



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

157

“DETERMINACION DE PROSTAGLANDINAS EN PLASMA DE CORDON UMBILICAL POR RADIOINMUNOANALISIS VALORES DE REFERENCIA”



DEPTO. DE PASANTES Y
EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

TESIS MANCOMUNADA

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a n

Ma. del Rayo Ivonne Almaguer Jasso

Lucila Lagunes Pretelín



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA.

PRESIDENTE: PROF.: DEA CORONADO PERDOMO
VOCAL: PROF.: MA. DOLORES LASTRA AZPILICUETA
SECRETARIO: PROF.: SALVADOR MARTIN SOSA
1er. SUPLENTE: PROF.: ESTHER GUTIERREZ HIDALGO
2o. SUPLENTE: PROF.: GUADALUPE LETICIA CARRASCO RIVERA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

HOSPITAL DE GINECOOBSTETRICIA # 4
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DE LOS SUSTENTANTES:

Ma. del Rayo Ivonne Almaguer J.
MA. DEL RAYO IVONNE ALMAGUER JASSO

Lucila Lagunes Pretelin
LUCILA LAGUNES PRETELIN

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL ASESOR DEL TEMA:

Salvador S.
DR. SALVADOR MARTIN SOSA

A mis padres:

JESUS ALMAGUER MORIN †

MA. LUISA JASSO DE A.

Por el apoyo, amor y dedicación
que siempre me han brindado.

A mis hermanos:

NORMA Y CHUCHIN por el cariño
que nos une.

A mis tíos:

RAMON Y MALENA con profundo
agradecimiento.

A JUAN Y ARACELI:

Que con su amistad y conocimientos
hicieron posible llegar a feliz término.

A nuestros amigos:
Por lo que significan
en nuestras vidas.

AL DR. SALVADOR MARTIN SOSA:

Por su valiosa asesoría e interés
en la realización de este trabajo.

AL DR. ENRIQUE TOVAR:

Agradeciendo su ayuda y las
facilidades proporcionadas
en el laboratorio de
radioinmunoanálisis.

C O N T E N I D O

	Págs.
INTRODUCCION	1
Generalidades de prostaglandinas	
Química	3
Bioquímica	6
Actividad fisiológica	11
Farmacología	14
Análisis radioinmunológico	18
Centelleo líquido	26
MATERIAL Y METODOS	
1. Material biológico	34
2. Equipo de laboratorio	34
3. Reactivos	35
4. Radioinmunoanálisis PGF	45
5. Radioinmunoanálisis PGE	52
6. Cálculos	59
7. Control de calidad	63
RESULTADOS	68
DISCUSION	71
CONCLUSIONES	73
RESUMEN	74
BIBLIOGRAFIA	76

INTRODUCCION.

Se ha demostrado que las prostaglandinas estan involucradas en algunos aspectos de la fisiología y patología pulmonar. Las prostaglandinas E y F (PGE yPGF) se liberan en el pulmón bajo la acción de estímulos tales como hipoxia, hiperinflación, anafilaxis, embolia y edema pulmonar ^(1,2).

En condiciones normales el pulmón es capaz de degradar prostaglandinas con bastante rapidez; las prostaglandinas E y F del torrente circulatorio se metabolizan e inactivan casi totalmente a su paso por el pulmón ⁽³⁻⁵⁾.

Sin embargo antes de inactivarse ejercen diversas acciones sobre el músculo liso y los vasos sanguíneos del árbol bronquial ⁽⁶⁻¹⁰⁾.

Las PGE producen vasodilatación arteriolar y broncodilatación, las PGF tienen acción constrictora sobre vasos sanguíneos y músculo liso bronquial ⁽¹¹⁾.

Las PGF pueden contribuir en forma importante al síndrome de insuficiencia respiratoria idiopática del recién nacido, ya que son broncoconstrictoras y causan también constricción arteriolar; pueden producir una disminución en la ventilación por la broncoconstricción y en la oxigenación de la sangre, por la disminución del riego sanguíneo pulmonar consecutivo a la constricción arteriolar.

Como en el síndrome de insuficiencia respiratoria idiopática se produce hipoxia, se puede desencadenar un círculo vicioso que incluya: hipoxia → aumento de PGF → constricción arteriolar pulmonar y de músculo liso bronquial, por lo tanto mayor hipoxia.

Dada la importancia de estas sustancias en la clínica, fue necesario el montaje de una técnica para su determinación, siendo esta el radioinmunoanálisis.

Igualmente se determinaron los valores de referencia de PGE y PGF en recién nacidos con apgar mayor o igual a 8 al minuto, como un primer paso en el estudio de estos mecanismos.

GENERALIDADES

Química de las prostaglandinas.

Las prostaglandinas (PG) se conocen desde 1930, habiéndose estudiado sus actividades farmacológicas: vasodepresoras y estimulantes del músculo liso, a partir de semen humano, semen y glándulas vesiculares de animales ⁽¹²⁾. Von Euler estableció el nombre genérico de las prostaglandinas basado en la suposición de que éstas eran secretadas por la próstata. Bergstrom en 1963 dedujo su estructura química ⁽¹³⁾ relacionándola al ácido prostanoico (Fig. 1).

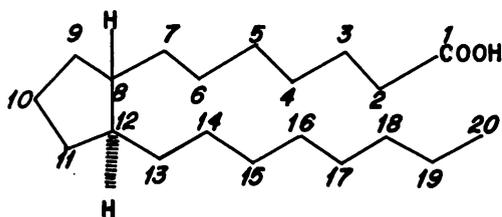


Fig. 1. Acido prostanoico. Estructura hipotética con la cual se relacionan las prostaglandinas.

Todas ellas poseen veinte átomos de carbono, con un anillo de 5 miembros al que se unen dos cadenas en carbonos adyacentes, de siete y ocho átomos respectivamente, estando presentes en la primera cadena el grupo carboxilo y en la segunda un grupo hidroxilo (C₁₅).

En la actualidad se clasifican en dos formas:
 familias y series ⁽¹⁴⁾. La primera se debe a la presencia de los grupos funcionales, unidos al anillo localizados en las posiciones C₉ y C₁₁. Los miembros de la familia A (PGA) presentan un grupo cetónico en el C₉ y un doble enlace entre los carbonos C₁₀-C₁₁ (Fig. 2), en la familia B (PGB) tienen un grupo cetónico en el C₉ y un doble enlace entre los carbonos C₈-C₁₂; las PGE poseen un grupo cetónico ubicado en C₉ y un hidroxilo en el C₁₁. Finalmente las PGF en los C₉ y C₁₁ exhiben dos hidroxilos.

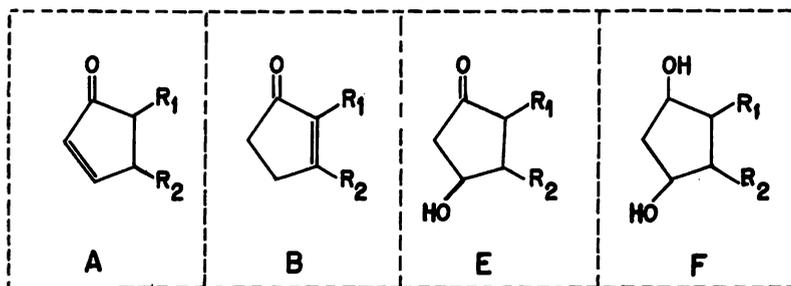


Fig. 2. Elementos de clasificación de las familias de las prostaglandinas

La clasificación de las PGs en series, se debe al grado de insaturación de las cadenas laterales, indicándose con un subíndice la cantidad de dobles enlaces presentes en tales cadenas (Fig. 3).

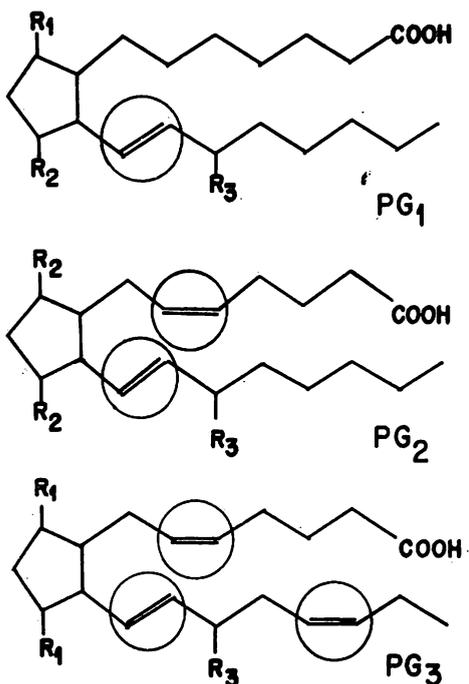


Fig. 3. Elementos en la clasificación de las prostaglandinas en series

Un tercer elemento estructural de identificación de las PGs es la orientación del grupo hidroxilo del carbono C₉ en el anillo, si se encuentra en el mismo lado de la cadena que tiene el carboxilo se le designa con la letra griega alfa (α) y en caso contrario con la letra beta (β) (15), (Fig. 4).

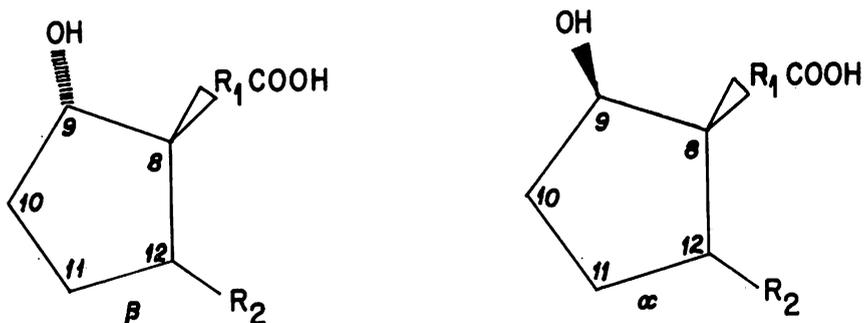


Fig. 4. Caracterización estructural de las prostaglandinas

Bioquímica de las prostaglandinas.

Precusores.

Los precursores biosintéticos de las PGs son ácidos grasos libres, esenciales y poliinsaturados, de 20 átomos de carbono y que dan origen a las series antes descritas siendo: 8, 11, 14 ácido eicosatrienoico (ácido dihomo gama linolénico) (Fig. 5) que origina la serie PG₁ (16-18); 5, 8, 11, 14- ácido eicosatrienoico (ácido araquidónico) que da origen a la serie II que es la más importante desde el punto de vista biológico y 5, 8, 11, 14, 17- ácido eicosapentanoico para la serie 3.

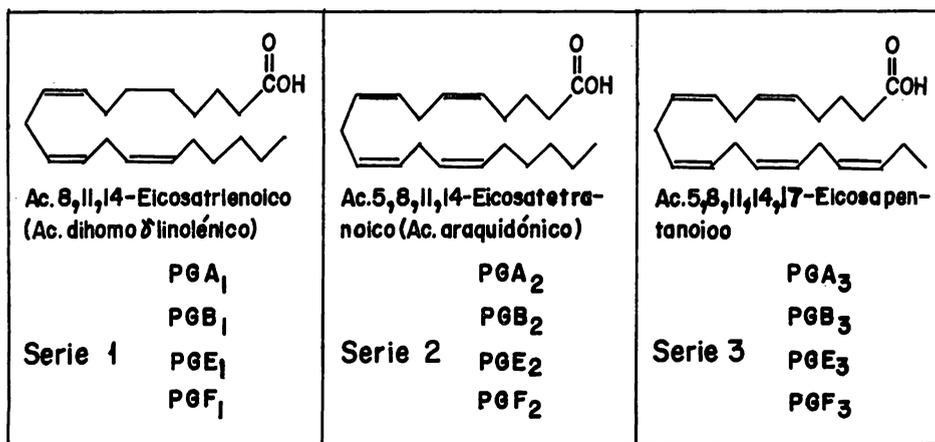


Fig. 5. Precursores que originan a las diferentes series de las prostaglandinas.

Los reportes más extensos sobre la síntesis de PGs hechos en vesícula seminal y en pulmón, por Samuelsson y colaboradores (19-20) permiten establecer las necesidades básicas, debido a la elevada actividad de síntesis (21): prostaglandina sintetasa (que es un complejo enzimático microsomal), ácidos grasos libres de veinte átomos de carbono con tres o más dobles enlaces (el ácido araquidónico es el más abundante), donadores de hidrógeno, oxígeno molecular y cofactores (agentes reductores) (22-24).

La síntesis de las prostaglandinas puede llevarse a cabo en cualquier célula a partir de sus precursores (14), siendo esto un factor limitante, generalmente la concentración de

ácidos grasos libres es baja y los fosfolípidos son ricos en ellos, ⁽²⁵⁾ su liberación es catalizada por una fosfolipasa bajo el estímulo de agentes físicos, químicos, influencias hormonales o neurohormonales ⁽²⁶⁻³⁰⁾. El inicio de la reacción es por la introducción de oxígeno en los carbonos C₉-C₁₁ del ácido (Fig. 6), seguido de una ciclización, catalizada por la ciclo-oxidasa del complejo prostaglandina sintetasa ⁽³¹⁻³³⁾. En el siguiente paso el endoperóxido se isomeriza (por medio de la endoperóxido isomerasa) dando la PGE, o bien; se reduce (con la endoperóxido reductasa) para obtener la PGF ^(34,35). Si el ácido araquidónico es el precursor empleado se obtiene PGE₂ y PGF_{2α} que son las PGs más abundantes en los mamíferos.

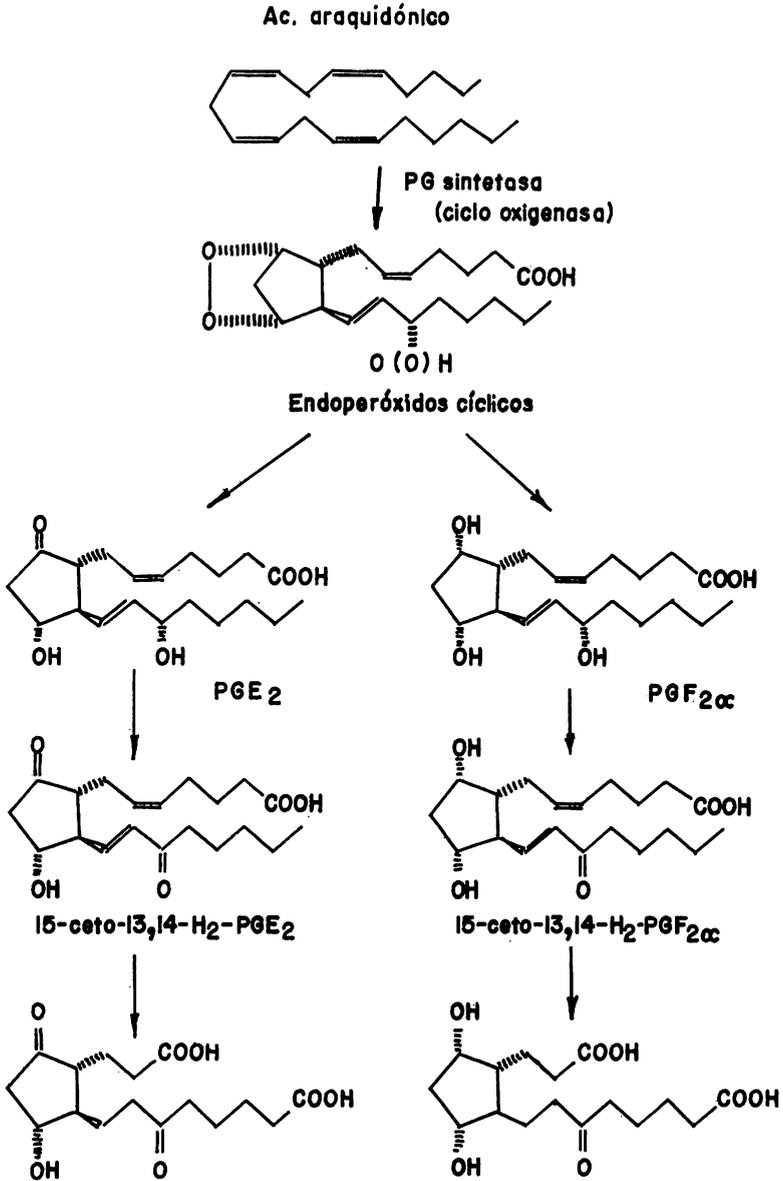


Fig.6. Formación y degradación de prostaglandinas E y F.

