

Tema 3: Técnicas isotópicas

Hay **material adicional** en la página web de la asignatura (se accede desde la página del Departamento: <http://www.uah.es/otrosweb/bioquimica>)

Justificación:

Las técnicas que emplean isótopos (generalmente los radiactivos) permiten la detección de moléculas en cantidades muy inferiores a las que se pueden detectar mediante métodos químicos de análisis. A modo de orientación: los análisis químicos no bajan de 10^{-7} mol, mientras que la radiactividad detecta 10^{-12} mol sin problemas y puede bajar aún más.

Recordatorio:

| m (mili-) | μ (micro-) | n (nano-) | p (pico-) | f (femto-) | a (atto-) | z (zepto-) | y (yocto-) |
|-----------|----------------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 10^{-3} | 10^{-6} | 10^{-9} | 10^{-12} | 10^{-15} | 10^{-18} | 10^{-21} | 10^{-24} |

¡atención!: alcanzamos la escala molecular: 1 zmol (un zeptomol) son sólo 602 moléculas, y 1 ymol (un yoctomol) no existe, es menos de una molécula)

Isótopos

Isótopos = mismo lugar (en la tabla periódica). Formas de un mismo elemento químico con distinta masa atómica (diferente número de neutrones en el núcleo). Químicamente son indistinguibles.

| | |
|------------------|--|
| de cada elemento | isótopo más abundante en la naturaleza |
| | isótopo(s) estable(s) |
| | isótopo(s) radiactivo(s) |

La mayor parte de los isótopos utilizados como marcadores en bioquímica se producen artificialmente, en reactores nucleares. Los compuestos simples obtenidos se transforman luego en productos bioquímicos mediante síntesis química y enzimática.

Isótopos estables

Uso menos frecuente que el de los isótopos radiactivos (detección más difícil).

Aplicaciones de los isótopos estables:

- Aumento de la densidad de la molécula y consiguiente separación. Ejemplo: experimento de Meselson y Stahl para demostrar el carácter semiconservador de la replicación: DNA marcado con ^{15}N y separado por ultracentrifugación isopícnica.
- Estudios de estructura y mecanismos de reacción mediante RMN. Ejemplo principal: ^{13}C .
- Trazador cuando no existe isótopo radiactivo para ese elemento. Ejemplo: ^{18}O , ^{15}N .

Detección: por espectrometría de masas

Isótopos radiactivos o radionucleidos

Se *desintegran* espontáneamente (reacción nuclear, emisión de partículas o radiación y transformación en otro elemento). La estabilidad de un isótopo depende de la proporción entre el número de protones y neutrones. Los compuestos marcados radiactivamente se llaman "**trazadores**", porque permiten al investigador seguir las transformaciones químicas o bioquímicas que se producen, en presencia de un enorme exceso de material no radiactivo.

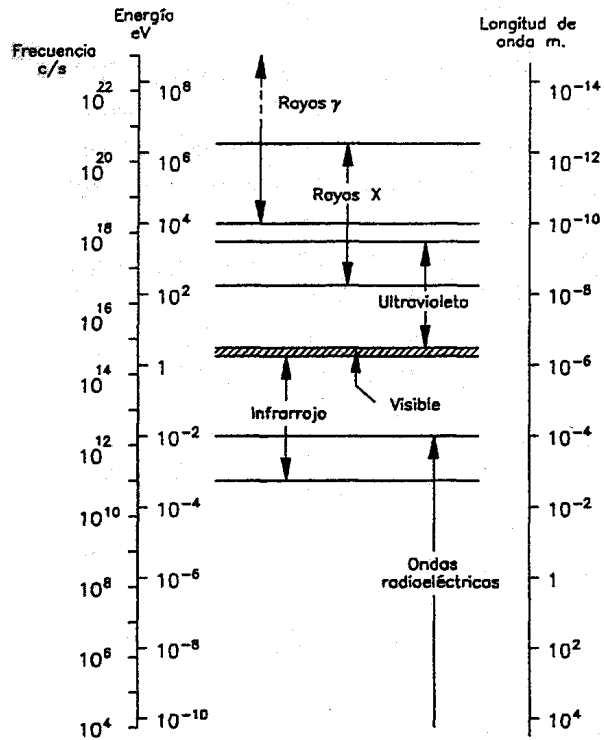
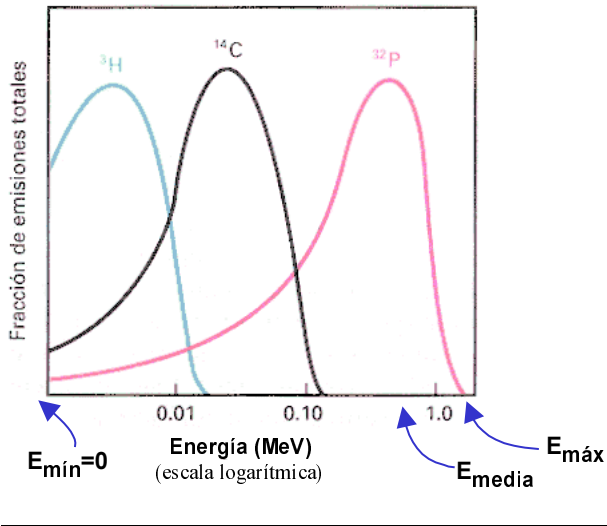
Naturaleza de la desintegración radiactiva

