

AR8500031

2
CNEA 468
Informe

ISSN 0325 - 1403

**Radioesterilización de
Gamma Inmunoglobulina
Humana Normal
Estudio de la Composición
de Amino Acidos**

**Norma Kaupert
E. E. Mariano**

**Comisión
Nacional
de Energía
Atómica**

República Argentina

Buenos Aires, 1981

Kaupert, Norma

Radioesterilización de gamma inmunoglobulina humana normal; estudio de la composición de amino ácidos. Buenos Aires, Comisión Nacional de Energía Atómica, 1981.

18 p. 26 cm. (Informe CNEA, 468)

Radioesterilización; Globulinas de origen animal. Mariano E.E.

614.48:539.12

547.962.4

Kaupert, Norma

Radioesterilización de gamma inmunoglobulina humana normal; estudio de la composición de amino ácidos. Buenos Aires, Comisión Nacional de Energía Atómica, 1981.

18 p. 26 cm. (Informe CNEA, 468)

Radioesterilización; Globulinas de origen animal. Mariano E.E.

614.48:539.12

547.962.4

Kaupert, Norma

Radioesterilización de gamma inmunoglobulina humana normal; estudio de la composición de amino ácidos. Buenos Aires, Comisión Nacional de Energía Atómica, 1981.

18 p. 26 cm. (Informe CNEA, 468)

Radioesterilización; Globulinas de origen animal. Mariano E.E.

614.48:539.12

547.962.4

CNEA 468
Informe

ISSN 0325 - 1403

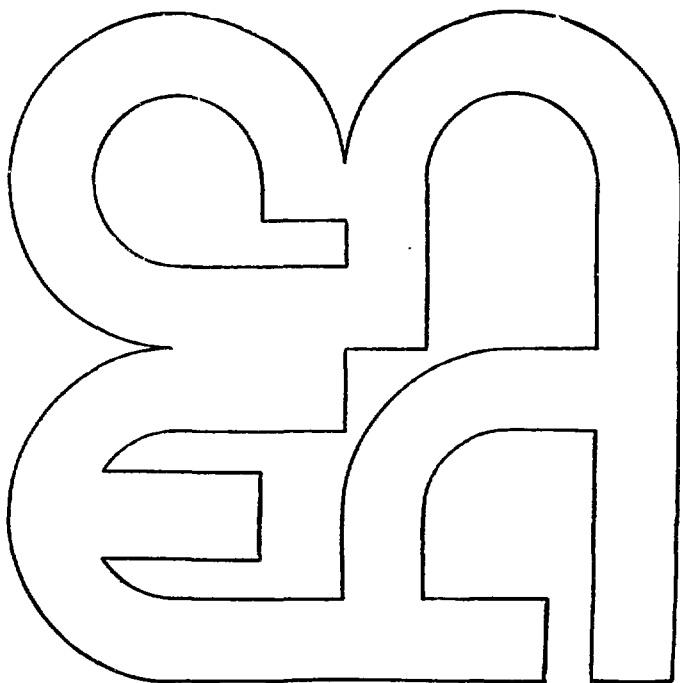
**Radioesterilización de
Gamma Inmunoglobulina
Humana Normal
Estudio de la Composición
de Amino Acidos**

**Norma Kaupert
E. E. Mariano**

**Comisión
Nacional
de Energía
Atómica**

República Argentina

Buenos Aires, 1981



INIS CLASSIFICATION AND KEYWORDS

C45

**STERILIZATION
COBALT 60
AMINO ACIDS
IMMUNOGLOBULINS
GLOBULINS - GAMMA
PH VALUE
GAMMA RADIATION
PHYSICAL RADIATION EFFECTS**

COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA
DEPENDIENTE DE LA PRESIDENCIA DE LA NACION

**RADIOESTERILIZACION DE
GAMMA INMUNOGLOBULINA HUMANA NORMAL
ESTUDIO DE LA COMPOSICION DE
AMINO ACIDOS**

Norma Kaupert* y E.E. Mariano*

Trabajo presentado en Abril de 1979

RESUMEN

Se estudiaron los efectos de las radiaciones ionizantes de ^{60}Co sobre la composición cuali y cuantitativa de aminoácidos en muestras de gamma inmunoglobulina humana normal (IgG) irradiadas en estado liofilizado y en soluciones de concentraciones variables a pH siete (pH 7).

Los resultados obtenidos no señalan cambios en las muestras liofilizadas, aun con la mayor dosis suministrada (10 Mrad).

Las soluciones de IgG sufrieron un efecto de radiación inversamente proporcional a su concentración. Así, suministrando 2,0 Mrad. a soluciones de 10,0 mg/ml y 5,0 mg/ml respectivamente, se produjo un efecto degradativo mayor, en las muestras de menor concentración proteica.

Se observaron cambios significativos en los siguientes aminoácidos: cistina, metionina, proína, histidina, arginina, tirosina y fenilalanina.

El análisis de los datos experimentales indica que la IgG humana liofilizada puede ser tratada con dosis varias veces superiores a las necesarias para producir esterilidad, sin modificar sus propiedades inmunológicas ni de estructura proteica primaria.

* CNEA - Dpto. Fuentes Intensas de Radiación.

