

## ARCHIVO HISTÓRICO



El presente artículo corresponde a un archivo originalmente publicado en el **Boletín de la Escuela de Medicina**, actualmente incluido en el historial de **Ars Medica Revista de ciencias médicas**. El contenido del presente artículo, no necesariamente representa la actual línea editorial. Para mayor información visitar el siguiente

vínculo: <http://www.arsmedica.cl/index.php/MED/about/submissions#authorGuidelines>

# XIII

## USO DE RADIOISOTOPOS EN EL LABORATORIO CLINICO

M.C. Johnson

El avance de la ciencia y de la tecnología ha permitido el desarrollo de técnicas cada vez más precisas y sensibles, lográndose la determinación de moléculas en una concentración de  $10^{-12}$  M en tejidos o en fluido biológico, antes imposible de determinar con los análisis químicos o biológicos (ya se están publicando métodos que llegan a  $10^{-15}$  M).

En la naturaleza, ciertas proteínas son conocidas por unirse específicamente a otras moléculas: tiroglobulina se une a tiroxina (T4); transferrina se une al hierro; transcortina se une al cortisol; anticuerpos se unen a los antígenos. En general, la molécula que se une es llamada ligadora y la molécula a unir es el analito o ligado.

Utilizando este tipo de reacción, se han desarrollado análisis cuantitativos conocidos como ensayos de unión competitiva, en donde las moléculas del analito compiten por los sitios de unión de un ligador específico.

Los radioisótopos en el Laboratorio Clínico son una herramienta muy útil para la cuantificación de hormonas, drogas, ácidos nucleicos, etc. Los más

utilizados en dichas determinaciones son: tritio ( $^3\text{H}$ ), Iodo 125 ( $^{125}\text{I}$ ), carbono 14, ( $^{14}\text{C}$ ), cobalto 57 ( $^{57}\text{Co}$ ), hierro 59 ( $^{59}\text{Fe}$ ), fósforo 32 ( $^{32}\text{P}$ ).

- Tritio y carbono 14 son muy usados en la determinación de hormonas esteroides (estrógenos, testosterona, cortisol, etc.), sales biliares, drogas (ciclosporina, digoxina, etc), ácidos nucleicos.
- Yodo 125, es el más usado en el Laboratorio Clínico para la detección de hormonas peptídicas (LH, FSH, TSH, etc), tiroideas (T4, T3), etc.
- Cobalto 57 es utilizado en la determinación de vitamina B<sub>12</sub>.
- Fósforo 32 es utilizado en la síntesis e hibridación de ácidos nucleicos.

La vida media, como el tipo de radiación emitida por cada radioisótopo, debe ser considerada por el experimentador, pues el procedimiento a seguir es diferente en cada caso.

Los compuestos que son marcados con el radioisótopo, reaccionan químicamente igual a su contraparte no marcada, observando el mismo comportamiento. Este principio es la base de todo ensayo con métodos radioisotópicos. Tampoco debe ser alterada la reacción antígeno-anticuerpo por efecto de la marca, manteniendo la misma capacidad antigénica

\* Laboratorio de Medicina Nuclear, Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

del marcado con respecto al frío. Es necesaria su presencia para permitir la identificación y la cuantificación del analito en las fracciones libres y unidas.

Al incubar el trazador con el anticuerpo en ausencia del analito frío, en las mismas condiciones de tampón, temperatura y tiempo del ensayo, se obtiene la unión inespecífica al sistema, observándose el daño del marcado en el tiempo, pues tiende a aumentar el porcentaje de uniones inespecíficas a medida que envejece el compuesto radiactivo.

### Antígenos:

Son moléculas que inducen una respuesta inmune en el animal en el que han sido introducidas por diferentes vías, (intradérmica, subcutánea, ganglionar, etc.) y deben ser reconocidas como no-propias, como extrañas. Los antígenos deben tener peso molecular mayor de 1000 Dalton para inducir respuesta inmunes. Los de menor peso molecular, llamados haptenos, deben conjugarse a moléculas del tipo albúmina o tiroglobulina como "transportador" y así ser capaces de inducir la producción de anticuerpos. Un antígeno puede tener varios determinantes antigénicos o sitios estructurales individuales, capaces de inducir diferentes respuestas inmunes. Por otra parte, diferentes antígenos pueden tener uno o más determinantes antigénicos idénticos, los que inducirían la producción de anticuerpos contra las mismas fracciones. Ej. cadenas de las hormonas LH, FSH, TSH, HCG.

