



PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MARCADAS CON I-131 UTILIZANDO HIDROXIAPATITA Y SEPHADEX

S. Margarita Garza Aguilar

Unidad Académica de Ciencias Químicas / Universidad Autónoma de Zacatecas,
Carr. Cd. Cuahutemoc km. 0.5, Guadalupe, Zacatecas
qfbsaramargaritaga@hotmail.com

Fabiola Monroy Guzmán

Gerencia de Aplicaciones Nucleares en la Salud, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, km 36.5 Carr. México-Toluca, 52045, Edo. de México
fmg@nuclear.inin.mx

Verónica E. Badillo Almaraz

Centro Regional de Estudios Nucleares / Universidad Autónoma de Zacatecas,
C. Ciprés No. 10, Fracc. La Peñuela, 98068 Zacatecas, Zacatecas
ebadillo@cantera.reduaz.mx

1. INTRODUCCION

El uso de compuestos marcados con radionúclidos ha crecido considerablemente, en medicina, bioquímica y otros campos afines. El estudio de las metodologías de radiomarcado (unión del radionúclido a biomoléculas) se encamina en la búsqueda de radiofármacos más accesibles, específicos y efectivos. El radiomarcado es la operación de incorporar el radionúclido en la molécula a marcar para obtener el trazador radioactivo. También lo podemos definir como un proceso por el que un radioisótopo se une con un ligando para dar lugar al radiofármaco final. En los compuestos radiomarcados, átomos o grupos de átomos de las moléculas son sustituidas por grupos de átomos o átomos radioactivos similares o diferentes. En los procesos de marcado, la variabilidad de condiciones fisicoquímicas puede emplearse para lograr una clase específica de marcado. El radioamarcado de moléculas puede realizarse con diferentes radionúclidos, como I-131, I-123, I-125, In-111 y Tc-99m entre otros [1].

La yodación se utiliza extensamente como medio de marcado de compuestos de interés biológico y médico (proteínas). El yodo es un elemento metálico que pertenece al grupo de los halógenos, su número atómico es 53 y su isótopo estable es el ^{127}I . El isótopo ^{125}I es el más comúnmente usado para producir antígenos radiomarcados y otros compuestos para procesos "in vitro", además tiene un tiempo de vida media prolongado (60 días), pero la energía del fotón es baja (27 a 35 keV) y esto no es apropiado para procedimientos "in vivo". El isótopo ^{131}I se utiliza bastante en medicina clínica, particularmente para estudios "in vivo" (ref). En este trabajo se recurrió al marcado de proteínas (albúmina) con yodo-131 para el estudio posterior de la interacción de éstas con el biomineral llamado hidroxapatita. Después del marcado de la proteína, es necesario, someterla a un proceso de purificación, ya que la mezcla de la reacción contiene, proteína marcada, proteína no marcada, yodo libre y reactivos oxidantes. La purificación puede realizarse utilizando una gran variedad de procedimientos fisicoquímicos como la Cromatografía en columna que consiste en el empleo de una columna empacada con una fase estacionaria porosa y una fase móvil líquida para eluir los componentes de la muestra a través de la columna. Como fase estacionaria para separar por intercambio iónico puede usarse el mismo mineral Hidroxapatita y o bien Sephadex para lograr la separación por exclusión molecular [2]. El presente trabajo realiza una comparación en la purificación de proteínas marcadas con el radioisótopo I-131 utilizando una hidroxapatita sintética marca BIO-RAD y Sephadex, ambos materiales utilizados como relleno (o empaque) de una columna de cromatografía.



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Protocolo de Radiomarcado de la albúmina

Algunas biomoléculas como proteínas radiomarcadas pueden ser preparadas con radioisótopos que sustituyen isótopos estables y no radiactivos en la estructura química; por ejemplo, donde un átomo de la estructura química de la proteína puede ser remplazado por uno radioactivo, o este átomo radioactivo se incorpora a la estructura de la proteína.

En la yodación de proteínas, el anillo fenólico de la tirosina es el sitio principal de yodación y el siguiente sitio importante es el anillo de imidazol de la histidina. El pH juega un papel importante en la yodación de proteínas, el pH óptimo es de 7 a 9. La temperatura y la duración de la yodación dependen del tipo de molécula que será yodada y el método de yodación usado. El grado de los efectos de yodación y la integridad de la molécula de la proteína, dependen del tipo de molécula de la proteína y el método de yodación.

El método de marcado usado para la radioyodación de albúmina, es el método de cloramina-T. La cloramina-T (N-monocloro-p-toluenosulfonamida) es una sal y un agente oxidante suave. En este método de yodación, se adiciona primero el compuesto que va marcarse, después la cloramina-T a la solución de yoduro de sodio marcado con I. La cloramina-T oxida el yoduro para que reaccione con las especies de yodo, las cuales después marcarán la proteína de interés. La eficiencia del marcado es alta (90%) [3].

Se aplicó el siguiente protocolo de radiomarcado [4]:

Se agrega a una suspensión de albúmina de 10m/ml, 1ml de cloramina-T y aproximadamente 1mCi de ^{131}I . Se agita vigorosamente por 30 segundos.

Se agrega 1ml de metasulfito de sodio, 1ml de KI y se agita nuevamente.

La proteína radioyodada se somete a una purificación.

