

MARCACION DE FIBRINOGENO

CON I-131^(*)

Conrado SEMINARIO, Teobaldo CAPILLO, José MONTAÑEZ

DEPARTAMENTO DE RADIOISOTOPOS - IPEN
Apartado 1687, Lima-Perú

RESUMEN

De las diferentes técnicas de marcación radioactiva del fibrinógeno humano liofilizado, se ha seleccionado la del monoclóruo de iodo modificada. La marcación de la molécula se efectuó en medio alcalino de buffer glicina en el que se hace actuar la solución de iodo estable y luego la del isótopo radiactivo. Los procesos de marcación efectuados con actividades variables tuvieron un rendimiento superior al 40 %; la purificación realizada con resina amberlita no permitió en ningún caso impurezas mayores del 5 % inicial. En los controles diarios efectuados hasta el séptimo día, los valores medios de pureza radioquímica no descendieron más de 1 %. La actividad específica, concentraciones de I-131 y fibrinógeno, así como otras características, se ajustan a lo establecido en los farmacopeas que lo consignan.

ABSTRACT

Among different techniques for radioactive labelling of liophilized human fibrinogen, iodine monochloride technique has been selected. Labelling was carried out in alkaline medium (glycine buffer) where stable iodine solution and then radioactive isotope react. The labelling process, made with different activities had more than a 40 % yield. Purification carried out with Amberlite arvided more than 5 % of initial impurities. Dayly controls of radiochemical purity carried out during 7 days showed less than 1 % decrease. Specific activity, ¹³¹I and fibrinogen concentrations and other characteristics agree with those established in pharmacopeas.

(*) Presentado al XI Congreso Panamericano de Farmacia y Bioquímica (NOV - 1982)

1. INTRODUCCION

Ante las diversas patologías para las cuales el fibrinógeno marcado, puede ser un valioso agente diagnóstico, se procedió a un estudio bibliográfico [1 - 11] de las diferentes formas de obtener dicho agente y que el mismo reuniera las características exigidas para su uso en humanos.

Del análisis de los procesos de marcación se eligió el que usa como vehículo una solución activa de monocloruro de yodo por ser uno de los más recomendados para la marcación de moléculas proteicas, por ser el yodo fácilmente incorporado a los anillos tirosínicos y por ser el yodo radioactivo (I^{131} ó I^{125}) uno de los radioelementos de mayor disponibilidad en nuestro medio.

Contando con todas estas ventajas se procedió a la etapa experimental logrando un producto que reúne las características necesarias para ser utilizado como agente de diagnóstico trombótica en arterias o en venas profundas o para detecciones tumorales debido a la retención del agente por parte de éstos como consecuencia de su elevado contenido de tromboplastina; el mismo producto puede ser también muy útil en la detección de rechazos en transplantes renales o en estudios de recambio del fibrinógeno en casos de leucemia mieloide.

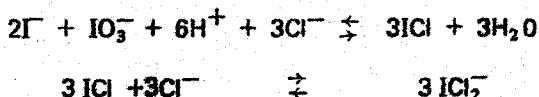
Es así que presentamos a continuación el trabajo experimental realizado y los resultados obtenidos.

2. FUNDAMENTO DEL PROCESO

La marcación de la molécula proteica se logra mediante la oxidación total del yodo en una solución de radioyoduro de sodio, la oxidación se formula de la siguiente manera:



Entonces las reacciones globales son:



Desde el punto de vista práctico el agente de iodación ($I^{131} Cl$) se obtiene a partir de una solución de $I^- : IO_3^-$ cuya concentración responde a una concentración molar 2:1 respectivamente a la cual por acción del HCl concentrado se le extrae el yodo bajo la forma de Cl_2 , el exceso de yodo libre puede extraerse por adición de un solvente orgánico no misible con el agua y en el cual el yodo posea un elevado coeficiente de solubilidad.

3. PROCEDIMIENTO DE MARCACION

El procedimiento se lleva a cabo mediante las técnicas descritas por Mc Farlane [5] y Helmkamp [2] y las modificaciones estudiadas por Samols y Williams [9] en base a las cua-

les el cloruro de iodo radioactivo se obtiene por intercambio entre una solución NaI¹³¹ y una alcuota de una dilución 1:50 de la solución inicial de cloruro de iodo estable diluido en solución salina alcalinizada con soda N.