Como consecuencia de lo expuesto, se concluye con que es factible la radioesterilización de IgG humana normal en estado liofilizado, no así en solución.

ABSTRACT

Effects of sterilizing radiation dose on the amino-acid composition of normal human Ig (G)

In order to verify gamma radiation effect, samples of Normal human Ig (G) in a) pH: 7 solutions with different concentrations and b) in liophilized state, were irradiated. In both, the quali and quantitative amino-acid compositions have been studied.

No changes in amino-acid composition were observed, for doses up to 10 Mrad delivered to the liophilized samples.

Nevertheless when 5 mg/ml and 10 mg/ml solutions of Ig (G) were irradiated with a 2 Mrad gamma dose, both were affected.

The damage appeared in greater proportion in the samples with lower concentration.

Cistine was the amino-acid most damaged and the loss of methionine, proline histidine, arginine, tirosine and phenilalanine, decreased in this order.

Therefore, gamma sterilization feasibility has been proved for Normal human Ig (G) only in the liophilized state.

INTRODUCCION

En el análisis de los efectos de las radiaciones ionizantes en proteínas deben considerarse las tres estructuras que conforman las moléculas de las mismas, a saber: la estructura primaria, determinada por la calidad y cantidad de aminoácidos; la secundaria, representada por las cadenas polipeptídicas y la terciaria, que involucra la disposición de dichas cadenas determinando la configuración espacial de la molécula.

Cuando una proteína es sometida a la acción de las radiaciones ionizantes, la absorción de energía puede inducir modificaciones en la naturaleza de los grupos químicos de la molécula, provocando destrucción, desaminación, y/o decarboxilación de aminoácidos. Este efecto radioquímico covalente presenta distintos grados de sensibilidad según las características de los aminoácidos,

resultando más sensibles aquellos que poseen uniones azufradas y siguiendo en orden decreciente los de estructura cíclica, los no saturados y por último los de cadena lineal saturada.

Siendo las moléculas de cistina, las que originan los puentes de disulfuro intramoleculares, de gran importancia para mantener las características biológicas de esta molécula (7), es lógico deducir que las mismas desaparecerán, al destruirse las primeras (8), (22).

Los efectos descritos, sumados a los radioquímicos conformacionales, por los cuales se origina destrucción de las uniones peptídicas, provocan destrucción de dipolos eléctricos y como consecuencia de ello ruptura de los puentes hidrogenados, modificando la estructura terciaria de la moléculas.

El objeto del presente trabajo consiste en verificar si la variación de respuesta inmunoquímica de la inmunoglobulina humana normal irradiada se debe a la radiolabilidad de sus aminoácidos y determinar cuál es la implicancia sobre este fenómeno de la variación del estado físico, concentración y dosis de irradiación.

Se plantea como hipótesis la existencia de una estrecha correlación entre las alteraciones radioquímicas covalentes y los cambios en el comportamiento inmunológico señalados en un trabajo anterior (16).

Los estudios inmunoquímicos e inmunolectroforéticos demostraron que, cuando la inmunoglobulina fue irradiada en estado liofilizado, no se observaron modificaciones en su comportamiento o las mismas fueron exiguas comparadas con las muestras irradiadas en solución. En consecuencia, el presente trabajo se realiza respetando las mismas condiciones físico-químicas observadas en el estudio antes mencionado (16).

Las dosis de irradiación utilizadas, se seleccionaron con el fin de determinar la factibilidad de esterilizar por radiaciones ionizantes la inmunoglobulina (IgG) humana normal

MATERIAL Y METODO

MATERIAL ESTUDIADO

Para este estudio se utilizaron muestras de IgG humana extraídas de suero normal por la técnica de batch, purificándolas por pasaje a través de columnas de intercambio iónico del tipo DEAE-Sephadex A-50 y posteriormente liofilizadas (16).

Se analizaron muestras irradiadas y sus respectivos controles.

TRATAMIENTO PREVIO

Para el tratamiento por irradiación se utilizaron muestras de IgG liofilizadas y en solución de 5.0 y 10.0 mg/ml. Estas últimas se prepararon utilizando solución reguladora de fosfatos de pH = 7.

IRRADIACION

Las muestras se irradiaron con una fuente de ^{60}Co de una velocidad de dosis de 250 Krad/hora.

Para muestras liofilizadas y en solución de 10 mg/ml, se suministraron: 2,0; 4,0; 6,0 y 10,0 Mrad. respectivamente. Para las muestras de 5,0 mg/ml de concentración, las dosis aplicadas fueron: 0,50; 2,0 y 4,0 Mrad.

METODO

Las muestras irradiadas fueron procesadas para su estudio, entre las 24 y 48 horas posteriores al tratamiento.

Todas las muestras de IgG controles e irradiadas en sus dos estados físicos fueron sometidas a hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 6N, en vacío, a $110 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura durante 22 horas (12). Posteriormente el hidrolizado fue evaporado a sequedad y el residuo obtenido solubilizado en solución de citrato de sodio-ácido clorhídrico (0,2N) de pH $2,2 \pm 0,02$. Las muestras así obtenidas fueron estudiadas en un analizador automático de aminoácidos marca Beckman 120 C, según la técnica establecida por Benson 1965 (4).

Los guarismos obtenidos en el presente estudio, fueron procesados de manera de obtener una permanente comparación entre controles y muestras irradiadas.

