

00570

les.  
1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Estudio de los métodos necesarios para la purificación y  
cuantificación de péptidos con acción biológica:  
insulina y neuropéptidos: TRH.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S

Que para obtener el título de  
Maestro en Ciencias Químicas  
(Farmacia, opción: Química Farmacéutica)

P r e s e n t a:

CARLOS

ROSALES

LEDEZMA

México, D.F.

1984



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 está 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.

## Resumen.

En el campo de la Ingeniería Genética y el estudio de Neuropéptidos se requiere de métodos relativamente simples para la cuantificación y purificación de proteínas y péptidos.

En este trabajo de Tesis se desarrollaron métodos para cuantificar insulina humana (producida en bacterias recombinantes) y TRH (estudios de su metabolismo), por Radioinmunoanálisis (RIA). Para lograr esto, se obtuvieron y caracterizaron anticuerpos contra estas sustancias. Se marcó insulina con  $^{125}\text{I}$ , probando diferentes métodos encontrando que los mejores eran Cloramina T y Iodogen en condiciones de nuestro laboratorio. El TRH- $^{125}\text{I}$  se marcó con Cloramina T. Se probaron diferentes métodos de precipitación de la radioactividad unida a los anticuerpos, encontrando que el Pansorbín y el método del segundo anticuerpo son los más reproducibles para el RIA.

Los sueros obtenidos contra estos péptidos se utilizaron para producir columnas de cromatografía de afinidad, con el fin de purificar estas sustancias. Los anticuerpos se unieron a un soporte inerte (Sepharosa 4B) con bromuro de cianógeno. Las columnas obtenidas unen selectivamente y eluyen con ácido acético al péptido de interés. La capacidad de las columnas permite sean usadas en purificaciones a nivel analítico.

## Abstract.

In the areas of Genetic Engineering and Studies on Neuropeptides it is necessary to have simple methods to measure and purify proteins and peptides.

In this Thesis, methods to quantify human insulin (produced in recombinant bacteria) and TRH (for studies on its metabolism) by radioimmunoassay (RIA) were developed. To achieve this we got and characterized antibodies against these substances. Insulin was labelled with  $^{125}\text{I}$  using different methods; It was found that Chloramine T and Iodogen are the best methods in our laboratory conditions. TRH- $^{125}\text{I}$  was labelled with Chloramine T. Different methods to precipitate radioactivity bound to antibodies were tried. Pansorbin and the second antibody systems proved to be more reproducible in RIA.

The sera obtained against these peptides were used to produce affinity chromatography columns, to try to purify these substances. Antibodies were fixed to an inert support (Sephrose 4B) by means of cyanogen bromide. The produced columns selectively adsorb and elute with acetic acid the particular peptide. Capacity of the columns allows them to be used in analytical purifications.

Quienes no suelen realizar experimentos difícilmente pueden percatarse de la diversidad de circunstancias requeridas para que progresen hasta resultados perfectamente demostrativos; o de la frecuencia con la cual el hombre que persigue una meta en su profesión puede sufrir interrupciones que -- frustran su esfuerzo casi en el momento de alcanzar frutos: y sin embargo, no vacilo ni un momento...

Edward Jenner, 1798

## CONTENIDO

1.	INTRODUCCION	1
2.	OBJETIVO	5
3.	ANTECEDENTES	6
3.1.	Ingeniería Genética	6
3.2.	Insulina	20
3.3.	Química y Funciones de TRH	32
3.4.	Radioinmunoanálisis	41
3.5.	Cromatografía de Afinidad	59
4.	METODOLOGIA	69
4.1.	Desarrollo de un Radioinmunoanálisis para Insulina	69
4.2.	Radioinmunoanálisis para TRH	78
4.3.	Preparación de Anticuerpos contra las Cadenas A y B de Insulina	83
4.4.	Columnas de Cromatografía de Afinidad	88
5.	RESULTADOS	97
5.1.	Radioinmunoanálisis de Insulina	97
5.2.	Radioinmunoanálisis para TRH	116
5.3.	Formación de Anticuerpos contra las Cadenas A y B de Insulina Porcina	120
5.4.	Columnas de Cromatografía de Afinidad	121
6.	DISCUSION Y CONCLUSIONES	131
7.	REFERENCIAS	140
8.	APENDICES	152

## 1. INTRODUCCIÓN.

Desde la determinación en 1953 por Watson y Crick de la estructura del ácido desoxirribonucléico (ADN), molécula responsable del almacenamiento, transmisión y manejo de la información genética, la Biología Molecular se ha desarrollado ampliamente. En los últimos años se ha logrado un gran auge con la Ingeniería Genética y las técnicas en las cuales se basa se han dirigido a lograr la producción de diferentes proteínas de gran demanda en medicina; con la ventaja de que se pueden obtener en cantidades mayores que por los métodos tradicionales y a menor costo.

Las técnicas empleadas permiten la alteración de la información codificada por el ADN de los genes de las células bacterianas. De este modo se pueden obtener bacterias (llamadas recombinantes) que pueden sintetizar proteínas no bacterianas, - esto es, provenientes de genes de otra especie ya sean humanos, animales o incluso vegetales. (1) (34).

En este campo el Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología (CEINGEB) de la UNAM se encuentra actualmente trabajando en un proyecto de producción de insulina humana por medio de técnicas de Ingeniería Genética, con lo que se persigue obtener un procedimiento que facilite la producción de insulina humana con fines de aplicación terapéutica, a un costo menor del que resulta de la obtención de insulina porcina o bovina por los métodos tradicionales. (13) (14) (35).

De una manera paralela en años recientes, 1960 a la fecha, se ha trabajado mucho otra línea de investigación en biología :

la Neurofisiología. En este campo se han descubierto moléculas (sustancias) de origen proteínico que son biosintetizadas tanto en el hipotálamo (en la base del cerebro) como en la glándula - hipófisis y otras regiones cerebrales.

Estas sustancias conocidas ahora como Neuropeptidos presentan funciones diversas y muy especializadas, de gran interés - tanto por sus efectos como por el potencial que presentan de poder ser usadas en el futuro como fármacos especiales con una acción específica sobre el Sistema Nervioso Central (20).

Los neuropeptidos se descubrieron primero como factores endógenos que tenían cierta acción fisiológica; se trató entonces de aislarlos y caracterizarlos. Algunos de ellos (los que aparecen en mayor cantidad) ya se han podido aislar y así tenemos, por ejemplo, a la vasopresina y la oxitocina, dos péptidos de ocho aminoácidos cada uno con una semejanza estructural muy grande y acciones bien diferentes, el primero funciona a nivel del riñon elevando la presión sanguínea por retención de líquidos, (este péptido es la hormona antidiurética); mientras que el segundo existe normalmente tanto en hombres como en mujeres, tiene un efecto de contracción sobre el músculo liso, pero su acción sobre el útero es mas evidente durante el parto. Los efectos tan opuestos nos indican que los receptores específicos que existen en las células blanco deben reconocer cambios muy pequeños entre estas moléculas. A través de estudios de relación Estructura-Actividad, es muy probable que pequeñas modificaciones en estas moléculas dieran lugar a péptidos sintéticos cuya acción específica sea mayor. Estos nuevos péptidos pueden tener en el futuro un gran valor como fármacos (11).

Otro grupo de neuropéptidos importantes es el de las encefalinas, cuyo descubrimiento surgió a través de la búsqueda de las moléculas endógenas que deberían actuar en los receptores de opiáceos (como la morfina). (37). Se conocen actualmente -- dos encefalinas, pero se cree que deben existir mas. Sus estudios se vuelven importantes al ver que estas moléculas pueden -- actuar en forma similar a la morfina quitando el dolor, pero -- con la ventaja de no provocar dependencia por ser moléculas endógenas, (11). Es probable que en el futuro se puedan llegar a -- usar en forma clínica como fármacos de uso corriente.

Dentro de este campo también el Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología de la UNAM se encuentra trabajando en un proyecto para caracterizar algunos de los neuropéptidos de mayor interés por sus acciones a nivel de todo el metabolismo regulatorio del organismo, como son el TRH (hormona liberadora de tirotropina) y el LHRH (hormona liberadora de la hormona luteinizante), (100).

Los péptidos provenientes del cerebro, así como algunas -- hormonas proteínicas y los péptidos producidos en bacterias recombinantes se encuentran generalmente en pequeñas cantidades -- en los tejidos donde se estudian, o se tratan de extraer; debido a esto es muy importante poder tener un método lo suficiente -- mente sensible y específico para cuantificarlos. Existe tam -- bién el problema que para su purificación estos péptidos por -- provenir de tejidos se encuentran con muchos componentes similares como son otras proteínas y una mezcla compleja de otras substancias (lípidos, carbohidratos, etc.), ello hace necesario con

tar con métodos cada vez mas específicos para la purificación de estos péptidos.

## 2. OBJETIVO.

En las áreas de Ingeniería Genética y Estudio de Neuropeptidos se trabaja con material biológico: extractos de células - de bacterias o de cerebro, respectivamente, a partir de los cuales se desea obtener un producto determinado. Mucho del éxito de las investigaciones en estos campos depende de las técnicas especiales empleadas para poder llegar a tener los péptidos puros y para poder cuantificarlos.

El trabajo de esta tesis constituye parte de los proyectos de investigación del CEINGEB / UNAM; 1) la producción de insulina humana y 2) el estudio del metabolismo de neuropeptidos.

El objetivo de esta tesis es tratar de desarrollar un modelo de aislamiento y caracterización de péptidos con bases en purificación, identificación y cuantificación, mediante el empleo de anticuerpos específicos en Radioinmunoanálisis (RIA) (cuantificación) y en Cromatografía de Afinidad (purificación).

La finalidad es poder aplicar estos resultados a un sistema de caracterización de futuros péptidos y proteínas usando - los recursos básicos con que contamos en nuestro medio, tratando de lograr la máxima eficiencia posible con los métodos más accesibles.

### 3. ANTECEDENTES.

#### 3.1. Ingeniería Genética.

La biología molecular es la ciencia que contribuye al estudio de la organización de los seres vivos a nivel de sus moléculas constituyentes analizando su estructura y función.

Una célula viva es una fábrica de proteínas. Sintetiza enzimas y otras proteínas para mantener su integridad y sus procesos fisiológicos. Los diferentes tipos de células hacen diferentes proteínas siguiendo las instrucciones del ADN de sus genes.

En los últimos años los avances logrados en una rama de esta ciencia, la Ingeniería Genética han permitido se puedan cambiar las instrucciones codificadas por el ADN en células bacterianas. Es posible aislar un gen de entre los varios millones que tiene una célula, fusionarlo con parte de un gen bacteriano e insertar en bacterias (transformación) la combinación de ambos (69). Estas nuevas cepas de bacterias se denominan recombinantes.

Si el gen insertado codifica para una proteína de aplicación biomédica, en tecnología de alimentos o fitogenética, un cultivo de bacterias recombinantes trabajará cual fábrica rentable en la producción industrial de esta proteína (14).

La célula produce sus proteínas traduciendo las órdenes almacenadas en el ADN. Esta información hereditaria está dada por el orden en que se acomodan las cuatro bases: adenina, guanina, timina y citocina a lo largo del ADN. Para lograr esta síntesis

el ADN, dentro del núcleo celular, se copia complementariamente en una molécula de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) (transcripción). El ARNm sale del núcleo y va al citoplasma donde una compleja maquinaria bioquímica lo traduce en una proteína uniendo los aminoácidos en el orden indicado (Fig. 1) (35).

Los organismos procariotes (bacterias) tienen un solo cromosoma circular y para Escherichia coli éste codifica para unos 3000 a 4000 genes. Algunas bacterias tienen fragmentos de ADN circulares extracromosomales denominados plásmidos. Un plásmido se propaga en la célula independientemente de la replicación del ADN cromosomal. Los plásmidos contienen información valiosa para las bacterias como puede ser la resistencia a antibióticos (13).

Hace unos 12 años se aisló una enzima bacteriana que era capaz de cortar al ADN en sitios específicos generando pequeños fragmentos (91). Esta enzima recibió el nombre de endonucleasa de restricción. Se conocen actualmente unas 100 enzimas de restricción diferentes que reconocen sitios (secuencias) específicos en cualquier molécula de ADN, cortándola en ese lugar, entre dos bases, generando así fragmentos de ADN con extremos idénticos (Fig. 2).

Los fragmentos de ADN provenientes de diferentes organismos y cortados con la misma enzima de restricción se pueden alinear entre sí debido a que sus extremos son idénticos. De esta forma un gen de otro organismo se puede introducir en un vehículo molecular (plásmido) y clonar en una bacteria (Fig. 3).

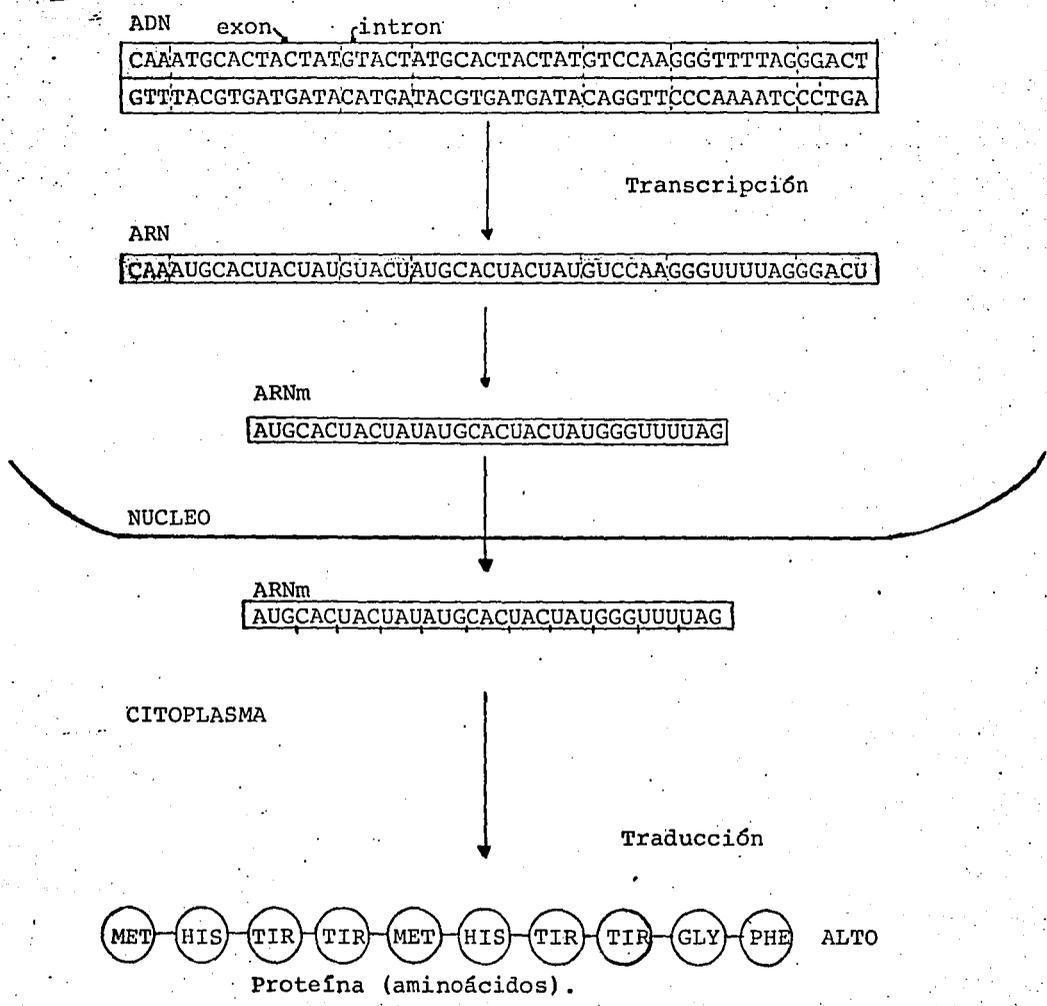


Fig. 1 Las proteínas se sintetizan en la célula de acuerdo a las instrucciones codificadas en los genes (ADN). El código genético se lee en grupos de tres bases - (codones) que indican cada uno un aminoácido particular.



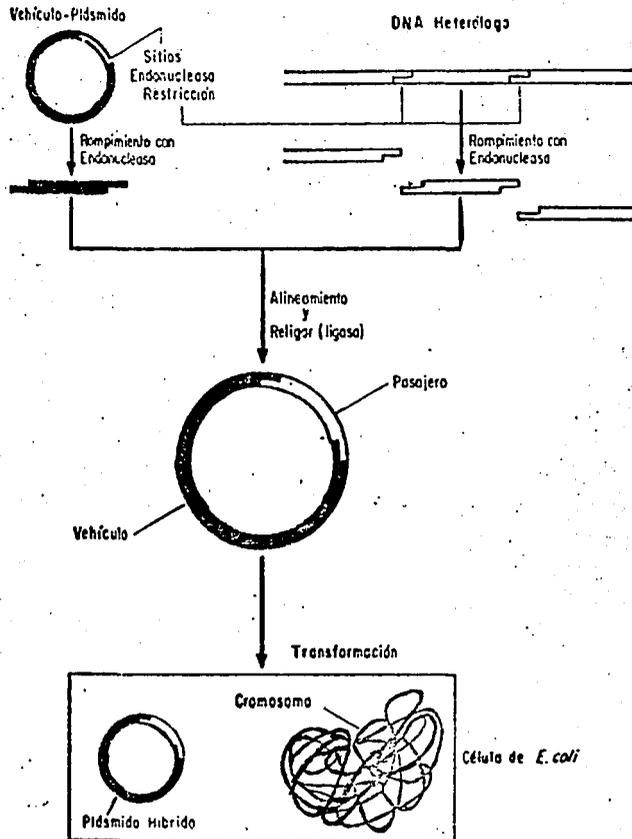


Fig. 3 Esquema de los procedimientos utilizados en la construcción y propagación de una molécula de ADN recombinante.

La clonación significa aislar un gen y colocarlo dentro de una bacteria que prolifera dando origen a una población de descendientes idénticos: una clona, los cuales conservan todos el gen aislado. El éxito de una clonación molecular consiste en salvar los siguientes obstáculos:

- Encontrar la secuencia estructural correcta del ADN que codifica para la proteína deseada.
- Colocar esta información en la bacteria, de forma que se conserve durante la división celular.
- Manipular la información adyacente al gen insertado modificando las órdenes reguladoras, de modo que la secuencia estructural se exprese en proteína.

Para que un gen se exprese, o sea, se traduzca en proteína debe haber a sus lados señales. Estas señales son segmentos de ADN que no codifican para proteínas pero son reconocidos por los mecanismos enzimáticos de la célula como instrucciones de inicio o terminación de una proteína, o como regulación. Estas señales son diferentes para organismos superiores e inferiores en la escala biológica. Una señal eucariote no es reconocida por una bacteria y la proteína no se produce aunque el gen esté clonado.

Otra forma menos general y aleatoria de obtener genes es la clonación de ADN obtenidos por transcripción reversa de ARN mensajeros específicos (Fig. 4). Se aísla el ARNm de células que produzcan una gran cantidad de la proteína de interés. El ARNm es copiado entonces por la enzima transcriptasa reversa que produce una cadena complementaria de ADN. Esta enzima se encuen--

tra en algunos virus que llevan como material genético ARN en vez de ADN. El ARN se elimina con una hidrólisis alcalina suave y entonces se copia una segunda cadena de ADN con la enzima polimerasa de ADN. Usando ahora la enzima transferasa terminal se añaden extremos largos de varias unidades de una base a cada cadena. Este fragmento de ADN se puede alinear con un plásmido que tenga extremos largos con la base complementaria a la que tiene el ADN copiado del ARNm. El plásmido ahora tiene en su interior a un gen de otra especie y puede ser transformado y clonado en bacterias (35).

La producción de proteínas de otro tipo (humanas por ejemplo) en bacterias puede abordarse de tres maneras (13):

a) Introducir a la bacteria el gen o genes aislados de células humanas o de mamíferos que codifican para la proteína escogida y esperar que la bacteria transcriba o traduzca las regiones reguladoras de estos genes. Hasta la fecha no ha sido posible expresar una proteína activa de un eucariote superior, después de introducir en E. coli el gen natural que la codifica.

b) A partir del ARNm aislado de una célula se obtiene el ADN complementario específico (Fig. 4). Este ADN se "une" en forma adecuada a los mecanismos de regulación bacteriana que permitan su expresión en la célula microbiana.

c) Otra posibilidad consiste en diseñar y sintetizar los genes o partes de genes que codifican para la proteína deseada. Para lograr esto debe conocerse la secuencia de los aminoácidos de la proteína en cuestión y, a través, del código genético los codo--

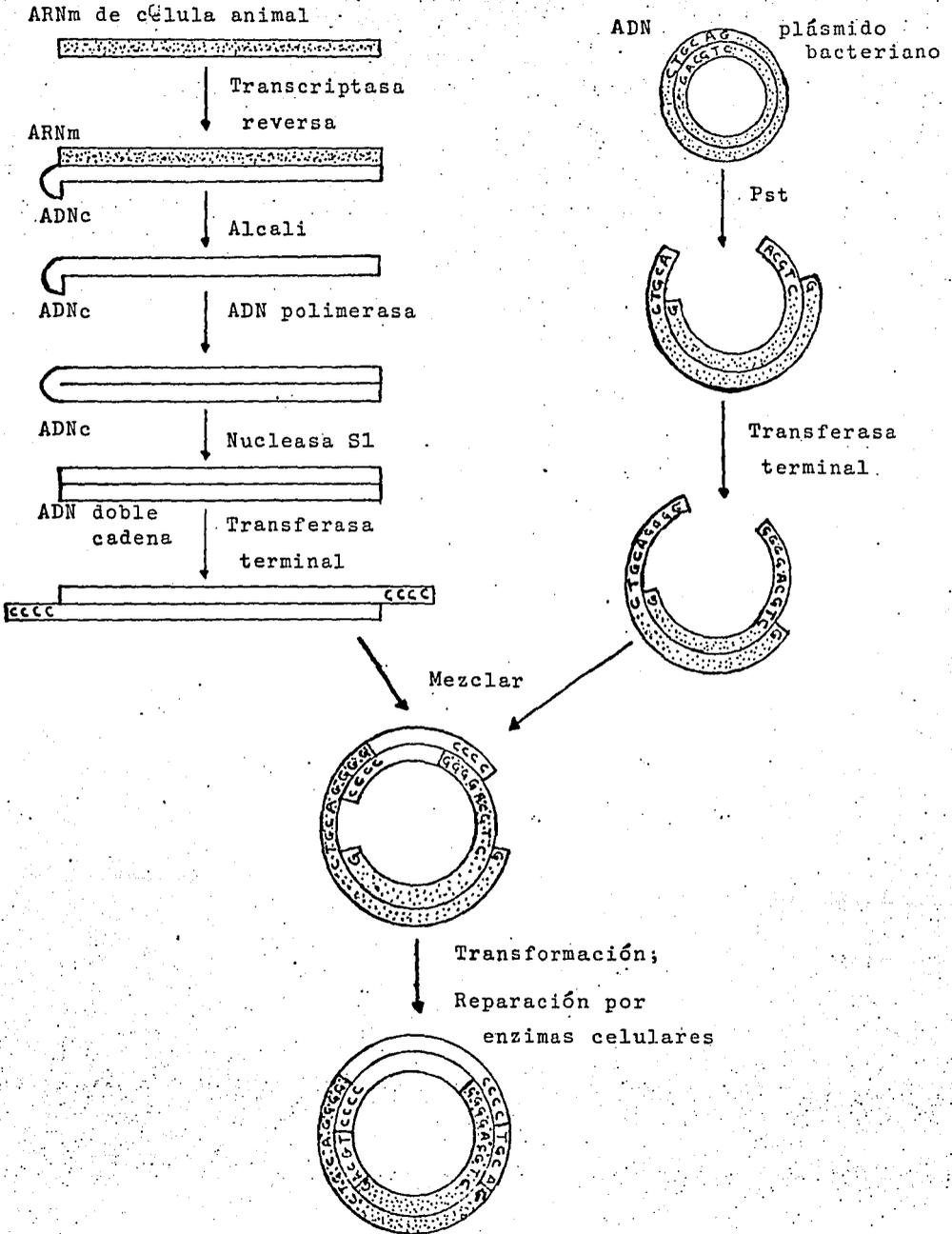


Fig. 4 Clonación molecular de ADN complementario a ARN mensajero.

nes (secuencia de ADN) que deben sintetizarse. Los genes sintetizados químicamente se pueden unir entonces a las señales de regulación para un sistema de genes bacterianos, de tal forma que las bacterias sinteticen la proteína en forma regulada y en cantidades elevadas (14). De esta forma se ha logrado producir en bacterias, somatostatina humana biológicamente activa (52).

### 3.1.1. Producción de Insulina Humana por Técnicas de Ingeniería Genética.

Los genes que codifican para las cadenas A y B de insulina humana fueron sintetizados por el grupo de Goeddel en la ciudad de San Francisco (36).

Debido a que los genes de las cadenas A y B no tienen regiones de regulación para su transcripción no pueden ser expresados en bacterias. Si se unen a regiones de regulación de otras proteínas, su expresión puede efectuarse, pero debido a que son péptidos muy pequeños y que además no presentan ninguna utilidad para la célula, son degradados rápidamente por enzimas proteolíticas endógenas (16). Entonces fue necesario unir el gen de cada cadena por separado al ADN de una proteína bacteriana que las estabilizara, así como a la región reguladora de la misma proteína (promotor: porción de ADN reconocida por la polimerasa de ARN para comenzar la transcripción)

Ambas cadenas fueron clonadas en un derivado del plásmido - pBR 322 (15) que lleva el gen de la  $\beta$ -galactosidasa (proteína - que se utilizó como estabilizadora, así como las regiones de re-

gulación del operón de lactosa de E. coli que permite a la bacteria utilizar la lactosa como fuente de carbono. El gen de una u otra cadena de insulina se introdujo en el sitio único de restricción de Eco RI que tiene el plásmido.

Al clonar el plásmido y expresarlo en E. coli se obtiene una proteína híbrida formada por los primeros aminoácidos de  $\beta$ -galactosidasa y unida a éstos la cadena A o B de insulina a través de una metionina (Fig. 5). Una característica importante de esta nueva proteína es que carece de actividad de  $\beta$ -galactosidasa y es completamente insoluble en agua, a diferencia de la  $\beta$ -galactosidasa nativa.

El plásmido pBR 322 lleva los genes que le confieren resistencia a los antibióticos tetraciclina y ampicilina. El gen de las cadenas se inserta de tal modo que queda inactivado el gen que confiere la resistencia a tetraciclina. Esto da la oportunidad de reconocer a las células transformadas con la molécula híbrida por su resistencia a ampicilina y sensibilidad a tetraciclina.

A partir de la proteína híbrida producida se separa la cadena A o B rompiendo específicamente en la metionina con bromuro de cianógeno (BrCN) (Fig. 6). (64). De la mezcla de péptidos resultante se purifica entonces la cadena de insulina correspondiente.

Las cadenas de insulina son protegidas de oxidación posterior en los residuos de cisteína formando los derivados R-SSO<sub>3</sub> - llamados S-sulfonato o sales de Bunte (4) (60).

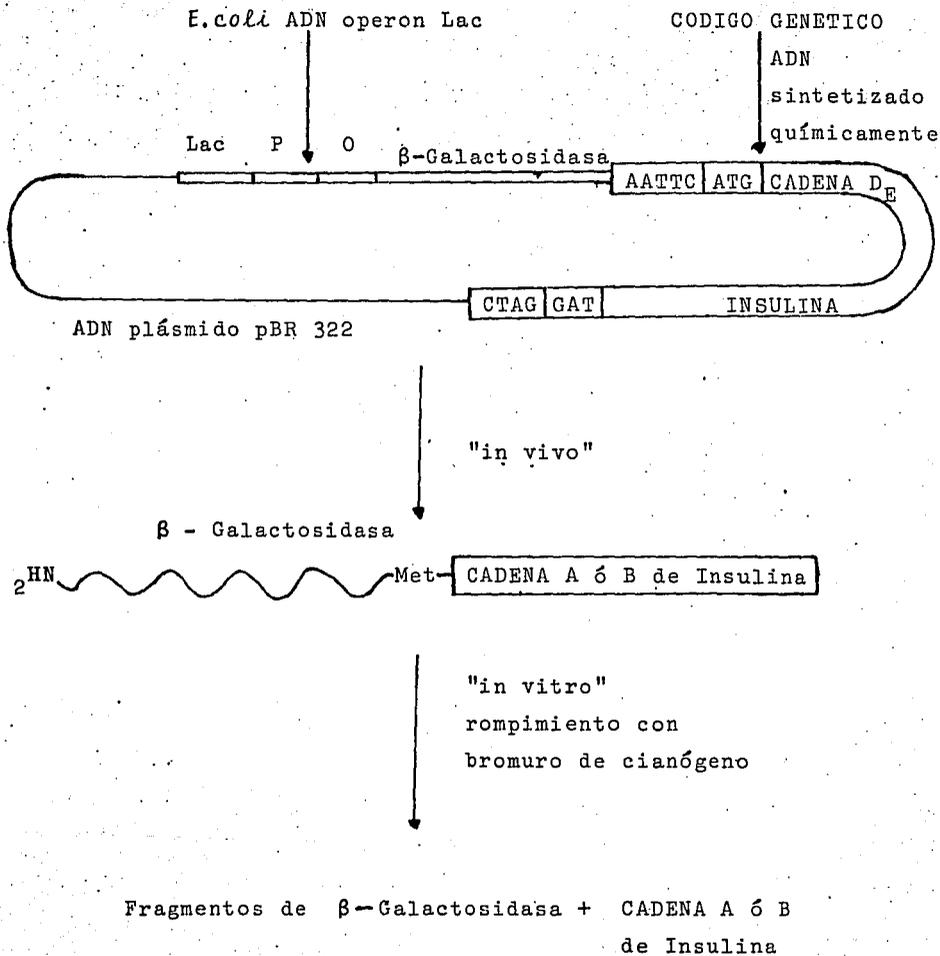


Fig. 5 Esquema de los procedimientos para formar un gen híbrido para la producción de cadenas de insulina humana por la bacteria *E. coli*.



Teniendo ambas cadenas de la insulina purificadas es posible reasociarlas químicamente "in vitro" para generar insulina. (Fig. 7) (25). Es interesante ver que en la reasociación se forman otros productos por la unión incorrecta de las cadenas, pero el principal producto es la hormona activa. A partir de esta mezcla se debe purificar la insulina biológicamente activa.