Tipo de emisión

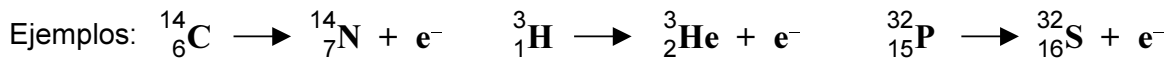
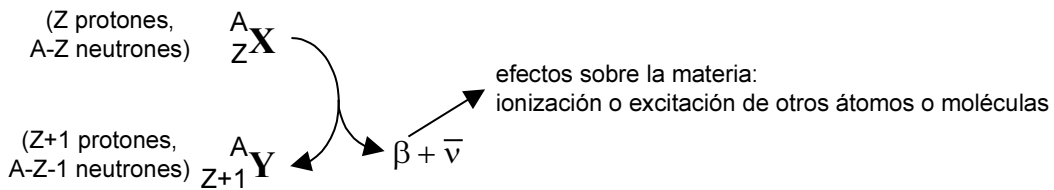
El núcleo de un elemento inestable se desintegra dando lugar a uno o varios tipos de radiación o partícula: α (núcleos de He, ^4_2He , p_2n_2), β (electrones) o γ (radiación electromagnética de alta energía). La radiación siempre procede del núcleo. En bioquímica son útiles los emisores de β o γ .

Radiación beta: electrones procedentes del núcleo ($n \rightarrow p + e^- + \bar{\nu}$) ($\bar{\nu}$ es un antineutrino), con energía diversa dentro de una escala continua, desde cero hasta un valor máximo característico de cada isótopo. Al atravesar la materia provoca ionización o excitación.

Espectros energéticos de emisión β de algunos isótopos radiactivos:



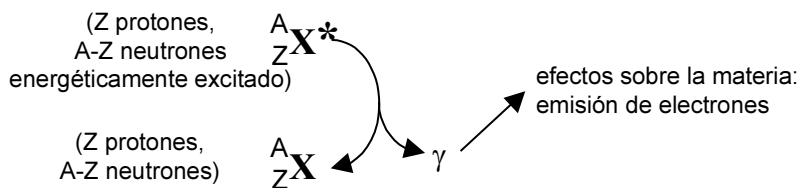
Espectro de la radiación electromagnética →



Radiación gamma: radiación electromagnética (fotones) de alta energía. Se origina en el núcleo, a diferencia de los rayos X, cuyo origen está en los electrones externos.

Un núcleo puede quedar en un estado energético excitado como consecuencia de una reacción nuclear, incluyendo las desintegraciones α y β . Al regresar espontáneamente al estado basal emite el exceso de energía en forma de rayo γ . Como los niveles energéticos son discretos, los valores posibles de energía de la radiación gamma también lo son (no son continuos como en la radiación beta).