Algunas drogas como la indometacina, el ácido acetil salicílico y otras sustancias actúan como inhibidores de la síntesis de PGs (36-40).

Catabolismo.

Las transformaciones metabólicas de las prostaglandinas son muy rápidas en hígado y en pulmón (41-42) siendo su vida biológica muy corta (43-46). Las reacciones catabólicas de las prostaglandinas son: oxidación en el C₁₅ (47-49) (con la enzima 15 deshidrogenasa), reducción entre los carbonos C₁₃-C₁₄ (50-53); beta y omega oxidación (B y W-oxidasa), (Fig. 7)

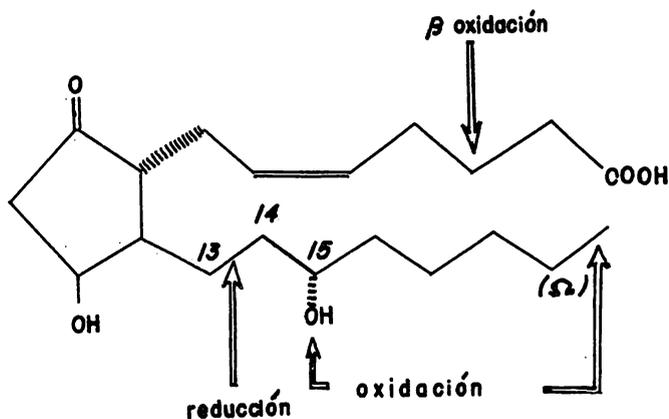


Fig.7. Principales vías metabólicas de prostaglandinas

Los principales metabolitos de la PGE y la PGF_{2 α} son: 15 ceto-13, 14 dihidro PGE y 15 ceto 13,14 dihidro PGF_{2 α} , respectivamente y que son excretados en orina como tales o bien como los derivados ácidos correspondientes.

La velocidad de secreción de las PG varía de 23 a 48 ug/24 hs en las mujeres y de 109-226 ug/24 hs en los hombres (54).

Actividad fisiológica de las prostaglandinas.

La importancia del estudio de estas sustancias, se debe al hecho de que las prostaglandinas o los sistemas enzimáticos de síntesis y degradación se hallan en casi todos los tejidos animales (55) y su concentración o distribución se ha reportado (56), tales razones hacen que las prostaglandinas participan en funciones normales y patológicas de los sistemas: nervioso, cardiovascular, renal, respiratorio, hematopoyético, endócrino, reproductor, sensorial y gastrointestinal (57), además tienen una relación estrecha con el dolor y las reacciones inmunológicas e inflamatorias (58).

La elevada actividad fisiológica de las prostaglandinas se refleja por el antagonismo que presentan las E y F, dada su estructura polar podemos analizar los efectos que presentan estas dos PGs (59).

Actividad de las prostaglandinas no polares contra las polares
(E > F).

Inhibe la secreción gástrica.

Disminuye la presión sanguínea.

Relajan tiras del músculo liso de aorta.

Aumentan la natriuresis.

Actividad de las prostaglandinas polares contra las no polares
(F > E).

Efectos de infertilidad (provocando luteolisis en animales).

Elevación de la presión sanguínea en ratas.

Aumentan la constricción de bronquiolos.

Generalizando los efectos antagónicos que pueden presentar
refiriéndose a las PGE, en animales completos se tiene:

Disminución de la presión sanguínea.

Incremento de la concentración del AMPc en trombocitos,
leucocitos, pulmones y ovarios.

Inhibición de la transmisión nerviosa.

Inhibición de la lipólisis.

Dilatación de bronquiolos.

Inhibición de la congestión nasal.

Aumento de la presión ocular.

Incremento de la permeabilidad vascular.

Inhibición de la agregación plaquetaria.

E in vitro:

Inhibición de las reacciones alérgicas.

Inhibición de las contracciones en tiras de uteros no embarazados.

Finalmente efectos mezclados de las PGs E y F siendo PGE

> PGF:

Incremento de la actividad uterina en el embarazo.

Inducción del trabajo de parto.

E in vitro:

Contracciones del íleon del cobayo.

Contracción del colon del hamster.

Contracción del útero de rata.

Las prostaglandinas además antagonizan la acción de las catecolaminas (60-61) por la inhibición de la liberación de éstas (62) o bien por la síntesis de las PGs (63), siendo este un ejemplo de la retroalimentación negativa que presentan las prostaglandinas con otras hormonas.

Fisiológicamente a las prostaglandinas no se les considera hormonas ya que éstas se sintetizan en un tejido y son transportadas hasta su sitio de acción, a diferencia de las PGs que se sintetizan y actúan en el tejido donde hacen falta (64).

Se han encontrado evidencias de la existencia de receptores para prostaglandinas unidos a la membrana de diferentes tejidos ⁽⁶⁵⁻⁶⁶⁾, que pueden explicar los mecanismos de acción de prostaglandinas, estos son de dos tipos de unión, específica e inespecífica, los primeros son dependientes de Ca^{2+} .

Farmacología de las prostaglandinas.

Las prostaglandinas tienen una actividad farmacológica variada, dependiendo de la prostaglandina de que se trate, el tejido estudiado y también de la especie del animal de experimentación. En el corazón aislado de rata y cobayo la PGE aumenta la contractilidad, ésta y la $PGF_{2\alpha}$ aceleran la frecuencia cardíaca, así mismo in vivo la PGE provoca contracciones más fuertes en músculo cardíaco. Ambas prostaglandinas citadas inhiben arritmias cardíacas ⁽⁶⁷⁾.

En los vasos sanguíneos la $PGF_{2\alpha}$ y la PGE tienen actividades antagónicas, siendo la primera vasoconstrictora y la segunda vasodilatadora, en cambio en vasos placentarios tienen una actividad selectiva e inhiben la permeabilidad capilar ⁽⁶⁸⁾. Por lo tanto la PGE provoca, una disminución en la presión arterial, un incremento en el flujo sanguíneo y un descenso en la resistencia periférica. Así la $PGF_{2\alpha}$ antagoniza estas actividades de la PGE.

Las prostaglandinas inhiben la secreción gástrica, en músculo circular, la PGE disminuye la contracción, mientras que la $PGF_{2\alpha}$ la incrementa, en cambio en las fibras longitudinales las dos la incrementan.

En los pulmones las PGE provocan vaso y broncodilatación, en tanto que las $PGF_{2\alpha}$ producen vaso y broncoconstricción (6-11).

El miometrio también sufre la acción de las PGs, reflejándose como un aumento en la contracción de este músculo, siendo mas potente la actividad de la $PGF_{2\alpha}$ que la de las demás. Empleada para provocar abortos en diversas etapas del embarazo siendo mas amplio su uso en el primer trimestre, provocando el desencadenamiento del trabajo de parto. En ovario incrementa la luteólisis dando con ello una posibilidad de ser empleados como anticonceptivos. Sobre tejido placentario actúan incrementando la constricción (69).

Las prostaglandinas inhiben la agregación plaquetaria provocada por la inducción de adenosín difosfato (ADP), debido a que previenen la esferización de las plaquetas, que se presenta previa a la agregación (36-70).

Las PGE elevan la concentración del AMP cíclico por estimulación de la adenilciclase y la $PGF_{2\alpha}$ estimulan

la formación de GMP cíclico; como la relación de éstos dos nucleótidos cíclicos controlan la función celular, provocan por ejemplo, en músculo liso el AMP cíclico una relajación y el GMP cíclico una contracción ⁽⁷¹⁾.

Las PGE, PGF_{1α} y PGF_{2α} estimulan la liberación de ACTH in vivo y las PGE in vitro la liberación de HC. La PGF presenta una influencia muy importante en la liberación de prolactina y gonadotrofinas, la PGE provoca un aumento en la secreción de tirotrófina e incrementa la liberación de hormona luteinizante ⁽⁴⁷⁾.

A las prostaglandinas se les involucra en el metabolismo del calcio, pudiendo participar en la liberación de calcio de los huesos. También están asociadas con la liberación de insulina, potenciando la liberación de glucosa y glucagon, inhibiéndose la concentración de glucosa por el empleo de inhibidores de la síntesis de prostaglandinas, tales como el ácido acetil-salicílico y la indometaxina.

La PGE antagoniza la respuesta presora, presentándose en este caso un ejemplo del fenómeno de retroalimentación ya que al estimular una terminación nerviosa se libera PGE, produciendo ésta una inhibición de la síntesis de noradrenalina ⁽⁷²⁾.

En el riñón las PG regulan la microcirculación, reabsor-

ción de agua y la excreción de sodio y potasio, la secreción de renina provocada por infusión de ácido araquidónico en conejos, efecto que se inhibe con indometacina.

ANALISIS RADIOINMUNOLOGICO.

Los procedimientos de cuantificación de sustancias químicas en muestras biológicas son diversos y varían su sensibilidad. Se muestran a continuación límites de detección para diferentes procedimientos y la naturaleza del análisis (73).

ANALISIS	SENSIBILIDAD (moléculas)	TIPO DE ANALISIS
Espectroscopía IR	10^{15}	No destructivo
Espectroscopía UV	10^{15}	No destructivo
Absorción atómica	10^{13}	Destructivo
Emisión a la flama	10^{13}	Destructivo
Cromatografía de gases	10^{13}	Destructivo
Radioisótopo ^{14}C	10^{11}	No destructivo
Radioisótopo ^3H	10^9	No destructivo
Radioisótopo ^{32}P	6×10^6	No destructivo

Las prostaglandinas son sustancias que están presentes en cantidades muy pequeñas, los métodos que se han empleado para cuantificación son diversos y su sensibilidad diferente, en cuanto a las dificultades que se

han presentado pueden hacer impropio el uso de uno u otro método por su falta de sensibilidad, especificidad incapacidad de cuantificación de alguna PG o bien; que sean demasiado lentos y laboriosos ⁽²¹⁾.

A continuación se enlistan los procedimientos más comúnmente empleados junto con sus características.

PGs	Ensayo	Sensibilidad (g/ml)
E, F, A	Bioensayo	10^{-9}
E, A, B	Espectrofotometría ultravioleta (278 nm)	10^{-6}
E	Espectrofotometría de fluorescencia	10^{-6}
E, F, A	Determinación enzimática Cromatografía de gas	10^{-9}
E,F,A,B	Detector de ionización de flama	10^{-7}
E,F,A,B	Detector de captura de electrones	10^{-10}
E,F,A,B	Detector de espectrómetro de masa	10^{-10}
E	Método de proteínas receptoras	10^{-11}
E,F,A,B	Radioinmunoanálisis	10^{-11}

El análisis radioinmunológico es una técnica de detección y cuantificación de sustancias en muestras biológicas, en la que se aplican las reacciones inmunológicas empleando

sustancias en cuya estructura se presentan isótopos radioactivos como trazadores. Este procedimiento suele tener las características de ser muy sensible, específico y sencillo de realizar. Sus limitaciones estriban en dos situaciones diferentes: la primera, que se trabaja con material radioactivo y se deben extremar los cuidados en el manejo de tal material y la segunda es que el costo inicial del equipo empleado es elevado, y por tanto no esta al alcance de cualquier laboratorio, pero la información que proporciona es de gran utilidad en la clínica de los enfermos, apoyando los criterios médicos en el tratamiento de muchas enfermedades.

El análisis radioinmunológico (comúnmente conocido como RIA o radioinmunoanálisis), sigue las bases establecidas por Berson y Yalow en 1959 (74), cuyo fundamento se basa en la competencia que se presenta entre un antígeno de origen natural y un antígeno en cuya estructura tiene un isótopo radioactivo como trazador, por un anticuerpo específico para formar un complejo antígeno-anticuerpo. Tal reacción se esquematiza a continuación:



Ag representa el antígeno natural, ^+Ag es el antígeno marcado. Ac es el anticuerpo específico de los antígenos, ^+Ag-Ac es el complejo formado por el antígeno marcado con el anticuerpo y ^+Ag es una fracción libre que no alcanzó a desplazar el Ag natural, del complejo Ag-Ac.

El procedimiento de cuantificación de las sustancias, empleando RIA no mide las cantidades absolutas de estas, sino que partiendo de la premisa de que las afinidades de los antígenos (Ag y ^+Ag) son iguales si se mantienen las mismas cantidades de ^+Ag y Ac, puede introducirse un factor de inhibición de la formación del complejo ^+Ag-Ac , por un aumento del antígeno natural o un antígeno usado como estándar, de tal manera que con los datos de radioactividad obtenidos en diferentes grados de inhibición con el estándar, puede referirse a estos la concentración de una muestra analizada en forma simultánea a la inhibición en la unión del ^+Ag ya descrita, ya que la radioactividad en el complejo es inversamente proporcional a la concentración del Ag inhibidor (concentración del estándar), de ahí que la cuantificación de las sustancias en muestras biológicas usando RIA sea relativa o no absoluta.

Características del radioinmunoanálisis.

En el RIA se establecen una serie de registros o controles para mantener un dominio esencial del procedimiento, a saber:

Cien por ciento de radioactividad (100% de R), este es un control que permite conocer la actividad del ^{+}Ag que se le agrega al sistema.

Cien por ciento de unión del anticuerpo (100% U), éste registro permite conocer la capacidad de unión que tiene el Ac por el Ag.

Unión inespecífica del anticuerpo, el cual permite valorar la capacidad del Ac para unirse a otras sustancias que no sea su antígeno específico.

Curva estándar, esto sirve para establecer rangos diferentes de unión ^{+}Ag -Ac por la inhibición de tal unión, variando las concentraciones del Ag inhibidor pudiendo entonces construir una gráfica de porcentaje de unión ^{+}Ag -Ac contra la concentración del inhibidor e interpolar valores de % de unión obtenidos para una muestra de concentración desconocida ⁽⁷⁵⁾.