RESULTADOS

Los aminoácidos evaluados en las muestras tratadas por irradiación en estado seco no muestran modificación alguna, respecto de los testigos, con ninguna de las dosis de experimentación aplicadas.

Para el caso de las muestras irradiadas en solución de 10,0mg de IgG por ml, aún con la menor dosis (2,0 Mrad), se observa disminución de la concentración en siete de los diecisiete aminoácidos determinados (Fig. 1 y 2).

Las pérdidas sufridas no son uniformes a todos ellos y varían en forma proporcional a la dosis dada.

Así, con 10,0 Mrad las pérdidas observadas son: histidina 65%; arginina 35%; prolina 48%; cistina 90%; metionina 85%; tirosina 70% y fenilalanina 30% respecto de los testigos (Fig. 2).

Los diez aminoácidos restantes permanecen invariables. En el caso específico de glicina se representa constantemente como 100% de concentración (Fig. 1, 3 y 5), debido a que su presencia es tan significativa que, de acuerdo con el método y el aparato utilizados en las determinaciones, produce absorción infinita.

Se observa un dato significativo respecto al efecto de radiación sobre la concentración de tirosina y fenilalanina. A pesar de la similitud de la estructura química de ambas moléculas, se determina que la fenilalanina sufre una disminución aproximada de concentración del 35% con la dosis de 6 Mrad., permaneciendo constante aún con 10 Mrad. La tirosina, en cambio, se destruye en relación directa con la dosis suministrada, observándose una disminución de concentración del orden del 65% con la dosis de 10 Mrad. (Fig. 6).

En otra experiencia con soluciones de IgG de 5,0 mg/ml pudo observarse mayor disminución de concentración, a nivel de aminoácidos.

En este ensayo, el efecto de irradiación es marcado, observándose pérdidas de concentración en dieciseis de los diecisiete aminoácidos estudiados. Como en el caso anterior, el deterioro es proporcional a la dosis dada. (Fig. 5).

La cistina es el aminoácido más afectado, pues ya con la dosis de 0,50 Mrad. no se consigue realizar una exacta determinación cuantitativa del mismo.

Los resultados muestran, marcadas discrepancias en los efectos de irradiación, sobre muestras de IgG tratadas en soluciones de distinta concentración. (Fig. 2 y 5). Con el objeto de señalar aquellas con mayor evidencia, se realiza un estudio comparativo de los datos obtenidos irradiando con 2,0 Mrad. soluciones de IgG de 10,0 mg/ml y 5,0 mg/ml de concentración respectivamente (Fig. 3).

Del análisis de la figura III se destaca la menor radioresistencia de los aminoácidos, cuando las soluciones irradiadas se hallan diluídas, llegando a mostrar una destrucción prácticamente total en el caso de cistina, metionina y tirosina.

Asimismo, en soluciones de 5 mg/ml, lisina, histidina, treonina, serina, ácido glutámico, prolina, valina, leucina, isoleucina y fenilalanina sufrieron una pérdida porcentual superior en un 50% a las observadas en soluciones de 10,0 mg/ml, ambas irradiadas con 2,0 Mrad.

Los resultados anteriores se ven confirmados cuando se analizan los efectos producidos por 0,50 y 2,0 Mrad., sobre soluciones de IgG de 5,0 y 10,0 mg/ml de concentración, respectivamente. (Fig. 4).

En estas condiciones se observa que con la dosis de 0,50 Mrad., la pérdida de cistina y tirosina es un 50% mayor en las muestras de menor concentración, respecto de la registrada a una dosis de 2 Mrad., en las muestras de mayor concentración. (Fig. 4).

DISCUSION

IRRADIACION DE IgG LIOFILIZADA

Según Alexander (1) cuando una sustancia es irradiada en medio seco, el efecto producido no es acumulativo y se ve circunscripto casi exclusivamente a la consecuencia directa de la absorción de energía, es decir, a la acción primaria de radiación. (Alexander - 1960). Como confirmación de ello es que no se detectaron modificaciones a nivel de aminoácidos en las muestras irradiadas respecto de los controles.

Estos resultados explican los obtenidos en un trabajo anterior, los cuales señalan que la irradiación de IgG humana liofilizada no provoca cambios en su conducta inmunológica.

En estas condiciones no existe libre desplazamiento de los iones y radicales libres, en consecuencia, la probabilidad de reacción de la proteína a nivel primario es exigua.

IRRADIACION DE IgG EN SOLUCION

Los datos obtenidos señalan que el daño por radiación es mayor cuando se trata de soluciones de menor concentración proteica.

Considerando que el peso molecular promedio de la fracción 7(s) de IgG humana es 150.000 (8), las soluciones irradiadas tienen en ambos casos una molaridad menor que uno ($< 1M$), por lo tanto es lógico suponer que la formación de radicales libres del soluto, se debe casi exclusivamente a la reacción

de los radicales libres del agua con el mismo (17).

