

MARCACIÓN DE LA HORMONA TIROIDEA 3`3`,5 - TRIYODOTIRONINA (T3) CON ¹²⁵I PARA LA OBTENCIÓN DE LA TIROXINA ¹²⁵I (T4) POR EL MÉTODO DE LA CLORAMINA T

Benites M.⁽¹⁾ mбенites@ipen.gob.pe, Morón G.⁽²⁾, Vásquez S.⁽¹⁾ svasquez@ipen.gob.pe

(1) *Planta de Producción de Radioisótopos – IPEN / Lima, Perú*

(2) *Universidad nacional Mayor de San Marcos / Lima, Perú*

RESUMEN

El presente trabajo sobre la marcación de la hormona tiroidea 3`3`,5 -Triyodotironina (T3) con ¹²⁵I para la obtención de la Tiroxina ¹²⁵I -T4 por el método de la Cloramina T, consta de la marcación, purificación y almacenamiento de la ¹²⁵I - T4. El mecanismo de reacción propuesto a partir de T3, para su marcación con ¹²⁵I, se realiza mediante intercambio isotópico que viene a ser una reacción de equilibrio, en tanto que para la obtención de ¹²⁵I - T4 se realiza mediante una sustitución electrofílica aromática (SEA), que es irreversible. Se realizaron 2 modificaciones con relación a la literatura, primero el tiempo de marcación de 1 minuto se extendió a 2 minutos y segundo, el empleo de otras relaciones molares de T3 y ¹²⁵I.

Todos los resultados obtenidos son sobre la base de un total de 4 marcaciones realizadas.

La purificación se realiza mediante una columna de vidrio de aproximadamente φ 0,9 x 16 cm de altura, empleando como soporte el Sephadex G-25 grado fino y eluyente tampón fosfato 0,05 M hasta obtener el pico de ¹²⁵I libre, posteriormente NaOH 0,01 N para obtener el segundo pico correspondiente al ¹²⁵I-T3 y finalmente el tercer pico correspondiente al ¹²⁵I-T4.

El almacenamiento de la hormona marcada se efectúa en una solución acuosa de la mezcla de L(+) cisteína, propilenglicol y albúmina bovina, conservada a -20 °C.

Los resultados del control de calidad fueron los siguientes:

- Alto grado de inmunoreactividad, probado mediante la técnica de RIA.
- Pureza radioquímica > 95%, efectuado mediante cromatografía ascendente en papel Whatman #3.
- Actividad específica alta: (1528 ± 673) μCi/μg.

1. INTRODUCCIÓN

Las hormonas tiroideas 3`3`,5-Triyodotironina (T3) y Tiroxina (T4), son secretadas por la glándula tiroides, con la finalidad de mantener el crecimiento y desarrollo normales, la temperatura corporal correcta y los niveles energéticos adecuados en el organismo humano. La carencia o deficiencia de estas hormonas al principio de la vida, produce retardo mental irreversible y enanismo, denominado hipotiroidismo neonatal. El método nuclear radioanalítico de Radioinmunoanálisis (RIA), para la cuantificación de la T4, han permitido el diagnóstico precoz del hipotiroidismo neonatal.

En general, para su uso en RIA, las hormonas T3 y T4 se marcan con ¹²⁵I a partir de T3 y mediante la Técnica de la Cloramina T.

La ¹²⁵I - T4 obtenida, fue empleada en un Proyecto de Investigación denominado "Detección Precoz del Hipotiroidismo Neonatal Mediante el Ensayo Radioinmunológico T4 y el Ensayo Inmuno radiométrico TSH", en el cual participaron las siguientes instituciones: El Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), el Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN), el Instituto Materno Perinatal (IMP) y el Instituto Nacional de Salud del Niño (INSN).

2. MÉTODOS Y MATERIALES

Para el marcaje de Hormonas Tiroideas T3 y T4 se utiliza el método de la Cloramina T, obteniéndose antígenos radioiodados con alto grado de inmunoreactividad, pureza y estabilidad. Este método fue realizado por primera vez por Greenwood, Hunter y Glover en 1963.

Cuando se utiliza como antígeno Triyodotironina (T3) se obtiene ¹²⁵I -T3 y Tiroxina marcada (¹²⁵I -T4). Para determinar la relación molar entre las moléculas marcadas obtenidas, es de suma importancia controlar el pH de la reacción y la cantidad de T3 respecto al Ioduro de Sodio que

se utiliza. Por otro lado, para obtener un alto rendimiento en la reacción de iodación es necesario utilizar una baja temperatura, soluciones recién preparadas de Cloramina T y no prolongar el tiempo de agitación más allá de 2 minutos.