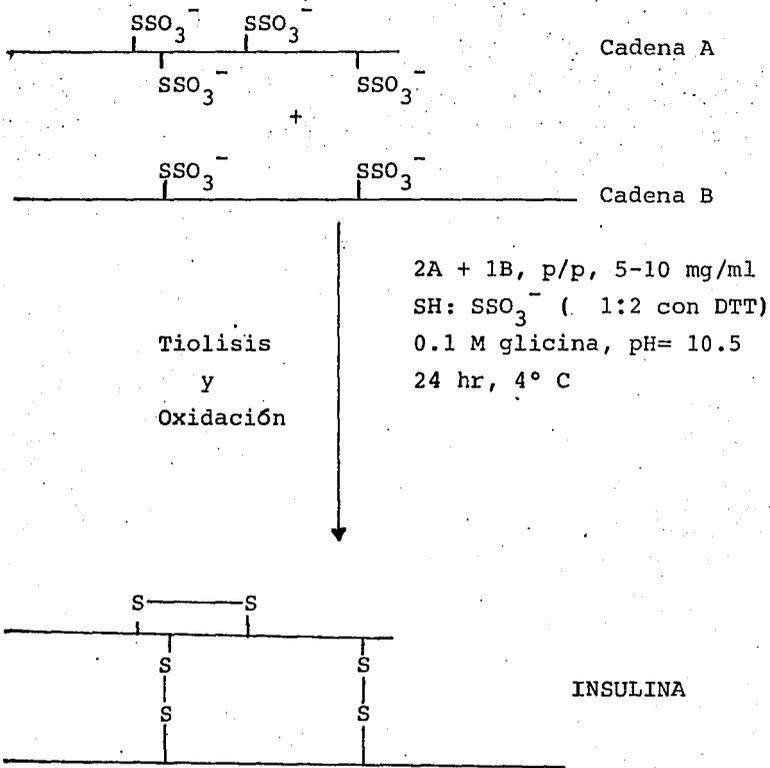


Fig. 7 Reasociación de cadenas de insulina humana.

### 3.2. Insulina.

#### 3.2.1. Lugar de producción.

La diabetes mellitus es la enfermedad endócrina más común y afecta alrededor del 2% de la población mundial. En 1909 J. de Meyer relacionó a la secreción de los islotes de Langerhans en el páncreas con la enfermedad y a la sustancia secretada la llamó inulina. Fue hasta 1921 cuando F. G. Banting y C. H. Best pudieron extraer con éxito insulina del páncreas, la secuencia de aminoácidos de esta hormona fue determinada por F. Sanger en 1955.

#### 3.2.2. Aspectos fisiológicos (45).

El efecto más marcado de la insulina es mantener los niveles de glucosa sanguínea dentro de los límites normales, pero también tiene acción sobre el metabolismo de los lípidos y las proteínas.

Los principales efectos de la insulina son:

- Aumentar el transporte de glucosa al interior del músculo esquelético y cardíaco y de células adiposas, (pero no al hígado, riñón o cerebro):
- Aumenta la incorporación de los ácidos grasos a los adipocitos, pero sólo en presencia de glucosa.
- Incremento en el transporte de aminoácidos al hígado, tejido adiposo y músculo cardíaco y esquelético.
- Promover la formación de glucógeno a partir de glucosa.
- Inhibir la gluconeogénesis (síntesis de glucosa a partir de -- aminoácidos.

- Aumentar la síntesis de triglicéridos (lipogénesis) a partir de glucosa en el tejido adiposo.

### 3.2.3. Estructura.

En 1926 J. J. Abel preparó por primera vez cristales de insulina y encontró que tienen forma rombohédrica. Se requiere de dos átomos de zinc para la cristalización, alrededor de los cuales se agrupan tres dímeros de insulina. El monómero con un peso molecular de 5 800 es la hormona activa.

La molécula está constituida por dos cadenas de aminoácidos, la cadena A con 21 residuos de aminoácidos y la cadena B con 30 residuos. Estas están unidas por dos puentes disulfuro de residuos de cisteínas. La cadena A tiene un puente disulfuro interno (Fig. 8).

La estructura tridimensional de la insulina se determinó -- por difracción de rayos X en 1972. La conservación de su conformación es vital para la actividad biológica y depende de varios factores, entre ellos los puentes disulfuro y la parte central - hidrofóbica que incluye una porción en  $\alpha$ -hélice entre las glicinas 8 y 20. La importancia relativa de las diferentes partes de la molécula para su actividad biológica se pueden estimar considerando aquellos aminoácidos que no cambian entre especies (Fig. 8). El rompimiento de los enlaces disulfuros A7 - B7 o A6 - B1 tiene muy poco efecto sobre la actividad de la hormona (7).

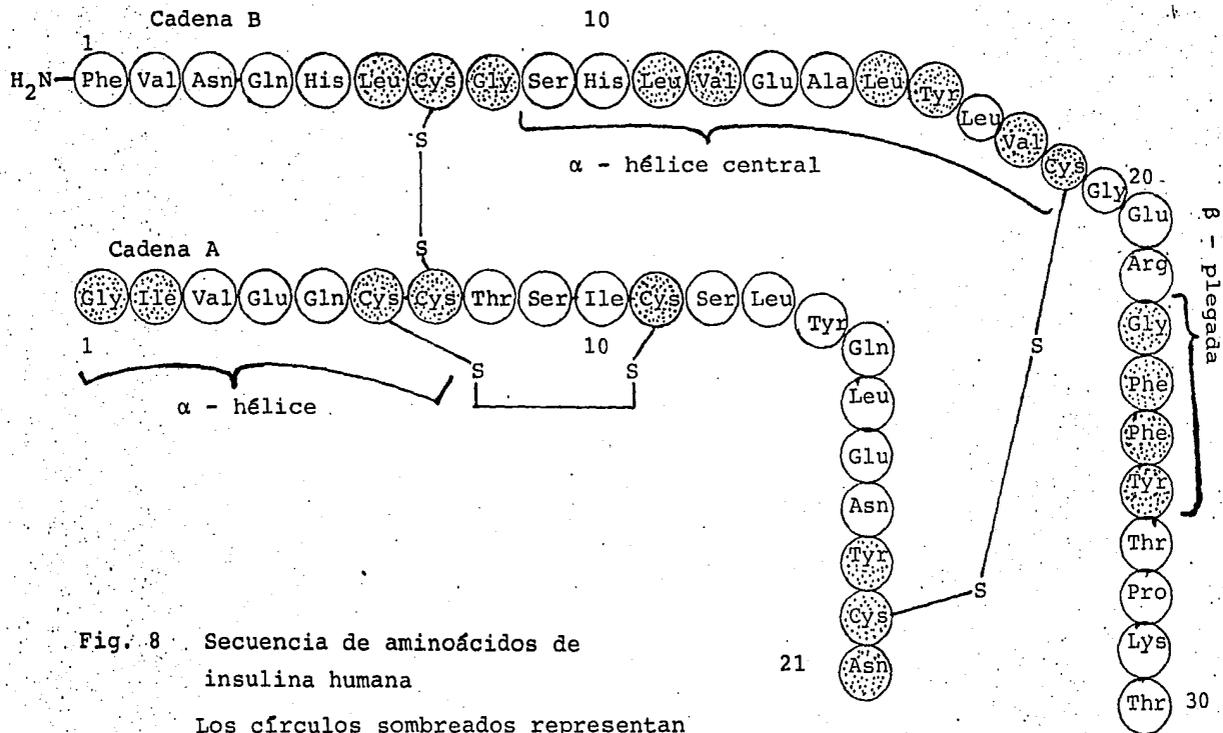


Fig. 8. Secuencia de aminoácidos de insulina humana

Los círculos sombreados representan aminoácidos invariables en las insulinas de todas las especies.

### 3.2.4. Síntesis y liberación.

La proteína traducida originalmente en las células beta, -- tiene un peso molecular alrededor de 11 500 (mucho mayor que el de la insulina). Esta proteína es lineal y se le ha llamado pre proinsulina y solamente existe completa en las células beta por un tiempo muy corto. La preproinsulina tiene una cadena de 23 - aminoácidos en el extremo N-terminal por medio de la cual, el ri bosoma donde se forma se une al retículo endoplásmico.

Al perder esta parte la proteína se forma la proinsulina -- (86 aminoácidos) la cual es transportada al aparato de Golgi, -- donde se forma insulina que se almacena en gránulos. La insulina es liberada de la proinsulina por la acción de dos enzimas -- que actúan como tripsina y quimotripsina, rompiendo a la molécula en las posiciones 31 y 32 (donde hay dos residuos de arginina) y en las posiciones 64 y 65 (lisina y arginina) (Fig. 9).

La secreción de insulina se produce en respuesta a muchos - estímulos fisiológicos y farmacológicos; entre los cuales están el aumento de glucosa, mannososa, glucosamina, gliceraldehído, epi nefrina ( $\beta$ - adrenérgico), glucagon, sulfonilurea. La liberación disminuye con somatostatina, diuréticos derivados de la tiazida, ausencia de calcio, catecolaminas (efecto  $\alpha$ -adrenérgico) etc.

La respuesta de las células beta a la hiperglicemia es de- pendiente de la presencia de  $Ca^{+2}$  externo y puede ser inhibida - con verapamil, el cual bloquea la permeabilidad de la membrana - al calcio.

La estimulación vagal puede potenciar la liberación de insu



lina y este efecto puede ser observado "in vitro" con fármacos - colinérgicos como: acetilcolina, metacolina y carbamilcolina (7).

### 3.2.5. Transporte y metabolismo.

La concentración normal de insulina en el plasma humano es - alrededor de  $5.8 \times 10^{-4}$   $\mu\text{g} / \text{ml}$ , teniendo un tiempo de vida media de 5 minutos. La forma en que se transporta en la sangre no está bien definida, pero se cree lo hace no unida a protefinas, posible<sub>mente</sub> en dímeros o tetrámeros inactivos.

La insulina liberada pasa directamente a través del hígado - donde 40 a 50% es eliminada en un solo paso. La destrucción meta**u**bólica de la insulina involucra tres tipos de reacciones:

- a) reducción no enzimática de los puentes disulfuro en presencia de tioles;
- b) reducción enzimática de los puentes disulfuro. Una enzima glu**u**tationa-insulina transhidrogenasa se ha aislado del hígado y - del riñón;
- c) inactivación por enzimas proteol**u**fticas.

### 3.2.6. Diabetes mellitus.

La diabetes mellitus es una enfermedad que se conoce desde - tiempos remotos, se identifica por la formación de grandes volú**u**mes de orina, sed, pérdida de peso y eventualmente coma y muerte.

La enfermedad se clasifica en dos tipos:

- Tipo I (antes juvenil), que aparece generalmente antes de los -

25 años. Se caracteriza por la marcada deficiencia o total ausencia de insulina, lo cual hace a los enfermos propensos a sufrir cetoacidosis.

- Tipo II (antes de la edad adulta), la mayoría de las veces se presenta después de los 40 años. En estos pacientes los niveles de insulina son normales o ligeramente menores, pero existe una respuesta lenta a la liberación de ésta. El problema fisiológico se debe a que la velocidad de secreción ya no es adecuada para las necesidades de la persona.

Las causas de la enfermedad no se conocen pero se manejan varias teorías: influencia genética, daño a las células beta, alta resistencia a las acciones de insulina, exceso de glucagon.

El tratamiento de la diabetes mellitus procura aliviar los síntomas de la hiperglicemia, impedir se desarrolle cetoacidosis y coma diabético y retrasar la aparición de complicaciones vasculares y neurológicas a largo plazo. El control de la dieta es la primera y principal forma de tratamiento encaminada a reducir la ingesta de carbohidratos y a bajar de peso.

La insulina se usa en los pacientes del tipo I, en el coma diabético y en los enfermos propensos a la acidosis. La hormona por ser un polipéptido se degrada en el tracto digestivo y debe administrarse por vía subcutánea aunque en emergencias puede darse intramuscular o endovenosa. Debido a su vida media tan corta se debe aplicar frecuentemente o bien formar depósitos en los tejidos a partir de los cuales se disuelva lentamente.

El interés por lograr fuentes alternas para obtener insulina

—se debe principalmente al gran número de enfermos diabéticos que existen en el mundo. La diabetes mellitus es una enfermedad que se caracteriza por niveles de glucosa elevados en la sangre, lo que provoca muchos trastornos tanto fisiológicos como económicos y sociales (43). Desafortunadamente no se tienen datos exactos — del número de diabéticos que hay, se calcula que existen unos 60 millones de pacientes diabéticos en el mundo, de los cuales 25 — millones se encuentran en países desarrollados y 35 millones en países en desarrollo. De los de países desarrollados sólo 15 millones están diagnosticados y bajo tratamiento médico ( 4 millones con insulina y 11 millones con hipoglucemiantes orales y/o — dieta solamente ), (Corporate Affairs Division, E. Lilly Co. y — National Commission on Diabetes to the Congress, USA) (84).

En Hispanoamérica la incidencia de la diabetes va desde un 1.2% en Chile hasta 7.3% en Venezuela. En México se estima que — la frecuencia de la enfermedad ha aumentado hasta el 4.5% (84) .

No se tiene hasta la fecha un dato mas confiable sobre la — cantidad de enfermos diabéticos. Esta falta de información se debe a que no se han hecho estudios estadísticos representativos — a toda la población del país. En México el Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" concentra a un gran número de en — ferros diabéticos en su clínica de diabetes, provenientes de todo el país, sin embargo, no son una muestra representativa de to — dos los enfermos que existen ya que sus datos no concuerdan con los de otros centros de salud donde se tratan pacientes diabéti — cos (98).

Tomando en cuenta lo anterior se puede estimar que existen unos 500 000 enfermos de diabetes mellitus en México que requieren de insulina para su supervivencia. El consumo de insulina en México es muy grande y además esta hormona no es producida en nuestro país teniendo que ser importada provocando un fuerte gasto no eliminable, por ahora, al país (50). Los datos de la cantidad de insulina importada en 1981 y 1982 aparecen en la Fig. 10.

Otro problema importante referente al consumo de insulina es que toda la hormona que hay para uso clínico se obtiene por extracción y purificación a partir de páncreas bovinos (24).

La administración de insulina se estandariza en términos de unidades internacionales (IU). Esta unidad está basada en una insulina cristalina estándar de referencia que tiene una actividad de unas 24 IU/mg (88).

La insulina bovina aunque presenta actividad hipoglucemian- te en humanos es ligeramente diferente en su estructura química a la humana, teniendo dos aminoácidos distintos en la cadena A y uno en la B. Esta diferencia es lo suficientemente grande para que el sistema inmunológico de los pacientes que reciben insulina bovina genere con el tiempo anticuerpos que inactivan a la hormona. Esto hace que se requieran cada vez cantidades mayores de insulina para lograr el mismo efecto clínico de antes. Si se contara con insulina humana en cantidad suficiente este problema se reduciría prácticamente a cero con las consecuentes ventajas para el paciente y su centro de salud, pues el control de la en-

IMPORTACION DE INSULINA EN MEXICO.

País	1981	1982	1981	1982
	(Kg B)		(\$)	
Argentina	2		82 708	
Brasil	2 554	11 179	666 190	1 145 438
E.E.U.U.		727		229 307
Holanda		1		8
<b>TOTAL</b>	<b>2 556</b>	<b>11 907</b>	<b>748 898</b>	<b>1 374 753</b>

Kg B: kilogramos brutos

\$: U.S. dólares

Fig. 10 Importaciones de insulina. (51).

fermedad sería más regular y no habría un aumento paulatino en la cantidad de hormona necesaria. Actualmente una forma que permite la producción de proteínas humanas (como insulina) en gran cantidad es la Ingeniería Genética. De aquí surge entonces el interés por estos estudios para obtener insulina humana (13) -- (14) (35).

### 3.2.7. Hipoglucemiantes orales.

Se han tratado de encontrar fármacos con acción hipoglucemiante que sean activos por vía oral. Entre éstos están las sulfonilureas que funcionan facilitando la liberación de insulina de las células beta, por lo que son efectivas sólo en la diabetes tipo II (Fig. 11).

Otros hipoglucemiantes orales son las biguanidas. Su mecanismo de acción es poco conocido. No liberan insulina, pero provocan un efecto en diabéticos y no así en personas normales. Se cree que esto es por procesos compensatorios en los primeros. Tienen el inconveniente de provocar en algunos casos acidosis láctica (7). (Fig. 12).

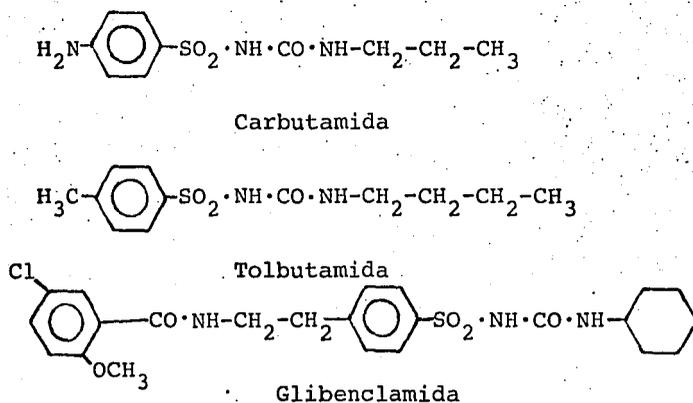


Fig. 11 Estructuras de sulfonilureas con acción hipoglucemiante oral.

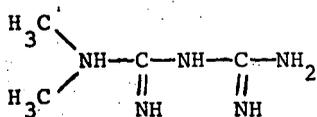
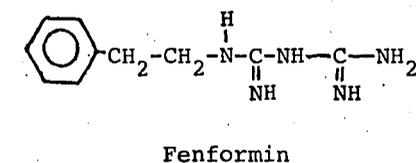


Fig. 12 Estructuras de biguanidas con acción hipoglucemiante oral.

3.3. Química y funciones de la Hormona liberadora de la Tiro- tropina ( TRH ).

3.3.1. Control hipotálamico de la función de la hipófisis.

La hipófisis es un órgano ovoide de coloración rojiza grisácea y se encuentra localizado en el cerebro inmediatamente por detrás del quiasma óptico como una prolongación del hipotálamo. La adenohipófisis (componente bucal) incluye al lóbulo anterior y al lóbulo intermedio, ambas de estructura glandular. La neuro hipófisis (componente nervioso) incluye al lóbulo posterior y - el tallo neural que une a la glándula al piso del cerebro en el hipotálamo. Esta glándula produce muchas hormonas que sirven pa ra regular la función endócrina de otras glándulas del organis mo (45).

Desde 1949 se sugirió que la función de la adenohipófisis estaba modulada por factores u hormonas reguladoras producidas en el hipotálamo (39). Este hecho se confirmó cuando se aisla- ron dos péptidos hipotalámicos que afectan dos hormonas diferen tes de la hipófisis: la hormona estimulante del tiroides (TSH ) y la hormona luteinizante (LH). Los péptidos se denominan hormo na liberadora de tirotropina (TRH) y hormona liberadora de la - hormona luteinizante (LHRH); sin embargo, ahora se sabe que tam bién hay factores que inhiben la liberación de su hormona blan- co. Algunos de estos factores se han encontrado también en o- otros lugares del sistema nervioso y por esto se han denominado neurohormonas o neuropéptidos (debido a su naturaleza química ) (46). Se han identificado a la fecha mas de veinte péptidos neu

roactivos en el sistema nervioso central y periférico, aunque se supone que existen muchos mas (46).

### 3.3.2. TRH y la regulación del eje hipófisis - tiroides.

El TRH provoca la liberación de TSH en todos los animales - que se han estudiado hasta la fecha, sin importar la vía de administración, edad o sexo. Después de la administración de TRH los niveles de TSH se elevan y también lo hacen los de triyodotironina ( $T_3$ ) y tiroxina ( $T_4$ ), que son las hormonas de la tiroides.

En general se acepta que la retroalimentación negativa para la liberación de TSH se da a nivel de hipófisis por  $T_3$  y  $T_4$  (86). El TRH parece actuar en la membrana plasmática del tirotripo para provocar la liberación de TSH preformado. Esto es inhibido - por las hormonas tiroideas que se cree actúan dentro de la célula para inducir la síntesis de ARNm, el cual dirige la síntesis de una proteína reguladora (no caracterizada) que inhibe la respuesta de estímulo dada por la unión de TRH a la membrana de la célula (10). Otro punto de apoyo para localizar el sitio de regulación negativo en la hipófisis viene de los trabajos de Montoya et.al. (75), quien midió el TRH inmunoreactivo en la sangre y el hipotálamo de animales expuestos al frío y después de administrar les  $T_3$  y  $T_4$ . Después de una hora en frío, los niveles de TRH en sangre subían hasta 500% sin bajar en forma paralela en el hipotálamo. Al aumentar los niveles de  $T_3$  y  $T_4$ , el nivel de TSH bajaba aún en los animales expuestos al frío.

### 3.3.3. Distribución de TRH en el cerebro de rata.

El TRH se ha identificado por radioinmunoanálisis e inmunocitoquímica en varias partes del cerebro. El TRH del hipotálamo representa el 31% del total medido en el cerebro (102). El lóbulo anterior, el diencefalo posterior, la corteza posterior y la médula espinal tienen cantidades considerables, mientras que el cerebelo presenta sólo el 2%. Dentro del hipotálamo la concentración mas grande está en la eminencia media.

La filtración en gel, intercambio iónico y cromatografía en capa delgada, lo mismo que la degradación en plasma se han usado para confirmar la identidad del TRH inmunoreactivo.

En otras especies no mamíferas donde el TRH no tiene influencia sobre la función del tiroides, se ha encontrado en estructuras nerviosas (53).

### 3.3.4. Propiedades químicas del TRH.

El TRH fue el primer factor que se identificó y cuya secuencia se conoció: piroglu-his-pronH<sub>2</sub> (12), (79) (Fig. 13) con base en la actividad biológica detectada en extractos hipotalámicos - purificados, capaces de liberar "in vivo" e "in vitro" TSH (41) (87). El TRH sintético es capaz de liberar TSH de la hipófisis - en todas las especies donde se ha probado.

Una vez conocida la estructura se han sintetizado varios análogos para definir los requerimientos estructurales de la molécula que dan lugar a la actividad biológica (63).

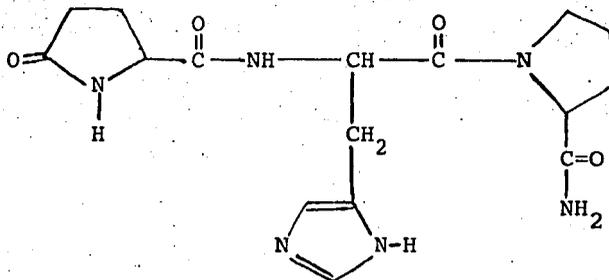


Fig. 13 Estructura molecular de la hormona liberadora de -  
tirotrópina (TRH): L-2-pirrolidón-5-carboxil-L-his-  
tidil-L-prolinamida.

Cambios en la posición del piroglutamil bajan la potencia -  
del TRH. La sustitución en el N del piroglutamil o cambiando el  
N por átomos menos nucleofílicos como oxígeno o azufre da menos  
del 1 % de la actividad biológica del TRH (18). Las sustitucio-  
nes en el residuo de histidina muestran que se requiere un grupo  
aromático para la actividad biológica (89). En el lado de la pro-  
lina se ha demostrado que una amida terciaria es importante para  
la actividad. La rigidez del anillo de prolina es esencial para  
la actividad (96). Al cambiar cualquier L-aminoácido por uno D -  
la actividad biológica se pierde totalmente (57).

De los primeros análogos probados el 3-metil-His<sup>2</sup>-TRH mostró

una actividad 800% mayor que el TRH (97). Este resultado apoya la idea de que el enlace de hidrógeno entre el imidazol de la histidina y la amida de la cadena peptídica debe estar presente en la conformación activa de la molécula; la sustitución en 3 produce rigidez en esta parte de la molécula facilitando el enlace de hidrógeno (38) (Fig. 14).

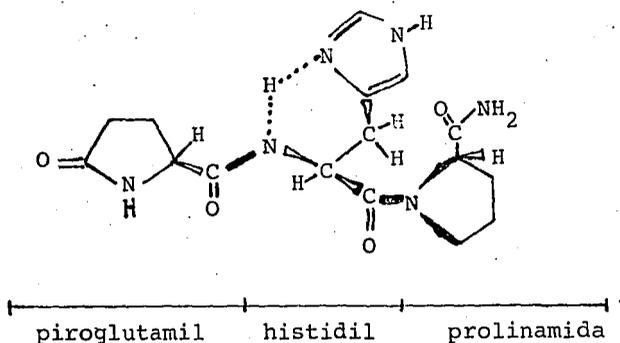


Fig. 14 Modelo de las interacciones por enlace de hidrógeno propuestas entre el anillo de imidazol y el enlace peptídico en el TRH. Las líneas gruesas muestran los enlaces peptídicos planares.

### 3.3.5. Funciones extrahipotalámicas del TRH.

La amplia distribución del TRH en el sistema nervioso central ha llevado a considerar que este péptido pudiera tener acciones directas sobre la actividad neural y sobre el comportamiento.

La administración de L-DOPA + pargilina (inhibidor de la MAO) estimula los sistemas dopaminérgicos dando patrones de comportamiento característicos. Al dar TRH junto con estos fármacos la respuesta es potenciada y el efecto es independiente del estado tiroides del animal (82). En forma similar algunas pruebas clínicas han dado evidencia de que el TRH disminuye los síntomas esquizofrénicos (101), y tiene acciones antidepresivas (59) (83). Los procesos del aprendizaje parecen mejorar después de la administración de TRH reduciendo la excitabilidad en ratas (93) e incrementando la claridad mental en mujeres (101).

A pesar de los estudios realizados el potencial antidepresivo del TRH no ha sido confirmado, pero aquí hay dos factores a considerar: a) el TRH inyectado se metaboliza rápido con una vida media de sólo 4-5 minutos; b) las dosis usadas están del orden de 0.5-1 mg/paciente (esto es, dosis que generan respuestas endocrinas) y no se han probado cantidades mayores.

Conociendo la estructura del TRH y su vulnerabilidad a la degradación enzimática se han sintetizado y evaluado varios análogos en la clínica (72).

Algunos análogos que han sido de interés (Fig. 15) presentan los siguientes cambios con respecto a la estructura primaria:

- 1) Sustitución de un oxígeno por el nitrógeno en el anillo de piroglutamil (e. g. DN 1417).
- 2) Cambiar el piroglutamil por anillos de 6 miembros (e.g. CG 3509 ó CG 3703).

- 3) Adicionar grupos alquilo al anillo de la prolina para disminuir el acceso de enzimas degradativas a la molécula (e.g. RX 77368)
- 4) Modificar los anillos del piroglutámico y la prolina al mismo tiempo (e.g. MK-771).

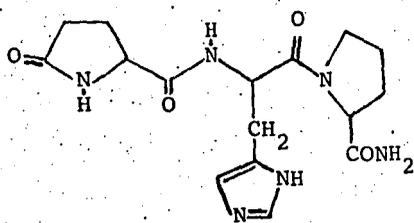
Todos estos análogos han mostrado una potencia mayor comparados con el TRH en pruebas de actividad neurofarmacológica en animales.

Estudios mas detallados con el RX 77368 indican que la protección de este análogo a la degradación enzimática es tan grande que ésta ya no es su principal mecanismo de depuración "in vivo". Con el CG 3509 se han reportado resultados similares.

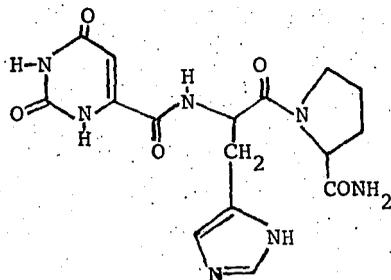
El TRH al igual que los antidepresivos tricíclicos ha demostrado que antagoniza la hipotermia y el comportamiento depresivo inducido por la reserpina. Con este tipo de pruebas y otras como: hipotermia en conejos, inmovilidad aprendida en ratones y eliminación de la hipotermia con temblor en ratones, indican que los análogos RX 77368, MK-771 y CG 3703 son entre 50 y 200 veces mas potentes que el TRH (76). El problema de estos análogos es que, si bien, parecen tener un potencial antidepresivo grande, aún siguen presentando la acción endócrina del TRH produciendo liberación de TSH (31). El estudio clínico de los análogos de TRH se ha centrado en sus efectos antidepresivos pero el tripéptido se ha usado -- también en el tratamiento de esquizofrenia, alcoholismo, síndrome hipercinético e hipofunción neuromuscular.

Encontrar análogos nuevos que puedan separar los efectos sobre glándulas y sobre el sistema nervioso central es uno de los -- mayores intereses dentro del estudio clínico del TRH. En el campo

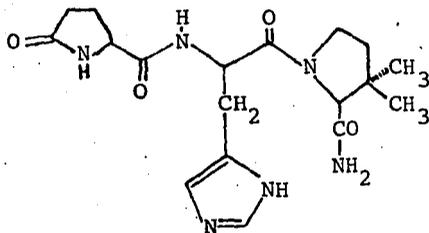
neuroendocrinológico se desea conocer el proceso de cambios y mecanismos de acción de estos péptidos para entender los sistemas de regulación metabólica sobre las hormonas y su interacción con el sistema nervioso.



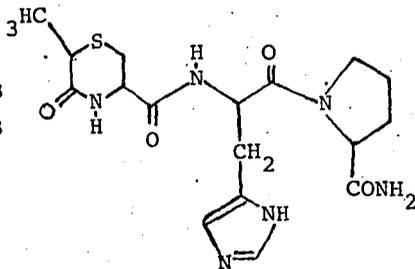
TRH



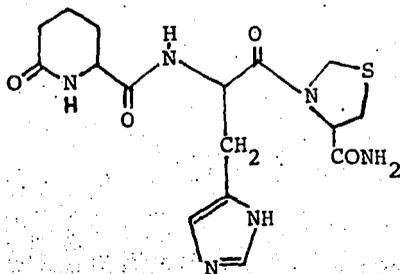
CG 3509



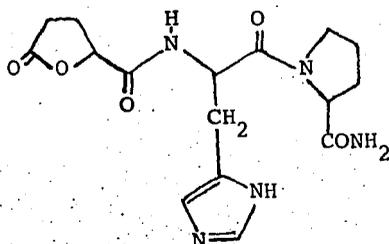
RX 77368



CG 3703



MK - 771



DN 1417

Fig. 15 Algunos análogos del TRH

### 3.4. Radioinmunoanálisis.

El radioinmunoanálisis, o más propiamente dicho, análisis de unión por competencia a proteínas, ha tenido una influencia muy grande sobre la evolución del trabajo de laboratorio clínico, farmacológico y sobre todo en la investigación endocrinológica.

Se reúne en este ensayo la combinación de radioisótopos y -- proteínas específicas con una capacidad de unión de alta afinidad (como los anticuerpos), para lograr la sensibilidad y especificidad necesarias para medir sustancias en concentraciones fisiológicas del orden de microgramos, nanogramos y picogramos ( $10^{-6}$ ,  $10^{-9}$  y  $10^{-12}$  gramos respectivamente).

En 1960 Berson y Yalow introdujeron la técnica del radioinmunoanálisis (104) para la insulina. Ellos demostraron que la adición de cantidades crecientes de insulina a una mezcla de una cantidad fija de anticuerpos y el antígeno marcado (trazador) causaba un decremento gradual en la cantidad de trazador que se unía al anticuerpo. La relación cuantitativa entre el antígeno marcado y el antígeno frío (no marcado) que se une al anticuerpo es la base del ensayo de unión competitiva a proteínas (105).

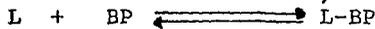
La necesidad de técnicas sensibles como el radioinmunoanálisis (RIA) surgió porque la concentración de algunas sustancias como hormonas y vitaminas en líquidos biológicos están en el orden de  $10^{-7}$  a  $10^{-11}$  M. Los métodos químicos clásicos de análisis como espectrofotometría, fluorometría, cromatografía de líquido-gas tienen en general límites de sensibilidad de microgramos y por lo tanto no resultan útiles para medir a ciertos compuestos biológicos.