Independientemente se prepara una solución de fibrinógeno en suero fisiológico tamponada con buffer de glicina a pH 9, ésta se vierte sobre el cloruro de iodo favoreciendo la iodinación por agitación constante durante 10 minutos.

El proceso se ha repetido N veces a fin de verificar su reproductividad utilizando actividades iniciales que han variado entre 5 y 25 mCi, logrando un rendimiento promedio de 50.4 % y una actividad específica también promedio de 96.6 uCi/mg conforme se puede apreciar en el cuadro No. 1.

Se detalla a título informativo los reactivos empleados:

- KI 1 mMol
- KIO₃ 0.5 mMol
- HCl conc. 10 ml
- CCl₄ 1 ml
- NaOH 1 N
- NaCl 0.9 %
- Glicina buffer pH 9
- Fibrinógeno liofilizado 50 mgr.

todos los cuales obviamente deben responder a grado farmacéutico.

Rendimiento de Marcación

CUADRO No. 1

Marcación No.	Actividad inicial mCi	Actividad incorporada mCi	Rendimiento %	Actividad específica uCi/mg.
1	5.2	2.1	39.8	41.4
2	21.7	9.8	43.0	186.6
3	5.0	3.0	58.7	58.7
4	14.5	7.4	50.5	146.4
5	12.0	6.0	49.5	118.8
6	13.0	5.9	44.6	116.0
7	4.8	3.0	61.9	59.4
8	9.1	4.9	52.4	95.4
9	6.0	3.7	60.2	72.2
10	10.8	4.8	43.2	93.4

4. PURIFICACION Y ENSAYOS BIOLOGICOS

No obstante estar dadas las condiciones para la reacción de iodinación es evidente una taza de iodo libre el cual debe eliminarse del producto deseado; se procede entonces al uso de una columna de intercambio iónico tipo Amberlita IRA-400 la cual retiene el iodo li-

bre y permite la elusión de la fracción protéica utilizando como eluyente un volumen adecuado de solución fisiológica.

El producto así obtenido es objeto de controles para certificar sus características siendo las más importantes los análisis por cromatografía ascendente para constatar su pureza radioquímica y las pruebas de retención en coágulo para verificar su comportamiento biológico.

- El análisis por cromatografía ascendente se realiza sobre papel utilizando como soporte papel Whatman No. 1 y como sistema solvente Metanol: Agua (7:3); el tiempo de desarrollo es de 2 hrs. para un frente aproximado de 16 cm. y un Rf de 0.0 para el fibrinógeno y 0.8 para el iodo libre. Los controles se han repetido cada 24 hrs. durante una semana para verificar la estabilidad del producto y los resultados se muestran en el cuadro No. 2.
- El comportamiento biológico se puede medir in vitro por el índice de retención en coágulo; para ello se toman muestras de sangre sobre una o dos décimas de ml. de fibrinógeno marcado, se lleva a incubación en baño de agua por 2 hrs. a 37°C para provocar la retracción del coágulo, luego se separa por centrifugación y se determinan los porcentajes de actividad en cada fracción y por ende el porcentaje de fibrinógeno marcado que ha actuado en la formación de la red de fibrina.

Las actividades se expresan en cpm y los resultados se presentan en el cuadro No. 3.

Control de Pureza Radioquímica

CUADRO No. 2

Lotes	Pureza Radioquímica %					
	0/día	1/2d.	3/4d.	5/6d.	7/8d.	13 d.
1	98.6	98.4	97.7	96.7	96.0	
2	95.3	94.5	94.2	93.5	92.0	
3	97.8	96.9	96.1	95.8	95.0	
4	98.9	97.8	96.3	95.7	94.5	
5	99.0	97.2	96.1	95.0	93.0	
6	98.3	97.4	97.0	96.2	95.8	
7	99.0	98.3	98.0	97.1	96.2	
8	97.3	97.0	96.3	95.2	94.4	
9	97.7	97.2	96.5	96.0	95.2	
10	97.3	96.4	95.8	95.0	94.2	91.0
11	97.8	96.9	96.1	95.6	94.8	92.5
12	99.4	98.7	97.7	96.5	95.3	92.0
13	99.2	98.5	97.9	96.5	96.0	91.1
14	99.1	98.1	97.3	96.5	95.2	90.4

