



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

DESARROLLO DE UNA METODOLOGIA INMUNO-  
LOGICA PARA LA DETECCION DE ENCEFALI-  
NAS: RADIOINMUNOENSAYO.

T E S I S P R O F E S I O N A L .  
para obtener el título de  
BIOLOGO.

DAVID MANUEL DIAZ PONTONES.

México, D. F.

1982



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE DE FIGURAS.

INDICE DE TABLAS.

INDICE DE ABREVIATURAS.

I	Introducción.	1
II	Antecedentes y Generalidades.	
	A.- Péptidos opioides	4
	B.- Encefalinas en muestras biológicas: Estabilidad, Extracción y Procesamiento.	13
	C.- Principios, desarrollo y optimización del Radioinmunoensayo para la medición de opioides.	17
	1.- Inmunoglobulinas y curso de la respuesta inmune.	18
	2.- Inmunogeno, inmunización, obtención y almacenamiento de los sueros.	21
	3.- Titulación de un suero.	28
	4.- Radioinmunoensayo.	29
	5.- Métodos de Separación del ligando libre del unido al anticuerpo.	33
	6.- Condiciones y factores que intervienen en la optimización de un Radioinmunoensayo.	37
	7.- Condiciones de incubación y Optimización del Radioinmunoensayo.	40
III	Procedimientos experimentales.	
	A.- Síntesis y Purificación del Inmunogeno.	44
	B.- Inmunización y Obtención del suero	51
	C.- Caracterización de los Sueros para Radioinmunoensayo.	

	1.- Titulación.	56
	2.- Radioinmunoensayo.	60
	3.- Procedimientos especiales en el Radioinmunoensayo.	
	a) Purificación del Radioligando.	66
	b) Coeficiente de extinción molar de las Encefalinas.	69
	c) Determinación de la concentración adecuada de carbón activado-dextrana.	70
	4.- Pruebas Control.	72
	5.- Modelo Matemático.	76
	6.- Optimización de las condiciones de incubación.	82
	7.- Ensayo de Especificidad de los sueros.	84
	D.- Determinación de la cantidad de Encefalina en el Tejido.	86
IV	Resultados.	
	A.- Síntesis y purificación del inmunogeno.	89
	B.- Purificación y vida del radioligando.	93
	C.- Titulación.	98
	D.- Afinidad y Capacidad de los anticuerpos.	102
	E.- Optimización de las condiciones de incubación.	113
	F.- Sensibilidad y Precisión.	118
	G.- Especificidad de los Sueros.	124
	H.- Determinación de la cantidad de Encefalina en Tejido Nervioso.	128
V	Discusión.	139
VI	Bibliografía	151

## INDICE DE FIGURAS.

Fig. 1	.- Morfina y sus derivados.	6
Fig. 2	.- Péptidos opioides.	11
Fig. 3	.- Inmunoglobulina.	20
Fig. 4	.- Reacción de conjugación por medio del Glutaraldehído o por la Carbodiimida.	23
Fig. 5	.- Principios de la Titulación.	30
Fig. 6	.- Principios del Radioinmunoensayo.	32
Fig. 7	.- Procedimiento de la Titulación.	57
Fig. 8a.	.- Procedimiento del Radioinmunoensayo.	61-62
Fig. 8b.	.- Desarrollo del Radioinmunoensayo.	63
Fig. 9	.- Modelo matemático: Capacidad del suero.	77
Fig. 10	.- Modelo matemático: Constante de disociación.	78
Fig. 11	.- Purificación del inmunogeno.	90
Fig. 12	.- Purificación del radioligando.	94
Fig. 13	.- Vida del radioligando.	97
Fig. 14	.- Titulación de los sueros: Leu-Enc y Met-Enc.	100
Fig. 15	.- Determinación de la capacidad de los sueros de Leu-Enc.	103
Fig. 16	.- Cambio en la capacidad de los sueros de Leu-Enc.	104
Fig. 17	.- Determinación de la capacidad de los sue- ros de Met-Enc.	106
Fig. 18	.- Cambio en la capacidad de los sueros de - Met-Enc.	107
Fig. 19	.- Determinación de la constante de disociación.	108

Fig. 20.- Condiciones de incubación para Leu-Enc.	114
Fig. 21.- Condiciones de incubación para Met-Enc.	116
Fig. 22.- Sensibilidad y especificidad para el suero de Leu-Enc.	119
Fig. 23.- Determinación de la sensibilidad y especificidad para el suero de Met-Enc.	120
Fig. 24.- Efecto de la concentración del suero.	124
Fig. 25.- Recuperación de la Encefalina de columnas de Amberlita XAD-2.	129
Fig. 26.- Determinación de Encefalina en Tejido Nervioso: comparación entre la fracción sobrenadante y la fracción parcialmente purificada.	133
Fig. 27.- Comparación en la cantidad de Encefalina en el Tejido.	135
Fig. 28.- Determinación del paralelismo de extractos de Tejido: Leu-Enc.	136
Fig. 29.- Determinación del paralelismo de extractos de Tejido: Met-Enc.	138

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1.- Cálculos para la concentración de reactivos para la reacción de conjugación.	47-48
Tabla 2.- Protocolo de Inmunización y Sangrado.	55
Tabla 3.- Constantes de disociación.	110
Tabla 4.- Concentración de sitios activos.	112
Tabla 5.- Determinación de la Sensibilidad y Especificidad.	125
Tabla 6.- Valoración del pH de las muestras de Tejido.	131-132
Tabla 7.- Radioinmunoensayos para Encefalinas.	142

Abreviaturas.

ac	Anticuerpo.
ACTH	Hormona adrenocorticotrófica.
Ag	Antígeno.
Ag-Ac	Complejo antígeno-anticuerpo.
ASB	Albumina de Suero bovino.
B-LPH	B-Lipotrofina.
B-MSH	B-Melanotrofina.
Col	Colaboradores.
CPC	Capacidad de precipitación del Carbón activado-dextrana.
cpm	Cuentas por minuto.
CTA	Control de trazador agregado.
dpm	Desintegraciones por minuto.
$\epsilon$	Coefficiente de extinción molar.
Enc	Encefalinas.
$^{125}\text{I}$	Iodo radioactivo.
Ig	Inmunoglobulina.
Ka	Constante de Asociación.
Kd	Constante de Disociación.
Leu-Enc	Leucina Encefalina.
Lis	Lisina.
Met-Enc	Metionina Encefalina.
post	Posterior.
RIE	Radioinmunoensayo (s).
SNC	Sistema Nervioso Central.

UM Control de Unión Máxima.

UNE Control de Unión Inespecífica.

## 1.- Introducción.

A principios del siglo pasado, fué aislado un alcaloide del opio que se denominó morfina. Para mediados del siglo XIX, el uso de éste alcaloide era preferido sobre el láudano y otros extractos crudos del opio. Fué hasta ese momento cuando quedaron esclarecidos sus efectos tóxicos y de adicción, además de sus acciones analgésicas, euforizantes y narcóticas. De la observación de que, aún a bajas dosis, el isomero levógiro de la morfina era más potente desde el punto de vista farmacológico, se contempló la posibilidad de la existencia dentro del Sistema Nervioso de un receptor de alta afinidad esteroespecífico para los opioides. En 1973 Pert y Snyder, comprobaron la existencia de tal entidad en el tejido nervioso.

Las propiedades de los receptores a opiáceos sugirieron que ésta entidad cumple una función fisiológica dentro del Sistema Nervioso Central (SNC). Para mediados de los años 70, existía evidencia a favor de ésta posibilidad, derivada de estudios neurofisiológicos en que la estimulación eléctrica del área gris central del cerebro medio producía un efecto analgésico que podía ser atenuado por la naloxona, siendo ésta última un antagonista de los opiáceos. De ésta forma, era posible que los receptores a opiáceos, fueran el blanco de acción de opioides endógenos hasta entonces no identificados, y cuyo efecto fisiológico podía ser similar al de la morfina. Por esta razón se investigó la capacidad de que extractos crudos de cerebro mimetizaran la acción de la

morfina en la contracción del vas deferens del ratón, y el ileum de cobayo. Se comprobó de ésta manera que los extractos poseen una actividad opioide. El siguiente paso fué el aislamiento e identificación de las sustancias responsables de ésta actividad, siendo las primeras en descubrirse, las denominadas encefalinas, (Leucina Encefalina y Metionina Encefalina) que sólo difieren entre sí, en el aminoácido del extremo carboxilo, teniendo las siguientes secuencias: la Leucina Encefalina, Tir-Gli-Gli-Fen-Leu, mientras que la Metionina Encefalina, Tir-Gli-Gli-Fen-Met.

La identificación y aislamiento de estos péptidos en 1975, - aunado al posterior descubrimiento de una gran familia de péptidos opioides, han abierto un amplio campo de estudio. Las investigaciones relacionadas con los péptidos endógenos en el SNC, han confrontado a los científicos con problemas metodológicos en cuanto a su identificación y cuantificación, ya que las técnicas comúnmente utilizadas para el análisis de los neurotransmisores de origen no péptidico, resultan inadecuadas en este campo de trabajo. La complejidad química de los péptidos y sus bajos niveles de concentración en muestras biológicas, imposibilitan el uso de éstas técnicas.

Para el estudio de la función de éstos pentapéptidos en el SNC, es necesario poseer una técnica de medición que tenga las siguientes características:

- 1) Especificidad hacia la sustancia que se desea medir.
- 2) Alta sensibilidad y precisión.
- 3) Capacidad para procesar simultáneamente un gran número de mues

tras.

Al efecto, el radioinmunoensayo ha sido ampliamente utilizado en neurobiología, por ser una técnica que reúne éstas tres condiciones derivando la especificidad y alta afinidad inherentes a las reacciones antígeno-anticuerpo.

El objetivo de éste trabajo es el de desarrollar ésta técnica para la medición selectiva de las encefalinas, preparando conjugados para inmunización, para que con ellos, se obtengan sueros - específicos contra las encefalinas. Estudiando el título y afinidad de los sueros, se escogerán los que permitan desarrollar un radioinmunoensayo altamente selectivo y sensible y optimizando -- las condiciones de los radioinmunoensayos para la detección y medición de las encefalinas en muestras biológicas, de ésta forma posibilitan el estudio del papel de éstas moléculas en el SNC.

## II.- Antecedentes y Generalidades.

### A.- Péptidos Opioides.

El descubrimiento en años pasados de la existencia de moléculas con una alta actividad opioide (Hughes y col. 1975) dentro del SNC, ha atraído la atención de muchos investigadores, por su posible utilidad en la medicina. El antiguo y continuo interés en ésta clase de drogas, es el resultado inevitable de su utilidad en medicina como sedantes, analgésicos, antidiarreicos, e inductores del sueño, entre otros efectos. El mecanismo de acción de los alcaloides del opio como la morfina y el ciento de sustancias sintéticas relacionadas, ha sido objeto de estudio por más de 200 años (Eddy y May 1973). Derosne en 1803 y Sertuner en 1805, aislaron del opio crudo una sustancia cristalina denominada por el último investigador como morfina y mostrando que poseía el mismo efecto que el opio en el perro.

Un gran número de evidencias se han acumulado a lo largo de los últimos 50 años, mostrando que la acción de los opioides dentro del organismo, dependen de su interacción con un receptor específico. Esta evidencia fué ampliamente estudiada por Beckett y Casy (1954), Portoghese (1965), Jacobson (1972) entre otros, y puede ser resumida como sigue:

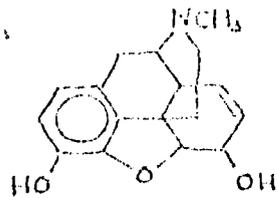
a) Existe una estructura química básica, capaz de producir todas las acciones del opio. Esta estructura básica se ha establecido en referencia de las presentes características de la molécula de

la morfina: siendo indispensables la presencia de un anillo aromático y el contenido de nitrógeno, generalmente como un amonio, que esté localizado a una distancia de dos átomos de carbono saturado del anillo aromático, también es de importancia el grupo hidroxilo y el fenólico (Eddy y Kay 1973). Algunas sustancias sintéticas relacionadas con la morfina, como la etorfina, poseen una actividad de 5,000 a 10,000 veces superior a la morfina y difiere en muy poco a la estructura de ésta. (figura 1)

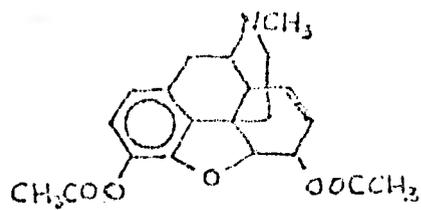
b) La morfina es una molécula asimétrica siendo la forma levógiro el isomero activo, mientras que el dextrógiro tiene muy poca actividad.

c) Se ha observado que algunos derivados de la morfina, pueden actuar como antagonistas de los opiáceos. Los cambios pequeños en la estructura, por ejemplo la sustitución de un grupo alilo dentro de la morfina, convierte a una droga de ser un potente analgésico, a otra que puede inhibir el efecto analgésico de la morfina.

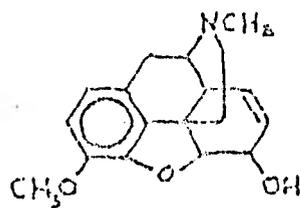
La farmacología molecular de los opiáceos y sus receptores, hacia pensar que la especificidad de estos últimos, estaba destinada a reconocer y responder a una molécula endógena, que produjera los mismos efectos que la morfina (Collier 1973). La evidencia directa favorecía tal posibilidad, derivada de estudios neurofisiológicos. Los estudios anteriores al descubrimiento de un ligando endógeno, fueron reportados por 1969 (Reynolds 1969) en que la estimulación eléctrica del perímetro dorso-lateral de la sustancia gris central del cerebro medio, produce analgesia, pro-



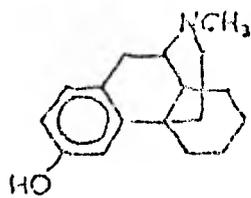
morfina



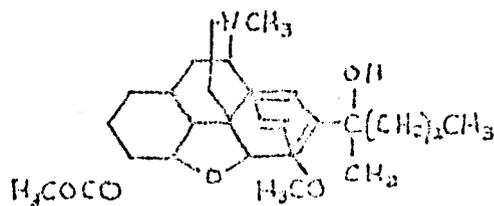
herojina



codeina



levorfanol



etorfina

FIGURA 1.- Morfina y sus Derivados.

La morfina es el analgésico de más amplio uso, siendo éste un alcaloide natural que se extrae del opio, que es el jugo desecado que se obtiene por la incisión de las cápsulas verdes que contienen las semillas de la adormidera, Papaver somniferum. En el opio se encuentran dos grupos principales de alcaloides, los fenantrénicos, entre los que se incluye la morfina y la codeína, y los bencilisoquinólicos que incluye la papaverina y la noscapina. La codeína es el 3- metiléter de la morfina, sin embargo a igualdad en peso, es menos potente que la morfina. Por otro lado la heroína o diacetilmorfina que es sintetizada a partir de la morfina por acetilación de los grupos OH fenólico y alcohólico, es más potente que la morfina y de igual forma el latorfanol.

bandose en cirugía de exploración en el cerebro de las ratas. Este dato es corroborado por Mayer y Liebeskin (1974), al demostrar que la estimulación eléctrica en el área gris central del cerebro medio, produce un efecto analgésico. La analgesia obtenida de esta forma, puede ser atenuada por la naloxona (Akil et al 1972, - 1976). Mientras que Jacob y col. (1974), encontraron que el ratón puede ser más sensible al dolor, por inyecciones en pequeñas cantidades de naloxona. Es recientemente que se ha demostrado la existencia de receptores altamente específicos para las moléculas opioides, tanto en el cerebro como en otras regiones. Goldstein y col. (1971) fueron los primeros en descubrir tales receptores - en el cerebro del ratón. Finalmente, la evidencia experimental - hizo desvanecer las dudas y objeciones, cuando en 1973 los doctores Snyder y Pert comprobaron la existencia de receptores específicos para los opiáceos en el sistema nervioso. (Pert y Snyder - 1973a, b).

Se realizaron experimentos marcando los sitios de unión en forma reversible con opioides  $^3\text{H}$  (se requiere para esto de ligandos  $^3\text{H}$  de alta actividad y especificidad). Un cuidadoso lavado - para remover las uniones no específicas, demuestra que éstas exceden en gran medida al número de sitios específicos, los que se encuencran a una concentración de 30 pmoles/g de cerebro (Pert y - Snyder 1973a, b, Simon et al 1973). En elegantes estudios realizados por Kuhar y colaboradores con la técnica de autorradiografía, demuestran la existencia de receptores a opiáceos, encontrándose que están concentrados en áreas que regulan funciones involucradas con los opioides, especialmente la integración de la per-

cepción del dolor y la euforia (Pert et al 1976, Atweh y Kuhar - 1977 a, b, c).

Estas observaciones fueron reconocidas como indicios adicionales de la existencia de un opioide endógeno, y cuya acción era bloqueada por la naloxona. Hughes investigó la posibilidad de mimetizar el efecto de la morfina, por medio de extractos crudos de cerebro, en ensayos de inhibición de la contracción del vas deferens del ratón y el ileum de cobayo ante estimulación eléctrica. Se demostró de ésta forma, que los extractos cerebrales poseen una molécula que mimetiza el efecto de la morfina y que es bloqueada por la naloxona. Demostró de ésta manera que tales extractos contienen péptidos con un peso molecular entre 300 y 700 daltones. Simultáneamente, varios grupos poseían preparaciones parcialmente purificadas de extractos con moléculas opioides endógenas de cerebro de mamífero (Pasternak et al 1975), de hipófisis (Teschemacher et al 1975), y de líquido cerebroespinal (Terenius y Wahlstrom 1975). Hughes (1975a, b) fué quien aisló del cerebro de porcino los primeros opioides endógenos en estado puro, a los que denominó encefalinas (Enc).

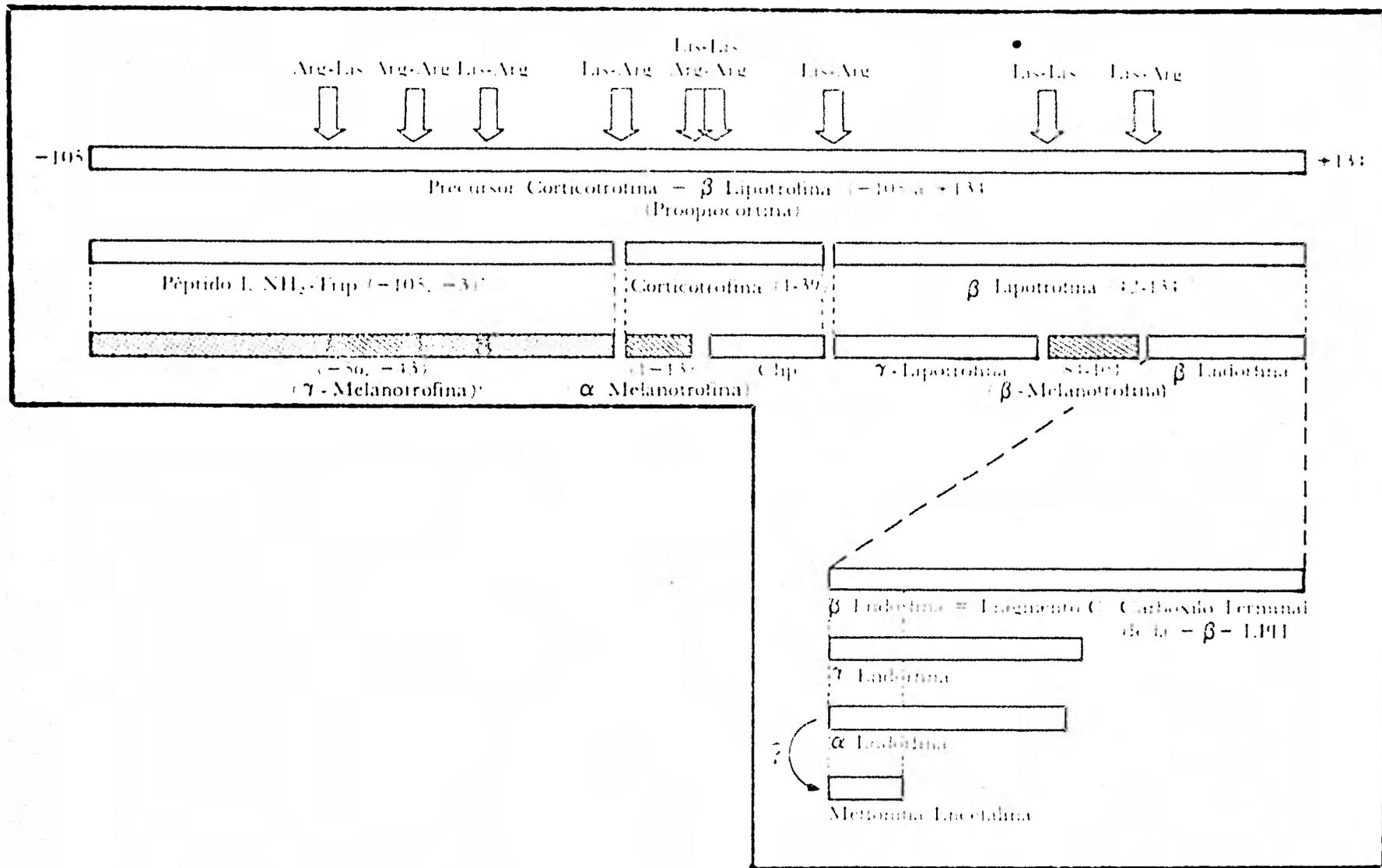
Su estructura fué descrita por Hughes y col. (1975 c) y la que originalmente parecía ser una sola molécula, resultó ser la mezcla de dos moléculas distintas, que difieren tan sólo en el aminoácido del extremo carboxilo, las encefalinas (Enc) poseen la siguiente secuencia: Tir-Gli-Gli-Pen-Leu (leucina encefalina, Leu-Enc) y Tir-Gli-Gli-Pen-Met (metionina encefalina, Met-Enc), la proporción determinada por Hughes fué de 1:5 respectivamente. Debido a su

simple estructura, rápidamente fueron sintetizadas y estudiadas en muchos laboratorios. La confirmación de la estructura propuesta - por Hughes, fué obtenida por Simantov y Snyder (1976), quienes aislaron el mismo par de péptidos de cerebro de ganado vacuno, pero - en una proporción diferente a la encontrada por Hughes.

Como punto de interés en su estructura, Hughes observó que la secuencia de la Met-Enc estaba contenida en el polipéptido B-Lipotrofina (B-LPH). Es decir que la secuencia de la Met-Enc correspondía a la secuencia de aminoácidos del 61 al 65 de la molécula - de B-LPH. Paradójicamente, la secuencia de aminoácidos de ésta - hormona hipofisiaria, había sido reportada diez años atrás (Li et al 1965) y se sabía ya que contenía la secuencia completa de la - hormona B melanotrofina (B-MSH). Proponiéndose entonces a la - B-LPH como precursora de la B-MSH y de la Met-Enc. Poco después - Bradbury y col. (1976) que estudiaron el fragmento carboxilo terminal constituido por los aminoácidos 61 a 90 de la B-LPH, informaron que éste fragmento tenía actividad analgésica, así como alta - afinidad por los receptores cerebrales. Era claro, que éste fragmento también contenía la secuencia de la metionina encefalina - (61-65 de la B-LPH). Al mismo tiempo Guillemin y col. (1976) aislaron varios péptidos con actividad morfominética tanto del hipotálamo, como de la hipófisis. Además del ya mencionado fragmento - carboxilo terminal de la B-LPH, llamado también B-endorfina (Cox - et al 1976, Li et al 1976, Bradbury et al 1976), identificaron las sustancias denominadas  $\alpha$  endorfina que es el fragmento 61-76 de la B-LPH y la  $\beta$  endorfina con la secuencia 61-77 de la B-LPH. Al - igual que la B-endorfina, la  $\alpha$  y  $\beta$  endorfina contienen en su extre

mo amino la secuencia de la Met-Enc, proponiendo que la B-LPH sería el precursor de todas estas moléculas. Para 1977 Mains, Eipper y Ling encontraron que la secuencia de la B-LPH, así como de la hormona adrenocorticotrofica (ACTH) aparecían a su vez en otra molécula de un peso molecular mayor, denominandola pro-opiocortina (figura 2). Existen algunos argumentos contra la hipótesis expuesta anteriormente; por una parte no se explica el origen de la Leu-Enc, y por otro lado Bloom y col. (1977) por métodos histoquímicos, demostraron que las endorfinas y las encefalinas (Enc) se encuentran distribuidas en diferentes grupos neuronales. Para 1979 se había encontrado una serie de argumentos, que apoyan la idea de que las Enc poseen un precursor diferente al de las endorfinas. Estudios de ontogenia en el sistema de las Enc y de las endorfinas (Bayon et al 1979) demostraron diferencias importantes en la aparición de estos dos sistemas. Para fines del mismo año, se develó la existencia de otras moléculas que poseían una mayor semejanza a las Enc, como es el caso de péptido triptico adrenal que tiene una secuencia formada por Tir-Gli-Gli-Fen-Met-Lis, o el heptapéptido adrenal Tir-Gli-Gli-Met-Arg-Fen (Stern et al 1979), los que serían buenos candidatos como precursores para la Met-Enc. Relacionados a la Leu-Enc se encuentra la  $\alpha$ -Neo-endorfina que tiene la secuencia, Tir-Gli-Gli-Fen-Leu-Arg-Lis-Arg (Kangawa et al 1979) o el tridecapéptido hipofisiario, conocido como dinorfina con la secuencia: Leu-Enc-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lis-Leu-Lis (Goldstein et al 1979).

En los últimos años se han descubierto diversas moléculas que poseen la secuencia de las Enc, pero el de mayor posibilidad



## FIGURA 2.- Péptidos Opioides.

La figura muestra la relación que guardan según su estructura primaria las encefalinas con los demás péptidos con actividad opioide. La secuencia de eventos muestra la primera hipótesis en el origen ontogenético de las encefalinas. Estudios más recientes demuestran una diferencia en cuanto a la localización de las Encefalinas con los posibles precursores. Esto, y la falta de una adecuada explicación al origen de la Leu-Enc, provocó la búsqueda de los precursores de las Encefalinas que estuvieran de acuerdo a los conocimientos hasta entonces adquiridos. En la actualidad la molécula - con mayor posibilidad de ser el precursor de las Encefalinas, es la pre-proencefalina. Para más detalles referirse al texto.

para ser considerado como precursor, es la Pre-pro-encefalina que contiene cuatro copias de la Met-Enc por una copia de la Leu-Enc, una Met-Enc-Arg-Pen y una de Met-Enc-Arg-Gli-Leu, mostrando estos dos últimos péptidos una alta capacidad opioide (Hoda et al 1982).

En un gran número de descubrimientos que se han dado desde 1975, aumentan el número de preguntas, no sólo las que se refieren a la relación que guardan estas sustancias entre sí, o las ya muy estudiadas acciones de los opiáceos sobre el SNC (analgesia, narcosis, euforia, adicción, dependencia, etc.), sino que se extienden a interrogar acerca de la integración de estas nuevas sustancias en los sistemas neuronales conocidos, su regulación y su interrelación con otros sistemas. Así su identificación y cuantificación en muestras biológicas, resulta ser una premisa indispensable para obtener las respuestas correspondientes.

B.- Encefalinas en Muestras Biológicas; Estabilidad, Extracción y Procesamiento.

Los estudios de los cambios post-mortem de las Enc, proveen la base de los procedimientos útiles para la extracción de éstas. Hasta años recientes se obtuvo evidencia directa de la estabilidad post-mortem de las Enc en el tejido (Childer y Snyder 1979). La gran cantidad de reportes, apoyan la estabilidad de las Enc dentro del tejido, cuando menos en las 6 horas subsiguientes al sacrificio del animal, no existiendo cambios en las concentraciones de Enc, pero la manipulación del órgano, produce la exposición a las enzimas degradativas, que se encuentran separadas de las Enc (Bayon sin publicar).

Existen reportes contradictorios con respecto al método de sacrificio que cause la menor perturbación en los niveles in vivo de Enc. Los animales sacrificados por medio de irradiación con microondas, poseen valores más altos de Enc, que aquellos que fueron decapitados (Yang et al 1977b, Verhoef et al 1980), y por otra parte se ha reportado que la diferencia en el método de sacrificio no es significativo (Gros et al 1978).

Existe también evidencia que indica, que las disecciones realizadas en el tejido, o cualquier otra técnica que produzca lesión, trae un decremento en el contenido de Enc. (Bayon et al 1978, Iversen et al 1978, Patey et al 1981, Bayon sin publicar).

Se han realizado varios intentos para lograr una manipulación

del tejido sin un decremento en los niveles de Enc. La irradiación por microondas, ha sido reportada como un método satisfactorio para la fijación del cerebro (Yang et al 1977, Rossier et al 1977b y Gros et al 1978). Realizando una perfusión in vivo con paraformaldehído neutralizado, estabiliza de igual forma la Enc cerebral (Bayon et al 1980a, b, Hughes et al 1977).

Por otra parte, se ha tratado de inhibir a las proteasas responsables de la degradación de las Enc en el proceso de extracción. Existen tres posibles enzimas que participan en la degradación de las Enc dentro del SNC, una de ellas es una amino péptidasa (Hambrook et al 1976, Dupont et al 1977, Mark et al 1977, Vogel y Altstern 1977, Craves et al 1978, Craviso y Musacchio 1978, Knight y Klee 1978, Simon et al 1979), otra de las enzimas es una dipéptido hidrolasa (Érdoş et al 1978a, b, Benuk y Mark 1979, Stine et al 1980) y la más reciente en ser caracterizada es una encefalina dipeptidil carboxilasa (Malfroy et al 1978, GoreNSTEIN et al 1979), las tres enzimas degradan a las Enc en péptidos inactivos, dando como resultado de la primera enzima la liberación del residuo del extremo amino del pentapéptido, y las otras dos enzimas hidrolizan la unión entre la Glicina<sup>3</sup> y la Fenilalanina<sup>4</sup> de la Enc. Se ha observado que la bacitracina es capaz de inhibir las proteasas cerebrales a una concentración milimolar (Miller et al 1977), siendo de igual potencia la puromicina (Barclay y Phillips 1978), y con una mayor especificidad el tiorfano (Roques et al 1980, Patey et al 1981). Así mismo se ha observado que el uso de una mezcla de péptidos sintéticos, evita la degradación de las Enc (Henderson et al 1978, Patey et al 1981).

Se ha observado que existe una sustancial degradación de las Enc, cuando se realiza la homogenización en amortiguadores para su preparación y desproteínización por calor (Rossier et al 1977b, Gros et al 1978). Alternativamente, la homogenización del tejido fresco en un ácido fuerte, como el HCl 0.1 N, parece proteger a las Enc (Gros et al 1978, Miller et al 1978a). Sin embargo algunas proteasas permanecen activas a un pH de 3.5 (Meck et al 1977).

Una modificación al procedimiento anterior, que ha probado ser un método más efectivo para la protección de las Enc, es la inactivación de las proteasas in situ, antes de extraer los péptidos del tejido (Rossier et al 1977b). El tejido hervido en ácido acético 2 N durante 15 a 30 minutos antes de su homogenización, previene cualquier pérdida significativa.

Otra consideración que está relacionada a la estabilidad de los péptidos opioides en el proceso, es la tendencia de oxidarse de ciertos aminoácidos, como es la metionina. El uso de agentes antioxidantes parece no ser necesario en el manejo cotidiano o por períodos cortos. En algunas ocasiones es necesario agregar 0.1% de mercaptoetanol cuando las muestras son almacenadas a -20°C por largos períodos (Bayon et al sin publicar). La eficiencia de extracción y recuperación de los péptidos de la muestra biológica, puede ser estimado por comparación de métodos alternos.

Las soluciones acuosas ácidas solas o en combinación con solventes orgánicos polares, han sido ampliamente usadas para la extracción de las Enc. El ácido tricloroacético, no es de amplio -

uso, puesto que no solubiliza totalmente a las moléculas opioides de alto peso molecular (Bayon sin publicar).

El proceso de purificación parcial o desproteínización previa a la cuantificación de las Enc y endorfinas, con el uso de ácidos fuertes, normalizan la permeación cromatográfica, mejorando su recuperación. (Austen et al 1977, Rossier et al 1977a, Rubinstein et al 1977, Hughes et al 1977, Liota et al 1978, Yang et al 1978).

C.- Principios, Desarrollo y Optimización del Radioinmuno-  
ensayo para la Medición de Opioides.

La primera técnica utilizada para la detección de las Enc en el cerebro de mamíferos, fué el bioensayo en el vas deferens del ratón o en el ileum de cobayo, utilizado por Hughes (1975a, b) durante la purificación de los opioides endógenos. Simultáneamente Pasternak et al (1975) y Terenius y Wahlstrom (1975), establecieron una técnica de competición por la unión al receptor, o sea una técnica o ensayo al radioreceptor. En este ensayo se mide la habilidad de los extractos del tejido para competir con opioides  $^3\text{H}$  por la unión al receptor, proveyendo una forma de medir la actividad de los opioides endógenos (Pasternak et al 1975, Terenius y Wahlstrom 1975, Simantov y Snyder 1976).

Las investigaciones sobre los péptidos opioides, en relación a su función dentro del SNC, han confrontado a los investigadores con problemas metodológicos, en cuanto a la identificación y cuantificación de los péptidos, que van más allá de los límites de las técnicas neuroquímicas tradicionales. Esto debido principalmente, a la mayor complejidad química de los péptidos sobre los neurotransmisores no peptidicos. Aunado a esto, la cantidad existente de neuropéptidos en el tejido nervioso es sumamente baja. Las demandas de especificidad y de sensibilidad, pueden ser resueltas con métodos basados en el reconocimiento esteroquímico de los péptidos, esto es, una interacción molécula a molécula como la que ocurre en el reconocimiento antígeno anticuerpo. La in-

munodetección ha sido una de las mejores herramientas en la comprensión de la acción biológica de los péptidos, pues posee la capacidad de discriminar moléculas en base a su estructura química y no a su acción biológica, como es el caso de los bioensayos y las técnicas de medición por unión al receptor.

Las técnicas de más importancia en la actualidad, son las técnicas de inmunodetección, que proveen la posibilidad del uso de un instrumento altamente específico para el estudio de los péptidos. Ambas técnicas conocidas como radioinmunoensayo e inmunocitoquímica, han sido ampliamente utilizadas en el estudio de desarrollo, distribución, transporte, liberación, entre otras, de los péptidos opiáceos. Las técnicas de inmunodetección, requieren de la disponibilidad del suero inmune con anticuerpos de alta afinidad y especificidad por el antígeno en estudio. Por ello se resume a continuación los conceptos mínimos sobre la respuesta inmune, relevantes para la obtención de los anticuerpos (Ac), así como los procedimientos generales para la producción de inmunogenos, la inmunización y, la recolección y titulación de los sueros. Posteriormente describimos en que se basa el radioinmunoensayo, sus variantes y métodos de desarrollo, así como los parámetros que los definen como sensibilidad, precisión y especificidad.

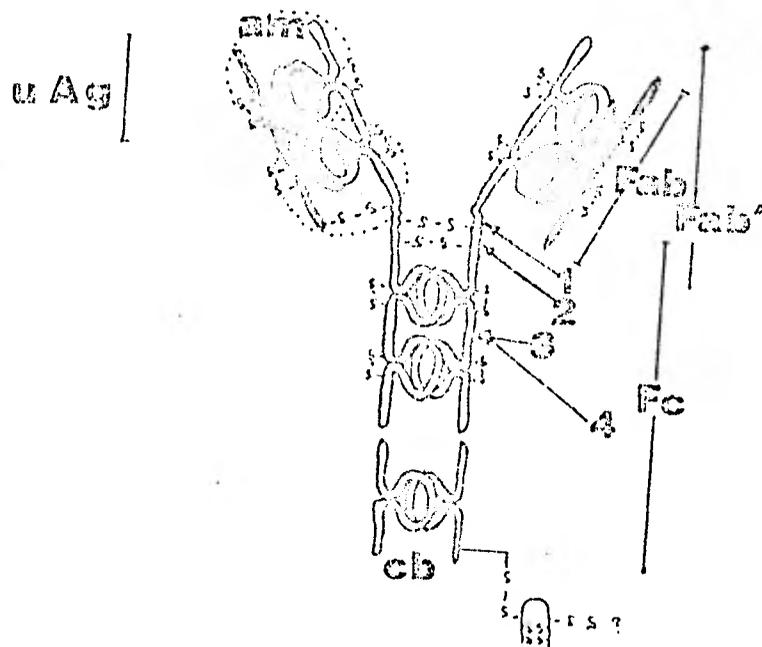
#### 1.- Inmunoglobulinas y Curso de la Respuesta Inmune.

En los animales superiores se ha desarrollado un mecanismo de defensa contra agentes patógenos externos, como las bacterias y los virus entre otros. La respuesta a la invasión de cualquier

material extraño, está mediada por el sistema inmune. Gran parte de la respuesta inmune involucra a los anticuerpos (Ac), que poseen la capacidad de unirse al material extraño que es denominado antígeno (Ag), y de ésta forma neutraliza el efecto del Ag dentro del organismo. La unión del Ac con el Ag es altamente específica, propiedad que ha permitido el uso de los Ac como una herramienta analítica para el reconocimiento y medición selectiva de ciertas sustancias.

La obtención de los Ac específicos para ser usados con éste propósito, requiere un reconocimiento mínimo del mecanismo de la respuesta inmune. A ésto se refiere de forma resumida y esquematizada, para proponer algunas consideraciones elementales respecto a los procedimientos y problemas relacionados a la obtención de los sueros.

Los anticuerpos son un grupo de proteínas relacionadas entre sí, que circulan en el torrente sanguíneo y que en general se denominan inmunoglobulinas (Ig). En los mamíferos existen cinco tipos de Ig que son IgM, IgG, IgA, IgD, IgE. Siendo su estructura básica un par de cadenas polipeptídicas, denominadas cadena pesada, unidas entre sí por medio de puentes disulfuro y asociadas cada una de ellas, de forma similar por puentes disulfuro a un polipéptido denominado cadena ligera (figura 3). Por cada par de cadenas pesada-ligera se une una molécula de Ag. El extremo terminal amino de cada una de éstas cadenas, constituye la región variable del anticuerpo, por medio de la cual se une el Ag, ésta variabilidad está en función a diferencias en la secuencia de amino



- cadena ligera
- cadena pesada
- s-s uniones disulfuro
- am amino terminal
- cd carboxilo terminal
- uAg sitio de union del Ag
- C region constante
- V region variable
- 1 papajna
- 2 pepsina
- 3 tripsina
- 4 plasmina

FIGURA 3.- Inmunoglobulina.

Se encuentra representado en forma esquemática una Inmunoglobulina en relación a su función y fragmentos enzimáticos. Se muestran las diferentes regiones que da lugar la digestión enzimática con diversas enzimas: La pepsina da lugar a la región denominada pFc; mientras que la tripsina dará origen a los residuos que se denominan TpFc! Para más detalle consultar la revisión realizada por Winkelhake (1978).

ácidos en ésta región de la molécula, y es la que da la especificidad al Ac.

La producción de las Igs en respuesta a la inoculación de un Ag ó inmunogeno, consiste inicialmente en la producción de IgM, - seguida por un aumento en la producción de IgG y con la subsecuente disminución de la cantidad de IgM. Una vez ocurrido éste fenómeno, si se inoculara una vez más con el mismo inmunogeno, lo cual se denomina inoculación de refuerzo, se producirá un rápido aumento en los niveles de IgG en el plasma, sin una aparición previa de IgM. Aún después de que los niveles de IgG hayan disminuído, es posible con frecuencia obtener nuevamente y en poco tiempo, - una respuesta en el aumento de IgG, ya que, el organismo posee células denominadas de memoria, las cuales preservan la capacidad para responder a la presencia de un Ag al que se ha expuesto el animal anteriormente, y producir al ser estimuladas una clona de células productoras de IgG contra ese Ag.

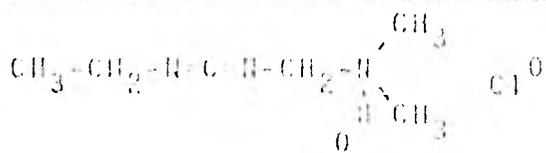
## 2.- Inmunogeno, Inmunización, Obtención y Almacenamiento de los Sueros.

No cualquier sustancia extraña es capaz de inducir la formación de Igs. Las moléculas pequeñas usualmente no lo hacen y el límite inferior en el peso molecular para poseer inmunogenicidad, es aproximadamente de 1,000 a 10,000 daltones. Ciertos inmunogenos son más potentes que otros. Generalmente entre más grande sea una proteína o carbohidrato, mayor será su inmunogenicidad. Los Ac sólomente reconocen una parte de la molécula y a dicha re-

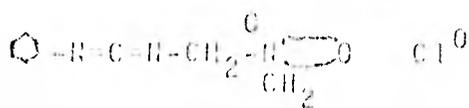
gión se le denomina determinante antigénico. En las proteínas, el determinante antigénico consiste de pocos residuos de aminoácido.

Algunas moléculas que por ser pequeñas no poseen la capacidad de estimular el sistema inmune por sí mismas, son unidas a moléculas de alto peso molecular, que son capaces de despertar una respuesta inmune, denominándose entonces a la molécula pequeña hapteno. Este fenómeno ha sido ampliamente utilizado para la obtención de Ac contra pequeñas moléculas, que se desea identificar y cuantificar por métodos inmunológicos. Se han utilizado como moléculas de alto peso molecular o moléculas acarreadoras, la albumina (ovoalbumina, albumina de suero humano o de bovino), la polilisina, la tiroglobulina y la hemocianina entre otras, puesto que ellas son buenos inmunogenos por sí mismas.

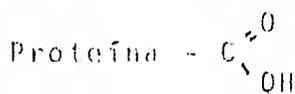
Para realizar la unión entre las moléculas de bajo peso molecular que no poseen inmunogenicidad, a moléculas de alto peso molecular, lo más deseable es la formación de una unión estable covalente. Cuando es un polipéptido, la unión con la proteína acarreadora, se suele realizar por medio de sus grupos amino o carboxilo. Las carbodiimidas y el glutaraldehido, son los reactivos más utilizados para llevar a cabo ésta unión. Las carbodiimidas pueden reaccionar con una variedad de ácidos débiles, activándolos para la formación de esteres o amidas. La reacción de las carbodiimidas con el carboxilo de los aminoácidos, es la predominante a temperatura ambiente, (figura 4). Por otra parte el glutaraldehido es un reactivo bifuncional que forma bases de Schiff



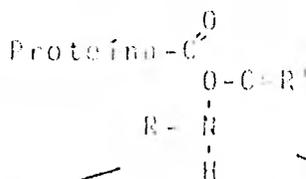
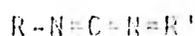
1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)-carbodiimida



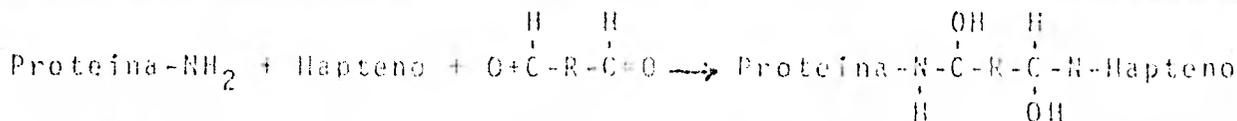
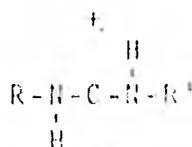
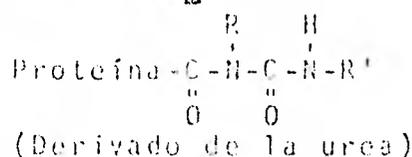
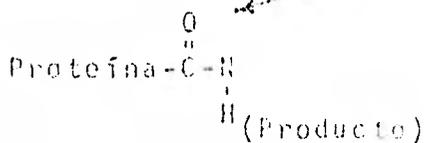
1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4)-etil)-carbodiimida 0-p-tolueno sulfonato



+



Hapteno-NH<sub>2</sub>



-H<sub>2</sub>O

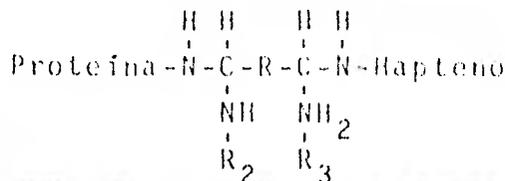
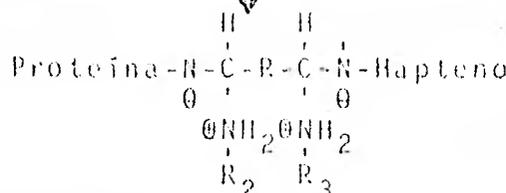
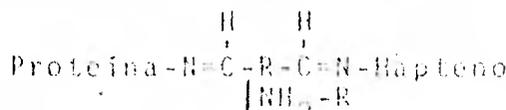


FIGURA 4.- Reacción de Conjugación por medio del Glutaraldehido o por la Carbodiimida.