La reacción de formación del complejo Ag-Ac es un equilibrio dinámico por lo que precisa de un adecuado período de incubación que permita alcanzar el equilibrio máximo en ésta formación. Para su cuantificación se hace imprescindible la separación de este complejo de la fracción

no unida, el método de separación empleado debe ser compatible con la persistencia del complejo formado.

Las técnicas de separación más comúnmente empleadas son:

Cromatoelectroforesis.-Pueden contribuir en forma importante las técnicas de cromatografía en papel o electroforesis en acetato de celulosa para separar los antígenos libres y los complejos formados (76).

Precipitación con sales o disolventes orgánicos.-Las soluciones salinas más frecuentemente usadas son de sulfato de sodio, sulfato de amonio y sulfito de sodio, de los disolventes, acetona, alcohol y dioxano.

Adsorción del Ag o del Ac a partículas sólidas.-Los adsorbentes más comunes son: carbón, talco, sílica, celulosa, resinas de intercambio iónico que no son ciertamente específicos para el Ag, modificándose esto por la adición de otra sustancia (dextrán o albúmina) que permite solo la adsorción del Ag.

Adsorción del Ac a superficies sólidas.-En esta técnica el anticuerpo está fijo o adsorbido a materiales plásticos lo que permite al Ag unirse para formar el complejo y por decantación se elimina el Ag libre.

Filtración en gel.-La diferencia en la velocidad de paso del Ag y el complejo Ag-Ac permite separar estos dos por filtración en Sephadex, debido al distinto tamaño molecular de las dos especies, pasando más rápidamente el complejo que el Ag.

Precipitación inmunológica o doble anticuerpo.-Esta técnica está basada en un aumento del volumen molecular del complejo por una segunda reacción inmunológica actuando el complejo como Ag y un segundo anticuerpo, precipitándose esta masa, pudiéndose aumentar la precipitación por una ulterior centrifugación.

Para asegurar un perfecto procedimiento de RIA se han establecido reglas precisas del control de este método y que a continuación se enlistan.

Precisión: Puede definirse como el grado de variación en la cuantificación repetida de una misma muestra alrededor del valor promedio.

Variación intra-análisis: Es un indicador de la precisión y reproducibilidad en la medición de una misma muestra a lo largo de un radioinmunoanálisis.

Variación inter-análisis: Es la medida de reproducibilidad de una misma muestra a través de diferentes análisis.

Sensibilidad: Es la mínima dosis detectable que es significativamente diferente de cero.

Especificidad: Puede definirse como el reconocimiento selectivo de la estructura a estudiar que desea cuantificarse sin interferencia de estructuras análogas u otras sustancias presentes en la muestra.

Exactitud: Es el grado de acercamiento entre el valor obtenido a través del radioinmunoanálisis y la concentración real de la muestra.

Existen elementos que coadyuvan a garantizar la confiabilidad del método, esto es meramente la aplicación estadística a los datos obtenidos, que confieren con los elementos aportados, criterios de aceptación o rechazo del proceso.

CENTELLEO LIQUIDO.

El centelleo líquido es un método empleado para la detección de radiaciones de baja energía (radiación B). Su principio se basa en las interacciones que se presentan entre una sustancia radioactiva distribuída uniformemente en el seno de un líquido de centelleo y sus constituyentes. (Fig. 8). La composición del líquido de centelleo, básicamente está hecha de una mezcla de un disolvente y un soluto, el primero excita sus electrones moleculares en presencia de radiación beta, esta excitación se transmite al soluto el cual actúa como un emisor de fotones, quienes se captan con la ayuda de un fotomultiplicador, el que transforma la señal luminosa en una señal eléctrica ⁽⁷³⁾.

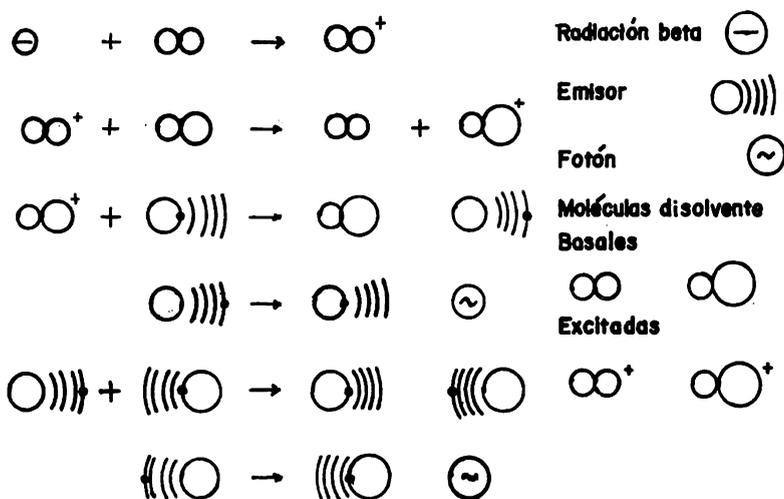


Fig. 8. Interacciones que se presentan en el proceso de centelleo líquido

Características del proceso y de sus componentes.

Para que el proceso sea correcto, la muestra a contar deberá reunir las siguientes características: que sea estable durante un período de tiempo suficientemente amplio de almacenaje y conteo, que la eficiencia de conteo sea compatible con la actividad de la muestra y el tiempo de conteo, la obtención de los datos con exactitud estadística razonable, la eficiencia de conteo sea reproducible y guarde relación al blanco, sin repeticiones o demasiadas manipulaciones.

Las bases que se tienen que tomar en cuenta son: las actividades del material, precisión requerida, número de muestras que se incluyan, el tipo de información esperada y un tiempo de preparación de muestras disponible.

Las muestras que son susceptibles de cuantificar por medio del proceso de centelleo líquido pueden tener en su estructura los isótopos radioactivos más comunes y se muestran a continuación:

Símbolo	Isótopo	Vida media		Energía max. (meV)
		años	días	
³ H	Tritio	12.3		0.018
¹⁴ C	Carbono-14	5,568		0.155
⁹⁰ Sr	Estroncio-90	27.7		0.545
³² P	Fosforo-32		14.3	1.71
³⁵ S	Azufre-35		89.0	0.167
⁴⁵ Ca	Calcio-45		165	0.254

Isótopos que emiten radiaciones beta.

Los elementos que constituyen el líquido de centelleo deberán ser de elevada pureza, "grado centelleo". La elección del disolvente está limitada por la presencia de electrones moleculares para su excitación con la radiación, el tiempo de duración del estado de excitación molecular deberá ser adecuado para asegurar una mayor transferencia energética del material radioactivo al emisor, el disolvente y el emisor deberán ser física y químicamente compatibles entre sí y con el material radioactivo, tendrá que considerarse costo y disponibilidad en el mercado además de no ser quemiluminiscente ⁽⁷⁷⁾. Los compuestos aromáticos son de uso común en el centelleo líquido debido a que poseen elevada eficiencia en la transferencia de energía; pueden usarse disolventes puros para muestras solubles en ellos, o bien; estos mismos disolventes y un agente emulsificante para muestras acuosas.

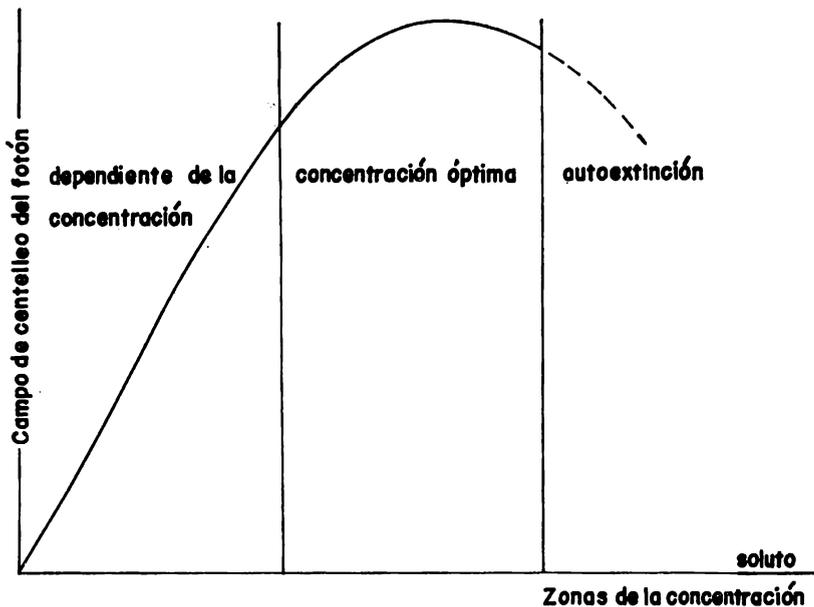


Fig.9. Zonas de actividad del soluto en función a su concentración

Las sustancias de mayor uso como emisores son compuestos conocidos químicamente como oxazoles y oxadiazoles, se les nombra empleando las abreviaturas de sus nombres químicos, como se ve en la figura 10.

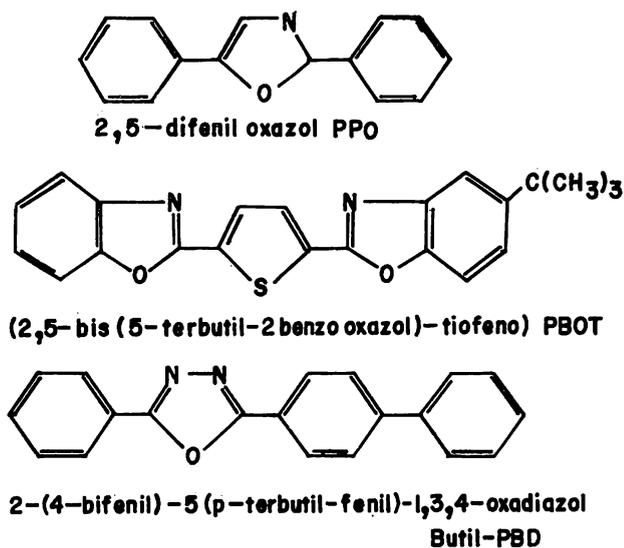


Fig.10. Centelladores primarios, longitud de onda 360- 400 nm.

Dicha figura muestra las estructuras semidesarrolladas de los centelladores primarios (cuya longitud de onda de fluorescencia esta entre 360 a 400 nm) y en la Fig. 11 la estructura, nombre químico y abreviatura de los centelladores secundarios (longitud de onda de fluorescencia entre los 400 a 420 nm) ⁽⁷⁸⁾.

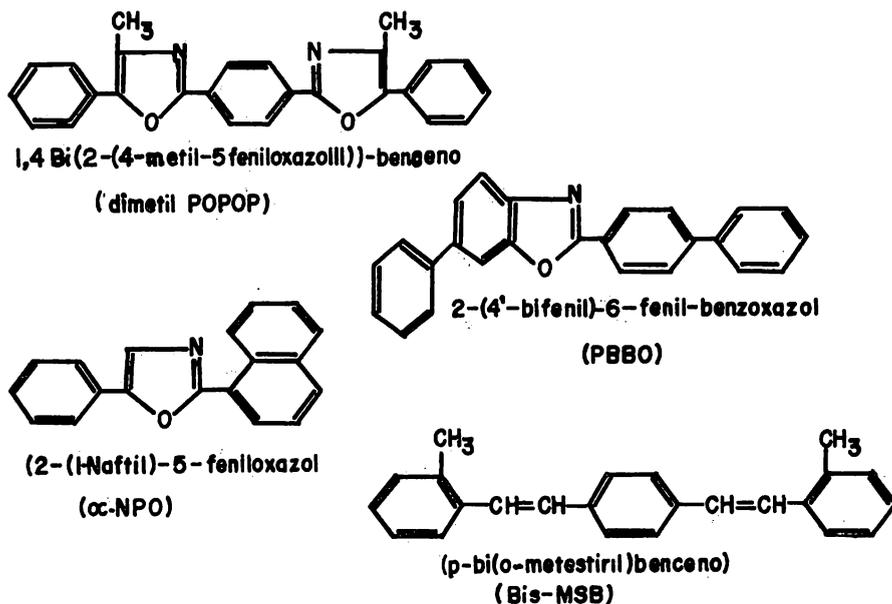


Fig.II. Centelladores secundarios con longitud de onda de 400-420 nm.

En las siguientes tablas se muestran las características de los centelladores.

TIPO	EMISOR	PICO DE FLUORESCENCIA	DECAIMIENTO	CAMPO DEL FOTON	CONCENTRACION OPTIMA (g/l)
P R I M A R I O S	PPO	375	1.4	0.83	3.8
	BUTIL PBD	385	1.0	0.69	6-12
	PBD	375	1.0	0.69	8-12

TIPO	EMISOR	PICO DE FLUORESCENCIA	DECAIMIENTO	CAMPO DEL FOTON	CONCENTRACION OPTIMA (g/l)
S. E C U N D A R I O S	PBOT	446	1.6	0.61	0.2-0.6
	POPOP	415	1.5	0.93	0.2-0.6
	DIMETIL POPOP	427	1.5	0.93	0.2-0.6
	α NPO	404	2.1	0.94	0.2-0.6

Enmascaramiento de la energía "quenching".

Este fenómeno es muy común en el centelleo líquido (79)
 básicamente es la reducción de fotones que logra detectar el fototubo, puede deberse a cuatro causas importantes:

Impurezas contenidas en la muestra que compiten con los centelladores por la energía transferida al disolvente.

Color presente en el líquido de centelleo que absorbe los fotones producidos en el seno de él.

Dilución del emisor, que no consigue transformar toda la energía transferida por el disolvente.

Absorción de radiaciones beta en el caso de que no haya un íntimo contacto estable o físico de los componentes del líquido de centelleo con la muestra radioactiva.

En el presente trabajo se consiguió disminuir la influencia del enmascaramiento empleando la técnica del estándar externo que se describe en el capítulo de material y métodos.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Se estudiaron los niveles plasmáticos de prostaglandinas E y F de 100 recién nacidos cuyo parto fué eutócico. Las calificaciones de apgar de éstos niños variaron entre 8 y 9 al minuto.

Se recolectaron 10 ml de sangre del cordón umbilical al momento de seccionarlo, recibiendo ésta en tubos de ensayo.

Los procedimientos empleados para cuantificar la PGF son una modificación de las técnicas de Jaffe⁽⁸⁰⁾, Levine⁽⁸¹⁾ y Caldwell⁽⁸²⁾; para la PGE es de acuerdo a los métodos descritos por Levine⁽⁸³⁾ y Gutierrez-Cernosek⁽⁸⁴⁾ adaptados por Clinical Assays y presentados en un estuche comercial para realizar 200 pruebas.

MATERIAL DE LABORATORIO

Equipo

Centrífuga refrigerada para 6000 rpm y -10°C.

Colector de fracciones refrigerado y automático.

Contador de centelleo líquido Beckman LS-250.

Teletipo con impresor.

Microbalanza.

Dispensadores de líquidos automáticos.
Agitador de tubos tipo vórtice.
Parrillas eléctricas con agitador magnético.
Baños de agua a temperatura constante.
Congelador de -20°C .
Cuarto de incubación 4°C .
Evaporador de 50 muestras JIL.
Equipos de presión positiva para cromatografía en columna JIL.
Potenciómetro marca Beckman, con microelectrodos.

