|---------------------|------------------------|------------------------------|------------------|-------------------------|-------|-------------------------------------|
| Método A ... .. | 400 mg              | 76 uc                  | 8 uc                         | 9 ml             | 0.020 uc/mg             | 10%   | 1 átomo g/<br>10 <sup>6</sup> moles |
| Método B ... .. | 400 mg              | 87 uc                  | 10 uc                        | 6 ml             | 0.025 uc/mg             | 11%   | 1 átomo g/<br>10 <sup>6</sup> moles |
| Método C ... .. | 100 mg              | 1 Mc                   | 257 uc                       | 12 ml            | 2.57 uc/mg              | 25%   | 1 átomo g/<br>6.250 moles           |
| Método D ... .. | 200 mg              | 115 uc                 | 39 uc                        | 15 ml            | 0.195 uc/mg             | 33%   | 1 átomo g/<br>10.000 moles          |

## S U M M A R Y

A general discussion of basic concepts regarding the chemical structure of proteins and applications of the radioactive isotopes are herein presented.

The experimental studies deal with labeling of human sero-albumen with radioactive iodine (I - 131) using different techniques, as well as its identification by electrophoresis and the choice of the most efficient method for labeling, according to the yield and the specific activity obtained.

## R E S U M E

Le travail contient dans sa partie générale, la discussion des concepts de base sur la structure chimique des protéines et sur quelques formes d'emploi et d'application des isotopes radioactifs.

La partie expérimentale montre la forme de marquage de la séro - albumine humaine avec le Iode radio-actif (I - 131) au moyen de divers techniques, l'identification par électrophorèse et l'élection de la meilleure technique, selon le rendement obtenue et l'activité spécifique atteinte.

## B I B L I O G R A F I A

1. LOEWY G. Cell Estructure and Function. Holt. Rinehart and Winston. Inc. 1963. Pág. 75-80.
2. PAULING L. COREY. L. The estructure of proteins molecules. Scientific American. Julio. 1950.
3. CONN, E., STUMF., Outlines of Biochemistry. John Wiley and Sons, Inc. New York. 1963. Pág. 77-79.
4. COHN, E.: J. Che. Soc. 72, 465, 1950.
5. TARVER H., REINHART. W.: J. Biol. Chem. 167, 393, 1947.
6. OVERMAN R.: Basic concepts of nuclear chemistry. Reinhol Publishing Corp. New York. 1963. Pág. 16-37.
7. TUBIS M.: Preparation and use of radioactive tracers. Nuclear Medicine. MacGraw-Hill Book. New York. 1965. Pág. 141-151.

8. LOMBARDI, M.: Radioisótopos en diagnóstico médico. USAEC. Oak Ridge. Tenn. 1965. Pág. 218.
9. TUBIS M. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 103, 497, 1960.
10. BAKER, P.: Reactor produced radionuclides. Radioactive Pharmaceuticals. USAEC 1966. Pág. 219.
11. VELÁSQUEZ, B. Terapéutica con sus fundamentos de farmacología experimental. Editorial Científico-Médica. Barcelona 1963. Pág. 346.
12. URSPRUNG, J.: Isotopes in experimental pharmacology. The University of Chicago Press. 1965. Pág. 361-382.
13. SCHIMD K.: Isotopes in experimental pharmacology. The University of Chicago Press. 1965. Pág 383-400.
14. ABBOTT LABORATORIES' Dep. of Radiopharmaceutical. Progress in nuclear medicine. Marzo 1956.
15. TUBIS. M.: Special iodinated compounds for biology and medicine. Radioactive Pharmaceuticals. USAEC. Oak Ridge. Tenn. 1966. Pág. 297.
16. MCFARLANE A. S., Efficient trace-labeling of proteins with iodine. Nature. Julio. 1954. Pág. 53.
17. HUGHES, W., The chemistry of iodination. Ann. N. Y. Acad. Sci 70, 3 1957.
18. MCFARLANE, A. S.: Metabolism of plasma proteins. Mamalian Protein Metabolism. Ed. Allison and Munro. Vol. I. Acad. Press. 1964, Pág. 331-336.
19. CHASE, G. Principles of radioisotopes methodology. Burgess Publishing. Co. Minn. 1962. Pág. 258-260.
20. FLODIN P.: Dextran gel and their application in gel filtration. Uppsala, Suecia. 1962. Pág. 10-30.
21. OTERO E.: Uso clínico de los isótopos radioactivos. Ed. Jiménez de Quesada. 1957. Pág. 119.
22. FREINKEL, N.: Am. J. Physiol. 167, 785. 1951.
23. SILVER S., Radioactive isotopes in medicine and biology. Lea and Febiger 1963. Pág. 216-220.
24. CHOU. S. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 77-193, 1951.
25. BAUER, F. Neurology, 14, 674, 1957.
26. TAPLIN G.: Aggregated albumin labeled with various radioisotopes. Radioactive Pharmaceuticals. USAEC. Oak Ridge, Tenn. 1966. Pág. 525-534.
27. TAPLIN G.: Organ visualization by photoscanning with macroaggregated of radioalbumin. International. Atomic Symposium of Medical Radioisotope Scanning. Atenas, Abril 1964.
28. DORE E.: Suspensions of radioalbumin aggregated for photoscanning test liver, spleen, lun and others organs' University of California, School of Medicine UCLA-519. 1963.
29. VISSCHER, R., Am. J. Obst. and Gynec. 80, 1154, 1961.
30. REJALI A.: Am. J. Roengenology. 79. 129, 1958.
31. SOLARI, J.: Clinical use of radioisotopes. Ed. W. B. Saunders Company, London 1957. Pág. 228.

32. HERZMAN, H.: Labeling of human serum albumin with iodine. *Isotope-technik*. 2: 157, 8.
33. CUTTER LABORATORIES' Berkeley, California Estados Unidos.
34. SMITH I. Chromatographic and electroforetis techniques. Vol. 2, Interscience Publishers Company. London 1960. Pág. 11.
35. U. S. P. Edición XVI. Pág. 24.
36. VEAL, N.: Radioisotopes technique in clinical research and diagnosis. Butterworth and Co. Publishers, London. 1958, Pág. 165. 170.
37. TATA, R. RALL, N.: *J. of Cli. End and Met.* Vol. 16, Nº 12. 1964. Pág. 1960.
38. STEINFELD, J. L.: *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 97, 281, 1958.