Se presenta en la parte superior la reacción de la carbodiimida. Este reactivo necesita un grupo carboxilo y un grupo amino para que se lleve a cabo la reacción deseada. Existen dos tipos de carbodiimida una que posee un anillo cíclico, mientras que la otra es lineal. La primera reacción se lleva a cabo entre el grupo carboxilo de la Proteína y la carbodiimida, resultando un producto intermedio, la reacción continua al agregar el hapteno  $-NH_2$  que se observa a la izquierda de la figura. La carbodiimida además de la reacción principal, da otra reacción colateral produciendo como producto el N - protein - substituido urea (Khorana - 1953).

En la parte inferior se muestra la reacción del glutaraldehido, la reacción se lleva a cabo por medio de los grupos amino. Una vez formada la base de Schiff, puede ser condensado otro grupo amino, como se muestra en la figura.

con los grupos amino. El glutaraldehido puede reaccionar con otros grupos, por ejemplo el hidroxil o el fenol, pero la reacción principal se realiza con el grupo amino (Habeeb e Hiramoto 1968). Se ha observado que la primera etapa de la reacción del glutaraldehido, envuelve la formación de un aminometilol, resultante de la interacción del grupo amino libre del hapteno con el grupo aldehido del reactivo bifuncional, dicho grupo resultante puede condensar con otro grupo amino libre (figura 4) (Fraenkel-Conrat y Olcott 1948a, b, Fraenkel-Conrat y Mecham 1949, Habeeb e Hiramoto 1948). Los conjugados resultantes de la unión por medio del glutaraldehido poseen una orientación, la que es fácilmente predecible, donde todos los haptenos estan unidos por su extremo amino, quedando de ésta forma el extremo carboxilo expuesto al exterior, posibilita la identificación por anticuerpo. En ambos tipos de reacción se formaran además de los productos deseados, productos colaterales, como es la formación de uniones entre los haptenos mismos o entre la proteína acarreadora, o productos colaterales como los derivados de urea que produce la carbodiimida.

De los agentes acoplantes referidos anteriormente, el glutaraldehido posee una ventaja sobre la carbodiimida, ésta es, que la reacción principal es llevada a cabo por medio de los grupos amino, tanto de la proteína acarreadora como del hapteno, por lo que da seguridad por medio de los grupos que reaccionan, y de ésta forma determina la orientación del hapteno con respecto a la molécula acarreadora. Para las Enc, es de importancia determinar la orientación del hapteno, puesto que si el hapteno se encuentra unido a la molécula acarreadora por medio de su grupo amino, expo

ne el extremo carboxilo a los Ac, que es la región por la que se diferencian las Enc; en caso contrario, si la unión se realiza por el extremo carboxilo, el reconocimiento inmunológico se realizará por la región semejante a ambas Enc. En el primer caso se podrán producir sueros que diferencien a ambas Enc, mientras que en el segundo caso el suero reconocerá en alto grado a ambas Enc. Se obtiene la orientación deseada en el caso de que la unión se forme por acción del glutaraldehido que une al hapteno por medio de su grupo amino libre, mientras que la carbodiimida puede realizar la unión tanto por su extremo carboxilo como por su grupo amino.

El glutaraldehido trae asociado la formación de polímeros, además de productos de oxidación del mismo, formando el ácido respectivo, reduciendo de ésta forma la eficiencia de la reacción deseada. Una solución a éste problema, es la purificación del reactivo bifuncional, mientras que la otra alternativa, es el incremento en el tiempo de incubación y/o la concentración de éste. La primera posibilidad es laboriosa, mientras que la posibilidad alterna tiene la ventaja de que los polímeros, así como el ácido en cuestión, no interfieren en la reacción deseada, siempre y cuando se amortigue el pH de la solución.

El resultado del procedimiento de conjugación puede ser estimado por varios métodos. Uno de los más utilizados, es la inclusión en la reacción de pequeñas cantidades de hapteno marcado radioactivamente, que facilita la detección entre los diversos productos obtenidos.

Por otra parte la pureza del inmunogeno es crítica. Las impurezas inducen la producción de anticuerpos, si son reconocidos como extraños, y su interferencia en el ensayo, dependerá de su analogía con el inmunogeno de importancia. Si las impurezas son estructuralmente diferentes al Ag en cuestión y si dentro del ensayo no se encuentra una sustancia análoga, dicho contaminante no tendrá importancia dentro del procedimiento. Pero la existencia aunque sea en una pequeña cantidad de contaminante parcial o totalmente similar al Ag, interferirá en el ensayo, por la producción de Ac contra éstas sustancias análogas. Aunado a esto, si dentro del RIE existe un contaminante idéntico, podrá producir errores en la cuantificación de la muestra ensayada.

La respuesta inmunológica a una determinada sustancia extraña, a pesar que tenga ésta un peso molecular alto, es con frecuencia baja. Con el fin de incrementar la respuesta del organismo, el inmunogeno es administrado conjuntamente con un adyuvante. El adyuvante parece actuar como un estimulante inespecífico hacia los linfocitos, causando una reacción contra el cuerpo extraño, produciendo un granuloma. Por otra parte el adyuvante tiene otro efecto, que es la de prolongar la vida del inmunogeno, aumentando el período de exposición a los linfocitos. Un adyuvante que ha sido utilizado en forma rutinaria, es el adyuvante de Freund, formado por un aceite mineral con o sin micobacteria o bacilos inactivos, que conjuntamente con el inmunogeno que se encuentra disuelto en solución salina, se emulsifica para la realización de la inmunización.

La cantidad de emulsión inoculada es variable según el inmunogeno en cuestión, la tendencia es a inocular dosis bajas de Ag. Tradicionalmente se inocula una dosis de 1 mg de inmunogeno por Kg de peso, pero tales cantidades si se dan en forma repetida pueden producir un fenómeno de tolerancia y así anular la respuesta del animal. Las dosis de inmunogeno en el orden de 10 ug a 100 ug/Kg pueden producir altos títulos (Vaitukaitis et al 1977). La utilización de dosis bajas de inmunogeno, pueden producir anticuerpos con una alta afinidad (Smith et al 1964, Vaitukaitis et al 1977, Vaitukaitis 1981). La condición para que se obtenga una respuesta inmune, es que el inmunogeno se encuentre en presencia de los linfocitos, si las cantidades de inmunogeno son bajas, ésto inducirá receptores en los linfocitos que tengan una alta afinidad por el inmunogeno en cuestión y de ahí que los Ac posean la misma afinidad. (Siskind y Benaceraf 1969, Stevenson et al 1975).

La vía más común de administración del inmunogeno, es la subcutánea o la intradérmica. La respuesta inmune se ve incrementada, si la inoculación se realiza en varios sitios a la vez (Vaitukaitis et al 1977). Las diversas técnicas reportadas, incluyen la inoculación en la región esplénica e intraarticular, así como en los cojinetes de las patas. Esta última, se ha observado que no aumenta la respuesta inmune y sí, en cambio, produce una lesión. La inoculación en varios sitios simultáneamente sobre el dorso del animal por vía subcutánea o intradérmica, ha proporcionado buenos resultados, y ha llegado a ser muy popular.

Un vez realizada la inmunización, debe ser extraído el suero. El conejo entre otras especies, puede producir una cantidad sustancial de sangre, aproximadamente 20 ml semanales, por medio de un corte o punción en la vena marginal de la oreja. Si se desea obtener volúmenes mayores de sangre, se puede realizar una punción cardíaca en intervalos de pocas horas, si la sangre perdida es reemplazada por solución salina.

El Ac que se encuentra en el suero, es obtenido por centrifugación después de la coagulación de la sangre. Una cantidad extra se obtiene cuando se refrigera el volumen de sangre y se procede a realizar una centrifugación. El suero puede ser almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  por largos períodos, inclusive por años, teniéndose que en pocas ocasiones se obtiene un decremento en el contenido y actividad de los Ac. Para evitar el crecimiento de bacterias, se agrega un bacterioestático o bacteriolítico. También se puede liofilizar o diluir 1/1 con glicerol.

### 3.- Titulación de un Suero.

La primera etapa para caracterizar la calidad de un suero, es la obtención de su título. Las técnicas generalmente utilizadas en inmunología, como la precipitación en gel, o sistemas de aglutinación, no son adecuadas para probar los anticuerpos para el RIE, debido principalmente a la imprecisión para cuantificar éste parámetro. El título de un suero es determinado, realizando diluciones de un suero a los que se les agrega una pequeña cantidad de ligando marcado radioactivamente, que se mantiene constan-

te en todo el ensayo, incubandose a bajas temperaturas, para que posteriormente se separen la fase del ligando (Ag) libre del unido al receptor (Ac) (figura 5). Así es posible establecer las proporciones del Ag agregado que es unida por el Ac en distintas diluciones del suero en estudio. Por tanto el título se define arbitrariamente como la dilución y por ello la concentración de suero, que es capaz de unir el 50% del Ag marcado radioactivamente, en las condiciones de reacción usadas. Como se indica la unión de radioligando con el Ac depende de la ley de acción de masas y por ello de la concentración de reactivos y de la constante de afinidad.

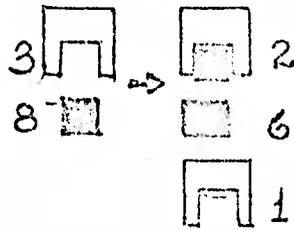
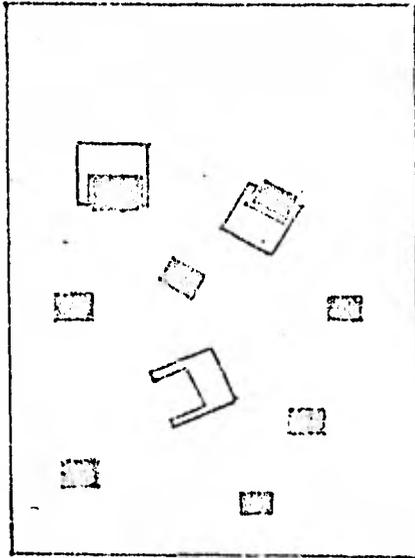
La función de la titulación es la de establecer cuales sueros merecen una futura investigación, para estudiar posteriormente su especificidad y afinidad por el Ag deseado, en función del RIE utilizado.

#### 4.- Radioinmunoensayo.

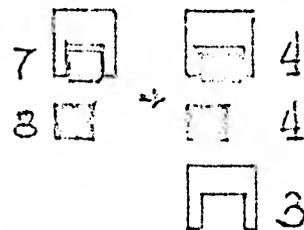
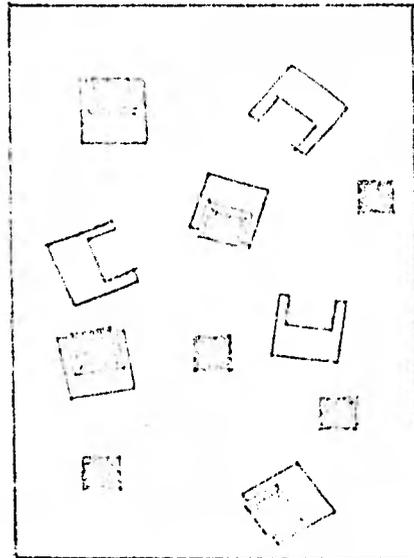
El radioinmunoensayo y las técnicas relacionadas, empezaron a desarrollarse hace 20 años en muy pocos laboratorios. En el transcurso de los años, ésta técnica ha sido ampliamente difundida y utilizada para la medición de innumerables moléculas y muchos campos de la ciencia, en particular la endocrinología, se vieron beneficiados por su desarrollo.

El término radioinmunoensayo (RIE), fué acuñado por Berson y Yalow (1961) para describir la técnica por ellos desarrollada,

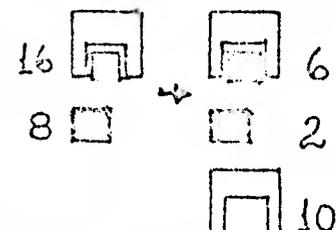
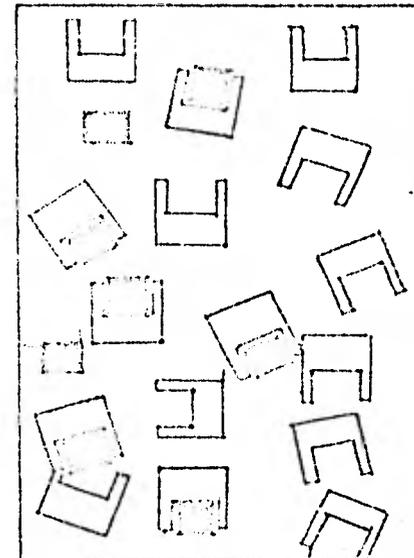
# TITULACION



U 25



U 50



U 75

 anticuerpo

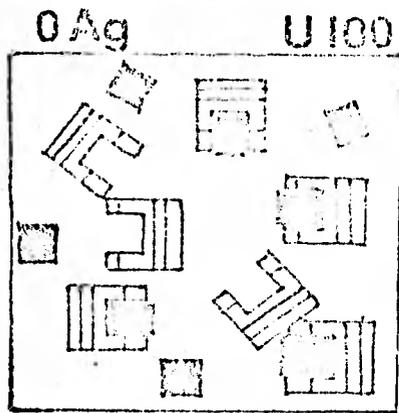
 antígeno radioactivo

FIGURA 5.- Principios de la Titulación.

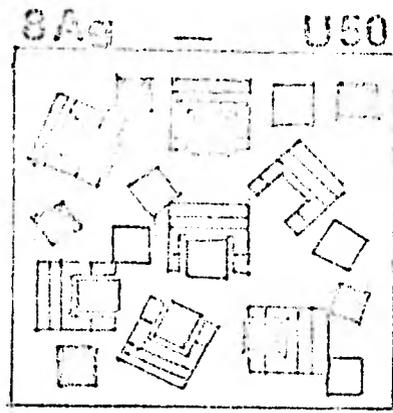
El título de un suero se determina realizando diluciones de un suero, al que se le agrega una cantidad constante de radioligando. Como se muestra en la figura de izquierda a derecha, tenemos un aumento en la cantidad de anticuerpo de un número de 3 a 6 y a 16, la cantidad de radioligando es constante, siendo éste de 8 moléculas. En la fase final en el primer caso encontramos la formación de dos complejos Ag-Ac, mientras que en el siguiente caso es de 4 y en el tercero de 6, de izquierda a derecha respectivamente: que equivalen al 25, 50 y 75 por ciento del trazador agregado que se encuentra unido específicamente.

que se basa en la competencia por los sitios de unión del Ac a una concentración constante, entre una cantidad constante de radioligando (ligando marcado radioactivamente) y cantidades variables de ligando sin ser marcado radioactivamente. Como se ilustra en la figura 6, cantidades crecientes de ligando frío, desplazan de los anticuerpos proporciones cada vez mayores del trazador. Cuando las cantidades de ligando frío son conocidas, es posible trazar una curva patrón, que relacione las proporciones de trazador unido con las cantidades de ligando frío que lo desplazan. Esta curva puede ser empleada para inferir la cantidad de ligando frío en una muestra problema, cuando se conoce el desplazamiento del trazador, que se produce al incubarse en el medio de reacción establecido.

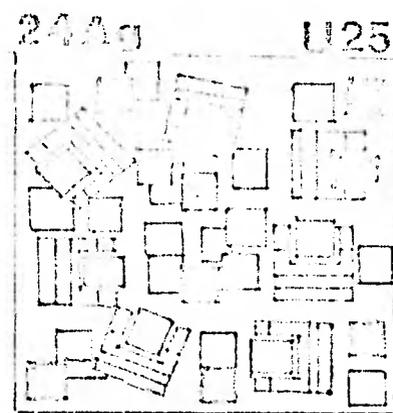
Existen dos tipos de RIE: el primero es un sistema competitivo entre el radioligando y el ligando por los sitios del receptor o Ac. Para éste caso, existen dos formas de establecer la competencia entre ambos tipos de ligando, aquel en que se realiza en equilibrio, cuando se agrega el ligando y el radioligando simultáneamente y son incubados bajo las mismas condiciones; o aquel en que se establece una competencia una vez que ha reaccionado el receptor con el ligando y se agrega en una etapa posterior al radioligando para entablar una competencia por los sitios de unión del Ac. En algunos casos éste último procedimiento, ha traído un aumento en la sensibilidad del RIE, puesto que éste procedimiento da una ventaja al ligando frío, haciendo que pequeñas cantidades de él puedan tener un efecto significativo desplazando al radioligando. El segundo tipo de RIE, es aquel en que no exis



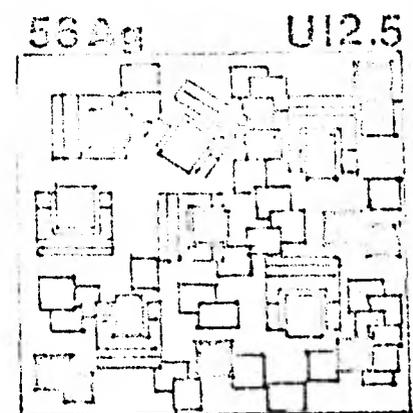
A



B

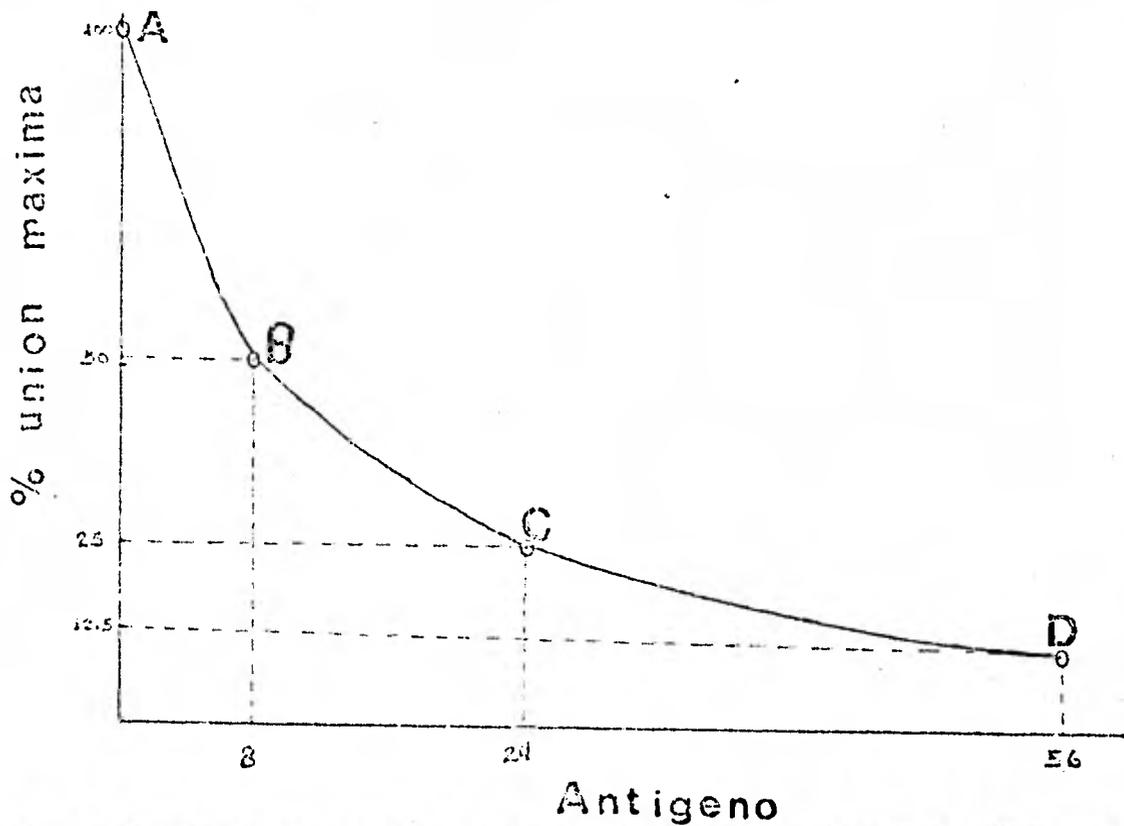
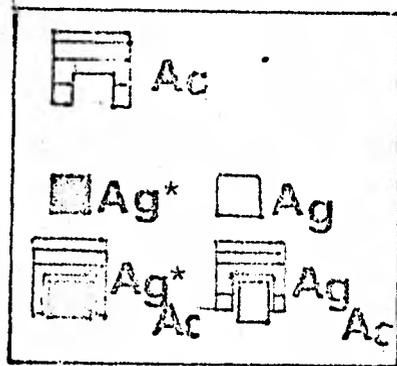


C



D

RADIOINMUNO-  
ENSAYO



## FIGURA 6.- Principios del Radioinmunoensayo.

En la parte superior encontramos cuatro condiciones distintas, en que se conserva constante la cantidad de Anticuerpo (AC) y Antígeno marcado (Ag+), y la variable es la cantidad de Ag - frío. A) En el primer caso no hay Ag frío, por lo tanto los Ac - estarán unidos en su totalidad al Ag+ (100%), B) en el segundo - caso se agregan 8 Ag fríos que compiten con los 8 Ag, estableciendo que aproximadamente el 50% estará ocupado en un Ac por el Ag+ y el otro 50% se encontrará libre, C) en el tercer caso se agregan 24 Ag fríos, lo que significa que el 25% del Ag+ estará unido al Ac, mientras que el resto se encontrará libre 6 Ag+, D) en el cuarto caso se agregan 56 Ag fríos para competir con 8 Ag+, el resultado es que 12.5% del Ag+ estará unido al Ac permaneciendo libres 7 Ag+.

En la parte inferior se establece la curva correspondiente.

te una competencia entre el radioligando y el ligando, generalmente se utilizan dos Ac, uno de ellos marcado radioactivamente. Ambos tipos de receptores se diferencian por el reconocimiento al determinante antigénico, teniendo el ligando dos sitios de reconocimiento distintos, uno para cada Ac. Este método es útil, cuando el ligando es difícil de marcar radioactivamente. El procedimiento se inicia incubando el anticuerpo marcado radioactivamente con la muestra deseada. En una etapa posterior, se agrega el segundo Ac que se encontrará unido a una matriz insoluble. Se lava la matriz, extrayendo el receptor marcado que no se haya unido, - la cantidad de receptor radioactivo en la fase unida es proporcional a la cantidad de ligando presente.

#### 5.- Métodos de Separación del Ligando Libre del Unido al Anticuerpo.

Cuando el principio fundamental en que se basa el RIE es la competencia entre el ligando marcado y no marcado. La factibilidad de un RIE está fundada, en la posibilidad de separar el ligando unido del libre. Los métodos de separación utilizados para realizar éste procedimiento, dependen de las diferentes propiedades de los reactivos como es carga, tamaño, solubilidad, configuración en el espacio y adsorción entre otras. La mayoría de los métodos por adsorción generalmente remueven el ligando libre.

Un método de separación ideal, es aquel que no debe afectar la distribución de la radioactividad entre la forma libre del ligando de la unida al Ac. Las deficiencias en ésta parte son las

denominadas errores por mezcla.

Los métodos de separación pueden ser considerados en varias categorías:

-Métodos electroforeticos y cromatoelectroforeticos. La electroforesis en papel, ha sido un método importante en el RIE, desde su utilización en el RIE de Berson y Yalow para la insulina (Berson y Yalow 1961). En una simple electroforesis, la separación del Ag marcado que se encuentra en el complejo Ag-Ac, está determinada por la migración del campo eléctrico y en el caso de la hormona del crecimiento (Hunter y Greenwood 1964) se tiene, que la hormona libre migra hacia el ánodo, mientras que complejo Ac-hormona del crecimiento migra hacia el cátodo, la separación lleva varias horas. Otro tipo de separación electroforetica es cuando el soporte tiene una alta afinidad por el Ag reteniendolo, -- mientras que el complejo Ag-Ac es desplazado por el flujo hidrodinámico, la separación obtenida por el campo eléctrico es la necesaria para obtener una buena resolución. Se obtienen buenas resoluciones en aproximadamente 20 minutos. (Daughaday y Jacobs 1971).

Existe una desventaja practica en ésta metodología, la cual demanda tanto tiempo como espacio. Las separaciones con muy buenos resultados se llevan a cabo generalmente en cuartos fríos. Además para la determinación de la radioactividad, es necesario que la tira en donde se realizó la separación, sea cortada en forma integra y fraccionarla trae como consecuencia una pérdida de resolución. Por otra parte la capacidad en la mayoría de los ca-

so está limitada a un volumen no mayor de 200 ul.

-Filtración en Gel. Cuando el complejo Ag-Ac es de peso molecular mayor que el Ag Libre, es fácil separarlos en una columna de filtración por peso molecular. Este método ha sido usado y de forma rutinaria en el análisis de desplazamientos competitivos (Genuth et al 1965). Practicamente éste método no es de amplia difusión, debido principalmente al tiempo y espacio que consumen, puesto que la preparación de las columnas individuales además de la preparación de los eluyentes, requiere un trabajo que consume demasiado tiempo.

-Precipitación no específica del Ag-Ac. Se han propuesto técnicas para la separación de complejo Ag-Ac, como es el caso de la insulina, en el que se precipita el complejo Ac-insulina por medio del sulfito de sodio al 17% (Grodsky y Forsham 1960), aunque la separación de la insulina es satisfactoria, existe cierta cantidad de insulina libre que queda atrapada en la fase insoluble, y cambios ligeros en la precipitación alteran el grado de separación. Los reactivos más usados son el fosfato de amonio (Chard et al 1970), polietilen glicol (Gros et al 1978), etanol (Odell et al 1965), etc., ya que dentro de las proteínas las Ig son las menos solubles, son completamente precipitadas por estos reactivos a una concentración de 33% de sulfato de amonio, 70% de etanol y 15% de polietilen glicol. La mayoría de los péptidos pequeños permanecen en solución bajo dichas condiciones. La ventaja es que es un método rápido y no requiere incubaciones especiales. Los datos publicados no parecen ser confiables para un uso rutina

rio, además de que su separación carece de especificidad.

-Inmunoprecipitación. La precipitación del complejo Ag-Ac por un segundo Ac dirigido contra el primer receptor, dan un producto in soluble que puede ser fácilmente separado (Skom y Talgame 1958). Este es uno de los métodos de más amplio uso en la actualidad, de bido a la especificidad que significa en el empleo de un Ac, además de ser uno de los métodos que menor interferencia introduce en el ensayo.

-Adsorción al Ag libre. Muchos péptidos tienen una alta tendencia de ser adsorbidos a ciertos materiales sólidos, entre los materiales más usados se encuentra la celulosa, vidrio, silice, talco o el carbón entre otros. Dentro de las técnicas de mayor uso se encuentra la de separación del carbón activado, que fué descrito por primera vez para el ensayo de la vitamina B<sub>12</sub> (Miller -- 1957). El carbón activado es cubierto con dextrana, que actúa como una malla de filtración selectiva, permitiendo únicamente el paso a pequeñas moléculas que se encuentren libres en el medio (Herbert et al 1965). Se ha probado que otras moléculas como la albumina pueden hacer el mismo papel que la dextrana. Al mismo tiempo, la dextrana cumple la función de soporte, manteniendo en suspensión al carbón activado, facilitando de ésta forma el proce dimiento de adsorción. La proporción de carbón activado dextrana depende de las moléculas a separar, así como del volumen que debe ser agregado y el tiempo de incubación, que están determinados además de la especie molecular por la concentración en el ensayo. La mayor parte de los RIE utilizan una relación 10:1 de carbón ac

tivado dextrana de diferentes pesos moleculares según el caso. El tiempo en éste caso es de gran importancia, ya que el carbón activado actúa como un segundo receptor, entrando en competencia por el ligando con el Ac.

#### 6.- Condiciones y Factores que Intervienen en la Optimización de un RIE.

De la comprensión de los principios del RIE, resulta claro que en cualquiera de sus modalidades, se requiere que se optimicen las condiciones de la reacción para obtener la mayor sensibilidad, precisión y especificidad que se pueden conseguir del antisuero empleado. No está de más subrayar, que la concentración y sobre todo la afinidad y especificidad del Ac por el Ag, son las que establecen los límites a ésta optimización.

Cuando se obtiene un dato positivo en el RIE, se debe de tener la seguridad de que la sustancia en cuestión, es la misma que fué utilizada en la curva patrón, o ésta es una sustancia análoga. Existen algunas sustancias que pueden interaccionar con el Ac, ya sea que posean el mismo determinante antigénico o parte de él. Cuando se presenta el caso en que se tiene un determinante semejante, comunmente su constante de afinidad es diferente a la afinidad de la molécula original. Esta situación se analiza en gráficas de trazador unido contra la cantidad de ligando. Si se poseen determinantes antigénicos similares, se obtienen curvas paralelas. Cuando el paralelismo de las gráficas se pierde, ésta pérdida por si misma no es suficiente para demostrar la diferen-

cia entre los determinantes antigénicos, más bien indicaría diferentes determinantes estereoquímicos. Aún cuando se posean una - secuencia común entre el ligando de un extracto y la curva patrón, la estructura espacial implica una diferencia en su constante de afinidad (Ekins y Newman 1970).

Una experiencia común al trabajar con curvas del tipo - Scatchard, es la producción de curvas bifásicas (Rodbard y Catt - 1972, Ekins 1971). La heterogeneidad de los sitios de unión en - el Ac, parece ser universal, es de importancia recalcar que una - especie dominante es la que aparentemente se encuentra en los in - munoensayos (Darush 1962). La curva de dilución de muestras bio - lógicas pueden presentar curvas bifásicas o asimétricas que es - tan relacionadas a la presencia de una población heterogénea de - Ac en el suero en el RIE. La heterogeneidad de los Ac presentes en el suero, comunmente se debe a varios determinantes antigeni - cos en el inmunogeno. La presencia de poblaciones de Ac con dife - rente afinidad, puede traer problemas serios en la determinación de la cantidad de ligando en una muestra, sobre todo cuando la in - flexión se encuentra en la zona de mayor precisión del RIE.

La identidad del ligando en una muestra biológica, no puede ser establecida con certeza cuando se utiliza un sólo RIE, ya que las moléculas análogas a la deseada pueden interaccionar con el - Ac. El ensayo de la muestra en dos RIE que difieren en la especi - ficidad del suero por el antígeno, incrementa la posibilidad de - realizar una correcta determinación en la muestra probada. La com - binación de un RIE con un ensayo para receptor, puede ser erróneo

en una determinación, puesto que puede existir un factor indeterminado que interfiera en ambos ensayos (Takahashi et al 1979).

La sensibilidad está definida como la mínima cantidad de Ag sin marcar o ligando frío, que puede producir un desplazamiento significativo del Trazador o radioligando en un RIE (Midgley et al 1969). Esta definición implica que el RIE en contraste con la mayoría de los ensayos químicos, no involucran un valor blanco, - por ejemplo un cambio en la unión máxima del Ag marcado producto de otros factores que interfieren con los Ag competitivos. En la mayoría de los ensayos químicos, el valor blanco es usualmente in dependiente de la muestra ensayada y depende de los reactivos que afectan el ensayo. En el RIE, el valor blanco es: producto de - ciertos componentes de la muestra, que frecuentemente son descono- cidos y que pueden interferir en un ensayo en particular. Se han reportado varios reactivos que pueden dañar un ensayo, siendo es- to particular para cada uno de ellos, un ejemplo de ésto es el bi carbonato (Bayon sin publicar), así como medios de soporte usados en cromatografía, o residuos de solventes (Souza et al 1970).

Hay que tomar en cuenta que la sensibilidad del RIE es depen diente de varios factores: la constante de afinidad, la concentra- ción de radioligando y del anticuerpo así como a la temperatura a la que se lleve a cabo el ensayo (Ekins et al 1968).

En la mayoría de los casos no es necesario calcular la cons- tante de asociación de un suero, unicamente es necesario calcular la sensibilidad. Pero tal vez el mejor parámetro para comparar -

varios sueros sea la constante de asociación ( $K_a$ ), que describe la avidez que posee un receptor por su ligando.

Por otra parte es conveniente determinar la precisión de un ensayo, o sea el grado de aproximación a un valor real, logrado a través de la realización de un RIE. La precisión de una técnica, es una de las características más importantes. En sus limitaciones intervienen los errores sistemáticos y accidentales (Meiner et al 1969). Al describir la capacidad de un ensayo, se usa el término sensibilidad y precisión, en forma vaga diciendo que el ensayo tiene una alta sensibilidad o alta precisión, siendo éstos términos muy relativos. La sensibilidad aumenta, conforme se pueda medir dosis más pequeñas. La precisión está en función del nivel a que sea tomado en el RIE, fluctuando ampliamente dentro de un ensayo. La precisión en un cierto valor, incrementa conforme los límites de error decrecen. Gradualmente ha llegado a ser universalmente aceptado que ambos, la pendiente y la dispersión en un punto, son los factores que determinan la sensibilidad y la precisión. La sensibilidad es un caso límite de la precisión; puesto que es la mínima cantidad diferenciable por el Ac; siendo éste valor la mínima dispersión al valor dado y esto está definido por las características del Ac y de las condiciones del ensayo.

#### 7.- Condiciones de Incubación y Optimización del Radioinmuno-ensayo.

La cantidad de radioligando que se agrega a un ensayo, es de

importancia en cuanto a la sensibilidad y precisión de éste. A -  
- éste respecto hay que tomar en cuenta dos consideraciones: una -  
- está relacionada a los problemas en la determinación de la radio-  
- actividad y otra el efecto de la concentración del radioligando -  
- en el ensayo. En primer lugar entre mayor sea la cantidad de ra-  
- dioligando, mejores serán los resultados obtenidos en la determi-  
- nación de la radioactividad. Pero por otro lado el aumento drás-  
- tico en la cantidad de radioligando, traerá como consecuencia una  
- disminución en la sensibilidad, aunque la exactitud en la determi-  
- nación de una muestra se vea aumentada. Para un ensayo se debe -  
- determinar la cantidad de radioligando, con base en la eficiencia  
- y errores en la determinación de la radioactividad, y a la sensi-  
- bilidad del ensayo. Una solución que conjunta un aumento tanto -  
- en la sensibilidad como en la precisión, es la de obtener radioli-  
- gandos de alta actividad específica, con ello se aumenta la canti-  
- dad total de ligando. Pero a diferencia de un radioligando marca-  
- do con  $^{125}\text{I}$ , que posee una mayor actividad específica, el ligando  
- marcado con tritio conserva la misma conducta química y biológica  
- que los compuestos fríos.

Por otra parte un factor que influencia la velocidad de la -  
- reacción, es la concentración de los reactivos, tanto del ligando  
- como del receptor. Por regla general las diluciones altas del -  
- Ac dan alta sensibilidad, mientras que las diluciones bajas aumen-  
- tan la precisión y el intervalo de trabajo, pero se obtienen bajas  
- sensibilidades. Por otro lado las diluciones altas del suero pro-  
- ducen un desplazamiento de los Ac de baja afinidad, extrayendolos  
- de la zona de trabajo.

Uno de los problemas más comunes cuando se utilizan pequeñas cantidades de reactivos, es la adsorción inespecífica a las paredes del material usado. Este problema acarrea innumerables errores en la determinación de muestras biológicas, la adición de proteínas que no interfieran en el ensayo, como es el caso de la albumina de suero humano (ASH) o de bovino (ASB) a concentraciones inferiores al 0.5%, previenen éste fenómeno (Ratjczak y Huhel - 1976, Kakuma et al 1979). Por otra parte la albumina previene el daño radiolítico y proteolítico de los compuestos en la mezcla de incubación. Las reacciones de proteolisis, así como otro tipo de reacciones adversas al ensayo, pueden ser minimizadas - llevando la reacción a bajas temperaturas. En términos prácticos, si el ensayo se lleva a cabo a 4°C, en incubaciones prolongadas, permitirá que la variación experimental en el tiempo de incubación, no sea un factor crítico en la precisión del ensayo.

El volumen de un ensayo es un factor determinante en la cantidad de reactivos a utilizar, para dar la concentración óptima para un ensayo. Entre más pequeño es el volumen de reacción, menor será la cantidad de reactivo para dar las concentraciones adecuadas. Existe una serie de factores que limitan el volumen mínimo de un ensayo, esto es el aumento en el error introducido al agregar cantidades muy pequeñas, así como el incremento en el error por mezcla en la etapa de separación. Por otra parte el volumen máximo está delimitado por la cantidad de reactivos a utilizar. Se han realizado ensayos con un volumen mínimo de 300  $\mu$ l. La utilidad de usar ensayos con volúmenes pequeños, es el aumento en la cantidad de ensayos, puesto que se dispone de una mayor can

tividad de suero para éste fin.

### III.- Procedimientos Experimentales.

#### A.- Síntesis y Purificación del Inmunogeno.

Debido a que las moléculas opioides son muy pequeñas, ya que consisten de cinco aminoácidos, por si mismas no son inmunogenos y se les tiene que unir covalentemente a una molécula de alto peso molecular como la albumina del suero bovino (ASB), que posee un peso molecular de 65,243 Daltons, y 60 residuos de Lisina, de los cuales unicamente 18 se encuentran expuestos en su estructura terciaria (Peters 1975, 1977), éstas últimas son de importancia, puesto que son por medio de las que se realiza el acoplamiento con las Enc. La ASB posee por si misma la capacidad de inmunogenicidad en los conejos, y por ello se logra estimular la respuesta inmune de éstos. La antigenicidad hacia la ASB ayuda a la atracción de los linfocitos que pueden interactuar con los haptenos que estan expuestos en su superficie. La ASB posee una serie de ventajas sobre otras moléculas de alto peso molecular, como es la alta pureza y facilidad con que puede ser obtenida. La alta pureza asegura que no se introduzcan contaminantes en el momento de la inmunización. El animal de experimentación producirá Ac dirigidos tanto hacia los haptenos unidos a ésta molécula, como a diferentes regiones de la ASB, estos últimos no interferirán en el ensayo ya que los determinantes antigénicos entre el hapteno (Enc) y la ASB son muy diferentes.

La unión covalente entre el hapteno y la molécula acarreadora se realizó por medio del glutaraldehido, reactivo bifuncional

que reacciona principalmente con los grupos amino, permitiendo así conseguir un inmunogeno en el cual las Enc estarán unidas por medio de su extremo amino a la ASB y exponen su extremo carboxilo, por el cual se diferencian ambas Enc, ya que éste puede ser leucina o bien metionina, favoreciendo de ésta forma la obtención de Ac específicos para cada Enc. Esta propiedad de proporcionar inmunogenos que pueden estimular la producción de Ac específicos para cada Enc, es la razón principal para escoger el glutaraldehido sobre la carbodiimida, siendo ésta última inespecífica para la producción de inmunogenos que produzcan Ac específicos para cada hapteno, pues se tendrán Ac que reconocerían el extremo carboxilo como otros que reconocerían el extremo amino.

En la tabla 1 se muestran los cálculos de las cantidades de reactivos, para la realización de conjugación entre la ASB y las Enc. Los cálculos están basados en la utilización de 1 mg de Leu-Enc o Met-Enc según el caso. La cantidad de Enc utilizada está basada en reportes publicados, en los cuales se ha obtenido buenos resultados, la cantidad de 1 mg de Enc está por debajo de los límites de tolerancia para péptidos. Tomando en cuenta la estequiometría de la reacción, se realizó el cálculo para la cantidad de ASB que tiene que ser agregada con base en los residuos de Lisina que posee ésta, suponiendo que todos los grupos amino de la Lisina se encuentran expuestos para reaccionar con el glutaraldehido y así unir a la Enc. Para más detalle sobre los cálculos de la cantidad de BSA se puede consultar la tabla 1 en la columna correspondiente. De forma semejante, se calculó los equivalentes de glutaraldehido necesarios para llevar a cabo la reac-

ción de acoplamiento, los cálculos se encuentran en la columna correspondiente de la tabla 1 tanto para la Leu-Enc como para la Met-Enc. Con base en los cálculos extraídos de la tabla 1, se obtiene que para 1 mg de Enc se requiere 2.024 mg de ASB para ser conjugada a la Leu-Enc, mientras que la cantidad de ASB para realizar la reacción con la Met-Enc es de 1.955 mg. Para la cantidad de glutaraldehído, considerando aproximadamente un exceso de seis veces sobre la cantidad de equivalencia, se tiene que se debe de agregar 20 ul. Para determinar el comportamiento de la reacción, se agregó una cantidad de 100,000 dpm que equivalen a 3.9 a 4.0 ng de Enc Tritiada.

La formación del conjugado se lleva a cabo a pH fisiológico, por éste motivo se determinó el poder de amortiguación de la solución utilizada como solvente, puesto que el pH de la solución de glutaraldehído es 3. Datos reportados en la literatura muestran que el amortiguador de fosfatos 0.1 M con pH 7.4 es capaz de mantener el pH adecuado. Realizando la prueba, se tiene que en 500 ul de éste amortiguador es capaz de mantener el pH agregando 15 ul de glutaraldehído al 25%. Procedimiento rutinario, para llevar a cabo la reacción de conjugación es la siguiente: la ASB se disuelve en un amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4, a una concentración de 4 mg/ml. Se toman 500 ul de ésta solución que se agregan a 1 mg de Enc según el caso, también se agregan 100,000 dpm de  $^3\text{H}$  Leu-Enc ó  $^3\text{H}$  Met-Enc en un volumen de 10 ul y se agita a temperatura ambiente hasta obtener una solución homogénea, previniendo la formación de espuma. A ésta mezcla se le agregan 20 ul de glutaraldehído al 5% y se agita la mezcla por 30 minutos

TABLA 1.-

CALCULOS PARA LA CONCENTRACION DE REACTIVOS PARA LA REACCION DE  
CONJUGACION

REACTIVO	Leu-Enc	ASB	Glutaraldehido
Peso Molecular	555	65,243	100.13
Cantidad: 1 mg Equivalente a 1.8 umoles.		Número de Lisinas: 58-60	Densidad (solu- ción al 25%) 1068.7 ug/ul
		Cantidad de Lis/ASB que reaccionan: 1.8 u mol	Cantidad de gluta- raldehido basado - en 1.8 umol de - Leu-Enc.
		Equivalentes de Lis ASB $65,243/58 = 1124$	$1.8 \text{ u mol} \times \frac{100.13 \text{ ug}}{\text{umol}}$ = 180.23 ug gluta- raldehido.
		Esto significa: $\frac{1124 \text{ gr Lis}}{\text{mol}} = \frac{1124 \text{ ug Lis}}{\text{u mol}}$	Corrección por den- sidad y dilución: $\frac{180.23 \text{ ug} \times 4}{1068.7 \text{ ug/ul}}$ = 0.674 ul
		Esto implica: $\frac{1124 \text{ ug}}{\text{umol}} \times 1.8 \text{ u mol}$ = 2024 ug	Utilizando una sol. de glutaraldehido al 5% 0.674 ul X 5 = = 3.37 ul
	Relación Leu-Enc ASB (P/p) 1 mg/2.02 mg = 1:2		Con 20 ul se tiene un exceso de: 20ul/3.37 ul = 5.93

TABLA 1.- (continuación)

CALCULOS PARA LA CONCENTRACION DE REACTIVOS PARA LA REACCION DE  
CONJUGACION.