### Anticuerpos:

Son proteínas producidas por células plasmáticas y linfocitos B del animal huésped. Los anticuerpos no sólo se unirán al antígeno *in vivo*, sino también en reacciones *in vitro* en las condiciones apropiadas, siendo esto la base de todas las reacciones inmunológicas y serológicas.

La introducción de antígeno puro en un grupo de animales no induce la misma respuesta inmune en todos ellos, siendo muy dependiente del sistema inmunológico del animal elegido, por ello es recomendable realizar la producción en un grupo grande de éstos. Los animales más comunmente usados en

la producción de anticuerpos de uso *in vitro* son: conejo, cabra, oveja, burro, caballo, cuy, pato, gallina.

El antisuero utilizado en radioinmunoensayo, en general es del tipo IgG y debe tenerse presente varios criterios de control de calidad en el estudio de dicho anticuerpo.

- Especificidad: debe reconocer solamente al analito contra el que fue producido, para ello es necesario utilizar inmunógenos de alta pureza.
  - Afinidad y avidéz: representan la firmeza y la estabilidad de la unión entre al antígeno y el anticuerpo. La afinidad está caracterizada por la constante de asociación.
  - Título: es la concentración del anticuerpo en el suero del animal huésped en un tiempo determinado.
  - Sensibilidad: es la concentración mínima de analito reconocida por el anticuerpo diluido en el medio de incubación.
- Todas estas características pueden variar en cada sangrado del animal.

### Reacción antígeno-anticuerpo:

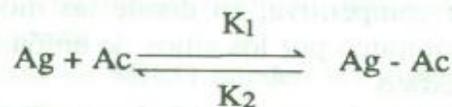
Las uniones son del tipo no covalente.

- Enlaces de hidrógeno
- Enlaces hidrofóbicos
- Fuerzas Coulómbicas
- Fuerzas de Van der Waals.

Estas uniones se ven afectadas por factores como: pH, molaridad, fuerza iónica y temperatura, tiempo y tampón de incubación.

La reacción Ag-Ac es un proceso reversible y en el equilibrio se ajusta a la descripción de la ley de masas, en donde:

(1)



(2)

$$K_a = \frac{(\text{Ag} - \text{Ac})}{(\text{Ag})(\text{Ac})}$$

(Ag): Concentración de antígeno  
(Ac): Concentración de anticuerpo  
Ka: Constante de asociación.

Basados en esta ecuación, se puede aplicar el análisis cuantitativo de la unión analito-ligador.

Este análisis puede aplicarse a reacciones entre macromoléculas (ácidos nucleicos, receptores, anticuerpos, etc.) y su analito, en condiciones de equilibrio. El sistema presenta saturabilidad en el sentido en que sólo existe un número finito de receptores por unidad de muestra.

Si consideramos que:

- (Ag) = (H) = Concentración de analito (hormonas)
- (Ac) = (R) = Concentración de ligando (receptor)
- (Ag-Ac) = (HR) = Concentración del complejo analito-ligando (hormona-receptor).

En el equilibrio la ecuación (1) será

$$(3) \quad K_1 (H) (R) = K_2 (HR)$$

$$(4) \quad \text{Reordenando } K_d = \frac{k_2}{k_1} = \frac{(H) (R)}{(HR)} \quad \text{ó} \quad \frac{(HR)}{(H)} = \frac{(R)}{K_d}$$

Donde  $K_d$ : constante de disociación,  $K_d = 1/K_a$   
 Si  $n_{max}$  es el número total de sitios de unión, entonces:

$$n_{max} = (R) + (HR) \quad \text{ó} \quad (R) = n_{max} - (HR)$$

Si consideramos  $U = a$  la hormona unida ( $HR$ )  
 y  $L = a$  la hormona libre ( $H$ )

Reemplazando en la ecuación (4), tendremos:

$$(5) \quad \frac{U}{L} = \frac{(R)}{K_d}$$

Si  $(R) = n_{max} - (HR) = n_{max} - (U)$

$$(6) \quad \text{Entonces: } \frac{U}{L} = \frac{n_{max} - (U)}{K_d} = \frac{n_{max}}{K_d} - \frac{1}{K_d} (U)$$