### 3.4.1. Análisis de unión por competencia.

El análisis de unión por competencia a proteínas (UCP) es el análisis de una sustancia (ligando), en el cual el reactivo de unión es una proteína con un número limitado de sitios de unión -- por los cuales el ligando marcado y no marcado compiten. La sustancia usada para seguir el ensayo de unión se llama trazador (o marca). La marca puede ser un radioisótopo, una enzima o una sustancia fluorescente (56).

La unión a proteínas se define como la asociación entre una proteína y otra sustancia (que puede ser también proteína) que resulta de la acción de fuerzas de corto alcance en muchos lugares (o sitios) de las dos moléculas reaccionantes. Las fuerzas de unión involucradas en las reacciones UCP son enlaces de hidrógeno, fuerzas iónicas, atracciones polares y fuerzas de van der Waal's (77).

En los ensayos UCP se considera que al final de la incubación los diferentes reactivos alcanzan el equilibrio. La ecuación de equilibrio es:



donde L: ligando, BP: proteína de unión específica, L-BP: complejo de unión.

El radioinmunoanálisis (RIA) es un caso particular de los ensayos UCP donde la proteína de unión son anticuerpos y el trazador es un isótopo radioactivo (56).

Antes de describir como se establece y funciona un radioinmunoanálisis conviene definir ciertos términos. Un antígeno (Ag) es aquella sustancia que inyectada a un animal mamífero, estimulará

una respuesta inmunológica. Un anticuerpo (Ab) es una gamma globulina que se produce como una respuesta inmune contra una sustancia extraña (antígeno) al cuerpo y que se une específicamente a esa sustancia (30). Un ligando es cualquier cosa que se une a un reactivo de unión adecuado, generalmente se refiere tanto al trazador marcado como al sustrato no marcado en un UCP.

La Figura 16 muestra el principio básico del RIA.

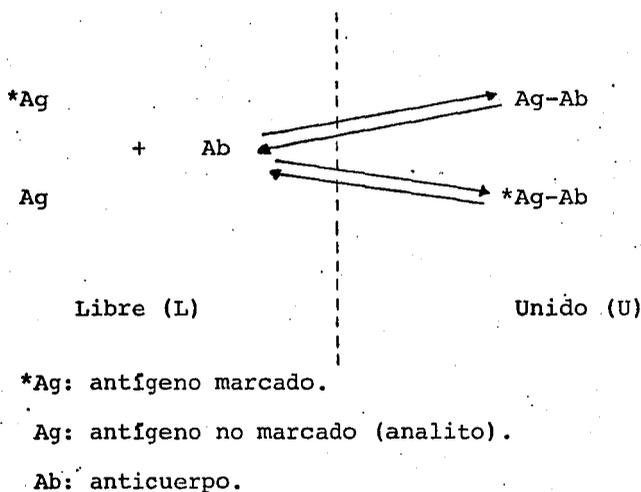


Fig. 16 Principio del radioinmunoanálisis.

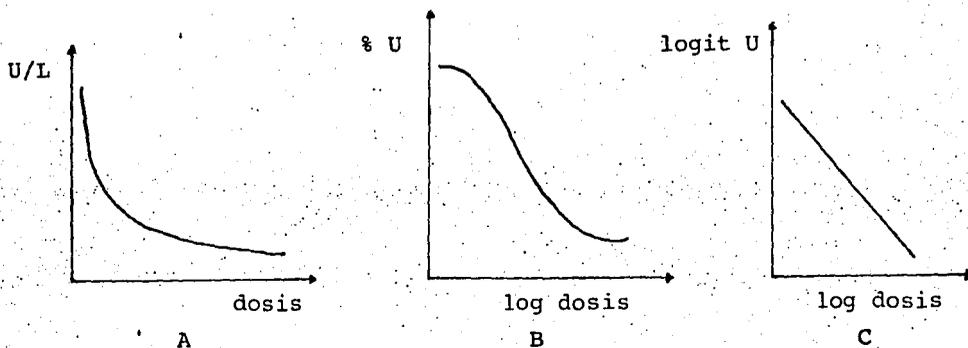
Si la cantidad de anticuerpo presente (capacidad de unión) es constante y pequeña en relación con el antígeno marcado que está constante y en exceso, entonces el antígeno competirá con el antígeno marcado por los sitios de unión disponibles en el anticuerpo. Por lo tanto la cantidad de \*Ag unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la cantidad de Ag presente. Cuando las moléculas

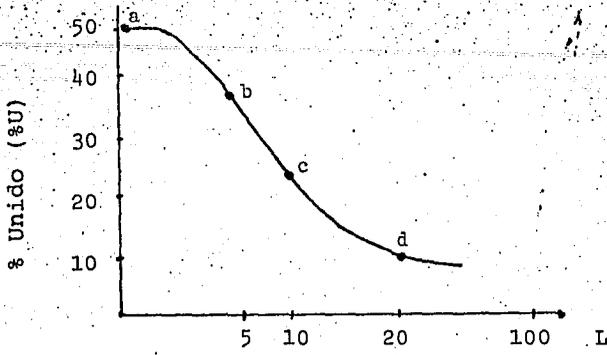
las trazadoras en la mezcla de reacción son separadas (las unidas al anticuerpo: \*Ag-Ab y las libres: \*Ag) y se mide el trazador en cada fracción, con respecto a la otra, la relación refleja la cantidad de antígeno no marcado presente.

Cuando se usan proteínas de unión de alta afinidad como son los anticuerpos, su afinidad y su capacidad son mayores a bajas temperaturas y disminuyen rápidamente a temperaturas mayores a  $-30^{\circ}$  C. (5) (56).

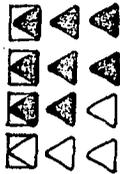
Durante el ensayo cantidades crecientes del Ag en concentraciones conocidas (estándares) llevan a un desplazamiento dosis-dependiente del trazador unido hacia la fracción libre. La separación de las fracciones libre y unida permite tener una curva estándar cuando U/L (unido sobre libre) o U% (porcentaje unido de la actividad del trazador) se grafican en las ordenadas contra la concentración del antígeno no marcado en las abscisas (Fig. 17).

En la literatura los datos del RIA se grafican en cualquiera de las tres formas siguientes, todas aceptables:

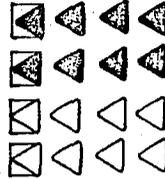




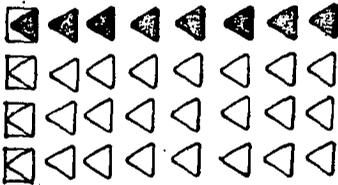
a)  $\%B = \frac{4}{8} \times 100$   
 $\%B = 50$   
 $L = 1$



b)  $\%B = \frac{3}{8} \times 100$   
 $\%B = 37.5$   
 $L = 4$



c)  $\%B = \frac{2}{8} \times 100$   
 $\%B = 25$   
 $L = 8$



d)  $\%B = \frac{1}{8} \times 100$   
 $\%B = 12.5$   
 $L = 24$

-  Anticuerpo
-  Complejo antígeno-anticuerpo
-  Antígeno no marcado
-  Antígeno marcado

Fig. 17 Principio básico de la curva estándar.  
 Al aumentar la cantidad de antígeno no marcado la cantidad de antígeno marcado disminuye en función de la dosis.

En las gráficas A y B la ordenada puede ser U/L, U%, U/Uo (unido sobre lo máximo unido sin antígeno no marcado), U/T (unido sobre total), dando todas el mismo tipo de curva.

La transformación logit usada en C es muy útil para cálculos con computadoras (42)(80) y es:

$$\text{logit } (x) = \ln \left[ \frac{x}{1 - x} \right] .$$

### 3.4.2. Propiedades de los antígenos.

Los antígenos son sustancias generalmente de alto peso molecular que al entrar en el organismo de un mamífero y ser reconocidas como "extrañas" al animal, estimularán una respuesta inmunológica, esto es, la producción de anticuerpos.

Los antígenos requieren para ser reconocidos por el sistema inmunológico que tengan un tamaño muy grande. Las proteínas, polisacáridos y lípidos son los antígenos por excelencia, siendo las proteínas los mejores. El peso molecular mínimo para que una sustancia sea antigénica es de unos 3000 a 5000.

Un hapteno es una molécula orgánica (P.M. 200 a 1000) que no es inmunogénica por sí misma pero que puede generar una respuesta inmune cuando se une a una sustancia más grande. De esta forma moléculas pequeñas no antigénicas como las hormonas esteroides, péptidos y fármacos, funcionando como haptenos pueden estimular la formación de anticuerpos específicos contra ellas.

### 3.4.3. Propiedades de los anticuerpos.

Una de las partes mas importantes y limitante en un RIA son los anticuerpos. Es importante hacer notar que un suero hiperinmune es un suero obtenido de un animal que ha sido expuesto al antígeno y que contiene varios tipos de anticuerpos. Por otro lado un anticuerpo es una protefna especial con una afinidad y especificidad características. Un suero usado para RIA se caracteriza por las propiedades de los anticuerpos que posee.

#### a) Título.

El título se refiere a la dilución óptima del anticuerpo, o sea, la dilución final usada en el ensayo, la cual garantiza que el anticuerpo está en concentración limitada. La titulación se hace incubando varias diluciones del suero con una cantidad constante del antígeno marcado en un volumen, temperatura y tiempos fijos. El título es una característica intrínseca del anticuerpo y es función de su afinidad por el antígeno, si bien, representa la concentración a la cual es usado.

En general una definición de título es: aquella dilución del suero que une un porcentaje especificado (e.g.  $U/T\% = 50$  ó  $30$ ) de una cantidad estandar del antígeno marcado bajo condiciones fijas de incubación, temperatura, volumen, tiempo y técnica de separación.

La dilución del suero que produce un desplazamiento significativo del trazador a concentraciones dentro del rango de interés es la mas adecuada para realizar el RIA. En la práctica se ha encontrado que el título adecuado de trabajo para péptidos pequeños está entre 30 y 40 % de unión.

### b) Especificidad.

La especificidad se refiere al grado de poder discriminar otras sustancias que no son las que se intenta medir. Los anticuerpos son en general específicos para una pequeña parte (P.M. 400 - 800) de una proteína. Es importante recordar que un suero hiperinmune contiene una mezcla de anticuerpos los cuales se unen al antígeno en diferentes proporciones. Es por esto que se debe caracterizar al suero para reconocer las sustancias que puedan unirse a los anticuerpos sin ser el antígeno que generó su formación, de forma tal que puedan ser eliminadas. Existen factores no específicos que pueden alterar el grado de unión al anticuerpo por un antígeno particular como son: fuerza iónica, pH, heparina, etc. Estas deben mantenerse constantes durante todo el ensayo.

Otra forma de interferencia inespecífica es la que se conoce como unión no específica (UNE). La UNE o ruido de fondo se refiere a la cantidad de antígeno marcado que en ausencia de anticuerpo permanece en la fracción unida después de la separación. Ruidos de fondo altos son debidos a adsorción del \*Ag a las paredes de los tubos y englobamiento inespecífico del \*Ag a proteínas protectoras en la solución amortiguadora del ensayo.

### c) Afinidad.

La afinidad indica la avidéz que presentan los anticuerpos por su antígeno. La afinidad observada en un suero hiperinmune es el resultado promedio de todos los sitios de unión y afinidades particulares de cada tipo de anticuerpo presente en el suero.

### 3.4.4. Marcadores radioactivos.

Para poder detectar cantidades del orden de picogramos se requiere tener las moléculas de antígeno marcadas con un átomo radioactivo que emita radiaciones de alta energía (74). Aunque se han usado moléculas marcadas con  $^3\text{H}$  y  $^{14}\text{C}$ , se ha generalizado el uso de átomos que emiten radiación gamma como el yodo-125 para marcar los antígenos que se usan en el RIA.

Los radioisótopos como  $^{125}\text{I}$  y  $^{131}\text{I}$  tienen vidas medias relativamente cortas (60 y 8.1 días respectivamente), cosa que no sucede con el  $^3\text{H}$  (12.3 años) y con el  $^{14}\text{C}$  (5730 años). Estos átomos se han convertido en los isótopos de elección porque su emisión gamma de relativa alta energía (22-41 keV para I-125) permite la preparación de ligandos marcados con alta actividad específica y tienen menos error de conteo que los radioisótopos de emisión beta (95). La radiación gamma puede ser medida directamente, mientras que las radiaciones beta que son de menor energía requieren poner la muestra en una solución de centelleo para poder ser detectadas, introduciéndose así, mayor variación y error en la medición (65).

La ventaja del uso del yodo radioactivo se puede ver con el cálculo simple de que un átomo de  $^{131}\text{I}$  sustituido en una molécula de insulina produce 200 veces más desintegraciones radioactivas por unidad de tiempo que las que producirían los 263 átomos de carbono de la molécula si fueran  $^{14}\text{C}$  (44). El yodo-125 es el radioisótopo más usado para marcar antígenos usados en RIA debido a que tiene una vida media más larga que el I-131 y es recibido con

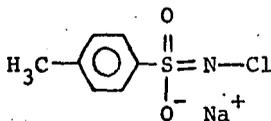
una abundancia isotópica mayor. La mayoría de los contadores cuentan el I-125 con mayor eficiencia que el I-131.

El yodo se une mediante agentes oxidantes a los residuos aromáticos de tirosina e histidina, marcando a las proteínas que contienen estos aminoácidos (47). También se une al grupo  $\text{NH}_2$  de las proteínas a través de reactivos de acoplamiento. Algunas moléculas no proteínicas pueden incorporar yodo directamente sin complicadas manipulaciones químicas. Una desventaja de unir directamente el yodo a proteínas es que este átomo (muy grande) puede cambiar la conformación de la molécula y hacer que se pierda inmunoreactividad con el anticuerpo (32).

### 3.4.5. Métodos de yodación.

#### a) Método de cloramina T.

Para unir el yodo-125 a las proteínas el método más empleado es el que usa cloramina T (N-cloro-p.toluensulfonamida de sodio), como agente oxidante (48) (71).



Cloramina T

La cloramina T actúa como oxidante en medio acuoso al liberar ácido hipocloroso el cual puede oxidar al yodo. El mecanismo de la reacción no se ha descrito completamente pero se cree interviene yodo catiónico ( $\text{I}^+$ ) que se forma en presencia de cloramina T (47). Un átomo de hidrógeno en el anillo aromático de la tirosi

na es cambiado a través de una reacción de sustitución electrofílica aromática por un átomo de yodo (Fig. 18). Con esta reacción se logra la yodación de proteínas en condiciones suaves (pH óptimo de 7.5) y en medio acuoso (29). Se utiliza un reductor fuerte para detener la reacción y regresar el yodo a su estado de oxidación negativo. Generalmente se emplea metabisulfito de sodio para terminar la reacción.

Se requieren cantidades muy pequeñas de cloramina T y en -- tiempos muy cortos (generalmente menos de un minuto) se completa la reacción. La separación de la proteína marcada del resto de -- los reactivos en la reacción se logra fácilmente por una cromatografía de exclusión molecular en Sephadex.

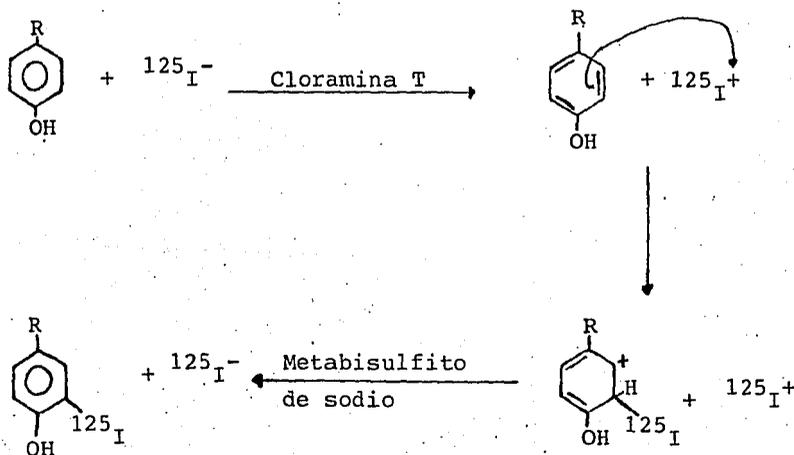


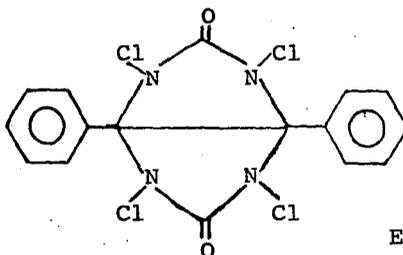
Fig. 18 Mecanismo de la yodación con el método de cloramina T.

b) Método de lactoperoxidasa (76).

Este método es similar al de cloramina T, pero tiene la ventaja de usar a la enzima peroxidasa y agua oxigenada como agente oxidante para llevar al yodo a un estado de oxidación positivo. Se considera que el daño causado a la proteína por estar en presencia de un oxidante es mucho menor en este caso que en el de la cloramina T (49).

c) Método de Iodogen.

Este reactivo: 1,3,4,6-tetracloro-3a,6a-difenilglicoluril, - fue introducido con el nombre comercial de Iodogen en 1978 (28).



Estructura del  
Iodogen

Con este reactivo la reacción de yodación nuevamente involucra una sustitución electrofílica aromática del yodo sobre los residuos de tirosina de las proteínas; sin embargo, ofrece dos ventajas sobre la cloramina T y la lactoperoxidasa: 1) parece dañar menos a los enlaces peptídicos y 2) no requiere de otra sustancia para terminar la reacción.

d) Método de Bolton - Hunter.

Se ha mencionado que el yodo por su gran tamaño y posibilidad

de unirse a histidina o tirosina puede alterar la estereoquímica y con esto las propiedades inmunológicas de la proteína. Tratando de solucionar estos problemas Bolton y Hunter introdujeron la yodación directa de proteínas (17), marcándolas en un sitio diferente a los aminoácidos aromáticos, cambiando así la posibilidad de alterar el sitio antigénico (parte reconocida por los anticuerpos) de la molécula.

El reactivo de Bolton - Hunter es el ester del ácido N-succinimidil-3-(4-hidroxifenil)propiónico, que se hace reaccionar con yodo-125 y cloramina T para dar el ester del ácido N-succinimidil-3-(4-hidroxifenil- $^{125}\text{I}$ )propiónico. Dicho reactivo transfiere el grupo p.hidroxifenilpropionilo a los grupos  $\epsilon$ -amino de lisinas o  $\text{NH}_2$  terminal de las proteínas, (Fig. 19).

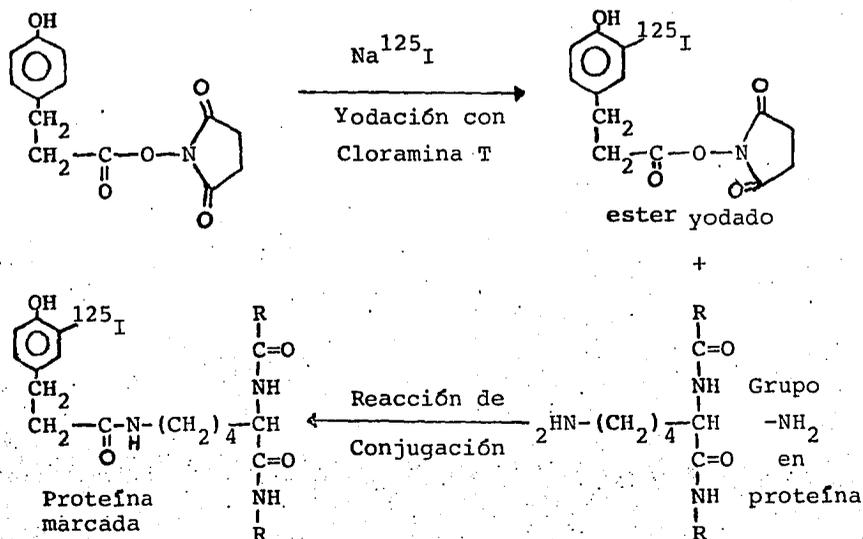


Fig. 19 Esquema de la reacción de yodación con el reactivo de Bolton - Hunter.

### 3.4.6. Métodos de separación.

En los sistemas de radioinmunoanálisis únicamente se mide el antígeno marcado. Es por esto necesario separar la fracción de éste unida al anticuerpo de la fracción libre. Esta separación se puede lograr por métodos fisicoquímicos (para casos con antígenos monovalentes donde no hay precipitación del complejo Ag-Ab) o inmunológicos (29) (44) (55).

Conviene el uso de métodos fáciles, rápidos y que permitan analizar un gran número de muestras con relativo poco trabajo. Los primeros radioinmunoanálisis separaban al antígeno libre del unido a anticuerpos aprovechando las diferencias en peso molecular y carga de éstos usando electroforesis en diversos soportes; e intercambio iónico, pero por poco prácticos estos métodos ya no se utilizan.

#### a) Adsorción con carbón y dextran.

Una mezcla de carbón activado y dextran se utiliza para adsorber al antígeno marcado libre y dejar en solución al complejo antígeno-anticuerpo. Después de agitar los tubos de reacción con esta mezcla, se centrifugan. En el carbón precipitado se encuentra la fracción libre y en el sobrenadante la fracción unida, pudiéndose separar fácilmente al eliminar el sobrenadante. Este método de separación es más útil con los sistemas que miden sustancias de bajo peso molecular como son hormonas, esteroides, algunos fármacos y ciertos péptidos.

b) Precipitación con NaCl y etanol.

A una solución que tenga disuelto cloruro de sodio 0.15 M se le añade etanol absoluto frío para lograr una concentración final del 80%. En estas condiciones la disminución de la constante dieléctrica del medio, así como la mayor solubilidad de la sal en agua, hace que las proteínas de alto peso molecular (como son los complejos antígeno-anticuerpo) precipiten. Al centrifugar se obtiene un precipitado que contiene la fracción unida, quedando la libre en solución. Se utiliza comúnmente una alta concentración en el medio de una proteína que precipite como acarreador, por ejemplo albúmina sérica bovina.

Este método es muy popular porque es rápido, cómodo y barato. Sin embargo, al provocar precipitaciones inespecíficas puede arrastrar algo de antígeno libre al precipitado dando lugar a valores altos de unión no específica.

c) Pansorbin.

Pansorbin es el nombre comercial de una suspensión al 10% de células de Staphylococcus aureus muertas. Esta bacteria tiene un componente de superficie conocido como proteína A. Es una proteína básica pequeña (P.M. 13000) que tiene la propiedad de reaccionar con el fragmento Fc de las moléculas IgG de la mayoría de los mamíferos (23) (62) (99). Al adicionar Pansorbin a los tubos de reacción la proteína A une a los anticuerpos. El Pansorbin se puede separar por centrifugación, en la cual las células arrastran en su superficie al complejo antígeno-anticuerpo, dejando en solución al antígeno libre. Se elimina el sobrenadante y se cuenta la ra--

radioactividad precipitada (unida). Este método es muy cómodo y rápido además de ser mas limpio pues precipita sólo a las inmunoglobulinas IgG.

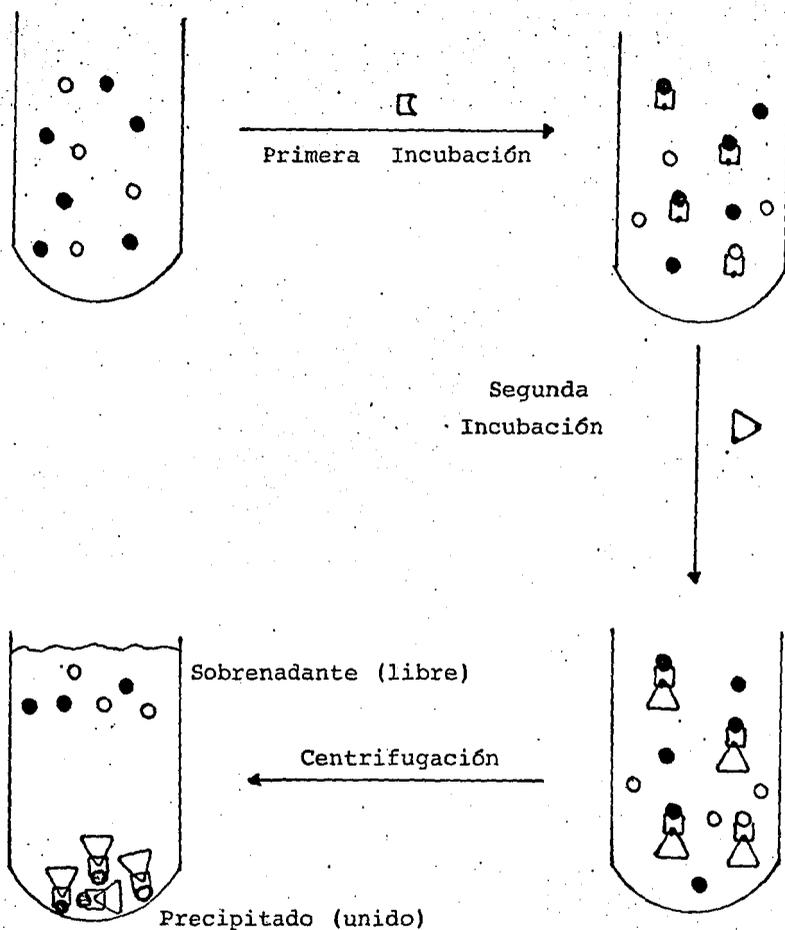
d) Precipitación con un segundo anticuerpo.

Este es el método mas sensible y específico de todos para poder separar las fracciones unida y libre del antígeno marcado ya que tiene menos posibilidad de arrastrar inespecíficamente al antígeno libre. A la mezcla de reacción en equilibrio se le añade un segundo suero que contiene anticuerpos contra las inmunoglobulinas usadas en la primera parte. Se incuba y se forma entonces un complejo de muy alto peso molecular: antígeno marcado-anticuerpo-segundo anticuerpo. Este complejo puede precipitar fácilmente, con una simple centrifugación, ya que es poco soluble (Fig. 20).

El sistema da valores de unión no específica muy bajos y valores de unión muy reproducibles con poca dispersión entre los replicados.

Para lograr una reacción de precipitación eficiente entre Ag y Ab se requiere que ambos esten en proporciones equivalentes. Si hay exceso de uno u otro la precipitación es escasa o puede llegar a no aparecer (Fig. 21) (5). Es por esto necesario titular el segundo anticuerpo, para encontrar la dilución óptima que se usará en el paso de separación en un RIA en particular.

La precipitación con un segundo anticuerpo tiene la desventaja de requerir mucho mas tiempo para tener los resultados pues involucra una segunda incubación.



- Antígeno marcado (\*Ag)
- Antígeno frío (Ag)
- ☐ Anticuerpo contra el antígeno ●
- ▷ Anticuerpo (de otra especie animal) contra el anticuerpo ☐

Fig. 20 Precipitación con un segundo anticuerpo para separar las fracciones libre y unida.

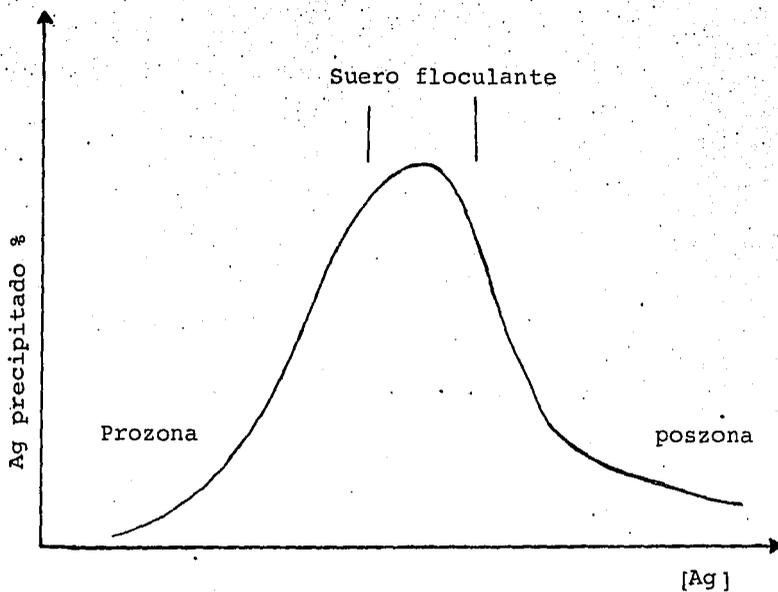


Fig. 21 Curva de precipitación. Se ven los efectos de prozona y poszona (menor cantidad de precipitado en caso de un exceso de anticuerpo o antígeno, respectivamente).

### 3.5. Cromatografía de afinidad.

#### 3.5.1. Principio de la cromatografía de afinidad.

La cromatografía de afinidad usa la propiedad única de la especificidad biológica que existe en la interacción de una macromolécula y su ligando (molécula que interactúa específica y reversiblemente con una proteína). Así por ejemplo, las enzimas se unen a sustratos particulares, las hormonas forman complejos con proteínas de unión específicas y receptores, los anticuerpos se combinan con sus antígenos complementarios y las lectinas de plantas se unen específicamente a ciertos antígenos de superficie de eritrocitos y leucocitos (5).

En la práctica de la cromatografía de afinidad un ligando (o proteína) se une covalentemente a un soporte insoluble y éste se empaca en una columna. Si se aplica una mezcla de proteínas a la columna, sólo aquella proteína que presente una afinidad considerable por el ligando será retenida en la columna, las otras pasarán sin ser detenidas. La proteína adsorbida específicamente puede ser eluida posteriormente alterando las propiedades del disolvente para que se favorezca la disociación de la proteína y su ligando (Fig. 22) (66).

En principio la cromatografía de afinidad se puede aplicar a cualquier par de moléculas biológicas que interactúan específica y reversiblemente.