REACTIVO	Met-Enc	ASB	Glutaraldehido
Peso Molecular	573	65,243	100.13
Cantidad 1 mg equivalen a 1.74 u mol		Número de Lisinas: 58-60	Densidad (solu- ción al 25%) 1068.7 ug/ul
		Cantidad de Lis/ASB para reaccionar 1.74 u moles	Cantidad de gluta- raldehido basado - en 1.74 u mol de Met-Enc
		Equivalentes de Lis ASB $65,243/58 = 1124$	$1.74 \text{ u mol} \times \frac{100.13 \text{ ug}}{\text{umol}}$ =1.74.22 ug gluta- raldehi- do
		Esto significa: $1124 \frac{\text{grLis}}{\text{mol}} = 1124 \frac{\text{ug Lis}}{\text{umol}}$	Corrección por den- sidad y dilución $\frac{174.22 \text{ ug} \times 4}{1068.7 \text{ ug/ul}}$ =0.6508
		Esto implica: $1124 \frac{\text{ugLis}}{\text{umol}} \times 1.74 \text{ umol} =$ =1955.7 ug	Utilizando una solu- ción de glutaralde- hido al 5% (0.6508)(5) = =3.25 ul
		Relación Met-Enc/ASB (%) 1mg/1955 mg =1:2	Agregando 20 ul se tiene un exceso de 20 ul/3.25 ul=6.47

a temperatura ambiente.

La mezcla de reacción es filtrada por una columna de separación por peso molecular, Bio-Gel P6, con una malla de 100 a 200, con una dimensión de 0.9 por 8 cm. La muestra es eluida con un amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4, con un flujo entre 120 y 180 ul/min, recolectando fracciones de 240 en tubos de polipropileno. Se determina la absorbancia de las fracciones colectadas a una longitud de onda de 280 nm en un espectrofotómetro Zeiz. La determinación de la absorbancia a 280 nm es necesaria debido a que ésta es la longitud de onda a la cual absorbe la Tir, que contiene tanto la ASB como la Enc. También se obtiene el cromatograma de la cantidad de radioactividad, el que se establece tomando una alícuota de 10 ul de cada fracción recolectada, a la que se agrega 5 ml de líquido de centelleo, con la siguiente composición: 2,5-Difeniloxazole (PPO), 3 gr; Triton X 100, 257 ml; Etilenglicol, 37 ml; Etanol, 106 ml y Xileno, 600 ml.

Se observa que la mezcla de incubación que inicialmente es transparente, al poco tiempo se torna de un color amarillo marrón, que se encuentra presente en las fracciones que poseen el conjugado ASB-Enc.

Conforme pasa el tiempo, la eficiencia en la conjugación fué disminuyendo. Este efecto es debido principalmente al aumento del número de polímero y el ácido glutárico, derivados del glutaraldehído (Guillet y Gull 1972), los que no participan directamente en la reacción principal. Para mantener la eficiencia en la

reacción, se decidió cambiar las condiciones de incubación. Estas modificaciones se realizaron de la siguiente manera:

- 1) La cantidad de glutaraldehido se aumentó al doble, o sea un incremento de 12 veces la cantidad de equivalencia.
- 2) El tiempo de incubación se incrementó a 45 minutos.
- 3) La cantidad de glutaraldehido se aumento a 22 veces sobre la equivalencia, y se incrementó el tiempo de incubación a 18 horas. El glutaraldehido fué agregado al 25% para evitar la dilución de la mezcla en una proporción de 15 ul para la Leu-Enc y de 14 ul para la Met-Enc.

La eficiencia de la reacción para ambas Enc se mantuvo constante en las condiciones 1 y 2; con éste cambio se esperaba un aumento en la eficiencia, pero éste no ocurrió, la eficiencia se mantuvo entre 25 y 35%. El cambio de procedimiento fué obligado debido a que meses después de realizar la reacción bajo el procedimiento del inciso 2 fracasó. Posiblemente el glutaraldehido contenía un alto índice de contaminantes, produciendo una disminución en la eficiencia de la reacción que era inferior al 5%. Este aumento en productos de oxidación y de polimerización del glutaraldehido, y sus efectos, es contrarrestado aumentando la cantidad del reactivo en cuestión y aunado al incremento en el tiempo de incubación, tal como se indica en el inciso 3. Los resultados bajo el último procedimiento alcanzaron la eficiencia que originalmente se obtenía.

## B.- Inmunización y Obtención del Suero.

La inmunización del conjugado ASB-Enc se realiza en conejos machos, de la raza New Zeland, con un peso mayor a 2.5 kg. Los animales previamente se aislaron durante 20 días, con el fin de llevar a cabo una selección, eliminando a los animales enfermos, y para que aumentaran de peso aquellos que posteriormente se utilizarían.

La primera etapa una vez seleccionados los animales, es la obtención del suero preinmune. Este se obtiene, por medio de corte en la vena marginal de la oreja del conejo, que previamente se rasuró y se limpio. Para la producción de una vaso dilatación, antes del corte se aplica Xileno, limpiando el exceso de éste, antes de realizar el corte para evitar la hemólisis. Se recolectan 20 ml de sangre en tubos de poliestireno para centrifugar, esperando por 30 minutos a temperatura ambiente la formación del coágulo. Posteriormente con una espátula, se despega el coágulo de las paredes del tubo y se refrigera durante 24 horas para que ocurra la contracción de éste. Posteriormente se centrifuga a --- 1,000 g durante 30 minutos a 5°C, decantando el sobrenadante, que es la fracción que contiene el suero. Mientras tanto al conejo se le aplica grasa como vaselina, en el lugar del corte, una vez que haya parado la hemorragia.

Los animales fueron separados en dos grupos iguales, uno que sería inoculado con Leu-Enc, mientras que el otro se inoculará con Met-Enc. Cada grupo consistió en 4 animales, dos de los cuales se

les administraría una única inmunización, a los otros se les darían inmunizaciones de refuerzo mensuales. Las posibles diferencias o ventajas existentes entre ambos métodos de inoculación, no podrán ser probados estadísticamente, debido al número reducido de individuos, además de la existencia de la variabilidad biológica entre los diferentes sujetos.

La cantidad de Enc inoculada por animal, se encuentra en función a la eficiencia de conjugación. La dosis escogida para la inoculación para ambas Enc, debe ser menor al valor de producción de tolerancia y por arriba de los valores mínimos a los que se pueden obtener de un suero altamente específico (Siskind y Benaceraf 1969). Se ha reportado en la literatura, inoculaciones con diferentes conjugados de Enc, entre el que se encuentra el realizado por Gros y col. (1978), que inoculara 1.5 mg de conjugado de ovoalbumina Enc. Tomando como referencia éste y otros valores semejantes, se determinó con base en el porcentaje de conjugación y los valores antes discutidos, inocular 1 mg de conjugado de ASB-Enc, el que es emulsificado con adyuvante de Freund completo en proporción de 1:1 en un volumen total mínimo de 1 ml, se procede a emulsificar en un Ultra Turrax hasta que al poner una pequeña gota de emulsificado en un baño agua-hielo permanece intacta. El procedimiento de emulsificación se realiza inmediatamente antes de su uso. La inoculación se realiza por vía intradérmica en el dorso del animal, que previamente fué rasurado y desinfectado, la inoculación se realiza en varios sitios para aumentar la superficie de exposición del inmunogeno, el número de sitios varía entre 20 y 30, con un volumen aproximado de 50  $\mu$ l (Vaitukaitis et al -

1977). La inoculación de refuerzo se reaaliza bajo el mismo procedimiento, pero con una dosis de 0.5 mg del conjugado de ASB-Enc, siendo semejante a los datos publicados. Una vez terminada la inoculación del inmunogeno, se recubre la zona con grasa como la vaselina, para evitar subsecuentes infecciones en los sitios de la inmunización.

Los animales con inoculación única, se sangran cada 30 días, mientras que los que se inmunizaron con inoculaciones de refuerzo, se sangran 15 días después de cada inoculación. La forma de obtención del suero, es la ya descrita, pero con una pequeña modificación en cuanto al tiempo de refrigeración, disminuyendo éste a 2 horas. Además se trató de reducir al mínimo el uso de Xileno, para evitar la hemólisis.

En los casos en que el título disminuyó, los animales recibieron una inoculación de refuerzo por vía intramuscular, con una dosis de 0.5 mg de conjugado ASB-Enc, sin ser emulsificada con adyuvante. Este tipo de refuerzo tiene el objeto de proporcionar una mayor exposición del inmunogeno y que éste circule por todo el cuerpo, y así de ésta forma activar de una manera más rápida las células de memoria. En la tabla 2 se encuentra especificados los protocolos de inmunización así como de sangrado.

Existe un método alternativo para sangrar a los animales, éste es la punción cardíaca. El preferir la obtención de la sangre por medio del corte en la vena marginal, radica unicamente en la seguridad del animal; puesto que sí bien, se corre el riesgo por medio de ésta técnica, de contaminar el suero con partículas exis

tentes en la piel del animal, se tomó la precaución de limpiar perfectamente la zona en cuestión.

TABLA 2.-

## INMUNIZACION Y OBTENCION DEL SUERO.

Conejo

- muertos en período de cuarentena -  
C2, C3, C5, C9.

	C 4	C 8	C 15	C 16
Leu-Enc				
Protocolo de Inmunización	.inoculación única	.inoculación única	.inoculación múltiple - refuerzo mensual	.inoculación múltiple - refuerzo mensual
	.sangrado a los 30, 45 y 60 días	.sangrado a los 30, 45 y 60 días		
	.sangrado c/30 días	.sangrado c/30 días	.sangrado 15 días desp. refuerzo	.sangrado 15 días desp. refuerzo
	.refuerzo intramuscular 207, 223 - días	.refuerzo intramuscular 207, 223 - días	.cambio de antígeno Leu-Enc Met-Enc 153 días	.refuerzo intramuscular 153, 168 días
	.sangrado 7 días post. a la inoculación	.sangrado 7 días post. a la inoculación	.sangrado 7 días post. a la inoculación	.sangrado 7 días post. a la inoculación
Título máximo (%B <sub>E</sub> ), cualquier dilución	20	41	0	22
Met-Enc				
Protocolo de Inmunización	.inoculación única	.inoculación única	.inoculación múltiple - refuerzo mensual	.inoculación múltiple refuerzo mensual
	.sangrado c/30 días	.sangrado c/30 días	.sangrado 15 días después del refuerzo	.sangrado 15 días después del refuerzo
	.refuerzo intramuscular 207, 223 - días	.refuerzo intramuscular 207, 223 días	.cambio de antígeno Met-Enc Leu-Enc 153 días	.refuerzo intramuscular 153, 168 días
	.sangrado 7 días post. a la inmunización	.sangrado 7 días post. a la inmunización	.sangrado 7 días post. a la inmunización	.sangrado 7 días post. a la inmunización
Título máximo (%B <sub>E</sub> ) cualquier dilución	0	10	0	36

## TABLA 2.- Protocolo de Inmunización y Obtención del Suero.

Se puede apreciar los dos tipos de inoculación realizados, una inoculación única de 1 mg de conjugado y el segundo método - el de inoculaciones múltiples con una inmunización inicial de 1 mg de conjugado, mientras que los refuerzos se realizaron con la mitad de la dosis original. Ambas inoculaciones se realizaron con Adyuvante de Freund completo (v/v). También se muestra los refuerzos por vía intramuscular, una vez que el título del suero decayó. En ésta tabla se incluye también el protocolo de sangrado y los resultados del porcentaje del máximo título.

Los animales C15 y C13, fueron animales que se les cambio el antígeno. Estos animales no respondieron a la inmunización inicial y se procedió a inocularlos con el otro inmunogeno, así el que se inoculó originalmente con Leu-Enc se cambio por Met-Enc y viceversa. Estos animales no respondieron al cambio de antígeno.

## C.- Caracterización de los Sueros para Radioinmunoensayo.

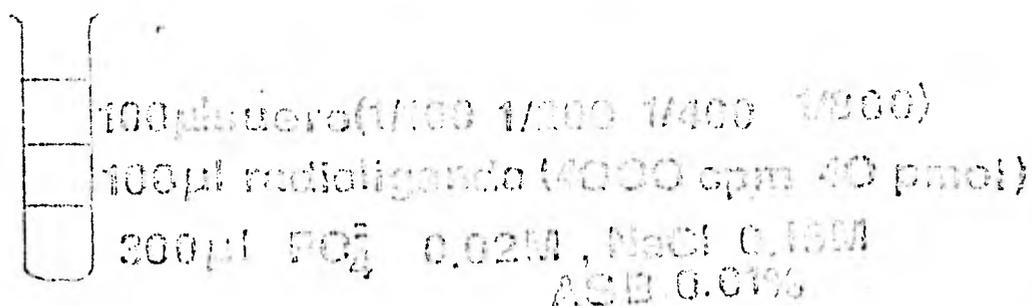
### 1.- Titulación.

El paso siguiente a la obtención del suero, es la determinación de su título. Para un suero se realizaron dos titulaciones, una inmediatamente después de su extracción y la otra conjuntamente con los demás sueros de un mismo animal.

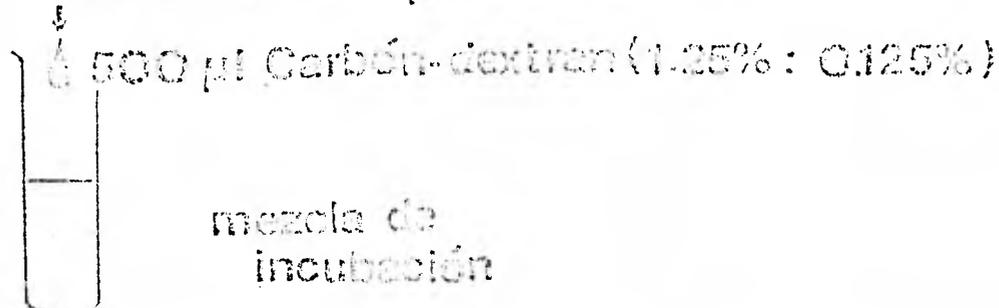
En la figura 7 se muestra el procedimiento seguido en una titulación. Se utiliza para el ensayo tubos de 12 por 75 mm de vidrio boro silicato, a los que se agrega 300 ul de amortiguador de fosfatos 0.02 M, haciendola isotónica con 0.15 M de NaCl, además con 0.1% de ASB. La capacidad amortiguadora probó ser suficiente para las muestras con pH de 6, con un volumen rutinario de 500 ul; mientras que la salina isotónica se agrega para aproximar a las condiciones fisiológicas de actividad del anticuerpo. La ASB se usó para prevenir fenómenos de adsorción inespecífica del radioligando (Ratajzak et al 1976 y Kakuma et al 1979).

A éste volumen se le agrega 100 ul de radioligando. El radioligando utilizado, se obtuvo de Amershem Inglaterra. La Leu-Enc (tirosil 3, 5 <sup>3</sup>H) Encefalina (5 L-Leucina), es obtenida para una racción de deshalogenación del derivado bromado por medio del tritio. Mientras que la Met-Enc (tirosil 3, 5 <sup>3</sup>H) Encefalina (5 L-Metionina) se obtiene por el mismo método que la Leu-Enc, pero se reduce antes de su purificación en cromatografía de alta presión. La actividad específica para la Leu-Enc varía entre 62 a 65 Curies/-

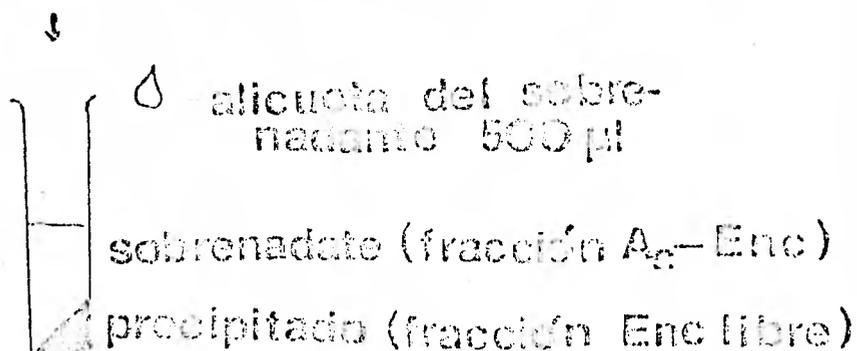
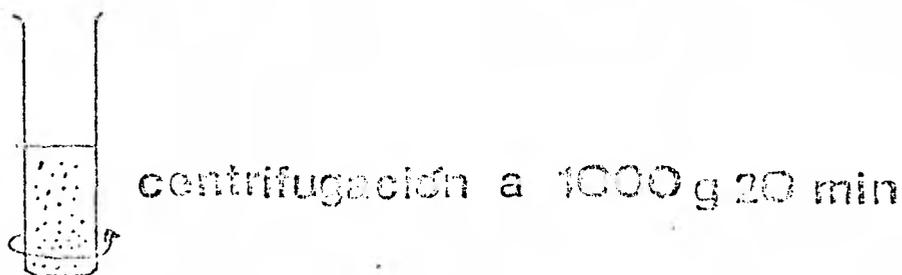
# Titración



↓  
incubación a 4°C por 24 hrs



↓  
incubación a 4°C , 30 min



## FIGURA 7.- Procedimiento de Titulación.

La figura muestra el procedimiento rutinario de titulación de los sueros obtenidos. Inicialmente se agregan 300 ul de amortiguador de fosfatos pH 7.4 y 0.15 M de NaCl. Posteriormente se decidió agregarle al medio de incubación 0.01% de albumina de suero bovino grado RIE, para impedir la adsorción inespecífica. A ésta cantidad se le agrega 100 ul de radioligando que contiene 4,000 cpm que equivalen aproximadamente a 40 pmol. inicialmente se diluía ésta fracción en agua, pero se observó que existía una adsorción a las paredes del recipiente que lo contenía, para evitar ésta unión no específica, se diluyó en el amortiguador de fosfatos que contenía 0.01% de albumina, probándose que el aumento de albumina no interfería con la titulación. Posteriormente se agregan 100 ul de suero diluido en medio de incubación a una dilución de 1/100, 1/200, 1/400 y 1/800, para dar las diluciones finales en el ensayo de 1/500, 1/1,000, 1/2,000 y 1/4,000. Se utiliza tanto el suero preinmune como el específico.

Se incuba por 24 horas a 4°C y posteriormente se le agrega 500 ul de carbón activado-dextrana, a una concentración de 1.25 y 0.125% respectivamente. Se deja incubar por 30 minutos a 4°C.

Posteriormente se centrifuga a 1,000 g durante 20 minutos. Del sobrenadante se toma una alícuota de 500 ul que se llevan a contar en un espectrofotómetro de centelleo líquido.

mmol, y para la Met-Enc es de 40 a 44 Curies/mmol. Ambos radioligandos se obtienen disueltos en amortiguador de fosfatos 0.02 M - pH 2.1 y en el caso de la Met-Enc además contiene 0.2% de mercaptoetanol. La cantidad de radioligando agregado a cada tubo es de 12,000 dpm, buscando con esto la mínima cantidad de trazador y la mejor precisión para ésta prueba.

Por último se agrega 100 ul del suero diluído en el medio de incubación, para dar una dilución final en el ensayo de 1/500, -- 1/1,000, 1/2,000 y 1/4,000, se agita la mezcla de incubación en vi bromezclador y se incuba durante 24 horas a 4°C. Los sueros utili zados aquí son tanto el suero preinmune como los específicos.

Posteriormente se procede a separar la fracción libre del radioligando, de la unida al anticuerpo; para ello se utilizó una - mezcla de carbón activado al 1.25% y de dextrana al 0.125% disuelto en un amortiguador de fosfatos 0.02 M, pH 7.4, y 0.15 M de NaCl. El carbón activado dextrana se disuelve en un amortiguador semejante al de la incubación, con la excepción de no contener ASB. Se - agrega 0.5 ml de carbón activado-dextrana a la mezcla de incubación agitándose en vibromezclador e incubándose por 30 minutos a 4°C. Después de los cuales se centrifuga a 1,000 g durante 20 minutos a 4°C.

Este tipo de prueba unicamente lleva dos controles, uno de - ellos es el trazador agregado (CTA), el cual lleva el medio de incubación 400 ul y 100 ul de radioligando, pero en lugar de agregar el carbón activado-dextrana, se agrega 500 ul de amortiguador de -

dilución de éste reactivo; otro control que se añade es el denominado de capacidad de precipitación del carbón-dextrana (CPC), que contiene 400 ul de medio de incubación y 100 ul de radioligando, - la fase de separación se agregará 500 ul de carbón activado dextrana. Estos se tratan de igual forma que el resto del ensayo.

Del sobrenadante que contiene el radioligando unido al anticuerpo, se tomo una alícuota de 500 ul, a la que se agrega 5 ml de líquido de centelleo, que fué descrito anteriormente. Se agita en un vibromezclador y se determina la radioactividad.

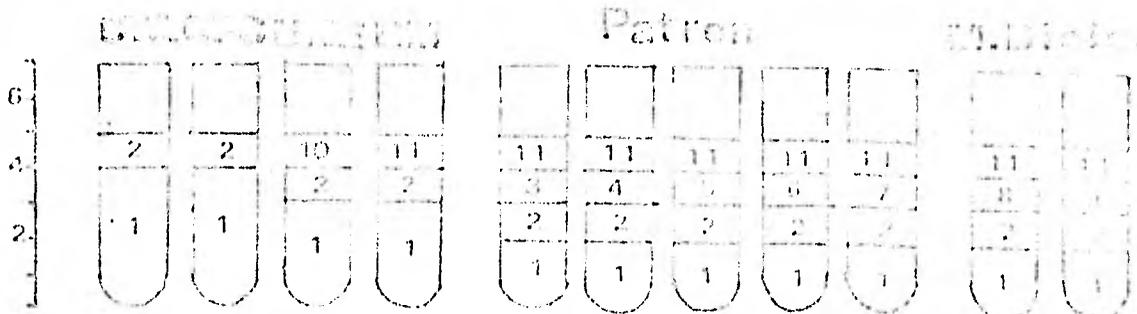
La utilización del carbón activado-dextrana para la separación del ligando libre, está justificada por su bajo costo en comparación a los demás métodos de separación, además de consumir un mínimo de tiempo y su fácil reproducibilidad.

## 2.- Radioinmunoensayo.

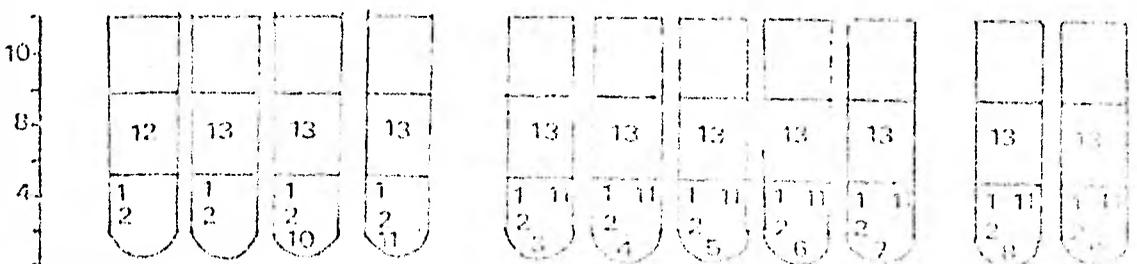
Una vez realizada la titulación, por medio de la cual se determina que sueros poseen la capacidad para ser sometidos a un estudio posterior, se debe desarrollar una curva patrón. La curva igual que los subsecuentes ensayos, se realiza en tubos de 12 por 75 mm de borosilicato. En la figura 8a se esquematiza el procedimiento para la realización de un RIE. Inicialmente se agregan a todos los tubos, 200 ul de medio de incubación, o sea un amortiguador de fosfatos 0.02 M pH 7.4, 0.15 M de NaCl y 0.01% ASB grado RIE. Posteriormente se agrega 100 ul de radioligando ya sea  $^3\text{H}$ -Leu-Enc ó  $^3\text{H}$  Met-Enc, el trazador se disuelve con medio de incubación agregando 12,000 dpm, que se mantendrá constante para todos los tubos. El tercer paso es agregar 100 ul de ligando frío, que competirá con el radioligando por los sitios de unión del Ac. Para este fin se emplearon las siguientes cantidades de Leu-Enc: - 20.93, 5.23, 1.30, 0.08 ng y para la Met-Enc: 45.58, 9.09, 2.74, 0.568, y 0.142 ng. Por último se añade el suero específico, agregándolo en alícuotas de 100 ul, a una dilución final en el ensayo de  $1/500$  y  $1/4,000$ . Los sueros utilizados para Leu-Enc son el C8 (45), C8(60) y C8(90), mientras que para la Met-Enc, se utilizaron el C14(75), C14(135) y C14(160). Tanto los sueros, como la dilución de éstos se escogió con base en las titulaciones.

Conjuntamente, se añaden a los tubos de la curva patrón el control de trazador agregado (CTA), que contiene 400 ul de medio de incubación y 100 ul de radioligando con 12,000 dpm; también es necesario saber la capacidad de precipitación del carbón activado

v o l u m e n ( X 10<sup>2</sup> μl)



INCUBACION: 30 hrs, 4°C



INCUBACION: 30 min, 4°C

CENTRIFUGACION: 5000 rpm, 5 min

0.5 ml ALICATORIO: 100 μl, 100 μl, 100 μl

DETERMINACION: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12

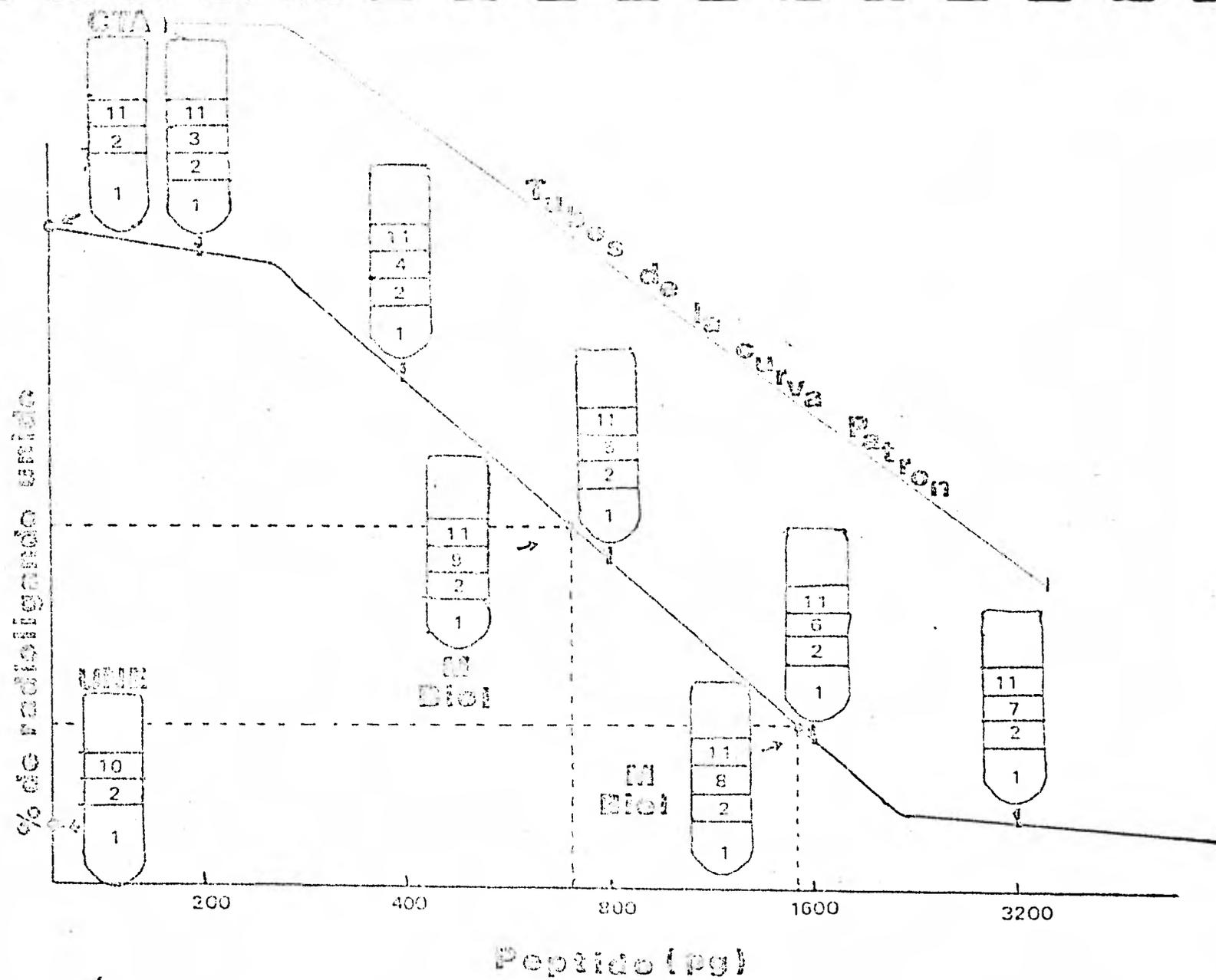
- 1 amortiguador: Fosfatos 0.01M, 1M, 10M 0.15, 0.3, 0.45
- 2 <sup>14</sup>C-Encelina 40 μmol, 200 μg
- 3 Enc 2.00 μg                      4 Enc 1.00 μg
- 4 Enc 1.00 μg                      5 Enc 0.50 μg
- 5 Enc 0.50 μg                      6 Enc 0.25 μg
- 6 Enc 0.25 μg                      7 Enc 0.125 μg
- 8 Enc 0.0625 μg
- 9 Enc 0.03125 μg
- 10 Enc 0.015625 μg
- 11 Enc 0.0078125 μg
- 12 Enc 0.00390625 μg

## FIGURA 8a.- Desarrollo del Radioinmunoensayo.

La figura 8a esquematiza el procedimiento rutinario para la realización de un RIE para ambas Enc. En el extremo izquierdo - se encuentra la escala de volumen en ul, que debe ser agregado - para cada reactivo. Se poseen 4 controles que son: CTA (Control del Trazador Agregado), CPC (Control de Precipitación del Carbón Activado Dextrana), UNE (Control de Unión no Específica) y UM - (Control de Unión Máxima), que acompañan a una curva patrón, de - la que unicamente se representan 5 puntos para ejemplificar a los tubos de muestra biológica(marcados como M. biolog.).

En la primera etapa se agrega el amortiguador de fosfatos - 0.02 M pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.01% ASB (reactivo 1), según se estipula en la escala para las diversas condiciones. En la segunda - etapa, se agrega 100 ul de radioligando con 4,000 cpm (reactivo 2). En el siguiente paso se añade unicamente a la curva estandar - 100 ul de ligando frío en diferentes cantidades ( 3 al 7), siendo un ejemplo y 100 ul de muestra biológica en dos diluciones a los tubos para ese objeto reactivo (8, 9). Posteriormente se agrega en la siguiente etapa, 100 ul de reactivo 10 (suero preimmune) - unicamente a UNE y 100 ul de reactivo 11 (suero específico) a todos los demás tubos que así se especifique. El suero preimmune y específico, serán agregados a la misma dilución. Posteriormente se procede a realizar una incubación durante 24 horas a 4°C, agitando previamente en un vibromezclador. Al término, se agrega 500 ul de reactivo 12 (amortiguador de fosfato pH 7.4, 0.15 M - NaCl) unicamente al CTA y 500 ul de reactivo 12 (carbón activado-

dextrana 1.25%; 0.125% respectivamente), se agitan en un vibromezclador y se incuban durante 30 minutos a 4°C. Se centrifuga a 1,000 g durante 20 minutos y se toma una alícuota de 500 ul del sobrenadante, a la que se agregará 5 ml de líquido de centelleo y se determina la cantidad de radioactividad.



Peptide (pg)

## FIGURA 8b.- Desarrollo del Radioinmunoensayo.

De los datos del ensayo, se procede a realizar los cálculos. En primer lugar se resta a todos los tubos la UNE, en la gráfica está representado con un valor basal. Los datos obtenidos en cada caso, se relacionan con la unión máxima (UM) tomándola como el 100%, (en la gráfica para simplificar no se muestra éste paso), - se extrae la curva patrón de los datos aportados por los tubos correspondientes, y se traza la curva que pase por estos puntos. Posteriormente el valor de unión de las muestras biológicas se le resta la unión no específica y se relaciona con la UM, expresada en porciento, éste valor se interpola en la curva y de ésta forma se obtiene la cantidad de encefalina para cada muestra. El esquema representa la cantidad y los reactivos que llevan cada uno de los tubos.

Abreviatura: CPC = Control de precipitación del carbón activado  
CTA = Control de Trazador Agregado  
Patrón = Tubos-patrón (curva patrón)  
M. biolog = Muestra biológica  
UM = Unión Máxima  
UNE = Unión no Específica.

dextrana (CPC), conteniendo 400 ul de medio de incubación y 100 ul de radioligando con 12,000 dpm. La diferencia existente entre CTA y CPC, consiste en la fase de separación. Además se utilizará un control de unión no específica (UNE), que contiene 300 ul de medio de incubación, 100 ul de radioligando con 12,000 dpm y 100 ul de suero preimmune a las diluciones especificadas anteriormente y por último, un control denominado unión máxima (UM), que lleva 300 ul de medio de incubación, 100 ul de radioligando con 12,000 dpm y 100 ul de cada uno de los sueros específicos, diluido para obtener una proporción final de  $1/500$  y  $1/4,000$ , hay que hacer notar que este control no contiene ligando frío para competir por el sitio de unión del Ac con el radioligando.

Una vez que se agregan los reactivos en el orden en que fueron descritos, y en forma simultanea a todos los tubos para impedir el efecto de bloque, se agitaron en un vibromezclador. En todo momento, el ensayo se lleva a cabo a 4°C, así como todos los reactivos se agregaron a esa temperatura. Posteriormente se incubaba la mezcla por 24 horas a 4°C.

Una vez terminada la incubación, se agregaran 500 ul de carbón activado dextrana (1.25%: 0.125% respectivamente) a todos los tubos, menos al CTA al que se le agregaran 500 ul de dilución. Se incubaba durante 30 minutos a 4°C, después de lo cual se centrifugará a 1,000 g durante 20 minutos. Se tomó una alícuota de 500 ul del sobrenadante, y se le determinó la cantidad de radioactividad.

Para determinar la cantidad de Enc en una muestra, se utiliza el suero adecuado, y se agrega 100 ul de muestra biológica a dos diluciones, sustituyendo ésta, a la cantidad de ligando frío conocido. Se acompaña a estos tubos, tanto con la curva patrón, como de los controles y se tratan de igual forma que éstos. Esto se ve ejemplificado en la figura 8a en que hay dos tubos como muestra del procedimiento.

El volumen de incubación, que se tomó para el desarrollo de ambos RIE, es de 500 ul, siendo éste el que permite una adecuada resolución para la separación del radioligando libre del unido, al ser llevado a 1,000 ul con la adición de la solución de carbón activado-dextrana. Por otra parte, es lo bastante reducido como para mantener bajo el gasto de suero, radioligando, y volumen de muestra, sin sacrificar la precisión del ensayo.

Un aumento en la cantidad de radioligando, traería un decremento en la sensibilidad, aunque se aumente la precisión, por éste motivo se tomó la cantidad mínima de radioligando que permita una adecuada precisión, sin un decremento drástico de la sensibilidad.

Además se determinó, la capacidad de amortiguación del medio de incubación. Su capacidad amortiguadora, probó ser suficiente para muestras, con un  $pH = 6$ , probadas en el volumen rutinario del ensayo. La salina, suele añadirse para aproximar las condiciones al estado fisiológico de actividad del Ac. La ASB se utiliza principalmente para prevenir la adsorción inespecífica.

### 3.- Procedimientos Especiales en el Radioinmunoensayo.

#### a.- Purificación del Radioligando.

Previamente al uso del radioligando en un ensayo, éste es purificado en cromatografía en placa fina. Se utilizaron placas de sílica gel con base de aluminio, las que traen incluidas en la matriz, una sustancia fluorescente a la exposición con la luz ultravioleta de longitud de onda larga. Al depositar una muestra sobre la placa, la posición de ésta se determina por la ausencia de fluorescencia, apareciendo una zona de color púrpura sobre un fondo verde fluorescente. Las placas usadas no se sometieron a ningún procedimiento previo a su uso.

Para purificar una muestra, se utilizaron placas de 17 cm de largo, cortadas en carriles de 1 cm de ancho, y poniendo la muestra a 2 cm de altura de la base, quedando de ésta forma, 15 cm de longitud para la separación de los compuestos que acompañan a las Enc. Se utilizó inicialmente una longitud de 10 cm para la separación pero resultó que el poder de resolución era muy pobre. Conjuntamente se corre un carril con una muestra de Enc, ya sea -Leu-Enc o Met-Enc según sea el caso, que servirá de referencia. El líquido de elución utilizado es monofásico, consistiendo en la mezcla de Cloroformo, Metanol, Agua, Acido Acético en una proporción de 15: 10: 2: 3 según el reporte de Malfroy et al (1978). Existen una gran cantidad de líquidos de elución para la separación de péptidos opioides (Malfroy et al 1978), pero el que se decidió utilizar, es el que permite la separación de diversos pro-

ductos de degradación de las Enc por ejemplo productos radioactivos y por otra parte separa un producto de oxidación el sulfóxido de la Met-Enc. La cámara de cromatografía se sella y se satura cuando menos 1 hora previa a su uso, utilizando un volumen de medio de elución, suficiente para cubrir 1 cm de altura de la cámara.

La muestra a purificar, es colocada sobre la placa con una microjeringa en el centro del carril y con un volumen de 2  $\mu$ l secando a continuación, con aire tibio, se repite el procedimiento hasta completar el volumen deseado. La muestra de Enc patrón aplicada es de 15  $\mu$ g, tomada de una solución de 1 mg/ml, puesto que la mínima cantidad de pentapéptido que es capaz de producir la ausencia de la fluorescencia, es de 10  $\mu$ g. El poder de resolución de la placa, no permite la observación directa de las muestras de Enc tritiada, puesto que la cantidad de ésta es inferior al límite de resolución.

Antes de iniciar la purificación, y una vez puestas las muestras en la placa, ésta es observada bajo la luz ultravioleta; con el fin de determinar la posición de las muestras de Enc fría, en caso de la Met-Enc tritiada que contiene mercaptoetanol, se observa ausencia de la fluorescencia.

La placa se corre durante aproximadamente dos horas, que es el tiempo que toma al frente de corrimiento para alcanzar 14.5 cm de altura. Una vez terminada la purificación, es extraída la placa de la cámara y se coloca en una posición horizontal, marcando -

cuidadosamente el frente de corrimiento y se espera que se seque a temperatura ambiente.

Nuevamente se observa bajo la luz ultravioleta, determinando con exactitud el frente de corrimiento y la posición de las muestras de referencia. La posición de la Enc de referencia, es determinada por la ausencia de la fluorescencia en la placa, la posición de la muestra, tomando su desplazamiento desde el origen, puede relacionarse con la distancia a la que se encuentra el frente de corrimiento desde el origen, a éste parámetro se le denomina índice de corrimiento. La determinación de la fracción de la Enc tritiada en estado puro, es obtenida relacionando el índice de corrimiento de la Enc de referencia, con distancia desde el origen del frente de corrimiento. El carril por el cual se purificó la muestra radioactiva, es cortado en porciones de medio centímetro y colocada en viales de polipropileno, se agita en un vibromezclador con 0.5 ml de agua, y una vez que el silice es separado de la base de aluminio, se agregan 0.5 ml de etanol (Gros et al 1978). El agua y el metanol no se adicionan simultáneamente, ya que el último entorpece el desprendimiento del silice de la placa. El etanol, además de ser un medio de extracción, actúa como un atrapador de radicales libres, impidiendo de ésta forma la producción de compuestos radiolíticos.

Debido a que las Enc se encuentran disueltas en un amortiguador de fosfatos 0.02 M, se estableció los límites de confiabilidad del método de purificación. Para éste fin se purificaron muestras de Enc bajo las siguientes condiciones: Una muestra de Leu-Enc -

fría disuelta en agua denominada muestra de referencia, una muestra de Leu-Enc disuelta en un amortiguador de fosfatos 0.02M, y otra muestra de Leu-Enc disuelta en un amortiguador de fosfatos 0.1M. De las muestras probadas, únicamente aquella que poseía un amortiguador de fosfatos en una concentración de 0.1 M, se encontró que las sales no interferían en la separación de los diversos productos, pero si en la observación directa de la placa bajo la luz ultravioleta, presentando un barrido que abarca de 6 a 8 cm posteriores al frente de corrimiento, impidiendo de ésta forma visualizar la región en donde se encuentra la muestra.

Uno de los problemas de usar moléculas radioactivas, es la descomposición de éstas. Existen varios modelos de descomposición radiolítica, los que pueden explicar de alguna forma los compuestos que acompaña a la Enc tritiada estos son: descomposición interna, debida a la emisión de radiación por el  $^3\text{H}$  de 12.2 años; aunado a esto se encuentra el efecto de la radiación  $\text{B}^-$  sobre las moléculas de Enc, para evitar este efecto, se trata de dispersar las moléculas radioactivas, y por ello se utiliza el volumen de 1 ml, por otra parte también es de importancia el impedir que las moléculas altamente reactivas, interaccionen con las Enc, estas moléculas pueden ser el producto de la radiación sobre otra molécula cercana, con éste fin se incluyen en la solución un atrapador de radicales libres como es el etanol, y por último para impedir la inestabilidad termodinámica de un compuesto y con ello la descomposición, se mantienen a bajas temperaturas.

b.- Coeficiente de Extinción Molar de las Encefalinas.

Es de importancia la obtención de el denominado coeficiente de extinción molar, que permite la determinación de la concentración de una solución de Enc. Para evitar problemas relacionados con el peso de pequeñas cantidades de Enc y de ésta forma introducir un error ya sea en el momento de pesarla, o por el estado de hidratación de las moléculas de Enc, se determinó éste parámetro. Este valor trae la ventaja de determinar la concentración de soluciones acuosas de Enc en las que se pudo evaporar parte del solvente.

Para este fin se seco una pequeña cantidad de Leu-Enc y otra de Met-Enc, y posteriormente se peso 1 mg de cada una de ellas, - en una microbalanza. Esta cantidad fué disuelta en 1 ml realizando la determinación de agua bidestilada. Se determinó la absorbancia a cada una de las muestras a 280 nm.

En la literatura se encuentra reportado el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) para la Tir, que es de 3.1498, pero la determinación de la concentración de las Enc en una solución, bajo éste valor, acarrearía varios errores, puesto que ésta molécula además del residuo de Tir, posee 4 más que interfieren la absorción. Los valores de los coeficientes de extinción molar para la Leu-Enc es de 3.1000 y para la Met-Enc es de 3.1152.

c.- Determinación de la concentración adecuada de carbón activado dextrana.

En la literatura se encuentra una gran cantidad de valores -

relacionados a la proporción entre el carbón activado (Norita A - de Sigma) con la dextrana que varía en peso molecular. Con el fin de determinar las características de precipitación, se probaron dos concentraciones: la primera con una relación de 2.5% a 0.25%, mientras que la segunda, con una relación de 1.25% a 0.125% de carbón activado-dextrana respectivamente.

Las pruebas se realizaron a las dos concentraciones de carbón activado-dextrana en titulaciones de diversos sueros de Leu-Enc y de Met-Enc sueros C8 y C14 entre los 0 y los 90 días, demostrando la existencia de una disminución en la unión específica, en la concentración más alta de carbón activado en comparación con la mitad de la concentración de carbón activado-dextrana. Con lo que respecta a la unión no específica, en el primer caso se observa una unión muy pobre, mientras que la unión no específica en el segundo caso es un poco más alta. El aumento en ambos tipos de unión, no es proporcional para ambas concentraciones de carbón activado-dextrana. Las pruebas realizadas muestran una ligera superioridad de la concentración baja de carbón activado-dextrana debido a la compensación entre ambos tipos de unión. Este ensayo no es una prueba definitiva, de que la cantidad usada de carbón activado-dextrana sea la más adecuada, sino más bien que bajo las condiciones probadas se tiene la seguridad que la cantidad de radioligando sin precipitar a altas concentraciones, se ven disminuidos por debajo del límite de seguridad, siendo la cantidad de radioligando libre que no es precipitado de 150 a 210 dpm que es la cantidad mínima, para que el carbón activado-dextrana no entre en competencia con el ligando unido al anticuerpo.