Ecuación que describe la ecuación de la recta  $y = mx + n$ , en donde  $n_{max}$  y  $K_d$  son constantes.  
 Si todos los sitios de unión están ocupados a una concentración de  $H$  infinita:  $U/L = 0$  entonces la ecuación (6) queda:

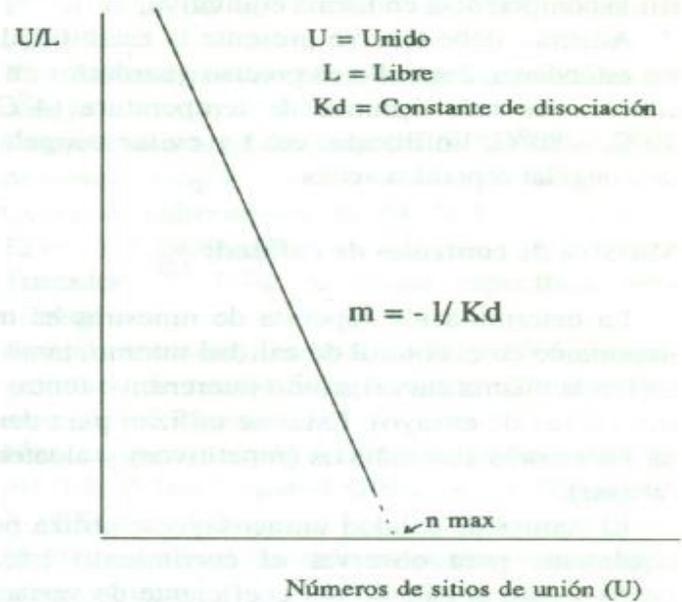
$$\frac{U}{L} = 0 = \frac{n_{max}}{K_d} - \frac{1}{K_d} (U)$$

ó

$$\frac{1}{K_d} (U) = \frac{n_{max}}{K_d}$$

Lo que es igual a:  $(U) = n_{max}$ , valor que se obtiene extrapolando en el eje de las X en el gráfico de Scatchard:

**Gráfico de Scatchard**



**Calibradores o estándar:**

Son sustancias de alta pureza y de menor concentración conocida, contra las cuales se refiere una muestra a analizar curvas de calibración de 5 a 8 puntos son realizadas, diluyendo el estándar más concentrado con el tampón de incubación. En general el rango de concentración cubre los valores normales, patológicos o los de algunas condiciones fisiológicas (embarazos, menopausia, etc.), presentes en el líquido a analizar. Se considera calibrador concentración cero, al constituido sólo por el medio de dilución de la curva, observándose en este punto la unión máxima ( $U_0$ ) del analito marcado al anticuerpo.

Los estándares son usualmente proteínas o moléculas pequeñas que son fácilmente atraídas por las paredes de pipetas, tubos. Para evitar este efecto es necesario agregar en el medio de incubación proteínas no reactivas como gelatina, albúmina sérica de bovino, o humana.

En las técnicas que utilizan anticuerpo como ligador, debe considerarse que éste debe tener la misma capacidad de reconocer a los calibradores, traza-

dores y muestras desconocidas para que pueda ocurrir la competencia en forma equitativa.

Además, debe tenerse presente la estabilidad de los estándares. Para ello es preciso guardarlos en las condiciones más óptimas de temperatura (4°C, -20°C, -80°C, liofilizado, etc.) y evitar congelar y descongelar repetidas veces.

#### Muestra de controles de calidad:

La determinación repetida de muestras es muy importante en el control de calidad interno, tanto intra (en la misma curva), como interensayo (entre varias curvas de ensayo). Estas se utilizan para detectar los errores sistemáticos (repetitivos) y aleatorios (al azar).

El control de calidad intraensayo se utiliza principalmente para observar el corrimiento interno (*drift*) y para el cálculo del coeficiente de variación intraanálisis.

El control de calidad interensayo se evalúa principalmente en las cartas de control de calidad (cartas de Shewart) y el cálculo del coeficiente de variación interanálisis.

Corrimiento interno (*drift*) es la obtención de diferentes valores para una misma muestra de control colocada en diferentes posiciones de la curva analizada.