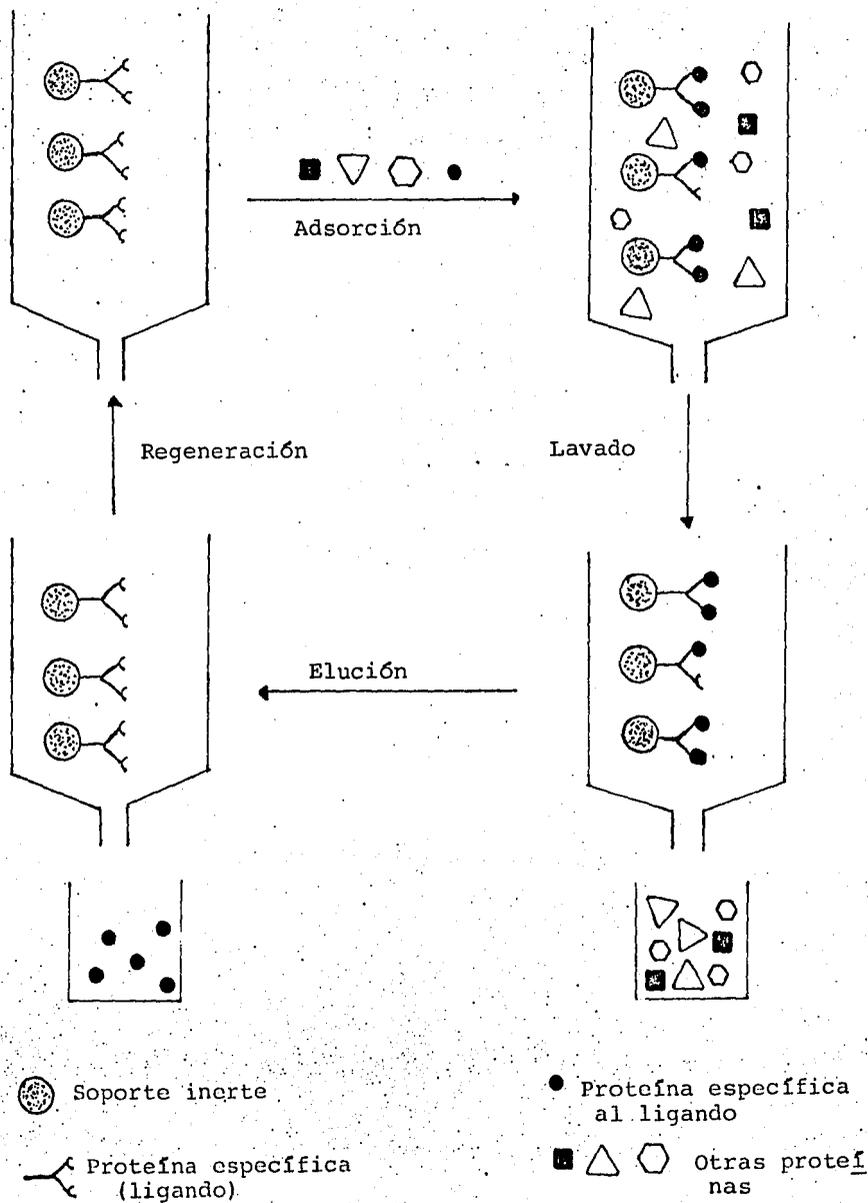


Fig. 22 Principio de la cromatografía de afinidad.

### 3.5.2. Propiedades de la matriz.

El soporte sólido o matriz que se usa en cromatografía de afinidad para unir el ligando es generalmente un gel, esto es, una estructura tridimensional en forma de red formado por un polímero entrecruzado. El espacio entre la estructura se llena con líquido y éste determina las propiedades mecánicas del gel. Existen muchos polímeros pero para este tipo de cromatografía se requiere que tengan características particulares, las cuales limitan el número de posibilidades. La matriz ideal debe cumplir con estas propiedades:

- 1) El soporte (polímero) insoluble debe formar una red porosa con espacios no muy cerrados que permita el paso libre de macromoléculas.
- 2) Las partículas del gel deben ser uniformes, esféricas y rígidas.
- 3) El gel debe de ser químicamente inerte, para evitar interacciones y uniones no específicas al gel.
- 4) El gel debe ser física y químicamente estable.
- 5) La matriz debe ser capaz de funcionalización.

#### 3.5.2.1. Celulosa.

La celulosa es un polímero que se ha usado mucho en otro tipo de cromatografía, pero debido a su naturaleza fibrosa y no uniforme impide la entrada libre a macromoléculas.

3.5.2.2. Dextranas.

Las dextranas son polímeros de glucosa con enlace  $\alpha$ -1,6 - producidos por Leuconostoc mesenteroides en un medio que contenga sacarosa. El sephadex es un producto comercial preparado por entre cruzamiento de dextran con epiclrorhidrina. El gran número de grupos oxhidrilo en el polímero hacen una matriz muy hidrofílica que se hincha con agua. Este gel es químicamente muy estable pero pre senta un grado de porosidad muy bajo. De los 8 tipos de sephadex que existen sólo el G-200 tiene posibilidades para ser usado en - cromatografía de afinidad.

3.5.2.3. Agarosa.

El agar se obtiene de varias especies de plantas marinas y - consiste de dos grupos de polisacáridos agarpectina y agarosa. - Estos polisacáridos pueden separarse por diferentes métodos. La - agarosa es un polisacárido lineal que alterna residuos de  $\beta$ -D-ga- lactopiranosos unidos 1,3 y 3,6-anhidro- $\alpha$ -L-galactopiranosos unidos 1,4 (2). A diferencia de las dextranas la matriz de la agarosa se cree se mantiene unida por enlaces de hidrógeno y no enlaces covalentes.

La falta de entrecruzamientos covalentes hace a la agarosa - relativamente lábil frente a ciertas condiciones como son altas - concentraciones de sal, urea, ácidos o bases fuertes. A pesar de estas limitaciones de estabilidad la agarosa presenta muchas de - las propiedades de la matriz ideal. Su estructura suelta permite el paso libre de macromoléculas y junto con la ausencia casi com-

pleta de grupos cargados reduce mucho la posibilidad de adsorción y desnaturalización de moléculas bioquímicas delicadas.

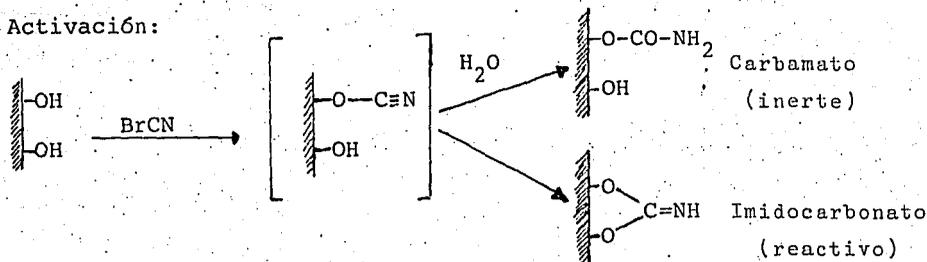
Comercialmente existe un polímero de agarosa entrecruzada llamado Sepharosa que presenta las mismas propiedades cromatográficas de la agarosa, pero con una mayor resistencia térmica y química.

### 3.5. 3. Activación del gel.

Los soportes hidrofílicos de polisacáridos han sido usados ampliamente como geles cromatográficos para la resolución y purificación de compuestos biológicos delicados. Es importante que el proceso de activación de la matriz sea lo suficientemente suave para no dañar su estructura. En términos químicos las matrices son activadas introduciendo grupos electrofílicos en el gel para hacerlos más reactivos frente a grupos nucleofílicos presentes en la molécula del ligando.

El método más general y mayormente usado es la activación con haluros de cianógeno, seguido del acoplamiento de aminas primarias o aromáticas al gel activado. La activación de polisacáridos con bromuro de cianógeno (BrCN) a pH alcalino se introdujo en 1967 por Axén et.al. (3). El proceso químico exacto no se conoce bien, pero el probable curso de intermediarios hasta dar el imido carbonato reactivo se ve en la Figura 23.

Activación:



Acoplamiento:

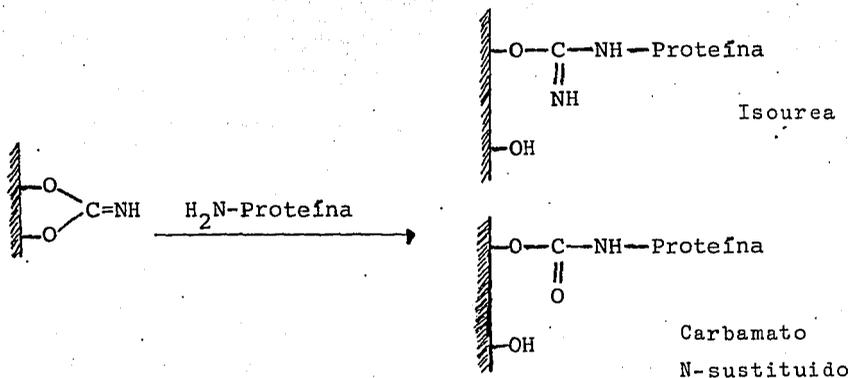


Fig. 23 Activación química de polisacáridos con bromuro de cianógeno (BrCN) y acoplamiento de proteínas al polisacárido ya activado.

### 3.5.4. Acoplamiento de la protefina.

La reacción de acoplamiento se lleva a cabo en medio acuoso a un pH de 8.5 a 9.5 (22) poniendo el gel en presencia de la protefina ( $pK_a \alpha-NH_2 \approx 8$ ). La reacción se deja continuar a 4° C por unas 12 horas, aunque se ha visto que la reacción casi está completa en 2 - 3 horas. La cantidad de ligando unida por gramo de gel activado es una función de la cantidad añadida en el paso del acoplamiento. A pesar del tiempo largo de este paso no todos los grupos reactivos del gel se unen a la protefina, por eso es recomendable incubar un poco mas de tiempo (unas 4 horas) en presencia de un exceso de una amina pequeña como: D-glucosamina, etanolamina o glicina (66).

Como regla general los geles con un ligando unido pueden ser reusados muchas veces sin apreciable pérdida de su capacidad de unión. Sin embargo, se ha detectado que existe un desprendimiento constante del ligando del gel activado con BrCN al paso del tiempo, lo cual hace que poco a poco el gel pierda su capacidad de unión (94).

### 3.5.5. Condiciones de uso de una columna de cromatografía de afinidad.

#### a) Columna.

La columna se prepara generalmente con muy poco gel 0.5 a 1 ml., para evitar los efectos de interacción inespecifica entre el gel y la muestra.

b) La solución amortiguadora.

Para correr la cromatografía se usa una solución amortiguadora que tenga el pH óptimo, fuerza iónica, temperatura y composición química (iones, otros factores, etc.) necesarios para lograr una interacción fuerte entre la proteína unida al gel y el ligando solubilizado en la muestra que se pasa por la columna.

c) Volumen de muestra, flujo y tiempo de equilibrio.

Generalmente el volumen de la muestra aplicada a una columna no es importante si la sustancia de interés tiene una alta afinidad por el ligando inmovilizado. Las sustancias que se unen débilmente deben ser aplicadas en un volumen pequeño para evitar su coelución con las otras sustancias no reactivas en el volumen vacío.

El equilibrio de adsorción entre el ligando inmovilizado y la sustancia que se va a purificar generalmente se alcanza lentamente. La muestra debe por lo tanto ser aplicada a la columna al menor flujo posible desde un punto de vista práctico. A veces es mejor usar condiciones de bache (suspensión) para permitir mayor tiempo de interacción entre el gel y la muestra. Se ha observado que es mejor un período de incubación más largo antes de la elución de la columna en todos los casos que el simple paso de la muestra por la columna aún al menor flujo posible. Esto es, tanto la eficiencia de la columna como la fuerza de la interacción aumentan con el tiempo (67).

d) Temperatura.

Se ha observado que el grado adsorción a un gel de afinidad disminuye al aumentar la temperatura. Es por lo tanto conveniente para poder tener purificaciones reproducibles por cromatografía de afinidad trabajar siempre a la misma baja temperatura. Se ha escogido 4° C por ser la temperatura mas usada en un cuarto frío normal. El cambio de temperaturas puede ayudar a favorecer la unión o la disociación de las moléculas que interactúan para lograr una elución selectiva. Por ejemplo: unir una proteína al gel a 4° y después a temperatura ambiente lograr su elución en condiciones muy suaves.

3.5.6. Capacidad de un gel.

La capacidad de un gel usado en cromatografía de afinidad es la cantidad máxima de sustancia que se puede unir selectivamente en un volumen dado de gel, bajo las condiciones óptimas de cromatografía. La forma mas usada para medir la capacidad es poner una cantidad grande del ligando ( $C_0$ ) en contacto con el gel, dejar incubar y medir la cantidad del ligando no unido ( $C$ ). La diferencia es la cantidad unida al gel, que dividida entre la cantidad de gel ( $m$ ) nos da la capacidad ( $q$ ).

$$q = \frac{(C_0 - C)}{m}$$

### 3.5.7. Elución de las sustancias unidas específicamente.

Después de que la muestra ha pasado por la columna, ésta se lava varias veces con la solución de equilibrio para quitar todas las sustancias que no se unen al gel. Posteriormente se debe eluir la sustancia adsorbida haciendo que se separe de su ligando específico. Esto se logra cambiando la composición, el pH, la fuerza iónica o la temperatura de la solución amortiguadora usada en la columna.

En el caso particular de los complejos antígeno-anticuerpo - una disminución de pH de 7.5 a 3 es comunmente suficiente para disociar la unión sin dañar a ninguna de las dos moléculas. Una solución amortiguadora de glicina - HCl (pH = 2.5) es muy usada, lo mismo que el ácido acético 0.1 M.

Otros sistemas requieren métodos mas drásticos de elución, - por ejemplo, la avidina de la clara de huevo se separa de agarosa-biotina con una combinación de clorhidrato de guanidinio 6 M y pH = 1.5 . En tales casos es muy importante regresar a la columna a un estado donde la protefna tome su estado nativo lo mas pronto posible para evitar un daño irreversible a las propiedades de la columna.

La elución cambiando la fuerza iónica se logra generalmente añadiendo NaCl 0.5 M ó 1 M a la solución amortiguadora inicial. - Este método es simple pero se prefiere evitar pues después hay -- que eliminar la sal de la muestra eluida y a veces esto no es fácil. Existen sales volátiles como el  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  que se pueden eliminar con cierta facilidad pero en general son muy caras y por esto se limita su uso.

#### 4. METODOLOGIA.

##### 4.1. Desarrollo de un radioinmunoanálisis para insulina.

##### 4.1.1. Obtención de anticuerpos.

Para encontrar un anticuerpo adecuado para la realización de un radioinmunoanálisis de insulina, se ensayaron 3 sueros comerciales contra insulina porcina y posteriormente un suero obtenido en el laboratorio (denominado SS).

Los sueros comerciales son:

- i) Suero anti-insulina porcina (SA) obtenido en cuyo de Resarch Laboratories.
- ii) Suero anti-insulina porcina (SB) obtenido en cabra de Resarch Laboratories.
- iii) Suero anti-insulina porcina (SC) obtenido en cuyo de Calbiochem.

##### a) Obtención del anticuerpo.

Se usó un esquema de inmunización empleado en el Centro Médico Nacional (IMSS), modificado ligeramente (81) (106). -- Cinco cuyos se inyectaron cada vez con 150 µg de insulina porcina cristalina (Sigma) en 250 µl de ácido acético 0.1 N mezclada con 250 µl de adyuvante de Freund completo para la primera inoculación e incompleto para las siguientes. Las inyecciones se hicieron intradérmicas repartiendo el volumen en varios lugares sobre el lomo del animal. Ocho días después de cada inyección, a partir de la tercera, se sangraron los animales para --

tener 1 ml de suero y probar en éste la presencia de anticuer--por. Para evitar un choque hipoglucémico en los animales inmunizados, se adicionó sacarosa al 5% en el agua de bebida.

#### 4.1.2. Preparación de insulina porcina-yodo-125.

##### a) Método de cloramina T.

La insulina porcina se marcó con el radioisótopo  $^{125}\text{I}$ , -- usando el método de cloramina T (40). Se inició probando marcar la insulina (5  $\mu\text{g}$ ) con 1 mCi de yodo-125 a un pH = 5. Se probaron diferentes tiempos de reacción: 15, 20, 30 segundos. Para detener la reacción se usó siempre metabisulfito de sodio en -- exceso. La separación de la hormona marcada, del yodo-125 no incorporado a la proteína y los otros productos de reacción se llevó a cabo por cromatografía de exclusión molecular a través de -- Sephadex G-25, o Sephadex G-10.

Debido a los resultados obtenidos (ver sección 5.1.2) se modificó ligeramente la técnica sugerida por Cuatrecasas (21). Se mezclan insulina porcina 5  $\mu\text{g}$  en 50  $\mu\text{l}$  de solución amortiguadora de fosfatos 0.25 M pH = 7.5 con 1 mCi de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  disuelto en -- 10  $\mu\text{l}$  de NaOH 0.1 N. Se añaden 20  $\mu\text{l}$  de cloramina T (100  $\mu\text{g}$ ) y se agita por 20 segundos al final de los cuales se añaden 20  $\mu\text{l}$  de metabisulfito de sodio (200  $\mu\text{g}$ ). La mezcla de reacción se -- aplica a una columna de Sephadex G-10 (aprox. 12 ml), previamente equilibrada con la solución de elución (fosfatos 0.05 M a -- pH = 7.5 con albúmina sérica bovina (BSA) grado RIA 0.2%).

La mezcla se eluye de la columna en fracciones de 0.4 ml.

El patrón de elución típico se muestra en la Fig. 25 (Resultados). Todas las manipulaciones se llevan a cabo dentro de una campana de extracción.

Inmediatamente después de la elución se prueba la inmunorreactividad de las fracciones correspondientes a los picos de radioactividad. Para esto, se preparan: 3 tubos con radioactividad total, 3 tubos de unión no específica (UNE) y 3 tubos que representan el porcentaje de unión del antígeno con el anticuerpo denominados Uo. Los totales llevan 50  $\mu$ l de insulina-<sup>125</sup>I a razón de 25 000 cpm - por tubo; los UNE llevan 150  $\mu$ l de la solución amortiguadora del ensayo (fosfatos 0.05 M pH = 7.5, NaCl 0.15 M y BSA 0.2%) con la misma cantidad de insulina-<sup>125</sup>I que los totales; y por último, los Uo llevan 50  $\mu$ l de la solución amortiguadora, 50  $\mu$ l de insulina-yodo-125 y 100  $\mu$ l de anticuerpo (suero SB) contra insulina a una dilución final de 1/5 000.

Se preparan 9 tubos para cada fracción de la columna. Todos los tubos se agitan en Vórtex y se incuban a 4° C durante 24 horas. Al final de este tiempo se añade 1 ml de etanol absoluto frío a cada tubo, se agitan en Vórtex y se centrifugan por 30 minutos a 3 000 rpm en una centrífuga Beckman J6 B, para sedimentar las proteínas precipitadas. En seguida se aspira el sobrenadante y se mide la radioactividad del precipitado en un contador gamma. Las fracciones se separan en alícuotas y se guardan en congelación a 4° C.

b) Método de Bolton - Hunter.

Se marcó insulina usando el reactivo de Bolton - Hunter -- (Amersham International Limited) (8) (17).

El reactivo disuelto en benceno (1 mCi/ml) se coloca en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se evapora el disolvente con una corriente suave de nitrógeno, dentro de una campana de extracción. Ya seco se guarda a 4° C hasta su uso.

Para marcar la proteína se añade al tubo con el reactivo la insulina 5 µg disuelta en 10 µl de solución amortiguadora de boratos 0.1 M pH = 8.5. El tubo se agita durante 15 minutos en hielo y después se añaden 0.5 ml de glicina 0.2 M en la misma solución amortiguadora y se deja 5 minutos mas en hielo. La mezcla de reacción se aplica a una columna de Sephadex G-25 equilibrada con solución de fosfatos 0.05 M pH = 7.5, BSA 0.2%. Se eluye colectando fracciones de 0.4 ml (ver sección 5.1.2. b). Posteriormente se mide la inmunorreactividad en forma similar a la yodación con cloramina T.

c) Método de lactoperoxidasa.

Se intentó marcar insulina usando el método de lactoperoxidasa (33) (76).

La insulina porcina, 5 µg se disuelve en 5 µl de solución salina isotónica. 5 µg de lactoperoxidasa se disuelven en 100 µl de solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH = 7.5. Se mezclan la enzima y la insulina junto con 1 mCi de yodo-125 en un tubo eppendorf pequeño. Se añade a la mezcla 100 µl de una diso-

lución de  $H_2O_2$  (1.2  $\mu g$ ), preparada poniendo 1  $\mu l$  de  $H_2O_2$  al 30% en 25 ml de  $H_2O$ . Se agita la mezcla por 5 minutos en Vórtex y después durante 25 minutos en un agitador rotatorio. Transcurrido este tiempo se añaden 2 ml de cisteína 2 mM y se agita vigorosamente 5 minutos mas.

La mezcla de reacción se aplica a una columna de Sephadex-G-25 equilibrada con solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, pH = 7.5 con BSA 0.2%.

Se probó también marcar insulina, aumentando la concentración de  $H_2O_2$  hasta 500  $\mu g$  y la concentración de lactoperoxidasa hasta 30  $\mu g$ . Las demás condiciones permanecieron constantes -- (ver sección 5.1.2. c).

#### d) Método de Iodogen.

El reactivo se disuelve en cloroformo en concentración de 20  $\mu g/ml$ . Se adiciona el volúmen necesario de esta disolución a tubos de vidrio de 13 x 100 mm, para tener 1 nmol ó 2 nmol de Iodogen por tubo. El disolvente se evapora con una corriente de nitrógeno y los tubos secos recubiertos con el reactivo se guardan al abrigo de la luz en un desecador a  $-18^\circ C$  (9).

Para marcar la insulina se disuelven 7  $\mu g$  de protefina en -- 100  $\mu l$  de solución amortiguadora de fosfatos 0.5 M pH = 7.5. Se adicionan 2 mCi de  $Na^{125}I$  disueltos en 20  $\mu l$  de NaOH 0.1 N y todo junto se transfiere a un tubo con 1 nmol de Iodogen. La mezcla se deja reaccionar por tres minutos, al final de los cuales se retira la mezcla del tubo y se aplica a una columna de Sephadex G-10, equilibrada con solución amortiguadora de fosfatos --

0.05 M pH = 7.5 con BSA grado RIA 0.2% (Fig. 26, Resultados). Se prueba la inmunorreactividad de los picos radioactivos igual que en la yodación con el método de cloramina T.

#### 4.1.3. Curvas de titulación.

##### a) Sueros hiperinmunes anti-insulina porcina.

Las curvas de titulación se hacen con el fin de determinar - la dilución adecuada del suero para la realización del radioinmunoanálisis. El sistema de ensayo utilizado consiste de 50  $\mu$ l de insulina-<sup>125</sup>I, 50  $\mu$ l de solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH = 7.5, NaCl 0.15 M con BSA 0.2% y de 100  $\mu$ l del suero en diluciones crecientes de 1/50 hasta 1/16 000, en los tubos Uo; además se preparan los tubos totales y los tubos UNE como se describió antes. Todas las diluciones se preparan por triplicado. Los tubos se incuban a 4° C durante 24 y 48 horas. Las fracciones de radioactividad (insulina-I-125) unida a los anticuerpos del suero y libre se separan por precipitación con etanol y con Pansorbin. Se centrifugan los tubos a 1 800 g durante 30 minutos y el sobrenadante se elimina por aspiración (Figs. 27, 28, 29, Resultados).

##### b) Segundo anticuerpo.

El segundo anticuerpo es un suero anti-globulinas de cuyo obtenido en cabra (Research Laboratories). Se titula incubando insulina-<sup>125</sup>I con suero SA en dilución 1/400, e insulina frfa: 100 y 500 pg por tubo, durante 24 horas. Se precipita la fracción -- unida con diferentes diluciones del segundo anticuerpo (100  $\mu$ l), incubando éste junto con suero normal de cuyo (100  $\mu$ l) por 24 ho-

ras mas. Centrifugando se separa el precipitado (fracción unida) del sobrenadante (fracción libre) (Fig. 30, Resultados).

#### 4.1.4. Curvas estándares.

Se realizaron curvas estándares a la dilución óptima encontrada (30% U/T), para determinar la sensibilidad de cada uno. Tomamos la sensibilidad de acuerdo con Ekins (27) como la menor -- cantidad detectable (10% de diferencia de  $U_0$ ).

Se incubaron 50  $\mu$ l de insulina-<sup>125</sup>I con 100  $\mu$ l del suero al título predeterminado y con 50  $\mu$ l de insulina fría en concentraciones desde 10 hasta 5 000 pg por tubo. Se prepararon también tubos totales y UNE, todos por triplicado. La separación de las fracciones libre y unida de la radioactividad se hace con etanol frío al 80% final; Pansorbin; y en el caso de los sueros obtenidos en cuyos, se usa una precipitación con un segundo anticuerpo (ver sección 5.1.4.).

#### 4.1.5. Especificidad de los anticuerpos.

Debido a las muestras que se analizarán por medio del radioinmunoanálisis para determinar insulina, provendrán principalmente de la reasociación de las cadenas A y B de insulina (25) (61) en forma de sales de Bunte (4) (19) (60). (ver sección 3.1.1.), -- se hacen pruebas para estudiar el comportamiento de los anticuerpos de los sueros SA y SS frente a las cadenas solas. Se prepararon curvas estándares de insulina cambiando la insulina porcina por insulina bovina, cadena A-SSO<sub>3</sub> porcina, cadena B-SSO<sub>3</sub> --

porcina. En el caso de las cadenas se usaron concentraciones - desde 10  $\mu\text{g}$  hasta 100  $\mu\text{g}$  por tubo (ver sección 5.1.6.).

#### 4.1.6. Protocolo final del radioinmunoanálisis.

El protocolo final del ensayo para insulina es:

- i) Solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH = 7.5, NaCl - 0.15 M con albúmina sérica bovina, grado RIA 0.2%.
- ii) 100  $\mu\text{l}$  de suero anti-insulina porcina obtenido en cuyo de - Resarch Laboratories (suero SA), diluido 1/200.  
50  $\mu\text{l}$  de insulina porcina-I-125 para dar 25 000 cpm.  
50  $\mu\text{l}$  de muestra.
- iii) Tiempo de incubación: 24 horas.
- iv) a) Precipitación con 100  $\mu\text{l}$  de Pansorbin diluido 3/10 con - solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH = 7.5.  
Agitar en vórtex 5 segundos y centrifugar 30 minutos a - 1 800 g a 4° C.  
Aspirar el sobrenadante.  
Contar el precipitado.
- b) Poner 100  $\mu\text{l}$  de suero normal de cuyo diluido 1/80 y 100  $\mu\text{l}$  de suero anti-globulinas de cuyo (segundo anticuerpo) di-  
luido 1/20.  
Incubar 24 horas.  
Centrifugar 30 minutos a 1 800 g a 4° C.  
Aspirar el sobrenadante.  
Contar el precipitado.

#### 4.1.7. Interferencias y reproducibilidad del ensayo.

Para ver la reproducibilidad del radioinmunoanálisis se probaron posibles fuentes de interferencia. Se realizaron curvas estándares de insulina usando insulina porcina fría. Se cambió la solución amortiguadora de fosfatos por el amortiguador usado en la reacción de reasociación de cadenas de insulina: glicina - 0.05 M pH = 10.5 (61). También se probó el efecto de las diferentes insulinas marcadas con I-125 por diferentes métodos y el efecto de insulina-<sup>125</sup>I almacenada por diferentes tiempos sobre la forma de las curvas estándares (Figs. 39, 40, Resultados).

Los resultados de los diferentes radioinmunoanálisis fueron calculados con la ayuda de un programa de computación diseñado para que los datos del ensayo fueran transformados a la forma -- logit  $\left[ \ln \frac{U/U_0}{1 - U/U_0} \right]$  en función del logaritmo de la concentración de insulina fría y que la línea de regresión fuera calculada para la línea recta resultante. (Apéndice A).

Se probó el efecto que se obtiene al cambiar el volumen final de la reacción conservando la dilución final del suero y las cantidades de insulina fría e insulina-I-125 (ver sección 5.1.7.).

## 4.2. Radioinmunoanálisis para TRH.

### 4.2.1. Preparación del anticuerpo contra TRH.

Se prepararon anticuerpos contra TRH siguiendo la técnica - descrita por Bassiri y Utiger (6). Se obtuvo un conjugado de TRH con albúmina sérica bovina. La inmunización con el conjugado permite al TRH actuar como hapteno (80) y generar una respuesta inmunológica.

#### a) Preparación del conjugado.

El reactivo acoplante bencidina bis-diazoada (BDB) se preparó de la siguiente forma: se disuelve clorhidrato de bencidina -- (0.23 g) en 45 ml de ácido clorhídrico 0.2 N y se agregan 5 ml de nitrito de sodio (175 mg disueltos en agua destilada). Se forma un producto de color amarillo naranja que se mantiene durante sesenta minutos a 4° C con agitación constante. Se preparan alícuotas de 1 ml de la sal de diazonio y se guardan a -18° C (57).

Para la unión de TRH con BSA se mezcla 1 ml de BDB con 1 ml de solución amortiguadora de boratos 0.16 M, NaCl 0.15 M, pH = 9. A la mezcla anterior se añaden 50 mg de albúmina y 5 mg de TRH - disueltos en 10 ml de la misma solución amortiguadora. La solución toma entonces un color pardo-rojizo. Se agita la solución por 2 horas a 4° C. Se dializa posteriormente la mezcla a 4° C durante 7 días contra agua destilada, cambiándola diariamente, y por último se dializa un día contra cloruro de sodio 0.15 M. Se guarda en alícuotas de 1 ml a -18° C.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

b) Esquema de inmunización.

Se inyectaron conejos blancos Nueva Zelanda, con el conjugado de TRH y albúmina mezclado con adyuvante completo de Freund - (1:1 v/v) en la primera inoculación y mezclando con adyuvante in completo de Freund (1:1 v/v) en las siguientes inoculaciones. Se inyectó a cada conejo 1 ml de la mezcla (250 µg TRH) en diferentes sitios intradermicamente, rasurando y desinfectando la zona previamente con alcohol, alternando el dorso y la parte ventral.

Se pusieron un total de 15 inoculaciones, una cada 3 semanas. 10 días después de cada inoculación, a partir, de la quinta los conejos se sangraron por la vena central de la oreja obteniendo 1 ml de sangre, con el fin de determinar la cantidad de anticuerpos contra TRH presentes en el suero (ver sección 5.2.1.). La sangre se coaguló a temperatura ambiente y se contrajo el coágulo por 12 horas a 4° C; se centrifugó durante 15 minutos a 1 800 g para separar el suero, que se guardó en alícuotas de 50 µl a -18° C.

Los radioinmunoanálisis de TRH que se muestran (sección 5.2.4.) fueron hechos con anticuerpos preparados en la forma descrita y obtenidos en el suero proveniente del último sangrado de los animales, aplicando anestesia y extrayendo la sangre por la vena cava inferior (58).

4.2.2. Yodación de TRH.

El TRH fue yodado con I-125, usando el método de cloramina T (40), utilizando las cantidades sugeridas por Bassiri y Utiger (6).

Se usaron 5  $\mu\text{g}$  de TRH disueltos en 50  $\mu\text{l}$  de solución amortiguadora de fosfatos 0.5 M pH = 7.5. Se añade 0.5 mCi de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  disuelto en 5  $\mu\text{l}$  de NaOH 0.1 N. A la mezcla se le agregan 30  $\mu\text{g}$  de cloramina T (30  $\mu\text{l}$ ) y se agita durante 30 segundos, después de los cuales se añaden 50  $\mu\text{g}$  de metabisulfito de sodio (100  $\mu\text{l}$ ). La mezcla se aplica a una columna de Sephadex G-10 previamente equilibrada con solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH = 7.5 con BSA 0.2%. Se eluye la columna con la misma solución a un flujo de 4 ml/hora y se colectan fracciones de 0.4 ml (Fig. 42, Resultados).

Posteriormente se prueba la inmunorreactividad de las fracciones correspondientes a los picos de radioactividad con un anticuerpo previamente caracterizado (58); para lo cual se preparan: tres tubos para cuentas totales, tres tubos para unión no específica y tres tubos de máxima unión. Los totales llevan 50  $\mu\text{l}$  de TRH -I-125 aproximadamente 20 000 cpm por tubo; los tubos UNE llevan también 50  $\mu\text{l}$  de TRH- $^{125}\text{I}$  con 200  $\mu\text{l}$  de solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH = 7.5, NaCl 0.15 M, BSA 0.2%; finalmente los tubos Uo llevan 50  $\mu\text{l}$  del TRH marcado, 150  $\mu\text{l}$  de la misma solución amortiguadora y 50  $\mu\text{l}$  del suero contra TRH a una dilución final de 1/25 000. Todos los tubos se agitan en vórtex y se incuban a 4° C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se centrifugan los tubos 30 minutos a 1 800 g a 4° C, después de haberles añadido 1 ml de etanol absoluto frío, para precipitar las proteínas. Entre las proteínas precipitadas está el complejo antígeno-anticuerpo formado. Se extrae el sobrenadante por aspiración y se cuenta la radioactividad en el precipitado en un contador gamma.