REACTIVOS

Acido acetil salicílico

EDTA

Eter de petróleo

Acetato de etilo

Isopropanol

Acido clorhídrico

Metanol

Benceno

Hidróxido de sodio

Acido acético

Tolueno

Tritón X-100

2,5-difenil oxazol (PPO)

2,2'-p-fenileno (4-metil-5-feniloxazol) (dimetil POPOP).
Estuche comercial Clinical Assays para análisis radioinmuno-
nológico de prostaglandina F que contiene:

Antisuero liofilizado de prostaglandina
Estándar de prostaglandina liofilizado (2400 pg/ml).
Suero normal de conejo liofilizado
Suero de carnero anticonejo liofilizado
Estándar de PGF_{2α} tritiado (2 μCi) y liofilizado.
Solución de amortiguador Tris.
Gelatina.

Estuche comercial Clinical Assays para análisis radioinmu-
nológico de prostaglandina E que contiene:

Antisuero de prostaglandina B liofilizado.
Estándar de prostaglandina B liofilizado (40 ng/ml).
Suero normal de conejo liofilizado.
Suero de carnero anticonejo liofilizado.
Estándar de PGB tritiado (2 μCi) y liofilizado.
Solución de amortiguador Tris.
Gelatina.

PROCEDIMIENTO

La muestra se recibió en tubos de ensayo fríos, los cuales contenían 0.1 ml de una solución con 5 mg de ácido acetil salicílico disuelto en 1 ml de agua destilada y 0.1 ml de una solución de 70 mg de EDTA en 1 ml de agua: agitándose por inversión 5 veces, conservándose en hielo 10 a 15 minutos hasta su centrifugación para separar el paquete celular del plasma a 2500 rpm y 10°C durante 10 minutos. El plasma ya separado fue congelado a -20°C hasta su análisis, siendo procesado en un lapso de tiempo no mayor a una semana, (Fig. 12).

METODO

1. OBTENCION DE LA MUESTRA

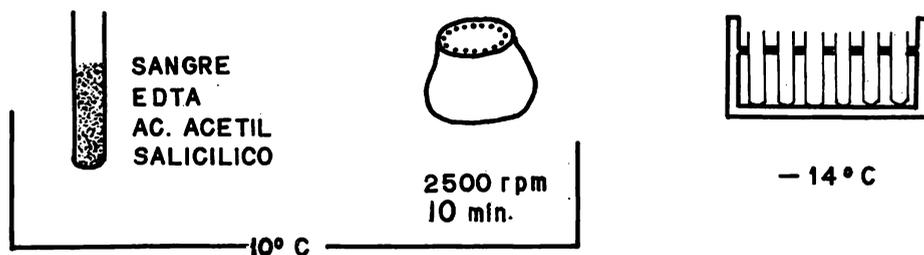


Figura 12

El método para la cuantificación de prostaglandinas plasmáticas contempla tres pasos importantes: a) la extracción de las prostaglandinas del plasma, b) la purificación de las mismas y c) la cuantificación por radioinmunoanálisis, a continuación se describen las etapas del proceso antes mencionado.

Extracción.

Para eliminar lípidos neutros y proteínas que pueden interferir en el análisis debido a la competencia de la albúmina y el anticuerpo por las prostaglandinas (85), es preciso hacer la siguiente extracción. En tubos de ensayo de 15 x 100 mm debidamente rotulados se mide 1 ml de plasma, se le agregan 3 ml de éter de petróleo agitándose mecánicamente. Al separarse las dos fases, la etérea se elimina por succión con vacío, a continuación se añaden 3 ml de una mezcla de extracción que contiene acetato de etilo-isopropanol-ácido clorhídrico 0.2 N en proporción 3:3:1 respectivamente; agitándose vigorosamente durante 15 segundos, al término de este tiempo se miden 2 ml de acetato de etilo y 3 ml de agua destilada, se repite la agitación y se procede a centrifugar los tubos durante 10 minutos a 2500 rpm y 10°C. Se toman 3.5 ml de la fase orgánica en un tubo de ensayo de 13 x 100 mm, evaporándose a sequedad (a 55°C y con corriente de nitrógeno), con este sistema se consigue evaporar hasta 50 muestras en 10 minutos (Fig. 13).

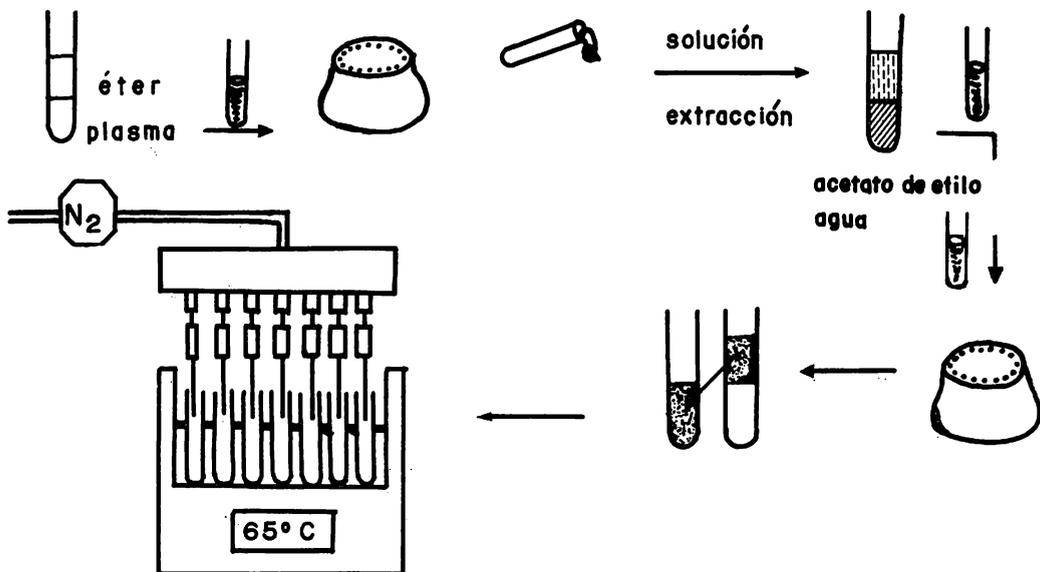


Fig.13. Extracción de la muestra

Purificación.

Con el fin de evitar las reacciones cruzadas de las prostaglandinas entre si, de acuerdo a los estudios de diferentes autores (80,82,84) es necesario purificarlas por medio de una cromatografía en columnas de ácido silícico.

En columnas Kontes de vidrio que poseen un depósito de 50 ml de capacidad, se empaquen las columnas con un tapon inferior de lana de vidrio, midiéndose en ellas 2 ml de una suspensión de ácido silícico (malla 100, 0.5 g/ml), en una mezcla benceno

acetato de etilo (60-40), cada una.

La elución diferencial de las prostaglandinas se hace empleando cuatro mezclas de disolventes, en las cuales se varía la concentración de uno de ellos (metanol).

a)mezcla 1 , benceno-acetato de etilo (60:40),

b)mezcla 2 , benceno-acetato de etilo-metanol
(60:40:20),

c)mezcla 3 , benceno-acetato de etilo-metanol
(60:40:10) y

d)mezcla 4 , benceno-acetato de etilo-metanol
(60:40: 2) .

El extracto evaporado se resuspende en 1 ml de la mezcla 3 y se vierte cuidadosamente en la parte superior de la columna. Se permite la salida al mililitro de la mezcla empleada en la resuspensión sin dejar que se seque la columna. Con 6 ml de la mezcla 1 se eluyen las prostaglandinas A y B, con 12 ml de la mezcla 4 se separan las prostaglandinas E y finalmente con 6 ml de la mezcla 2 se obtienen las prostaglandinas F , (Fig. 14).

Columna

KONTES



FRACCION	MEZCLA DE SOLVENTES	ml	PG
1	benceno-acetato etilo	6	A y B
2	benceno-acet. etilo-metanol(60:40:2)	12	E
3	benceno-acet. etilo-metanol(60:40:20)	6	F

Ac. silicico malla 100
(en benceno-acetato etilo 60:40)

Fig.14. Condiciones de la separación de prostaglandinas

Cada prostaglandina fue separada y recibida en un tubo en forma individual. Para acelerar su paso se usó una corriente de nitrógeno con una presión promedio de 150 mm de Hg empleando para ello un aparato diseñado por nosotros (Fig. 15).

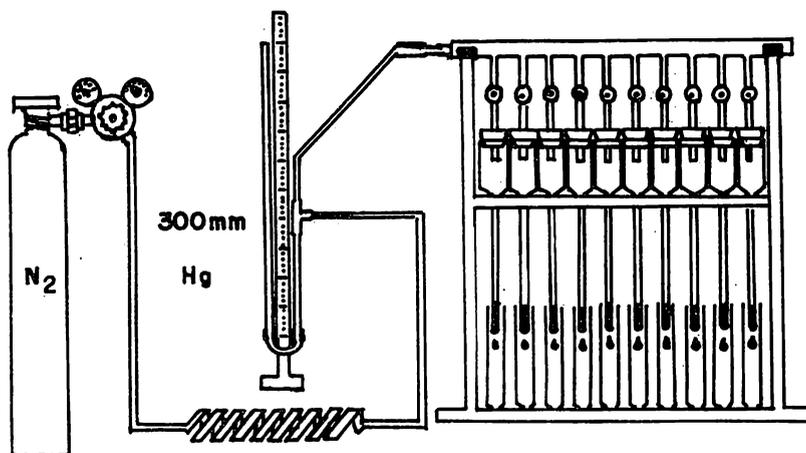


Fig.15. Separación diferencial de prostaglandinas

Esto permitió la reducción del tiempo de elución de 18 horas (cuando se hacia pasar únicamente por gravedad a 2 horas con la presión positiva).

Cada tubo de las prostaglandinas separadas y perfectamente identificadas se llevo al sistema de evaporación, hasta la eliminación completa de los solventes cubriéndose cuidadosamente con papel parafilm en espera de ser procesadas y cuantificadas en el análisis radioinmunológico.

En las pruebas que se hicieron con el fin de determinar el volumen de las mezclas se separación con la cual eluye cada tipo de prostaglandina, se emplearon columnas de ácido silícico perfectamente empacadas y un colector de fracciones que posee un sistema electrónico de volúmenes fijos.

Cantidades conocidas de estándares tritiados de prostaglandinas (A,B,E y F) se les hizo pasar a través de las columnas empleando volúmenes variables de las mezclas recibiendo alícuotas de 1ml en tubos de vidrio; analizándoseles en forma individual y mezcladas, el resultado final se muestra en la figura 16.

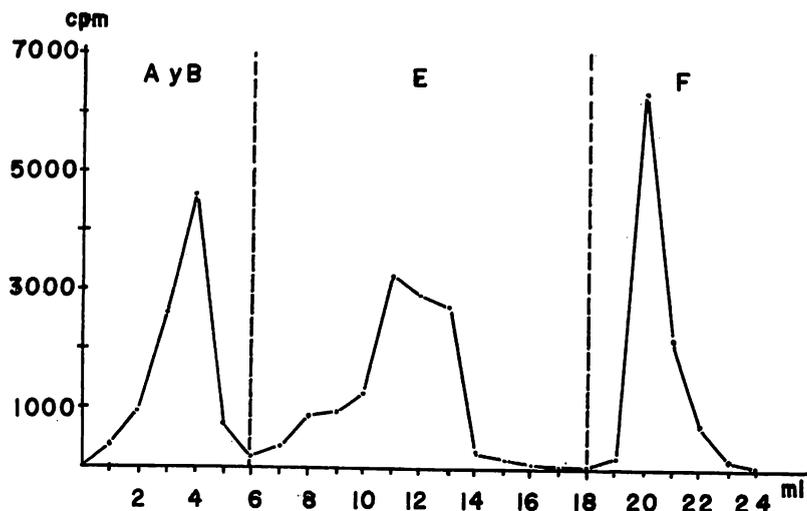


Fig.16. Separación cromatográfica de las prostaglandinas.

Conocidas las condiciones de la separación se diseñó una prueba con el objeto de conocer la eficiencia de la recuperación, en 10 columnas empacadas de igual forma se hicieron pasar mezclas en cantidades conocidas de estándares de prostaglandinas tritadas recibiendo en tubos de vidrio las diferentes fracciones, llevándose a evaporación y resuspendiéndose con 1 ml de solución de NaOH 0.1 N, se les agregaron 10 ml de solución de centelleo agitándoseles vigorosamente durante 60 segundos, se dejaron reposar una hora y se sometieron a conteo. Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de recuperación siendo del 60% en promedio y ± 1.25 de error estándar para la $\text{PGF}_{2\alpha}$ y 63% ± 2.38 en el

caso de la PGE. De 10 columnas que se usaban en la separación de las muestras plasmáticas una de ellas se le destinaba como control de recuperación, sin que se hayan encontrado cambios dentro de los límites de los porcentajes expresados anteriormente.

RADIOINMUNOANALISIS

A continuación se describen los procedimientos empleados en la cuantificación de las prostaglandinas (E y F).

PROSTAGLANDINA F

Preparación de reactivos.

Reactivo A:

El contenido de un frasco del concentrado de amortiguador TRIS (compuesto de 0.36 g. de trizma, 2.5 g. de NaCl en 10 ml de agua) se mezcla con 250 ml de agua y ajustamos el pH a 7.4 y con agua destilada lo llevamos a 300 ml, guardándose en el refrigerador, un máximo de dos meses.

Reactivo B:

100 mg de gelatina se disuelven en 100 ml del reactivo A, calentando ligeramente y con agitación moderada, ajustando a 7.4 el pH de la solución con NaOH 0.1 N o HCl 0.1 N, conservar en refrigeración, estable dos o tres días.

Los frascos que contienen los liofilizados del estuche comercial: antisuero de $\text{PGF}_{2\alpha}$, suero normal de conejo, suero de carnero anticonejo y el estándar marcado con tritio de la prostaglandina ($^3\text{H PGF}_{2\alpha}$) se reconstituyen con 10 ml del reactivo B en cada frasco, dejándolos reposar 15 minutos y evitando la formación de espuma al agitarlos. Se guardan bajo una temperatura de -10 a -20°C pudiendo

congelarse y descongelarse repetidamente, conservando sus características, el estándar frío de prostaglandina se re suspende con 5 ml del reactivo B, estabilidad 3 meses, en congelación.

Solución de centelleo:

7 g de PPO y 0.3 de dimetil POPOP, se disuelven en 667 ml de tolueno y 333 ml de tritón X-100, almacenándose en frasco ámbar a temperatura constante.

Fundamento del método.

Este es un procedimiento de análisis radioinmunológico para cuantificar el contenido de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en muestras biológicas. Esto se hace midiendo el porcentaje de unión, que se presenta por la competencia de cantidades conocidas de prostaglandina F marcada con tritio y la presente en la muestra, por un anticuerpo específico para la $\text{PGF}_{2\alpha}$.