#### 4.- Pruebas Control.

Existen algunas pruebas que deben de ser realizadas, con el fin de averiguar las posibles interferencias en el RIE, una de ellas es verificar la interacción de algunos reactivos con la formación del complejo Ag-Ac. Estos reactivos pueden ser aquellos que se utilizan en la purificación del radioligando, como pueden ser residuos de la matriz de las placas, ó los líquidos de elución de las Enc, en especial el etanol, o por otra parte contaminantes de las Enc debido a productos radiolíticos que acompañan a la  $^3\text{H}$  Enc pura.

Para los ensayos se utilizaron sueros de título conocido -- agregandolos en alícuotas de 100 ul, y diluidos a concentración tal, que diera al final  $1/500$ ,  $1/1,000$ ,  $1/2,000$  y  $1/4,000$  a los que se agrega 100 ul de radioligando con 12,000 dpm y 200 ul de medio de incubación, consistente en un amortiguador de fosfatos 0.02 M, pH 7.4, 0.15 M NaCl.

Debido a que el radioligando es purificado en cromatografía en placa fina, existe la posibilidad de que la matriz de la placa interfiera con el ensayo, para probar ésta posibilidad se agregó al ensayo 100 ul de una solución madre, que es obtenida al disolver  $1\text{ cm}^2$  de placa de gel de sílice ó de gel de sílice con fluoruro en 1 ml de agua destilada. Un problema en esta prueba, es el de carecer de un radioligando de alta pureza, ya que los parámetros que serán probados, son aquellos que sirven para purificarla. Por éste motivo se utilizó un trazador sin purificar, y como

referencia del efecto del silice o del silice fluorescente, se utilizó un control al que se le agregó únicamente 100 ul de agua en lugar de la muestra de silice. Los resultados en caso de obtener un efecto positivo en ésta prueba, serían reportados como un decremento o aumento en la unión específica. Para este caso, la prueba fué negativa para ambas situaciones, teniendose que en ambos casos el silice o con silice fluorescente no interfieren en el ensayo.

También se probó el efecto del etanol sobre la formación del complejo antígeno-anticuerpo, debido a que éste reactivo es utilizado como un atrapador de radicales libres una vez purificado el radioligando. Se probó una concentración de 0.25% de etanol en el ensayo con el suero RB-92 donado por el Dr. Guillemin del Instituto Salk, dirigido contra la Leu-Enc. Los resultados de ésta prueba, fueron negativos, bajo las condiciones ensayadas. La cantidad de etanol que se probó, es superior a la cantidad que comúnmente se encontrará en el ensayo. Debido a que el radioligando puro, se encuentra disuelto en etanol al 50%, tomando de ésta fracción una alícuota teniendo como límite máximo 700 ul, con el fin de extraer únicamente la fase soluble en que se encuentran la  $^3\text{H}$  Enc, y de ésta forma no arrastrar parte del precipitado que es principalmente de silice, con éste valor nos da un contenido de 350 ul de etanol. La muestra es diluída, en forma rutinaria en volúmenes superiores de 30 ml considerese 100 ul por tubo, para un ensayo mínimo de 300 muestras, la cual nos da una concentración de 1.16% al ser disuelta en el amortiguador de incubación, o sea que por cada 100 ul de muestra que contenga radioligando se

le agregará 1.16 ul de etanol, considerando el volumen del ensayo de 500 ul, tendremos que la concentración de etanol es de 0.23%. Hay que tomar en cuenta que se está usando como caso extremo y que generalmente se extraen los 700 ul de muestra purificada, pero que el número de muestras en el RIE es muy superior a las 300 muestras, siendo generalmente de 500 a 600 muestras por ensayo, dando entonces que la concentración de etanol dentro del ensayo varia entre 0.11% y 0.14%.

Por último se probó el efecto del radioligando contaminante. El radioligando contaminante se define aquí, como productos radiolíticos de la Enc tritiada que no son reconocidos por el Ac correspondiente. La prueba se realizó con sueros de título conocidos, C8(45), C8(60) y C14(75). El radioligando contaminante es obtenido al realizar una purificación, y tomar los flancos de la muestra pura de Enc  $^3\text{H}$ . El ensayo se realiza en forma comparativa entre el radioligando puro y el contaminante. Los resultados obtenidos, muestran un decremento en la unión específica con el radioligando contaminante, así como un aumento tanto en la unión no específica como en el control de precipitación del carbón activado-dextrana. El fenómeno observado en éste caso es muy complejo, ya que un aumento excesivo en la cantidad de productos radiolíticos, traerá como consecuencia el incremento de estos en la fase soluble, que no son adsorbidos al carbón activado. Un aumento de ésta naturaleza, no trae aparejado un aumento proporcional en la unión no específica, introduciendo con ambos controles, errores en la determinación de las muestras. Los efectos de la muestra contaminante de radioligando, se observa claramente en las

primeras titulaciones que se realizaron con un radioligando sin -  
purificar, en las que se nota variaciones para el título de un -  
mismo suero pasando de un ensayo a otro, en que la cantidad de ra  
dioligando inmunologicamente reconocible era variable.

### 5.- Modelo Matemático.

La utilización de modelos matemáticos de la reacción Ag-Ac, tiene por objeto obtener ecuaciones que permitan, graficando los datos experimentales del radioligando unido, libre o la combinación de ambos, obtener parámetros de la reacción como es la constante de disociación ( $K_d$ ), capacidad del suero y pureza inmunológica del radioligando entre otros. Estos valores permiten una comparación más precisa entre los sueros obtenidos, que superan a los valores crudos de las titulaciones. Así mismo, se usan estos modelos para escoger los sueros que aseguren RIE más sensibles.

Las figuras 9 y 10, muestran la deducción matemática de un modelo para el análisis gráfico de los datos extraídos, tanto de las titulaciones como de las curvas patrón. La deducción matemática está basada en la Ley de acción de masas y es una modificación de la deducción matemática de Eadie (1942), Hofstee (1952) y Rosenthal (1967), estos análisis gráficos son similares y por ello se denominan comúnmente como gráficas del tipo Scatchard. Klotz y Hunston (1971), las introducen para el RIE, y fueron los mismos los que introducen las gráficas de doble recíproca.

Tanto para las deducciones matemáticas de la figura 9 como la de la 10, se basan en las siguientes suposiciones;

- 1) El antígeno o ligando, está presente en forma homogénea, consistiendo en una sola especie.
- 2) El anticuerpo o receptor, está presente en una sola especie química homogénea. No hay diferencia entre los distintos Ac de

Fig 9

$$K_d = \frac{[B]([A] + [B])}{[Ab][B]}$$

$$q_b [B] / q_f = \frac{1}{K_d} [T_t - T_b]$$

$$\frac{q_b [B] / q_f}{T_t} = \frac{1}{K_d} [T_t / T_t - T_b / T_t]$$

si  $q_b [B] / q_f = T_b = B$ ,  $B_0 = B / T_t$ ,  $q_f = q_t$

A pureza total del radioligando

$$T_t / T_t = 1 = B_{max}$$

$$\frac{B_0}{q} = \frac{1}{K_d} [B_{max} - B_0]$$

$$\frac{B_0}{q} = \frac{B_{max} - B_0}{K_d}$$

$$\frac{B_{max}}{K_d} = \frac{B_0}{q} + \frac{B_0}{K_d}$$

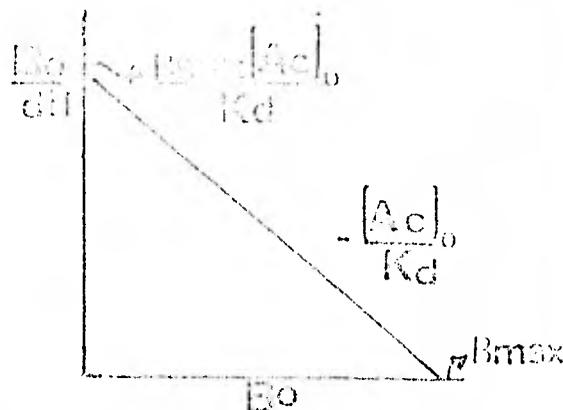
$$B_{max} = \frac{B_0 K_d + B_0}{K_d}$$

$$B_{max} = B_0 \left[ \frac{K_d + 1}{q} \right]$$

$$\frac{1}{B_0} = \frac{1}{B_{max}} \left[ \frac{K_d + 1}{q} \right]$$

$$\frac{1}{B_0} = \frac{K_d}{B_{max}} \frac{1}{q} + \frac{1}{B_{max}}$$

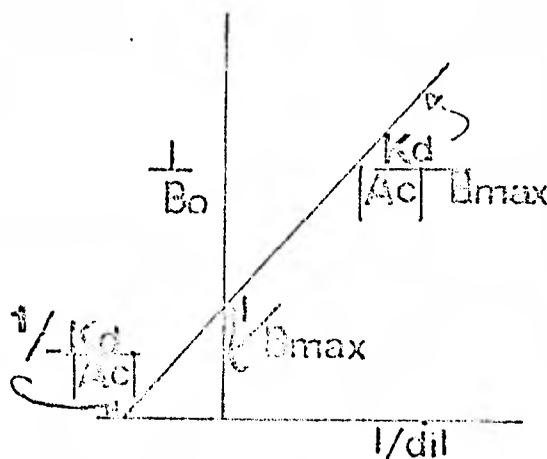
$$\frac{1}{B_0} = \frac{K_d}{B_{max} [Ac]_0 dil} + \frac{1}{B_{max}}$$



puesto que  $q = [Ac]_0 dil$

$$\frac{B_0}{[Ac]_0 dil} = \frac{1}{K_d} B_0 + \frac{B_{max}}{K_d}$$

$$\frac{B_0}{dil} = \frac{[Ac]_0}{K_d} B_0 + \frac{B_{max} [Ac]_0}{K_d}$$



$K_d$ : constante de disociación

$l$ : fracción libre  
 $b$ : fracción unida

$T_t$ : radioligando

$[Ac]_0$ : concentración de sitios activos del anticuerpo

$q = [Ac]_0 dil$   
 $dil$ : dilución del suero

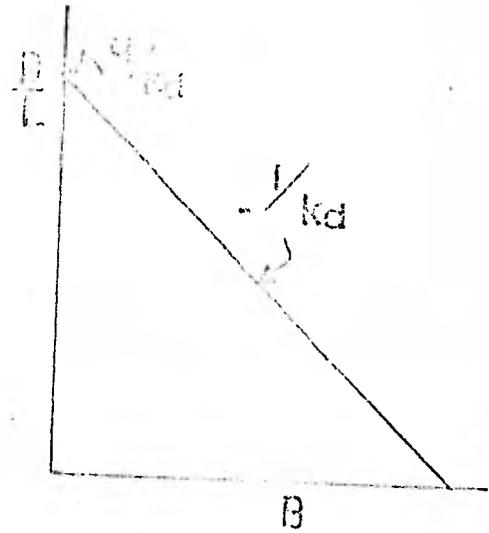
$B_{max}$ : pureza inmuno-  
logica del radioligando  
 $\frac{Ac}{K_d}$ : capacidad del suero

Fig 10

$$K_a = \frac{(q_t - T_L)}{(q_t - q_b) (T - T_L)}$$

$$\frac{B}{L} = K_a \quad q_t - B$$

$$\frac{B}{L} = K_a q_t - K_a B$$

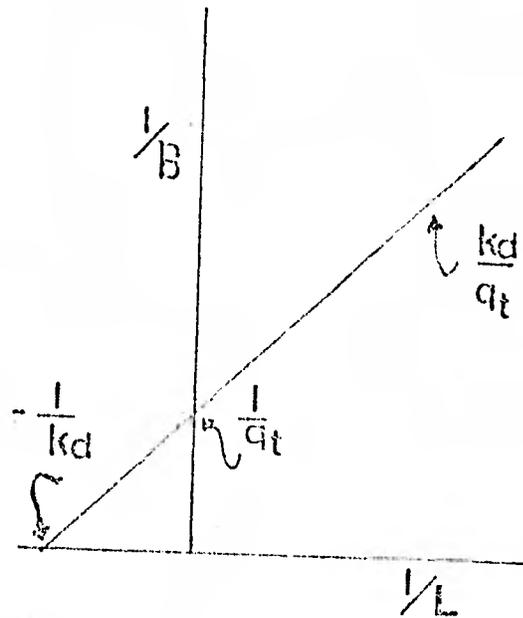


$$\frac{B}{L} = -\frac{1}{K_d} B + \frac{q_t}{K_d}$$

$$\frac{B}{L} = -\frac{B}{K_d} + \frac{q_t}{K_d}$$

$$\frac{q_t}{K_d} = \frac{B}{L} + \frac{B}{K_d}$$

$$\frac{1}{B} = \frac{K_d}{q_t} \frac{1}{L} + \frac{1}{q_t}$$



$$K_a = \frac{1}{K_d}$$

un mismo suero.

- 3) Tanto el antígeno como el anticuerpo son univalentes, ésto es, que el ligando puede interaccionar únicamente con una molécula de receptor y viceversa, sin que ocurran otras interacciones.
- 4) No existen efectos alostéricos, y la reacción sigue según la Ley de acción de masas, según el orden de la cinética química.
- 5) El ligando y el radioligando poseen las mismas propiedades fisicoquímicas.
- 6) El hápteno ya sea frío o marcado radioactivamente, reacciona con el receptor hasta que se alcance el equilibrio.
- 7) La forma libre de la unida al receptor del ligando ó radioligando, puede ser separada sin perturbar el equilibrio.
- 8) La proporción de radioligando unido del libre o del unido del total puede ser medido perfectamente.

De la figura 9, se puede extraer una serie de datos importantes. Este modelo fué diseñado principalmente para determinar la capacidad de los sueros, la que relaciona la concentración de sitios activos del suero entre la constante de disociación. Los datos de las titulaciones para un suero a varias diluciones en ensayos realizados simultáneamente, son vertidos en este modelo obteniendo en la parte superior de la figura, la deducción matemática para las gráficas del tipo Scatchard, en donde se tiene en las abscisas la fracción unida específicamente del radioligando, contra la fracción de radioligando unido específicamente, entre la dilución del suero. De éste tipo de gráfica se obtiene de la pendiente la capacidad del suero con signo negativo, el intercepto -

con la abscisa la cantidad de radioligando inmunológicamente reconocible. En la parte inferior de la figura 9, se encuentra la deducción para las gráficas del tipo de doble recíproca, en donde la abscisa representa las veces de dilución del suero, mientras que en la ordenada se tiene la inversa de la fracción unida específicamente. La pendiente es la capacidad del suero multiplicada por la pureza inmunológica, mientras que el intercepto con las ordenadas, se encuentra el inverso de la pureza inmunológica, y por otro lado el intercepto con las abscisas es el inverso de la capacidad con signo negativo.

En la figura 10 se encuentra la deducción matemática para la obtención de la constante de disociación. Este modelo está diseñado para vertir los datos de las curvas patrón y obtener éste parámetro. En la parte superior se encuentra la deducción matemática para la obtención de gráficas del tipo Scatchard, teniendo como abscisa la cantidad unida específicamente en pg y en la ordenada la cantidad unida específicamente entre la libre. En éste caso no se utilizan los datos en forma cruda ya que existen dos tipos de ligandos; el radioligando y el ligando frío, por éste motivo, se tiene que realizar una corrección por la actividad específica:

$$\frac{\text{Cantidad de radioactividad reconocible por el Ac}}{\text{pg de Enc fría} + \text{pg de Enc } ^3\text{H reconocible por el Ac}}$$

y posteriormente sacar la relación entre la cantidad unida expresada en cpm y la actividad específica, el resultado de esto nos proporciona la cantidad unida específicamente en pg, únicamente -

se debe de realizar la conversión a moles. Por otro lado la cantidad de ligando libre se obtiene entre la cantidad total de ligando agregado, radioligando y ligando frío, al que se restará la cantidad unida específicamente realizando todo éste procedimiento con datos expresados en  $\mu\text{g}$  ó moles. La constante de disociación, la obtendremos de la pendiente y estará expresada como menos el inverso de la constante de disociación; según los datos graficados puede obtenerse  $\mu\text{g}$  ó moles. El intercepto con la ordenada, nos dará la capacidad de los sueros en función de la dilución a la que se realizó el ensayo.

Hay que hacer notar que el modelo de la figura 9 sirve para extraer dos datos de importancia, la capacidad del suero y la pureza inmunológica; realizándose a una cantidad constante de  $\text{Ag}$ , variando el  $\text{Ac}$ , como ocurre en las titulaciones. Mientras que para la obtención de las constantes de disociación por medio de la figura 10, se realizan con cantidades variables de  $\text{Ag}$  a una cantidad fija del  $\text{Ac}$ .

## 6.- Optimización de las Condiciones de Incubación.

Debido a que se ha encontrado para diferentes RIE un beneficio en realizar los RIE en incubaciones diferenciales o fuera de equilibrio. Con el propósito de establecer las mejores condiciones de incubación que ofrezcan las mayores sensibilidades y porcentaje de unión específica.

La prueba se realizó con tres sueros para cada Enc. estableciendo que las diluciones finales de los sueros eran de 1/500 y de 1/4,000, agregados en alícuotas de 100 ul. Se utilizaron los siguientes sueros: para la Leu-Enc el C8(45), C8(60) y C8(90), mientras que para la Met-Enc se utilizó los sueros C14(75), C8(130) y C14(160).

La cantidad de radioligando agregada al ensayo es de 12,000 dpm manteniendo constante ésta cantidad durante todo el ensayo, agregandola en alícuotas de 100 ul. Para competir por los sitios del anticuerpo se agregó la siguiente cantidad de ligando: para Leu-Enc 20.93, 5.23, 1.30, 0.08 ng y para Met-Enc 45.58, 9.09, 2.74, 0.568 y 0.142 ng. Al ensayo se agregan los controles de CTA, CPC, UNE y UM, cada 96 muestras.

El ensayo en equilibrio se realizó con incubaciones a 24 y 48 horas a 4°C. Mientras que las que se realizaron fuera del equilibrio, se incubó inicialmente a 4°C con el ligando frío a 20 y 44 horas, tiempo en el cual se añade el radioligando y se incubaba por cuatro horas más a 4°C. Después de éste tiempo se separan

las fases del ligando libre del unido al anticuerpo, por medio del carbón activado-dextrana según los protocolos anteriores.

## 7.- Ensayo de Especificidad de los Sueros.

Una prueba importante en el ELI, es la determinación de la especificidad de los sueros, es decir qué sustancias son capaces de competir con la Enc, por el sitio activo del anticuerpo. Para ello se probaron moléculas opioides, como la Leu-Enc, Met-Enc,  $\alpha$  Endorfina, Tir-Gli-Gli y la Riotorfina (Tir-Arg). Que se agregaron en alícuotas de 100  $\mu$ l en un intervalo de valores que van de 6.25 pg a 13.107  $\mu$ g, para competir con  $^3\text{H}$  Met-Enc ó  $^3\text{H}$  Leu-Enc según el caso.

Para desarrollar este tipo de ensayo, se utilizaron dos sueros, uno de ellos de Leu-Enc el C8(60) y el otro de Met-Enc el C14(160), diluidos a una concentración final de  $1/1,500$ , agregándolos en alícuotas de 100  $\mu$ l. Igual que los casos anteriores se agrega 12,000 dpm de radioligando en alícuotas de 100  $\mu$ l. Para competir con el radioligando por los sitios de unión, se utilizó la encefalina correspondiente, y realizando un ensayo paralelo se probaron cada una de las moléculas análogas en un intervalo que va de 6.25 pg a 13.107  $\mu$ g. Se introdujeron los siguientes controles CTA, CPC, URE y Um, se agitan los tubos y se incuban a 4°C durante 24 horas. Tanto los sueros como las diluciones y las condiciones de incubación son extraídas del procedimiento de optimización del ensayo, cuyos detalles se verán en los resultados.

Al término de éste tiempo, se agregan 500  $\mu$ l de carbón activado dextrana en una proporción de 1.25% a 0.125% respectivamente, menos al control CTA que se le añade 500  $\mu$ l de amortiguador de dilución del carbón activado. Se incuba por 30 minutos a 4°C, y al

término, se centrifuga a 1,000 g durante 20 minutos a 4°C, se toma una alícuota de 500  $\mu$ l del sobrenadante, al que se determinará la radioactividad durante dos minutos.

D.- Determinación de la cantidad de Encetalina en el Tejido.

Una prueba importante en la validación del RIL, es la capacidad de éste para determinar las cantidades de Enc existentes en muestras biológicas. Con este fin, se determinó la cantidad de ambas encefalinas en 5 regiones diferentes del cerebro de rata. Se utilizaron ratas macho de la raza Sprague-Dowley, con un peso entre 150 y 175 gr. Las ratas utilizadas, se sacrificaron por decapitación, a las que se les extrajo el cerebro inmediatamente después el que fué lavado en una solución isotónica a 4°C antes de ser disecado por medio de la técnica de Glowinski e Iversen (1966). Las 5 regiones del cerebro que se extrajeron, difieren en la cantidad de Enc, así como en el tamaño, siendo éstas: Cuerpo Estriado, Hipotálamo, Hipocampo, Área Septal, y Complejo Amigdalino. Una vez disecadas las regiones, se incuban en 2 ml de ácido acético 11N, en un baño a una temperatura mínima de 85°C durante 30 a 40 minutos (Rossier et al 1977b). A continuación, se homogeniza por medio de un Ultraturrex por 10 a 20 segundos, evitando la producción de espuma en el proceso. Se toma una alícuota de 100  $\mu$ l para determinar la cantidad de proteína por medio del método de Lowry y col. (1951). El homogenado restante se centrifugó a 2,000 g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante es decantado cuidadosamente, y se mide el volumen de éste, dividiéndolo en dos partes iguales. Una parte será la denominada fracción sobrenadante, la que será probada en esa forma y la otra mitad se someterá a una purificación parcial antes de determinar la cantidad de Enc. Este procedimiento se realiza para probar la posible interferencia en el ensayo, de moléculas existentes en el tejido o de los reactivos

utilizados en el procedimiento de extracción, que en una centrifugación a baja velocidad no precipitan. Tal posibilidad se verifica comparando los valores obtenidos entre las muestras de la fracción de sobrenadante y las muestras parcialmente purificadas. La purificación se realizó por medio de columnas de Amberlita XAD-2, siendo el mismo procedimiento utilizado por Hughes y col. (1977) pero con pequeñas modificaciones. La Amberlita es una resina hidrofóbica que adsorbe a las Enc, dejando pasar a la mayor parte de las macromoléculas hidrofóbicas.

Para determinar la recuperación de las Enc y optimizar su purificación parcial, se realiza un experimento preliminar. Se tomó un extracto de tejido, el que fué previamente centrifugado, y al sobrenadante se le agrega una cantidad de Leu-Enc  $^3\text{H}$  y Met-Enc  $^3\text{H}$  de 50,000 dpm de cada una de ellas, previamente purificadas por cromatografía en placa fina. Las columnas de Amberlita de 0.0 por 8 cm, son previamente lavadas con tres volúmenes de Acetona, Metanol al 90% y Agua desgasada, posteriormente se equilibran con tres volúmenes de HCl 0.1 M, regulando el flujo a 1 ml/min. Se carga el sobrenadante con el trazador y se permite que éste penetre en la columna. Se lavan las proteínas y demás compuestos más hidrófilos que las Enc con 40 ml de HCl 0.1 M y posteriormente se eluyen las Enc con 40 ml de Metanol al 90%. El lavado y las eluciones se recolectan en fracciones de 10 y 5 ml respectivamente. Se toman alícuotas para determinar la cantidad de radioactividad.

Una vez determinada la forma de trabajo, se procedió a puri-

ficar parte de los sobrenadantes de los extractos de tejido que serían probadas en el EII. Las muestras de la fracción sobrenadante, como las muestras obtenidas de la purificación parcial por Amberlita, se someten a un evaporación a sequedad.

Un tercio del total de muestras de ambos tipos de procesamiento se resuspenden en 500 ul de amortiguador de fosfatos 0.02 M pH 7.4, 0.15 M de NaCl, y 0.01% de ASB. El resto de las muestras es resuspendido en 440 ul de amortiguador de fosfatos 0.02 M, pH 7.4, 0.15 M de NaCl, 0.01% de ASB, agregandoles 60 ul de NaOH 1 N.

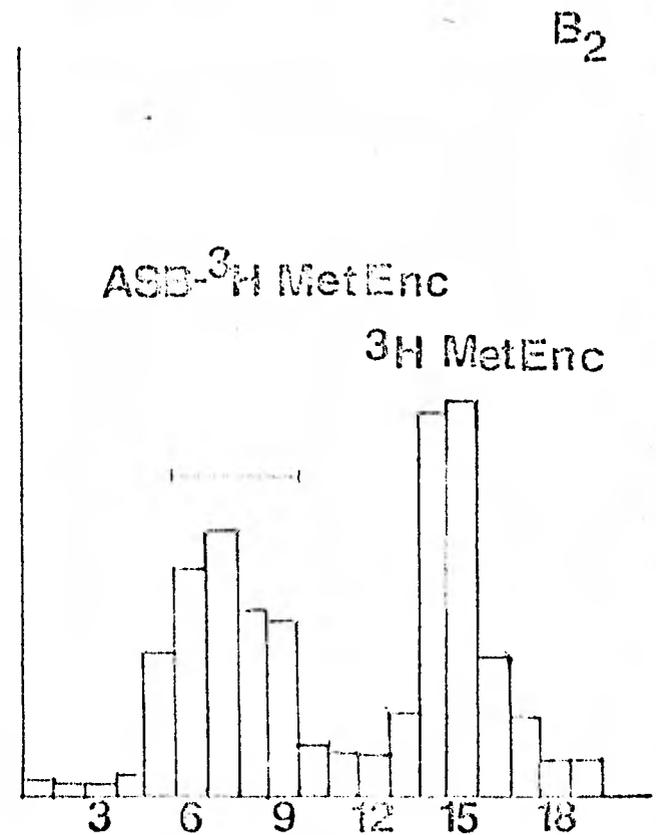
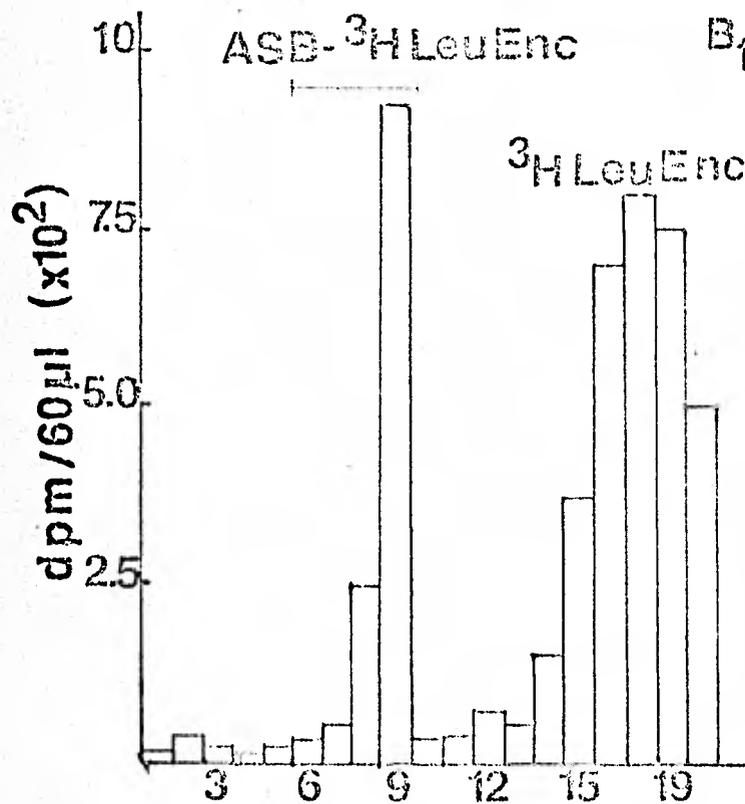
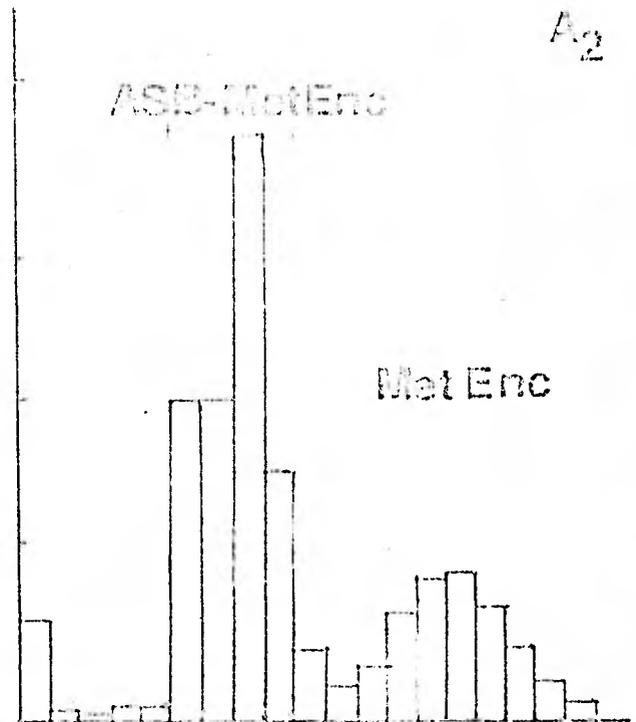
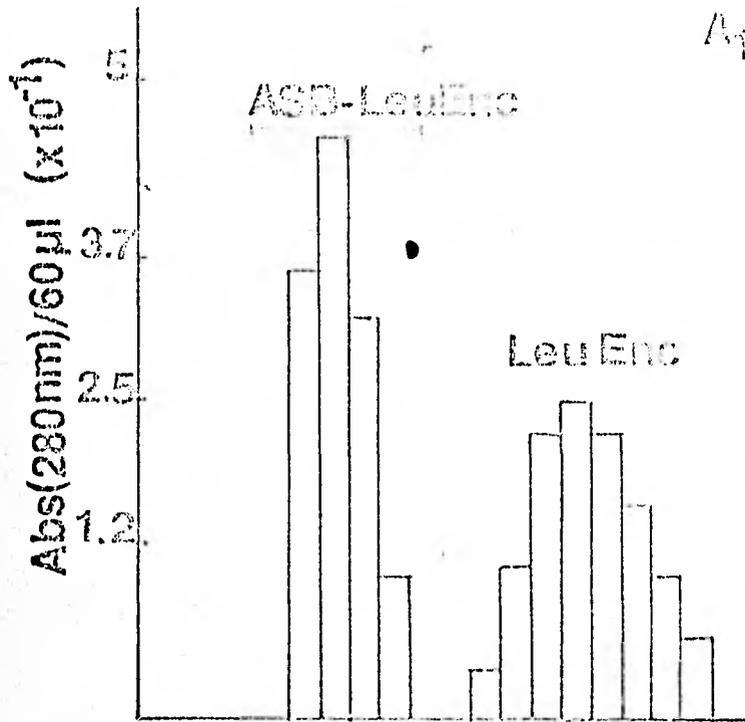
Se desarrolló un ensayo con una curva patrón tanto de Leu-Enc como de Met-Enc para el suero C8(60) y de igual forma para el suero C14(160), con un intervalo de valores de 5.25 pg a 3.276 ug. Mientras que la cantidad de radioligando es constante, agregando 12,000 dpm. Para ambos sueros se realiza el ensayo comparativamente entre las dos concentraciones de amortiguadores de fosfatos. Obteniendo que las curvas patrón tanto del amortiguador de fosfatos 0.02 M como del 0.2 M son similares, sin cambio alguno en la sensibilidad. Además se determinó para una muestra el contenido de Leu-Enc como de Met-Enc.

#### IV.- Resultados.

##### A.- Síntesis y Purificación del Inmunogeno.

El primer paso para la obtención de un RIE de alta sensibilidad, es la de poseer un inmunogeno capaz de producir Ac específicos y de alta afinidad hacia ese inmunogeno. Para ello se realizó la síntesis y la purificación de la forma que se estableció en los procedimientos experimentales. Los resultados de tal reacción se encuentran en la figura 11. En ella se muestra un cromatograma representativo de los resultados de la purificación de la reacción de conjugación entre la Enc y la ASB por medio del glutaraldehído. En la parte superior de la figura 11 se encuentra la determinación de la absorbancia a 280 nm de las diversas fracciones tanto para conjugados de Leu-Enc como de Met-Enc. En parte inferior se encuentra la determinación de la cantidad de  $^3\text{H}$  Enc para las mismas muestras anteriormente mencionadas.

En el extremo izquierdo se encuentra la reacción de conjugación de la Leu-Enc con la ASB, en que encontramos dos picos de importancia, el primero de ellos eluye entre la fracción 6 a 9 que poseen un color amarillo marrón, mientras que el segundo pico eluye en las fracciones 12 a 19. Hay que hacer notar que ambos picos coinciden en el cromatograma de absorbancia como el de radioactividad. Debido a que se está utilizando una columna de filtración por peso molecular, el primer pico corresponde a las fracciones que contienen el conjugado deseado o sea ASB-Leu-Enc, además la resolución de la columna, no permite la separación de polímeros -



Fracción

## FIGURA 11.- Purificación del Inmunogeno.

La figura muestra el cromatograma de purificación de la - reacción entre la ASB y la Enc por medio del glutaraldehído. Se utilizaron columnas de Bio Gel P6, con una dimensión de 0.9 por - 8 cm, con un flujo entre 120 y 180 ul/min recolectando fracciones de 240 ul. Los datos están expresados a 60 ul para corrección de algunas fracciones que tuvieron 300 ul, puesto que la recolección se realizó manualmente. En la figura 11 A se encuentra la determinación de la absorbancia a 280 nm. En B se encuentra la determinación de la radioactividad. El número 1 corresponde a la Leu-Enc, mientras el número 2 corresponde a la Met-Enc.

La eficiencia de conjugación para ambas Enc es de 25 al 35%. Se tienen dos picos, siendo el que primero eluye el que contiene el conjugado ASB-Enc que posee un color amarillo marrón.

de ASB y ASB que no reaccionó. El segundo pico corresponde a la Leu-Enc o a dímeros de ésta. El glutaraldehído eluye en una fracción posterior.

En el extremo derecho se encuentra la reacción de la ASB con la Met-Enc. Al igual que para la otra Enc se encuentran dos picos de importancia que coinciden para ambos tipos de determinación. El primer pico que corresponde al conjugado de la ASB-Met-Enc, polímeros de la ASB y ASB sin reaccionar, eluye entre las fracciones 5 a 9, y que también posee un color amarillo marrón; el segundo pico con los dímeros de la Enc y Enc sin reaccionar eluye entre las fracciones 13 y 17.

Por tanto para ambas reacciones se observan dos picos, el primero que contiene productos de alto peso molecular, mientras que el segundo contiene compuestos de peso molecular pequeño. Las fracciones que son de interés, son las que incluyen al primer pico, las cuales se juntan y con ellas emulsificadas se inoculan según el protocolo establecido en procedimientos experimentales. Estas fracciones contienen ASB en diferentes formas que producirá Ac específico hacia ella. Debido a que la de la ASB no contiene la secuencia de las Enc, ésta no interferirá en el ensayo.

La eficiencia de la reacción de conjugación se encuentra en un intervalo que va del 25 al 35% para ambas Enc. Sabiendo que la ASB contiene 60 residuos, y bajo la eficiencia obtenida, sabemos que de 18 a 20 residuos de Lis estarán ocupados, siempre y cuando por cada residuo de Lis le sea unida una Enc. Esto quiere

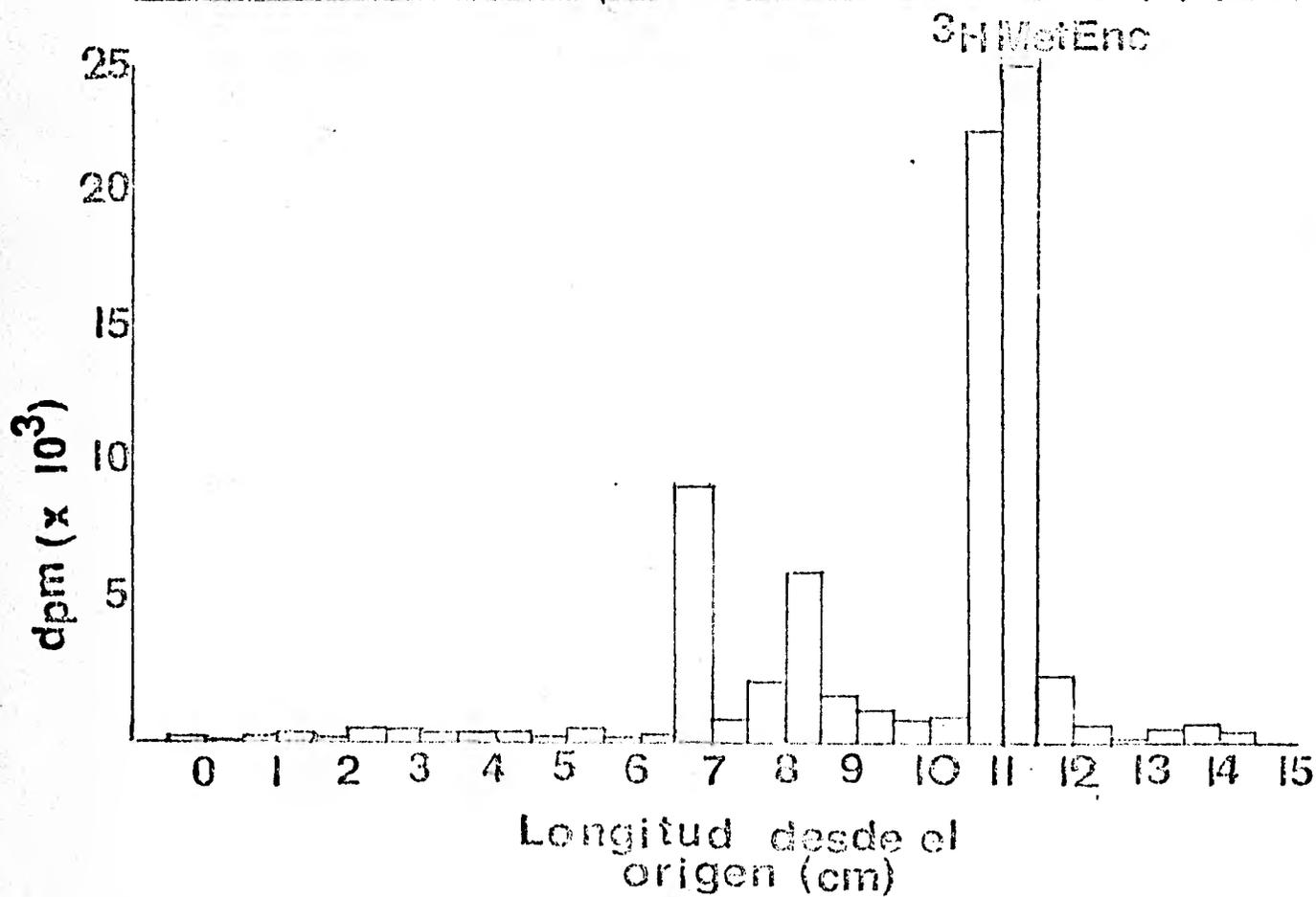
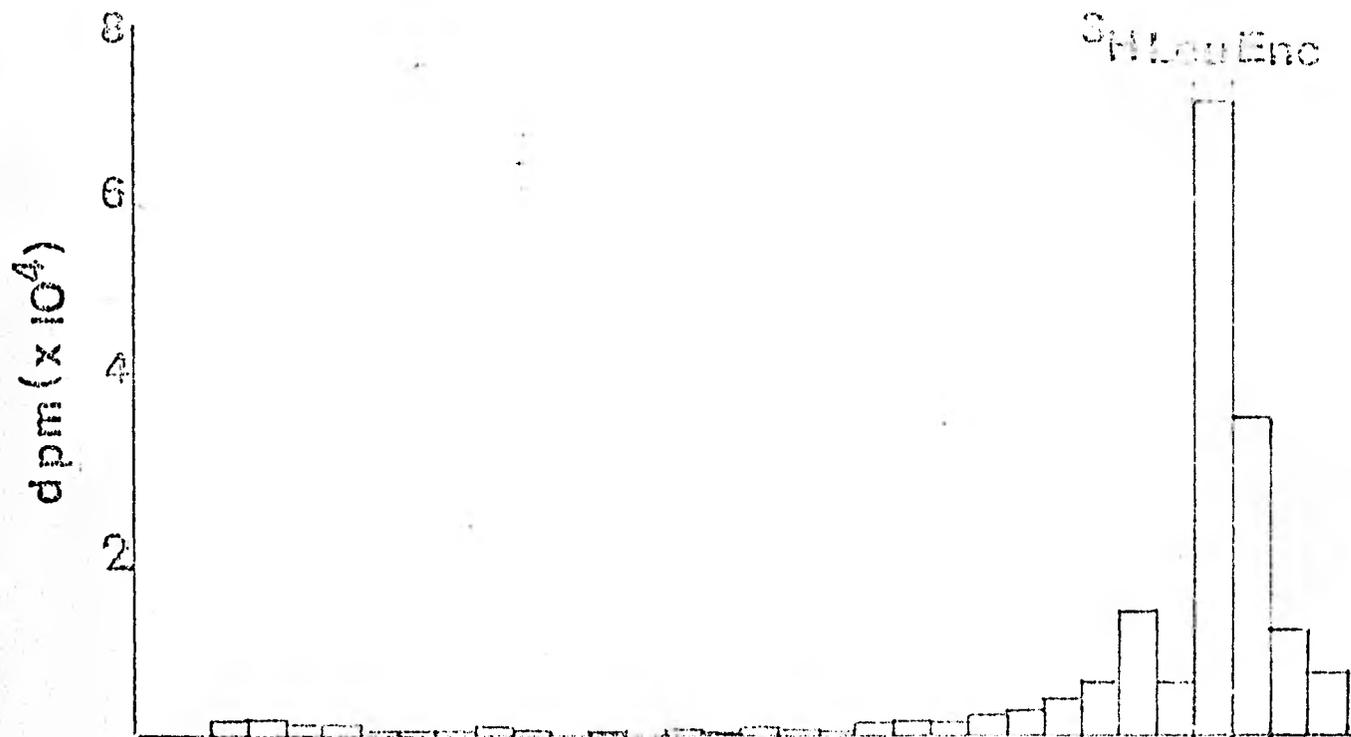
decir que todas las Lis expuestas, 18 residuos de Lis se encuentran reaccionando con el glutaraldehido. No hay que descartar la posibilidad de que ya que en la reacción con el glutaraldehido se producen condensaciones, a un residuo de Lis estén unidas dos Enc.

Por otra parte tomando en cuenta que se tenía 1 mg de Enc para reaccionar, haciendo la suposición de que no existen pérdida alguna, tendremos que 250 ug a 350 ug de la Enc estará unida a 2 - mg de ASB. Lo que implica que en una inoculación se inmunizó 1 mg de ASB con 125 a 175 ug de Enc, mientras que para una inoculación de refuerzo se inoculó 62.5 a 87.5 ug de Enc.

## B.- Purificación y Vida del Radioligando.

Inicialmente el radioligando utilizado para las titulaciones, fué un trazador que no es purificado previamente a su uso. Posteriormente se observó, probando que los contaminantes que acompañan al radioligando, interfieren en las titulaciones, por lo que se hizo necesaria su purificación.

En la figura 12 se ve un cromatograma representativo de la purificación de las Enc en cromatografía en placa fina. En la parte superior se encuentra una purificación de Leu-Enc, se tiene que la  $^3\text{H}$  Leu-Enc está a 13 cm del origen, poseyendo un índice de corrimiento de 0.81. Antecediendo a ésta fracción, se observa una serie de barras que son productos radiolíticos que conforme envejece el trazador aumentan en cantidad, llegando en ocasiones a contaminar la fracción pura, trayendo como consecuencia que sea insuficiente el poder de resolución de la placa. En la parte inferior se encuentra un cromatograma para la purificación de la Met-Enc tritiada, observándose que la muestra pura de  $^3\text{H}$  Met-Enc se encuentra a los 11 cm de origen, teniendo un índice de corrimiento de 0.75. Al igual que para la otra Enc, se tienen productos de radiólisis que anteceden a la muestra, además se da otro producto de importancia que es el sulfoxido de la Met-Enc que puede alterar los resultados. En el cromatograma mostrado para la Met-Enc se observa que la Enc tritiada está entre las fracciones a 10.5 y 11 cm del origen, siendo la última de éstas la más pura, puesto que la primera posee contaminantes en una mínima parte, producto de la radiólisis de las Enc que corren muy cerca de ellas.