Comportamiento Biológico

CUADRO No. 3

Lote	Lectura de actividad cpm (1er. día)		O/o de Radioactividad en el coágulo
	Coágulo	Suero	
1	46252	8317	88.0
2	25677	4564	84.9
3	53563	7416	87.8
4	34269	3512	90.7
5	28934	5310	84.4
6	40068	6796	85.4
7	26144	4149	86.3
8	25814	3749	87.3
9	27153	3389	88.9
10	26398	4385	85.7
11	27885	2922	90.5
12	27631	2841	90.7
13	24414	3057	88.8
14	22775	4006	85.0

5. RESULTADOS

Conforme se puede apreciar en los cuadros anteriormente expuestos al término del presente trabajo se llega a los siguientes resultados:

- 1) Luego de una serie de ensayos experimentales del método seleccionado se ha logrado un rendimiento promedio del 50.4 O/o, porcentaje muy apreciable frente a lo que la literatura internacional prescribe para los casos de marcación de proteínas.
- 2) La verificación de pureza radioquímica al tiempo cero responde al 98.2 O/o y luego de 8 días de controles sucesivos, tiempo que corresponde al período de semidesintegración del I^{131} , se obtiene 94.8 O/o porcentajes promedios que responden a las exigencias internacionales para su aplicación en humanos.
- 3) El comportamiento biológico medido por su capacidad de intervención en la formación del coágulo sanguíneo alcanza 87.5 O/o frente a un 87 ± 3 O/o indicado en las referencias bibliográficas.
- 4) La actividad específica obtenida de 96.6 uC/mg también está bien ubicada dentro de los límites prescritos que señalan los límites entre 50 y 200 uC/mg, sin embargo es factible de obtenerse niveles mucho más altos si se parte de actividades mayores o en su defecto si se disminuye la concentración del sustrato.

6. CONCLUSIONES

Como consecuencia de los resultados antes expuestos se concluye:

- 1) Se ha comprobado la eficiencia de la técnica elegida para la marcación de moléculas protéicas.
- 2) El producto obtenido: Fibrinógeno 131 , reúne las características exigidas para su uso como radiofármaco.
- 3) El Fibrinógeno 131 puede ser producido localmente en forma rutinaria incrementando nuestra línea de producción de compuestos marcados.

7. REFERENCIAS

- [1] Harker L.A., Slichter S.J.: Studies of platelet and fibrinogen kinetics in patients prosthetic heart valves. N. Engl. J. Med. 283 (1970) 1302.
 - [2] Helmkamp E.W., Contreras M.A. and Izzo M.J.: 131 labelling of protein at high activity level with 131 ICl preparations. Int. J. Appl. Radiat. Isot. 18 (1967) 747.
 - [3] Ikeno L.C., Bowen B.M., Der M.: Commercial production of 125 -fibrinogen injection J. Radioanal. Chem 65 (1989) 179.
 - [4] Loberg M., Miller I. and Cooper M.: Radioiodinated Autologous Fibrinogen: A rapid Method of preparation for Clinical use. Subramanian Chapter 52 (1975).
 - [5] Mc Farlane A.S.: In vivo behavior of 131 -fibrinogen J. Clin. Invest. 42 (1963) 346.
 - [6] Martínez J., Shapiro S.S., Holburn R.R.: Metabolism of human prothrombin and fibrinogen in patients with Thrombocytosis secondary to myeloproliferative States Blood. 42 (1973).
 - [7] Monasterio G., Becchini M.F. Riccioni N.: Radioionated (131 I and 125 I) fibrinogen for the detection of malignant tumors in man in medical Radioisotope Scanning, Vol II, Vienna IAEA, 1964, p. 159.
 - [8] Porter K.A.: Rejection in treated renal allografts. J. Clin. Path. 20 (1967) 518.
 - [9] Samois E., Williams H.S.: Trace labelling of insulin with iodine. Nature. 190 (1967) 1211.
 - [10] Subramanian G. and Rhodes B.A.: Radiofarmaceuticals published by Society of Nuclear Medicine, Inc. New York 1975, chapter 54.
 - [11] Winston M.A., Weiss R.R., Bland W.H., et. al: Use of 131 I fibrinogen in detection of renal transplant rejection. Invest. Urol. 9 (1971) 119.
-

Marcación de fibrinógeno con I-131 por Conrado Seminario, Teobaldo Capillo, José Montañez se distribuye bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivar 4.0 Internacional.