#### 4.2.3. Curvas de titulación.

Para encontrar la dilución adecuada del suero que se usará en el radioinmunoensayo, se hacen curvas de dilución, de la siguiente forma: 50  $\mu$ l de TRH-<sup>125</sup>I y 50  $\mu$ l del suero en diluciones crecientes de 1/50 hasta 1/32 000. Se preparan además tubos totales y UNE como se describió antes. Todos los tubos se incuban a 4° C durante 24 horas y después se separan las fracciones de radioactividad unida y libre por precipitación con alcohol frío y posterior centrifugación 30 minutos a 1 800 g. El sobrenadante se elimina y se cuenta la radioactividad del precipitado (Fig. 41, Resultados).

#### 4.2.4. Curva estándar.

Se preparó una curva estándar de la siguiente forma: tubos totales con 50  $\mu$ l de TRH-<sup>125</sup>I (aproximadamente 20 000 cpm); tubos UNE con 50  $\mu$ l de TRH-<sup>125</sup>I y 200  $\mu$ l de solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH = 7.5, NaCl 0.15 M, BSA 0.2%; tubos Uo con 50  $\mu$ l TRH-<sup>125</sup>I, 150  $\mu$ l de solución amortiguadora y 50  $\mu$ l del suero contra TRH a la dilución adecuada; tubos de la curva con 50  $\mu$ l TRH-<sup>125</sup>I, 100  $\mu$ l de solución amortiguadora, 50  $\mu$ l de suero diluido y 50  $\mu$ l de TRH no radioactivo en concentraciones de 5 a - 2 500 pg por tubo (Fig. 43, Resultados).

#### 4.2.5. Radioinmunoanálisis de TRH.

Para medir muestras de TRH se realiza un radioinmunoanálisis, preparando los tubos igual a la forma descrita en la curva

estándar, pero cambiando los 50  $\mu$ l de TRH estándar no radioactivo por 50  $\mu$ l de la muestra que contiene TRH a concentración desconocida.

Se usó un suero contra TRH preparado en forma similar al -- suero descrito y ya caracterizado (58) a una dilución final de - 1/25 000 (ver sección 5.2.4.).

Se probó el efecto del agente precipitante para separar las fracciones libre y unida del TRH radioactivo, usando etanol frío al 80% final y Pansorbin.

#### 4.3. Preparación de anticuerpos contra las cadenas A y B de insulina porcina (103).

##### 4.3.1. Anticuerpos contra cadena A.

Dado el bajo peso molecular de la cadena A y por tanto su escasa inmunogenicidad se decidió inyectarla a los animales en forma de conjugado para tratar de aumentar su poder inmunogénico. Se utilizó la cadena A sulfonada de insulina porcina (4) (19) para tener la molécula mas parecida a la que se obtendrá de bacterias.

##### 4.3.1.1. Preparación del conjugado.

Se forma un conjugado de cadena A con glutaraldehído, sin usar una proteína acarreadora. El glutaraldehído se polimeriza formando un conjugado de mayor peso molecular.

La preparación del conjugado es como sigue: a 15 mg de cadena A en una solución de fosfatos 0.1 M pH = 6.8 se agregan -- 2 ml de glutaraldehído al 5%. Se deja reaccionar a temperatura ambiente por 2 horas. La mezcla de reacción se dializa contra una solución de fosfatos 0.1 M pH = 7.4 por 24 horas haciendo un cambio a las 12 horas. El rendimiento del conjugado fue determinado usando cadena A-<sup>125</sup>I y midiendo la cantidad de radioactividad unida (ver sección 5.3.1.).

##### 4.3.1.2. Esquema de inmunización.

Se inyectaron 0.5 ml de conjugado mezclado con 0.5 ml de adyuvante de Freund completo a cada uno de 7 cuyos, en la primera

aplicación y una mezcla semejante usando adyuvante incompleto en las siguientes inyecciones. Los suyos se inyectaron cada 4 semanas y se sangraron para obtener el suero 10 días después de cada inyección.

#### 4.3.1.3. Titulación de los sueros.

Los sueros obtenidos de los animales inmunizados se probaron para detectar la presencia de anticuerpos, por medio de una titulación usando cadena A- $^{125}\text{I}$ . Cada suero se incubaba a una serie de diluciones desde 1/500 hasta 1/128 000 con una cantidad constante de cadena A- $^{125}\text{I}$ , durante 24 horas, en una solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH = 7.5 con BSA 0.1%. Transcurrido este tiempo, se precipita el complejo antígeno-anticuerpo formado con etanol frío o con Pansorbin. Se centrifuga a 1 800 g por 30 minutos; se elimina el sobrenadante y se cuenta el precipitado en un contador de radiaciones gamma (ver sección 5.3.1.).

#### 4.3.1.4. Yodación de la cadena A.

La cadena A se marcó con I-125 por diferentes métodos para probar los sueros de los suyos. Se utilizaron métodos que produjeran modificaciones en sitios diferentes de la molécula para no alterar en alguno de los casos el posible sitio antigénico.

##### a) Método de cloramina T.

- Cadena A 5  $\mu\text{g}$  en 5  $\mu\text{l}$  de ácido acético 0.1 M.
- 50  $\mu\text{l}$  de solución amortiguadora de fosfatos 0.5 M pH = 7.5.
- $\text{Na}^{125}\text{I}$  (1 mCi) en 10  $\mu\text{l}$ .
- Cloramina T 10  $\mu\text{l}$  (2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).

- Reacción 15 segundos.
- Metabisulfito de sodio 100  $\mu$ l (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l).
- Los productos de yodación se separan en una columna de Sephadex G-10 eluida con solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M -- pH = 7.5, con BSA 0.2%.

b) Método de Bolton - Hunter.

- El benceno, que disuelve al reactivo (1 mCi de  $^{125}\text{I}$ ), se evapora con nitrógeno.
- Se agregan 5  $\mu$ g de cadena A en 10  $\mu$ l de solución de boratos - 0.1 M pH = 8.5.
- Se agita 15 minutos a 0° C.
- Se agregan 0.5 ml de glicina 0.2 M en una solución de boratos 0.1 M pH = 8.5. Se deja todo 5 minutos a 0° C con agitación.
- Se separan los productos de reacción en una columna de Sephadex G-10 que se eluye con solución de fosfatos 0.05 M pH = 7.5 con 0.2% de gelatina.

#### 4.3.2. Anticuerpos contra cadena B.

La cadena B de insulina porcina se unió con albúmina sérica bovina en forma de dos conjugados diferentes para aumentar su poder inmunogénico.

##### 4.3.2.1. Preparación de los conjugados.

- a) Se formó un conjugado con cadena B, albúmina y bencidina bis-diazoada (BDB). La bencidina diazoada se prepara como se describe en la sección 4.2.1. a.

El conjugado cadena B-BDB-BSA, se prepara como sigue: se mezclan 5 ml de BDB con 5 ml de solución de boratos 0.16 M pH = 9, NaCl 0.15 M y se añade 240 mg de BSA, 30 mg de cadena B y 50 ml de solución boratos agregados lentamente. Todo se hace a 4° C y se deja con agitación a esta temperatura por 2 horas. Se dializa contra agua durante 7 días. El producto dializado se guarda en congelación (ver sección 5.3.2.).

b) Conjugado de cadena B con glutaraldehído. En 4 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH = 6.8 se agregan 20 mg de cadena B y 2 ml de glutaraldehído al 5%. Se agita a temperatura ambiente por 2 horas. Se dializa durante la noche contra una solución de fosfatos 0.1 M pH = 7.4. El conjugado se guarda en congelación.

#### 4.3.2.2. Esquema de inmunización.

Ocho cuyos se inyectaron cada uno con 0.3 g de conjugado -- (en 0.7 ml) mezclado con 0.7 ml de adyuvante de Freund. La primera inyección fue con adyuvante completo y las siguientes con incompleto.

Otro grupo de 7 cuyos se inoculó poniendo a cada animal -- 300 µg de conjugado (en 70 µl) mezclado con 70 µl de adyuvante.

Los cuyos se inyectaron cada 4 semanas y se sangraron para obtener el suero 10 días después de cada inoculación.

#### 4.3.2.3. Titulación de los sueros.

Los sueros de los cuyos inmunizados contra cadena B se pro-

baron para ver si tenían anticuerpos, titulándolos frente la cadena B-<sup>125</sup>I en forma similar a la usada para los sueros de cadena A (sección 4.3.1.3.) (Resultados: sección 5.3.2.).

#### 4.3.2.4. Yodación de la cadena B.

La cadena B se marcó con el método de cloramina T de la siguiente forma:

- Cadena B 5 µg.
- Solución fosfatos 0.25 M pH = 7.5, 50 µl.
- Na<sup>125</sup>I 1 mCi (10 µl).
- Cloramina T 20 µl (5 µg/µl).
- Reacción 30 segundos.
- Metabisulfito de sodio 20 µl (10 µg/µl).
- Los productos se separan en una columna de Sephadex G-10 eluida con solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH = 7.5, -- NaCl 0.15 M con BSA 0.2%.

#### 4.4. Columnas de cromatografía de afinidad.

##### 4.4.1. Columnas para insulina.

Para preparar una columna de cromatografía de afinidad con anticuerpos contra insulina se utilizó como soporte Sepharosa 4B (Pharmacia). Los anticuerpos se unieron a este gel covalentemente usando la técnica propuesta por Cuatrecasas (70). Se utiliza un miligramo de proteína del suero hiperinmune por cada mililitro de gel.

Las proteínas del suero se midieron usando el método de Lowry (68) de la siguiente forma:

- 10  $\mu$ l de muestra aforados a 1 ml con  $H_2O$ .
- 5 ml del reactivo E, reposar 10 minutos.
- 0.5 ml del reactivo de Folin\*, reposar 30 minutos.
- Leer absorbancia a 590 nm.

Los reactivos empleados son:

- A.  $Na_2CO_3$  al 2 % en NaOH 0.1 N.
- B.  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  al 0.5%.
- C. Tartrato de sodio y potasio al 1%.
- D. Solución B + solución C (1:1 v/v).
- E. 1 ml de solución D + 50 ml de solución A; esta solución es estable por 24 horas.

\* Reactivo de Folin, se diluye en agua (1:1 v/v) antes de usar.

Se hizo una curva estándar de proteínas con BSA de 0 a 500  $\mu$ g.

Para medir la eficiencia de la reacción de acoplamiento de los anticuerpos al gel se marcó con yodo-125 un poco de inmunoglobulinas (IgG) de conejo con el siguiente método.

- 10  $\mu\text{g}$  IgG.
- 50  $\mu\text{l}$  de solución de fosfatos 0.5 M pH = 7.5.
- 10  $\mu\text{l}$   $\text{Na}^{125}\text{I}$  (1mCi/ 10  $\mu\text{l}$  NaOH 0.1 N).
- 25  $\mu\text{l}$  cloramina T ( 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  ).
- 30 segundos de reacción.
- 100  $\mu\text{l}$  metabisulfito de sodio (0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ).
- Separar la mezcla de reacción en una columna de sephadex G-25 eluyendo con solución de fosfatos 0.05 M pH = 7.5 con NaCl - 0.15 M y BSA grado RIA 0.2%. (Ver sección 5.4.1.).

#### 4.4.1.1. Activación del gel.

La técnica de acoplamiento de anticuerpos al gel que se sigue es: se colocan 5 ml de gel (sepharosa 4B) en 5 ml de agua -- destilada. Se adicionan entonces 10 ml de carbonato de sodio 2M. La suspensión se pone en un baño de hielo y se agita suavemente durante 10 minutos. Se añade 1 ml de bromuro de cianógeno ( $\text{BrCN}$ ) (2 g/ml de acetonitrilo). Se agita fuertemente durante 2 minutos. Inmediatamente se pasa el gel a un embudo Buchner para filtrarlo con vacío. Se lava sucesivamente con 200 ml de  $\text{NaHCO}_3$  0.1M pH=9.5 200 ml  $\text{H}_2\text{O}$  y 200 ml de  $\text{NaHCO}_3$  0.2M pH=9.5. El gel se recupera - con una espátula y se coloca en un tubo con tapón que contenga - 5 ml de  $\text{NaHCO}_3$  0.2M pH=9.5. Al gel se le adiciona entonces el - suero hiperinmune conteniendo los anticuerpos. Se incuba la mezcla por 20 horas a 4°C con agitación por inversión. Al final de este tiempo se añaden 5 ml de glicina 1M y se agita por 4 horas mas. Se transfiere el gel a un embudo y se filtra con vacío lavan

do con 200 ml de acetato de sodio 0.1M pH=4 con NaCl 0.5M; 200 ml de urea 2M con NaCl 0.5M y por último  $\text{NaHCO}_3$  0.1M pH=10 con NaCl 0.5M. El gel se resuspende finalmente en solución amortiguadora de fosfatos 0.05M pH=7.5 . Se guarda en frío.

#### 4.4.1.2. Condiciones de cromatografía.

Se colocan 0.5 ml del gel con los anticuerpos contra insulina en una columna. Se equilibra el gel con una solución amortiguadora de fosfatos 0.05M pH=7.5 con BSA 0.1%. La muestra que -- contiene insulina se aplica a la columna y se deja pasar lentamente. Se lava la columna con la misma solución de fosfatos, sin albúmina. Para eluir la insulina unida al gel se aplica a la columna ácido acético 0.1M (Fig. 45, Resultados).

Posteriormente para poder tener una unión mayor de la insulina al gel se dejó la muestra en la columna cerrada por tres horas, agitando por inversión a 4°C para favorecer el equilibrio . La columna se lava entonces con solución de fosfatos 0.05M pH=7.5 y la insulina es eluida con ácido acético 0.1M.

#### 4.4.1.3. Capacidad.

Para determinar la capacidad de la columna se aplica insulina no marcada en cantidades crecientes a una pequeña cantidad de gel. Después de lavar y eluir la muestra se mide la insulina en todas las fracciones por radioinmunoanálisis. La cantidad de proteína unida al gel dividida entre el volumen del segundo da la - capacidad de la columna (Fig. 46, Resultados).

#### 4.4.1.4. Propiedades de la columna.

Para poder ver si la columna es capaz de reconocer sólo la insulina inmunológicamente activa se pasa una muestra de insulina-I-125 por la columna teniendo una incubación de tres horas. - Las fracciones se colectan y cuentan en un detector de radiaciones gamma. Cada uno de los picos que se obtienen es concentrado y neutralizado para recromatografiarlo por separado en la misma columna. Al final se mide la inmunorreactividad en todas las fracciones eluidas de la columna, con un suero anti-insulina diferente al usado en la columna (ver sección 5.4.1.2.).

#### 4.4.2. Columnas para TRH.

##### 4.4.2.1. Activación del gel.

Se utilizó como soporte un gel de sepharosa 4B y se unieron a él anticuerpos contra TRH con la técnica de Cuatrecasas (70) según el siguiente procedimiento:

- 5 ml de gel.
- 5 ml de agua.
- 10 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2M.
- Agitar suavemente en baño de hielo por 10 minutos.
- Pasar a un embudo y lavar sucesivamente con:
  - 200 ml de  $\text{NaHCO}_3$  0.1M pH=9.5
  - 200 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ .
  - 200 ml de  $\text{NaHCO}_3$  0.2M pH=9.5.
- Transferir el gel con espátula a un tubo con 5 ml de  $\text{NaHCO}_3$  0.2M pH=9.5 .

- Adicionar el suero en cantidad suficiente para tener 5 mg de proteínas.
- Incubar a 4°C durante 20 horas con agitación por inversión.
- Añadir 5 ml de glicina 1M.
- Incubar a 4°C por 4 horas mas.
- Pasar a un embudo y lavar sucesivamente con:
  - 200 ml de acetato de sodio 0.1M pH=4 con NaCl 0.5M.
  - 200 ml de urea 2M con NaCl 0.5M.
  - 200 ml de NaHCO<sub>3</sub> 0.1M pH=10 con NaCl 0.5M.
- Finalmente el gel se resuspende en solución amortiguadora de fosfatos 0.05M pH=7.5 , (ver sección 5.4.2.2.).

#### 4.4.2.2. Purificación de TRH tritiado.

Para probar el comportamiento de esta columna se utiliza - TRH marcado con tritio (<sup>3</sup>H) o bien TRH marcado con <sup>125</sup>I.

El TRH-<sup>3</sup>H (New England Nuclear), antes de usarlo en las -- pruebas de la columna, se repurifica por medio de una cromatografía en placa delgada usando placas de sílica gel de alta resolución (HPTLC Merck) y como sistema de disolventes: cloroformo, metanol, amoniaco (125:75:25). La posición del TRH se indica usando un estándar de TRH no marcado y revelandolo con el reactivo - de Pauli (92); o bien midiendo la radioactividad de la placa en un lector de placas, (Fig. 48, Resultados).

La fracción con mayor radioactividad se eluye de la sílica con metanol absoluto y se seca con nitrógeno, después se resuspende en solución de fosfatos y se congela. Para contar el TRH-<sup>3</sup>H - se utiliza un contador de centelleo líquido. Se pone la muestra

en un vial de conteo y se completa su volumen a 0.5 ml. con agua. Se añaden entonces 10 ml del líquido de centelleo Bray (65).

#### Reactivo de Pauli.

Se mezclan volúmenes iguales de:

- ácido sulfanílico al 1% en HCl 1.0 N y
- nitrito de sodio al 5% (recién preparado)

Se deja reposar 5 minutos en hielo. La placa se rocía con esta mezcla y se deja secar. Se rocía ahora con carbonato de sodio al 15%. El TRH revela como una mancha de color naranja.

#### Líquido de centelleo Bray.

- Naftaleno	60	g
- PPO	4	g
- POPOP	0.2	g
- Metanol	100	ml
- Etilenglicol	20	ml
- Dioxano c.b.p.	1000	ml

#### 4.4.2.3. Condiciones de cromatografía.

Se determinó el tiempo que debe dejarse la muestra incubándose con el gel para alcanzar condiciones de equilibrio. Para esto se coloca un volumen pequeño de gel en diferentes tubos y se añade una cantidad constante de TRH-<sup>3</sup>H. A diferentes tiempos se centrifugan los tubos y se separa el sobrenadante del gel. Se cuenta la radioactividad en el sobrenadante (Fig. 49, Resultados).

Para correr la cromatografía se incubó la muestra con el gel en la columna por tres horas a 4°C con agitación por inversión. La columna se equilibra previamente con solución amortiguadora de fosfatos 0.05M pH=7.5 con 0.2% de BSA grado RIA. Después

de la incubación la columna se lava con solución de fosfatos sin albúmina y se eluye el TRH unido al gel con ácido acético 0.1M - (54) (75) (Fig. 50, Resultados).

#### 4.4.2.4. Capacidad.

Para medir la capacidad de la columna de TRH se aplica una cantidad constante de TRH marcado con cantidades cada vez mayores de TRH frío. La cantidad de TRH no marcado que desplaza toda la radioactividad dividida entre el volumen de gel empleado indica la capacidad (Fig. 51, Resultados).

#### 4.4.2.5. Propiedades de la columna.

Para estudiar el comportamiento de la columna se pasa una muestra de TRH-<sup>3</sup>H. Todas las fracciones se colectan y se cuenta una alícuota con líquido de centelleo. Cada uno de los picos que se obtienen se concentra y neutraliza para recromatografiarlo -- por separado en la misma columna. Se mide la radioactividad en todas las fracciones y se calcula la distribución de marca en los diferentes picos, (ver sección 5.4.2.4.).

Posteriormente se probó la columna con un extracto de hipotálamo de rata para tratar de ver la capacidad de purificación de TRH por cromatografía de afinidad y comparar este proceso con otro método de purificación mas largo.

Se sacrificaron 25 ratas macho Wistar albinas y se extrajeron los hipotálamos. Se pesó el tejido y se homogenizó con ácido acético al 20% v/v para tener 1 µg de hipotálamo en 10 µl. Se hicieron alícuotas de 500 µl (aproximadamente 1 hipotálamo) y se -

guardaron en congelación.

Las alícuotas del extracto de hipotálamo se someten a un -- proceso tradicional de purificación de TRH, o bien, se pasan por la columna de cromatografía de afinidad. En ambos casos se mide, el TRH obtenido, por RIA, (Fig. 52, Resultados).

a) Purificación de TRH por cromatografía en placa delgada.

El TRH en el homogenado de hipotálamo se purifica de la siguiente manera:

- Centrifugar el homogenado en tubos eppendorf en una centrifuga Sorvall con el rotor SS34 a 15 000 rpm durante 15 minutos.
- Recuperar el sobrenadante.
- Extraer con tres volúmenes de éter saturado con ácido acético al 20%.
- Secar el ácido en un evaporador a vacío (Savant).
- Resuspender en metanol al 90% y dejar toda la noche a -20°C.
- Centrifugar a 15 000 rpm en centrifuga Sorvall y rotor SS34.
- Recuperar el sobrenadante.
- Secar en Savant.
- Resuspender en 1/10 del volumen anterior con metanol absoluto. Agitar y secar otra vez.
- Resuspender en solución amortiguadora de fosfatos 0.05M pH=7.5
- Aplicar a una placa de cromatografía en capa delgada (HPTLC) y desarrollar con la mezcla de disolventes siguiente: cloroformo, metanol, amoníaco (125:75:25).
- Raspar la placa en la zona donde aparece el TRH y eluir con me tanol al 90%.

- Secar en Savant.
- Resuspender, por último, en solución amortiguadora de fosfatos 0.05M pH=7.5 , (Tabla 3, Resultados).

b) Purificación de TRH por columna de cromatografía de afinidad.

El homogenado de hipotálamo de rata se trata de la siguiente manera:

- Centrifugar a 15 000 rpm en centrífuga Sorvall con rotor SS34.
- Recuperar el sobrenadante.
- Secar en Savant.
- Resuspender en solución amortiguadora de fosfatos pH=7.5.
- Pasar por la columna con anticuerpos anti - TRH. Lavar con solución de fosfatos sin albúmina. Eluir con ácido acético 0.1M.
- Las fracciones de ácido acético se secan en Savant y se resuspenden en solución amortiguadora de fosfatos 0.05M pH=7.5.

(Tabla 3, Resultados).

## 5. RESULTADOS.

### 5.1. Radioinmunoanálisis de insulina.

#### 5.1.1. Obtención de anticuerpos contra insulina.

Solamente uno de los cuyos inmunizados generó anticuerpos - contra insulina. El suero obtenido se denominó SS, mostró un título de 1/8 000 y fue caracterizado completamente (ver mas adelante).

#### 5.1.2. Obtención de insulina porcina - $^{125}\text{I}$ .

##### a) Método de cloramina T.

Se probó marcar con 0.5, 1 y 2 mCi de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  a pH=5 encontrando que se incorpora mejor la radioactividad a la proteína - con 1 mCi. Si se aumenta a 2 mCi se desperdicia mucha radioactividad ya que no se une a la insulina, a menos que se aumente también la cantidad de proteína.

El patrón de elución de la columna para separar la hormona marcada del  $^{125}\text{I}$  libre con sephadex G-25 se muestra en la Figura 24. En estas condiciones se obtenía una insulina-I-125 que había incorporado alrededor del 40% de la radioactividad usada en la reacción. La inmunorreactividad estaba entre 40 y 50% según la preparación.

Con el fin de aumentar la incorporación de radioactividad a la insulina se intentó hacer la reacción a pH=7.5, siendo éste el óptimo para la yodación de los residuos de tirosina (48). La

incorporación de radioactividad llegó hasta valores de 80 y 90%, según el tiempo empleado.

Se marcó con 0.5, 5, 10, 50, 100 y 200  $\mu\text{g}$  de cloramina T en 30 segundos. Se observa una incorporación cada vez mayor de la radioactividad a la insulina. Sin embargo, pese a que con 50  $\mu\text{g}$  se marca poco y en cambio con 200  $\mu\text{g}$  se observa una alta incorporación la proteína marcada resultante ya no es inmunológicamente reactiva (Tabla 1).

Se probó marcar con 100  $\mu\text{g}$  de cloramina T a diferentes tiempos: 10, 15, 20 y 30 segundos. La radioactividad incorporada a la proteína es ligeramente mayor a 20 y 30 segundos, no habiendo prácticamente diferencia entre estos tiempos (Tabla 1). Sin embargo, la inmunorreactividad es mayor a 20 segundos.

Con estas condiciones se siguió trabajando posteriormente para marcar la insulina con yodo-125. El patrón típico de elución de una yodación con el método final (sección 4.1.2. a) se muestra en la Figura 25.

La actividad específica de la insulina marcada calculada a partir de la radioactividad precipitada con ácido tricloroacético al 20% está entre 70 y 90  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ .

#### b) Método de Bolton - Hunter.

La incorporación de la radioactividad a la insulina fue de un 40%, pero no se logró una buena separación entre la insulina marcada y el reactivo no incorporado a la proteína. La inmunorreactividad de las fracciones radioactivas fue del orden de 10%.

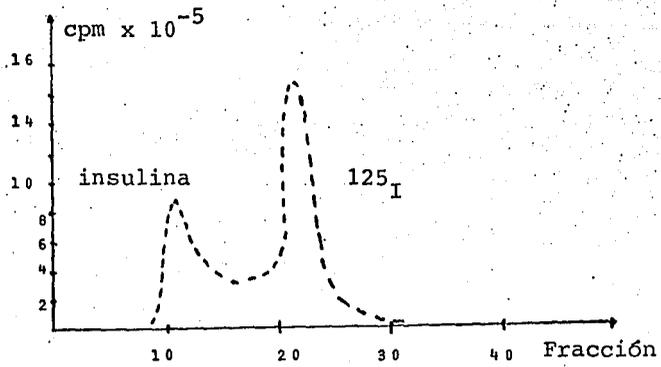


Fig. 24 Patrón de elución de la mezcla de yodación de insulina porcina en una columna de sephadex G-25.

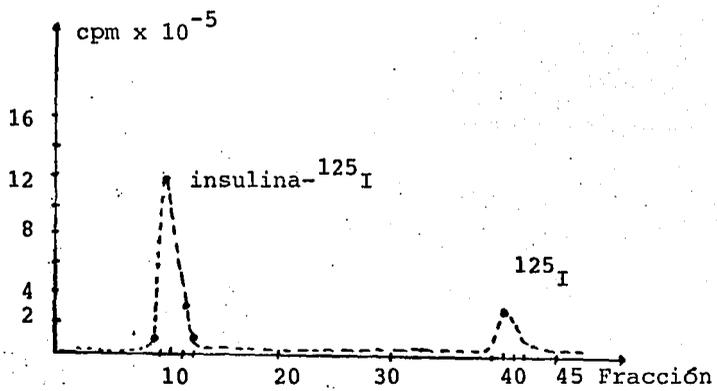


Fig. 25 Perfil cromatográfico de la mezcla de yodación de insulina porcina en una columna de sephadex G-10. Método de cloramina T.

Insulina ( $\mu\text{g}$ )	$^{125}\text{I}$ (mCi)	Cloramina T ( $\mu\text{g}$ )	Tiempo ( s )	Incorpo- ración de iodo-125 ( % )	Inmuno- reacti- vidad
5	1	0.5	30	---	---
5	1	5	30	---	---
5	1	10	30	---	---
5	1	50	30	16	+
5	1	100	30	85	---
5	1	200	30	90	---
5	1	100	10	36	+
5	1	100	15	75	+ +
5	1	100	20	80	+ +
5	1	100	30	85	---

Tabla 1. Marcado de insulina porcina con yodo-125 usando cloramina T a pH=7.5

c) Método de lactoperoxidasa.

Se intentó marcar insulina porcina por el método de lactoperoxidasa, varias veces, pero en ninguno de los casos se logró incorporación de la radioactividad a la proteína. Se aumentaron -- las concentraciones de enzima y del oxidante ( $H_2O_2$ ) hasta 30  $\mu g$  y 500  $\mu g$  respectivamente; tampoco se logró marcar a la insulina.

d) Método de Iodogen.

Se marcó insulina porcina usando el reactivo Iodogen. La proteína incorporó de 30 a 40 % de la radioactividad inicial aplicada. La prueba de inmunorreactividad mostró que las fracciones de la columna de sephadex G-10 correspondientes a los picos radioactivos eran insulina inmunologicamente activa y  $^{125}I$  libre en este orden de elución (Fig. 26).

La insulina-yodo-125 posee una inmunorreactividad de 60% y un valor de UNE del 6% precipitando con etanol. La actividad específica calculada por la cantidad de radioactividad precipitada con ácido tricloroacético al 20% es de 70  $\mu Ci / \mu g$ .

5.1.3. Curvas de titulación.

a) Sueros anti - insulina porcina.

Se obtuvieron las curvas de titulación para los sueros anti insulina porcina: SA, SB y posteriormente (cuando se produjo) SS. El suero SC no se tituló y se uso directamente a la dilución recomendada por el fabricante (1/400). Se hicieron incubaciones 24 y 48 horas y se separaron las fracciones de radioactividad unida y libre por precipitación con etanol y Pansorbin, para cada caso (Figs. 27, 28, 29 ).

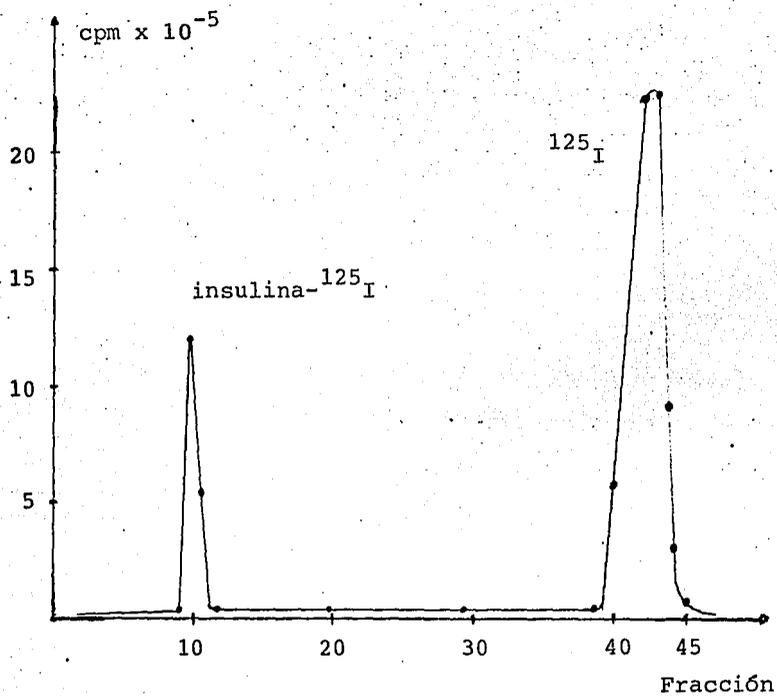


Fig. 26 Patrón de elución cromatográfico de yodación de insulina porcina con el método de Iodogen. Columna de sephadex G-10. Se cuentan 5  $\mu$ l de cada fracción (0.4 ml).