## FIGURA 12.- Purificación del Radioligando.

Muestra los cromatogramas resultantes de la purificación de Leu-Enc tritiada en la parte superior, y de Met-Enc tritiada en la parte inferior. El líquido de elución es una mezcla de Cloroforno, Metanol, Ac. Acético, Agua (ver Métodos). El cromatograma está expresado como la longitud en cm desde el origen, contra la cantidad de radioactividad encontrada en cada fracción. En éste caso se corren placas, de gel de sílice con fluoroforo, de 15 cm de longitud por 1 cm de ancho, para su determinación se fracciona en rectángulos de 0.5 por 1 cm a lo que es denominado fracción. Para determinar la posición de la Enc pura se usan patrones de Enc fría. La relación entre la posición de la muestra deseada, con respecto con la longitud total a la que corrió la placa, se le denomina índice de corrimiento, para el caso de la  $^3\text{H}$ -Leu-Enc es de 0.81 y para la Met-Enc es de 0.75, los cuales son inferiores a los reportados por la literatura, 0.87 para la Leu-Enc (Malfroy y col. 1978).

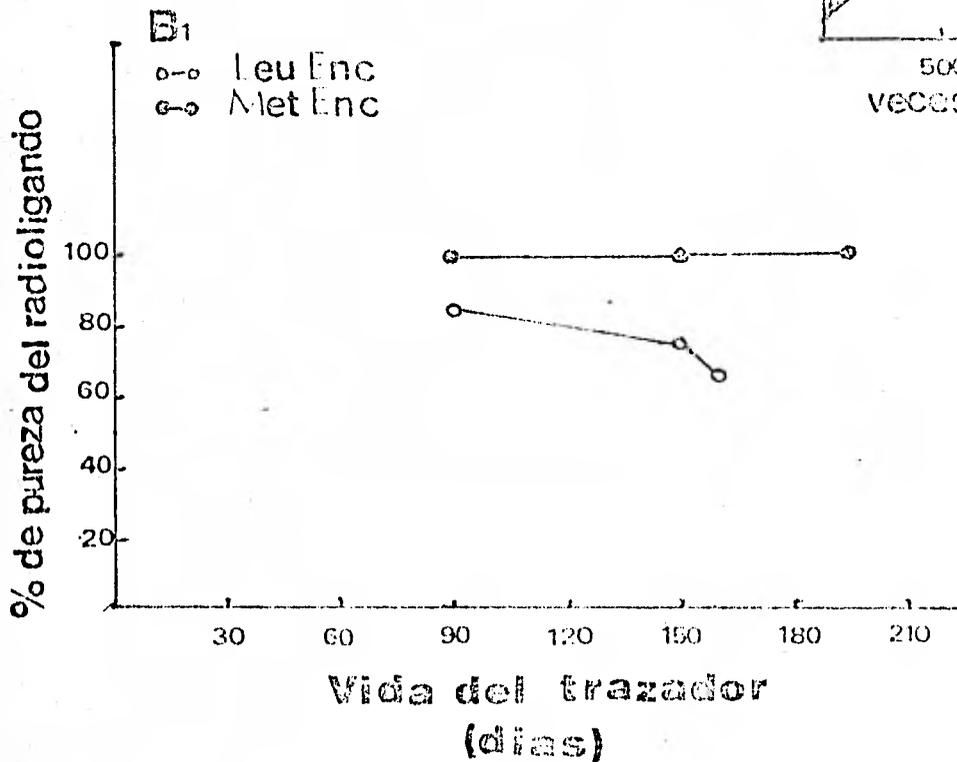
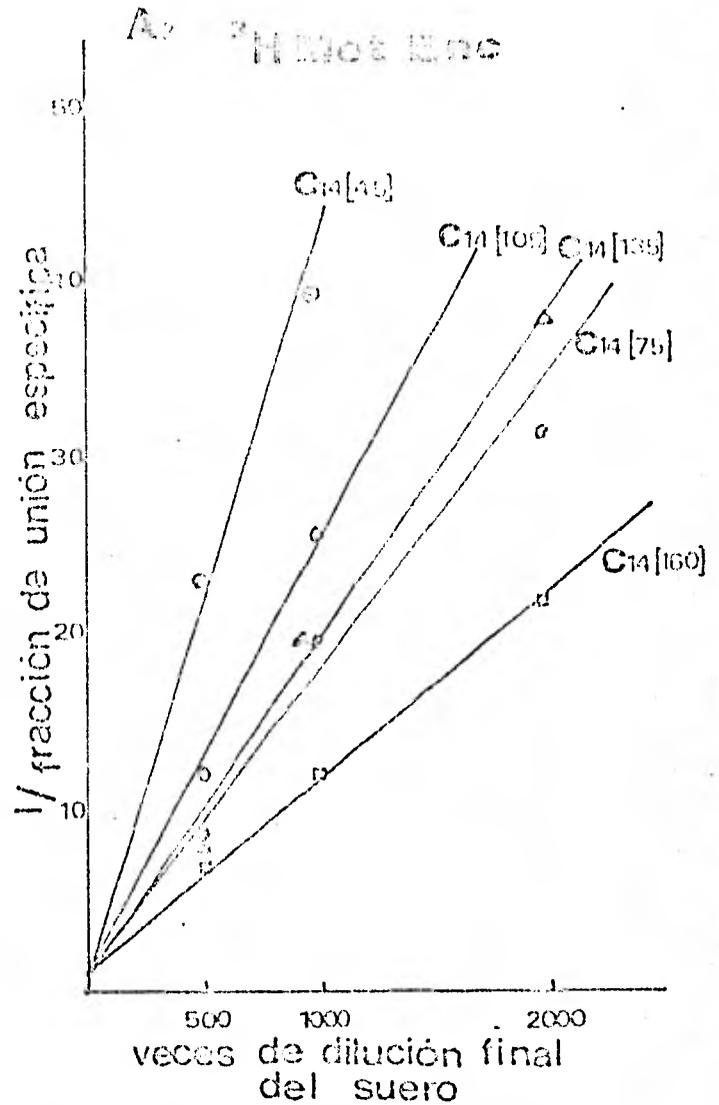
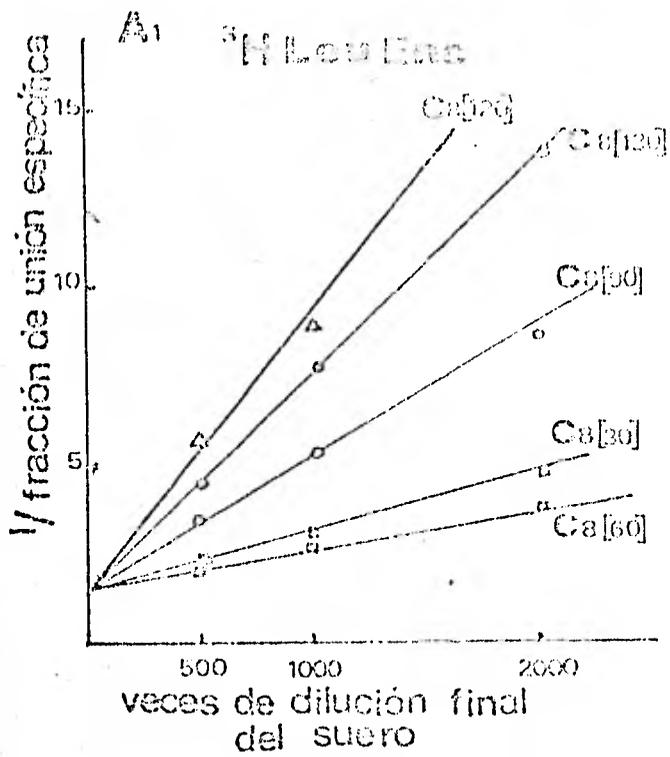
La recuperación de las Enc de las placas de sílice, tiene un intervalo entre 60 a 80%, de la cantidad de Enc puesta inicialmente.

Por otra parte se observa, que el envejecimiento del radioligando trae el aumento de productos contaminantes que no pueden ser reconocidos como inmunogenos por el Ac. Por medio de la deducción matemática mostrada en la figura 9, se puede conocer la pureza del radioligando que es reconocido por el Ac. La figura 13 muestra un ejemplo de la forma de obtener éste parámetro. La cantidad de radioligando inmunologicamente reconocido, varía de un ensayo a otro, tendiendo a disminuir en cantidad sin reportar que éste sea purificado. Para un ensayo realizado con varios sueros simultáneamente, que poseen la misma cantidad de radioligando inmunologicamente reconocible se puede extraer de la figura 13  $A_1$  y  $A_2$  para cada Enc. En donde se encuentran gráficas para varios sueros realizando en un mismo ensayo. Los puntos son extraídos de las titulaciones y están graficados como el inverso de la fracción de radioligando unido contra las veces de dilución. De gráficas de éste tipo se obtienen que todas las rectas pasan por un mismo punto, el que significa el inverso de la fracción del radioligando inmunologicamente reconocible por el Ac. Conforme el intercepto se aleja del origen, será mayor la cantidad de contaminantes que contendrá el radioligando. El valor mínimo que puede ser obtenido en estos tipos de gráficas es el de 1, que significa el 100% de pureza. La fracción de unión específica, se obtiene al realizar el siguiente cálculo para cada punto de dilución:

(Unión específica/cantidad total de radioligando)

\*fracción de unión específica.

La obtención de varios de estos valores, en diversos ensayos que difieren en el tiempo de realización, donde el radioligando varía en cantidad de contaminantes, se puede observar en la figura 13B1, en la que se muestra la vida del trazador. El tiempo utilizado no es absoluto, debido a que no se tiene un control del trazador, - antes de que arribe al laboratorio.



## FIGURA 13.- Vida del Radioligando.

La figura muestra la forma de extraer los valores de la fracción de radioligando inmunológicamente puro, para un ensayo en que se probaron simultáneamente varios sueros para Leu-Enc (A1) y para Met-Enc (A2). La parte inferior muestra el transcurso ó vida del trazador, gráfica que es obtenida realizando el procedimiento de la sección A para varios ensayos, figura 13 B. Los datos provienen de las titulaciones, mientras que la forma de graficar y extraer los datos es por el método gráfico de la figura 9. Para más detalles referirse al texto.

### C.- Titulación.

Se recordará que inicialmente los títulos de los sueros fueron obtenidos en ensayos realizados a diferentes tiempos, en que se tienen resultados muy variables, puesto que existe un factor de interferencia que impide la comparación entre varios ensayos. El factor de interferencia, son los contaminantes del radioligando, que se comprobó que disminuían la unión específica, y aumentaban la UNE y el CPC, y con ello incrementan la variación conforme las titulaciones se realizan en periodos largos entre una y otra. Además estos ensayos fueron realizados con un medio de incubación que no contenía ASB, al añadir éste reactivo al medio de incubación trae como consecuencia una disminución de adsorción no específica, dejando de ésta forma, que la unión específica hacia el anticuerpo sea expresada de una manera más confiable, por el aumento en la precisión. Conjuntamente se observó que existía una cantidad de radioligando que no era posible de ser precipitada por el carbón activado dextrana, aún a la concentración más alta de éste. El aumento en la cantidad de productos sin precipitar, se fué haciendo notorio conforme el trazador o el radioligando envejecía, por aumento en la cantidad de productos radiolíticos. Para evitar los problemas antes mencionados, se procedió a realizar la purificación del radioligando en cromatografía en la placa, realizandola previamente a su utilización.

En la tabla 2 se encuentran resumidos los resultados del mayor título obtenido para cada animal, con titulaciones simultáneas para cada conejo, así podemos comparar el mayor valor para

la Leu-Enc, que se tiene para un animal inoculado una única vez - siendo este animal el C8, mientras que para la Het-Enc, el mejor título se observa para el método de inoculaciones de refuerzo, siendo el que obtuvo el mayor título el C14. En la figura 14 se muestra el comportamiento de estos dos animales, teniendo que en la figura 14a se observa que título del C8 aumenta rápidamente obteniendo los mayores valores a los 45 y 60 días, después de los cuales disminuye lentamente el título hasta un valor basal, a pesar de - que se le inoculó de refuerzo por vía intramuscular, el título no aumento. Por otra parte en la figura 14b se encuentra la respuesta inmune del C14 a inoculaciones de refuerzo por vía intradérmica, se observa que el animal responde inmediatamente a la primera inoculación, aumentando el título con las inoculaciones de refuerzo, alcanzando el máximo a los 75 días después de la primera inoculación. Posteriormente decae lentamente a pesar de ser reforzado mensualmente y nuevamente responde después de un refuerzo por vía intramuscular, alcanzando el máximo título a los 160 días de la - primera inoculación. A pesar del continuo estímulo para que aumente su título, el animal no responde.

Casos 14  
 MetEhc  
 inoculación múltiple

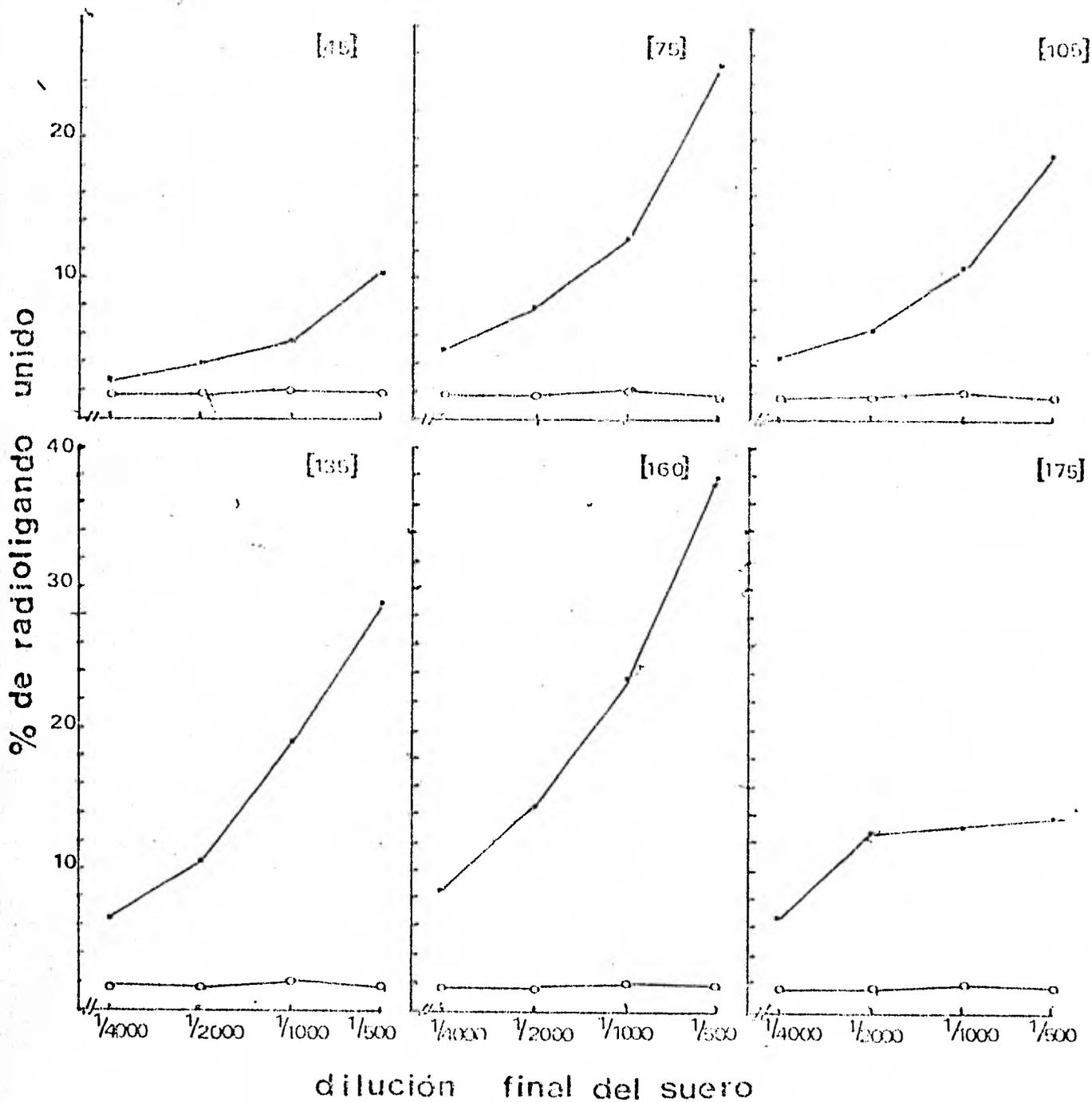


Fig B

Concilio 8  
 Leu 151c  
 inoculación única

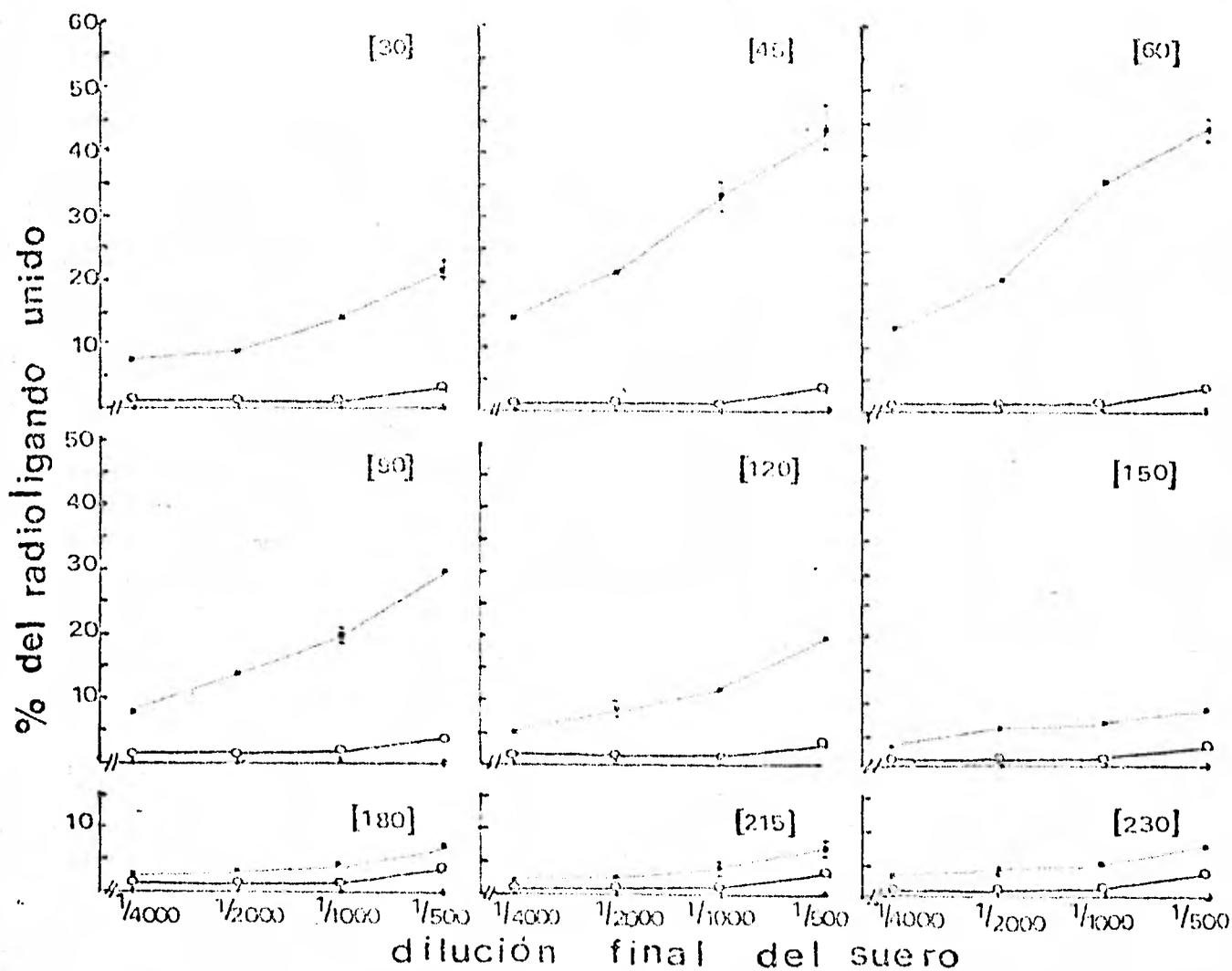


Fig A

FIGURA 14.- Titulación de los Sueros de Leu-Enc y Met-Enc.

La figura muestra los datos de los dos animales que tienen el mayor título. Las titulaciones mostradas, son realizadas simultáneamente para todos los sueros de un mismo animal. Los resultados de la titulación corresponde a los sueros de Leu-Enc (8) y de Met-Enc (14).

Se representa por los siguientes símbolos: o-o Unión no específica,  $\square$  -  $\square$  Unión total.

A). Se ve el transcurso de la respuesta inmune para un animal, al cual se le dió una inoculación única. Se observa que la unión no específica es baja, y que su interferencia es mínima en el ensayo. La unión total va aumentando hasta alcanzar un máximo a los 45--60 días de la primera y única inoculación, y posteriormente descendiendo lentamente, hasta alcanzar una basal. A pesar de que se le reforzó por medio de inoculaciones por vía intramuscular, el animal no respondió, permaneciendo en su estado basal. La unión total máxima se obtiene para la menor dilución del suero.

B). Comportamiento del animal inoculado con Met-Enc. Se inoculó en múltiples ocasiones, observando que posee una respuesta a los 75 días de la primera inoculación, posteriormente descendiendo su título, logrando nuevamente un máximo a los 160 días. Hay que hacer notar que entre ambos picos de máximo título, existe un valor mínimo a los 105 días después de la primera inoculación, después de la cual se dió un refuerzo por vía intradérmica aumentando su título, posteriormente a esto, se le da una inoculación por

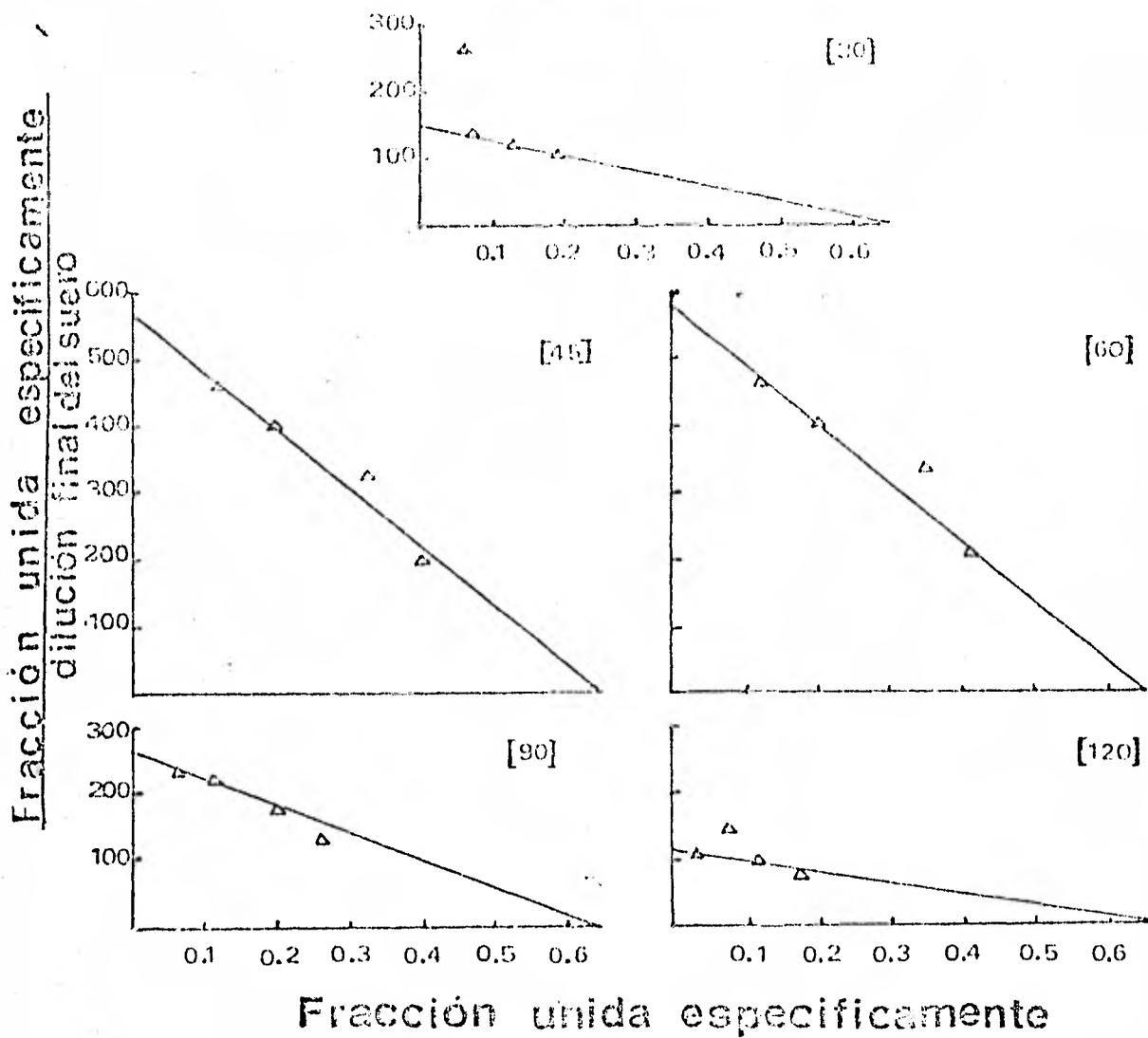
por vía intramuscular obteniéndose el máximo título a los 160 días, de la primera inoculación. Los datos están expresados como el porcentaje de unión total del radioligando contra la dilución final del suero.

#### D.- Afinidad y Capacidad de los Anticuerpos.

La afinidad es uno de los parámetros que limitan el desarrollo de un RIE. La afinidad es una propiedad intrínseca de los Ac de un determinado suero. Para la determinación de la afinidad, - la que estará expresada como la constante de disociación, se estableció un modelo matemático, y para ello hay que remitirse a la - figura 10. De igual forma la capacidad de los sueros es de importancia el ser determinada, pues involucra la concentración, y se encuentra resumido en la figura 9. Los detalles de su obtención se refirieron en los Procedimientos Experimentales.

La capacidad de los sueros, está expresada como la concentración de los sitios activos entre la constante de disociación. En las figuras 15 y 17 se puede extraer de la pendiente la capacidad del suero. En la figura 15 se encuentran graficados los valores para una titulación simultánea con los sueros del C8. Las gráficas son del tipo Scatchard, teniendo como abscisa la fracción de radioligando unido específicamente, que en la ordenada se tiene - la fracción de radioligando unida específicamente entre la dilución final del suero. Hay que hacer notar que todos los sueros - interceptan a la abscisa en el mismo punto, éste valor es 0.65, - que es la fracción de radioligando inmunologicamente puro. Por otro lado se ve que la pendiente de las curvas aumenta de los - 30 a los 45 días siendo muy semejante a los 60 días y decreciendo posteriormente. Estos datos pueden ser representados como lo muestra la figura 16 en que se ve que la mayor capacidad la tiene el

# Conejo 3 Len Enc



## FIGURA 15.- Determinación de la Capacidad del Suero de Leu-Enc.

La figura muestra la representación de gráficas del tipo - Scatchard, de los diferentes sueros para el CB inmunizada con - Leu-Enc. Las gráficas representan la fracción de trazador unido específicamente entre la dilución final del suero, contra la fracción de trazador o radioligando inmunogenamente reconocible y - unido específicamente. Los datos fueron procesados según la figura 9. La pendiente representa la concentración de suero entre la constante de disociación con signo negativo. Mientras que en el intercepto con la abscisa, se tiene la cantidad de radioligando inmunológicamente puro o reconocible por el anticuerpo. Los datos aquí mostrados fueron obtenidos en titulaciones simultáneas para un mismo animal.

$\frac{[\text{Sitios activos}]}{\text{Constante de disociación}} \quad (\times 10^3)$

Conejo 8  
leu Ehc

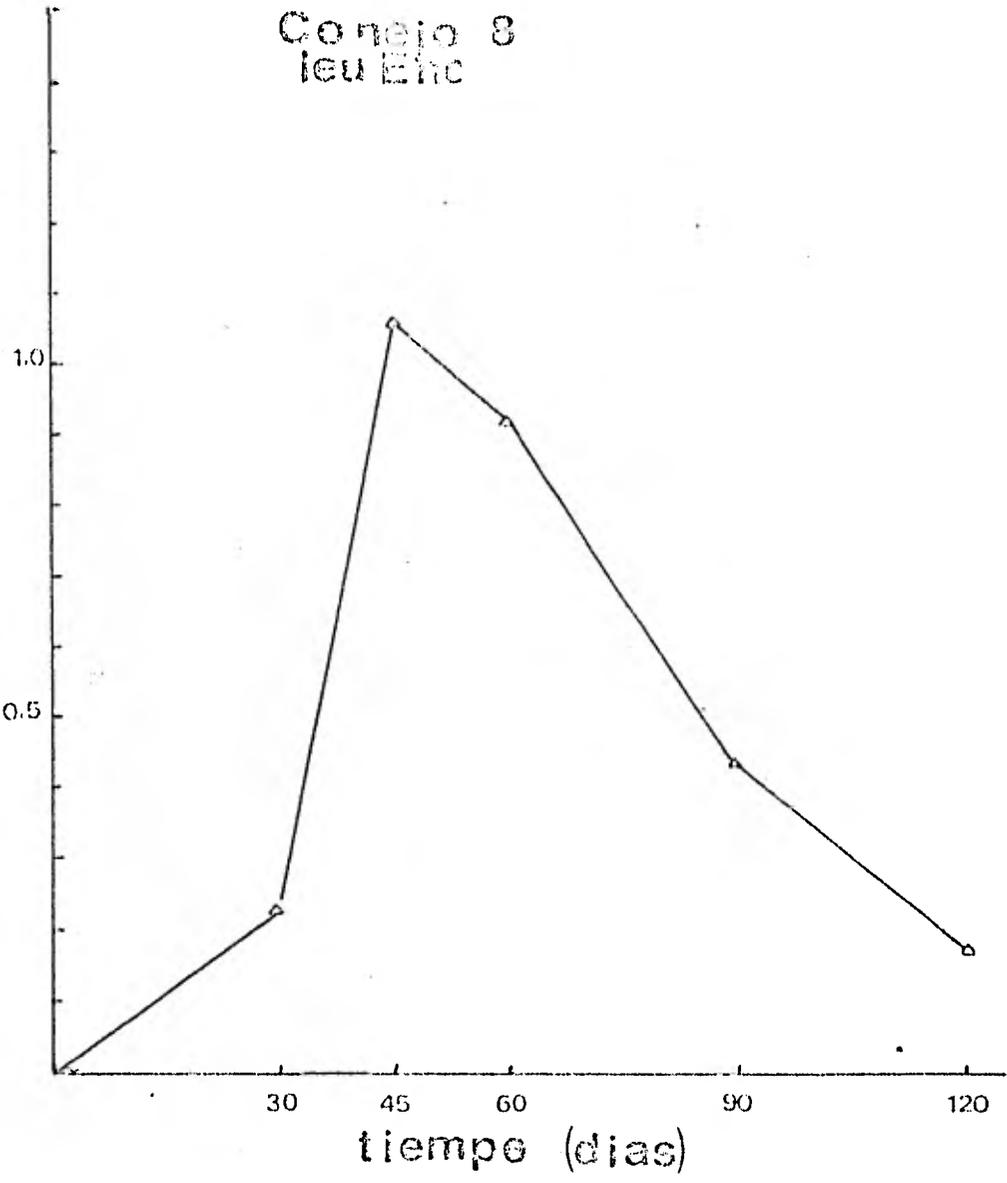


FIGURA 16.- Cambio en la Capacidad de los Sueros: de Leu-Enc.

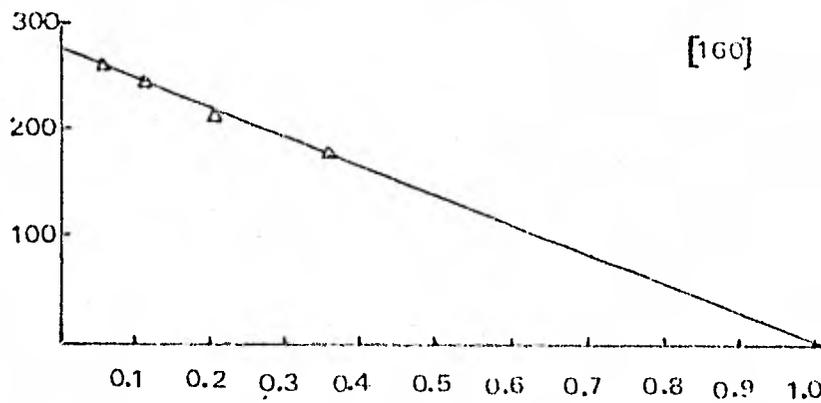
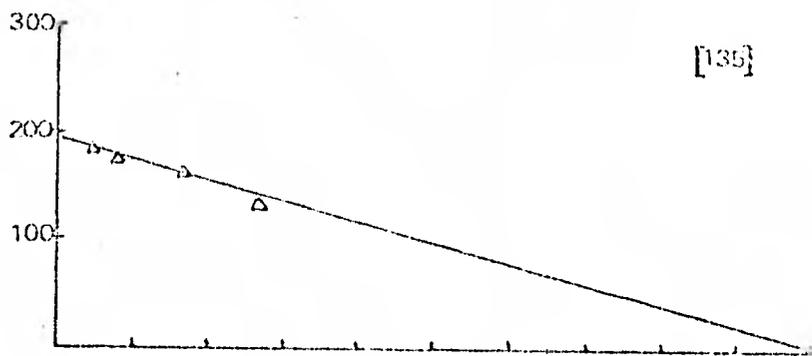
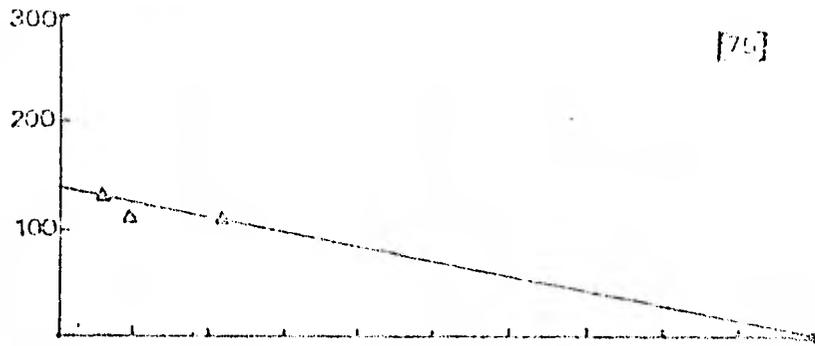
La curva representa los cambios en la capacidad de los sueros relacionando la concentración de anticuerpo sobre la constante de disociación, en el transcurso del tiempo posterior a la primera inmunización. Los datos fueron obtenidos según la figura - 9 y 15.

En la figura se puede notar que el parámetro mencionado anteriormente, en que se ve que aumenta rápidamente, obteniéndose un máximo a los 45 días y posteriormente descendiendo lentamente. Hay que recordar que el animal únicamente recibió una inmunización a los 0 días.

suero C945), y que es similar a la del suero C8(60). Se ve que la única inoculación del inmunógeno de Leu-Enc, es capaz de producir sueros con altas capacidades entre los 45 y 60 días, después de los cuales desciende lentamente hacia los 90 días, tendiendo a un valor basal. En la figura 17 se encuentra de forma análoga, las curvas Scatchard para la Met-Enc. Se observa que la interacción con las abscisas tiene el valor de 1, esto quiere decir que el radioligando después de ser purificado por cromatografía en placa fina, es 100% reconocible por el anticuerpo. Por lo que corresponde a las pendientes, se observa un aumento gradual en ésta, teniendo que entre los 75 y los 135 días sufre un cambio la pendiente, haciéndose notorio éste entre los 135 y 160 días después de la primera inoculación. Hay que recordar que éste animal fué inoculado con inmunizaciones de refuerzo y que al día 153 se le dió una inmunización de refuerzo por vía intramuscular. Si los valores de las pendientes extraídas de la figura 17 son graficados con respecto al tiempo, obtendremos la figura 18, en la que se observa un continuo aumento en la capacidad de los sueros, presentándose una meseta entre los días 75 y 105, obteniéndose el mayor valor a los 160 días.

Por medio del modelo matemático extraído de la figura 10 (procedimientos experimentales), se puede obtener la constante de disociación. Este parámetro nos dará la posibilidad de comparar los sueros con una mayor confiabilidad. La manipulación de los datos y la extracción de éstos valores, se encuentran explicados en los procedimientos experimentales. La figura 19 muestra -

Fracción unida específicamente  
dilución final del suero



Fracción unida específicamente

## FIGURA 17.- Determinación de la Capacidad del Suero de Het-Enc.

La figura muestra la representación del tipo Scatchard de los diferentes sueros de C14 inmunizado con Het-Enc. Las gráficas están expresadas como la fracción de radioligando unido específicamente entre la dilución final del suero, contra la fracción de radioligando unido específicamente. La pendiente representa menos concentración de suero entre la constante de disociación (capacidad del suero). Mientras que la extrapolación de la recta que corta al eje de la abscisa, no da la cantidad de radioligando inmunológicamente reconocible por el anticuerpo. Los datos mostrados aquí, provienen de titulaciones simultáneas para una misma serie de sueros.

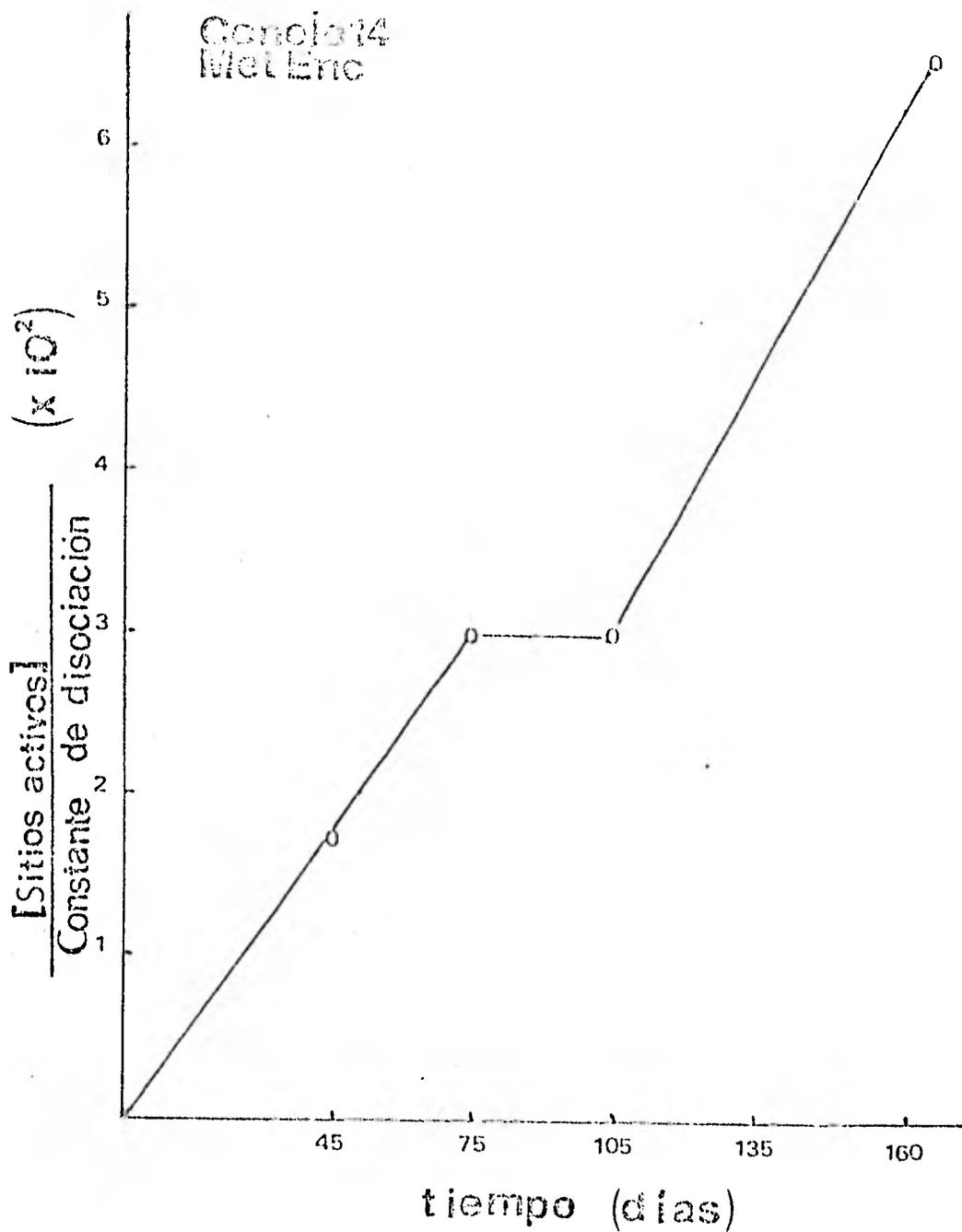


FIGURA 18.- Cambios en la Capacidad de los Sueros de Met-Enc.

La gráfica muestra el transcurso de la capacidad de los sueros, que relacionan la concentración de anticuerpo entre la constante de disociación en el transcurso del tiempo después de la primera inmunización. Los datos fueron obtenidos según la deducción matemática que se encuentra en la figura 9 y en la figura 17. Se muestra que los refuerzos en éste caso, traen continuamente un aumento en éste parámetro, observándose una meseta entre los 75 y 105 días, después de los cuales hay un aumento hasta los 160 días.