La separación de la prostaglandina libre de la unida se efectúa empleando la técnica del segundo anticuerpo seguida de una centrifugación. (Fig. 17)

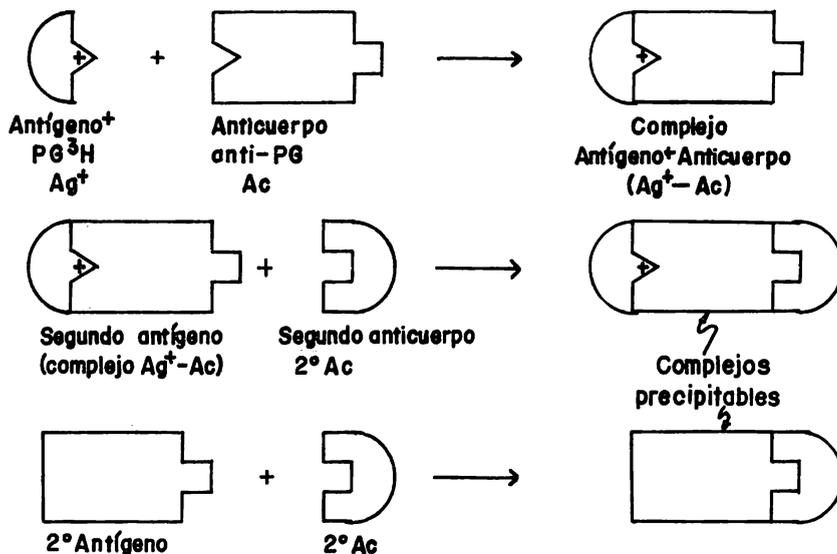


Fig.17. Principio de la separación de las porciones libre y unida por medio del segundo anticuerpo.

Desarrollo del método.

Previo al ensayo se descongelan los reactivos del equipo y se colocan en hielo, procurando mantenerlos en tales condiciones durante el análisis. En este tipo de estudios es necesario preparar una curva con estándares de PG en cantidades conocidas las que se unen al anticuerpo específico y separándolas de las libres puede construirse una gráfica de porcentaje de unión contra concentración y con ésta determinar las cantidades de la PGF presente en la muestra biológica.

Preparación de la curva estándar.

En seis tubos marcados con: 1/1, 1/3, 1/9, 1/27 1/81 y 1/243, se pipetea 1 ml del reactivo B a partir del tubo 1/3 en el tubo 1/1 se coloca 1ml del estándar de concentración 24 ng/ml y de este se toma 0.5 ml vertiéndose en el tubo marcado con 1/3 se mezcla suave y completamente evitando que se forme espuma, a continuación se mide 0.5 ml de la solución y se travasa al tubo 1/9, repetimos la operación sucesivamente hasta el tubo 1/243. Las concentraciones de PG en pg/0.1 ml obtenidas finalmente son: a)1/1 de 2400, b)1/3 de 800, c)1/9 de 267, d)1/27 de 88.9, e)1/81 de 29.6 y f)1/243 de 9.8.

Ensayo radioinmunológico.

Se usan tubos de plástico desechables de 75 x 100 mm para radioinmunoanálisis. Llevándose un registro minucioso de los tubos que contienen los diferentes componentes del ensayo y cada tubo perfectamente identificado. En 16 tubos iniciales se tienen los controles de unión y la curva estándar, en los tubos restantes se procesaran las muestras, todo esto por duplicado.

A los tubos se les miden 0.5 ml del amortiguador tris isogel (reactivo B), en los tubos marcados 1 y 2 (unión inespecífica) se añade 0.1 ml del reactivo B, los tubos con las marcas 3 y 4 seran el 100 % de unión, a partir del tubo 5 se miden

0.1 ml de las soluciones de la curva estándar, así los tubos 5 y 6 tendrán de la dilución 1/1, 7 y 8 de 1/3, 9 y 10 de la 1/9, 11 y 12 de 1/27, 13 y 14 de 1/81 y finalmente 15 y 16 de la dilución 1/243.

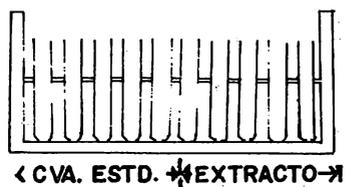
Los extractos de las PGF obtenidas de la separación cromatográfica se resuspenden en 0.6 ml del reactivo B con agitación moderada, trasvasándose completa y cuidadosamente a tubos de radioinmunoanálisis.

Con pipeta automática y extremo cuidado se depositan en el fondo de los tubos 0.050 ml de la solución de prostaglandina tritiada, colocándose la punta empleada en el cesto de desechos radioactivos, a continuación se añaden a partir del tubo 3, 0.050 ml de la solución de antisuero de prostaglandina, agitar suavemente, los tubos se tapan y meten en un baño de agua a 37°C incubándose durante una hora.

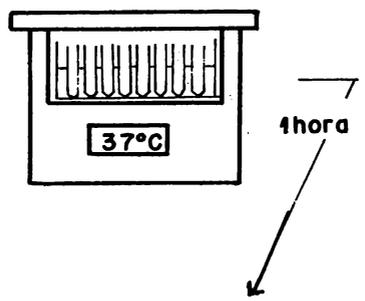
Al término de la incubación se sacan y añaden a todos los tubos 0.1 ml del suero normal de conejo y 0.1 ml del suero de carnero anticonejo (segundo anticuerpo). Mezclamos agitando suavemente y en el cuarto de incubación a 4°C incubamos de 18 a 24 horas.

Después de la incubación se centrifugan a 3000 rpm durante 30 minutos a 4°C. En seguida de la centrifugación se decantan los tubos 1 y 2 en frascos de centelleo entrechocando los

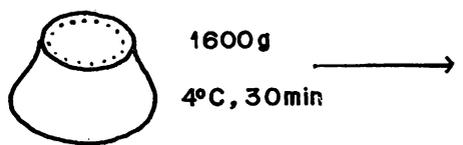
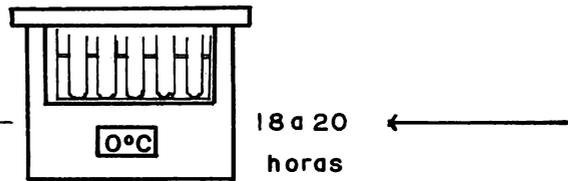
rebordes de ambos, (cuentas totales). El sobrenadante de los demás tubos se deposita en un recipiente que contiene los desechos radioactivos. Los tubos ya decantados se depositan sobre sus labios en un papel secante y secamos perfectamente las paredes de los tubos con papel filtro. Disolver los precipitados de todos los tubos con 1 ml de solución de NaOH 0.1N, con agitación; el contenido de los tubos se vacía en frascos de centelleo asegurando la máxima transferencia, agregar 10 ml de la solución de centelleo tapar y mezclar con agitación vigorosa durante 1 minuto, dejar reposarlos una hora y proceder a determinar la radioactividad presente (CPM) durante 10 minutos (Fig. 18).



- 1) PG ³H Est.
 - 2) ANTISUERO PG
-



-
- 1) SUERO NORMAL CONEJO
 - 2) SUERO CARNERO ANTICONEJO



NaOH →

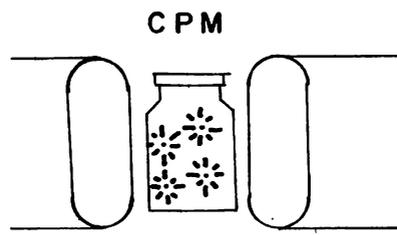


Figura. 18.

PROSTAGLANDINA E

Preparación de reactivos.

Reactivo A:

Amortiguador tris, el contenido del frasco de solución concentrada 30 X (cuya composición es: amortiguador tris ma 0.3 M, cloruro de sodio 4.3 M y azida de sodio 0.46 M como preservativo) se mezclan con 270 ml de agua bidestilada, ajustándose el pH a 7.4 y aforar a 300 ml con agua bidestilada, puede conservarse a 4°C hasta dos meses.

Reactivo B:

Disolver en 100 ml del reactivo A, 100 mg de gelatina calentando ligeramente y agitando suavemente, se ajusta a 7.4 el pH con NaOH 0.1 N o HCl 0.1 N, preparar cada 2 o 3 días y conservar bajo refrigeración.

El contenido del frasco estándar PGB y se reconstituye con 1 ml de agua destilada, dejando reposar durante 15 minutos y se mezcla agitando suavemente. El estándar reconstituido se conserva en congelación (-10 a -20°C) pudiendo congelar y descongelar varias veces, mezclando suavemente en cada ocasión, estable durante tres meses.

Los frascos que contienen los liofilizados del estuche comercial: Prostaglandina B₁ tritiada (PGB₁ 3H), suero

normal de conejo y suero de carnero anticonejo se reconstituyen pipeteando 10 ml de reactivo B en cada frasco, agitando suavemente evitando la espuma, en caso de ser usados de inmediato. Mantener en congelación (-10 a -20°C) un tiempo no mayor a tres meses. No pierden sus características si se les congela o descongela repetidamente.

Solución de centelleo: 7 g de PPO, 0.3 g de dimetil POPOP, se disuelven en 667 ml de tolueno y 333 ml de Tritón X-100, almacenándose en frasco ambar a temperatura constante.

Fundamento del método.

Este es un procedimiento de análisis radioinmunológico para cuantificar los niveles de PGE en muestras biológicas. El antisuero proporcionado en el estuche comercial mide específicamente PGB, por tanto es necesaria la transformación de PGE purificada, en PGB mediante un tratamiento alcalino, antes del ensayo inmunológico. La cuantificación de la PGB obtenida se hace midiendo el porcentaje de unión de esta y una cantidad conocida de PGB ^3H con el anticuerpo antes mencionado, la separación de las prostaglandinas B libres de las unidas se realiza usando la técnica de doble anticuerpo seguida de una centrifugación (Fig. 17).

Desarrollo del método.

Conversión PGE en PEB.

El extracto obtenido de la cromatografía se diluye con 2 ml del amortiguador tris-isogel, tomar 1 ml de esta solución en tubo de vidrio de 16 x 150 mm con tapón de rosca, se ajusta el pH de la solución en un rango de 12.5 a 12.9 usando un potenciómetro provisto de microelectrodos, a continuación se tapan los tubos y mezclan perfectamente. En un baño de agua a ebullición se meten durante 5 minutos, los tubos se sacan se enfrían ajustando el pH a 7.4 con ácido acético glacial. Se toma una alícuota de 0.4 ml de esta solución considerando el factor de dilución para el ensayo radioinmunológico.

En 10 tubos de ensayo se colocaron cantidades medidas de PGE ^3H (9500 CPM) y se sometieron a conversión alcalina cuantificándose por RIA la PGB obtenida, calculándose el porcentaje de eficiencia de cambio, siendo el promedio de este igual a 96.96 con un error estándar de $\pm 1.53\%$.

Previo al ensayo se descongelan los reactivos del equipo y se colocan en hielo, manteniéndolos en tales condiciones durante el análisis. Es necesario preparar una curva con estándares de PGs en cantidades conocidas las que se unen al anticuerpo específico y separándolas de las .

libres puede construirse una gráfica, de porcentaje de unión contra concentración y con ésta determinar las cantidades de PGE presente en la muestra biológica.

Preparación de la curva estándar.

En seis tubos marcados con: 1/1, 1/3, 1/9, 1/27, 1/81 y 1/243 se pipetea 0.6 ml del reactivo B a partir del tubo 1/3, en el tubo 1/1 se coloca 0.6 ml del estándar de concentración 40 ng/ml y de éste se toma 0.3 ml vertiéndose en el tubo marcado con 1/3, se mezcla suave y completamente evitando que se forme espuma, a continuación se mide 0.3 ml de la solución y se trasvasa al tubo 1/9, repitiéndose la operación sucesivamente hasta el tubo 1/243. Las concentraciones de PG en pg/0.05 ml finalmente son: a) 1/1 de 2000, b) 1/3 de 667, c) 1/9 de 222, d) 1/27 de 74, e) 1/81 de 25 y f) 1/243 de 8.2

Ensayo radioinmunológico.

Se usan tubos de plástico desechables de 75 x 100 mm para radioinmunoanálisis. Llevándose un registro minucioso de los tubos que contienen los diferentes componentes del ensayo y cada tubo perfectamente identificado, en 16 tubos iniciales se tienen los controles de unión y la curva estándar, en los tubos restantes se procesaran las muestras, todo esto por duplicado.

A los 16 tubos se les miden 1.0 ml del amortiguador tris isogel (reactivo B), en los tubos marcados 1 y 2 (unión inespecífica) se añade 0.1 ml del reactivo B, los tubos con las marcas 3 y 4 serán el 100% de unión, a partir del tubo 5 se miden 0.050 ml de las soluciones de la curva estándar, así los tubos 5 y 6 tendrán de la dilución 1/1, 7 y 8 de 1/3, 9 y 10 de la 1/9, 11 y 12 de la 1/27, 13 y 14 de la 1/81 y finalmente 15 y 16 de la dilución 1/243.

A los tubos que contienen 0.4 ml de las soluciones de PGE transformadas, con pipeta automática y extremo cuidado se depositan en el fondo de los tubos 0.050 ml de la solución de prostaglandina tritiada, tirándose la punta empleada en el cesto de desechos radioactivos, a continuación se añaden a partir del tubo 3, 0.050 ml de la solución de antisuero de prostaglandina, agitar suavemente, los tubos se tapan y meten en un baño de agua a 37°C, incubándose durante una hora.

Al término de ese tiempo se sacan y añaden a todos los tubos 0.1 ml de suero normal de conejo y 0.1 ml del suero de carnero anticonejo (segundo anticuerpo). Mezclamos agitando suavemente y en el cuarto de incubación a 4°C incubamos de 18 a 24 horas.

Después de la incubación se centrifugan a 3000 rpm durante 30 minutos y a 4°C. En seguida de la centrifugación se

decantan los tubos 1 y 2 en frascos de centelleo entrechocando los rebordes de ambos (cuentas totales). El sobrenadante de los demás tubos se deposita en un recipiente que contiene los desechos radioactivos. Los tubos ya decantados se depositan sobre sus labios en un papel secante y secamos perfectamente las paredes de los tubos con papel filtro. Disolver los precipitados de todos los tubos con 1 ml de solución de NaOH 0.1 N, con agitación; el contenido de los tubos se vacía en frascos de centelleo, se añaden 10 ml de la solución de centelleo, tapar y mezclar con agitación vigorosa durante un minuto, dejar reposarlos una hora y proceder a determinar la radioactividad presente (CPM) durante 10 minutos, en el contador de centelleo líquido (Fig. 18).

Corrección por enmascaramiento "quenching".

Con el objeto de reducir la presencia de enmascaramiento de las muestras procesadas, usamos el método del estándar externo. Frascos proporcionados por el proveedor del aparato que contenían estándares calibrados con tritio, en tolueno y cantidades crecientes de cloroformo (sustancia que produce enmascaramiento en las soluciones de centelleo) se sometieron a conteo en el contador de centelleo líquido escogiendo el programa de estándar externo, con lo que se obtuvieron los valores de enmascaramiento (s) de cada frasco. Conociendo la actividad de las muestras y habiendo determinado el enmascaramiento,

podemos construir una gráfica de eficiencia contra enmascaramiento (Fig. 19) con ella podemos interpolar los valores de enmascaramiento de muestras y reducir ese factor de error en nuestro sistema.