Coefficiente de variación intraanálisis es la estimación de la precisión de un ensayo y para calcularlo es necesario poner dentro del mismo ensayo al menos en 2 posiciones diferentes, muestras de control de calidad de distintas concentraciones, pues es un parámetro dosis-dependiente.

Las cartas de control de calidad se construyen a base del valor promedio de las muestras de control de calidad con sus límites de confianza.

Coefficiente de variación interanálisis, es la estimación cuantitativa de la variación que experimenta una muestra al analizarla en diferentes curvas de ensayo.

#### Incubación:

Es el proceso en el que se produce la reacción hormona—receptor; antígeno—anticuerpo; reacción

enzimática, etc., en las condiciones óptimas de tampón, pH, temperatura, tiempo de incubación, volumen final, etc.

#### Método de separación de las fracciones libre y unida.

Para la cuantificación de una muestra es necesaria la separación de la fracción libre (analito), de la unida (complejo analito-ligador). Para ello hay diversas técnicas desarrolladas:

—Adsorción: Moléculas de bajo peso molecular (menor de 1.000 Dalton) son adsorbidas por sustancias del tipo carbón activado, carbón-dextrán, talco en polvo, tierra de diatomácea, etc., en un corto período y centrifugado posteriormente, quedando la fracción unida en el sobrenadante.

—Métodos de precipitación: En general, se precipita la fracción unida. Puede ser por procedimientos inmunológicos o químicos.

—Inmunológicos: Se utiliza un segundo anticuerpo producido en una especie diferente a la utilizada en el primer anticuerpo, siendo preparada específicamente contra la gammaglobulina del anticuerpo hormono-específico. Para facilitar la precipitación del complejo analito-gamma globulina - anti gamma globulina, se adicionan proteínas séricas que actuarían como coprecipitadores. La separación de las fracciones libres y unidas se realiza finalmente por centrifugación, quedando el complejo en el precipitado. Este método es conocido como el 2º anticuerpo y es específico en la precipitación del complejo de interés.

#### Precipitación química.

La precipitación de las proteínas del medio se logra modificando su solubilidad; los agentes precipitantes más utilizados son: etanol, polietilenglicol, sulfato de amonio, tricloroacético. Ambas fracciones son separadas por centrifugación, quedando la fracción unida en el precipitado.

Estos métodos no son específicos y suelen afectar la estabilidad del complejo antígeno-anticuerpo. Separación en fase sólida: Se utiliza anticuerpos

unidos a una matriz insoluble.

Unión covalente del anticuerpo a un soporte sólido finamente particulado: sepharosa, sephadex, celulosa, sílica, poliacrilamida, partículas de hierro magnéticas, etc. Durante la incubación debe mantenerse agitación constante. La separación de ambas fracciones se realiza por centrifugación a velocidad y tiempo menores que con las técnicas anteriores. Al usar partículas de hierro magnético la separación es con una placa magnética, evitándose la centrifugación.

Unión covalente o por adsorción del anticuerpo a las paredes de tubos, esferas o placas de poliestireno, nylon polipropileno, etc. Este método no requiere de centrifugación, pero se observa disminución de la sensibilidad del análisis. El rendimiento del anticuerpo es menor que en los ensayos líquidos, y tubos con anticuerpo pegado de diferentes lotes no pueden ser usados.

**Técnicas.**

Las técnicas *in vitro* más comunes en donde se utiliza la radioactividad, son las siguientes:

1.- Radioinmunoanálisis (RIA): Es un método analítico que combina la especificidad de un anticuerpo con la sensibilidad del método radioquímico. Es un análisis de competencia entre el antígeno frío y el marcado por los sitios de unión de un anticuerpo que está en una concentración limitante en el medio de incubación.

El análisis cuantitativo se realiza contra una curva de calibración de concentraciones crecientes de analito frío. La incubación del anticuerpo en ausencia de estándar da el valor de unión máximo ( $U_0$ ) del trazador a los sitios del anticuerpo, pues no hay competencia con el frío.

La pendiente de la curva es negativa.

El comportamiento del trazador en el medio de incubación y en el sistema de separación, se ve al incubarlo en ausencia de calibradores y de anticuerpo. Se denomina unión no específica (UNE).