Por tratarse de soluciones diluídas ($< 1M$), debe considerarse que las especies químicas producidas al irradiarse dichas soluciones son las mismas que se destacan al irradiarse agua. Debe tenerse en cuenta que cuando se irradia agua a temperatura ambiente ($25^{\circ} C$), se forman según Hart y Anbar, (11) y Swallow (20), los siguientes productos: \bar{e} acuoso (2,8); H_2O (+2,8); OH (2,8); H (0,5); H_2 (0,4); H_2O_2 (0,8). Las cantidades relativas indicadas entre paréntesis están expresadas en valores G (N° de eventos/100 eV absorbidos). Los elementos liberados son de naturaleza transitoria y desaparecen rápidamente por interacción entre ellos o bien con productos radiolíticos.

Es de gran importancia la capacidad de reacción del soluto frente a un radical dado; para el caso de las proteínas su reactividad está dirigida preferentemente al \bar{e} acuoso y al $H\dot{O}$ (19).

La acción del \bar{e} acuoso afecta en gran medida las uniones peptídicas (18), los enlaces disulfuros y todos aquellos núcleos electrofílicos. La acción del $H\dot{O}$, con sus características oxidantes, afecta principalmente estructuras anulares y dobles enlaces produciendo pérdidas de átomos de hidrógeno (17), (9).

Todos los fenómenos hasta aquí señalados se encuentran condicionados por diferentes variables (5), (13), (6), entre ellas: concentración y dosis. En consecuencia se previó que, para una misma dosis de irradiación, las muestras de mayor concentración serían menos afectadas. Esto se debe a que, en soluciones, los efectos de radiación guardan una relación de proporcionalidad directa con la dosis e inversa respecto de la concentración (3).

Cuando se analizan los resultados obtenidos, con soluciones de inmunoglobulina con concentración de 10 mg/ml, se observa un orden variable de destrucción de aminoácidos, condicionado por la naturaleza de los grupos químicos de las moléculas. En este sentido puede observarse que los aminoácidos más afectados son aquellos que poseen grupos disulfuros y sulfhidrilos tales como cistina, cisteína y metionina (23), siguiendo en orden decreciente los de estructuras cíclicas no saturadas y saturadas respectivamente.

Siendo las moléculas de cistina, las que originan los puentes disulfuros intramoleculares fundamentales para mantener las características específicas de la inmunoglobulina, es lógico deducir que estas últimas desaparecerán al destruirse las primeras (12).

Estos resultados se hacen más evidentes en los estudios efectuados en muestras de menor concentración (5 mg/ml). Coincidentemente con las observaciones realizadas por inmunoelectroforesis de muestras irradiadas con sólo 0,50 Mrad., se observa una significativa modificación de comportamiento respecto de los controles (16).

Es oportuno destacar que, en concordancia con otros estudios (14), los resultados del presente trabajo ponen claramente de manifiesto, la influencia de la concentración en la acción de las radiaciones ionizantes; fundamentalmente cuando se analizan los guarismos obtenidos con dosis de 2,0 Mrad. Con esta dosis se puede observar que, en las soluciones de concentración de 5 mg/ml existe una significativa destrucción de todos los aminoácidos, excepto glicina.

Con referencia a la constante concentración de glicina en todas las muestras, aun en aquellas que fueron sometidas a las mayores dosis de radiación, cabe traer a colación las conclusiones de Peter G. y Col. (15), quienes señalan que la destrucción de otros aminoácidos favorecería la formación de glicina; este fenómeno resulta independiente de la presencia de oxígeno durante el proceso de radiación.

Los resultados experimentales observados señalan que, mientras la pérdida de fenilalanina por incremento de dosis deja de ser significativa superados los 6,0 Mrad., la cantidad de tirosina detectada disminuye significativamente con la dosis.

Suponemos que este hecho puede deberse a que, por acción de los \bar{e} acuosos y radicales $\text{H}\ddot{\text{O}}$ se produce la pérdida o bloqueo del grupo fenólico de la tirosina, la que llegaría a detectarse como fenilalanina.

CONCLUSIONES

- 1) Hasta la dosis de 10 Mrad., no se observan cambios significativos en la composición de aminoácidos de la inmunoglobulina humana normal irradiada en estado liofilizado.
- 2) La irradiación de IgG en solución, provoca una significativa alteración de la composición de aminoácidos.
- 3) La cistina, fue el aminoácido que registró mayor pérdida, en las muestras de IgG irradiadas en solución.
- 4) Se deduce que, como consecuencia de la pérdida de cistina, las moléculas de inmunoglobulina humana normal pierden sus características específicas.
- 5) Los resultados obtenidos en el presente trabajo explican aquellos encontrados en estudios inmunoquímicos e inmunoelectroforéticos.
- 6) La esterilización por radiación de la IgG humana normal es factible, cuando el tratamiento se efectúa en muestras liofilizadas.
- 7) Con el uso de radiaciones gamma, se agiliza enormemente el proceso de esterilización de este producto, al obviarse los métodos convencionales para alcanzar el mismo fin.