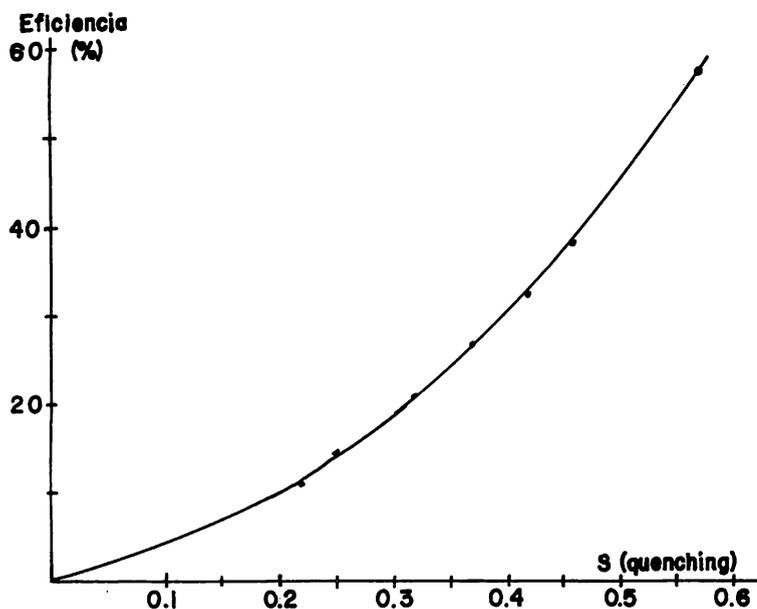


Fig.19. Curva de enmascaramiento

CALCULOS.

Datos obtenidos por centelleo líquido.

UNE = Unión inespecífica.

T = Cuentas totales (tomadas como el promedio de los frascos T_1 y T_2).

T_c = Cuentas totales corregidas. ($T_c = T - UNE$)

U_o = 100 % de unión.

U_c = 100 % de unión corregida. ($U_c = U_o - UNE$).

CPM_n = Cuentas por minuto de los tubos de curva estándar o de las muestras sin corregir.

CPM_{nc} = Cuentas por minuto corregidas.

CPM_{nc} = CPM_c - UNE.

s = Valor del enmascaramiento del frasco.

Corrección por enmascaramiento.

Interpolando en la gráfica el valor de "s" conocemos la eficiencia y empleando la siguiente fórmula tenemos las DPM sin enmascaramiento (reales) :

$$DPM = \frac{(CPM - UNE) \times 100}{\% \text{ eficiencia}}$$

Hechas las correcciones de enmascaramiento y usando la misma nomenclatura, procedemos a calcular el porcentaje de unión de estándares y muestras.

$$\% U = \frac{CPMn - UNE}{Uc}$$

CPMn = Cuentas por minuto de los tubos de curva estándar o de las muestras sin corregir en DPM.

UNE = Unión no específica en DPM.

Uc = 100 % de unión corregida en DPM. $Uc = Uo - UNE$

Para conocer la concentración de PGs en la muestra usamos la transformación Logit-log descrita por Rodbard, adaptada por Bedolla y colaboradores (86). En la cual se construye una gráfica cuyos valores de "y" serán los porcentajes de unión de la curva estándar transformada en Logit y los de "x" serán los logaritmos decimales de las concentraciones del estándar frío.

$$L = \ln \frac{\% U}{100 - \% U}$$

L = logit

Para facilitar los cálculos de la concentración evitando con ello los errores personales, se calcula empleando el procedimiento de los mínimos cuadrados, la pendiente de la recta (m) y el valor de la ordenada al origen (b), usando las siguientes fórmulas:

$$m = \frac{\sum xy - (\sum x)(\sum y) / n}{\sum x^2 - (\sum x)^2 / n}$$

$$b = \frac{\sum y - [(m) (\sum x)]}{n}$$

$$y = mx + b$$

De donde podemos conocer la concentración de las muestras:

$$[x] = \text{antilog} \frac{y + b}{m}$$

Cuyas concentraciones son:

$$\text{PGF} = \text{pg/ml}$$

$$\text{PGE} = \text{pg/tubo}$$

Los procesos fisicoquímicos y químicos empleados para la purificación y/o transformación de las prostaglandinas plasmáticas no son totalmente eficientes, por lo que es necesario introducir una corrección por cada etapa del procedimiento, en que pudiera existir una pérdida en la recuperación.

Recuperación por pérdida de la cromatografía en columna.

$$[X_c] = \frac{[x] \cdot 100}{\% \text{ R.C.}}$$

$[X_c]$ = concentración corregida pg / ml.

$[x]$ = concentración de prostaglandina:

%R.C. = porcentaje de recuperación de columna.

Corrección por alícuota extracción.

$$[X_{cd}] = \frac{VTS [X_c]}{VAE}$$

VTS = volúmen total de solventes.

VAE = volúmen alícuota empleada.

Xcd = concentración PG corregida por alícuota de extrac
ción.

Para PGF = pg / ml.

Corrección por eficiencia de la conversión.

$$X_{cdc} = \frac{X_{cd} \cdot 100}{PEC}$$

PEC = porcentaje de eficiencia de la conversión.

$[X_{cdc}]$ = concentración de prostaglandina corregida por PEC.

Corrección por alícuota de la conversión.

$$[X_{cdca}] = \frac{(VTC) (X_{cdc})}{VAC}$$

VTC = volúmen total en la conversión

VAC = volúmen de la alícuota tomada de la conversión.

$[X_{cdca}]$ = concentración real de PGE (pg/ml).

CONTROL DE CALIDAD DE LA TECNICA

Las pruebas que se realizaron para valorar el sistema fueron las que se describen a continuación: sensibilidad, precisión, especificidad y exactitud.

Sensibilidad

Usando los estándares proporcionados en el equipo, la concentración mínima detectable para la PGF fue de 18.3 pg/ml y para la PGE 25 pg/ml. El empleo de la transformación (logit-log) para linearizar la curva de estándares permitió establecer los límites de confiabilidad entre 30 y 2400 pg/ml para la PGF (Fig. 20) y de 50 a 3000 pg/ml para la PGE (Fig. 21). Las pendientes de las curvas fueron de -2.3 en promedio para la PGF y ± 0.25 de desviación estándar, la PGE tuvo valores de -2.26 ± 0.34

Precisión

Con el fin de conocer que variación tenía cada punto de la serie de diluciones con las que se construye la curva tipo, se procesaron en un solo día, diez veces cada punto y con ellos se calcularon los coeficientes de variación tanto de la PGF como de la PGE, como se observa en el siguiente cuadro:

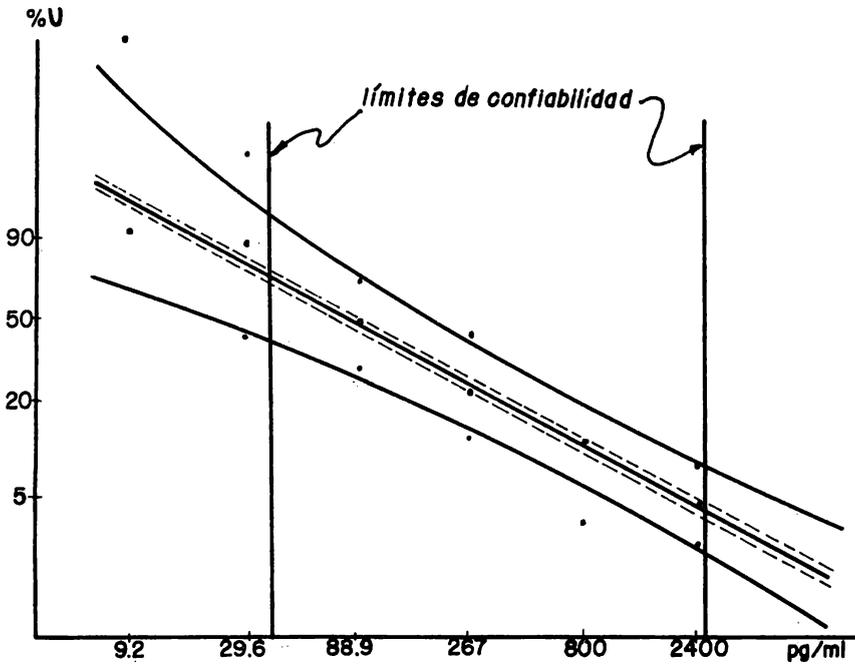


Fig. 20. Curva estándar de PGF

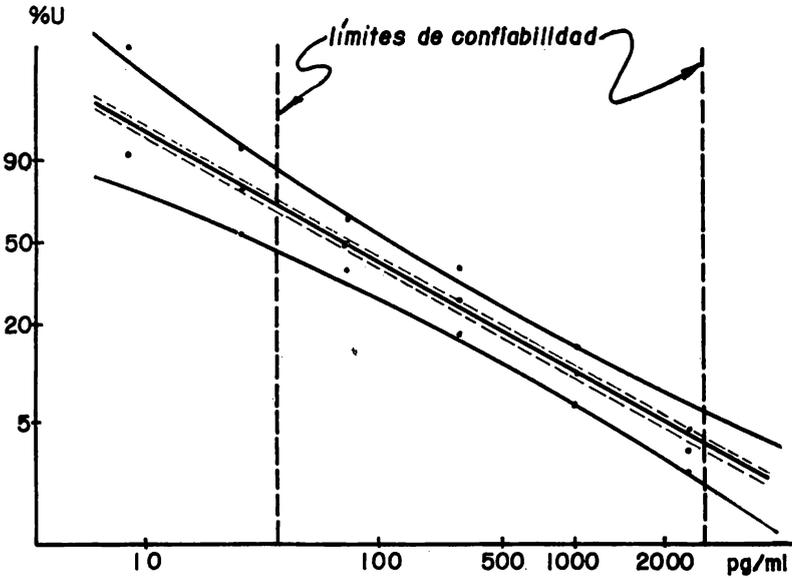


Fig. 21. Curva estándar de PGE

DILUCIONES	1/1	1/3	1/9	1/27	1/81	1/243
PGF _{2α}	4.7	4.3	3.5	2.0	3.4	4.3
PGB	1.3	2.9	2.8	3.2	4.0	5.8

Los coeficientes de variación obtenidos de 10 ensayos hechos en diferentes días, empleando las diluciones de las curvas estándar se indican en el siguiente cuadro:

DILUCIONES	1/1	1/3	1/9	1/27	1/81	1/243
PGF _{2α}	6.1	5.7	3.6	3.8	5.2	5.8
PGB	3.9	3.5	5.0	4.6	4.9	6.2

El coeficiente de variación intra-análisis para 10 ensayos radioinmunológicos de una misma muestra fueron de 3.18% con promedio de 341.5 pg/ml y desviación estándar 4.5 para la PGF y de 2.2% en la PGE con 1063 pg/ml en promedio y 19 de desviación estándar. El resultado de 10 ensayos de una misma muestra realizados en diferentes días (inter-análisis) tuvieron un coeficiente de variación de 6.5% con promedio de 356 pg/ml y 10.27 de desviación estándar para la PGF; en el caso de la PGE 7.73 de coeficiente de variación, con promedio de 1044 pg/ml y 57.5 de desviación estándar.

ESPECIFICIDAD

La separación cromatográfica de las prostaglandinas permitió operar al anticuerpo sin que hubiera en el sistema reacciones cruzadas debido a homólogos de las prostaglandinas por evaluar.

EXACTITUD

La recuperación de 1000 pg de PGF sometidos a los procesos de extracción, purificación y radioinmunoanálisis por triplicado, fue de 962 pg así mismo de 1000 pg de PGE fueron recuperados 936 pg.

Con el propósito de valorar rápidamente el funcionamiento del proceso, se establecieron criterios de calidad los cuales se hicieron con controles gráficos de varios parámetros: a) por ciento de unión no específica, con un máximo aceptable de 3% para la PGF y de 4% en el caso de la PGE (Fig. 22); b) pendientes de las curvas, para la PGF se obtuvo un promedio de -2.3 y desviación estándar de ± 0.25 con la PGE sus valores fueron -2.26 ± 0.34 (Fig. 23) y c) por ciento de eficiencia de unión del anticuerpo, para ambas prostaglandinas se establecieron los límites de confianza entre 30% a 90% (Fig. 24). Con todo esto se puede aceptar o rechazar cualquier ensayo que no reúna estos requisitos.

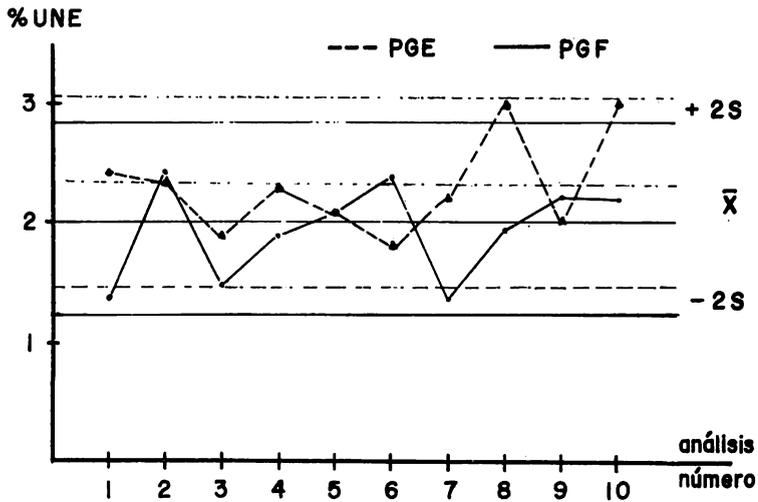


Fig. 22. Gráfica del control diario del RIA para la unión no específica.

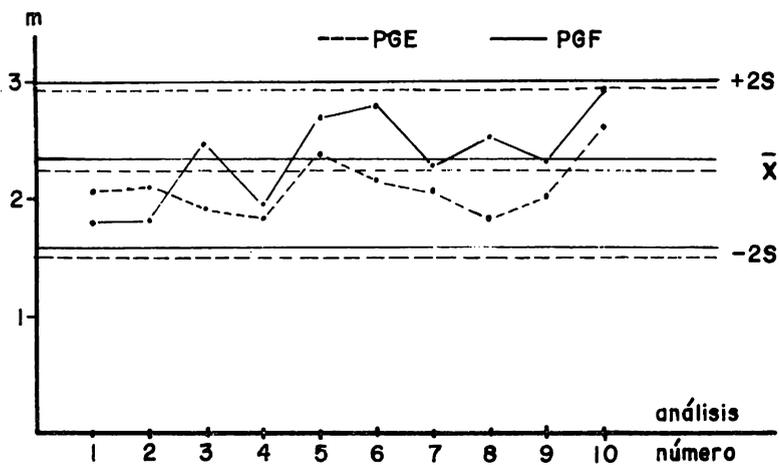


Fig. 23. Gráfica del control diario del RIA para pendientes.