Al no tener carga eléctrica, la radiación gamma no provoca ionización en la materia que atraviesa, pero puede expulsar electrones de su órbita o, al chocar con un núcleo, producir un par electrón-positrón; estos electrones secundarios en ambos casos son similares a la radiación beta.



| isótopo | partícula emitida | E_{\max} (MeV) [*] | periodo de semidesintegración |
|------------------|-------------------|----------------------|-------------------------------|
| ^2H | estable | | |
| ^3H | β | 0.018 | 12.3 años |
| ^{14}C | β | 0.155 | 5568 años |
| ^{15}N | estable | | |
| ^{18}O | estable | | |
| ^{24}Na | β | 1.39 | 14.97 horas |
| | γ | 1.7, 2.75 | |
| ^{32}P | β | 1.71 | 14.2 días |
| ^{35}S | β | 0.167 | 87 días |
| ^{40}K | β | 1.33, 1.46 | $1.25 \cdot 10^9$ años |
| ^{45}Ca | β | 0.254 | 164 días |
| ^{131}I | β | 0.335, 0.608 | 8.1 días |
| | γ | 0.284, 0.364, 0.637 | |

* 1 MeV = 10^6 eV ; 1 eV (electrón-voltio) = energía cinética adquirida por un electrón como consecuencia de ser sometido a un campo eléctrico creado por una diferencia de potencial de un voltio, o trabajo necesario para trasladar un electrón entre dos puntos cuya diferencia de potencial es de un voltio. 1 MeV = $1.602 \cdot 10^{-13}$ J

Ley de la desintegración radiactiva

La radiactividad es un fenómeno aleatorio. La probabilidad de que un determinado núcleo atómico se desintegre no se ve afectada por el número de fenómenos de desintegración que se han producido previamente ni por la interacción con otros núcleos radiactivos. Se trata más bien de una propiedad intrínseca de ese núcleo.

Como consecuencia, el número de desintegraciones que se producen en un determinado intervalo de tiempo sólo depende del número de átomos presentes. Por ello, la desintegración radiactiva es un proceso con cinética de orden 1, descrito por la ecuación siguiente:

$$-\frac{dN}{dt} = \lambda N$$

(la velocidad de disminución del número de núcleos es proporcional al número existente)
 λ = “**constante de desintegración**”, característica de cada isótopo (y de cada modo de desintegración, si tuviese varios).
 Sus unidades son (tiempo)⁻¹

integrando:
 $N = N_0 e^{-\lambda t}$ (el número de núcleos desciende exponencialmente con el tiempo)
 N_0 = número de átomos existentes a tiempo cero
 N = número de átomos existentes a tiempo t

consecuencias: La fracción de núcleos que se desintegra en un determinado intervalo de tiempo es constante.
 El número de núcleos que quedan sin desintegrar disminuye exponencialmente.

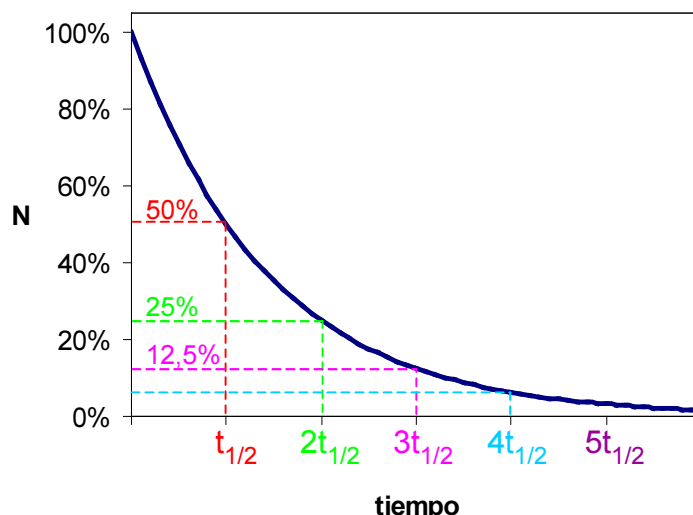
¿Cuánto tarda una muestra en reducirse a la mitad? = ¿Cuánto tarda en desintegrarse la mitad de los átomos de una muestra?

$N_0/2 = N_0 e^{-\lambda t}$; $t = \ln(1/2) / -\lambda = \ln 2 / \lambda = 0.693 / \lambda = t_{1/2}$, $\tau_{1/2}$ (tau griega) o **T**, “**periodo de semidesintegración**” (a veces llamado “semivida”, pero no se debe llamar “vida media”, que es el promedio de vida de un átomo)

Cada vez que transcurre $t_{1/2}$, se han desintegrado la mitad de los núcleos que quedaban:

| tiempo transcurrido | $t_{1/2}$ | $2t_{1/2}$ | $3t_{1/2}$ | $4t_{1/2}$ | ... |
|------------------------------------|-----------|------------|------------|------------|-----|
| cantidad remanente sin desintegrar | 50% | 25% | 12.5% | 6.25% | ... |

Visto de forma gráfica:



Es importante considerar el tiempo de semidesintegración del isótopo elegido para realizar un experimento, porque nos indica si tendremos suficiente actividad para medirlo y si esta actividad cambiará significativamente durante el experimento y la medida.