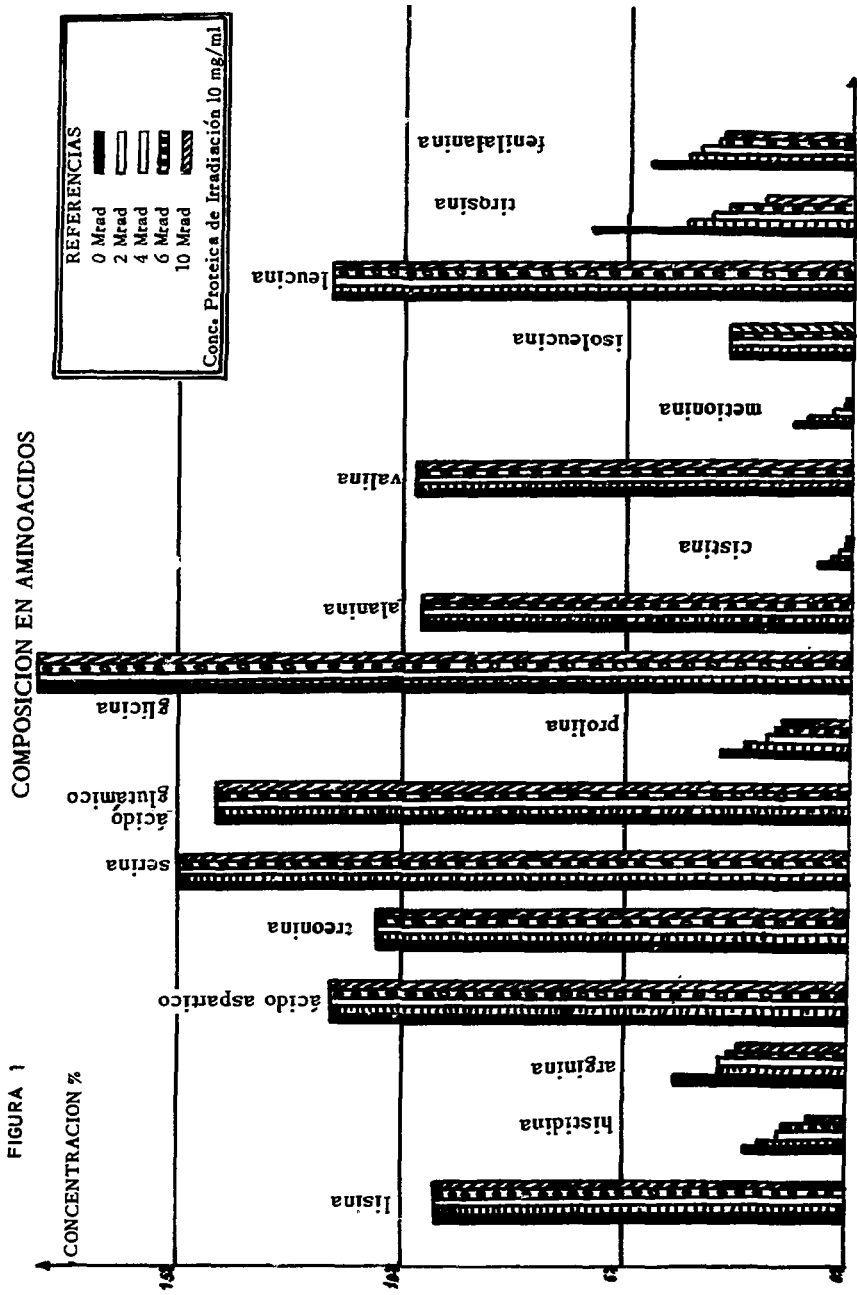


FIGURA 1

FIGURA 2

AMINOACIDOS RADIOSENSIBLES de la IgG.