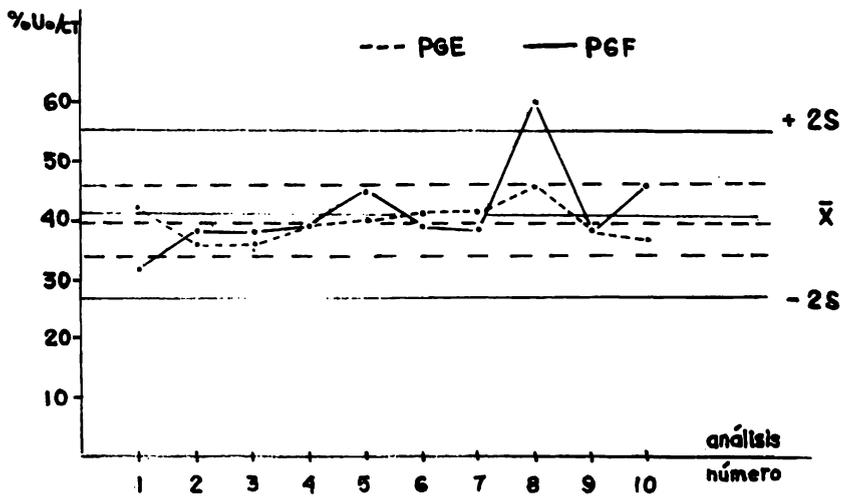


Fig.24. Gráfica del control diario del RIA para la eficiencia de unión del anticuerpo.

RESULTADOS DE PGE Y PGF EN PLASMA DE RECIEN NACIDOS

Las concentraciones de las prostaglandinas estudiadas en los 100 niños recién nacidos son los siguientes: La PGF tuvo un valor promedio de 444.3 pg/ml con una desviación estándar de ± 190.02 pg/ml (cuadro 1) y límites de confiabilidad al 95.4%, tomados como $X \pm 2S$ fueron de 64.3 a 824 pg/ml. (Figs. 25 y 26).

Los valores para la PGE tuvieron un valor promedio de 2.2703 ng/ml, con una desviación estándar de ± 1.0515 ng/ml y sus límites de confiabilidad fueron de 0.1673 a 4.3733 ng/ml (Figs. 25 y 27).

	número de casos	promedio	desviación estándar	límite menor	límite mayor
PGF +	100	444.3	190.02	64.3	824
PGE ++	100	2.2703	1.0515	0.1673	4.3733

CUADRO I. PROSTAGLANDINAS PLASMATICAS EN CORDON UMBILICAL

+ pg/ml

++ ng/ml

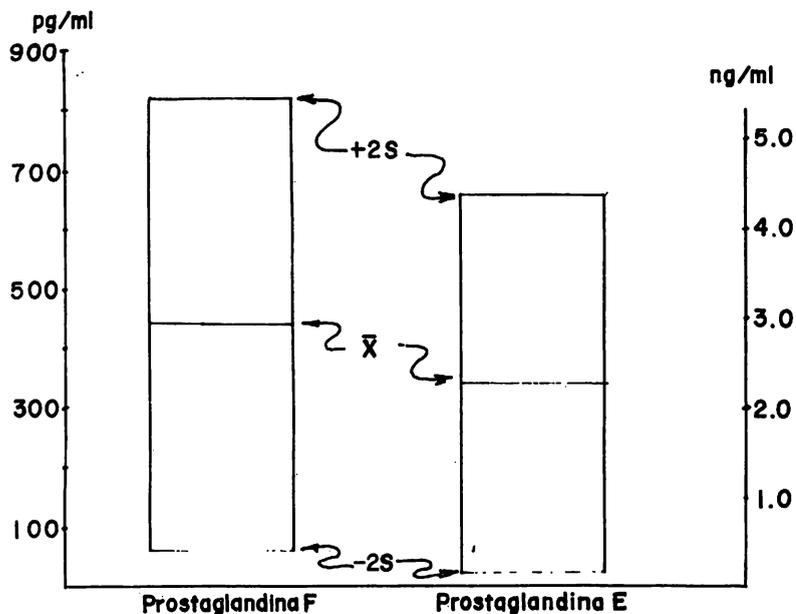


Fig.25. Límites de confiabilidad de prostaglandinas en plasma de cordón umbilical.

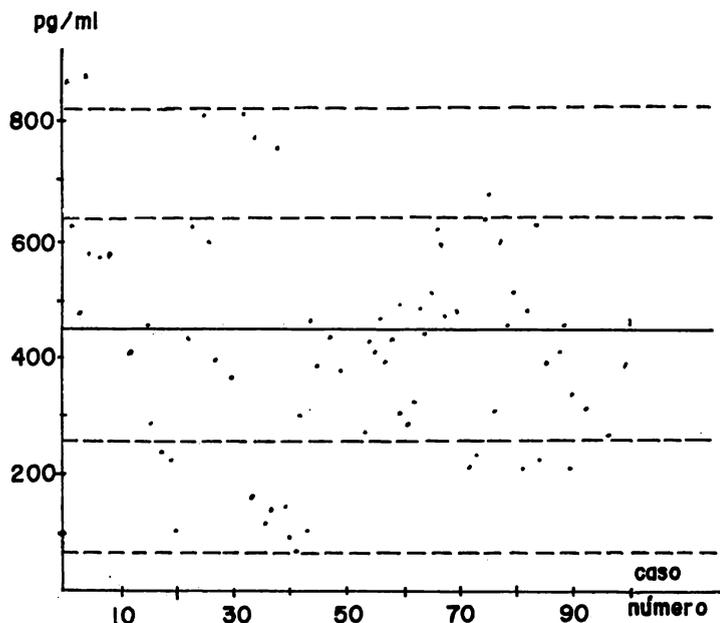


Fig.26. Carta de distribución individual de PGF en plasma de cordón umbilical.

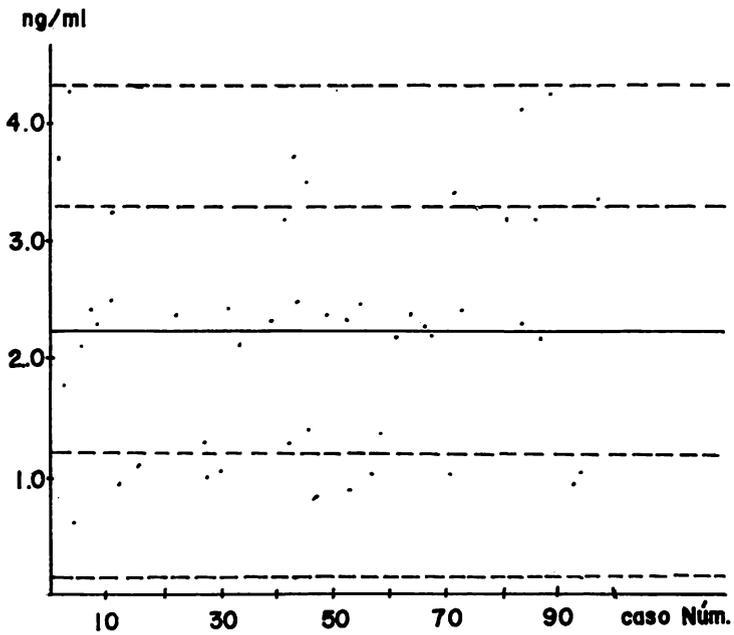


Fig.27. Carta de distribución individual de PGE en plasma de cordón umbilical.

DISCUSION

Para cuantificar sustancias por las que se tenga interés desde el punto de vista científico, con el fin de aportar mayores conocimientos de los procesos fisiológicos y patológicos, con la consecuente resolución de problemas médicos, es necesario que las técnicas que se emplean reúnan especiales características que hagan confiable su uso.

Los datos que se aportan en el presente trabajo reúne los requisitos del control de calidad que se exige en estos procedimientos ^(76, 87), esto hace que los métodos aquí descritos sean aceptables para su empleo.

Las dificultades que presenta la toma y el manejo de las muestras de cordón umbilical aunado a la actividad de síntesis de las prostaglandinas son causas de las variaciones tan grandes que se tienen para las prostaglandinas estudiadas, un experimento programado para valorar el uso de suero o plasma nos reveló que hay un aumento del 53% de la PGF cuando se usó suero en presencia de inhibidor de la síntesis de PGs y del 64% cuando se empleó suero sin inhibidor. Tales razones nos inducen a considerar la necesidad de un aumento en las precauciones que se deben tomar tanto en la toma de la muestra, como su posterior tratamiento.

Los valores obtenidos en los 100 recién nacidos son igualmente comparables a los de otros estudios reportados ^(89,90)

y son mayores respecto a los publicados por Mitchell y colaboradores ⁽⁹¹⁾, en 1978, aunque guarda cierta relación la proporción de PGE/PGF, de 6.4 para ellos y de 5.1 para nosotros. A diferencia de otro reporte hecho por Friedman ⁽¹¹⁾ en 1978 en recién nacidos con síndrome de insuficiencia respiratoria idiopática en los cuales la relación es mucho menor, alrededor de 0.4 .

Si bien el instructivo de empleo del equipo indica que es para $PGF_{2\alpha}$ ⁽⁹²⁾, el antisuero proporcionado en él no discrimina entre $PGF_{2\alpha}$ y $PGF_{1\alpha}$ (50% de reacción cruzada), por tanto los resultados obtenidos reportan las PGF en bloque, tal como fueron separadas en la cromatografía en columna; esto parecería un índice de poca confiabilidad en su aplicación clínica, nosotros consideramos, apoyados por los conceptos encontrados en la literatura internacional, que con esta técnica se aporta una herramienta en el estudio de las prostaglandinas, puesto que la $PGF_{2\alpha}$ tiene una mayor concentración en el organismo que la $PGF_{1\alpha}$ ^(35,52) y además ^(42,68) más que la actividad fisiológica de ambas es similar .

Analizando la dispersión de los valores reportados consideramos que puede atribuirse a diversas causas: toma y manejo de la muestra, dificultades propias de la técnica, habilidad personal y que es la primera técnica que enfrentamos.

CONCLUSIONES

1. Se presentan dos procedimientos que resultan adecuados para cuantificar las PGE y PGF, basados en los reportes de control de calidad.
2. En la técnica para determinar PGE utilizando plasma de cordón umbilical se sugiere no diluir el extracto de la muestra con 2 ml de amortiguador, sino con 1 ml, para evitar que los valores obtenidos se encuentren fuera de los límites de confiabilidad de la curva estándar.
3. Se recomienda la cuantificación de PG en plasma y no en suero, porque la acción del inhibidor puede ser más completa que en la muestra de suero.
4. Se aportan valores de PGF y PGE como marco de referencia para posibles interpretaciones clínicas de los procesos fisiopatológicos perinatales.
5. Con este reporte se concluye una fase de los estudios en los cuales se aplicará esta técnica.

RESUMEN

A las PGE y PGF se les relaciona estrechamente con la fisiopatología pulmonar, por su elevada actividad en vasos y bronquios, también se les asocia con el síndrome de insuficiencia respiratoria en el recién nacido. Todo esto hace sugestivo que su participación en los procesos de control de la presión arterial y la actividad pulmonar sea muy importante tanto durante el trabajo de parto como en la evolución del recién nacido.

Se estableció una técnica para la cuantificación de PGE y PGF por radioinmunoanálisis en plasma, se establecieron valores de referencia en 100 recién nacidos aparentemente sanos (apgar mayor o igual a 8 al minuto).

La eficiencia en la purificación de las prostaglandinas plasmáticas fueron del 60% para PGF y 63% para PGE. La concentración mínima detectable para la PGF fue de 18.3 pg/ml y para la PGE de 25pg/ml. El coeficiente de variación de cada punto de la serie de diluciones (intra-análisis) para la $PGF_{2\alpha}$ fue de: 1/1, 4.7; 1/3, 4.3; 1/9, 3.5; 1/27, 3.2; 1/81, 3.4; 1/243, 4.3 y para la PGE de 1/1, 1.3; 1/3, 2.9; 1/9, 2.8; 1/27, 3.2; 1/81, 4.0; 1/243, 5.8 y los valores obtenidos en 10 ensayos inter-análisis para la $PGF_{2\alpha}$ fue de 1/1, 6.1; 1/3, 5.7; 1/9, 3.6; 1/27, 3.8; 1/81, 5.2; 1/243, 5.8; para la

PGB de: 1/1, 3.9; 1/3, 3.5; 1/9, 5.0; 1/27, 4.6; 1/81, 4.9; 1/243, 6.2.

El coeficiente de variación intra-análisis para 10 ensayos de una misma muestra fueron de 3.18% con promedio de 341.5 pg/ml y desviación estándar 4.5 para la PGF y de 2.2% en la PGE con 1063 pg/ml en promedio y 19 de desviación estándar. En 10 ensayos inter-análisis se obtuvo un coeficiente de variación de 6.5% con promedio de 356 pg/ml y 10.27 de desviación estándar para la PGF y de 7.73 con promedio de 1044 pg/ml y 57.5 de desviación estándar para la PGE.

La eficiencia de la conversión de la PGE a la PGB fué de 96.96%.

La recuperación de 1000 pg. de PGF fué de 962 pg y para la PGE de 1000 pg. se recuperaron 936 pg.

La PGF mostró un valor promedio de 444.3 pg/ml con una desviación estándar de ± 190.02 pg/ml y la PGE con un promedio de 2.2703 ng/ml y una desviación estándar de ± 1.051 ng/ml.

BIBLIOGRAFIA

1. Said, S. I., Yoshida, T. y Kitamura, S.: Pulmonary alveolar hypoxia: Release of prostaglandins and other humoral mediators. *Science*. 185: 1181-1182, 1974.
2. Tyler, T L., Wallis, R. G., Leffler, C. W y Cassin, S.: Prostaglandins and the pulmonary vascular response to hypoxia in the neonate. *Fed. Proc.* 34: 274, 1975.
3. Ferreira, S. H. y Vane, J. R.: Prostaglandins: Their disappearance from and release into the circulation. *Nature* 216: 868, 1967.
4. Piper, P. J., Vane, J. R. y Wyllie, J. H.: Inactivation of prostaglandins by the lungs. *Nature* 225:600-604, 1970.
5. Golub, M., Zia, P. y Matsuno, M.: Metabolism of prostaglandins A₁ and E₁ in man. *J. Clin. Invest.* 56: 1404-1410, 1975.
6. Sweatman, W. J. F. y Collier, H. O. J.: Effects of prostaglandins on human bronchial muscle. *Nature* 217: 69, 1968.
7. Smith, A. P. y Cuthbert, M. F.: Antagonistic action of aerosols of prostaglandins F₂ oc and E₂ on bronchial muscle tone in man. *Br. Med. J.* 3:212-213, 1972..

8. Fishburne, J. I. Jr., Brenner, W. E. y Braaksma, J. T.: Cardiovascular and respiratory responses to intravenous infusion of prostaglandin $F_{2\alpha}$ in the pregnant woman. Am. J. Obstet. Gynecol. 114:765-772, 1972.
9. Mathé, A. A., Hedqvist, P. y Strandberg, K.: Aspects of prostaglandin function in the lung. N. Engl. J. Med. 296: 850-855, 1977.
10. Weir, E. K., Reeves, J. T. y Grover, R. F.: Prostaglandin E_1 inhibits the pulmonary vascular pressor response to hypoxia and prostaglandin $F_{2\alpha}$. Prostaglandins. 10: 623-631, 1975.
11. Friedman, Z. y Demers, L. M.: Essential fatty acids, prostaglandins and respiratory distress syndrome of the newborn. Pediatrics. 61: 341-347, 1978.
12. Douglas, W. W.: Polypeptides-angiotensin, plasma kinins, and other vasoactive agents; prostaglandins. En: The Pharmacological Basis of Therapeutics. Goodman, L. S. y Gilman, A., Eds., McMillan Pub. Co., E. U. A., 1975, Pags. 641 y 642.
13. Bergström, S.: Ryhage, R., Samuelsson, B. y Sjövall, J.: Prostaglandins and related factors. 15. The structures of prostaglandin E_1 , $F_{1\alpha}$ and F_1 . J. Biol. Chem. 233: 3555-3564, 1963.