La relación molar de T3 / ^{125}I , determinan el rendimiento de T3 marcada con respecto a T4 marcada. El efecto de dicha proporción molar se puede explicar de la siguiente manera: el mecanismo de reacción para la formación de ^{125}I -T3, es un intercambio isotópico y para ^{125}I -T4, es la sustitución electrofílica aromática (SEA); el primer mecanismo es una reacción de equilibrio, mientras que el segundo ocurre de una manera irreversible.

* Marcación

Todas las reacciones de marcación fueron llevadas a cabo en tubos de vidrio de 5 mL. La adición de los reactivos se efectuó con micropipetas Eppendorf, bajo el siguiente protocolo:

- 50 μL de tampón fosfato 0,5 M; pH 7,4
- 25 μL (1,04 μg) de L-T3
- 15 - 20 μL (800 - 2670 μCi) de ^{125}I en NaOH 0,01N
- 25 μL (25 μg) de cloramina T

Mezclar en Vortex durante 120 segundos;

- 25 μL (25 μg) de metabisulfito de sodio
- 25 μL (250 μg) de L(+) cisteína HCl H_2O

Mezclar en Vortex, e inmediatamente succionar el contenido del tubo con una micropipeta de 250 μL e inyectar en la columna de purificación.

• Purificación

Columna de vidrio de aproximadamente ϕ 0,9 x 16 cm de altura, empleando como soporte el Sephadex G-25 grado fino.

Transferir la mezcla de reacción del tubo de marcación a la columna. Luego añadir el Tp PO_4 0,05 M. Luego realizar el perfil de elución, colectando fracciones de 1 mL. El primer pico que se obtiene es el de ^{125}I libre, posteriormente se eluye con NaOH 0,01 N para obtener el segundo pico correspondiente al ^{125}I -T3 y finalmente el tercer pico correspondiente al ^{125}I -T4; posteriormente almacenar a -20°C cada una de las hormonas en el diluyente respectivo (solución acuosa de la mezcla de L(+) cisteína, propilenglicol y albúmina bovina). Los controles de calidad que se le efectúan al trazador, son la determinación de la pureza radioquímica y la respuesta inmunológica.

• Controles de Calidad

La pureza radioquímica, para la determinación del ^{125}I libre en ^{125}I -T3 y ^{125}I -T4 purificados, se realiza mediante la técnica de Cromatografía en Papel Ascendente:

Soporte: Papel Whatman #3 (tira de 1,0 x 8,0 cm).

Fase móvil: Mezclar 5 mL de n butanol, 2 mL de ácido acético y 1 mL de agua destilada.

La respuesta inmunológica, se realiza mediante la técnica de Radioinmunoanálisis.

3. RESULTADOS

El tiempo de marcación no debe exceder de 2 minutos, para evitar la formación de productos de ^{125}I -T3 y ^{125}I -T4 con más de una molécula radioactiva y evitar así la radiólisis y procoavar la inestabilidad de estos productos, con lo cual el metabisulfito de sodio se debe agregar inmediatamente a los 2 minutos de haberse añadido el ^{125}I .

Condiciones óptimas de marcación obtenida:

- * **Tiempo de reacción** : 2 minutos
- * **pH** : 7,4
- * **Relaciones molares de $^{125}\text{I}/\text{T3}$** : 1/1,3 a 1/4,3

Dependiendo cual sea la hormona de interés, ya sea la ^{125}I -T3 o la ^{125}I -T4, se elegirá la relación molar ideal, para obtener más de uno o del otro producto. Si se desea obtener más ^{125}I -T3, se usará la relación 1/4,3 y si se desea obtener más ^{125}I -T4 se usará la relación 1/1,3.

Relaciones molares de los reactantes y productos

| Nº Marcación | Relación Molar Reactantes | | Relación Molar Productos | | Actividad Específica ($\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) | |
|--------------|---------------------------|------------------|--------------------------|----------------------|---|----------------------|
| | T3 | ^{125}I | ^{125}I -T4 | ^{125}I -T3 | ^{125}I -T4 | ^{125}I -T3 |
| 1º | 4,33 | 1 | 1 | 0,87 | 682 | 680 |
| 2º | 2,07 | 1 | 1 | 0,74 | 1476 | 1480 |
| 3º | 1,95 | 1 | 1 | 0,73 | 1608 | 1628 |
| 4º | 1,30 | 1 | 1 | 0,58 | 2343 | 2326 |

% Actividad, μg marcados

| Nº Marcación | T3 μg | ^{125}I μCi | % Actividad | | μg Marcados | |
|--------------|------------------|---------------------------------|----------------------|----------------------|------------------------|----------------------|
| | | | ^{125}I -T4 | ^{125}I -T3 | ^{125}I -T4 | ^{125}I -T3 |
| 1º | 1,04 | 800 | 52 | 38 | 0,48 | 0,35 |
| 2º | 1,04 | 1680 | 56 | 35 | 0,53 | 0,33 |
| 3º | 1,04 | 1780 | 58 | 36 | 0,49 | 0,30 |
| 4º | 1,04 | 2670 | 61 | 29 | 0,53 | 0,26 |
| Promedio | 1,04 | 1732 | 56,7 | 34,5 | 0,51 | 0,31 |
| | $\pm 0,0$ | ± 764 | $\pm 3,8$ | $\pm 3,9$ | $\pm 0,03$ | $\pm 0,04$ |