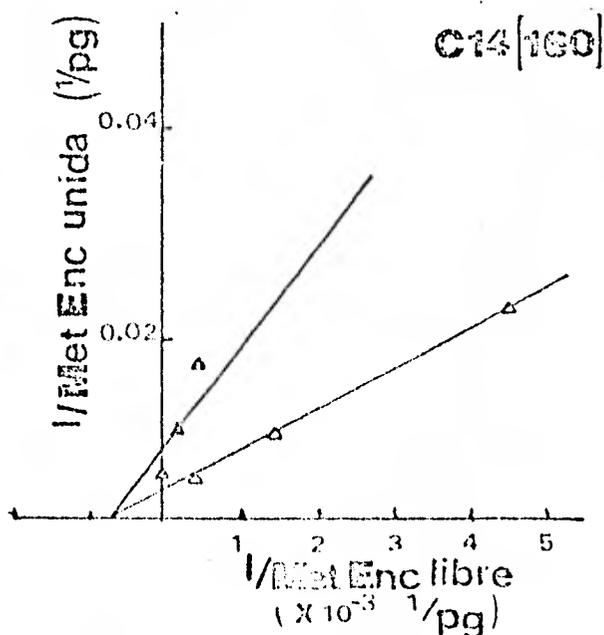
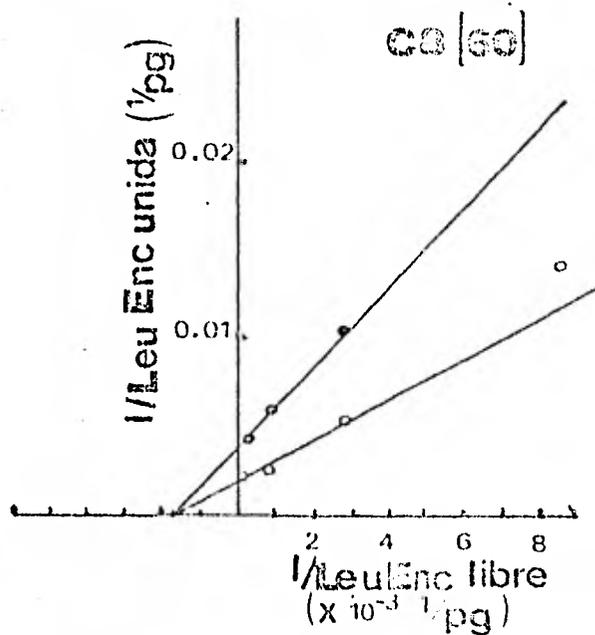
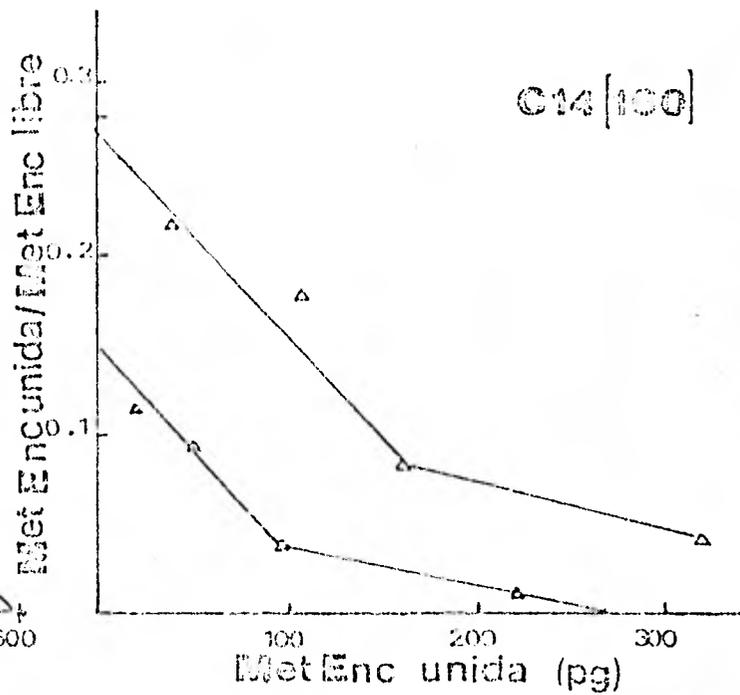
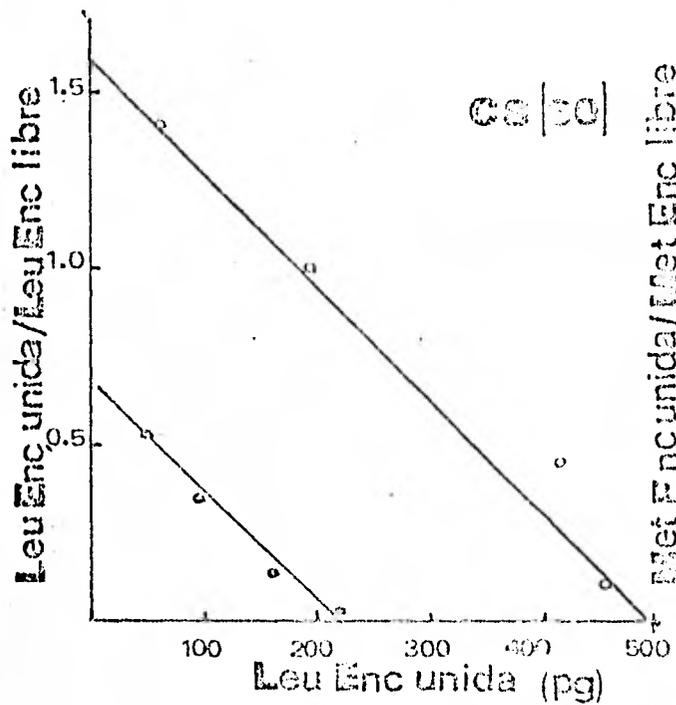


FIGURA 19.- Determinación de la Constante de Disociación.

La gráfica muestra los datos graficados en curvas tipo - Scatchard y doble recíproca para los sueros de Leu-Enc y Met-Enc. En la parte superior se muestran las curvas de tipo Scatchard para C8(60 y C14(160), viendose que en la curva para Leu-Enc no presenta un cambio de pendiente, mientras que para la Met-Enc se presenta éste fenómeno expresado por el punto de inflexión, demostrando la existencia de dos poblaciones diferentes de anticuerpos. En la parte inferior se encuentran las curvas de doble recíproca, obtenidas de los mismos datos que en las gráficas de la parte superior. Se utilizó el modelo matemático que se encuentra en la - figura 10.

Los datos mostrados aquí son extraídos de ensayos en incubación simultanea llevada a cabo a 24 horas.

Símbolos:

○-○ dilución final del suero 1:1,500, ●-● dilución del suero final 1/4,000. Los círculos son del suero C8(60) de Leu-Enc, - mientras que los triángulos se emplean para el suero C14(160) de Met-Enc.

un ejemplo de los datos tratados por el modelo matemático expresado en la figura 10. Se observa en las gráficas del tipo Scatchard en la parte superior de la figura 19, mientras en la parte inferior se encuentran gráficas de doble recíproca. En las gráficas tipo Scatchard se puede extraer de la pendiente el recíproco de la constante de disociación con signo negativo, observando que para la Leu-Enc las pendientes para las dos diluciones del suero en que se realizó el ensayo, son paralelas. De igual forma se tiene un paralelismo para la curva del extremo derecho de la figura 19, que corresponde a la Met-Enc, se conserva el paralelismo aunque se encuentren curvas bifásicas. Este tipo de curvas bifásicas, demuestran la existencia de dos poblaciones, con constantes claramente diferentes. Los valores de las constantes de disociación obtenidas de las gráficas del tipo Scatchard, se encuentran resumidas en la tabla 3. Se comprobó los resultados obtenidos, realizando gráficas de doble recíproca. Se observa que la curva de doble recíproca para la Met-Enc no presenta la inflexión debido a que este tipo de gráficas, dan mayor peso a los valores en que el RIE son obtenidos con mayor precisión.

En la tabla 3 como se había mencionado anteriormente, se encuentran las constantes de disociación obtenidas por ambas formas de graficación. Se observa que para los sueros de Leu-Enc, las constantes de disociación obtenidas por curvas de doble recíproca, la mayor afinidad la posee el suero C8(45), seguida por el suero C8(60) y posteriormente por el C8(90); pero si se observan los datos obtenidos de las curvas del tipo Scatchard, tendremos la mis-

TABLA 3.- Constantes de Disociación.

Suero	Doble-Recíproca (M)	Scatchard (M)
C8 (45)	$8 \times 10^{-10}$	$1.2 \times 10^{-9}$
C8 (60)	$2.1 \times 10^{-9}$	$1.2 \times 10^{-9}$
C8 (90)	$2.5 \times 10^{-9}$	$1.2 \times 10^{-9}$
C14 (75)	$1.12 \times 10^{-8}$	$8.93 \times 10^{-9}$
C14 (135)	$1.58 \times 10^{-8}$	$1.45 \times 10^{-8}$
C14 (160)	$8.73 \times 10^{-9}$	$8.8 \times 10^{-9}$

ma constante para los tres sueros. Para los sueros de Met-Enc se ve que la mayor constante de disociación la posee el suero C14 (160), seguido del suero C14(75) y después el C14(135), encontrándose que por ambos métodos de obtención de la  $K_d$  se tiene el mismo comportamiento, siendo mucho más cercanos los valores del C14 (160) y C14(75) en gráficas del tipo Scatchard. La razón de esta discrepancia entre ambos procedimientos, es la diferencia en peso que dan cada uno de los métodos de graficación. En resumen, se tienen dos sueros de Leu-Enc con alta afinidad el C8(45) y C8(60), aunque el C8(90) posee una afinidad menor no es de alguna forma malo, mientras para la Met-Enc únicamente se cuenta con un suero el C14(160), teniendo una menor afinidad el C8(75).

Conocida la capacidad del suero y la constante de disociación, se puede obtener la concentración de sitios activos, que vienen resumidos en la tabla 4. Se observa que la mayor concentración de sitios activos para los sueros del C8, lo tiene el C8(60), seguido por el C8(90) y muy cercano a él, el suero C8(45). Mientras tanto, se observa que para los sueros de Met-Enc, se tiene un aumento en la concentración de sitios activos conforme pasa el tiempo y aumenta el número de refuerzos. Este mismo dato, puede ser obtenido de las curvas del tipo Scatchard de la figura 18 y figuras semejantes para cada suero, siendo la intersección con la abscisa el valor de  $q$ , que relaciona la concentración de sitios activos y la dilución (ver figura 10), o por medio de la interacción de la ordenada en que se encuentra relacionada la constante de disociación con  $q$  (ver figura 10). Por ambos métodos las concentraciones de los sitios activos son similares.

TABLA 4.-

Concentración de Sitios Activos del Anticuerpo.

Suero	Ac
C8 (45)	$1.1 \times 10^{-6}M$
C8 (60)	$2.7 \times 10^{-6}M$
C8 (90)	$1.2 \times 10^{-6}M$
C14 (75)	$2.16 \times 10^{-6}M$
C14 (135)	$3.0 \times 10^{-6}M$
C14 (160)	$3.6 \times 10^{-6}M$

E.- Optimización de las condiciones de incubación.

Una vez que se ha determinado los sueros a utilizar, se procede a establecer las condiciones óptimas de incubación, para obtener la mayor sensibilidad y un mejor porcentaje de unión.

Para la Leu-Enc se probaron tres sueros, teniéndose que los mejores resultados fueron para el C8(45) y C8(60). Para describir los resultados obtenidos, tomaremos como ejemplo el suero C8(60), ya que ambos sueros tienen el mismo comportamiento. En la figura 20 se encuentran los resultados de éste ensayo. En la incubación diferencial no fuera del equilibrio a 48 horas, se obtiene un comportamiento incierto en las dos diluciones probadas, en que la unión inespecífica (UNE) es alta, de forma tal, que interfiere en la precisión de los datos de la unión específica, y reduciendo este valor para las dos diluciones, provocando así, que las curvas se empalmen, con un comportamiento incierto. Comparando los datos entre ambas incubaciones diferenciales, se nota que la incubación diferencial a 24 horas, también presenta una unión inespecífica alta, pero siendo en un grado menor que en la incubación similar a 48 horas, permitiendo de ésta forma obtener una diferencia entre las dos diluciones. Tenemos que la unión inespecífica para la incubación fuera del equilibrio a 48 horas es del 35% del radioligando agregado, disminuyendo a 20% en la incubación diferencial a 24 horas.

Comparando las incubaciones en equilibrio con las que se en-

Conojo s[CO]  
 Leu-enc  
 inoculación única

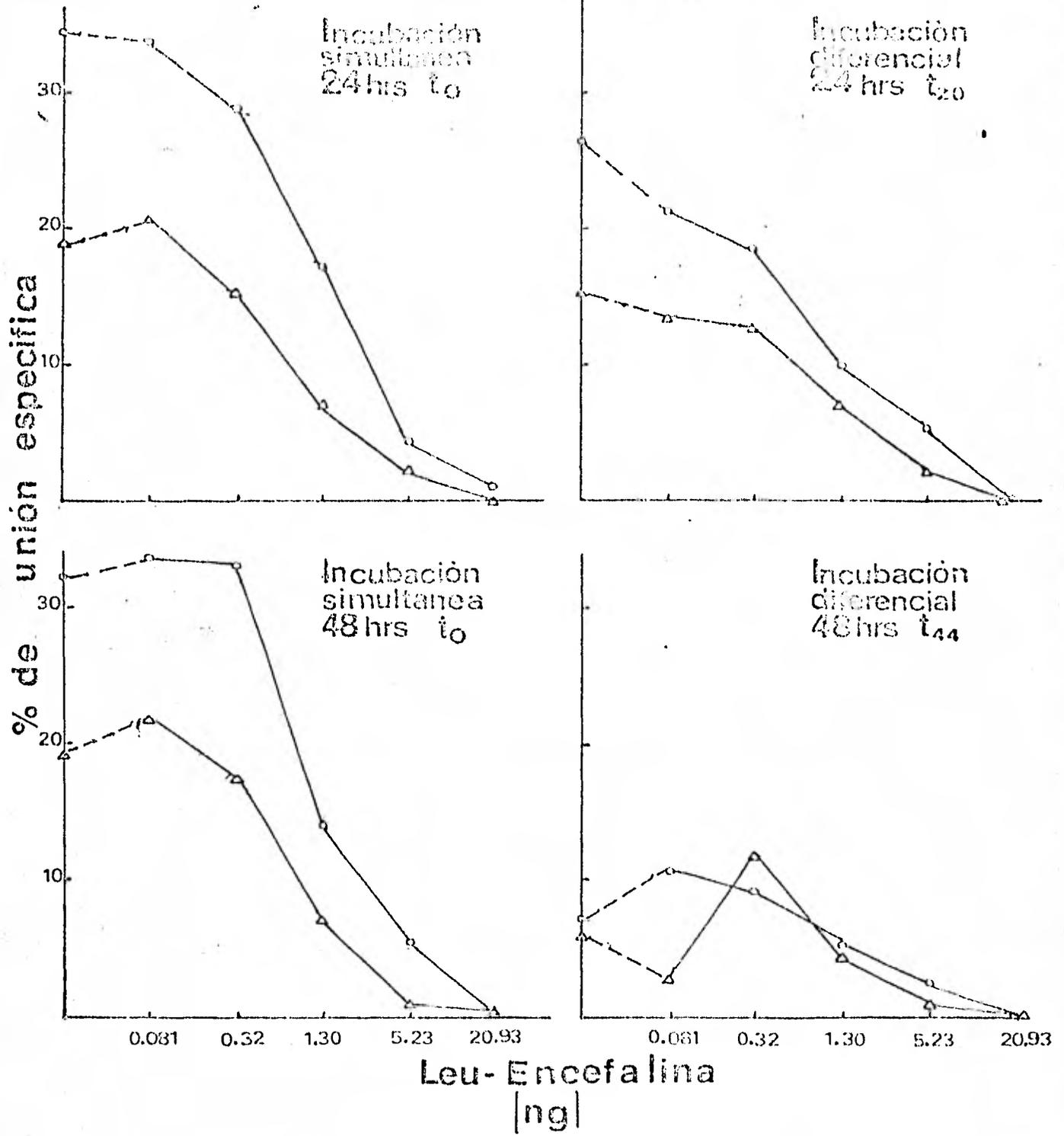


FIGURA 20.- Condiciones de Incubación para la Leu-Enc.

Se probaron cuatro condiciones de incubación para los sueros C8(45), C8(60) y C8(90). El comportamiento es el mismo en los tres casos, como ejemplo se tomó el suero C8(60). Se realizaron dos incubaciones diferenciales una a 24 horas, agregando el radioligando después de 20 horas (t 20) de haber agregado el ligando frío, e incubando por 4 horas más a 4°C; la segunda incubación diferencial se realizó a 48 horas agregando el radioligando 4 horas antes de terminar el ensayo (44 horas); siguiendo el mismo procedimiento que la anterior. Por otro lado se realizaron incubaciones en equilibrio a 48 y 24 horas, agregando el ligando y radioligando simultáneamente. Las gráficas están expresadas como porcentaje de unión específica (unión total - unión no específica expresado como el porcentaje del radioligando total agregado) vs. la cantidad de Enc fría agregada al ensayo. En la parte superior se muestran las dos incubaciones realizadas a 25 horas y en la parte inferior las de 48 horas. En el margen izquierdo se encuentra la incubación en equilibrio, mientras en el extremo derecho se exponen las incubaciones diferenciales. Para más detalle ver el texto.

Símbolos:

o-o dilución final del suero 1/1,500

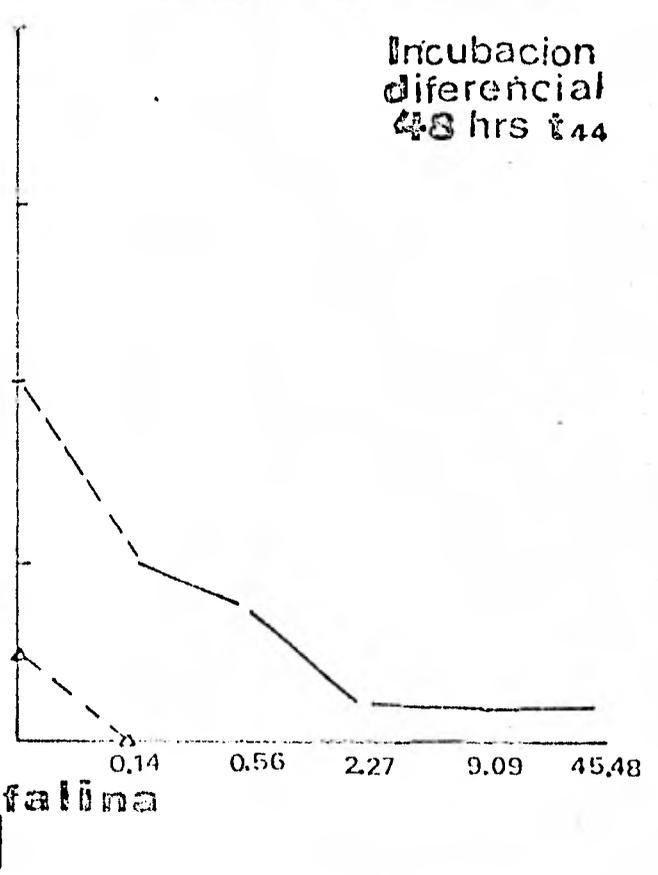
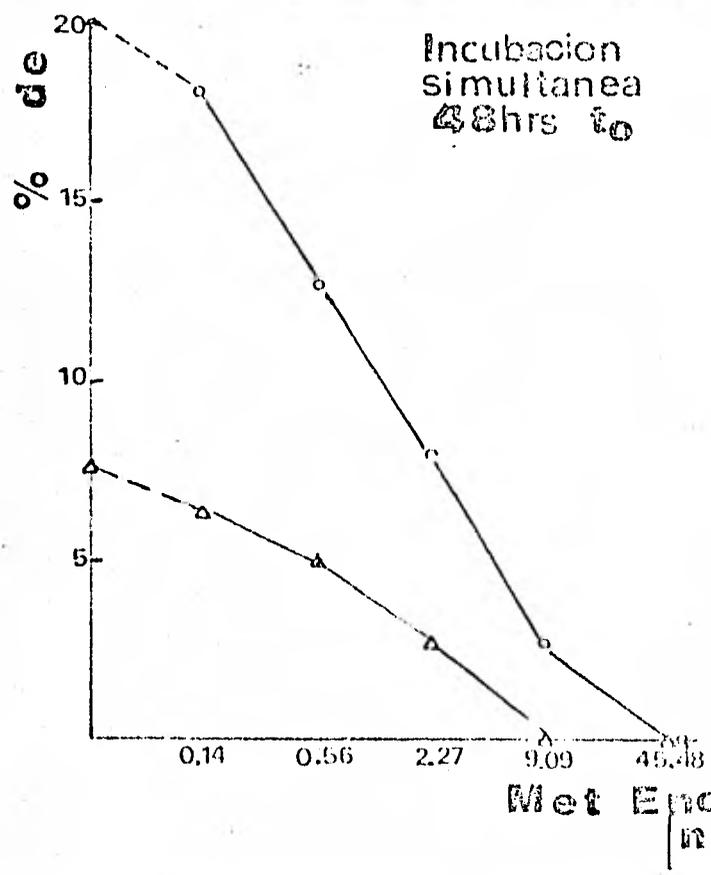
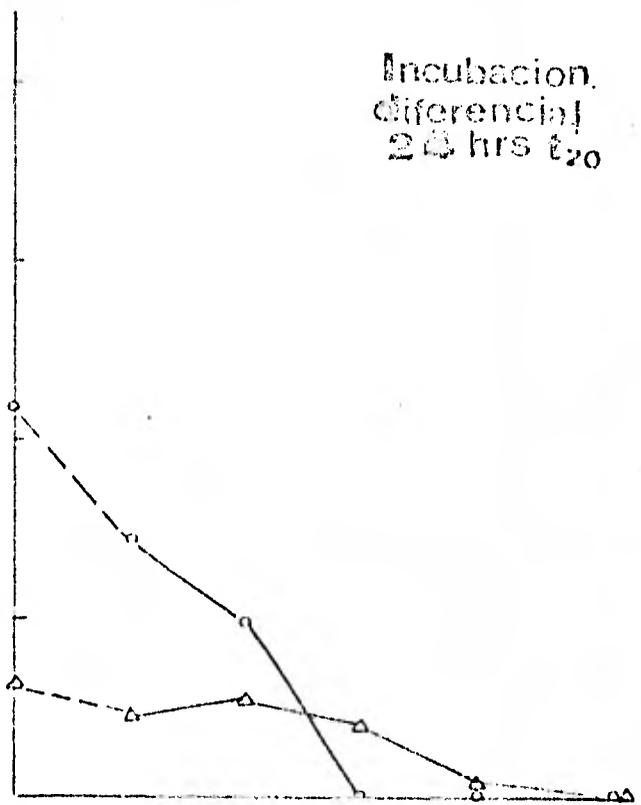
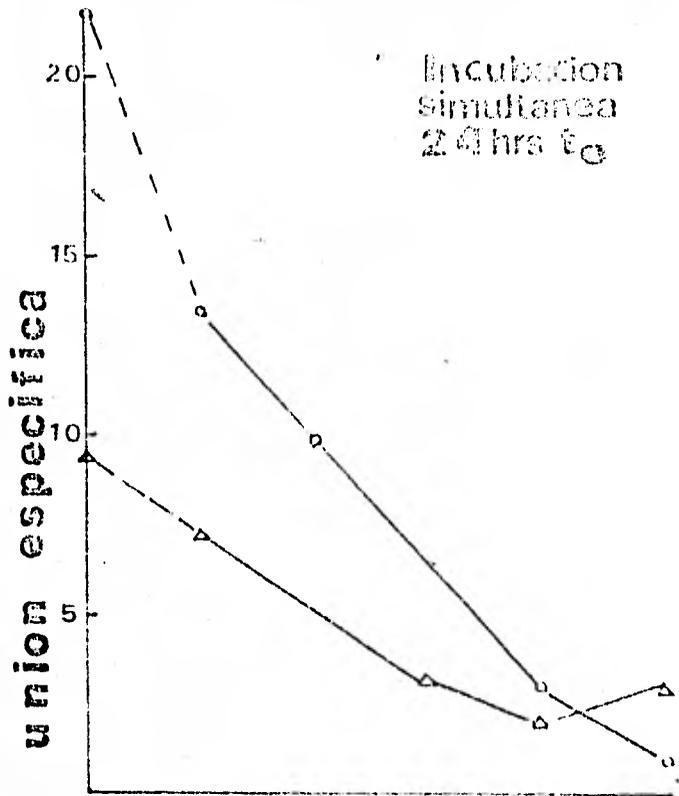
Δ-Δ dilución final del suero 1/4,000

cuentran fuera del equilibrio, tendremos que la unión inespecífica de las primeras, es muy baja, llegando a ser de 3 a 4%, esto significa aproximadamente una disminución de un orden de magnitud en éste valor, en relación a las incubaciones diferenciales. Este permite tener un ensayo claro en ambos casos de incubaciones simultaneas.

Comparando los valores de precipitación del carbón activado-dextrana, se tendrá que éste dato se incrementa en las incubaciones diferenciales, y que va en aumento conforme se incrementa el tiempo, caso que no se nota en las incubaciones simultaneas, tanto en tiempos de incubación cortos, como 24 horas, como aquellos que son largos como de 48 horas.

Para el caso de los sueros de la Met-Enc, se tiene que únicamente uno de los sueros obtiene buenos resultados, éste suero es el C14(160), el suero C14(75) aunque posee valores de unión específica más bajos es posible desarrollar un RIE con él. El C14 (160) tiene un comportamiento similar al suero de Leu-Enc, en que se nota un comportamiento atenuado para las incubaciones diferenciales, en que si bien se tiene un aumento en los valores de unión inespecífica, no son tan altos como los del suero C8(60) ó C8 (45), pues aumenta de 3 a 4% en las incubaciones simultaneas de 7 a 8% en las incubaciones diferenciales. En las incubaciones simultaneas se tiene un aumento en el porciento de unión de radioligando, sin que exista ninguna diferencia entre los dos tiempos de incubación (figura 21).

Conejo 14 (100)  
Met Enc



Met Encefalina  
(ng)

FIGURA 21.- Condiciones de Incubación para Met-Enc.

Se probaron cuatro condiciones de incubación para los sueros C14(75), C14(135) y C14(160). La figura unicamente muestra los resultados obtenidos para el suero C8(60). Se realizan dos incubaciones diferenciales una a 24 horas, agregando el radioligando después de 20 horas ( $T_{20}$ ) después de haber agregado el ligando frío, e incubando por 4 horas más a 4°C; la segunda incubación diferencial se realizó a 48 horas ( $T_{44}$ ) siguiendo el procedimiento anterior. Por otra parte, se realizaron incubaciones en equilibrio a 24 y 48 horas, agregando el ligando y el radioligando simultaneamente. Las gráficas estan expresadas como porcentaje de unión específica (unión total - unión no específica, expresado como porcentaje del radioligando total agregado) vs. la cantidad de Enc fría agregada al ensayo. En la parte superior se encuentran las incubaciones realizadas a 24 horas y en la parte inferior las de 48 horas. En el margen izquierdo, están las incubaciones simultaneas, mientras en el extremo derecho se exponene las incubaciones diferenciales.

Símbolos:

o-o dilución final del suero 1/1,500

Δ-Δ dilución final del suero 1/1,400

Para todos los casos, tanto para el C8(60), C8(45) y C14(160) se tiene que el mejor tipo de incubación es la simultanea, no obteniéndose beneficios con las incubaciones diferenciales, en que se esperaba un aumento en la sensibilidad, y si bien se tuvo un decremento radical en la precisión. Puesto que los resultados para ambos tipos de incubaciones simultaneas son semejantes, se opto por utilizar la incubación a 24 horas, que consume menos tiempo.

## F.- Sensibilidad y Precisión

Un valor de importancia que es necesario determinar para todo RIE, es la sensibilidad, ya que por medio de ésta, se obtiene la mínima cantidad de Enc detectada por ensayo.

De los datos de la optimización de las condiciones de incubación, ( figuras 20 y 21) pueden extraerse un valor estimativo de la sensibilidad, no se puede dar un valor exacto, debido a que los intervalos de valores de ligando libre son muy amplios. Pero esto no impide dar un valor aproximado de la sensibilidad, encontrando que éste valor para los tres sueros de Leu-Enc, C8(45), C8(60) y el C8(90), poseen una sensibilidad por arriba de los 81 pg, siendo muy similar la sensibilidad para el suero C8(60) y C8(45), mientras que la sensibilidad para el suero C8(90) es un poco menor comparada con los otros dos sueros. Mientras que para la Met-Enc, se observa que la mayor sensibilidad se obtiene para el suero C14(160), siendo ésta menor al mínimo valor probado o sea que es menor a 142 pg. Los otros dos sueros tienen una sensibilidad ligeramente mayor a éste valor, siendo entre los dos sueros restantes el de mayor sensibilidad el C8(75).

Para definir el valor más preciso de la sensibilidad para ambos sueros, o sea el C8(60) y el C14(160), se realizó un ensayo con los intervalos de valores más pequeños. El valor obtenido para la sensibilidad de ambos sueros, se encuentra alrededor de los 100 pg. Para más detalle ver las figuras 22 y 23 que se encuentra esquematizado una curva patrón para cada suero.

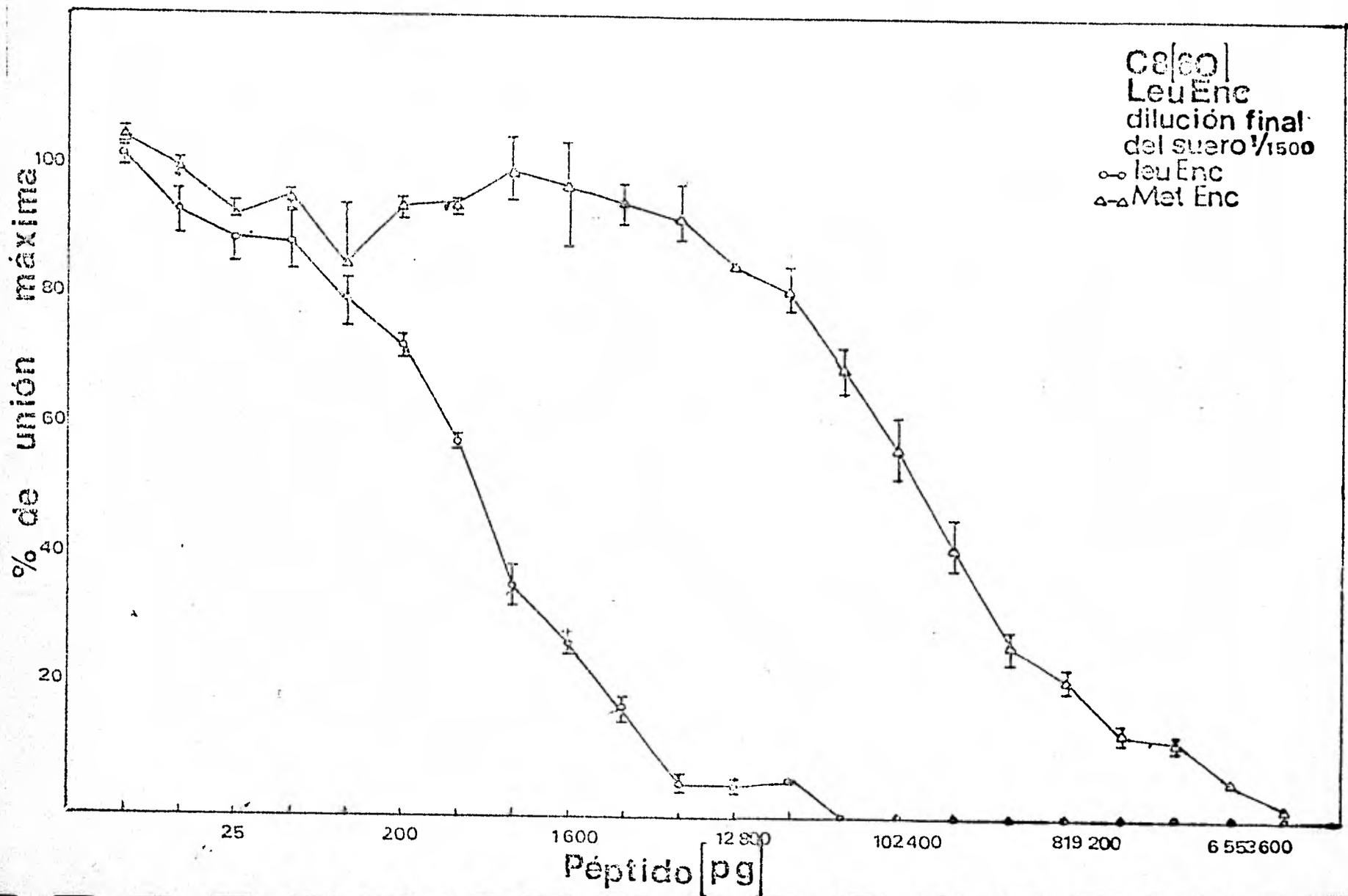


FIGURA 22.- Sensibilidad y Especificidad para Leu-Enc.

La gráfica muestra la curva de desplazamiento con Leu-Enc y con Met-Enc. La curva está expresada como porcentaje de unión - máxima es decir la unión específica para cada punto con respecto al control de unión máxima o sea aquel en el que no contiene ligando frío, expresado en porciento, contra la cantidad de péptido frío. La dilución final del suero es de 1/1,500. La sensibilidad del ensayo es de aproximadamente 100 pg. Conjuntamente se muestra el desplazamiento ocasionado por la Met-Enc. Hay que hacer notar que la sensibilidad del ensayo se encuentra al 80% de unión máxima, que está por debajo de la zona de interferencia con los demás análogos de las Encefalinas. Observando la curva de desplazamiento con Leu-Enc tenemos una pequeña meseta entre 6,400 a 51,200 pg de péptido agregado, pero este fenómeno no tiene gran importancia debido a su valor de unión máxima.

Si los datos son graficados en una forma logit ( $\ln B/F$ ) contra el logaritmo de la dosis o de péptido agregado, se obtienen curvas paralelas para el desplazamiento con Leu-Enc y de Met-Enc. Determinando de ésta forma que el anticuerpo reconoce el determinante antigénico similares, pero su afinidad por ellos es diferente.

Símbolos:  $\bar{I}$  significa Intervalo de valores.  
 o-o Leu-Enc  
 $\Delta-\Delta$  Met-Enc

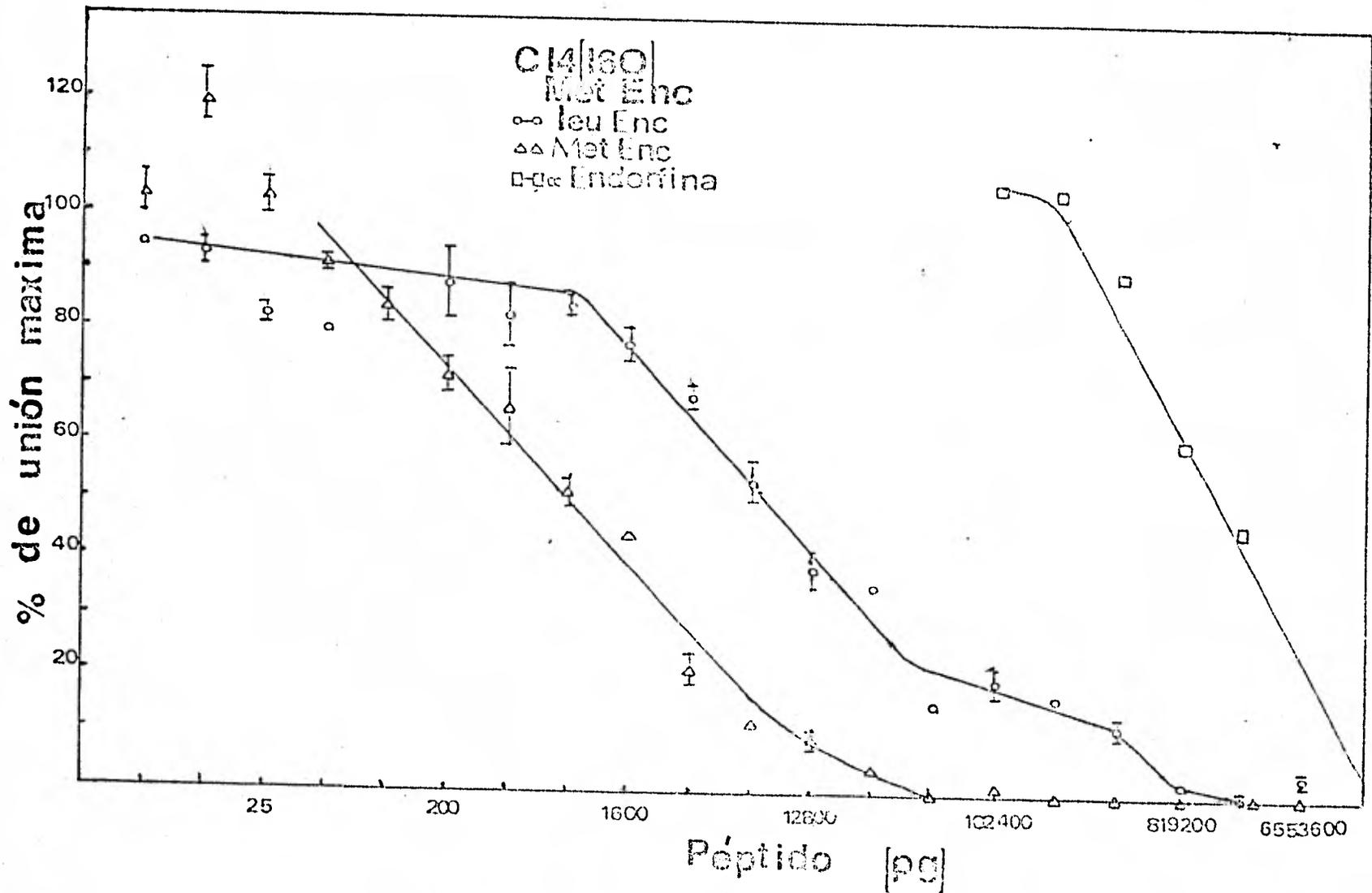


FIGURA 23.- Sensibilidad y Especificidad para Met-Enc.

La gráfica muestra la curva de desplazamiento con Leu-Enc y con Met-Enc,  $\alpha$ -End. La curva está expresada como porcentaje de unión máxima contra la cantidad de péptido frío agregado al ensayo. La sensibilidad y la especificidad se realizaron para el suero -- C14(160), a una dilución final de 1/1,500. Se observa la curva de desplazamiento con Met-Enc podemos ver que la sensibilidad se encuentra a los 100 pg de péptido frío. Teniendo un intervalo de trabajo de 100 pg a 6,400 pg.

Símbolos:        Significa intervalo de valores, en caso de no existir diferencia entre los valores unicamente se señala el punto sin intervalo.

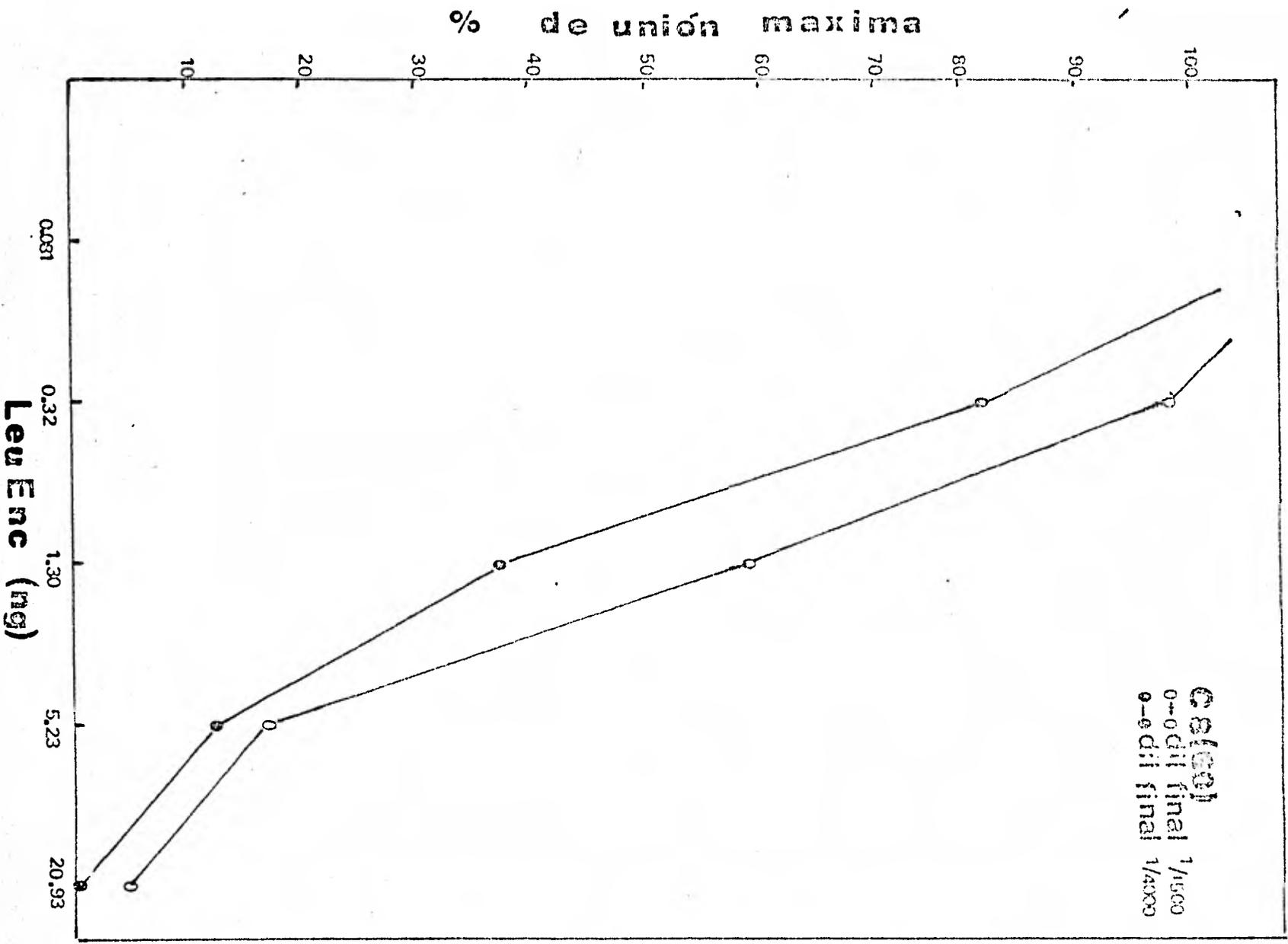
o-o Leu-Enc

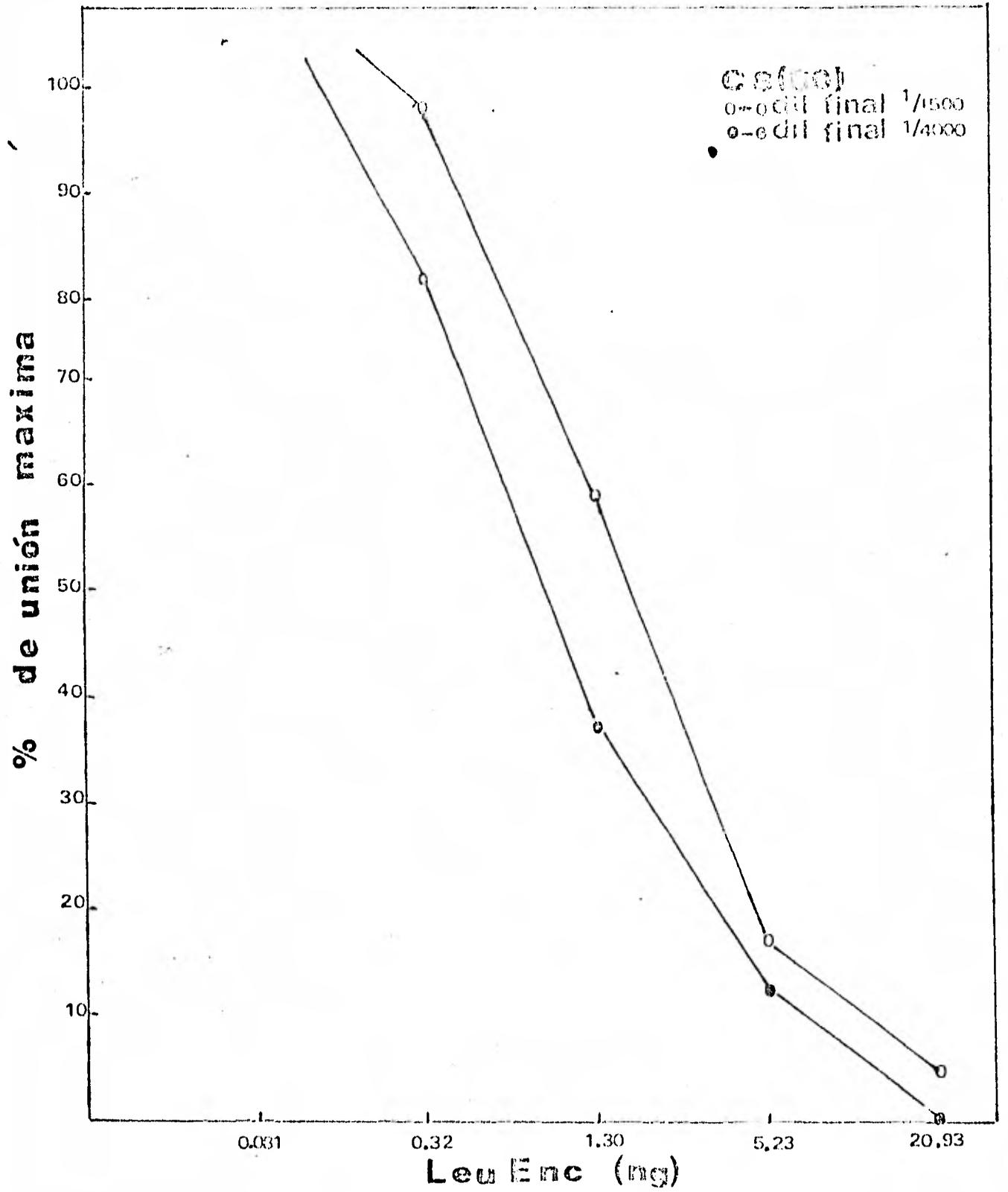
$\Delta$ - $\Delta$  Met-Enc

$\square$ - $\square$   $\alpha$ -Endorfina

La dilución del suero es un factor importante para determinar la sensibilidad del ensayo. De la figura 24 se puede observar que las curvas de dilución a 1/1,500 tienen un forma sigmooidal, mientras que las curvas de diluciones 1/4,000 no acaban de completarla, lo que le da a ésta última dilución una mayor sensibilidad, pero existe una pérdida de la precisión, encontrándose que el menor error introducido es para las menores diluciones del suero, así como el mejor intervalo de trabajo. Las sensibilidades anteriormente expresadas, se obtuvieron a un dilución final del suero de 1/1,500 para ambos sueros. Para las diluciones 1/4,000 se observa un decremento en la precisión, siendo muy notable para el suero C14(160) en que el intervalo de valores es de poca confiabilidad, puesto que la curva se encuentra por debajo del 10% de unión específica. Siendo ésto último esperado si se observan las curvas de titulación (figura 14).