Ejemplo: Radioinmunoensayo de tetrayodotiro-nina (RIA de T4)

**Materiales:**

1°. Anticuerpo en conejo anti T4: dilución 1/200

2°. Anticuerpo en cabra antigamaglobulina de conejo

Tampón: Barbital 0.1 M pH 8.6 Gamaglobulina de conejo 5 mg%

Curva de calibradores de T4: 0, 1, 5, 3, 0, 6.0, 12.0, 18.0, 24.0, ug%.

Trazador:  $^{125}$ I-T4 Actividad específica: 960 uCi/ug

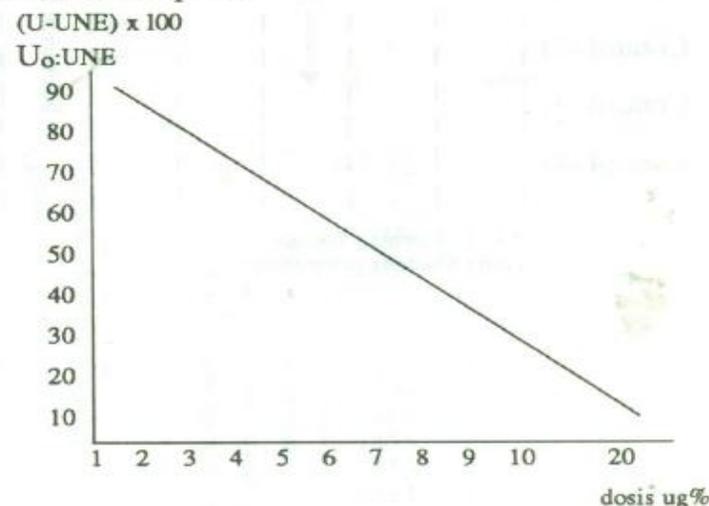
Tampón trazador: Barbital 0.1 M, pH 8.6, Gamaglobulina de conejo 5 mg%, ácido naftalinsulfónico (ANS) 75 mg%.

Mezcla precipitación: Tampón fosfato 0.01 M pH 7.4, Polietilenglicol (PEG) 4 g% (P/v) triton X - 100 0.1% (P/v).

El precipitado es contado en contador que capta radiación gamma.

Las concentraciones de las muestras controles y desconocidas se extrapolan en el siguiente gráfico.

**Gráfico (I)**  
Curva dosis respuesta



En el control de calidad del ensayo debe considerarse:

- Porcentaje de unión no específica (UNE/CT) 100=%UNE
- Porcentaje de unión máxima %U<sub>0</sub> = (U<sub>0</sub> UNE)/CT x 100

Protocolo de Incubación de T4 por RIA

	Tampón ul	Estándar ul	Muestra ul	Trazador ul	1 <sup>er</sup> anticuerpo ul	2 <sup>o</sup> anticuerpo ul	PEG Triton		cpm	$\bar{X}$	$\frac{(U-UNE)}{(U_0-UNE)}$	x 100
C.T.				100					38024 39022			
Est 0 (unc)	225	-	-			50	1		2962 2184	2573	100 x	(UNE/CT)=6.7
Est 0 (U <sub>0</sub> )	125	-	-		100				29006 28490	28748	100 x	(U <sub>0</sub> /UNE)/CT=68%
1.5 ug %	100	25	-						25864 25266		89	
3.0 ug %			-						21294 21658		71.5	
6.0 ug %			-						14108 15102		44.1	
12.0 ug %			-						9184 9014		25.3	
18.0 ug %			-						6963 7091		16.8	
24.0 ug %			-						5215 5369		10.1	Dosis ug %
Control (1)		-	25						5782 5786		11.1	22
Control (2)		-							8918 8984		24.2	13
Control (3)		-							12362 11960		37.4	8.3
Control (4)		-							22998 23288		78.0	2.3
											79.1	2.2

\* C.T.: Cuentas Totales  
cpm : Cuentas por minuto

Incubación 1 hora a temperatura ambiente

Incubación 30' a temperatura ambiente

Centrifugación a 1500 g, 20 minutos, 4°C

Contar precipitado en contador para rad. gamma

Dosis ug %

22

20

13

12.5

8.3

8.8

2.3

2.2

2.3

- Concentración en dosis al:
  - 20% de unión de la curva
  - 50% de unión de la curva
  - 80% de unión de la curva
- Pendiente de la curva.
- Concentración de las muestras controles (Drift)
- Coeficiente de variación intraensayo

2.- Análisis Inmunoradiométrico (IRMA): Este método como el RIA, está relacionado con la estructura química del analito y su ligador. En este caso, el ligador específico (anticuerpo) está marcado con un radioisótopo y se encuentra en exceso con respecto a la cantidad de la sustancia a analizar.