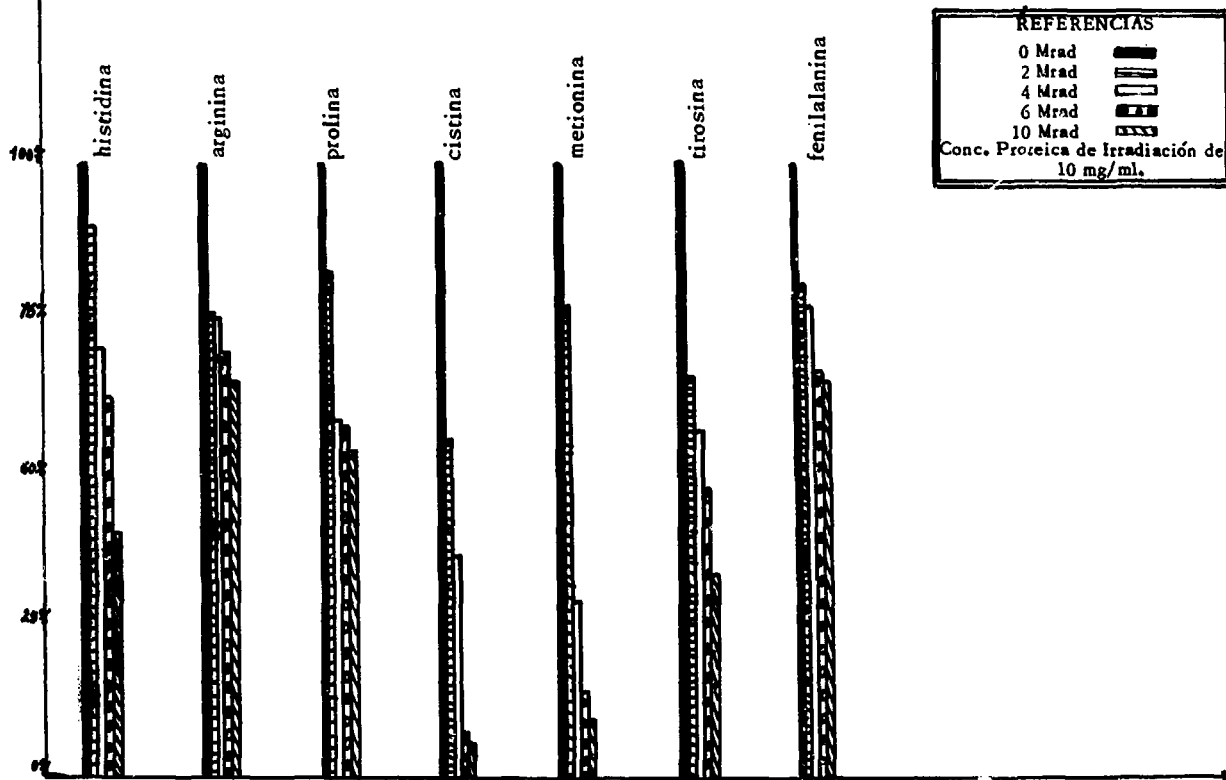
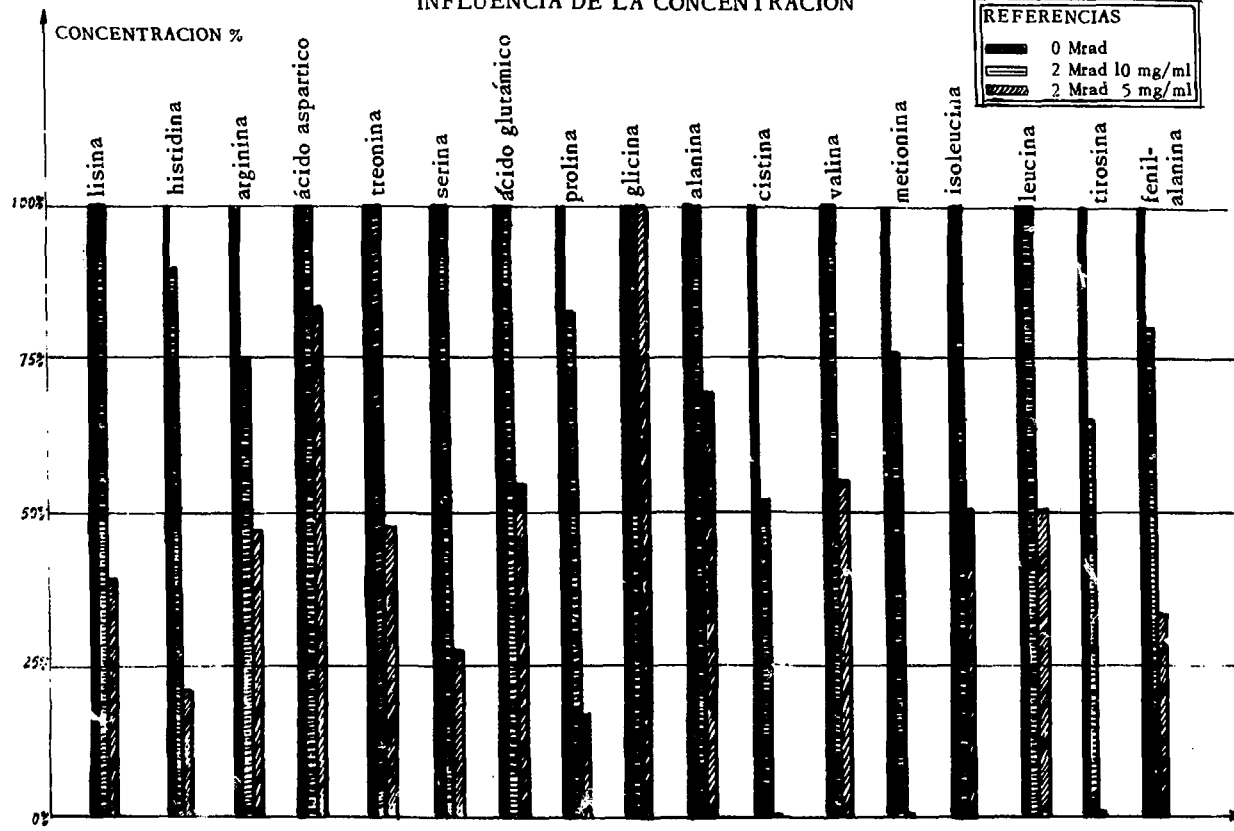