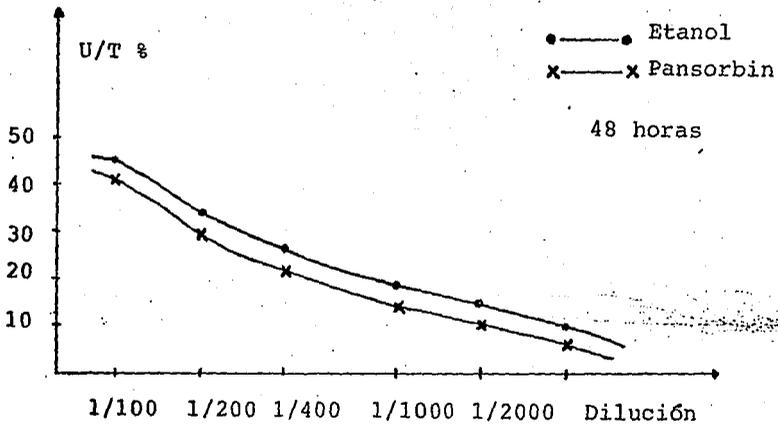
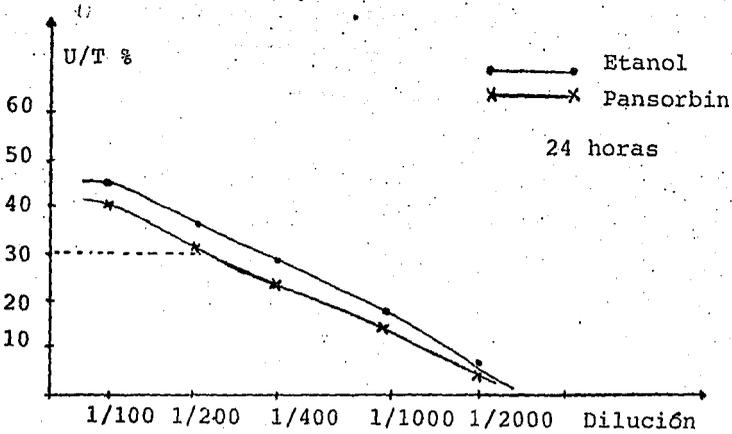


Fig. 27 Titulación del suero anti - insulina porcina obtenido en cuyo ( SA ), Research Laboratories.

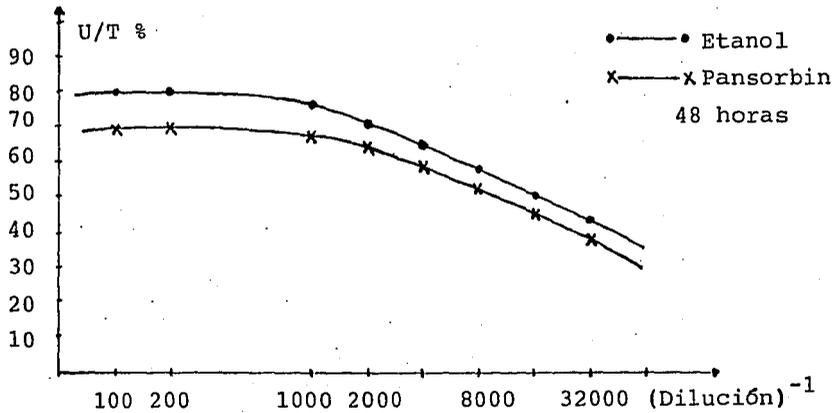
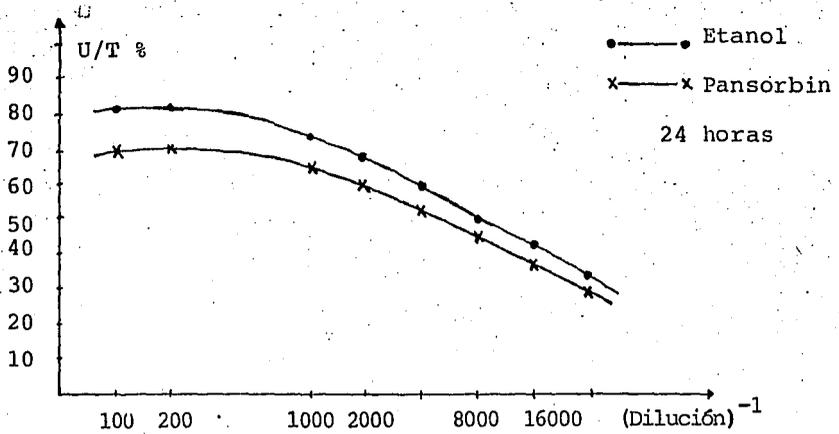


Fig. 28 Titulación del suero anti - insulina porcina obtenido en cabra ( SB ). Research Laboratories.

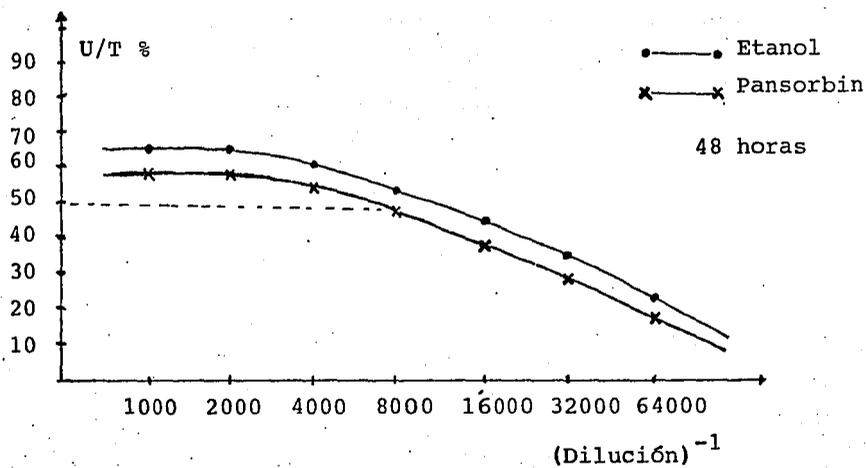
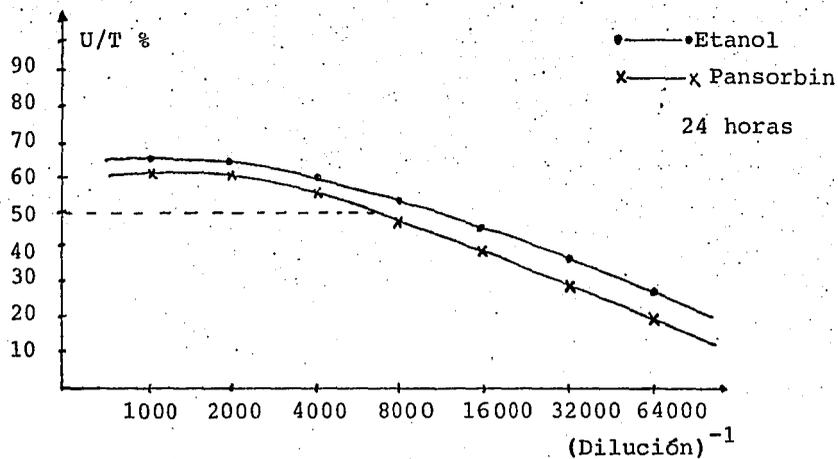


Fig. 29 Curva de titulación del suero anti - insulina porcina obtenido en cuyo ( SS ). Producido en el laboratorio.

Se observa en todos los casos que a las 48 horas de incubación la unión del antígeno marcado es ligeramente mayor que a las 24 horas, pero no en forma significativa. Por este motivo en todos los demás experimentos se incubó solamente 24 horas.

b) Segundo anticuerpo.

Se tituló el segundo anticuerpo (suero anti - globulinas de cuyo, obtenido en cabra), para encontrar la dilución adecuada para precipitar la fracción de radioactividad unida a los anticuerpos. Una dilución del segundo anticuerpo 1/10 (100  $\mu$ l/tubo) con 100  $\mu$ l de suero normal de cuyo 1/80 como acarreador precipitó el máximo de la fracción unida (U) (Fig. 30).

5.1.4. Curvas estándares.

Las curvas estándares obtenidas para el suero anti - insulina porcina obtenido en cabra (SB) aparecen en la Figura 31. Se usó el suero diluido 1/8000. Se puede observar el efecto de graficar la radioactividad unida (U) sobre el total de radioactividad (T), (U/T), con respecto a la gráfica de lo unido (U) sobre lo unido cuando no hay antígeno (insulina) no marcado ( $U_0$ ), (U/ $U_0$ ).

Las curvas estándares para el suero SA y para el suero SC - se muestran en las Figuras 32 y 33 respectivamente.

Al comparar los tres sueros (Fig. 34), se encuentra que el más sensible es el suero SA; éste se siguió usando posteriormente para realizar los radioinmunoanálisis, a una dilución final de 1/200. La curva estándar para el suero SS se muestra en la Figura 35.

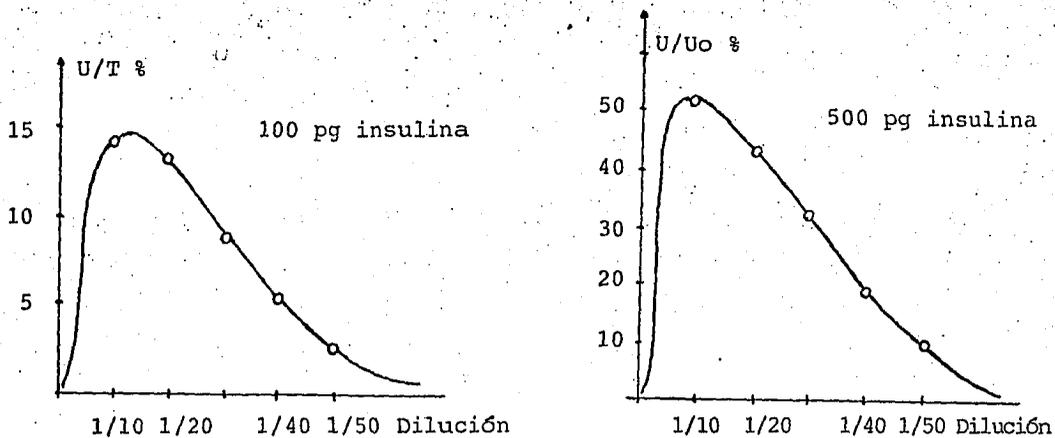


Fig. 30 Titulación del segundo anticuerpo.

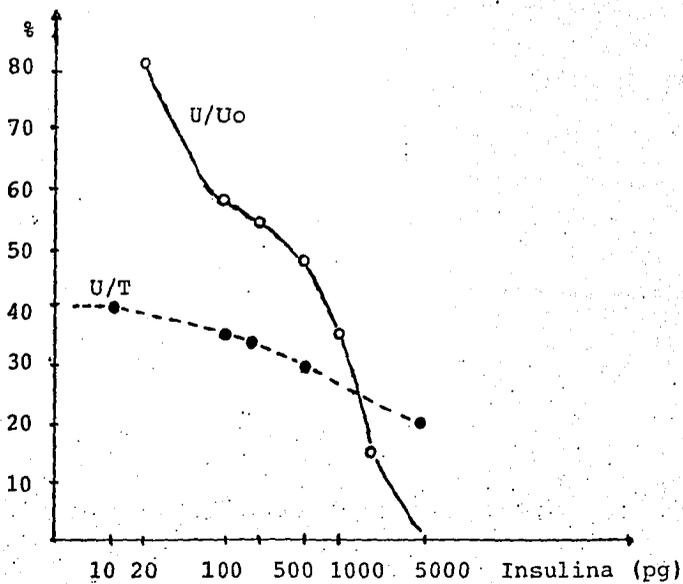


Fig. 31 Curvas estándares del suero de cabra anti - insulina porcina (SB).

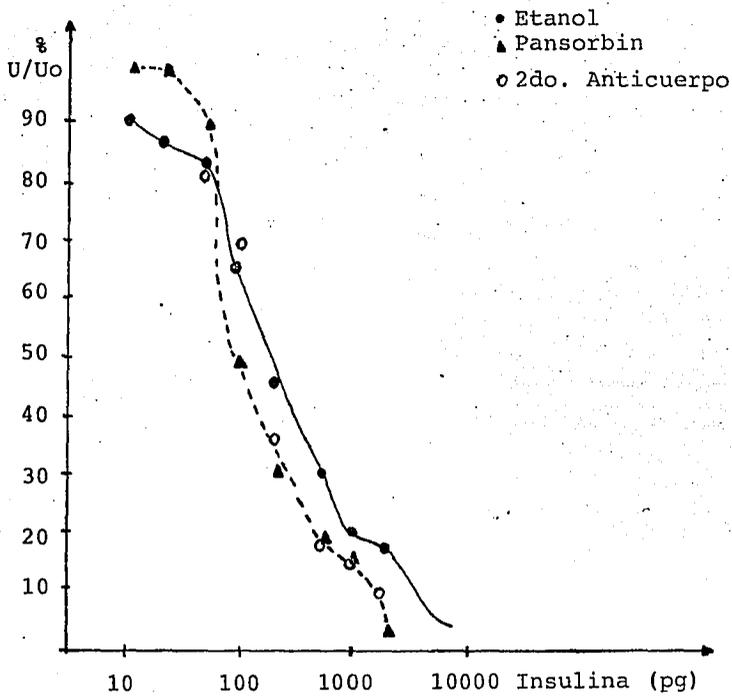


Fig.. 32 Curvas estándares para el suero anti - insulina obtenido en cuyo (SA).

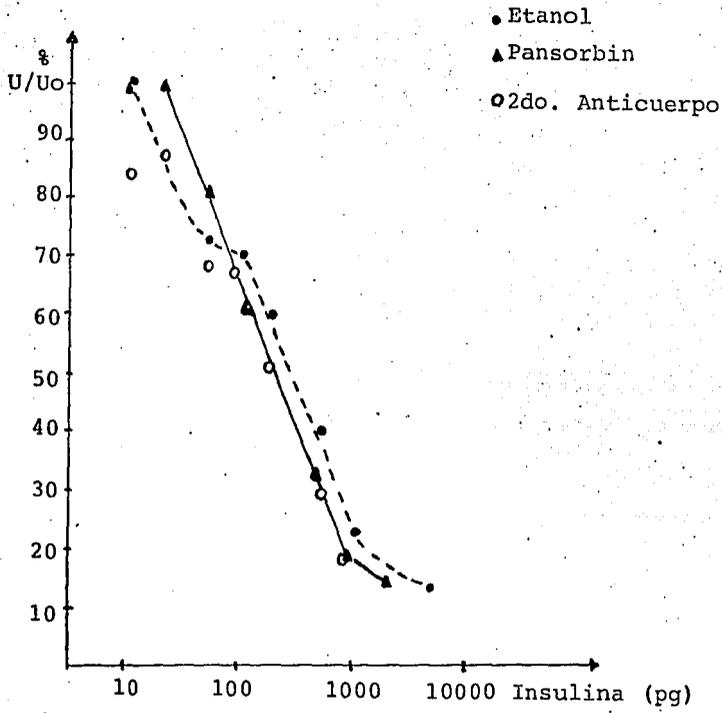


Fig. 33 Curvas estándares para el suero anti -  
insulina porcina obtenido en cuyo (SC).

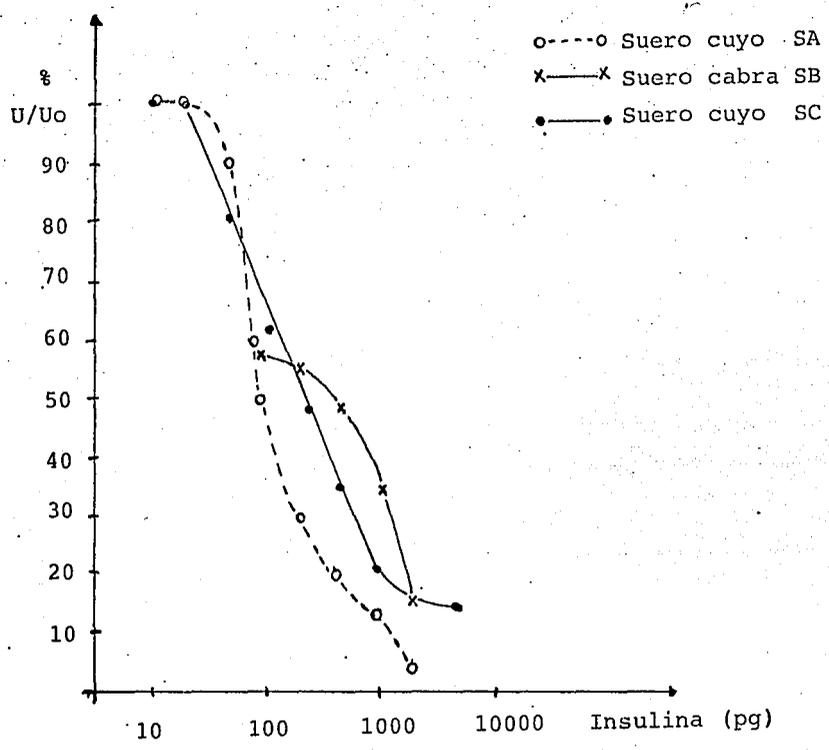


Fig. 34. Curvas estándares de los diferentes sueros anti - insulina porcina. Precipitación con Pansorbin después de 24 horas de incubación.

#### 5.1.5. Curva estándar final del radioinmunoanálisis.

Al usar el protocolo final del radioinmunoanálisis descrito en la sección de métodos (4.1.6.), se obtiene una curva estándar de insulina porcina, en forma reproducible. Esta curva presenta una buena sensibilidad ( 100 pg ) y una región lineal entre 100 y 1000 pg de insulina porcina por tubo (Fig. 36).

#### 5.1.6. Especificidad de los anticuerpos.

Las curvas estándares cambiando insulina porcina por insulina bovina, cadena A-SSO<sub>3</sub> porcina y cadena B-SSO<sub>3</sub> porcina, muestran que los anticuerpos reconocen con la misma especificidad - (las curvas tienen la misma pendiente) a las dos insulinas. La cadena A-SSO<sub>3</sub> no es reconocida por los anticuerpos; mientras que la cadena B-SSO<sub>3</sub> presenta cruce inmunológico con los anticuerpos, pero a concentraciones mucho mayores que las usadas en la curva estándar (Figs. 37 y 38).

#### 5.1.7. Interferencias y reproducibilidad del ensayo.

Se realizaron curvas estándares de insulina cambiando la solución amortiguadora de fosfatos por la solución de glicina 0.05M pH=10.5 que se usa en la reacción de reasociación de las cadenas de insulina (ver Fig. 7, sección 3.1.1.). Otras curvas estándares muestran el efecto de la insulina marcada por los métodos de cloramina T y de Iodogen, así como el uso de insulina fresca (recien marcada) e insulina marcada y almacenada (Figs. 39 y 40).

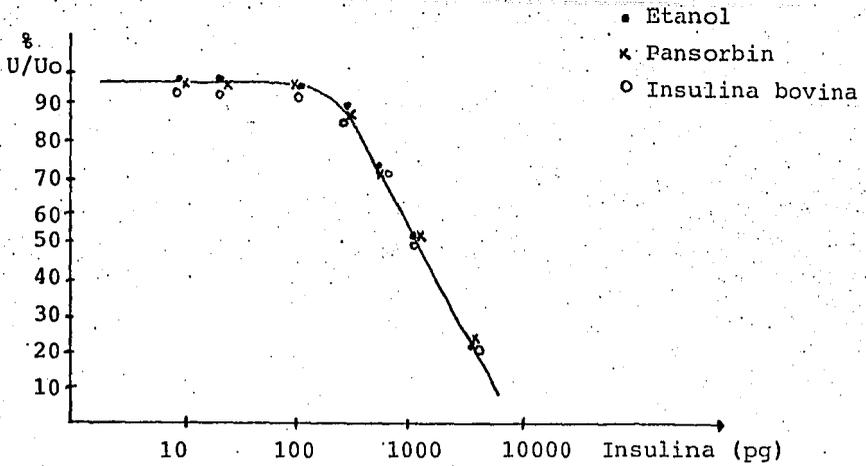


Fig. 35 Curvas estándares del suero anti - insulina porcina obtenido en cuyo (SS). Las dos insulinas bovina y porcina cruzan casi perfectamente.

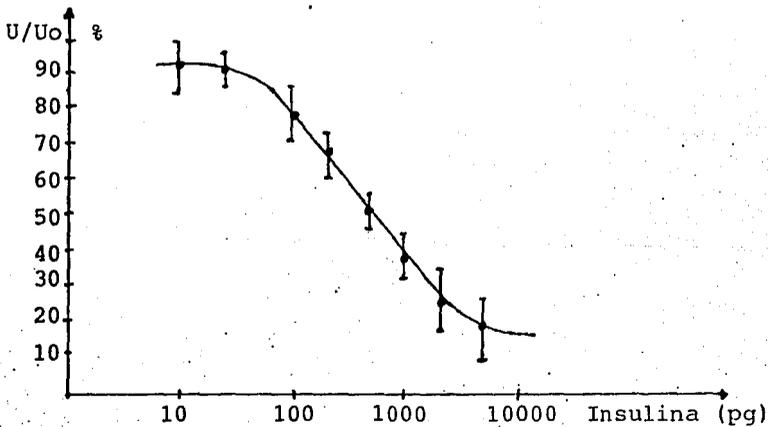


Fig. 36 Curva estándar para insulina porcina (promedio de 8 ensayos) realizada con el suero SA en dilución final 1/200. Precipitación con segundo anticuerpo.

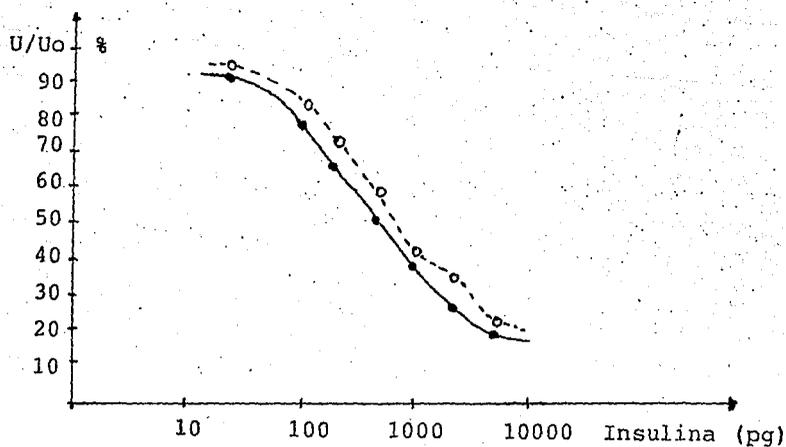


Fig. 37 Curvas estándares de insulina porcina (●) e insulina bovina (○) con el suero de cuyo SA.

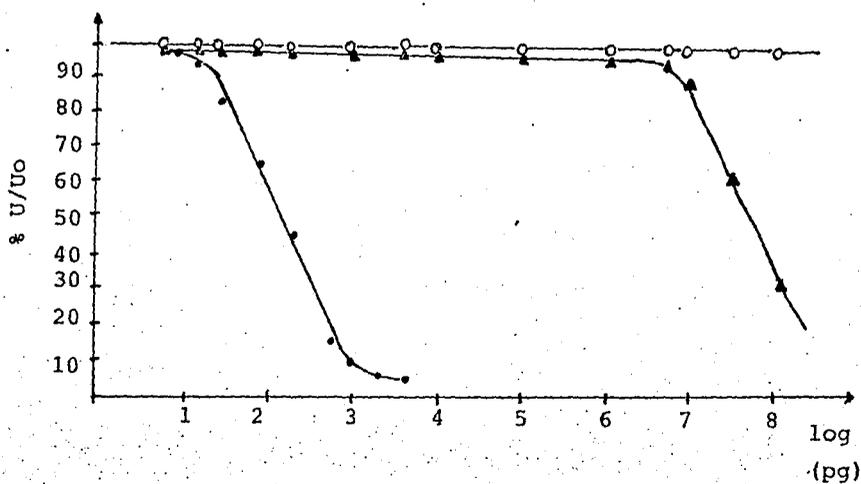


Fig. 38 Interferencia de las cadenas A-SSO<sub>3</sub> (○) y B-SSO<sub>3</sub> (▲) de insulina porcina a la curva estándar de insulina porcina (●).

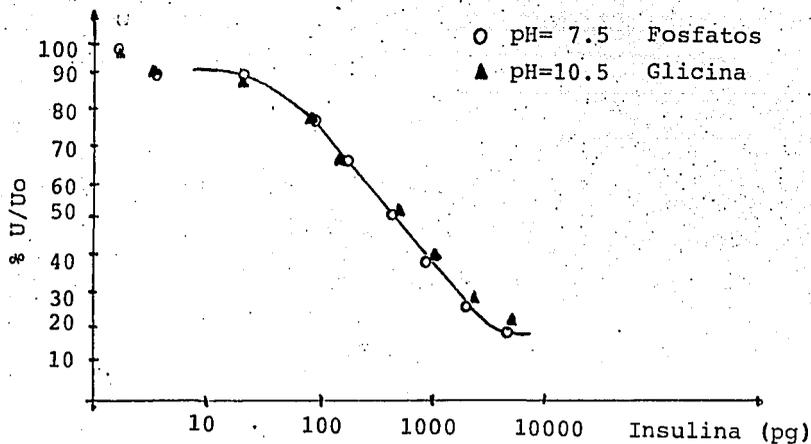
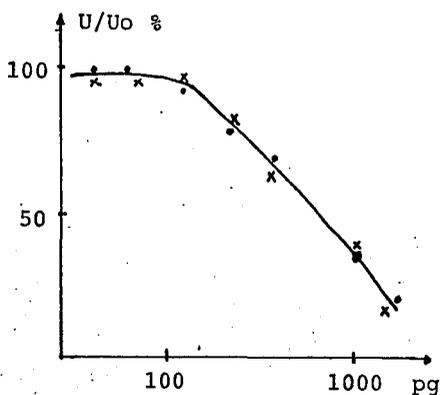
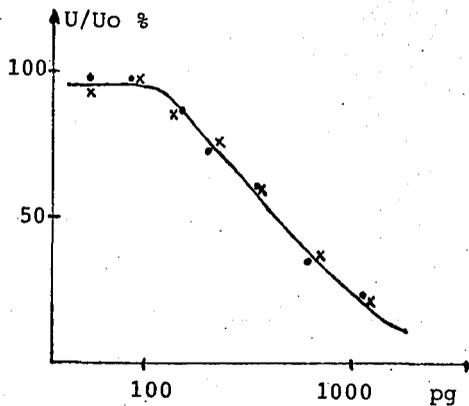


Fig. 39 Curvas estándares de insulina con diferentes soluciones amortiguadoras de pH.



Cloramina T  
fresca  
almacenada 2 semanas



Iodogen  
fresca  
almacenada 2 semanas

Fig. 40 Efecto de la insulina-<sup>125</sup>I marcada por diferentes métodos sobre la curva estándar.

El cambio de volumen de reacción, conservando las concentraciones de los diferentes reactivos no alteró la forma de la curva.

En todos los casos se encontró que el ensayo es muy reproducible y que no había cambios en la forma de la curva por ninguno de estos parámetros. Las condiciones del sistema de radioinmunoanálisis son las siguientes:

Dilución del anticuerpo (suero SA)	1/200
Masa radioactiva	320 pg
Límites y sensibilidad de la curva estándar: $U/U_0 \% = f \left[ \log(\text{pg/tubo}) \right]$	100 a 1000 pg
Pendiente	$45.0 \pm 0.69$
Intercepto al origen	$153.6 \pm 5.51$
Coefficiente de correlación lineal	0.9991
Unión máxima	$35 \pm 5 \%$
Unión no específica	$5.8 \pm 1.4 \%$
50% de $U/U_0$	200 pg
Cuentas totales por tubo	25 000 cpm

## 5.2 Radioinmunoanálisis para TRH.

### 5.2.1. Preparación del anticuerpo contra TRH.

Después de la quinta inyección sólo uno de los conejos dió respuesta inmunológica presentando anticuerpos contra TRH en su suero. Se encontró que a una dilución final del suero de 1/2000 se une el 30 % (U/T) del TRH radioactivo usado (Fig. 41). La concentración de anticuerpos contra TRH se mantuvo igual (mismo título) al paso del tiempo hasta cerca de un año.

### 5.2.2. Yodación del TRH.

El TRH marcado con  $^{125}\text{I}$  presenta una inmunorreactividad entre 50 y 60% para el tercer pico del patrón de elución de la columna de sephadex G-10 (ver sección 4.2.2.). Los dos picos anteriores así como el último que corresponde a yodo-125 libre, no son inmunorreactivos (Fig. 42). Las fracciones 22 a 27 se guardan congeladas a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Cuando las fracciones tienen mas de 15 días guardadas se repurifican por cromatografía a través de una columna de sephadex G-10 con las mismas condiciones antes descritas. Esto hace que la inmunorreactividad aumente en las fracciones guardadas hasta valores iguales o superiores a los que se tienen cuando se acaba de marcar el TRH.

### 5.2.3. Curva estándar.

Se realizó una curva estándar para TRH con el suero obtenido a una dilución final de 1/2000. Los resultados aparecen en la

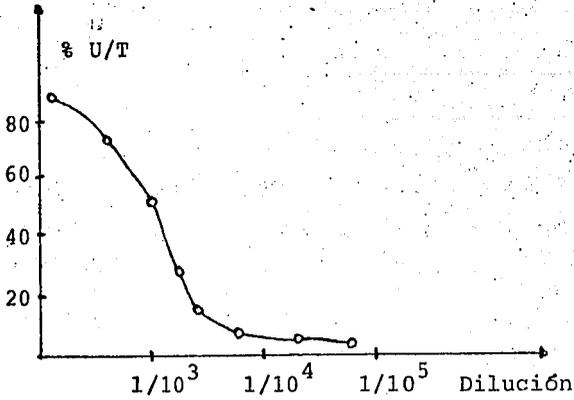


Fig. 41 Curva de titulación del anticuerpo contra TRH.

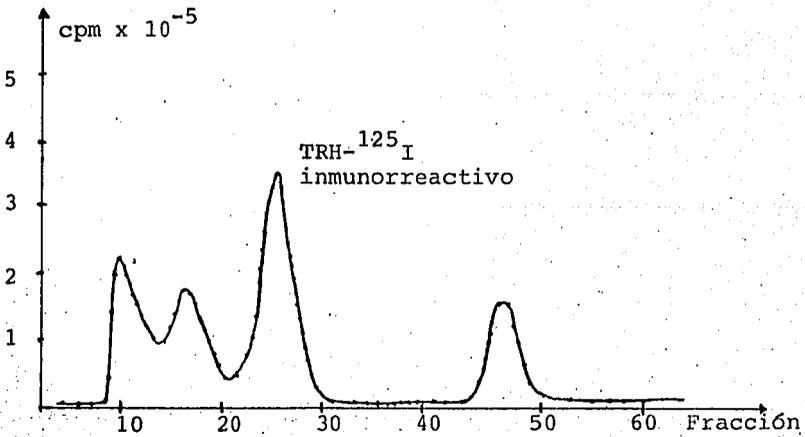


Fig. 42 Perfil cromatográfico de la yodación de TRH con cloramina T en una columna de sephadex G-10.