2.2 Protocolo de purificación con la fase mineral Hidroxiapatita y el Sephadex

En la purificación de moléculas radioyodadas se utilizan una gran variedad de procedimientos fisicoquímicos, como la cromatografía, ya que es una técnica eficiente, simple, rápida y puede ser utilizada para la producción a gran escala de moléculas marcadas. En este trabajo se recurrió a la cromatografía de exclusión molecular (Sephadex) e intercambio iónico (Hidroxiapatita), para la purificación de moléculas marcadas.

Se realiza el empaque de la columna con material de relleno Hidroxiapatita y Sephadex respectivamente. Posteriormente se procede a percolar la preparación de proteína radioyodada y se reciben fracciones de 3ml. La solución de elusión es NaH_2PO_4 . A cada fracción recuperada se le determina la actividad y se realiza el cromatograma correspondiente.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

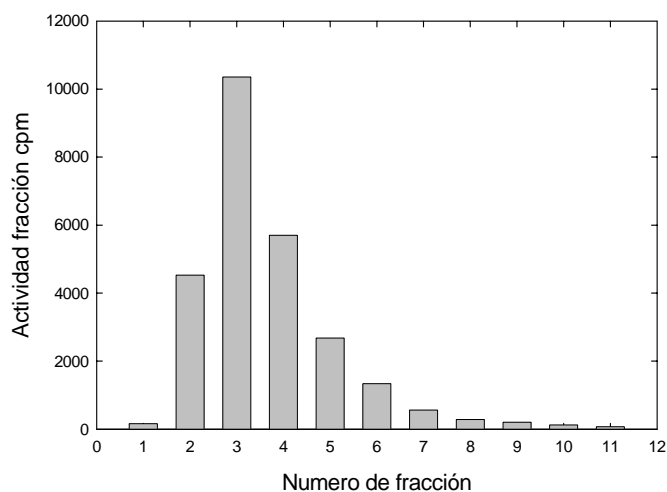


Figura 1. Determinación de la actividad de la albúmina marcada I-131 en cada una de las fracciones recuperadas, purificada con Sephadex.

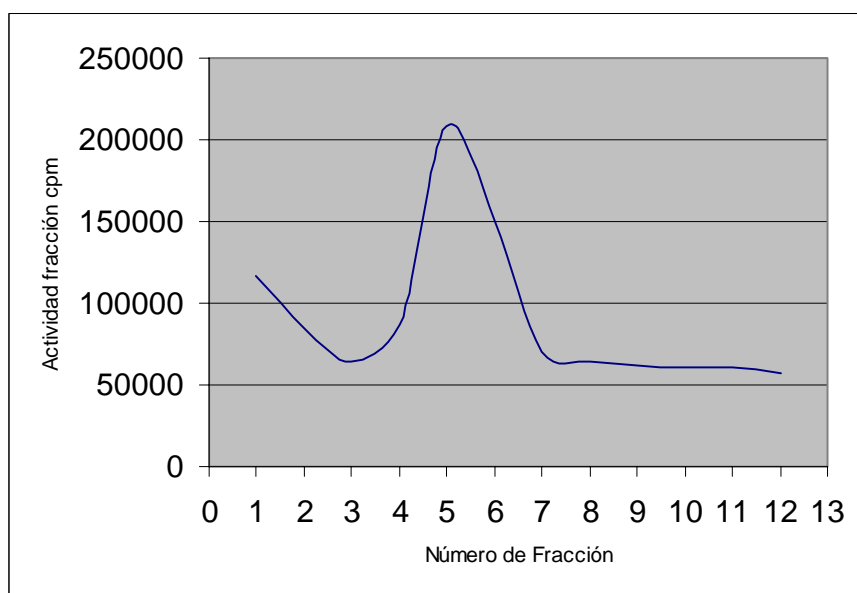


Figura 2. Determinación de la actividad de la albúmina marcada I-131 en cada una de las fracciones recuperadas, purificada con Hidroxiapatita



La figura 1 muestra que no hay separación de la albúmina yodada del I-131 libre, a diferencia de la figura 2 donde se realizó la separación de I-131 libre de la albúmina yodada, lo que nos indica que la hidroxapatita permite una mejor separación, obteniendo una buena purificación de la proteína yodada. Para mejorar el resultado de la purificación de la albúmina-¹³¹I en la columna de Sephadex tal vez sea necesario someter a una segunda cromatografía en columna de Sephadex, la fracción donde se encuentra la albúmina-¹³¹I, lo que implica mas tiempo.

4. REFERENCIAS

- [1] Gopal B. Saha. Radiopharmaceuticals and Methods of Radiolabeling. Fundamentals of Nuclear Pharmacy. Third edition. Springer – Verlag N.Y. 1992.
- [2] Tiselius A, Hjertén S y Lovin O. Protein Chromatography on Calcium Phosphate Columns. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **65**, 132-155, 1956.
- [3] Vladimir Tolmachev, A. Bruskin, I. Sivaev. Radiobromation of close – dodecaborate anion. Aspects of labeling chemistry in aqueous solution using Chloramine- T. *Radiochim.* **90**, 229-235, 2002.
- [4] Curso Nacional de Capacitación sobre Metodología de Radioisótopos orientado al Radioinmunoanálisis. Proyecto ARCAL VIII. ININ-OIEA. Junio (1990) 190 páginas.