FIGURA 3

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION



COMPARACION DE EFECTOS

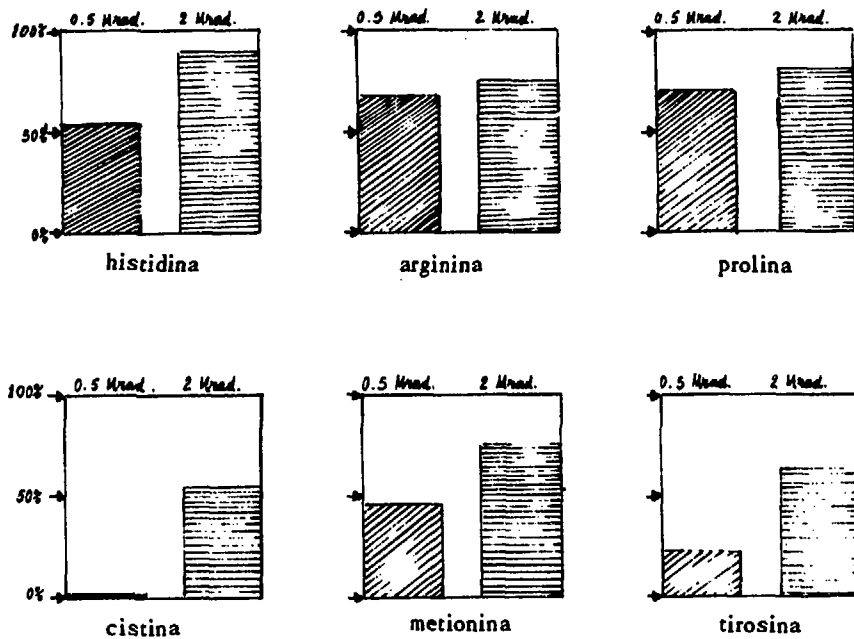


FIGURA 4

REFERENCIAS
 ▨ 5 mg/ml
 ▨ 10 mg/ml

FIGURA 5

AMINOACIDOS RADIOSENSIBLES DE LA INMUNOGLOBULINA

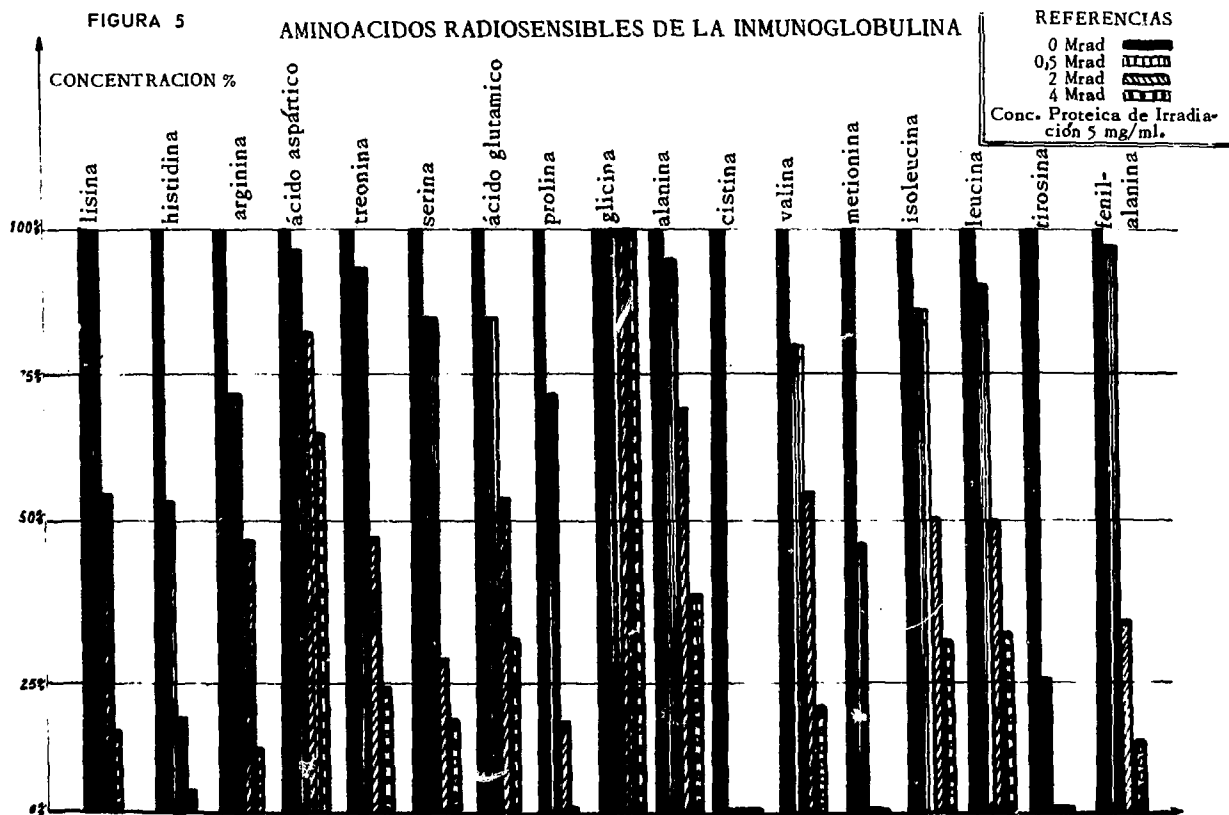
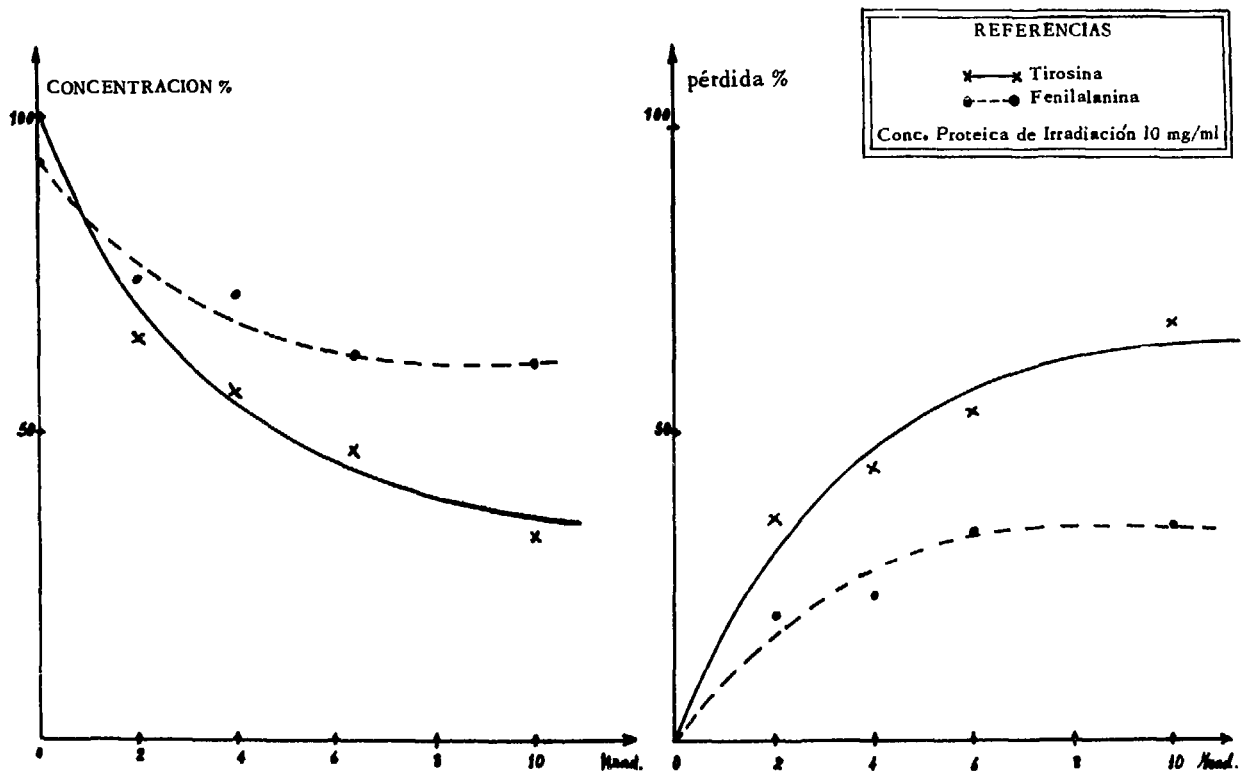