Figura 43, donde se observa que hay una buena sensibilidad del anticuerpo al antígeno frío (TRH no marcado). Se observa un desplazamiento del 10% a 5 pg de TRH frío.

#### 5.2.4. Radioinmunoanálisis de TRH.

Los ensayos para cuantificar muestras de TRH se realizaron con un anticuerpo caracterizado previamente (58) y separando con Pansorbin la fracción de radioactividad unida de la libre, en vez de alcohol porque se encontró una mejor reproducibilidad de los datos, menor dispersión en los triplicados y menor valor para la unión no específica ( 3.5%) (Fig. 44).

La curva presenta una sensibilidad de 5 pg de TRH frío y es paralela a un estándar de TRH (extracto ácido de hipotálamo).

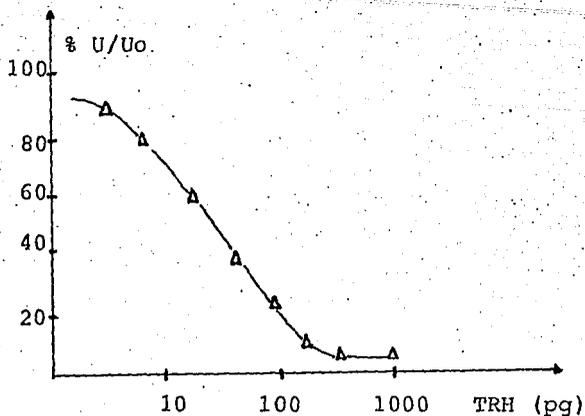


Fig. 43 Curva estándar de TRH. Suero diluido 1/2000.  
Precipitación con etanol frío al 80%.

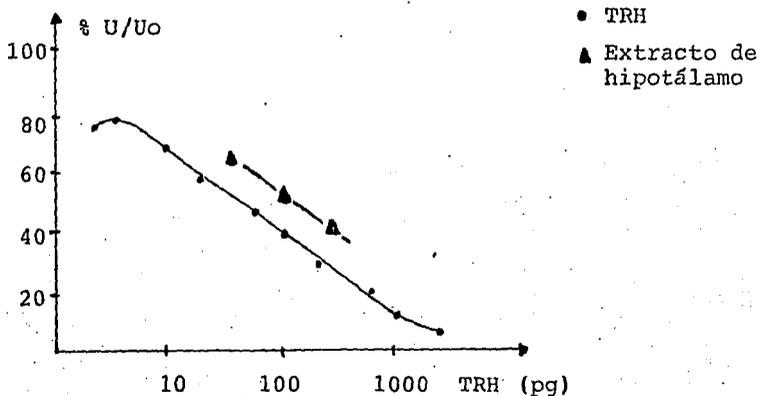


Fig. 44 Curva estándar de TRH con un anticuerpo caracterizado previamente (58) a dilución 1/25 000.  
Precipitación con Pansorbin.

### 5.3 Formación de anticuerpos contra las cadenas A y B de insulina.

#### 5.3.1. Anticuerpos contra cadena A.

Se formó el conjugado de cadena A y glutaraldehído. El producto de esta reacción incorporó 40% de la cadena al conjugado, según la cantidad de marca radioactiva (cadena A-<sup>125</sup>I) unida.

Todos los sueros obtenidos del sangrado de los cuyos a lo largo de un año se probaron por medio de la titulación con cadena A-I-125. En todos los casos el valor de U/T (unido sobre total) nunca fue mayor al 5% indicando esto que ningún suero contenía anticuerpos contra la cadena A de insulina.

#### 5.3.2. Anticuerpos contra cadena B.

Los sueros de los 15 cuyos inmunizados contra cadena B se probaron para detectar la presencia de anticuerpos, titulándolos a diferentes diluciones, contra una cantidad pequeña ( $\approx 20000$  cpm) y constante de cadena B-I-125. Se siguió el curso de la inmunización durante nueve meses.

Dentro del grupo de animales que recibieron el conjugado -- con BDB sólo uno presentó anticuerpos. Se encontró al cuarto mes una unión de la marca radioactiva del 13.3% a una dilución de 1/100. Al quinto mes subió a 26.5% a la misma dilución. Posteriormente bajó a 15% en los siguientes sangrados.

En los animales inyectados con el conjugado de glutaraldehído dos presentaron anticuerpos. El primero dió una unión máxima de 17% al quinto mes, que bajó después a 12%, a la dilución 1/100. El segundo animal dió a la misma dilución una unión del 21.5% en el cuarto sangrado (quinto mes) y después bajó al 10%.

#### 5.4 Columnas de cromatografía de afinidad.

##### 5.4.1. Columna para insulina.

Se unieron anticuerpos contra insulina al gel con bromuro de cianógeno. La eficiencia del acoplamiento medida en base a la fracción de  $\text{IgG-}^{125}\text{I}$  (añadida como trazador) que se une al gel es de 81.4%. Se utilizan los anticuerpos del suero SB en la columna. La insulina- $^{125}\text{I}$  que se pasa por la columna es retenida en su gran mayoría por el gel. Aparece un pico pequeño de radioactividad en las primeras fracciones del lavado. El segundo pico corresponde a insulina- $^{125}\text{I}$  inmunorreactiva que es eluible con ácido acético 0.1M (Fig. 45).

##### 5.4.1.1. Capacidad.

La capacidad de la columna se determina cromatografiando insulina porcina a través de la columna en las siguientes cantidades: 100, 300, 500 y 1000 ng. La columna se lava con solución de fosfatos y después se eluye con ácido acético. La cantidad de insulina presente en cada fracción se mide por radioinmunoanálisis (Fig. 46). Se observa que la columna preparada con 200  $\mu\text{l}$  de gel une 36 ng de insulina. Esto permite calcular una capacidad de 180 ng/ml.

##### 5.4.1.2. Propiedades.

La habilidad de la columna para discriminar entre la insulina inmunológicamente activa y la no inmunorreactiva se probó --

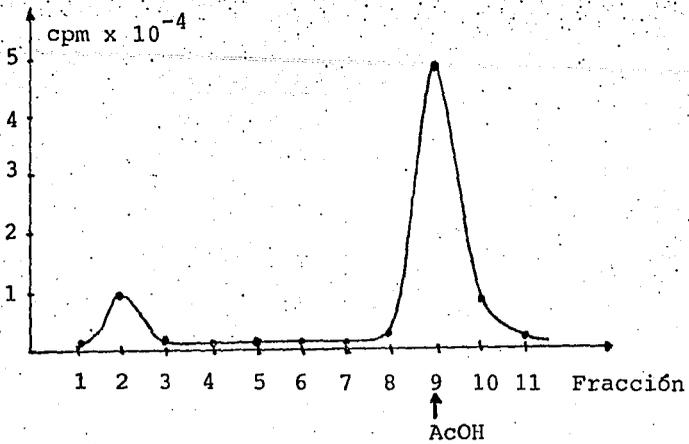


Fig. 45 Perfil de elución de insulina-<sup>125</sup>I en una columna de cromatografía de afinidad.

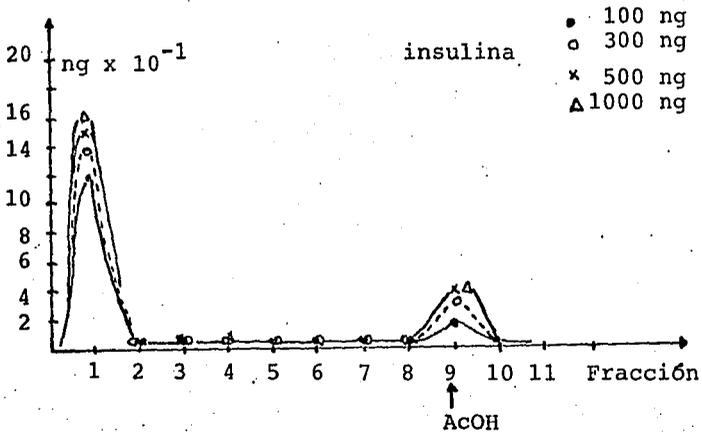


Fig. 46 Patrón de elución de la columna de cromatografía de afinidad para insulina con diferentes cantidades de insulina porcina.

usando insulina-<sup>125</sup>I que presenta una inmunorreactividad del 39% frente a los anticuerpos de insulina (suero SA) a la dilución óptima del radioinmunoanálisis. Cada uno de los picos obtenidos se vuelve a cromatografiar en la misma columna y se obtienen dos picos de cada uno (Fig. 47). La inmunorreactividad de cada pico se mide con los anticuerpos del suero SA dando los valores de la tabla 2.

	pico 1		pico 2	
% Radioactividad	36.		61	
	pico 1-1	pico 1-2	pico 2-1	pico 2-2
% Radioactividad	24.8	8.0	4.3	45.1
Inmunorreactividad(%)	00	10.0	8.0	50.

Tabla 2. Inmunorreactividad medida con anticuerpos contra insulina (suero SA), de los picos obtenidos en una columna de cromatografía de afinidad.

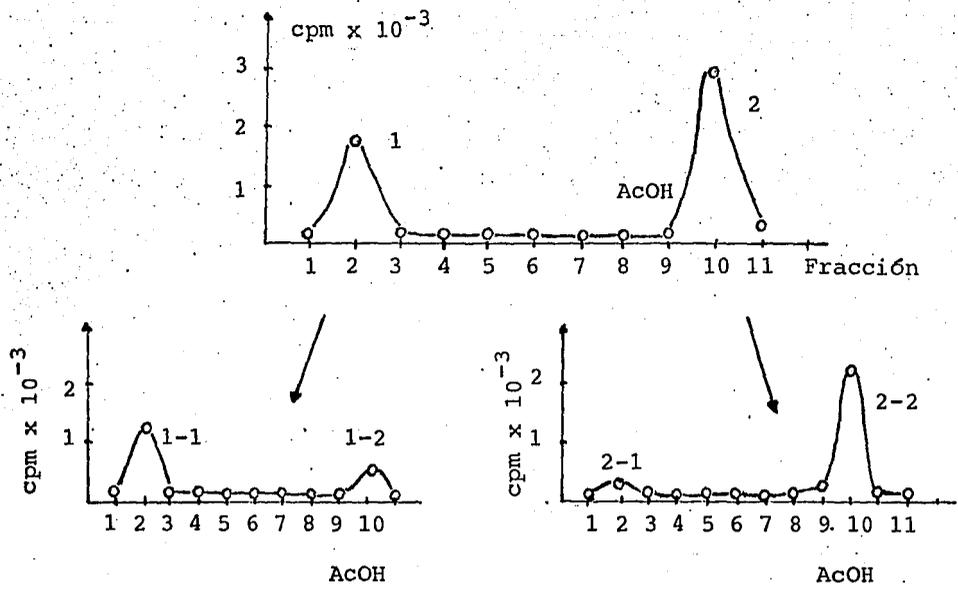


Fig. 47 Cromatografía de insulina-<sup>125</sup>I a través de una columna de cromatografía de afinidad. (Ver Tabla 2.).

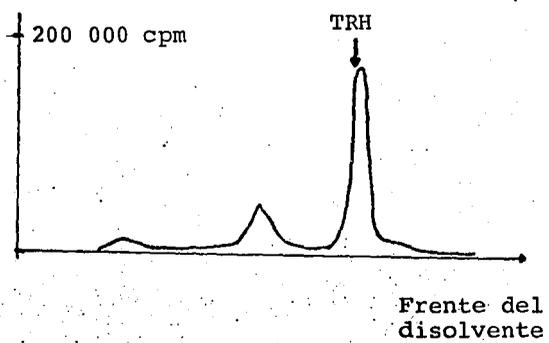


Fig. 48 Distribución de la radiactividad en una placa de cromatografía donde se corrió TRH-<sup>3</sup>H. La flecha indica la posición del TRH estándar no marcado.

#### 5.4.2. Columna para TRH.

##### 5.4.2.1. Purificación de TRH tritiado.

El TRH marcado con tritio ( $^3\text{H}$ ) de NEN muestra un producto - radioactivo que migra diferente al TRH estándar en la cromatografía de placa delgada. Esta fracción de radioactividad no revela con el reactivo de Pauli y aumenta en proporción conforme el -- TRH- $^3\text{H}$  tiene más tiempo de almacenamiento (Fig. 48).

El TRH- $^3\text{H}$  eluido de la placa y recromatografiado presenta - un solo pico que comigra con el estándar de TRH frío. Conservando el TRH marcado en congelación no presenta degradación significativa hasta un mes después de repurificado.

##### 5.4.2.2. Condiciones de cromatografía.

Se acoplan anticuerpos contra TRH de un suero de conejo, con una eficiencia de reacción, medida por la incorporación al gel - de IgG- $^{125}\text{I}$ , de 79.5%.

Se encontró que el TRH se une en cantidades mayores al gel al aumentar el tiempo de incubación hasta las tres horas, cuando se alcanza el equilibrio (Fig. 49).

El patrón de elución de la columna se muestra en la Figura 50 para TRH- $^3\text{H}$  y TRH- $^{125}\text{I}$ , después de incubar cada uno durante - tres horas con el gel.

##### 5.4.2.3. Capacidad.

Se aplica a la columna TRH- $^{125}\text{I}$  ( $\approx 20\ 000$  cpm) junto con -- cantidades cada vez mayores de TRH frío. Se prueban: 100, 200, -

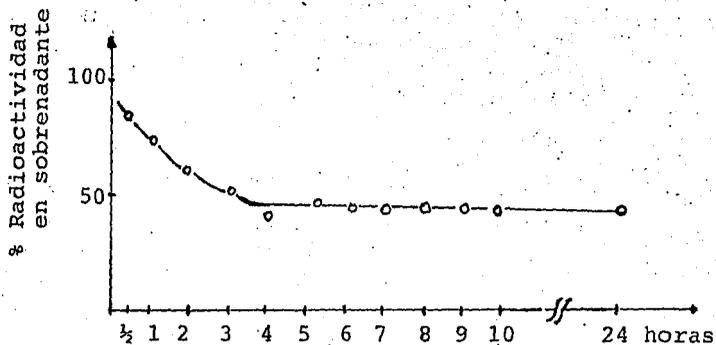


Fig. 49 Determinación del tiempo para alcanzar el equilibrio de unión entre TRH-<sup>3</sup>H y la columna de cromatografía de afinidad.

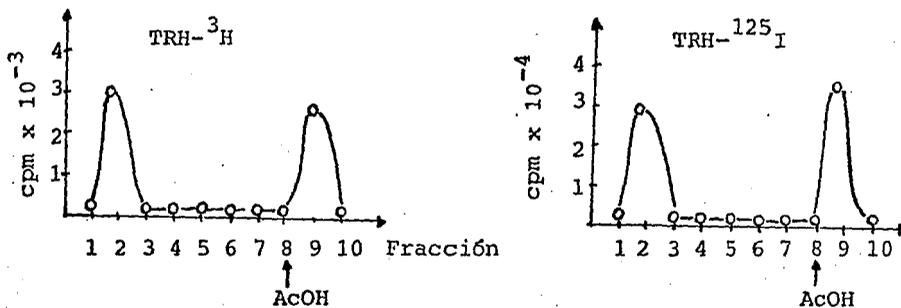


fig. 50 Perfil cromatográfico de la columna de afinidad para TRH con TRH-<sup>3</sup>H y TRH-<sup>125</sup>I.

300 y 400 ng de péptido no marcado (Fig. 51).

Cuando se ponen 400 ng el TRH radioactivo es desplazado completamente de una columna que tiene 190 µl de gel. Dividiendo esta cantidad de péptido entre el volumen tenemos una capacidad de 2.1 µg/ml.

5.4.2.4. Propiedades de la columna.

El TRH-<sup>3</sup>H se cromatografía en la columna de afinidad. Cada uno de los picos obtenidos se pasa nuevamente por la columna, encontrándose la distribución de radioactividad siguiente:

	pico 1		pico 2	
% Radioactividad	45		42	
	pico 1-1	pico 1-2	pico 2-1	pico 2-2
% Radioactividad	26	16	11	36

El extracto de hipotálamo de rata pasado por la columna de cromatografía de afinidad presenta en las fracciones eluidas con ácido acético un producto que es inmunorreactivo frente a los anticuerpos contra TRH. En todas las demás fracciones no se detecta TRH por medio del RIA (Fig. 52).

Se midió por RIA la cantidad de TRH en el extracto de hipotálamo después de quitar restos celulares por centrifugación y neutralizar el ácido de la solución. También se determinó la can-

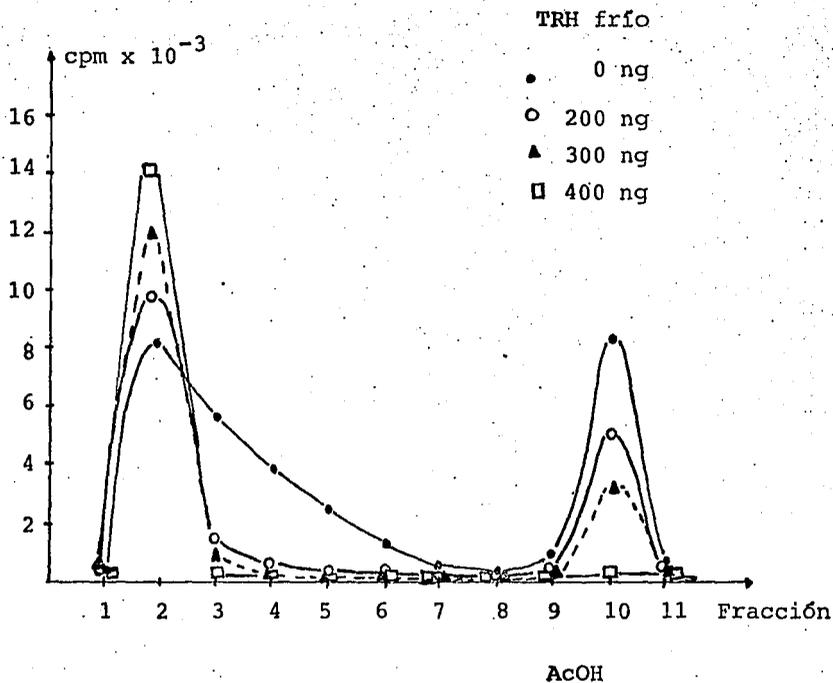


Fig. 51 Determinación de la capacidad de la columna de cromatografía de afinidad para TRH. Al aumentar la cantidad de TRH no marcado se desplaza mas el TRH-<sup>125</sup>I unido al gel. La cantidad que desplaza toda la marca dividida entre el volumen de gel da la capacidad.

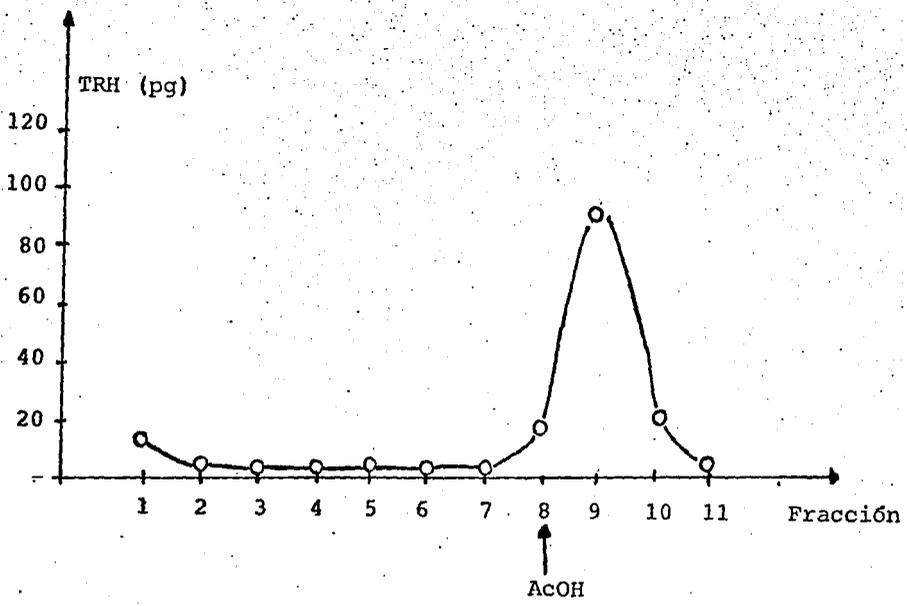


Fig. 52 Perfil cromatográfico del extracto de hipotálamo de rata en la columna de afinidad. Se mide la cantidad de TRH por RIA en 50  $\mu$ l - de cada fracción ( 1 ml ) de la columna. Solamente las fracciones eluidas con ácido acético presentan TRH.

tividad de TRH recuperado después del proceso de purificación tradicional en cromatografía en capa delgada.

Estos valores se comparan con los recuperados de TRH a través de la cromatografía de afinidad (Tabla 3.).

MUESTRA	TRH (ng)/hipotálamo *
Homogenado de hipotálamo	10.3 ± 0.3 (6)
Eluido columna de afinidad	2.6 ± 0.06 (8)
Eluido placa de sílica	2.1 ± 0.3 (7)

\* Media ± ls; ( ) número de muestras.

Tabla 3. TRH inmunorreactivo proveniente de un extracto de hipotálamo de rata. Comparación de dos métodos de purificación.

## 6. DISCUSION Y CONCLUSIONES.

Para poder realizar un radioinmunoanálisis uno de los elementos mas importantes es el anticuerpo, ya que en general son sus propiedades las que limitan mayormente la sensibilidad y especificidad de todo el ensayo.

En el caso de insulina se inmunizaron varios cuyos para obtener anticuerpos contra la hormona. Se escogió este animal porque da una buena respuesta inmunológica y pocos problemas fisiológicos debido a que su insulina difiere en varios aminoácidos de la de otros mamíferos (49) (104), evitandose así el fenómeno de autoinmunidad contra la hormona.

Sólo uno de los cuyos generó anticuerpos. Esto puede deberse a que los animales no estaban en óptimas condiciones fisiológicas, lo cual es importante para una buena respuesta inmune, o bien, que el antígeno no estaba disponible en una concentración y estado adecuados (mezcla con el adyuvante, sitio de inyección, etc.), para ser reconocido por el sistema inmune del animal.

El anticuerpo obtenido presentó un buen título (1/8000), aunque es preferible en general, que sea mas alto; sin embargo, es mejor que el título de los sueros comerciales.

Para los anticuerpos contra TRH se utilizó un conjugado -- que aumenta el poder inmunogénico del péptido. Un conejo dió -- respuesta formando anticuerpos. Aunque el título del suero es -- bajo (1/2000 al 30% de U/T) tiene una buena sensibilidad (5 pg) y permite la obtención de un buen radioinmunoanálisis. A pesar de esto es deseable obtener sueros con mayor título para lo -- cual se puede tratar de inmunizar con otro tipo de conjugados.

Las cadenas A-SSO<sub>3</sub><sup>-</sup> y B-SSO<sub>3</sub><sup>-</sup> de insulina porcina en forma de conjugados no iniciaron la formación de anticuerpos en los cuyos inmunizados. En el caso de la cadena A se sabe que los sitios antigénicos de la molécula de insulina están en la cadena B principalmente (103), por lo cual es difícil la formación de anticuerpos contra este péptido. Es necesario probar otros sistemas (como conjugados, adyuvantes, etc.) para tratar de aumentar su poder inmunogénico.

La cadena B generó anticuerpos con una baja sensibilidad y en cantidades muy pequeñas. Estos anticuerpos no pueden ser usados para establecer un radioinmunoanálisis o para poder emplear los en otros sistemas de detección o purificación.

Se realizaron yodaciones de los péptidos por diferentes métodos. Se utilizó en forma común 1 mCi de <sup>125</sup>I para el marcado. Esta cantidad de radioactividad permite la obtención de moléculas con una actividad específica alta, estando aún dentro de los límites de seguridad recomendados para el manejo de isótopos que emiten radiaciones gamma (95). Se encontró que con esta cantidad de radioactividad (1 nmol) se pueden marcar bien 5 µg de insulina (1 nmol). Esto indica que una relación molar 1:1 del péptido al <sup>125</sup>I es la más recomendable para el marcado de péptidos chicos; al usar mas radioactividad ésta no se incorpora al péptido. Con protefmas grandes la relación puede ser aumentada hasta 1:3.

Las primeras yodaciones se hicieron a pH=5 (mejor solubilidad de la insulina), pero al hacer la reacción a pH=7.5 que es el óptimo para marcar los residuos de tirosina (2) la incorpora

ción fue mayor. Se decidió marcar siempre a este último pH.

La incorporación de radioactividad llegó hasta valores de 80 y 90% según el tiempo empleado. Incorporaciones de cerca de 90% dan una insulina-I-125 no inmunorreactiva. Marcando durante 15 ó 20 segundos se obtiene una insulina que incorpora 75 a 80% de la marca radioactiva y con una inmunorreactividad del orden de 50% (Tabla 1).

La inmunorreactividad máxima está en las fracciones de mayor radioactividad del primer pico y disminuye progresivamente hacia las fracciones de la base del pico. El segundo pico que es yodo libre no es inmunorreactivo en ninguno de los casos.

Se observó que la unión no específica (UNE) de la insulina marcada era mayor conforme se ponen mas cpm en un tubo; también aumenta al ir pasando el tiempo. En general cuando se precipita la fracción unida con alcohol el valor de UNE está entre 10 y - 15%. La precipitación con Pansorbin es más limpia que con etanol. Esto es, se obtienen siempre valores de UNE menores 5 - 6% . -- También se encontró que cuando la solución amortiguadora del en sayo que lleva albúmina sérica bovina al 0.2% es filtrada por una membrana Millipore antes de su uso los valores de UNE son - menores y mas homogéneos. Para resultados cualitativos y rápidos se usó etanol como agente precipitante mientras que para los de más ensayos, de rutina se usó Pansorbin.

Se observa que la precipitación con Pansorbin da una curva con mayor sensibilidad que la obtenida precipitando con alcohol. El uso del segundo anticuerpo para precipitar, genera curvas -- prácticamente idénticas a las de Pansorbin.

Se encontró que para obtener resultados óptimos es muy importante que tanto la cloramina T, como el metabisulfito de sodio sean pesados justo antes de ser usados. Esto es especialmente crítico para la cloramina T, la cual en presencia de luz y la humedad ambiental puede descomponerse.

La mezcla de yodación se separó en dos tipos de sephadex : G-25 y G-10. El segundo excluye a la insulina casi completamente por lo que sale de la columna en las primeras fracciones. Trabajando a un flujo lento ( 4ml/hora) se obtiene un patrón de elución siempre reproducible con dos picos perfectamente separados (Fig. 25).

Al marcar con el reactivo de Bolton - Hunter se logró una buena incorporación de radioactividad al péptido pero no hubo una buena separación de los componentes de la reacción en la cromatografía por sephadex. Creemos que esto fue debido al uso de albúmina en la solución de elución, la cual puede unir a los productos de la reacción en forma inespecífica.

El método de lactoperoxidasa requiere para su éxito de una enzima activa y de una concentración adecuada de agua oxigenada. Es muy importante asegurarse de que el  $H_2O_2$  usada esté realmente al 30% y sea reciente. En nuestro caso creemos que el problema radicó en la enzima que dadas las condiciones de almacenamiento se inactivó.

El método de Iodogen incorpora menos radioactividad (30 a 40%) que el de cloramina T, pero genera insulina- $^{125}I$  con inmunorreactividades ligeramente mayores a las del segundo método. Este proceso por requerir mas tiempo es mas controlable, pero -

tiene el inconveniente de que expone a la persona por mas tiempo al yodo-125.

En la caracterización de los sueros se encontró que el suero de cabra (SB) y el de cuyo (SS) tienen un título y sensibilidad semejantes. Sin embargo, el suero SA aunque con título sumamente menor (30% U/T a 1/200) presenta una sensibilidad mayor (Fig. 34). La gráfica de U/U<sub>0</sub> en función del logaritmo de la concentración del antígeno da una curva sigmoidea cuya parte central es prácticamente una recta. Entre mayor sea la pendiente de esta parte de la curva y mas a la izquierda se encuentre mayor es la sensibilidad del suero. Al contar con una cantidad de este suero (SA) suficiente para trabajar mas de un año se decidió usarlo para establecer el RIA de insulina, mientras se obtenía un anticuerpo en nuestro laboratorio. Ahora se puede realizar el RIA con el suero comercial SA, o bien, con el suero obtenido aquí SS.

Incubando a 48 horas se une una mayor cantidad de antígeno marcado al anticuerpo que a 24 horas pero la diferencia no es significativa, por este motivo se decidió incubar en lo sucesivo solamente 24 horas.

La curva final del RIA es muy reproducible (Fig. 36). Presenta una zona lineal entre 100 y 1000 pg. Esta región permite interpolar con mucha confianza valores de muestras desconocidas. Todas las muestras fueron leídas en esta zona de la curva.

Se encontró que los anticuerpos cruzan perfectamente con la insulina bovina aunque con una ligera menor sensibilidad. Esto permite que el ensayo mida insulina de otras especies dife-

rentes a la porcina con gran confianza, cuando estas no sean muy diferentes en su composición de aminoácidos a la porcina como es el caso de la humana (Fig. 37).

Se encontró que ninguna de las cadenas A o B de insulina -- cruzan con los anticuerpos contra insulina. Esto permite que se pueda medir insulina en una mezcla de reasociación de cadenas sin tener que purificar la insulina de otros componentes de la -- reacción (Fig. 38).

En el caso del RIA para TRH, ambos sueros de que disponemos tienen una sensibilidad del orden de 5pg., lo cual permite determinar con gran confiabilidad TRH en muestras fisiológicas. En cada ensayo se determina el TRH con un extracto de hipotálamo de -- rata a diferentes diluciones para generar una curva que debe ser paralela a la curva estandar. Si esto es así, significa que aquello que se mide presenta un comportamiento semejante al producto endógeno del tejido donde se produce. Cuando las curvas no son -- paralelas, el ensayo es descartado.

El marcado de TRH con <sup>125</sup>I se realizó con cloramina T siendo reproducible en todos los casos. El producto tiene una inmuoreactividad de 50 a 60%. En la separación de la mezcla de -- reacción por sephadex G-10 se obtienen varios componentes que no son inmunorreactivos (Fig. 42). Estos pueden ser productos de -- degradación del TRH ya que su proporción aumenta al marcar TRH -- almacenado por mas tiempo o bien, TRH que incorpora mas de un -- átomo de yodo por molécula. La eficiencia de la columna es muy buena, siempre y cuando se mantenga un tamaño largo (mas de 15cm) y un flujo lento: 4ml/hr.

Para la purificación de estos péptidos con el uso de anticuerpos, la cromatografía de afinidad es una buena alternativa. Se trató de obtener columnas para este tipo de cromatografía uniendo los anticuerpos a sepharosa 4B con Br CN (3) (22).

Los anticuerpos se unieron al gel con una eficiencia promedio del 80% en todos los casos. Ya con los geles activados se montaron columnas que llevan un volumen pequeño de gel (menos de 1ml) para evitar los fenómenos de adsorción inespecífica al máximo.

Se encontró que no basta pasar la muestra por la columna aunque sea lento para obtener los mejores resultados. La reacción de unión del péptido a sus anticuerpos que está pegado al gel requiere un mínimo de tres horas para llegar a un equilibrio. Por esto se deja la muestra en contacto con el gel en una columna cerrada y con agitación por varias horas antes de lavar y eluir.