Se combina la acción de dos anticuerpos específicos, uno de ellos marcado radioisotópicamente, producido contra el analito a medir y el otro también contra el mismo analito o contra el complejo analito-anticuerpo marcado.

El análisis cuantitativo se realiza con respecto a

una curva de calibración de concentraciones crecientes de antígeno frío pero, a diferencia del RIA, la pendiente de la curva es positiva, pues a menor cantidad de analito presente, menor unión se producirá.

Este método es de gran sensibilidad, pero de muy alto costo, pues es necesaria la utilización de dos anticuerpos específicos, uno de los cuales, en general es monoclonal.

Ejemplo: Medición de TSH sérica por ensayo radiométrico (TSH IRMA).

Materiales:

- Anticuerpo monoclonal anti TSH radioyodinado con I25 Yodo
- Anticuerpo anti TSH policlonal unido a celulosa.
- Tampón fosfato sódico 0.01 M pH 7.5, BSA 1% (p/v), Tween 20 5% (v/v). Azida sodio 0.1% (p/v).
- Tampón de lavado: Fosfato sódico 0.01 M pH 7.5, Tween 20 (v/v), azida sodio 0.1% (p/v).

**Protocolo de incubación: TSH-IRMA**

	Tampón ul	Est ul	Mt ul	Ac* ul	Ac-cel ul	Sol Lav. ml	Sol Lav. ml	cpm	Dosis mU/
C.T.									
ET	-			50	-			74598	
Est 0	300	100	-		50	2		74693	
0.3 mU/1								181	
0.6 mU/1								200	
3.0 mU/1								265	
7.5 mU/1								259	
15 mU/1								349	
30 mU/1								384	
60 mU/1								730	
Control (1)			100					737	
Control (2)								1485	
Control (3)								1455	
								2655	
								2534	
								5021	
								4846	
								9905	
								9931	
								306	0.7
								305	0.7
								1308	7.0
								1256	6.7
								3101	22
								3246	24

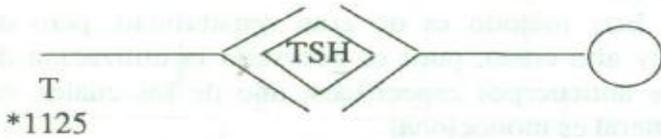
Agitación toda la noche temp. amb.

Centrifugación 800/5min/4°C  
Eliminación sobrenadante.

Centrifugación 800/5min/40°C  
Eliminación sobrenadante  
Contar el precipitado en contador gamma.

Esquema de unión.  
Anticuerpo anti TSH  
Monoclonal (ratón)

Anticuerpo anti TSH  
Policlonal (oveja)  
unido a la fase sólida.



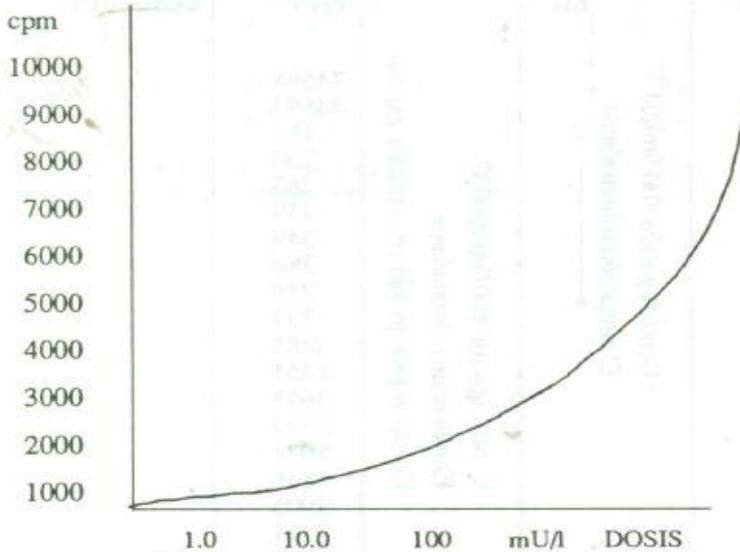
En el precipitado obtenido por centrifugación se encuentra el complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo el que es contado en contador gamma.