Unidades de radiactividad

La emisión de radiactividad se mide habitualmente en **curios** (abreviado **Ci**) = número de desintegraciones por segundo que experimenta un gramo de radio = $3.70 \cdot 10^{10}$ d.p.s. = $2.22 \cdot 10^{12}$ dpm

Las cantidades manejadas en las aplicaciones biológicas son muy inferiores, y se usan el milicurio y microcurio ($1 \mu\text{Ci} = 2.22 \cdot 10^6$ dpm)

La unidad de radiactividad en el Sistema Internacional es el **becquerel** (o becquerelio), $1 \text{ Bq} = 1$ d.p.s.; por tanto, $1 \text{ Ci} = 3.70 \cdot 10^{10}$ Bq.

Es bastante difícil detectar todas las desintegraciones, por lo que en la práctica se manejan **cuentas** por minuto (cpm), que se relacionan con las dpm a través de la *eficiencia* del recuento.

Actividad específica: se define como la radiactividad por unidad de masa o de cantidad de materia (mol). Indica la abundancia de un isótopo con respecto al total de átomos de ese elemento

Medida de la radiactividad

Medida de la radiactividad beta mediante ionización de gases

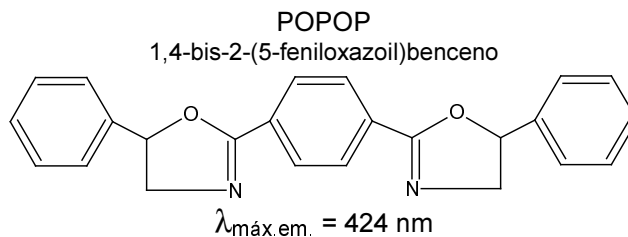
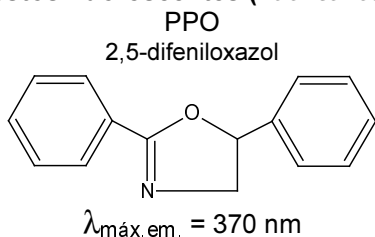
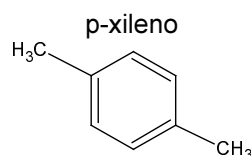
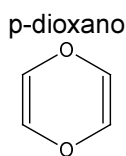
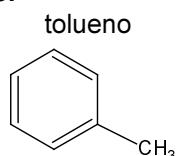
Una partícula beta que pasa a través de un gas puede desalojar un electrón de uno de los átomos del gas, con lo que se produce un par iónico (el electrón desalojado y el catión). A menudo la partícula β tiene suficiente energía para seguir produciendo sucesivas ionizaciones. En un detector de ionización, el gas está dentro de una cámara con dos electrodos cargados, que atraen a los electrones secundarios y a los cationes, registrándose una pequeña corriente eléctrica.

Dependiendo de la diferencia de potencial que se establece entre los electrodos, el detector trabaja en condiciones de respuesta distintas, lo que da lugar a diversos tipos de detectores (no detallados aquí). Uno de ellos es el **contador Geiger-Müller**, que resulta muy eficiente para detectar emisores beta de alta energía, como el ^{32}P , pero poco para los de baja energía, como el ^3H .

Para la detección por ionización, las muestras deben ser sólidas a fin de que puedan ponerse en contacto con la ventana del detector.

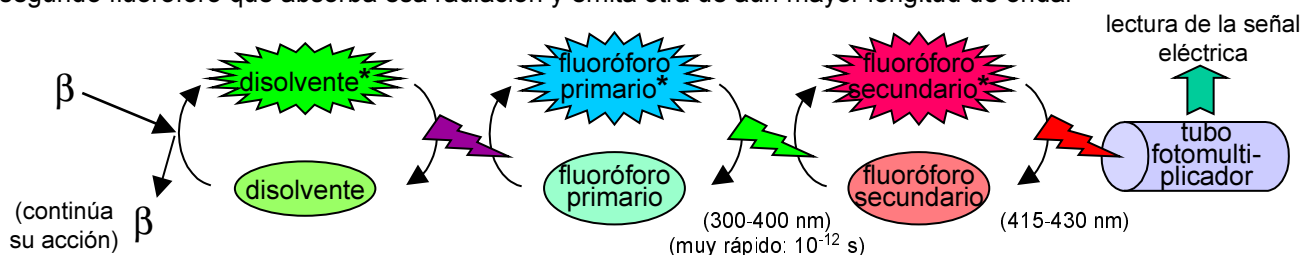
Medida de la radiactividad beta mediante centelleo líquido