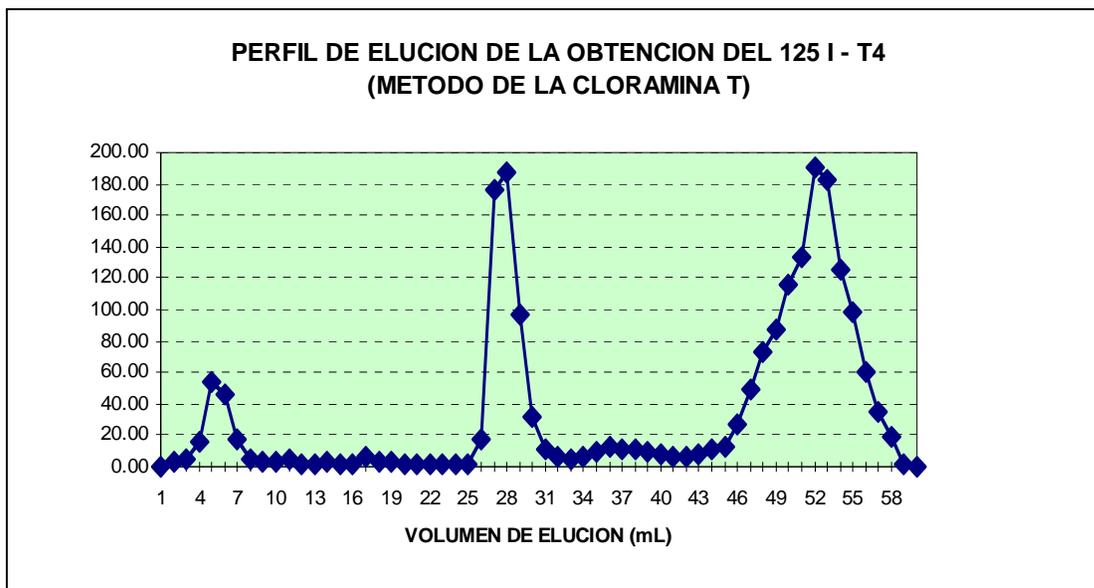
- * **Actividad específica de ^{125}I -T3**: 1528 ± 673 (Ci/g)
- * **Actividad específica de ^{125}I -T4**: 1527 ± 680 (Ci/g)
- * **Pureza radioquímica** > 95%
- * **La respuesta inmunológica**, realizada mediante la técnica de Radioinmunoanálisis,

dieron muy buenos resultados.

4. CONCLUSIONES

Empleando la técnica de la Cloramina - T, para la marcación de hormonas tiroideas T3 y T4, la cual es una técnica sencilla y económica, se obtienen antígenos radioiodados con alto grado de inmunoreactividad, pureza y estabilidad (6 meses en el diluyente específico).

El aporte científico del presente trabajo, radica en la ampliación del tiempo de marcación de 1 minuto a 2 minutos y en la variación y determinación de las relaciones molares de $^{125}\text{I}/\text{T}_3$ de un rango de 1/1,3 a 1/4,3.



5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] F. RICHE, J. P. MATHIE, M. VINCENS, A. BARDY, M. COMET, M. VIDAL, Bull. Soc. Chim. Fr. II, 49 (1984).
- [2] A. E. JONES, A. DAVISON, Int. J. Appl. Radiat. Isot., 33, 867 (1982).
- [3] A. G. DAVISON, A. G. JONES, Int. J. Appl. Radiat. Isot., 33, 875 (1982).
- [4] J. DE LIVERANT, W. WOLF, Int. J. Appl. Radiat. Isot., 33, 857 (1982).
- [5] K. LIBSON, E. DEUTSCH, B.L. BARNETT, Int. J. Appl. Radiat. Isot., 102, 2476 (1980).
- [6] ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE SOCIEDADES DE BIOLOGÍA Y MEDICINA NUCLEAR (ALASBINM). Manual De Control de Calidad de Radiofármacos, 37 (1980), Montevideo.
- [7] MANUEL CASTRO, ARTURO PORTILLA. Taller Regional de Capacitación sobre Producción de Radionucleídos y Radiofármacos Terapéuticos, {4 - 15 Nov. 1996}, Lima-Perú.

* Este trabajo fue realizado como tema de tesis, para la obtención del título profesional de Químico, de la autora principal, teniendo como asesor al Dr. José Grimaldo Morón.