FIGURA 6

TIROSINA- FENILALANINA



BIBLIOGRAFIA

- 1) ALEXANDER, P., HAMILTON, L. - Rad. Research 13, 214 (1960).
- 2) ANBAR, M., BAMBENE, M., ROSS, A. B. - Natl. Stand. Ref. Data Ser. Natl. Bur. Stand. 43 (1973)
- 3) BACQ, Z. M., ALEXANDER, P. - Fund. of Radiobiology 188 (1961)
- 4) BENSON, J. V., PATTERSON, J. A. - Anal. Chem. Vol. 37, 1108 (1965).
- 5) BRAAMS, R. Radiation Research 31, 8 (1967).
- 6) BRAAMS, R., EBERT, M. Int. J. Radiat. Biol. 13, 195 (1967).
- 7) COHEN, S. PORTER, R. Adv. Immunol. 4, 287, (1964).
- 8) DAVIS, B. et all - Microbiology. HARPER Intemac. Edition, 2^a Printing - 418- 447 (1970).
- 9) DORFMAN, L. M. et all. Natl. Stand. Ref. Data, Ser Natl. Bur. Stand 43 (1973).
- 10) GARRISON, W. M. et all J. Phys. Chem. 71, 1546 (1967).
- 11) HART, E. J. y ANBAR, M. "The Hidrated Electron" Willy Interscience, New York (1970).
- 12) HILL, R. L. Adv. Prot. Chem. Vol. 20 N^o 37, 107, (1965)
- 13) HOFFMAN, M. Z. Hayon E. J. Phys. Chem. 79, 1362 (1975).
- 14) KHARCHENKO, LI., PAULOWSKAYA, T. E. - Radiobiology Vol. 16 (4) 04 (1976).
- 15) PETER, G., WIELAND, Z., RAJEROSKY, B. Naturforsch 166, 198 (1961).
- 16) SCAVINI, L. M., RODRIGUEZ, S. M., MARIANO, E., DEGROSSI, O. J. Medicina Vol. XXXV, p. 382 (1975).
- 17) SIMIC, M. G. - J. Agric. Food Chem. Vol. 26 N^o 1 (1978).
- 18) SIMIC, M. G., HAYON, E. Radiat. Res. 48, 244, (1971).
- 19) SIMIC, M., NETA, P. HAYON, E. - Journal Am. Chem. Soc. 92, 4763 (1970).

- 20) SWALLOW, A. J. - Radiation Chemistry, Willy London (1972).
- 21) TAL, J., FARAGGI, M. - Rad. Research 62, 337/347 (1975).
- 22) Technical Reports IAEA Series N° 114, Vienna (1970).
- 23) WILKENING et all - J. Phys. Chem. 72, 185 (1968).