El cálculo de las concentraciones de las muestras desconocidas y controles se extrapolan en el gráfico cpm/dosis.

Se presentan dos sistemas de gráficos siendo muy práctico el sistema de separación de la curva estándar en dosis altas y bajas, así la extrapolación se realiza en una recta.

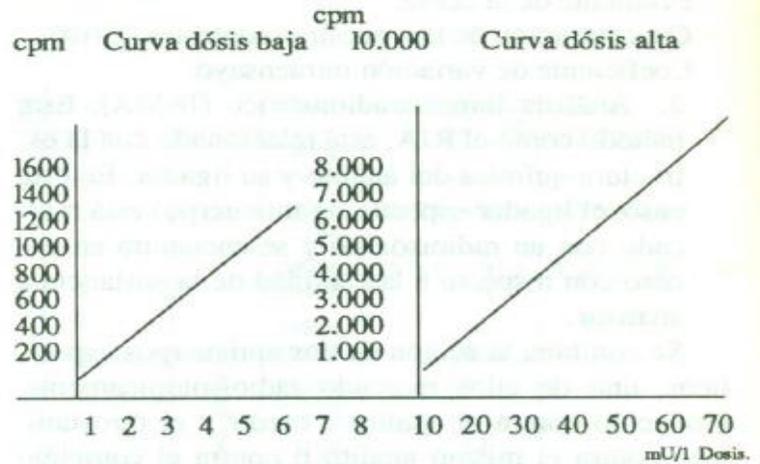
Gráfico (2)

Curva de calibración de TSH - IRMA



Curva exponencial de déficit extrapolación para muestras de baja concentración.

Gráfico (3)



Esta técnica radiométrica es muy sensible detectando como dosis mínima 0.05 mU/l de TSH, en cambio en el radioinmunoensayo de TSH la dosis mínima detectable es de alrededor de 1 mU/l, no logrando diferenciar entre los individuos eutiroides de hipertiroideos.

3.- Radiosíntesis enzimática: Esta técnica utiliza la radiosíntesis de compuesto con métodos enzimáticos y posterior purificación por filtración, extracción, cromatografía en placa fina, etc.

Este método es utilizado en la síntesis de RNA, DNA, Catecolaminas metiladas, etc.

Ejemplo: medición de catecolaminas plasmáticas.

Materiales:

- Enzima: Catecol-orto-metil-transferasa (COMT) (EC 2.1.1.6)
- Trazador: S-Adenosyl-1 (metil <sup>3</sup>H) Metionina (<sup>3</sup>H- SAM)
- Estándar Interno: Mezcla de 10 ng/ml adrenalina, 10 ng/ml noradrenalina y 10 ng/ml dopamina en tampón tris - HCl
- Solventes orgánicos
- Solución estabilizante: GSH 200 mg/ml, EGTA 100 mg/ml pH 7.3
- TampónTris : HCl pH 8.5 0.1 M, EGTA y mgCl<sub>2</sub>

**Cálculo.**

Se utiliza el análisis de Scatchard para la determinación del número de sitios de unión. Para ello, se realizan las siguientes mediciones:

	cpm	UE	L	UE/l	U (fmoles/0.2)	UM (molar)
Uniones no específicas	10586					
(UNE)	7117					
En presenciade DES 10 <sup>-4</sup> M	5207					
	3670					
	1808					
	776					
Uniones totales (UT)	18515	7979	109874	0.072	49.56	247,8 x 10 <sup>-12</sup>
	14613	7496	71095	0.105	46.85	234.25x 10 <sup>-12</sup>
	12092	6885	50871	0.135	43.03	215.15x 10 <sup>-12</sup>
	9592	5922	32791	0.181	37.01	185.05x 10 <sup>-12</sup>
	6055	4247	15373	0.276	26.54	132.7 x 10 <sup>-12</sup>
	3069	2293	6433	0.356	14.33	71.65 x 10 <sup>-12</sup>
Cuentas totales (CT)	117853					
	78591					
	57756					
	38713					
	19620					
	8726					

- UNE: unión no específica
- UT: unión total
- UE: unión específica (UE=UT-UNE)
- CT: cuentas totales
- L: fracción libre (CT-UE)
- uE/: raza unión específica vs. libre
- U: unión en fmoles/0.2 ml de citosol
- UM: unión en concentración molar
- 3H-estradiol: actividad específica: 160 Ci/mmol.