14. Granström, E.: Prostaglandin chemistry. Acta Obstet. Gynecol. Scand. Supl. 87: 13 y 14, 1979.
15. Shaw, J.E. y Ramwell, P.W.: Separation, identification and estimation of prostaglandins. Methods Biochem. Anal. 17: 327, 1969.
16. Van Dorp, D.A., Beerthuis, R.K., Nugteren, D.H., y Vonkeman, H.: The biosynthesis of prostaglandins. Biochem. Biophys. Acta. 90: 204-206, 1964.
17. Bergström, S., Danielssen, H. y Samuelsson, B.: The enzymatic formation of prostaglandin E₂ from arachidonic acid. Prostaglandin and related factors. Biochim. Biophys. Acta. 90: 207-210, 1964.
18. Bergström, S., Carlson, L.A. y Weeks, J.R.: The prostaglandins: a family of biologically active lipids. Pharmacol. Rev. 20: 1-48, 1968.
19. Klenberg, D. y Samuelsson, B.: The biosynthesis of prostaglandin E₁ studied with specifically ³H labelled 8,11,14 eicosatrienoic acids. Acta, Chem. Scand. 19: 534-535.
20. Hamberg, M. y Samuelsson, B.: On the mechanism of the biosynthesis of prostaglandin E₁ and F_{1α}. J. Biol. Chem. 242: 5336-5343, 1967.



21. Russel, P.T., Eberle, A.J. y Cheng, H. C.: The prostaglandins in clinical medicine, A developing role for the clinical chemist. Clin. Chem. 21: 653-666, 1975.
22. Hamberg, M. y Samuelsson, B.: Oxygenation of unsaturated fatty acids by the vesicular gland of sheep. J. Biol. Chem. 242: 5344-5354, 1967.
23. Samuelsson, B.: On the incorporation of oxygen in the conversion of 8,11,14-eicosatrienoic acid to prostaglandin E₁. J. Am. Chem. Soc. 87: 3011-3013, 1965.
24. van Dorp, D.: Recent developments in the biosynthesis and the analysis of prostaglandins. Ann. N.Y. Acad. Sci. 180: 181-199, 1971.
25. Hands, W.E.M. y Samuelsson, B.: Phospholipids precursors of prostaglandins. Biochim. Biophys. Acta. 164: 426-429, 1968.
26. Vonkeman, H. van Dorp, D.A.: The action of prostaglandin synthetase on 2-arachidonyl lecithin. Biochim. Biophys. Acta. 164: 430-432, 1968.
27. Wilkinson, A.R., Aynsley-Green, A. y Mitchell, R.: Persistent pulmonary hypertension and abnormal prostaglandin E levels in preterm infants after maternal treatment with naproxen. Arch. Dis. Child. 54: 942-945, 1979.

28. Kloeck, F.K. y Jung, H.: In vitro release of prostaglandin from human myometrium under influence of stretching. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 117: 276-279, 1973.
29. Downie, J., Poyser, N.L. y Winderlich, M.: Level of prostaglandins in human endometrium during the normal menstrual cycle. *J. Physiol.* 236: 465-472, 1974.
30. Katz, R.L. y Katz, G.J.: Prostaglandins basic and clinical considerations. *Anaesthesiology.* 40:471-493, 1974.
31. Wlodawer, P. y Samuelsson, B.: On the organization and mechanism of prostaglandin synthetase. *J. Biol. Chem.* 248: 5673-5678, 1973.
32. Hamberg, M. y Samuelsson, B.: Detection and isolation of an endoperoxide intermediate in prostaglandin biosynthesis. *Proc. Acad. Sci. U.S.* 70: 899-903, 1973.
33. Hamberg, M., Svensson, J. y Samuelsson, B.: Prostaglandin endoperoxides. A new concept concerning the mode of action and release of prostaglandins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 3824, 1974.
34. Hinman, J. W.: Prostaglandins. *Annu. Rev. Biochem.* 41: 161-178, 1972.

35. Lee, R.A., y Lands, W.E.M.: Cofactors in the biosynthesis of prostaglandins F_{1α} and F_{20c}. *Biochim. Biophys. Acta.* 260: 203-211, 1972.
36. O'Brien, J.R.: Platelets and prostaglandins. *Lancet.* 2: 1307, 1976.
37. Saeed, S.A. y Cuthbert, J.: On the mode of action and biochemical properties of antiinflammatory drugs. II. Prostaglandins. 13:565-575, 1977.
38. Green, K.: Determination of prostaglandin in body fluids and tissues. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand. Supl.* 87: 21-26, 1979.
39. Whittle, B.J.R.: Prostaglandin synthetase inhibitors. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand. Supl.* 87: 21-26, 1979.
40. Levine, L., Hinkle, P.M., Voalkel, E.F. y Tashjian, A.H.J.: Prostaglandin E production by mouse fibrosarcoma cells in culture: Inhibition by indomethacin and aspirin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 47: 888, 1972.
41. Samuelsson, B., Granström, E., Green, K. y Hamberg, M.: Metabolism of prostaglandins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 180: 138-163, 1971.

42. Hamberg, M.: Quantitative studies on prostaglandins synthesis in man. III. Excretion of the major urinary metabolite of prostaglandins F_{1α} and F_{2α} during pregnancy. *Life Sci.* 14: 247-252, 1974.
43. Raz, A.: Interaction of the prostaglandin with blood plasma proteins. *Biochem. J.* 130: 631-636, 1972.
44. Raz, A.: Interaction of prostaglandins with blood plasma proteins. III. Rate of disappearance and metabolites formation after intravenous administration of free or albumin bound prostaglandins F_{2α} and A₂.
45. Ferreira, S.H. y Vane, J.R.: Prostaglandins. Their disappearance from and release into the circulation *Nature.* 216: 868-873, 1967.
46. Vane, J.R.: The release and fate of vasoactive hormones in the circulation. *Brit. J. Pharmacol.* 35: 209-242, 1969.
47. Olley, P.M. y Coceani, F.: The prostaglandins. *Am. J. Dis. Child.* 134: 688-696, 1980.
48. Green, K. y Samuelsson, B.: Endogenous levels of 15-keto-dihydro-prostaglandins in human plasma. *Biochem. Med.* 11: 298, 1974.

49. Green, K., Bygdeman, M., Topozada, M. y Wiqvist, N.:
The role of prostaglandin $F_{2\alpha}$ in human parturition:
Endogenous levels of 15-keto-13, 14-dihydro $PGF_{2\alpha}$ du-
ring labour. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 120: 25, 1974.
50. Granström, E.: On the metabolism of prostaglandins in
man. *Prog. Biochem. Pharmacol.* 3: 80-93, 1967.
51. Hamberg, M. y Samuelsson, B.: The structure of the
major urinary metabolite of prostaglandin E_2 in man.
J. Am. Chem. Soc. 91: 2177-2178, 1969.
52. Hamberg, M.: Quantitative studies in prostaglandin
synthesis in man. Determination of the major urinary
metabolite of prostaglandins $F_{1\alpha}$ and $F_{2\alpha}$. *Anal.*
Biochem. 55: 368, 1973.
53. Hubbard, W.C. y Watson, J.R.: Determination of 15-
keto-13, 14-dihydro-metabolites of PGE_2 and $PGF_{2\alpha}$ in
plasma using high performance liquid chromatography
and gas chromatography mass spectrometry.
54. Berström, S., Bygdeman, M., Samuelsson, B., y Wiqvist,
N.: The prostaglandins and human reproduction. *Hosp.*
Proc. 6: 51-57, 1971.

55. Pace-Asciak, C.R. y Rangraj. G.: Distribution of prostaglandin biosynthetic pathways in several rat tissues. Formation of 6-keto prostaglandin $F_{1\alpha}$. Biochim. Biophys. Acta. 486: 579-582, 1977.
56. Karim, S.M.M., Sandler, M. y Williams, E.D.: Distribution of prostaglandins in human tissues. Br. J. Pharmacol. 31: 340-344, 1967.
57. Kadowitz, P.J., Joiner, P.D. y Hyman, A.L.: Physiological and pharmacological roles of prostaglandins. Ann. Rev. Pharmacol. 15: 285-306, 1975.
58. Kaliner, M. y Austern, K.F.: Immunologic release of chemical mediator from human tissues. Ann. Rev. Pharmacol. 15 177-189, 1975.
59. Vapaatalo, H. y Parantainen, J.: Prostaglandins, their biological and pharmacological role. Med. Biol. 56: 163-183, 1978.
60. Horton, E.W.: Prostaglandins. Mediators, modulators or metabolites. J. Pharmacol. 28: 389-392, 1976.
61. Lee, J.B.: The interrelationships between renal prostaglandins and blood pressure regulation. Am. J. Med. Sci. 263: 335-316, 1972.

62. Dubocovich, M.L. y Langer, M.Z.: Evidence against physiological role of prostaglandin in the regulation of noradrenaline release in the cat splen. *J. Physiol.* (Lond) 251: 757-762, 1975.
63. Davies, B.N., Horton, E.W. y Withrington, P.G.: The occurrence of prostaglandin E₂ in splenic venous blood of the dog following splenic nerve stimulation. *Br. J. Pharmac. Chemother.* 32: 127-135, 1968.
64. Anggard, E.: Studies on the analysis and metabolism of the prostaglandins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 180: 200-215, 1971.
65. Gorman, R.R. y Miller, O. V.: Specific prostaglandin E₁ and A₁ binding sites in rat adipocyte plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 323: 560-572, 1973.
66. Kuenl, F.A. y Humes, J.L.: Direct evidence for a prostaglandin measurements. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 19: 480-484, 1972.
67. Wennmalm, A.: Prostaglandins and cardiovascular function: some biochemical and physiological aspects. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 39: 399-405, 1979.

68. Hiller, K. y Karim, M.: Effects of prostaglandins E_1 , E_2 , $F_{1\alpha}$, $F_{2\alpha}$ on isolated human umbilical placental blood vessels. *J. Obstet. Gynaec. Brit.* 75: 667-673, 1978.
69. Tepperman, H., Beydoun, S. y Abdul-Karim, W.: Drugs affecting myometrial contractility in pregnancy. *Clin. Obstet. Gynecol.* 20: 423-445, 1977.
70. Humes, J. L., y Strausser, H.R.: Prostaglandins and cyclic nucleotides in maloney sarcoma tumors. *Prostaglandins.* 5: 183-196.
71. Harris, R.H. y Ramwell, P.W.: Cellular mechanisms of prostaglandin action. *Ann. Rev. Physiol.* 41: 653-668, 1979.
72. Segawa, R., Hayashi, H., Nakano, M., Murakami, H. y Kasahara, C.: Prostaglandins and norepinephrine metabolism; effect of indomethacin on prostaglandin synthesis and norepinephrine turnover rate. *Japan. J. Pharmacol.* 27: 478-480, 1977.
73. Newman, F.M.: Introduction to liquid scintillation counting. Reporte tecnico 567, Beckman Instruments Inc. California, 1973, pag. 7 .
74. Berson, S.A. y Yalow, R.S.: Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* 184: 1648, 1959.

75. Skelley, S.D., Brown, L.P. y Besch, P.K.: Radioimmunoassays. *Clinical Chemistry*. 19: 146-186, 1973.
76. Reuter, A. M., Ketelslegers, J.M., Hendrick, J. C. y Franchimont, P.: Radioimmunoassay of protein hormones: principles and methodology. *Hormone Res.* 9: 404-421, 1978.
77. Newman, F.M.: Sample preparation procedures for liquid scintillation counting. Reporte técnico 551, Beckman Instruments Inc. California, pág. 3-11, 1976.
78. Liquid scintillation counting. Publicación 711580, Nuclear Chicago Corp. 2a. ed., pág. 1-15, 1966.
79. Long, E.C.: Liquid scintillation counting theory and techniques. Reporte técnico 915-NUC 76.7T. Beckman Instruments. Inc., California. pág. 3-11, 1976.
80. Jaffe, B.M., Behrman, H. R. y Parker, C.W.: Radioimmunoassay measurement of prostaglandins E, A and F in human plasma. *J. Clin. Invest.* 52: 398-405, 1973.
81. Levine, L. y Van Vunakis, H.: Antigenic activity of prostaglandins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41: 1171-1175, 1970.
82. Caldwell, B.V., Burnstein, S.B., Brock, W.A. y Speroff, L.: Radioimmunoassay of the F prostaglandins. *J. Clin. Endocr.* 33: 171-175, 1971.

83. Levine. L., Gutiérrez-Cernosek, R.M. y van Vunakis, H.: Specificities of prostaglandins B₁, F_{1α} and F_{2α} antigen-antibody reaction. J. Biol. Chem. 239: 6782-6785, 1971.
84. Gutiérrez Cernosek, R.M., Morrill, L.M. y Levine, L: Prostaglandin F_{2α} levels in peripheral sera of man. Prostaglandins. 1: 71-80, 1972.
85. Raz, A.: Interaction of prostaglandins with blood plasma proteins. Biochem. J. 130: 631-636.
86. Bedolla, T. M., Pérez, P.G. y Ulloa, A. A. : Análisis de datos y control de calidad en el radioinmunoanálisis de hormonas esteroides. Departamento de Biología de la reproducción. Instituto Nacional de Nutrición. México, 1978. pág. 1-32.
87. Castañeda, P. G., Zamora, L. G. y Cortés-Gallegos, V.: Medición de prostaglandinas F en plasma de hombres sanos. Rev. Invest. Clin. 30: 283-289, 1978.
88. Hertelendy, F., Woods, L. y Jaffe, B. M.: Prostaglandin E levels in peripheral blood during labor. Prostaglandins 3: 223-227, 1973.

89. Craft, I. L., Scrivener, R. y Dewhurst, C. J.:
Prostaglandin $F_{2\alpha}$ levels in the maternal and fetal
circulations in late pregnancy. J. Obstet. Gynaecol.
Br. Commonw. 80: 616-618, 1973.
90. Pokoly, T. B. y Jordan, V. C. :Relation steroids and
prostaglandin at vaginal delivery and cesarean section.
Obstet. Gynecol. 46: 577-580, 1975.
91. Mitchell, M. D., Brunt, J., Bibby, J., Flint, A. P. F.,
Anderson, A. B. M. y Turnbull, A. C. : Prostaglandins in
the human umbilical circulation at birth. Brit. J. Obstet.
Gynaec. 85 : 114-118, 1978.
92. 3H Prostaglandin $F_{2\alpha}$ radioimmunoassay kit. Instructivo,
Clinical Assays. pag. 2-12, 1980.