Las razones de que la eficiencia sea reducida son: que las partículas beta no alcancen al detector, que se emitan en direcciones que no impactan con él, o que su energía no sea suficiente para provocar la ionización del gas. Una forma de intentar solventar esta limitación es que la muestra esté contenida en el interior del detector; esto se consigue disolviendo o suspendiendo la muestra en un líquido que contiene una o más sustancias fluorescentes. Éstas, al recibir la radiación beta, emiten fluorescencia, que puede ser luego detectada por un mecanismo óptico (un tubo fotomultiplicador).

Algunos componentes frecuentes de un líquido de centelleo:**Compuestos fluorescentes ("centelleadores"):****Disolventes:**

(se les suele añadir metanol, dimetilsulfóxido, etilenglicol... para aumentar la polaridad y facilitar la disolución de muestras biológicas)

¿Cómo una desintegración produce fluorescencia? Las partículas beta que abandonan la muestra y entran en el disolvente ceden su energía a las moléculas de éste, que pasan a un estado energético excitado. Al regresar al estado basal emite un fotón de luz de baja longitud de onda, que es absorbido a su vez por el fluoróforo y emitido luego como fotón de longitud de onda mayor (fluorescencia), que ya es detectable por un tubo fotomultiplicador (detecta la luz y la convierte en un pequeño pulso de voltaje). Si no es así, es preciso un segundo fluoróforo que absorba esa radiación y emita otra de aún mayor longitud de onda.

**Características deseables en un líquido de centelleo:**

- Máxima solubilidad de las muestras
- Baja señal de fondo
- Toxicidad mínima
- Alto punto de inflamación (poco inflamable)
- Baja fotoluminiscencia (activación del centelleador por radiación UV ambiental)
- Baja quimioluminiscencia (producción de luz como resultado de una reacción)
- Eficiencia elevada y reproducible
- Poca difusión a través de los viales
- Biodegradabilidad

Ruido de fondo:

La señal, para ser detectable y fiable, debe ser suficientemente superior al ruido de fondo del contador. Las causas de éste son diversas: limitaciones del fotomultiplicador y electrónica del sistema detector, radiación ambiental, ^{40}K en el vidrio, centelleo por la luz ambiental o por los rayos cósmicos (*radiación de Cerenkov*).

Extinción ("quenching"):

Es la reducción de la eficiencia en la transferencia de energía desde las partículas beta hasta el fotomultiplicador, en cualquier etapa y por cualquier medio. Disminuye, por tanto, la señal detectada.

a) Extinción química

Componentes de la muestra que absorban parte de la energía de las partículas beta sin emitir fotones o que absorban los fotones sin emitir fluorescencia. Ejemplos: agua, ácidos, sales, oxígeno disuelto.

b) Extinción por el color

Componentes de la muestra que absorben luz en la longitud de onda emitida por el fluoróforo secundario: disminuyen los pulsos de luz que llegan al detector. El "color" puede ser visible o ultravioleta cercano.

c) Extinción por dilución

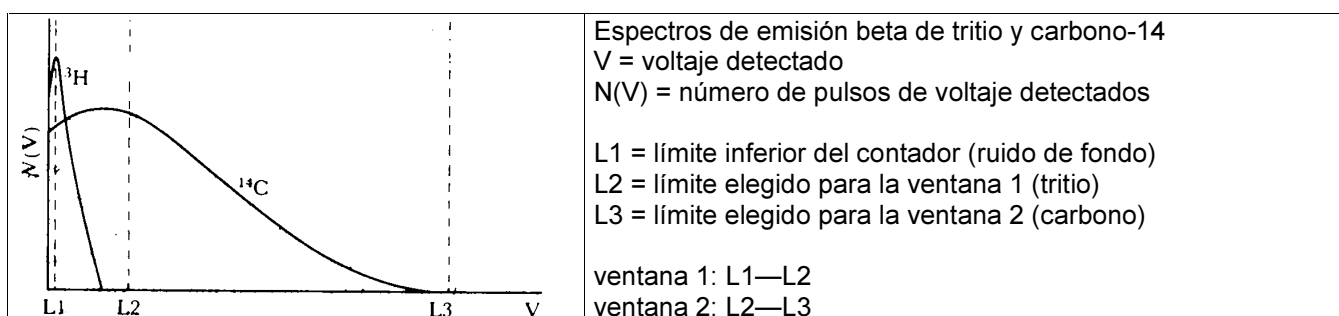
El disolvente y los fluoróforos resultan diluidos por la adición de muestra, lo que disminuye la probabilidad de un centelleo. Especialmente importante con muestras líquidas.