Del ensayo a intervalos pequeños de ligando frío, puede obtenerse otra observación de importancia, y ésto es el comportamiento del anticuerpo a diferentes cantidades de ligando frío. Como se observa en la figura 22, en la curva de desplazamiento de Leu-Enc fría para el suero C8(60) no posee puntos de ambigüedad, ésto es, que a un mismo porciento de unión máxima, no existen dos o más valores de ligando frío. De presentarse fenómenos de ésta naturaleza, traería como consecuencia que el intervalo afectado no pueda ser utilizado y ésto fenómeno trae aparejado una disminución de la sensibilidad. De forma análoga se puede extraer de la figura 23, que para el suero C14(160) no posee puntos de ambigüedad.





● (●) (●)  
○-dil final 1/1500  
●-dil final 1/4000

% de unión maxima

Lew Enc (mg)

0.031 0.32 1.30 5.23 20.93

## FIGURA 24.- Efecto de la Concentración del Suero.

La gráfica muestra la unión máxima a dos diluciones del suero C8(80) y C14(160). Para la dilución final del suero de 1/4,000 se tiene que ésta posee la mayor sensibilidad, debido a que el intervalo probado aún no completa la forma sigmoidea característica de estas curvas. Si se observa detenidamente, alrededor del 50% de unión máxima, la cual es la región de trabajo de un RIE, pues posee la mayor precisión, se tiene que la curva a una dilución final del suero 1/4,000, supera a la curva del suero a la dilución final de 1/1,500.

Símbolos: o-o dilución final del suero; 1/1,500

o-o dilución final del suero; 1/4,000

Por otra parte se calcula la precisión para ambos ensayos.

Este valor es obtenido de las figuras 22 y 23 de los intervalos para un punto que es interpolado inicialmente a la curva patrón y de ahí al eje de las abscisas. Con este valor se puede predecir la confiabilidad de una determinación, y los intervalos en los que probablemente se encuentre el valor real. Obteniendo-se que para el RIE de Leu-Enc se tiene un valor de  $-80, \pm 160$  pg mientras que para el RIE de Met-Enc es de  $-120, \pm 160$  pg.

#### G.- Especificidad de los Sueros.

La especificidad se determinó una vez que se optimizaron las condiciones de máxima sensibilidad.

Debido a la existencia de diversas moléculas que poseen ya sea en forma parcial o total el determinante antigénico contra el que están dirigidos los anticuerpos, se tiene que proceder a determinar la especificidad de cada suero para cada una de las moléculas, esto es determinar la proporción en que cada molécula análoga, compite con el ligando específico por el sitio activo del anticuerpo.

En el caso de la Leu-Enc, se probaron cuatro sustancias análogas, que son: Met-Enc,  $\alpha$ -Endorfina, Tir-Gli-Gli y Tir-Arg. Dichas sustancias poseen una secuencia de aminoácidos semejante a la Leu-Enc, que pueden competir por los sitios del anticuerpo. Los resultados de este ensayo se encuentran en la tabla 5 y la figura 22, en las que se representan los datos obtenidos. En la figura 22 se tiene una curva de desplazamiento con Leu-Enc y otra con Met-Enc, encontrándose que la curva de desplazamiento posee una sensibilidad de 100 pg y un intervalo de trabajo de 100 a 6,400 pg, mientras que la curva de desplazamiento con la Met-Enc posee una sensibilidad de 25,600 pg, lo que significa que se necesitan 256 pg de Met-Enc para desplazar un pg de Leu-Enc. En la tabla 5 se tiene que el porcentaje de reconocimiento del suero C8(60) para la Met-Enc, es de 0.33%, el que permite diferenciar a ambas Enc. Por otra parte este suero no reconoce a la  $\alpha$ -Endorfi-

TABLA 5.- Sensibilidad; Especificidad.

En la tabla se muestran los diferentes datos obtenidos de los ensayos realizados con el suero C8(60) y C14(160), con Leu-Enc, Met-Enc,  $\alpha$  Endorfina, Tir-Gli-Gli, Tir-Arg.

Suero	Dilución final del suero	Sustancia	Sensibilidad (pg)	Péptido 80% (logit) (pg)	Reconocimiento %	Intervalo útil (% Unión máxima)
C8(60)	1/1,500	Leu-Enc	100	115		
		Met-Enc	25,600	24,000	0.33	<85
		$\alpha$ -End			0.0007	<83.2
		Tir-Gli-Gli			0.0007	<84.0
		Tir-Arg				<84
C14(160)	1/1,500	Met-Enc	100	160		
		Leu-Enc	1,400	1,200	8.88	
		$\alpha$ -End			0.1	<100
		Tir-Gli-Gli			0.0015	<100
		Tir-Arg			0.0015	<100

na, ni a la Tir-Gli-Gli y Tir-Arg, las cuales dan líneas horizontales por arriba del 83% de unión máxima, y de ésta forma inutiliza esa parte del ensayo que está expresado como rango útil en la tabla 5. Hay que hacer notar que la sensibilidad para este suero se encuentra por debajo del límite de interferencia. Observando las curvas de desplazamiento tanto de la Leu-Enc como de Met-Enc para el suero C8(60), tenemos que son paralelas, dato confirmado al realizar gráficas del tipo logit ( $\ln U/L$ ) contra log de la dosis de péptido agregado, en que se tienen curvas paralelas, demostrando que se tienen determinantes antigénicos semejantes, pero que difiere la afinidad del Ac por ellos.

En el caso del suero C14(160), se probaron la Leu-Enc, Endorfina, Tir-Gli-Gli y Tir-Arg obteniéndose la figura 23, y los datos de la tabla 5. Esta figura muestra que el anticuerpo únicamente reconoce a la Leu-Enc y a la  $\alpha$  Endorfina. Ambas curvas son paralelas a la curva patrón, por lo que poseen determinantes antigénicos similares, pero difiere la afinidad del suero por ellos. La curva de desplazamiento con la Leu-Enc en el intervalo por arriba del 85% de unión máxima, pierde su paralelismo con la curva patrón, mientras que aproximadamente por debajo del 20% ambas curvas presentan un cambio en la pendiente. Este suero reconoce en 8.88% a la Leu-Enc que es un valor mayor que el obtenido por el suero C8(60) para la Enc análoga, además reconoce a la  $\alpha$  Endorfina en 0.1%. Por ello se requieren 11.2 pg de Leu-Enc para desplazar 1 pg de Met-Enc. Por otra parte no existe ninguna interferencia con los demás péptidos probados. El intervalo de trabajo se extiende de los 100 pg a 6,400 pg aproximadamente.

Representando los datos tanto del desplazamiento con Met-Enc y  $\alpha$  Endorfina para el suero C14(160), en gráficas del tipo logit, corroboran el paralelismo de las curvas en los intervalos preestablecidos. Hay que hacer notar que para el C8(60) como para el C14(160), una disminución en el número de aminoácidos para cualquiera de las Ac, no lo reconocen como Ag.

## II.- Determinación de la cantidad de Encefalina en Tejido Nervioso.

Los resultados que se obtienen de la purificación parcial de las Enc, en el experimento para la determinación de las condiciones de trabajo, se muestran en la figura 25. En ella se observa que la Enc no eluye cuando la columna es lavada con el HCl 0.1 N, y que la mayor parte de ésta eluye en los primeros 5 ml, cuando la columna es lavada con metanol al 90%, y muy poca de la Enc se obtiene en los siguientes 5 ml. Los datos expresados en la gráfica, son el resultado de cuatro columnas montadas y lavadas bajo el mismo procedimiento. La recuperación de las encefalinas en estas columnas es de  $78 \pm 7.5\%$ . Existe una dificultad para la mantención del flujo constante a 1 ml/min, por éste motivo se regula éste cuando la columna se lava con Metanol al 90% y se coteja nuevamente cuando se equilibra con el HCl 0.1 N. Basándose en los resultados obtenidos, se determinó excluir con 40 ml de HCl 0.1 M y eluir a las encefalinas únicamente con 10 ml de metanol al 90%.

Se calculó la recuperación de las muestras biológicas, una vez que fueron evaporadas a sequedad y resuspendidas en un amortiguador de fosfatos, siendo éste valor de  $88.8 \pm 4.11\%$ , dato que se obtuvo de 4 casos. El volumen en que fueron resuspendidas las muestras, se obtiene al realizar los cálculos basados en la necesidad de agregar 100 ul de muestra al ensayo, y que éste valor, se encuentre dentro del intervalo de trabajo. Los cálculos están basados en los datos reportados en la literatura (Yang et al 1978). Conjuntamente se realizó la medición de pH una vez que las muestras son resuspendidas. Los resultados se encuentran resumidos -

% de <sup>3</sup>Hencefalina eluida

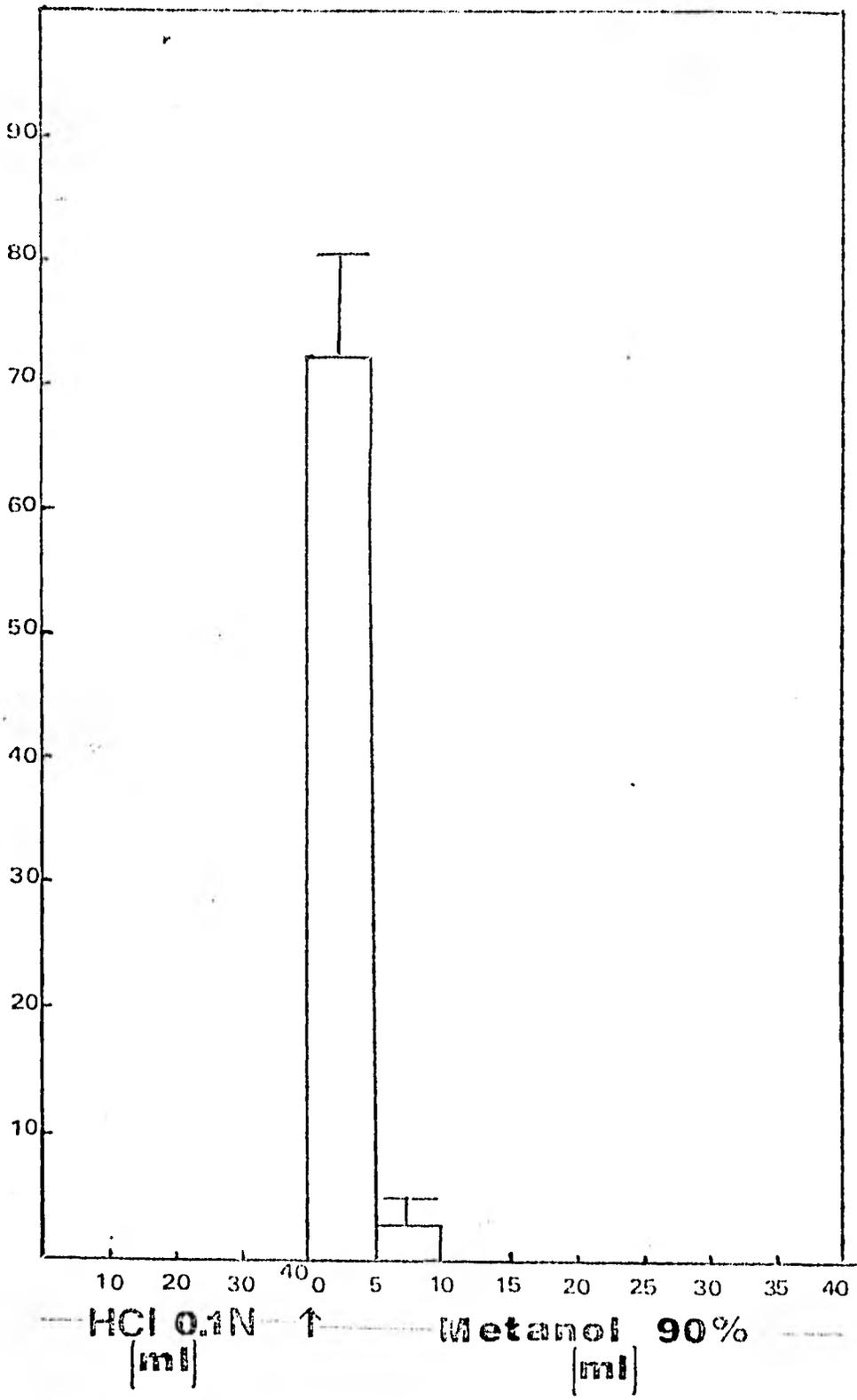


FIGURA 25.- Recuperación de Encefalina de Columnas de Amberlita KAD-2.

La gráfica muestra el procedimiento seguido para determinar los parámetros de la purificación parcial de las Enc. Se utilizó un extracto crudo de tejido al que se agregó Enc  $^3\text{H}$  (50% Leu-Enc y 50% Met-Enc). Se lava con 40 ml de HCl 0.1 N, recolectando fracciones de 10 ml. Se observa que la Enc permanece adsorbida a la resina. Posteriormente se eluye la Enc con 40 ml de Metanol al 90%, recolectando fracciones de 5 ml.

en la tabla 6. De ellos se observa que el amortiguador de fosfatos 0.02 M hasta ahora usado, no es capaz de amortiguar el pH de la fracción sobrenadante, en ninguno de los 5 casos que se probaron; mientras que la fracción purificada por amberlita poseía un pH de 7.4. Posteriormente se ensayo un amortiguador con una concentración de 0.2 M a pH 7.4, resuspendiendo las muestras en 500  $\mu$ l, obteniéndose que la fracción sobrenadante no podía ser amortiguada, mientras que la fracción parcialmente purificada poseía un pH de 7.4. Debido a que ninguno de los dos amortiguadores es capaz de amortiguar el pH ácido de la muestra, se decidió realizar una valoración con NaOH 1 N. De los datos extraídos de la tabla 6, se determinó resuspender las muestras de la fracción sobrenadante en 440  $\mu$ l de amortiguador fosfatos 0.2 M y 60  $\mu$ l de NaOH 1 N.

Las curvas patrón de los RIE de los sueros C8(60) y C14 (160), realizadas a las dos concentraciones de fosfatos, son similares tanto para las curvas de Leu-Enc como para la Met-Enc realizadas simultáneamente. El pH de las muestras ensayadas a su concentración de 0.02, afecta definitivamente la formación del complejo Ag-Ac, de forma tal, que los valores en porcentaje de desplazamiento, no entran en el intervalo de trabajo, mientras que las muestras ensayadas con el amortiguador de una concentración más alta, no presentaron ningún problema.

En la figura 26, se muestran los resultados obtenidos al comparar las dos formas de extracción. Puede verse que los valores de la purificación parcial por medio de la amberlita, son superiores que los datos de la fracción cruda. La posible interferencia,

TABLA 6.-

Valoración de los pH de las muestras de tejido.

		Condición		pH.
1)	20 ul de Ac Acético + 400 ul Bufer PO <sub>4</sub>		0.02M	3
2)	5 ul de Ac Acético + 400 ul Bufer PO <sub>4</sub>		0.02M	5
3)	Amigdalá 1	+400 ul Bufer PO <sub>4</sub>	0.02M	5.5
4)	Amigdalá 2	+200 ul Bufer PO <sub>4</sub>	0.02M	5.0
5)	Hipotálamo 1	+400 ul Bufer PO <sub>4</sub>	0.02M	6.5
6)	Hipotálamo 2	+400 ul Bufer PO <sub>4</sub>	0.02M	4.5
7)	Septum 4	+400 ul Bufer PO <sub>4</sub>	0.02M	5.0
8)	Estriado 7	+400 ul Bufer PO <sub>4</sub>	0.02M	5.5
9)	5ul Ac Acético	+400 ul Bufer PO <sub>4</sub>	0.2M	5.0
10)	100ul de 9)	+400 ul Bufer PO <sub>4</sub>	0.2M	5.5
11)	100ul de 9)	+400 ul Bufer PO <sub>4</sub>	0.2M	5.5
12)	2ul Ac Acético + 60ul NaOH 1N +400 Bufer PO <sub>4</sub>		0.2M	9.5
13)	5ul Ac Acético + 60ul NaOH 1N +400 Bufer PO <sub>4</sub>		0.2M	7.0
14)	10ul Ac Acético + 60ul NaOH 1N +400 Bufer PO <sub>4</sub>		0.2M	5.5
15)	100ul de 12)	+400 ul Bufer PO <sub>4</sub>	0.2M	8.0
16)	100ul de 13)	+400 ul Bufer PO <sub>4</sub>	0.2M	7.5
17)	100ul de 14)	+400 ul Bufer PO <sub>4</sub>	0.2M	7.0
18)	0ul Ac Acético	+400 ul Bufer PO <sub>4</sub>	0.2M	7.4
19)	2ul Ac Acético	+400 ul Bufer PO <sub>4</sub>	0.2M	6.5
20)	2ul Ac Acético + 60ul NaOH 1N +400 Bufer PO <sub>4</sub>		0.2M	10.01
21)	2ul Ac Acético + 60ul NaOH 1N +400 Bufer PO <sub>4</sub>		0.2M	8.5
22)	100ul de 20)	+400 ul Bufer PO <sub>4</sub>	0.2M	10.0
23)	100ul de 21)	+400 ul Bufer PO <sub>4</sub>	0.2M	7.5

(continua)

## Conclusión:

2 ul de Ac Acético  
5 ul de Ac Acético  
si son amortiguados con la NaOH y el Bufer 0.2M  
10 ul de Ac Acético  
cuesta un poco de trabajo amortiguar el pH.

24) Muestras para el ensayo + 60ul NaOH 1N +440 ul  
Bufer  $PO_4$  7.0 a 8.0

## Conclusión:

Los residuos de ácido acético se encuentran por arriba de 2 ul de acético y por debajo de los 10 ul.

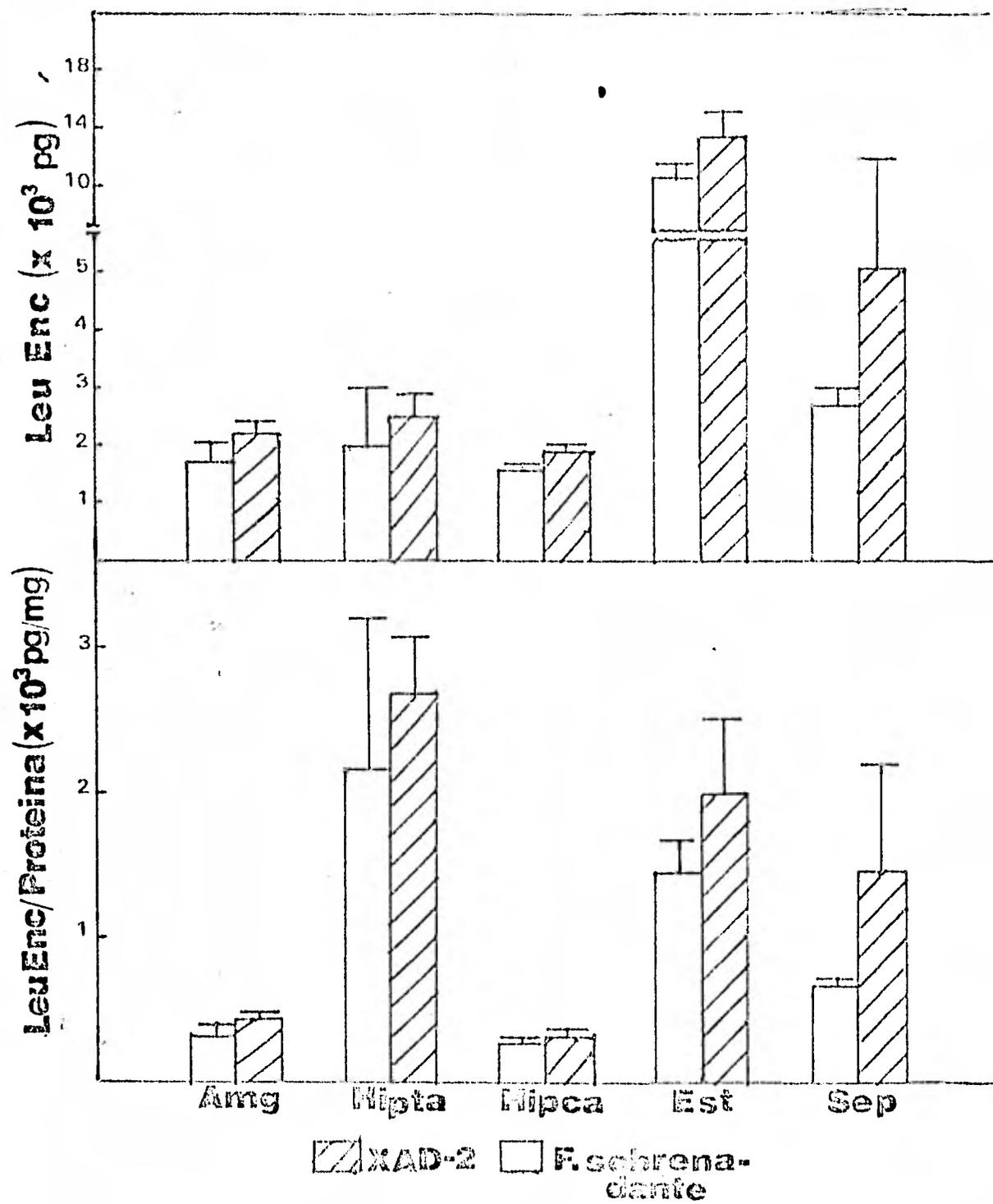


FIGURA 26.- Determinación de Encefalina en el Tejido Nervioso:  
Comparación entre la fracción sobrenadante y la  
fracción parcialmente purificada.

Se muestran los datos obtenidos en las cantidades de Leu-Enc de las siguientes regiones: Amígdala, Hipotálamo, Hipocampo, Estriado, Septo. Así mismo se compara la purificación parcial por medio de la amberlita XAD-2, con un extracto crudo de tejido. La extracción del tejido viene detallada en el texto, siendo la única diferencia entre ambas fracciones, la purificación por amberlita en uno de los casos. En la parte superior de la figura, se encuentra la cantidad de Enc por región, mientras que en la parte inferior, se encuentra la relación entre la cantidad de Enc y su contenido en proteína. Se observa que la mayor cantidad de Enc se encuentra en el Estriado, pero la proporción con las otras regiones disminuye, cuando se relaciona éste valor al contenido de proteína.

Símbolos:  fracción sobrenadante  
 fracción parcialmente purificada por Amberlita XAD-2

se debe a un reactivo utilizado en la extracción o preparación del tejido, muy bien podría ser el ácido acético, probado ya en RIE, o bien residuos de resina de amberlita. Cualquiera de las dos formas producirían un valor blanco, siendo el primer caso un valor blanco positivo. Por otra parte se obtuvieron los resultados para la cantidad de Met-Enc para las mismas muestras. En la figura 27 B<sub>1</sub> se encuentran los resultados de la cantidad de Enc en pmol y corregida por proteína. Y la mayor cantidad se encuentra en el Estriado. Conjuntamente en la figura 27 B<sub>2</sub> se muestran los resultados de la cantidad de Leu-Enc expresada en pmol/mg de proteína extraídos de los datos de la figura 26 y obtenidos a su vez por muestras parcialmente purificadas por la amberlita, de igual forma que los resultados para Met-Enc. En la figura 27 B<sub>3</sub>, se tiene la relación Met-Enc/Leu-Enc para cada región, teniendo que el Hipocampo es el que posee la mayor proporción.

Como se mencionó en los antecedentes, el encontrar un paralelismo entre una curva de desplazamiento, con otra sustancia análoga, nos da idea de la similitud en el reconocimiento del determinante antigénico por el Ac. Para ello se determinó el paralelismo existente entre los extractos del tejido y las curvas de desplazamiento para el suero C8(60) (figura 28). Si se observa, se proponen rectas que son paralelas a la curva de desplazamiento de Leu-Enc, aparentemente la desviación en cada punto es muy grande, pero graficando individualmente cada región, los puntos se ajustan perfectamente a una recta paralela a la curva de desplazamiento con el péptido frío. La gran dispersión en los datos mostrados, es la intervención de otros factores, los que se deben a la variabilidad

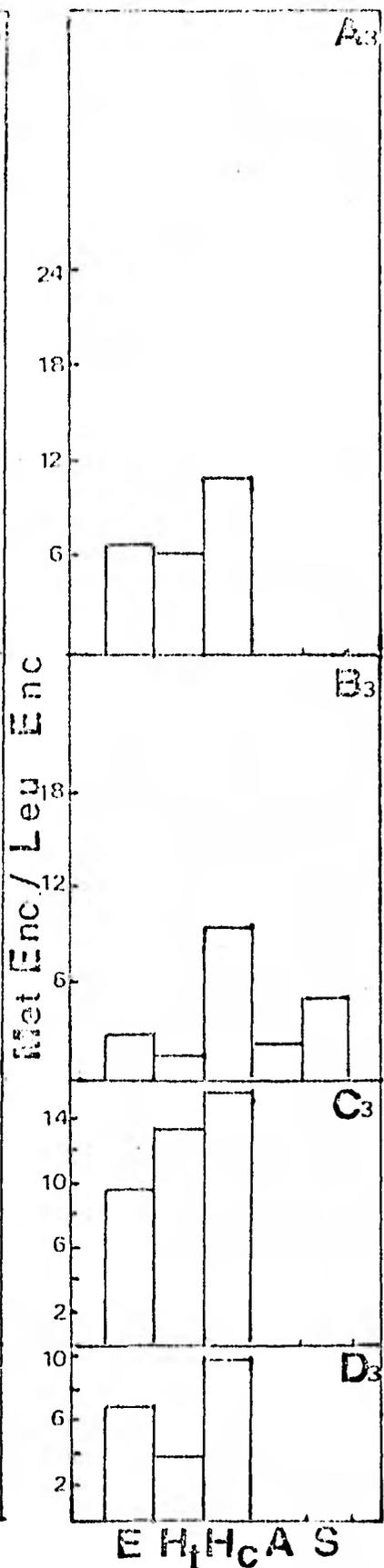
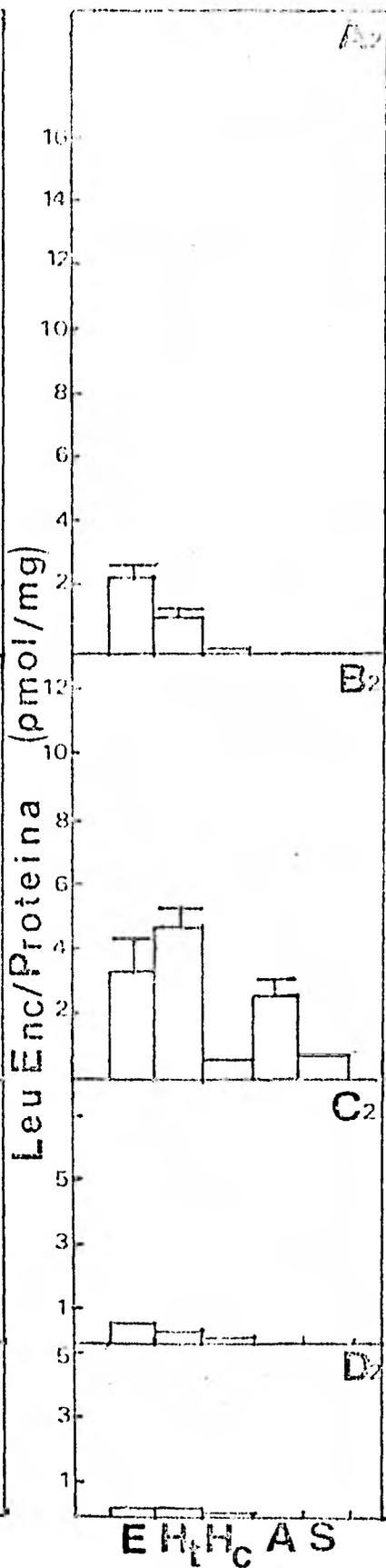
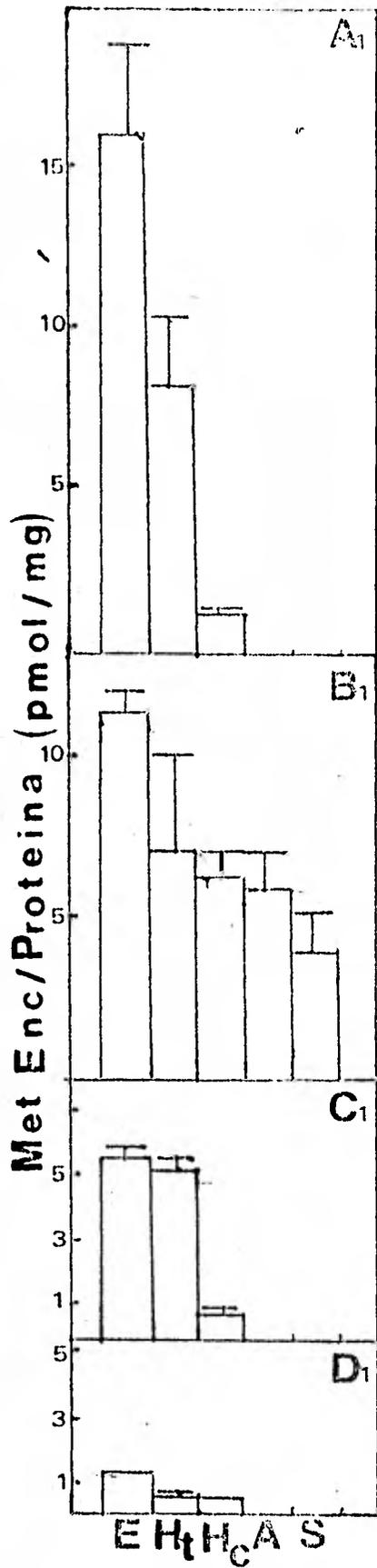


FIGURA 27.- Comparación de la Cantidad de Encefalina en el Tejido.

En la parte izquierda de la gráfica se encuentra la cantidad de Met-Enc en pmol/mg de Proteína. Se comparan los datos con los publicados por otros autores. En la parte media de la gráfica se muestra la cantidad de Leu-Enc pmol/mg de proteína, de igual forma se compara con los datos publicados. En la parte derecha se representa la relación entre Met-Enc y Leu-Enc en las diversas regiones. Hay que hacer notar que existe una variación en los datos reportados de autor a autor, pero esto no quiere decir que exista un caos dentro del campo; más bien se entiende que las técnicas actuales para la extracción de tejido, son muy diversas, que son subjetivas, además de la existencia de la variación entre autor a autor en considerar cada región y su limitación. Lo importante, es comparar los perfiles obtenidos entre los diversos autores y ver el comportamiento de la distribución de las encefalinas dentro del cerebro.

Referencias;

A<sub>1, 2, 3</sub> (Yang et al 1977), B<sub>1, 2 3</sub> (suero C8(60), C14(160),  
C<sub>1, 2, 3</sub> (Miller et al 1978a) D<sub>1, 2, 3</sub> (Gross et al 1978).

Abreviaturas:

E = Estriado, Ht= Hipotálamo, Hc=Hipocampo, A = Amígdala y  
S = Septo.

Conejo 8 [60]  
Leu Enc

Dilución del tejido

$\frac{1}{45}$   $\frac{1}{15}$   $\frac{1}{10}$   $\frac{1}{5}$   $\frac{1}{2.5}$

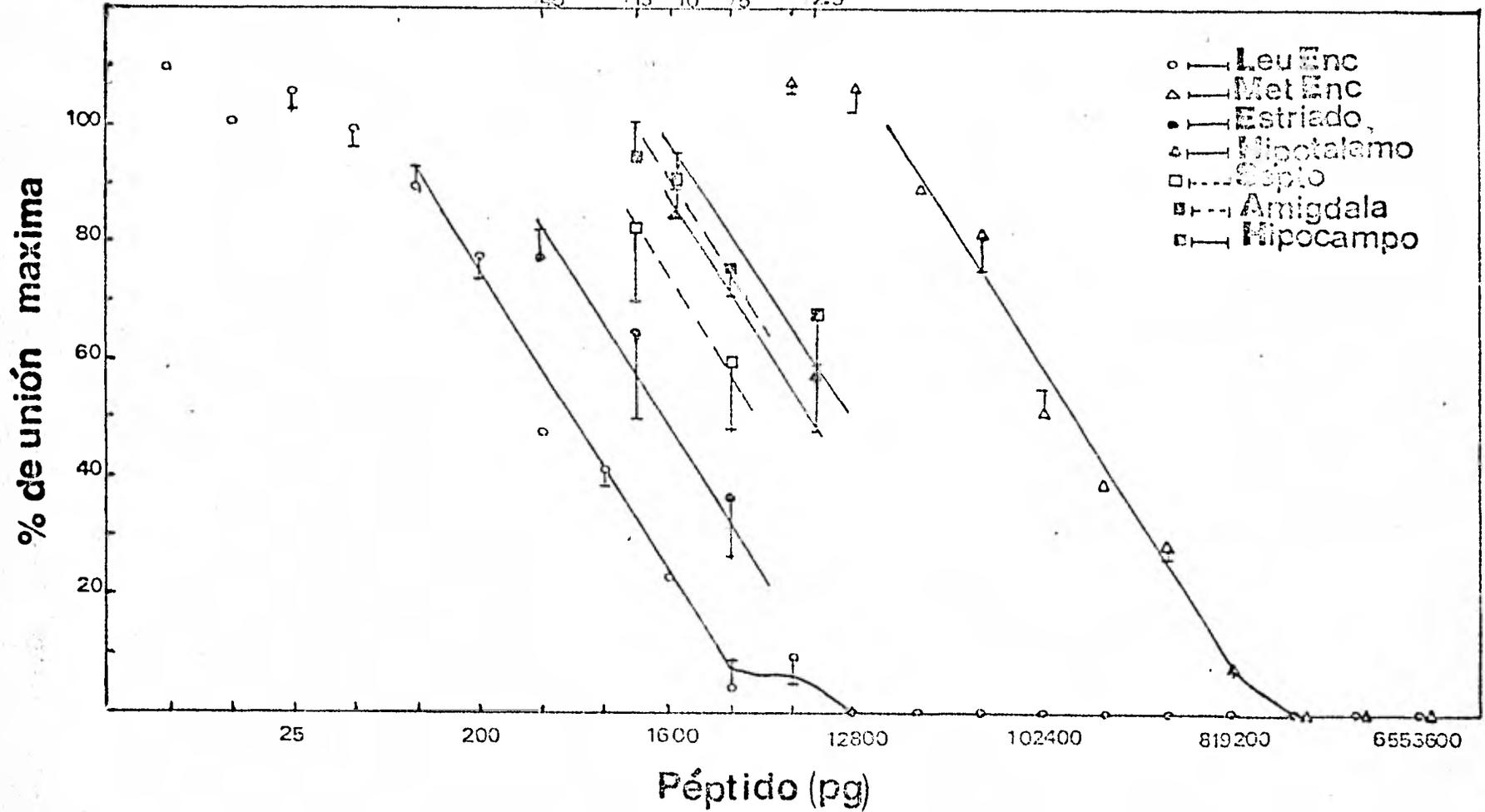


FIGURA 28.- Determinación del Paralelismo de los Extractos de -  
Tejido: Leu-Enc.

La curva está expresada como el porcentaje de unión máxima -  
contra la cantidad de péptido frío agregado, o bien contra la di-  
lución del tejido. Las rectas son el promedio de cuando menos -  
tres animales, todos ellos realizados por duplicado y se expresan  
como intervalos de valores. Las rectas son paralelas a la curva  
patrón. Los datos graficados aquí son los datos obtenidos del -  
método de extracción por amberlita (XAD-2).

biológica, es decir aún cuando los animales escogidos estaban en un intervalo determinado de peso, la diferencia en el tamaño del cerebro era notable, aunado a esto se encuentra un posible error en la disección.

De igual forma que para la Leu-Enc, se determinó el paralelismo de los extractos de tejido para Met-Enc, dando como resultado la figura 29. En ella se puede apreciar que los extractos de tejido tiendan a comportarse de una forma similar que a la curva de desplazamiento con Met-Enc. La dispersión de los datos nuevamente se debe al mismo efecto que en el ensayo de Leu-Enc, ya que son las mismas muestras probadas en ambos RIE.

**C 14 [160]**  
**Met Enc**

Dilución del tejido

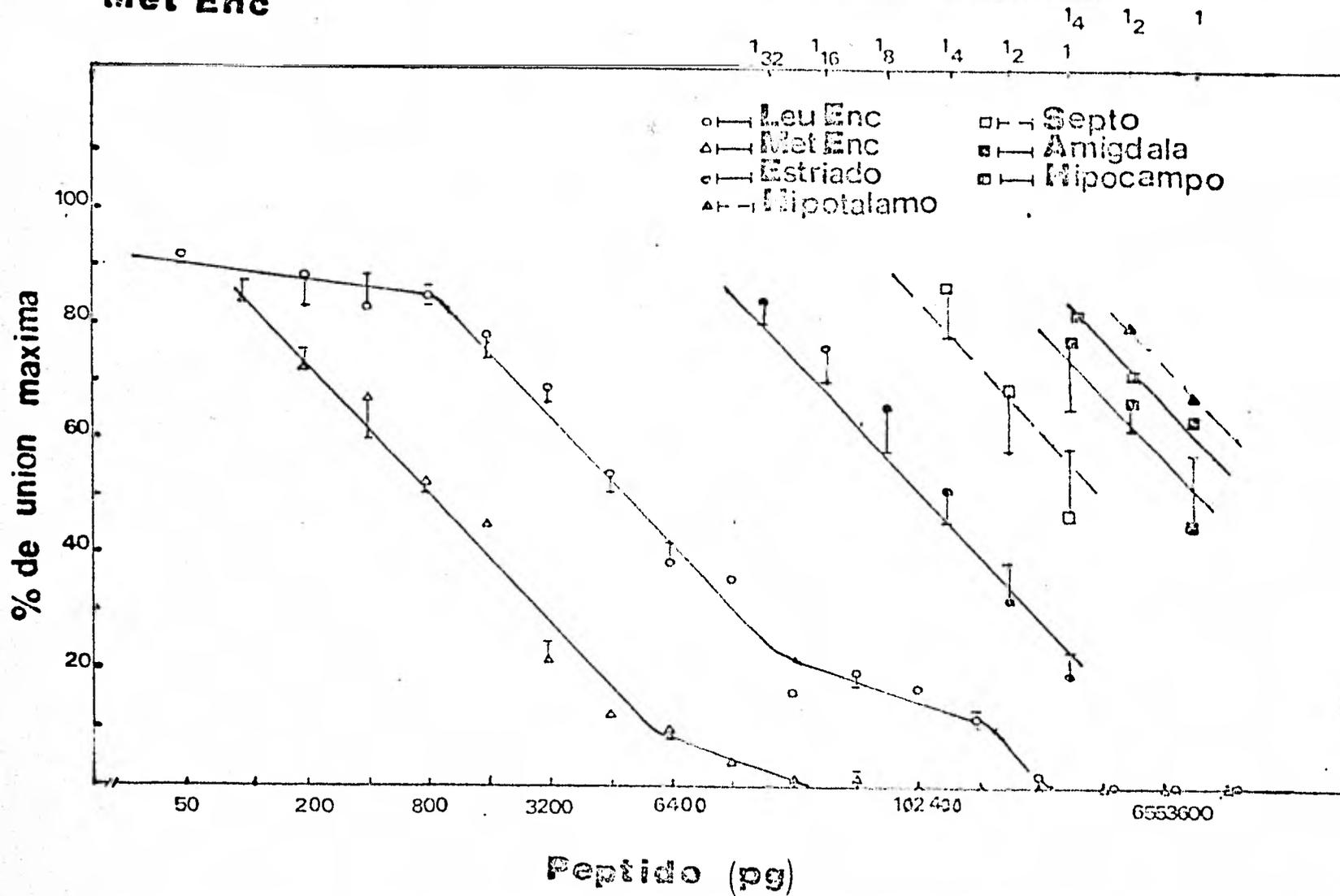


FIGURA 29 .- Determinación del Paralelismo de los Extractos de -  
Tejido: Met-Enc.

Al igual que la figura 28, la curva expresa como el porcentaje de unión máxima contra la cantidad de péptido o bien contra - la dilución del tejido, demuestra un comportamiento paralelo de - los extractos de tejido de diversas regiones del cerebro de rata. Las rectas son de cuando menos el promedio de tres datos.

## V.- Discusión.

Para el estudio del papel biológico que cumplen las Enc dentro del organismo, se requiere una serie de métodos que aporten datos sobre su regulación, síntesis, cambios metabólicos etc. Las técnicas hasta ahora utilizadas en Neurobiología para el estudio de los Neurotransmisores tradicionales, no poseen las características necesarias para el estudio de los péptidos opioides, ya que su estructura y concentración en el tejido, provocan que la resolución de las técnicas utilizadas hasta entonces, sean insuficientes para el estudio de éstas moléculas. En los últimos años, el estudio de los péptidos opioides, ha traído aparejado el desarrollo de innumerables RIE, puesto que ésta técnica posee la ventaja de tener una alta sensibilidad aunada a la especificidad que le confieren las características del anticuerpo utilizado.

Para desarrollar un RIE confiable se debe estimar sus limitaciones y las ventajas de un determinado suero. Un paso importante es establecer la especificidad, delimitando que moléculas pueden competir por el Ac. Una molécula análoga que puede interferir en el ensayo es la Enc complementaria, a la que se emplea para obtener el suero. De los datos aportados al desarrollar el ensayo competitivo entre ambas Enc, encontramos que pequeños cambios en el quinto residuo de la Enc, como es la diferencia entre la Leu y la Met, traen que un suero sea específico hacia una u otra Enc. Este hecho lo muestra los bajos valores en el reconocimiento del C8(60) por la Met-Enc que es de 0.33%. Aunque el valor para el suero C14(160) en el reconocimiento por la Leu-Enc es mayor sien-

do éste de 8.8%, señalan conjuntamente la selectividad de ambos sueros por su inmunogeno. El ensayo con la Endorfina con ambos sueros aporta datos sobre el determinante que reconoce cada anticuerpo. Presentando únicamente una competencia por los sitios del anticuerpo del suero C14(160). El reconocimiento de la Endorfina por éste suero es explicado considerando que la Endorfina en su extremo amino posee la secuencia de la Met-Enc, el dato tan bajo de reconocimiento del suero C14(160) que es de 0.1% por la Endorfina, indica que es necesario el del quinto aminoácido libre para el reconocimiento por el anticuerpo. Los datos de reconocimiento de la Enc complementaria, así como los bajos valores de reconocimiento de la Endorfina en uno de los casos indican que se cumplió uno de los objetivos planteados inicialmente, éste es producir un RIE específico para cada Enc, teniendo de ésta forma que reconocer al Hapteno por su extremo carboxilo y no por su lado amino, ya que de ser de esta última forma, el anticuerpo reconocería de igual forma a la Enc complementaria y la Endorfina, y las demás Endorfinas.