Las columnas obtenidas retienen al péptido de interés marcado radioactivamente, lo mismo que al péptido frío, y lo eluyen posteriormente selectivamente al cambiar el pH en la columna desde 7.5 hasta 2.0.

En el caso de ambas columnas, se determinó que la capacidad que tienen es muy baja para poder ser usados con fines preparativos, sin embargo en fines analíticos pueden ser muy útiles. Esto es importante para el caso de insulina la cual se desea purificar en grandes cantidades, ya sea de extractos de páncreas o bien de los productos de reasociación de cadenas obtenidas por Ingeniería Genética. Para el TRM esto es relativo, porque las muestras que se trabajan tienen cantidades pequeñas (microgramos), y tal vez en ciertas purificaciones como las hechas a nivel de laboratorio de investigación, la endocrinología sea suficiente con fines

"preparativos".

La capacidad puede ser aumentada si se usan anticuerpos con mayor título y sensibilidad, purificando las inmunoglobulinas y uniendo solamente éstas al gel y probando otros tipos de soportes.

La columna de insulina separa los productos radioactivos no inmunorreactivos, con lo que aumenta el valor de inmunorreactividad de la hormona marcada, lo cual es un indicio de que se ha logrado una mayor pureza en la muestra (Tabla 2).

Al pasar un extracto de hipotálamo de rata por la columna de afinidad para TRH, se detecta TRH (medido por RIA) sólomente en las fracciones de ácido acético (Fig. 52) mostrando esto que el péptido endógeno de una fuente natural se une y eluye selectivamente.

Al comparar los dos métodos de purificación (sección 4.4.2.5.) (Tabla 3) se encuentra que las cantidades de TRH obtenidos por ambos son semejantes. Esto permite proponer que el método de cromatografía de afinidad es más rápido y cómodo para purificar el péptido. Sin embargo, como solo se midió el TRH por RIA es necesario demostrar la naturaleza homogénea del producto obtenido por la columna con diferentes sistemas.

Finalmente podemos ver que se ha logrado implementar sistemas de cuantificación para péptidos en concentraciones bajas a través de Radioinmunoanálisis específicos.

Se han probado métodos para la producción de anticuerpos de proteínas pequeñas y haptenos teniendo éxito en ambos. Esto permite suponer que ensayando los conjugados y esquemas de inmunización adecuados se logrará obtener anticuerpos contra otras

moléculas pequeñas como son hormonas y fármacos, lo cual permitirá su cuantificación en concentraciones mucho menores.

Se optimizaron dos métodos de marcado radioactivo con  $^{125}\text{I}$  para péptidos: Cloramina T, y Iodogen.

Los radioinmunoanálisis con sistemas sencillos, muy sensibles y reproducibles en las condiciones de trabajo existentes en nuestro medio.

Los anticuerpos específicos permitieron obtener columnas de cromatografía de afinidad para péptidos. Estas columnas permiten purificar estas moléculas con mayor facilidad y menor tiempo, aunque no necesariamente a homogeneidad. La capacidad de las columnas proporcionan sistemas útiles a nivel analítico (detección y purificación en laboratorio), pero no preparativo en gran escala.

## REFERENCIAS.

1. Aharonowitz Yair and Cohen Gerald.: The microbiological production of pharmaceuticals. Scientific American. 245. 106-118. -- (1981).
2. Arnott S., Fulmer A., Scott W. E.: The agarose double helix and its function in agarose gel structure. J. Mol. Biol. 90. 269-284 (1974).
3. Axén R., Porath J., and Ernback S.: Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. Nature (London). 214. 1302. (1967).
4. Bailey L.J., Cole R.D.: Studies on the reaction of sulfite with proteins. J. Biol. Chem. 234. 1733-1739. (1959).
5. Barret J.T.: Inmunología. Introducción a la inmunología y la inmunobiología. Editorial Interamericana. México. (1972).
6. Bassiri R.M., and Utiger R.D.: The preparation and specificity of antibody to thyrotropin releasing hormone. Endocrinology. 90. 722-727. (1972).
7. Bentley P.J.: Endocrine Pharmacology. Physiological basis and therapeutic applications. Cambridge University Press. England. U.S.A. (1980).
8. Birnbaumer L., and Swartz T.: Indirect Iodinations., in Laboratory Methods Manual for Hormone Action and Molecular Endocrinology. Seventh Edition. (W.T. Schrader and B.W. O'Mallet Editors). Baylor College of Medicine. Houston Texas. (1983).

9. Birnbaumer L., and Swartz T.: The use of Iodogen to iodinate -- peptide hormones., in Laboratory Methods Manual for Hormone Action and Molecular Endocrinology. Seventh Edition. (W.T. Schrader and B.W. O'Malley Editors). Baylor College of Medicine. -- Houston Texas. U.S.A. (1983).
10. Blackwell R.E., and Guillemin R.: Hypothalamic control of adeno-hypophyseal secretions. Ann. Rev. Physiol. 35. 357. (1973).
11. Bloom E.F.: Neuropeptides. Scientific American. 245. 114-124. - (1981).
12. Boler J.: The identity of chemical and hormonal properties of - the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidyl-prolineamide. Biochem. Biophys. Res. Commun. 37. 705-710. (1969).
13. Bolívar F.: Producción de hormonas humanas por ingeniería genética molecular. Naturaleza. 1.(79). 23-32. (1979).
14. Bolívar F.: Ingeniería genética molecular. Ciencia. 31. 155-163. (1980).
15. Bolívar F., Rodríguez R., Greene P.J., Betlach M., Heyneker H., Boyer A.W., Crosa J. and Falkow S.: Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. Gene. 2. 95. (1977).
16. Bolívar F.: Recombinación "in vitro" de ácidos nucleicos. Ingeniería genética molecular. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 21. 37-55. (1979).
17. Bolton E.A., and Hunter W.M.: The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a <sup>125</sup>I-containing -- acylating agent. Application to the radioimmunoassay. Biochem. J. 133. 529-539. (1973).

18. Bowers C.Y., Weil A., Chang J.K., Silversston H., Enzmamm F. and Folkers.: Activity - Structure Relationships of the TRH. Biochem. Biophys. Res. Commun. 40. 683. (1970).
19. Cecil R. and Loening V.E.: The reaction of the disulphide - groups of insuline with sodium sulphite. The Biochem. J. 76. 146-155 (1966).
20. Cotman C.W., McGaugh J.L.: Behavioral Neuroscience. Academic Press. New York. London. (1980).
21. Cuatrecasas P.: Insulin receptor interactions in adipose tissue cells. Direct measurement and proprieties. Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.). 68. 1264-1268. (1971).
22. Cuatrecasas P.: Protein purification by affinity chromatography. J. Biol. Chem. 245. 3059-3065. (1970).
23. Davis B.D., Dulbecco R., Eisen H.N., Ginsberg H.S., Wood W.B., McCarty M.: Microbiology, including immunology and molecular genetics. Second Edition. Harper & Row Publishers. U.S.A. (1973).
24. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. Vigésima novena -- Edición. Editorial PLM. México. (1983).
25. Dixon G.H., and Wardlaw A.C.: Regeneration of insulin activity from the separated and inactive A nad B chains. Nature (London). 188. 721-724. (1960).
26. Epelbaum J.: Subcellular distribution of radioimmunoassayable - somatostatin in rat brain. Brain Research. 126. 309-323. (1977).
27. Ekins R.P., Newman G.B. and O'Rividian J.L.H.: Statistics in - Endocrinology. (J.W. McArthur and T. Colton Editors). MIT Press, Cambridge. p. 345. (1970).

28. Fraker P.J. and Speak J.C. Jr. : protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloramide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-difenilglicoluril. Biochem. Biophys. Res. Commun. 80. 849-857. (1978).
29. Freeman Lonard M. & Blaurock M. Donald. Editors.: Radioimmunoassay. Grune & Stratton, Inc. U.S.A. (1975).
30. Fudenberg H.H., Stites P.D., Caldwell L.J., Wells J.V.: *Inmunología clínica. Segunda edición. El Manual Moderno. México.* (1980).
31. Fukuda N., Nishimura O., Shikata M., Hatanaka G., Miyamoto M., Saji Y., Nakayama R., Fujino M. and Nagawa Y.: Synthesis and pharmacology of TRH analogues to separate central nervous system action from endocrine activity. Chem. pharm. Bull. 28. 1667-1672. (1980).
32. Garratt C.J.: Effect of iodination on the biological activity of insulin. Nature. 201. 1324. (1964).
33. Garvey, Cremer, Sussdorf.: *Methods in immunology.* 3th Edition. W.A. Benjamin, Inc. London. U.S.A. (1977).
34. Gilbert W., Villa-Komaroff L.: Proteínas útiles obtenidas a partir de bacterias recombinantes. Investigación y Ciencia. 45. 46-56. (1980).
35. Gilbert W., Villa-Komaroff L.: Useful proteins from recombinant bacteria. Scientific American. 242. 68-82. (1980).
36. Goeddel D.V., Kleid D.G., Bolívar F., Heyneker H.I., Yansuta D. G., Crea R., Hirose T., Kraszewski A., Itakura K., Riggs A.R.: Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes - for human insulin. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 76. 106. (1979).

37. Goodman L.S., Gillman A.: The pharmacological basis of therapeutics. Sixth Edition. MacMillan Publishing Co., Inc. U.S.A. (1980).
38. Grant G., Ling N., River J. and Vale M.: Orientation restrictions of the peptide hormone, thyrotropin releasing factor due to intramolecular hydrogen binding. Biochemistry. 11:3070. (1973).
39. Green J.D. and Harris G.M.: Observation of the hypophysoportal vessels of the living rat. J. Physiol. (London). 108. 359. (1949).
40. Greenwood F.C., Hunter W.M. and Glover J.S.: The preparation of  $^{131}\text{I}$  labelled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem. J. 89. 114-123. (1963).
41. Guillemin R., Yamazaki E., Gard D.A., Jutisz M., Sakiz E.: "In vitro" secretion of thyrotropin (TSH): stimulation by a hypothalamic peptide (TRF). Endocrinology. 73. 564-572. (1973).
42. Guy E.A. Editor.: Handbook of radioimmunoassay. (Clinical and - Biochemical Analysis Vol. 5). Marcel Dekker, Inc. New York U.S.A. (1977).
43. Guyton A.C.: Tratado de fisiología médica. Quinta edición. Ed. Interamericana. México. (1977).
44. Handbook of experimental immunology. Vol. I Immunochemistry. Ed. by D.M. Weir. Third Edition. Blackwell Scientific Publications. Oxford. Great Britain. (1978).
45. Harper H.A., Rodwell V.W., Mayes P.A.: Manual de Química Fisiológica. Séptima edición. Editorial: El Manual Moderno, S.A. (1980).
46. Hökfelt T., Johansson O., Ljungdahl A., Lundberg J.M., Schultzberg M.: Peptidergic neurones. Nature. 284. 515-521. (1980).

47. Hughes L.W.: The chemistry of iodination. Ann. N.Y. Acad. Sci. 70. 3. (1957).
48. Hunter W.M.: "Radioimmunoassay" in Handbook of experimental immunology. Vol. 1. Immunochemistry. Edited by D.M. Weir. Third Edition. Blackwell Scientific Publications. Oxford. (1978).
49. Inagaki Y., and Yohmoto K.: A method for the iodination of insulin and its binding to dissociated mouse mammary cells. Endocrinol. Japon. 28. (1). 29-35. (1981).
50. Insulina en Estadística Industrial Anual. Secretaría de Programación y Presupuesto. CGSNEGI. México. (1980).
51. Insulina. Importación. Fracciones arancelarias No. 29.39 A 006. Instituto Mexicano de Comercio Exterior. México. (1982).
52. Itakura K., Hirose T., Crea R., Riggs A., Heyneker H., Bolívar F., and Boyer H.W.: Expression in Escherichia coli of the chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. Science. 198. 1056. (1977).
53. Jackson I., and Reichlin S.: Brain TRH is independent of hypothalamus. Nature. 267. 853. (1977).
54. Jackson I.M.D.: TRH in the rat nervous system: identity with synthetic TRH on high performance liquid chromatography following affinity chromatography. Brain Research. 201. 245-248. (1980).
55. Jaffe B.M. and Benrman H.R. Editors.: Methods of hormone radioimmunoassay. Second Edition. Academic Press. N.Y. U.S.A. (1979).
56. Jeffrey C.T.: Fundamentals of RIA and other ligand assays. Scientific Newsletters Inc. U.S.A. (1979).

57. Joseph-Bravo P.I.: Studies in thyrotropin releasing hormone: degradation and release. Thesis for Ph.D. degree. University of London. (1978).
58. Joseph-Bravo P.I., Charli J.L., Palacios J.M., Kordon C.: Effect of neurotransmitters on the "in vitro" release of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone from rat mediobasal hypothalamus. Endocrinology. 104. 801-806. (1979).
59. Kastin A.J., Ehrensing R.H., Schald D.S. and Ancherson M.S.: Improvement in mental depression with decreased thyrotropin response after administration of thyrotropin releasing hormone. -- Lancet, ii. 740-742. (1972).
60. Katsoyanis P.G., Tometsko A., Zalut C., Johnson S., Trakatellis A.C.: Studies on the synthesis of insulin from natural and synthetic A and B chains. I. Splitting of insulin and isolation of the S-sulfonated derivatives of the A and B chains. Biochem. 6. 2635-2641. (1967).
61. Katsoyanis P.G., Tometsko A.: Insulin synthesis by recombination of A and B chains: a highly efficient method. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 55. 1554-1561. (1966).
62. Kessler S.W.: Rapid isolation of antigens from cells with a -- staphylococcal protein A-antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. Journal of Immunology. 115 (6). 1617-1624. (1975).
63. Klinger N., Gobel P., Seif F.J., Kalbacher H. and Walter W.: TSH and prolactin release of TRH and TRH analogues. Acta. Endocr. 84. 6. (1977).
64. Lehninger A.L.: Biochemistry. Second Edition. Worth Publishers, Inc. New York. (1975).

65. Long E.C.: Liquid scintillation counting theory and techniques. Beckman Instruments Inc., editor. (1980).
66. Lowe C.R.: An introduction to affinity chromatography. North-Holland Publishing Company. Amsterdam. (1979).
67. Lowe C.R., Harvey M.J., Dean P.D.G.: Affinity chromatography on immobilised adenosine 5'-monophosphate. Eur. J. Biochem. 41. 341-345. (1974).
68. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193. 265-275. (1951).
69. Mandel M., and Higa A.: Calcium - dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. 53. 159-162. (1970).
70. March S.C., Parikh I., Cuatrecasas P.: A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. Annal. Biochem. 60. 149-152. (1974).
71. McConaley P.J., and Dixon F.J.: A method of trace iodination of proteins for immunologic studies. Int. Arch. Allergy. 29. 185-189. (1966).
72. Metcalf Geoffrey.: Regulatory peptides as a source of new drugs--the clinical prospects for analogues of TRH which are resistant to metabolic degradation. Brain Research Reviews. 4. 389-408. (1982).
73. The Merck Index. An encyclopedia of chemicals and drugs. Ninth Edition. Martha Windholz, editor. Merck & Co., Inc. N.J. U.S.A. (1976).

74. Miles L.E.M., and Hales C.N.: Labelled antibodies and immunological assay systems. Nature (London). 219. 186. (1968).
75. Montoya E., Serbel M.J., and Wilker J.F.: TRH secretory physiology studies by RIA and affinity chromatography. Endocrinology. 96. 1414. (1975).
76. Morrison M., Bayse G.S., Webster R.G.: Use of lactoperoxidase - catalysed iodination in immunological studies. Immunochemistry. 8. 289-297. (1971).
77. Morrison R.T. and Boyd R.N.: Química Orgánica. Ed. Fondo Educativo Interamericano, S.A. México. (1976).
78. Morse J.H.: Rapid production and detection of insulin - binding antibodies in rabbits and guinea pigs. Proc. Soc. Exp. Biol. - Med. 101. 722. (1959).
79. Nair R.M.G.: Structure of porcine thyrotropin releasing hormone. Biochemistry. 9. 1103-1106. (1970).
80. Odell W.D., and Daughaday .: Principles of competitive protein-binding assays. J.B. Lippincott Company. U.S.A. pp. 33, 134-157. (1971).
81. Parra C.A.: "Hormonas Proteicas". (Manual de Laboratorio). Depto. Investigación Científica. Centro Médico Nacional. IMSS. México. (1980).
82. Plotnikoff N.P., Prange A.J., Breese G.R., Wilson I.C.: Thyrotropin releasing hormone: enhancement of DOPA activity in thyroidectomized rats. Life. Sci. 14. 1271. (1974).
83. Prange A.J., Wilson I.C., Lara P.P., Alltop L.B. and Breese G.R.: Effects of thyrotropin releasing hormone in depression. Lancett. ii. 999-1002. (1972).

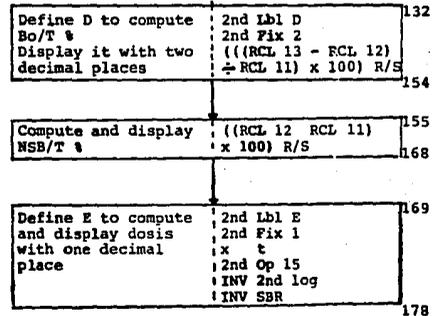
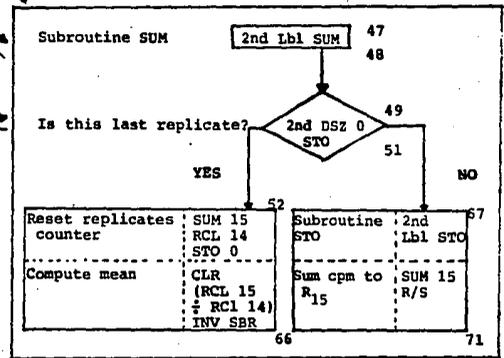
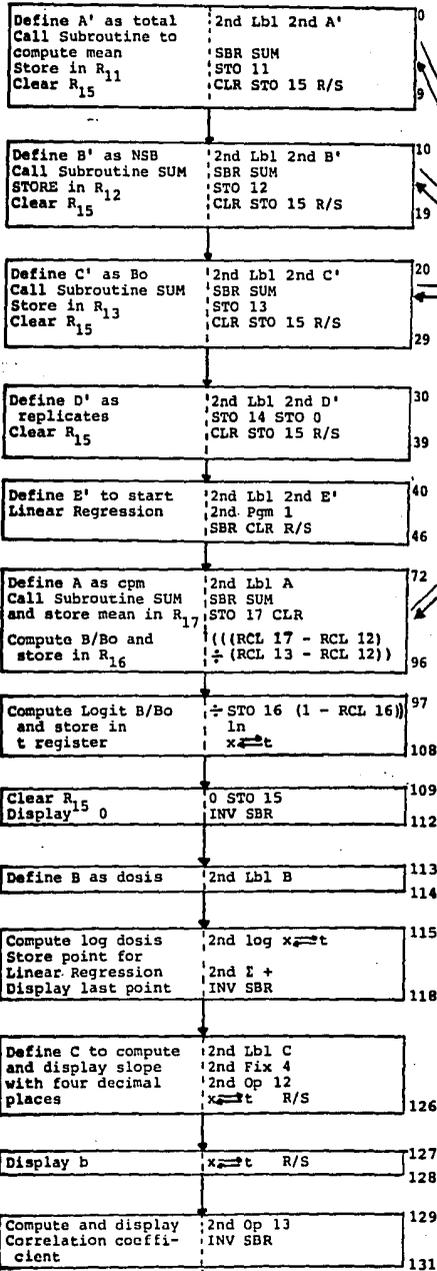
84. Quibrera R., Torres Ruvalcaba A., Guerrero A. Escuela de Medicina; Universidad Nacional Autónoma de San Luis Potosí. S.I.P. México.: " Prevalencia de diabetes mellitus en 2280 familias analizadas a través de jóvenes sanos ". En resumen de XXIII Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología. 23-26 noviembre 1983. Acapulco, Gro. México.
85. Reeves H.C., Heeren R., and Malloy P.: Enzyme purification using antibody crosslinked to protein A agarose. Application to Escherichia coli NADP-isocitrate dehydrogenase. Anal. Biochem. 115. 194-196. (1981).
86. Reicklin S., Martín J.B., Mitnick M.A., Boshans R.L., Grimm Y., Bollinger J., Gordon J., and Malacara S.: The hypothalamus in pituitary thyroid regulation. In: Recent progress in hormone - research (E. B. Ashwood editor). New York Academic Press; vol.28.
87. Schally A.V., Bowers C.Y., and Redding T.W.: Purification of thyrotropic hormone-releasing factor from bovine hypothalamus . Endocrinology. 78. 726-732. (1966).
88. The SI (International System) for the health professions. Prepared at the request of the Thirtieth World Health Assembly. -- World Health Organization. Geneva. (1977).
89. Silvertsson A., Chang J.K., Folkers K., and Bowers C.Y.: Synthesis of di- and tri peptides and assay "in vivo" for activity in the thyrotropin releasing hormone and luteinizing releasing hormone systems. J. Med. Chem. 15. 8. (1972).
90. Smith L.F.: Species variation in the aminoacid sequence of insulin. Am J. Med. 40. 662-666. (1966).
91. Smith H.O., and Wilcox K.W.: A restriction enzyme from Hemophilus influenzae. J.Mol. Biol. 51. 379-391. (1970).

92. Stahl Egon.: Thin - layer chromatography. A laboratory handbook. Academic Press Inc., Publishers. Germany. (1965).
93. Stratton L., Gibson C., Kolar K.G., and Kastin A.: Neonatal -- treatment with TRH affects development, learning and emotionality in the rat. Pharm. Biochem. Behav. 5. 66. (1976).
94. Tesser G.I., Fisch H., Schwyzer R.: Limitations of affinity chromatography: solvolytic detachment of ligands from polymeric supports. Helv. Chim. Acta. 57. 1718-1730. (1974).
95. University of Cambridge.: Precautions to be observed in the use of radioactive materials and machines which produce ionizing radiations in the laboratories of the university. Cambridge. United Kingdom ( October 1971).
96. Vale W., Grant G., and Guillemin R.: Chemistry of the hypothalamic releasing factors. Studies on structure function relationships. In: Frontiers in neuroendocrinology. (W.F. Ganong and L. Martini, editors). Oxford University Press. p. 375. (1973).
97. Vale W., Burgus R., Dunn T.F., and Guillemin R.: Plasma inactivation of TRH and related peptides: its inhibition by various means and by the synthetic dipeptide PCA-His-OMe. Hormones. 2 . 193. (1971).
98. Valles Sánchez Victoria. Clínica de diabetes. Instituto Nacional de la Nutrición: "Salvador Zubirán". Comunicación personal.
99. Werner S., and Machleidt W.: Isolation of precursors of cytochrome oxidase from Neurospora crassa: application of subunit - specific antibodies and protein A from Staphylococcus aureus. J. Biochem. 90. 99-105. (1978).

100. White A., Handler P., Smith E.L., Hill R.L., Lehman I.R.: Principles of biochemistry. Sixth edition. McGraw-Hill -- Book Company. U.S.A. (1978).
101. Wilson I.C., Prange A.J., Lara P.L., Alltop L.B., Stike-leather R.A., and Lipton M.A.: TRH psychobiological responses in normal women. Arch. Gen. Psych. 29. 15. (1973).
102. Winokur A., Davis R., and Utiger R.D.: Subcellular distribution of TRH in the rat brain and hypothalamus. Brain -- Research. 120. 423. (1977).
103. Yagi Y., Maier P., Pressman D.: Antibodies against the -- component polypeptide chains of bovine insulin. Science. 147. 617-619. (1965).
104. Yalow R.S., and Berson S.A.: Immunoassay of endogenous -- plasma insulin in man. J. Clin. Invest. 39. 1157. (1960).
105. Yalow R.S., and Berson S.A.: Chapt. 1 " introduction and general considerations". In: Principles of competitive -- protein binding assays. (Odell & Daughaday, editors). -- J.B. Lippincott Co., Philadelphia. (1971).
106. Yalow R.S., and Berson S.A.: Radioimmunoassay of plasma insulin. In: Methods of Biochemical Analysis. Vol. XII. -- Edited by David Glick. Interscience Publishers. New York. (1964).

LOGIT-LOG RIA PROGRAM. (CRL)

TI - 59



Registers:

- |                       |                            |
|-----------------------|----------------------------|
| R <sub>0</sub> DSZ    | R <sub>14</sub> Replicates |
| R <sub>11</sub> Total | R <sub>15</sub> sum (cpm)  |
| R <sub>12</sub> NSB   | R <sub>16</sub> B/Bo(-NSB) |
| R <sub>13</sub> Bo    | R <sub>17</sub> mean cpm   |

①

## Logit-Log RIA Program (G.R.L.)

## USER INSTRUCTIONS

STEP	PROCEDURE	ENTER	PRESS	DISPLAY
1	Enter number of replicates	n	2nd D'	0
2	Enter total	cpm <sub>1</sub> cpm <sub>n</sub>	2nd A' 2nd A'	cpm <sub>1</sub> 0
3	Enter NSB	cpm <sub>1</sub> cpm <sub>n</sub>	2nd B' 2nd B'	cpm <sub>1</sub> 0
4	Enter Bo	cpm <sub>1</sub> cpm <sub>n</sub>	2nd C' 2nd C'	cpm <sub>1</sub> 0
5	Clear linear regression Curve		2nd E'	0
6	Enter cpm of standars	cpm <sub>1</sub> cpm <sub>n</sub>	A A	cpm <sub>1</sub> 0
	Enter standard dosis	dosis	B	1*
7	Compute curve parameters		C R/S R/S D R/S	m b r Bo/T% NSB/T%
8	Compute unknown dosis	cpm <sub>1</sub> cpm <sub>n</sub>	A A E	cpm <sub>1</sub> 0 ** dosis

## NOTES:

1. After last replicate, it displays 0.
2. Step 6 must be repited for each replicate.
- \* Display shows number of points in curve.
3. m - slope  
b - y-intercept  
r - correlation coefficient
- \*\* Flashing indicates out of range.

APENDICE B. SUSTANCIAS COMERCIALES EMPLEADAS.

Acido acético	J.T. Baker
Acido bórico	J.T. Baker
Acido clorhídrico	J.T. Baker
Acido etilén diamino tetracético	Sigma Chemical Company
Acido sulfanílico	Sigma Chemical Company
Acido tricloroacético	J.T. Baker
Acetato de sodio	J.T. Baker
Acetonitrilo	J.T. Baker
Adyuvante incompleto de Freund	DIFCO Laboratories
Adyuvante completo de Freund	DIFCO Laboratories
Albúmina sérica bovina	Sigma Chemical Company
Alcohol etílico	J.T. Baker
Alcohol metílico	J.T. Baker
Amoniaco	J.T. Baker
Azida de sodio	J.T. Baker
Bencidina - HCl	Sigma Chemical Company
Bicarbonato de sodio	J.T. Baker
Bolton - Hunter - <sup>125</sup> I	Amersham Laboratories
Bromuro de cianógeno	Sigma Chemical Company
Carbonato de sodio	J.T. Baker
Cloramina T	Sigma Chemical Company
Cloroformo	J.T. Baker
Cloruro de sodio	J.T. Baker
Dioxano	J.T. Baker
Etilenglicol	J.T. Baker
Eter etílico	J.T. Baker
Fosfato de sodio dibásico	J.T. Baker
Fosfato de sodio monobásico	J.T. Baker
Gelatina	Sigma Chemical Company
Glicina	Sigma Chemical Company
Glucosa	Sigma Chemical Company
Glutaraldehido	Sigma Chemical Company

Hidróxido de sodio	J.T. Baker
Insulina bovina	Sigma Chemical Company
Insulina porcina	Sigma Chemical Company
Insulina porcina-I-125	New England Nuclear
Iodogen	Sigma Chemical Company
Lactoperoxidasa	Sigma Chemical Company
LHRH	Peninsula Laboratories, Inc.
Metabisulfito de sodio	Mallinckrodt Chemical Works
Naftaleno	J.T. Baker
Nitrito de sodio	J.T. Baker
Pansorbin	Sigma Chemical Company
Peróxido de hidrógeno	J.T. Baker
PPO	New England Nuclear
POPOP	New England Nuclear
Reactivo de Folin	Sigma Chemical Company
Sephadex G-10	Pharmacia
Sephadex G-25	Pharmacia
Sepharosa 4B	Pharmacia
Suero de cabra anti insulina porcina	Research Laboratories, Inc.
Suero de cabra anti IgG de cuyo	Research Laboratories, Inc.
Suero de cuyo anti insulina porcina	Research Laboratories, Inc.
Suero de cuyo anti insulina porcina	Calbiochem-Behring, Corp.
Sulfato cúprico	J.T. Baker
Tartrato de sodio y potasio	J.T. Baker
TRH	Peninsula Laboratories, Inc.
TRH- <sup>3</sup> H	New England Nuclear
TRH- <sup>125</sup> I	New England Nuclear
Urea	Sigma Chemical Company
Xilol	J.T. Baker
Yoduro de sodio ( <sup>125</sup> I)	Amersham Laboratories
Yoduro de sodio ( <sup>125</sup> I)	New England Nuclear

## APENDICE C. EQUIPO EMPLEADO.

Agitador magnético	Tri-R Magnetic Stirrer
Agitador vórtex	Vortex-Genie TM
Balanza analítica	Mettler H54AR
Balanza granataria	Ohaus Harvard Trip
Centrífuga	Beckman J-6B
Centrífuga	Beckman Microfuge B
Centrífuga	Sorvall RC - 5
Colector de fracciones	Gilson FC 80-K
Congelador (-20 °C)	IEM De Luxe
Contador para radiaciones gamma	Beckman 5500
Contador para radiaciones beta	Packard Tri-carb Mod. 3390
Dilutor automático	Micromedic Systems
Evaporador	Savant RH 40-11
Espectrofotómetro	Beckman DU -8
Potenciómetro	Fisher 320
Refrigerador (4 °C)	IEM De Luxe
Ultracongelador (-70 °C)	Kelvinator Series 100

APENDICE D. ABREVIATURAS.

Ab	Anticuerpo
AcOH	Acido acético
ADN	Acido desoxirribonucleico
Ag	Antígeno
Ab-Ag	Complejo antígeno anticuerpo
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
BSA	Albúmina sérica bovina
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
IgG	Inmunoglobulina G
IU	Unidad Internacional
LH	Hormona luteinizante
LHRH	Hormona liberadora de la hormona luteinizante
MAO	Monoamino oxidasa (enzima)
NEN	New England Nuclear
PPO	2,5-difeniloxazol
POPOP	[2,2'-p-fenilenbis(4-metil-5-feniloxazol)]
RIA	Radioinmunoanálisis
SA	Suero anti insulina porcina obtenido en cuyo. Research Lab.
SB	Suero anti insulina porcina obtenido en cabra. Research Lab.
SC	Suero anti insulina porcina obtenido en cuyo. Calbiochem
SS	Suero anti insulina porcina obtenido en cuyo producido en el laboratorio

TRH	Hormona liberadora de la tiotropina
TSH	Tiotropina
T <sub>3</sub>	Triyodotironina
T <sub>4</sub>	Tiroxina
U	Fracción unida
Uo	Fracción unida (máxima) en ausencia de antígeno frío.
UCP	Análisis de unión por competencia
UNE	Unión no específica