Preparación de la muestra:

Lo ideal es que esté disuelta en el líquido de centelleo, para maximizar el contacto con el disolvente y así la eficiencia. Si no es posible, al menos formando una suspensión. En muchos casos, la muestra insoluble se recoge en un filtro (papel, fibra de vidrio o nitrocelulosa), se seca (para eliminar la extinción del agua) y se introduce el filtro en el líquido de centelleo.

Detección simultánea de dos trazadores radiactivos:

La magnitud del pulso de voltaje que se produce como resultado de la desintegración es proporcional a la energía de la partícula beta emitida. Como consecuencia, se pueden detectar simultáneamente dos trazadores coexistentes en la muestra. El contador de radiactividad permite definir las "ventanas", canales o intervalos de voltaje en los que debe contar las señales, correspondientes (tras calibración adecuada) a "ventanas" de energía de las partículas beta emitidas y, por tanto, a ambos isótopos. La definición de estas ventanas debe ser cuidadosa, pues normalmente los espectros de energía de ambos isótopos se solapan.



Ejemplo:

| Muestra | L1—L2 (canal A) | L2—L3 (canal B) | B / A |
|------------------------|--------------------|--------------------|--------|
| problema | 500 cpm | 800 cpm | |
| patrón ^3H | 16 840 cpm | 25 cpm | 0,0015 |
| patrón ^{14}C | 4 250 cpm | 10 200 cpm | 2,40 |

Cálculos para la muestra problema:

$$1) \text{ cpm de } ^3\text{H} \text{ en el canal B} \quad B = A \times (B/A)$$

$$= 500 \times 0,0015 = 0,75 \approx 0$$

Importante: el canal B se ha elegido de modo que no hay cuentas de tritio en él

Por tanto, todas las cuentas del canal B son de carbono:

$$2) \text{ cpm de } ^{14}\text{C} \text{ en el canal B} = 800 - 0,75 \approx 800$$

La muestra problema repartirá sus cuentas de ^{14}C de la misma forma que el patrón (según la forma del espectro de ^{14}C):

$$3) \text{ cpm de } ^{14}\text{C} \text{ en el canal A} \quad A = B / (B/A)$$

$$= 800 / 2,40 = 333$$

El resto de cuentas del canal A deben ser de tritio:

$$4) \text{ cpm de } ^3\text{H} \text{ en el canal A} = 500 - 333 = 167$$

Sumando:

$$5) \text{ cpm totales de } ^3\text{H} = 167 + 0,75 = 167$$

$$6) \text{ cpm totales de } ^{14}\text{C} = 333 + 800 = 1133$$

$$7) \text{ relación } ^3\text{H} / ^{14}\text{C} \text{ (en cpm)} = 167 / 1133 = 0,147$$

Verificación:

$$\text{cpm totales canal B} = 0,75 + 800 = 800$$

$$\text{cpm totales canal A} = 333 + 167 = 500$$

$$\text{cpm totales} = 167 + 1133 = 1300 = 500 + 800$$

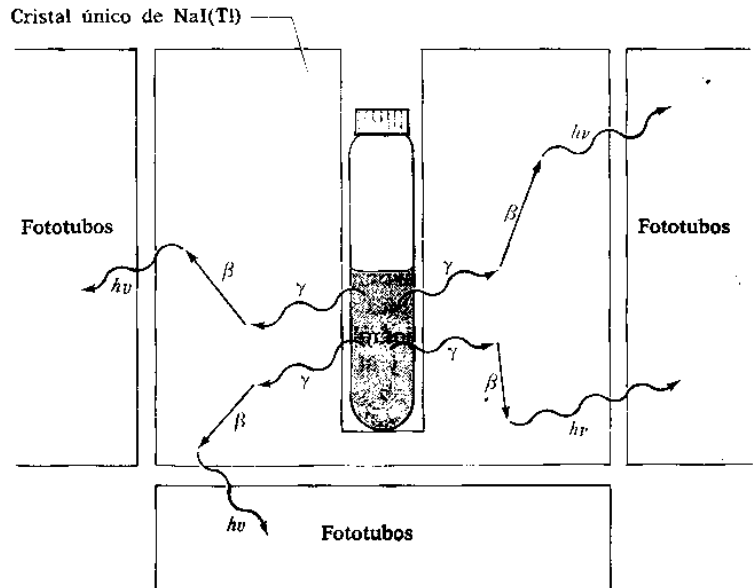
Continuando con el ejemplo: si hemos usado el ^3H para marcar leucina, con una actividad específica de 5 Ci/mmol, y el ^{14}C para marcar tirosina, con una actividad de 4 Ci/mmol, y conocemos la eficiencia de nuestro contador de radiactividad, 30% para el ^3H y 90% para el ^{14}C , podremos calcular la proporción molar de ambos aminoácidos en la muestra problema:

| | | |
|--|--|------------------------------------|
| $167 / 0,30 = 556 \text{ dpm } ^3\text{H}$ | $556 \text{ dpm} / (5 \times 2,22 \cdot 10^{12} \text{ dpm/mmol}) = 5,0 \cdot 10^{-11} \text{ mmol Leu}$ | Leu / Tyr = 0,50 / 1,41 = 0,354 |
| $1133 / 0,90 = 1259 \text{ dpm } ^{14}\text{C}$ | $1259 \text{ dpm} / (4 \times 2,22 \cdot 10^{12} \text{ dpm/mmol}) = 1,41 \cdot 10^{-10} \text{ mmol Tyr}$ | |
| o, directamente: Leu / Tyr = $\frac{556 \text{ dpm} / 5 \text{ Ci/mmol}}{1259 \text{ dpm} / 4 \text{ Ci/mmol}} = 0,353$ | | |

Medida de la radiactividad gamma

Los rayos γ se pueden detectar por **centelleo sólido**. Gracias a su mayor energía y poder de penetración, no es tan crítico el contacto estrecho entre muestra y centelleador, por lo que éste puede ser sólido y externo a la muestra; suele ser un gran cristal de yoduro sódico con trazas de talio, que rodea el compartimento donde se introducirá la muestra.

Al ir atravesando el cristal de NaI, los rayos γ producen electrones (β) que, a su vez, excitan átomos adyacentes del cristal, terminando por producirse una fluorescencia (fotones, $h\nu$) que es detectada por un tubo fotomultiplicador. Al igual que en el centelleo líquido, se pueden hacer experimentos de marcaje doble.



Una de las aplicaciones más frecuentes en bioquímica del marcado con trazadores gamma es la yodación de proteínas con ^{125}I (se estudiará su aplicación en el radioinmunoensayo, tema 6).

Autorradiografía

Se trata de un método que no sólo detecta la radiactividad, sino que permite un análisis espacial: en qué zonas de la muestra se localiza el trazador. Se aplica a muestras de organismos completos, órganos, tejidos, cortes histológicos, células, e incluso moléculas, así como a placas de cromatografía plana o de electroforesis. Se requiere un contacto directo de la muestra con el componente detector, que es una emulsión fotográfica (habitualmente en forma de una película fotográfica del tipo empleado para radiografía). La radiación emitida como consecuencia de la desintegración de los isótopos radiactivos activa los granos de haluro de plata haciéndolos susceptibles para reducirse a plata metálica durante el revelado fotográfico, sólo en los puntos de la emulsión situados sobre el punto donde se ha producido la desintegración. Tras fijar la foto, los resultados se observan a simple vista o al microscopio, dependiendo de la escala de la muestra.