También se probaron el tripéptido (Tir-Gli-Gli) y el dipéptido (Tir-Arg), los resultados para ambos sueros es negativo, probando de ésta forma que cuando menos uno de los productos degradativos de las Enc no interfieren en el ensayo (Malfroy et al 1978). Mientras que por otro lado, el dipéptido denominado Kiotorfina el cual parece que cumple una función importante en la liberación de las Enc, (Takagi et al 1979) por estar localizado en la misma región que éstas, no interaccionan con los anticuerpos contra las Enc. Una disminución de dos residuos de aminoácido del extremo -

carboxilo, causado por enzimas degradadoras, no alteran los resultados en extractos de muestras biológicas; además éste resultado propone la necesidad de éstos residuos para la especificidad del anticuerpo. Los productos de degradación de las Enc y la Kiotorfina son demasiado pequeños para interaccionar en el sitio activo del anticuerpo, pues se cree que el sitio activo debe ser ocupado por 5 a 8 residuos de aminoácidos. Por otra parte, el aumento en el número de aminoácidos a la Met-Enc trae como consecuencia una disminución de la especificidad, así lo muestran los resultados de la Endorfina; de igual forma la reducción en el número de aminoácidos, como es el caso de la Tir-Gli-Cli hace que éste no sea reconocido.

En la tabla 7 se muestran los diversos RIE reportados en la literatura. Si se realiza una comparación en cuanto a especificidad encontraremos que C8(60) es más específico para la Enc complementaria en más de 30 veces al RIE de Yang, 1.5 superior al de Childer, 21 veces más específico que el de Gros, 3.15 y 9.9 veces más específico a los RIE de Miller o de Rossier. Si este mismo suero se compara con el cruce de  $\alpha$ -Endorfina tendremos que no cruza con este péptido existiendo ensayos que si lo realizan. Comparando por otro lado el suero C14(160) en cuanto al reconocimiento con la otra Enc, se tiene que supera en 1.12 veces al de Yang, pero se ve superado por los RIE de Childer que es 17.6 veces más específico, 1.76, <8.8 y 44.4 más específico el de Gros, Miller, Akil respectivamente, mientras que el reconocimiento con la  $\alpha$ -Endorfina estan todos en el mismo intervalo.

TABLA 7.- Radioinmunoensayos para Encefalinas <sup>a</sup>

PEPTIDO (Antígeno) <sup>b</sup>	Animal Inmunizado y conjugado <sup>c</sup>	Radioligando y método de marcas <sup>d</sup>	Sensibilidad	Especificidad <sup>f</sup>		Referencia
				Otra En- cefalina	Endorfinas	
Met-Enc	Conejo -succinil Met-Enc +succinil hemo- cianina a poli- lisina, CDI	( <sup>3</sup> H)-Met-Enc	≤ 10 pmoles	10%	α, B (<1%)	Yang <u>et al</u> 1977, 1978
Leu-Enc	Conejo -Hemocianina, CDI	( <sup>3</sup> H)-Leu-Enc	≤ 2 pmoles	10%	α, B (<1%)	Yang <u>et al</u> 1977, 1978
Met-Enc	Conejo -Hemocianina glutaraldehido	( <sup>3</sup> H)-Met-Enc	≤ 10 pmoles	< 0.5%	B-end (neg)	Childers <u>et al</u> 1978
Leu-Enc	Conejo -Hemocianina, CDI	( <sup>3</sup> H)-Leu-Enc	≤ 1 pmol	< 0.5%	B-end (neg)	Childers <u>et al</u> 1978
Met-Enc	Conejo -ovoalbumina, CDI	MonoIodo <sup>125</sup> Met-Enc -L. perox.	≤ 20 fmoles	5%	α, B(0.1%)	Gros <u>et al</u> 1978
Leu-Enc	Conejo -ovoalbumina, CDI	MonoIodo <sup>125</sup> Leu-Enc -Cl. T.	≤ 20 fmoles	7%	α, B(0.1%)	Gros <u>et al</u> 1978
Met-Enc	Conejo -ASA,glutaralde- hido	<sup>125</sup> I-Met-Enc -Cl. T.	10 fmoles	<1%	B-end (neg)	Miller <u>et al</u> 1978a, b.
Leu-Enc	"	<sup>125</sup> I-Leu-Enc	10 fmoles	<1%	B-end (neg)	Miller <u>et al</u> 1978a
Met-Enc	"	( <sup>3</sup> H)-Met-Enc	1 pmol	0.2%	B- α (0.2-0.4%)	Akil <u>et al</u> 1978
Leu-Enc	"	( <sup>3</sup> H)-Leu-Enc	1 pmol	5%	B- α (0.2-0.4%)	Akil <u>et al</u> 1978
Leu-Enc	"	<sup>125</sup> I-Leu-Enc -Cl. T.	2 fmoles	3%	B- α (0.1%)	Rossier <u>et al</u> 1977a

TABLA 7.- Radioinmunoensayos para Encefalinas.

a.- Los datos mostrados, ejemplifican varios tipos de RIE con sueros específicos para las Enc, se muestra la relación en cuanto a procedimientos de inmunización, preparación del antígeno y sensibilidad del ensayo. Esta tabla no incluye todos los RIEs que utilizan comunmente un suero específico caracterizado con propósitos de inmunoprecipitación o inmunocitoquímica.

b.- Abreviaturas: B-end = B-endorfina; -end = -endorfina; -  
Met-Enc = Met<sup>5</sup>-encefalina; Leu-Enc = Leu<sup>5</sup>-encefalina.

c.- En primer lugar se dan las moléculas acarreadoras, y después el agente acoplante. En la mayor parte los conjugados son emulsi-  
ficados con adyuvante completo de Freund. Detalle de los protocolos de inmunización aparecen en las referencias.

Abreviaturas: CDI = i, etil 3(3dimetil-amino propil) carbodiimi-  
da, ASB = Albumina de suero bovino.

d.- Métodos de iodinación CIT = método de la cloramina T

Lperox = método de la lactoperoxidasa

e.- Cuando no se especifica en las referencias, el dato es obtenido de las curvas estandar a 20% de desplazamiento de trazador unido.

f.- Neg - negativo (no dan dato numérico).

La especificidad de ambos sueros, C8(60) y C14(160), permite realizar un adecuado reconocimiento inmunológico de las Enc en muestras biológicas. Como lo muestran las figuras 27 y 28 en que se tienen curvas paralelas entre los patrones y las de extractos de tejido, demostrando que los sueros están detectando determinantes antigénicos similares, o cuando menos, los cuales no pueden distinguirse del comportamiento de las Enc. Pero por otra parte, en que las curvas son paralelas la afinidad del Ac por éstas moléculas es distinta.

Existen muchas otras sustancias opioides que pueden interactuar con los Ac descritos, como la dinorfina, B-endorfina, D-Ala<sup>2</sup>-Enc entre otras muchas, pero las posibilidades para realizar estas pruebas por el momento están limitadas.

Un dato de importancia en el RIE es la sensibilidad, en el caso de la Leu-Enc para el suero C8(60) y para la Met-Enc con el suero C14(160), se tiene una sensibilidad de 100 pg, esto significa que pueden ser detectados 0.18 pmol de Leu-Enc y 0.26 pmol de Met-Enc por tubo, comparando los resultados con otros ensayos que utilicen Enc tritiada como radioligando, tendremos que la sensibilidad obtenida para el RIE de Leu-Enc es mayor que la reportada por Childers y col. (1978) y semejante a la reportada por Akil y col. (1978); mientras que para el RIE de Met-Enc la sensibilidad obtenida es mayor que la publicada por Yang et al (1977), Childers y col. (1978) y Akil y col. (1978). La utilización de un radioligando de alta actividad como lo sería el <sup>125</sup>I traería un aumento en la sensibilidad entre 20 y 50 veces (Gros et al 1978), y se

esperaría que la sensibilidad para los RIE desarrollados sería de 2 a 5 pg. En la tabla 7 se ve que los RIE más sensibles, son los que utilizan como radioligando el  $^{125}\text{I}$ . La utilización de éste tipo de reactivo, traería aunado un aumento en la precisión.

Aunque la sensibilidad obtenida con un radioligando tritiado es buena, para algunos casos es un factor limitante, con el fin de aumentar dicha sensibilidad, sin tener que cambiar de marca radioactiva, se realizaron las incubaciones diferenciales tanto a tiempos cortos, de 24 horas como a tiempos largos. Con estos ensayos se trajo una disminución en la precisión, sin que se aumentará la sensibilidad. Este caso, se presentó principalmente por el alto nivel de productos posiblemente radiolíticos, que no se adsorben al carbón activado, y que permanecen en forma libre o unidos inespecífica a los Ac. Este fenómeno trae como consecuencia valores altos ya sea en CPC o en URE, o en ambos, de forma tal que aumenten el ruido dentro del ensayo, interfiriendo de tal manera con la unión específica que presente un comportamiento incierto. En el caso de la Met-Enc los valores de interferencia aunque son menores, siguen existiendo productos que permanecen en la fase unida al anticuerpo, ya sea en forma libre o unida inespecífica al Ac. Hay que considerar que existe la posibilidad de que éste tipo de Ac tenga una afinidad semejante o superior por el sulfoxido de la Met-Enc, y que si bien se están formando productos que no reconoce el Ac, también se están obteniendo productos de oxidación que contrarrestan el efecto negativo de los productos radiolíticos (King y Millar 1980), estos Ac pueden ser producto del inmunogeno oxidado en el momento de la emulsificación.

Por otra parte cuando se efectúan múltiples inmunizaciones, es la producción de Ac con diferente afinidad, que puede causar muchos problemas. En la figura 19 se encuentra un suero con dos grupos de Ac con diferente afinidad, presentándose el mismo caso para toda la familia de sueros del C14. La producción de curvas bifásicas pueden ser el resultado además de otros factores que a continuación se mencionan y que refuerzan la idea de tener dos poblaciones de Ac. Este tipo de curvas bifásicas resultan cuando se toman ensayos fuera del equilibrio (Rodbard et al 1977), en nuestro caso se obtuvieron de ensayos realizados en equilibrio, coincidiendo tanto las curvas de incubación simultánea a 24 como a 48 horas. Por otra parte también se comprobó que no existe una interferencia que perturbe el equilibrio. Este fenómeno se presentaría en caso de que el tiempo de incubación, en el procedimiento de la separación entre la fase de ligando unido al Ac y el libre, fuera muy larga. Se ha demostrado que con 20 minutos de incubación de la mezcla de reacción con el carbón activado-dextrana a una concentración del doble de la utilizada en nuestro ensayo en pruebas con hormonas, no existe efecto alguno. En nuestro caso, se observaron ligeros cambios a las dos concentraciones de carbón activado-dextrana en incubaciones durante 30 minutos. Algunos aspectos teóricos de la cinética de separación de la fase libre de la unida al anticuerpo ha sido ampliamente estudiada por Rodbard y Catt (1972). En nuestro caso, la proporción de carbón activado-dextrana está calculada para que de 3 a 4% del radioligando libre quede en la fase del sobrenadante (CPC), asegurando que el tiempo de incubación como la concentración de la mezcla de separación, son las adecuadas para impedir una interferencia por

un segundo receptor.

Los datos obtenidos para las constantes de disociación, varían de una forma de representación a otra. Las diferencias existentes entre ambos tipos de gráficas, son debido a que las curvas del tipo de Scatchard dan igual peso a todos los puntos, mientras que las gráficas del tipo de doble recíproca dan mayor peso a los puntos que se obtienen con mayor precisión en RIE. Esto va aunado a los errores dentro del ensayo.

Los resultados de la constante de disociación con la concentración de los sitios activos (tablas 3 y 4), nos muestran que para el C8 en sus tres sueros no cambia, pero existe un aumento en la concentración de sitios activos alcanzando un mínimo a los 60 días, regresando a los 90 días a un valor semejante al de los 45 días. Observando la figura 16 en que se encuentra graficada la capacidad de los sueros del C8, se ve que existe un pico a los 45 días descendiendo lentamente a los 60 días y posteriormente a los 90 días. En éste caso el suero C8(45) y C8(60) combinan la concentración de sitios activos con la constante de disociación, al observar las gráficas de doble recíproca, para que la diferencia sea muy pequeña entre ambas capacidades de los sueros. El suero C8(90) posee una menor afinidad que el suero C8(45) y C8(60), además de una menor concentración de sitios activos que el suero C8(60), haciendo que su capacidad sea menor a los otros dos sueros. Mientras que para los sueros de Met-Enc, el suero C14(160) tanto por su constante de disociación como por la concentración de sitios activos, supera a los otros dos sueros. Se ob-

serva claramente el cambio de la capacidad del suero C14(160) comparandolo con los sueros C14(75), C14(105). Estos últimos sueros combinan la concentración de sitios activos con la constante de afinidad para mantener su capacidad similar. Bajo estos datos, se tienen dos sueros para la Leu-Enc que combinando la concentración de sitios activos con la afinidad los hacen útiles para el RIE, estos sueros son el C8(45) y C8(60). Mientras que para la Met-Enc se tiene un único suero, que combina tanto la concentración de sitios activos como la afinidad y sensibilidad para que con él se pueda desarrollar un RIE.

Basándose en el modelo matemático de la figura 9, se puede obtener la figura 13. Es de importancia considerar éste punto, sobre todo para determinar el estado en que se encuentre el radio ligando, puesto que éste factor introduce una discrepancia o una interferencia en el ensayo. La variación en la calidad del radio ligando, afecta la precisión de los datos obtenidos, encontrándose que entre más productos de la radiolisis, tenderá a disminuir la unión específica y del control de precipitación. Existe una limitación al empleo de radioligando tritiado, principalmente debido a la cantidad de productos contaminantes. La curva de la figura 13 nos permite predecir el tiempo de utilidad de un radioligando y con esto disminuir el número de ensayos que fracasen, principalmente por la baja calidad de la  $^3\text{H}$  Enc, por contaminación de productos que no son reconocidos por el Ac.

Para la purificación parcial de las Enc, se encuentra que la recuperación de las columnas de Amberlita XAD-2 son satisfacto--

rias, eliminando una serie de componentes que interfieren en forma inespecífica con el ensayo (ver figura 26). La cantidad de Enc en las 5 regiones del cerebro ensayadas, fué mayor en el Estriado, - pero al relacionar esta cantidad con el contenido de proteína, se ve evidentemente disminuída la proporción que guardaba con las demás regiones. Este mismo problema puede presentarse en la determinación de la cantidad de Enc en muestras biológicas. Para impedir tal efecto tanto en las muestras biológicas, como en los patrones, son tratados en la misma forma.

La cantidad de Encefalina en el tejido está representada en la figura 27, en ella se encuentra expresada la cantidad de Leu-Enc y Met-Enc. Se puede observar en forma comparativo los valores obtenidos por varios autores, así como la relación existente entre Met-Enc y Leu-Enc en las diversas regiones. Existe una gran diferencia entre los diversos protocolos seguidos por varios autores, tanto en la forma de realizar la disección, como de la forma de extraer las Encefalinas y de evitar su degradación. La técnica utilizada para la disección de las diferentes regiones es la de -- Glowinski e Iversen (1966), que es la utilizada por la mayoría de los autores, mientras que la técnica de Palkivits (1973), es utilizada por Kobayashi y col. (1978). La forma de extracción de las encefalinas y de prevenir la degradación va desde el uso de ácido acético 1 N al uso de HCl, de ácido tricloacético y microondas. La mayor cantidad de Met-Enc por mg de proteína, fué encontrada en el Estriado, el cual contiene una zona rica de Encefalina, que es el Globus Pallidus. Mientras que para la Leu-Enc se encontró que el Hipotálamo es el que contiene la mayor cantidad, siguiéndole en

cantidad el Estriado (figura 27). En general los datos obtenidos para el suero C8(60), son más altos que los reportados en la bibliografía, de igual forma se encuentra para el suero C14(160), pero a diferencia del anterior Yang (1977) obtiene valores más altos para el Hipotálamo y para el Estriado. Comparando entre los diversos autores los datos no coinciden, siendo el caso de Gros (1978) el que obtiene las cantidades más pequeñas.

La relación entre Met-Enc y Leu-Enc varía de región a región, ésta es mayor en el Hipotálamo, dato que es coincidente con el de otros autores, siendo el valor obtenido en nuestro ensayo semejante al de Gros (1978) y Yang (1977). Cuando en ésta parte se refiere uno a la cantidad de Leu-Enc o de Met-Enc, se está hablando de una sustancia que es reconocida por el anticuerpo, existiendo la posibilidad de una molécula con un determinante antigénico parecido o igual, que sea reconocido por el anticuerpo receptor. Un dato de importancia dentro del desarrollo del RIE es el error inter e intraensayo. Para el RIE de Leu-Enc se obtuvo un error intraensayo de 6.76%, y para el RIE de Met-Enc fué de 4.33% mientras que el error interensayo para el RIE de Met-Enc fué de 4.50%.

Existe un fenómeno de dilución en RIE que es limitante en ésta técnica y se debe principalmente a que sólo una porción del Estriado contiene la Enc, mientras que el resto únicamente aporta al contenido de proteína. Por otro lado existe una limitación en cuanto al uso del RIE, ésta es la incapacidad de seguir el curso temporal de las Enc, ya que las muestras biológicas que se obtienen tienen que ser procesadas, durante la cual se destruye la es-

estructura anatómica de la región. Por otra parte existe una limitación en cuanto a la sensibilidad de un RIE sobre todo en relación al cambio que es posible detectar en muestras biológicas que estén por debajo de éste valor. Se sabe que en experimentos de liberación de encefalinas, la cantidad de Enc liberada va de 0.5 a 5% de la cantidad de Enc por región. Estos valores limitan el uso de la técnica a las regiones de alto contenido de Enc, que presentan un cambio significativo.

Una vez que se han caracterizado los sueros por medio del RIE, pueden ser utilizados en otras técnicas que complementan al RIE. Entre éstas técnicas destacan la Inmunocitoquímica y la Cromatografía de afinidad. La primera cubre algunas limitaciones del RIE, la inmunoadsorción en columnas de afinidad o la inmunoprecipitación permiten una alta purificación de las Enc en un sólo paso de fraccionamiento. En la actualidad, nuestro trabajo está enfocado en el desarrollo de estas técnicas, y el empleo de las mismas en el estudio de los precursores metabólicos, transporte y liberación neuronal de las Enc.

## VI.- Bibliografía.

- Akil H., D. J. Mayer, J. C. Liebeskind (1972). Comparason chez le rat entre l'analgésie induite para stimulation de la substance grise peri-aqueducala et l'analgésie morphinique. *Crhebd Séane. Acad Sci* 274: 3603-3605.
- Akil H., D. J. Mayer, J. C. Liebeskind (1976). Antogonism of stimulation-produced analgesia by naloxone, a narcotic antogonist. *Science* 191: 961-962.
- Akil H., S. J. Watson, P. A. Berger, J. D. Barchas (1978). En the Endorphins (E Costa y M. Trabuccki eds) *Ad in Biochemical - Psychopharmacol.* vol 18: 125-139.
- Austen B. M., D. G. Smyth, C. R. Snell (1977).  $\alpha$  Endorphin,  $\delta$  - endorphin and met-enkephalin are formed extracellularly from lipotropin C-Fragment. *Nature* 269: 619 621.
- Ateweh S. F., M. J. Kuhar. (1977a) Autoradiographic localization of opiate receptor in rat brain. I. Spinal cord and lower - medulla. *Brain Res.* 124: 53 67.
- Ateweh S. F., M. J. Kuhar. (1977b) Autoradiographic localization of opiate receptor in rat brain. II. The brain stem. *Brain Res.* 129: 1-12.
- Ateweh S. F., M. J. Kuhar. (1977c). Autoradiographic localization of opiate receptor in rat brain. III. The telencephalon. - *Brain Res.* 134: 393-405.

- Barclay T., M. Phillips (1978). Inhibition of the Enzymatic -- degradation of the Leu-Enkephalin by puromycin. Biochem and Biophys Res. commun. 81(4): 1119-1123.
- Bayon A., J. Rossier, A. Mauss, F. E. Bloom, L. L. Iversen, N. - Ling, R. Guillemin (1978). In vitro release of methionine<sup>5</sup> enkephalin and Leucen<sup>5</sup>-enkephalin from the rat globus pallidus. Proc Natl. Acad. Sci. USA 75: 3503-3506.
- Bayon A., W. J. Shoemaker, F. E. Bloom, A. Mauss, R. Guillemin - (1979). Perinatal development of the endorphin and enkephalin containing system in the Rat Brain. Brain Res (179): 93-101.
- Bayon A., L. Koda, E. Battenberg, F. E. Bloom (1980a). Redistribu- tion of endorphin and enkephalin immunoreactivity in the rat - Brain and pituitary after in vivo treatment with colchicine or cytochalasine B. Brain. Res. 183: 103-111.
- Bayon A., L. Koda, E. Battenberg, R. Azad, F. E. Bloom (1980b). - Regional distribution of endorphin met<sup>5</sup> enkephalin and - leu<sup>5</sup>enkephalin in the pigeon brain. Neurosci. Lett. 16: - 75-80.
- Bayon A., J. W. Shoemaker, J. F. McGinty, F. Bloom. Immunodetection of endorphins and enkephalins: A search for reliability (sin pu blicar).
- Beckett A. H., A. F. Casy (1954). Synthetic analgesics: Stereo- chemical considerations. J. Pharm. Pharmacol. 6: 981-986.

- Benuck M., N. Mark (1979). Co-identi of brain agiotensin converting enzyme with a membrane bound dipeptidyl carboxy peptidase -- inactivina met-enkephalin. *Biochem Biophys Res Commun.* 88 - (1): 215-221.
- Berson S. A., R. S. Yalow (1961). General Principles of radio-immunoassay. *Clin. Chem. Acta.* 22:51.
- Berson S. A., R. S. Yalow (1973). General radioimmunoassay. *En - Methods in investigative and diagnostic endocrinology, Part 1*, S. A. Bersond and R. S. Yalow eds, pp 84-120. North Holland - Publishing Co. Amsterdam.
- Bloom F., J. Rossier, E. Battenber, T. Vargo, S. Winck, N. Ling, R. Guillemin (1977). Regional distribution of b-endorphin and -enkephalin in rat brain: a biochemical and cytochemical study. *Neuroscience. Abstr.* 7:886.
- Bradbury A. F., D. G. Smyth, C. R. Snell (1976). Lipotropin: - precursor to two biologically active peptide. *Biochem Biophys Res. Commun.* 69(4): 950-956.
- Collier H. O. J. (1973). Pharmacological mechanisms of drug dependence. *En: Pharmacology and the future of Man. Procceding of the 5<sup>th</sup> International Congress on Pharmacology.* J. Cochin and E. L. Way eds. Karge, Basel. pp 65-76.
- Cox B. M., K. E. Opheim, H. Teschamacher, A. Godstein (1975). A - peptide like substance from pituitary that acts like morphine 2 purification and properties. *Life Sc* 16: 1777-1782.

- Cox B. M., A. Godstein, CH. Li (1976). Opioid activity of a --  
pentapeptide, B-lipotropin (61-91), derived from B-lipotropin  
Proc Natl. Acad. Sci. USA 73: 1821-1823.
- Craviso G., J. M. Musacchio (1978). Inhibition of Enkephalin degra-  
dation in the guinea pig ileum. Life Sci 23: 2019-2030.
- Craves F. B., P. Y. Law, C. A. Hunt, H. H. Loh (1978). The metabolic  
desposition of radiolabeled enkephalins in vitro and situ. J.  
Pharmacol. Exp. Ther, 206 (2): 492-506.
- Card T., N. R. N. Boyd, M. L. Forsling, A. S. McNeill, J. Landon -  
(1970). The development of a radioimmunoassay for oxytocin. -  
The extraction of oxytocin from plasma and its measurement -  
diuring parturition in human and goat blood. J. endocrino -  
48: 223-234.
- Childer S. R., R. Shwarcz, J. T. Coyle, S. H. Snyder (1978). Radio-  
immunoassay of enkephalins; levels of methionine- and leucine -  
enkephalin in morphin dependent and kainic acid lesioned rat -  
brains. Adv. Biochem. Psychopharmacol. 18: 161-173.
- Childer S. R., S. H. Snyder (1979). Diurnal variation, post-mortem  
degradation and effect of cycloheximide in endorphins in -..  
mental health Research. E. Usdin, W. E. Bunney, Jr. Kline eds  
pp 181-188. MacMillan Press London.
- Daughaday W. H., L. S. Jacobs (1971). Methods of separating --  
antibody-bound from free antigen. Principles of competitive -  
protein-binding assay. Odell and Daughday. ed. Lippincott -  
Co. Philadelphia. pp 303-324.

- Dupont A., L. Cusan, M. Garon, G. Alvarado, F. Labrie (1977). -  
Extremely rapid degradation of  $^3\text{H}$  methionine enkephalin by -  
various rat tissues in vivo and in vitro. Life Sci. 21: -  
907-914.
- Eadie G. S. (1942). The inhibition of cholinesterase by physos-  
tignine and protigmine. J. Biol. Chem 146: 85-93.
- Eddy N. B., E. L. May (1973). The search for a better analgesic.  
Science 181: 407-414.
- Ekins R. P., G. B. Newman, J. L. H. O'Riordan (1968). Theoretical -  
aspects of "saturation" and radioimmunoassay. En radioisotopes  
in medicine: In vitro studies. (Hayes R. L., F. A. Woswitz, B.  
E. P. Murphys eds) v. v. Atom. Comm. Oak Ridge USA pp 59.
- Ekins R. P., Newman (1970). En 2<sup>nd</sup> Karolinska Symposia on Research  
methods in reproductive endocrinology, E. Diczfausy ed. -  
Steroid assay by protein binding. 11036. Stockholm.
- Ekins R. P. (1971). Mathematical treatment of data. En radio-  
immunoassay methods, K. E. Kirkham and W. M. Hunter eds.  
Churchil and Livengstone Edinbur. pp 164.
- Erdos E. G., A. B. Johnson, N. T. Boyden (1978a). Inactivation of  
enkephalina: effect of purified peptidyl depeptidase and -  
culture human endothelial cell. Adv. Biochem Psychopharmacol.  
18: 45-49.
- Erdos E., R. Johson, N. Boyden (1978b). Hydrolysis of enkephalin  
by cultured human endothelial cell and by purified peptyl-  
dipeptides. Bichem Pharmacol 27: 843.

- Fraenkel-Conrat H., H. Olcott (1948a). The reaction of formaldehyde with proteins. V. Cross-linking between amino and primary amide or guanidyl group. *Am. Chem Soc.* 70: 2673-2684.
- Fraenkel-Conrat H., H. Olcott (1948b). Reaction of formaldehyde with proteins. *J. Biolchem* 174: 827-843.
- Fraenkel-Conrat H., D. Mecham (1949). The reaction of formaldehyde with proteins. VII. Demonstration of intermolecular crosslinking by means of osmotic pressure measurement. *J Biol. Chem* 177: 477-486.
- Genuth S., A. Fiohman, H. E. Lebovitz (1965). A radioimmunological-assay method for insulin using insulin  $^{125}\text{I}$  and gel filtration. *J. Clin. Endocrinol Metab* 25: 1043-1049.
- Glowinski J., L. L. Iversen (1966). Regional studies of catecholamines in the rat brain I. The disposition of  $^3\text{H}$  norepinephrine,  $^3\text{H}$  dopamine and  $^3\text{H}$  dopa in various regions of the brain. *J. Neurochem* 13: 655-669.
- Goldstein A., L. I. Lowney, B. K. Pal. (1971). Stereospecific and non specific interaction of the morphine narcotic congener - levorphanol in subcellular fractions of mouse brain. *Proc Nat. Acad. Sci. USA.* 68: 1742-1747.
- Goldstein A., S. Tachibana, L. I. Lowney, M. Hukapiller, L. Hood (1979). Dynorphin (1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc Natl Acad. Sci USA.* 76: 6666-6670.
- Goodfriend T. L., L. Levine, G. D. Fasman (1964). Antibodies to bradykinin and angiotensin: A use of Carbodiimides in immunology. *Science* 144: 1344-1346.

- Gorenstein C., S. M. Snyder (1979). Two distinct enkephalinases: solubilization, partial purification and separation from - angiotensin converting enzyme. *Life Sci* 25: 2065-2070.
- Grodsky G. M., P. H. Forsham (1960). Radioimmunoassay of Insulin. *J. Clin. Invest.* 39: 1070.
- Gros C., P. Pradelles, C. Rouget. O. Bepodin, F. Dray, M. C. - Fournie Zaluski, B. P. Roques, H. Pollard, C. Lorens-Cortes, J. C. Schwartz (1978). Radioimmunoassay of methionine and - leucine enkephalins in regions of rat brain and comparison - with endorphins estimated by a radioreceptor assay. *J. - Neurochem.* 31: 29-39.
- Guillemin R. N., Ling, R. Burgus (1976). Endorphines, peptides d'origien hypotholomique et neurohipophysaire a activieté - morphinomimetique. Insolement of structure moleculare-endor - phine. *C. R. Acad. Sci. D.* 282: 783-785.
- Guillet A., H. Gull (1972). Glutaraldehyde its purity and stability. *Histochemie* 30: 162-167.
- Habeeb B., R. Hiramoto (1968). Reaction of Proteins with - Glutaraldehyde. *Arch. Biochem. Biophys.* 126: 16.
- Hambrook J. M., B. A. Morgan, M. J. Rance, C. F. Smith (1976). - Mode of deactivation of enkephalins by rat and human plasma and rat brain homogenates. *Nature.* 262: 782-783.
- Henderson G., J. Hughes, H. W. Kosterlitz (1978). In vitro - release of leu and met-enkephalin from the corpus striatum. *Nature* 271: 677-679.

- Herbert V., K. S. Lau, W. Chester, W. Gottlieb, S. J. Bicher --  
(1965). Coated Charcoal immunoassay of insulin. J. Clin -  
Endocrinol Metab. 25: 1375-1384.
- Hofstee, B. H. J. (1952). On the evaluation of the constants VM  
and  $K_m$  in enzyme reaction. Science 116: 320-331.
- Hokfelt T., R. Elde, O. Johansson, L. Terenius, L. Stein (1977).  
The distribution of enkephalin immunoreactive cell bodies in  
the rat central nervous system. Neurosci. Lett (1-2): 25-31.
- Hughes J. (1975a). Search for the endogenous ligand of the opiate  
receptor. Neuroscis. Res. Prog. Bull. 13: 55-58.
- Hughes J. (1975b) Isolation of an endogenous compound from the  
brain with pharmacological properties similar to morphine.  
Brain. Res. 88: 295-308.
- Hughes J., T. W. Smith, H. W. Kosterlitz, L. A. Morgan, H. W. -  
Fothergill, B. A. Morris. (1975c). Identification of two -  
related penta-peptides from the brain with potent opiate -  
agonist activity. Nature. 258: 577-579.
- Hughes J., H. W. Kosterlitz, T. W. Smith (1977). The distribution  
of methionine-enkephalin and leucine-enkephalin in the brain  
and peripheral tissues. Br. J. Pharmac 61: 639-657.
- Hunter W., E. C. Greenwood (1964). A radioimmuno-electrophoretic  
assay for Human Growth Hormone. Biochem J. 91. 43-56.
- Iversen L. L., S. D. Iversen, F. E. Bloom, T. N. Vargo, R. Guille-  
min (1978). Release of enkephalin from rat globus pallidus -  
in vitro. Nature 271: 679-681.

- Jacob J. J., E. C. Tremblay, M. C. Colombel (1974). Facilitation de reaction nociceptives par la naloxane chez le souris et - chez le rat. *Psychopharmacologia*. 37: 217-223.
- Jacobson A. E. (1972). Narcotic analgesics and antagonis. En : - Chemical and Biological Aspects of Drug Dependence, S. J. - Mule y H. Brill eds. 101-118. Chemical Ruber Co. Press. - Cleveland.
- Kakuma U. S., Y. Arakama, N. Goji (1979). Ocurrence and signifi- cance of antibody to lives specific membrane lipoprotein by double antibody immunoprecipitation method in sera of patients with acute and chronic liver diseases. *Gastroenterology*. - 76: 665-672.
- Kangawa K., H. Matsuo, M. Igarashi (1979).  $\alpha$ -neo-endorphin: a - big  $\beta$ -enkephalin with potent opiate activity from porcine - hipotalami. *Biochem and Biophy. Res. Commun.* 86: 153-160.
- Karush F. (1962). Immunologic Specificity and Molecular Structure. *Advances in Immunology*. 2: 1-43.
- Khorana H. G. (1953). The chemistry of carbodiimides. *Chem Rev.* 53: 145-164.
- King J., R. P. Millar (1980). Radioimmunoassay of methionine - enkephalin Sulphoxide: phylogenetic and anatomical distribution. *Peptides*. 1: 211-216.
- Klotz I. M., D. L. Hunston (1971). Propierties of Graphical re- presentation of Multiple Classes of Binding sites. *Biochem* 10: 3065.

- Knight M., W. Klee (1978). The relation ship between enkephalin - Degradation and opiate receptor ocupancy. J. Biol. Chem 253 (11): 3843-3847.
- Kobayashi R., M. Palkovits, R. J. Miller E. J. Chang, P. Cuatrecasas (1978). Brain enkephalin distribution is unaltered by - hipophysectomy. Life Science. 22: 527-530.
- Li C. H., L. Barnafi, M. Chretien, D. Chang (1965). Isolation - and aminoacid secuencia of B-LPH from sheep pituitary glands Nature 206: 1093-1094.
- Li C. H., S. Lemaire, D. Yamashiro, B. A. Doneen (1976). Biochem. Biophys. Res. Commun. 71: 19-25.
- Liotta A. S., T. Suda, D. T. Krieger (1978). Beta-lipotropin is the major opioid-like peptide of human pituitary and rat. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75(6) 2950-2954.
- Lowry O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall (1951). Protein measrement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Mains R. E., B. A. Eipper, N. Ling (1977). Common precursor to - corticotropins and endorphins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 3014-3018.
- Malfroy B., J. P. Swerts, A. Guyon, B. P. Roques, J. C. Schwartz (1978). High affinity enkephalin-degrading peptidase in - brain is increase after morphin. Nature 276: 523-526.

- Mark N., A. Grynbaun, A. Neidle (1977). On the degradations of -  
enkephalins and endorphins by rat and mouse brain extracts -  
Biochem and Biophys Rs. Commun. 74(4): 1552-1559.
- Mayer D., J. Liebeskind. (1974). Pain reduction by focal ---  
electrical stimulation of the brain; an anatomical and --  
behavioral analysis. Brain Res. 68: 73-93.
- Meck J., H. Y. Yang, E. Costa (1977). Enkephalin catabolism in -  
vitro and in vivo. Neuropharmacol 16: 151-154.
- Meiners H., W. Eppenstein, K. E. More (1969). Laboratory Physics.  
Wiley and sons eds. pp 5, 6.
- Midgley AR., G. D. Niswender, R. W. Rebar (1969). Principles for  
the assesment of the reliability or radioimmunoassay method  
(precision, accuracy, sensitivity, specificity). E. Diczfalusy  
ed. Immunoassay of gonadotrophins. Karolinska Simposium. -  
Acta. Endocrinolog. 63 sup 142.
- Miller O. (1957). Determination of bound vitamin B<sub>12</sub>. Archives  
of Biochem and Biophys. 68: 255-262.
- Miller R., K. J. Chang, P. Cuatrecasas, S. Wilkinson (1977). The  
metabolic stability of the enkephalins. Biochem. Biphys, Res.  
Commun. 74(4): 1311-1318.
- Miller R. J., J. Chang, B. Cooper, P. Cuatrecasas (1978a). Radio-  
immunoassay and characterization of enkephalin in rat tissues.  
The J. Biol. Chem 253 (2): 531-538.

- Miller R. J., J. Chang, P. Cuatrecasas, S. Vikinson, L. Lowe, C. Beddell, B. Follenjant (1978b). Distribution and pharmacology of the enkephalins and related opiate peptides En: Centrally Acting Peptides. J. Hughes ed. McMillan pp 295-315.
- Noda M., Y. Fucatanl, H. Takahashi, M. Toyosato, T. Hirose, S. Inayama, S. Nakanishi, S. Numa. (1982). Clonign and sequence analysis of CDNA for bovine adrenal preproenkephalin. Nature 215: 202-206.
- Odell W., J. Wilberd, W. Paul (1965). Radioimmunoassay of thyrotropin in human serum. J. Clin Endocrinol Metab (25) 1179-1188.
- Palkovits M (1973). Isolated removal of hipotalamic in other brain nueclet of the rat. Brain Res. 50: 449-450.
- Pasternaĳ G., R. Goodman, S. Snyder (1975). And endogenous morphine like factor in mammalian brain. Life. Sci 16: 1765-1769.
- Patey G., De La Baume, J. C. Schwatz, C. Gros, B. Roques, M. C. Fournie-Zaluski. (1981). Selective Protection of methionine enkephalin release from brain slices by enkephalinase inhibition Science, 212: 1153-1155.
- Pert C., S. Snyder. (1973a). Opiate receptor: demostration in nervous tissue. Science 179: 1011-1014.
- Pert C., S. H. Snyder. (1973b). Propierties of opiate receptor binding in rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70(8): 2243-2247.

- Peter C., N. J. Kuhar, S. H. Snyder (1976). Opiate receptor: Autoradiographic localization in rat brain. *Proct. Natl. Acad. Sci. USA.* 73(10): 3729-3733.
- Peters T. (1975). Serum albumin: En: The Plasma protein. Vol. I putnam F. W. ed New York. Academic Press. pp 133-181.
- Peters T. (1977). Serum albumin: recent progress in the understanding of its structure and biosynthesis. *Clin. Chem* 23: 5-12.
- Portoghese P. S. (1965). A new concept on the mode of interaction of narcotic analgesia with receptors. *J. Med. Chem.* 8: 609-616.
- Potter M., W. D. Terry (1973). En the antigens. Ed. M. Sela. Vol. 1 pp 299: Academic Press. New York.
- Rodbard D., J. Ruder, J. Vaitukaitis, U. Jacobs. (1971). Mathematical analysis of kinetics of radioligand assay; improved sensitivity obtained by delayed addition of label ligand. *J. Clin. Endocrinol* 33: 343-354.
- Rodbard D., J. Catt. (1972). Mathematical theory of radioligand assay; the kinetics of separation of bound from free. *J. Steroid Biochemisty* 3: 255-273.
- Roques B. P., M. C. Fournie-Zaluski, E. Soroca, J. M. Lecomite, B. Malfroy, C. Llorens, J. C. Schwartz (1980). The enkephalin inhibition thiorphan. *Nature* 288: 286-287.
- Ratajczak T., R. Huhel (1976). Estradiol receptor: influence of plasma proteins on detection an quantitation. *J. Steroid. Biochem* 7: 741-744.

- Reynolds D., (1969). Surgery in the rat during electrical -  
analgesia induce by brain stimulation. Science 164: 444-445.
- Rosenthal H. (1967). Graphic method for the determination and -  
presentation of binding parameters in a complex system. -  
Anal. Biochem 20: 525-532.
- Rossier J., T. M. Vargo, S. Minick, N. Ling., F. E. Bloom, R. -  
Guillemin (1977a). Regional dissociation of B-endorphin and  
enkephalin contents in rat brain and pituitary. Proc Natl.  
Acad. Sci. USA. 74(11): 5162-5165.
- Rossier J., A. Bayon, T. M. Vargo, N. Ling, R. Guillemin, F. E. -  
Bloom (1977b). Radioimmunoassay of brain peptides. Evaluation  
of a methodology for the assay of B-endorphin an enkephalin.  
Life Sc. 21: 847-852.
- Rossier J., Y Audigier, N. Ling. J. Cros, S. Udenfriend (1980).  
met-enkephalin-Arg<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup>, present in high amounts in brain -  
of rat, cattle, and man, is an opioid agonist. Nature 288:  
88-90.
- Rubinstein M., S. Stein, L. D. Gerber, S. Udenfriend (1977). -  
Isolation and characterization of the opioid peptides from  
rat pituitary: B-Lipotopin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. -  
74(7): 3052-3055.
- Simantov R., S. N. Snyder (1976). Brain and pituitary opiate -  
mechanisms; pituitary opiate receptor binding, radioimmuno-  
assay for methionine enkephalin and leucine-enkephalin an -  
<sup>3</sup>H-enkephalin interaction with opiate receptor. En "Opiates  
and Endogenous Opiate Peptides". H. J. Kosterlitz ed. Elsevier.  
North Holland. pp 41-48.

- Simon E., J. M. Hiller, I. Edelman (1973). Sterospecific Binding of the Potente narcotic analgesic  $^3\text{H}$  Metorphine to rat brain homogenate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70(7): 1947-1949.
- Simon E., K. Bonnet, V. Hiller (1979). Opioid activity of synthetic and naturally occurring enkephalin peptides. Biochem - Pharmacol 28: 333-337.
- Skom J. H., D. V. Talmage (1958). Nonprecipitating Insulin Antibodies. J. Clin. Invest. 37: 783-786.
- Siskind G., B. L. Benaceraf. (1969). Cell selection by antigen - in immune response. Advance Immunology 10: 1-50.
- Smith H., R. C. Gallop, B. T. Tozaer (1964). The production of - specific Rabbit antibodies by injecting individual antigen- antibodies complex separated from mixed antigen. Immunology. 7: 111-117.
- Souza M. L. A., H. O. Williamson, L. O. Woody, E. Diczfalusy - (1970) in. 2<sup>nd</sup> Karolinska Symposia on Research Methods in - reproductive endocrinol. E. Diczfalusy, ed. Steroid assay by Protein Binding. 171-187.
- Stern A. S., R. V. Lewis, S. Kimura, J. Rossier, L. D. Garber, L. Brink, S. Stein, S. Udenfriend (1979). Isolation of the - opioid heptapeptide met-enkephalin Arg<sup>6</sup> Phe<sup>7</sup>, from bovine - adrenal modulary granules and Striatum. Proc. Natl. Acad. - Sci. USA. '76: 6680-6683.
- Steverson G. T. (1975). Superface immunoglobulin of guinea pig leukaemic lymphocytes. Immunology 28: 807.

- Stine S. M., H. Y. T. Yang, E. Costa (1980). Inhibition of in situ metabolism of (<sup>3</sup>H) met<sup>5</sup>-enkephalin and potentiation of met<sup>5</sup>-enkephalin analgesia by captropil. Brain. Res. 188: - 295-299.
- Takagi H., H. Shiomi, H. Veda, H. Amano (1979). A novel analgesic depeptide from bovine is a possible met-enkephalin release. Nature 282: 410-412.
- Takahashi M., H. Kaneto, E. Meno, J. Watanabe, M. Koida, H. Ogawa, H. Yajiima (1979). Radioimmunoassay of methonine enkephalin and interference by brain factor of immunoreactivity and - opiate receptor binding activity. Jap. J. Pharmac 29: - 203-209.
- Terenius L., A. Wahlstrom (1975). Morphin like ligand for opiate receptors in human CSF. Life Sci. 16: 1759-1764.
- Teschemacher H., K. E. Opheim, B. M. Cox A. Goldstein (1975). - A peptide like substance from pituitary that acts like morphins J. Isolation. Life Sci. 16: 1771-1776.
- Vaitukaitis J., J. B. Robbins, E. Nieschlag, G. T. Ross (1977). A method for producing specific antisera with small dose of immunogen. J. Clin Endocrinol 33: 988-991.
- Vaitukaitis J. (1981). Production of antisera with small doses of Immunogen: multiple Intradermal Injections. Methods in -- Enzymol 73: 46-52.
- Vogel Z., M. Altstern (1977). The adsorption of enkephalin to - poroce polystyrene bound a simple assay for enkephalin - Hidrolysis Febs. Letters. 80 (9): 332-336.

- Vorhoef J., J. G. Loefer, J. P. Burbach, W. H. Gispen, A. Witter, D. De Wied (1980).  $\gamma$ -endorphin,  $\alpha$ -endorphin and their destyrosine fragmentes in ral pituitary and brain tissue. - Life Sci- 26: 851-859.
- Walter V., P. M. Heane (1976). Theoretical aspects of radioimmunoassay. En Handbook of radioimmunoassay. Guy Abraham ed. pp 87-130.
- Winkelhake J. (1978). Immunoglobulin structure and effector functions. Immunochemistry 15: 695-714.
- Yalow R., S. S. A. Berson (1961). Immunological specificity of Human insulin: application to immunoassay of insulin. J. Clin Invest. 40: 2190-2198.
- Yang H. Y., W. Fratta, J. S. Hong, A. M. Digiulio, E. Costa (1978). Detection of two endorphin-like peptides in nucleus caudatus, Neurpharmacol. 17: 433-438.
- Yang H. Y., J. S. Hong, E. Costa (1977). Regional distribution of Leu and Met enkephalin in rat brain. Neuropharmacol. - 16: 303-307.