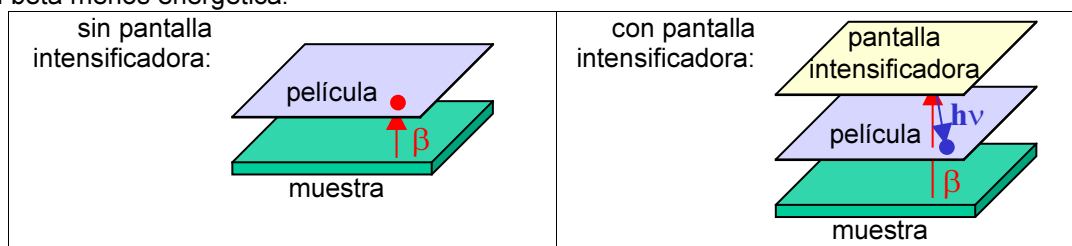
Una película fotográfica consta de una suspensión en gelatina de cristales de haluro de plata. La exposición de esos cristales a la luz o a la radiación los activa, de forma que diversos agentes reductores (*reveladores*) son capaces de convertir la Ag^+ en Ag metálica (puntos de color oscuro). En ausencia de tal activación, la plata es resistente a la reducción química.

La autorradiografía resultante proporciona información sobre la distribución espacial del material radiactivo y sobre su cantidad (a través de la intensidad de la señal).

| Ejemplos de autorradiografías: | | | |
|--------------------------------|---|--|--|
| | preparación de microscopía | | gel de electroforesis de proteínas |
| | electroforesis bidimensional de proteínas | | imagen de un tiroides con bocio utilizando tecnecio-99 metaestable |

El desarrollo de la autorradiografía requiere generalmente un tiempo prolongado (varias horas o días), dependiendo de la cantidad de radiactividad contenida en la muestra y de la energía del isótopo. Se realiza introduciendo muestra y película dentro de un contenedor metálico cerrado ("cassette") y con frecuencia en un congelador a -80°C , pues a baja temperatura la energía de activación del haluro de plata es menor.

La detectabilidad se puede mejorar empleando *pantallas intensificadoras*, láminas que contienen un compuesto fosforescente que al recibir la radiación beta emite varios fotones; de ese modo se amplifica la señal. Puesto que los fotones tienen menor energía que la radiación beta, es importante usar baja temperatura, así como una película cuyo espectro de respuesta se adecue a esas energías. La película se sitúa entre la muestra y la pantalla intensificadora. Las partículas beta, en consecuencia, deben atravesar la película, por lo que las pantallas intensificadoras clásicas sólo sirven para ^{32}P y ^{125}I , pero no para ^3H , ^{14}C , ^{35}S o ^{33}P , que emiten radiación beta menos energética.



Actualmente existen aparatos capaces de detectar el patrón bidimensional de radiactividad directamente, sin necesidad de la película fotográfica. Se emplean en especial con placas de cromatografía, geles de electroforesis o membranas de transferencia Western, Southern o Northern.

Algunas aplicaciones

Las aplicaciones de los trazadores radiactivos en bioquímica y biología molecular son innumerables. De forma ilustrativa, mencionaremos algunas a continuación.

Dependiendo del tiempo de exposición del sistema biológico al isótopo radiactivo, las aplicaciones se pueden clasificar así:

1. **Marcaje de equilibrio:** la exposición es prolongada, de modo que cada especie molecular alcanza una radiactividad específica constante.
2. **Marcaje de pulso:** se administra el trazador durante un tiempo corto con respecto a la duración del proceso estudiado, estudiando qué compuestos resultan marcados (aquellos que derivan biosintéticamente de forma inmediata del suministrado).
3. **Marcaje de pulso y caza:** se administra el trazador durante un tiempo corto y luego se sustituye por el mismo compuesto no marcado, siguiendo la evolución del marcaje a lo largo de las rutas metabólicas a diversos tiempos.

De forma general, posibles usos de los isótopos radiactivos

1. Para detectar materiales en cantidades demasiado bajas para los ensayos químicos
2. Para distinguir moléculas idénticas que se encuentran en distintas localizaciones químicas
3. Para analizar mezclas demasiado complejas para los análisis químicos convencionales
4. Para demostrar la participación en una reacción en la que los productos no se puedan distinguir químicamente de los reactivos

Bibliografía específica

- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Watson, J. D. (1996). *Biología molecular de la célula*, 3ª ed. Omega. Biblioteca: 576.3ALB p.189-91
- *** Freifelder, D. (1991). *Técnicas de bioquímica y biología molecular*. Reverté. Biblioteca: 577.1FRE Cap. 5 y 6.
- Karp, G. (1998). *Biología Celular y Molecular*. McGraw-Hill Interamericana. Biblioteca: 576KAR p.714-7.
- ** Mathews, C. K. y Van Holde, K. E. (1998). *Bioquímica*, 2ª ed. McGraw-Hill Interamericana. Biblioteca: 577.1MAT p.486-91