- Solución de productos para detener la reacción: solución de 4 mM metaadrenalina, 4 mM metanoradrenalina, 4 mM metoxytiramina en tampón borato 0.5 M pH 11.
- Líquido de centelleo: PPO 5 g/l en tolueno
- Placas cromatográficas.

**Método:**

La enzima COMT cataliza la transferencia de un  $^3\text{H}$ -metilo del compuesto  $^3\text{H}$ -SAM a adrenalina, noradrenalina y dopamina que se encuentra en la muestra a analizar. Los productos resultantes  $^3\text{H}$ -meta-adrenalina  $^3\text{H}$  Normetaadrenalina y  $^3\text{H}$ -3-metoxytiramina, son extraídos y purificados por mezclas de solvente y posteriormente separados entre sí por cromatografía en placa fina. La radioactividad atribuible a cada catecolamina es rescatada de la sílica en un frasco con líquido de centelleo y medido en contador de centelleo líquido.

La cuantificación de las muestras se realiza agregando una cantidad conocida de solución de estándar a un tubo de la muestra a analizar, antes de la acción enzimática. Este sistema es denominado como Estándar Interno. Los cálculos finales se hacen relacionando la incorporación de la radioactividad en la muestra en presencia y en ausencia de estándar interno.

4.- Análisis de receptores por técnicas radioactivas: Los sistemas nerviosos y endocrino comunican información entre las células, tanto de órganos blancos como en otros. Las células que pertenecen a órganos que responden a una determinada hormona contienen moléculas específicas llamadas receptores que unen a la hormona y posteriormente desencadenan la respuesta celular. Los receptores son proteínas que contienen 1 o más sitios de unión, produciéndose cambios conformacionales al formarse el complejo hormona-receptor. La especificidad y la afinidad son propiedades fundamentales de estas moléculas.

Ejemplo: Análisis de receptores estrógenicos en tumores de mama.

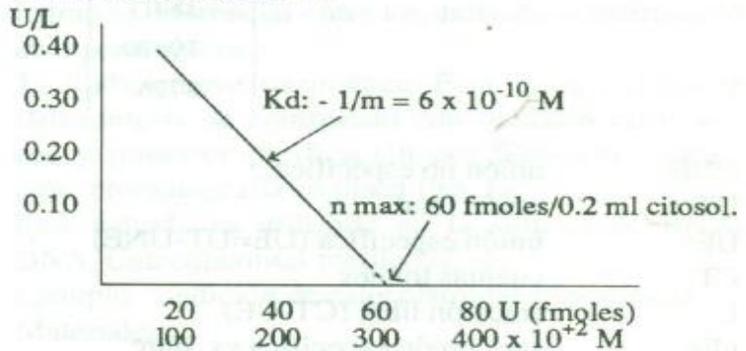
El estudio se realiza en receptores estrogénicos cito-

sólicos

- Materiales:**
- Estradiol tritiado: Actividad específica 160 Ci/mml.
  - Dietilstilbestrol  $10^{-4}\text{M}$  (DES  $10^{-4}\text{M}$ ).
  - Tampón fosfato sólico 0.01 M pH 7.5 EDTA 1.5 mM., glicerol 10% (v/v).
  - Carbón - Dextran: 0.25% p/v carbón 0.025% p/v dextran T 7.0, en Buffer PB 0.01 M pH 7.5.

**Método:** Se pulveriza el tejido congelado, se suspende en tampón frío y se ultracentrifuga para la obtención de citosol. Cantidades constantes de citosol incubadas con estradiol tritiado en concentración creciente ( $10^{-9}$  -  $10^{-8}\text{M}$ ) en presencia y ausencia de un exceso de dietilstilbestrol para calcular las uniones no específicas y las uniones totales, respectivamente.

El complejo hormona-receptor se separa del estradiol radioactivo por el método de carbón-dextran, encontrándose después de la centrifugación la fracción unida en el sobrenadante.

**Gráfico de Scatchard.**

El tejido tumoral del ejemplo tiene una concentración de receptores de 60 fmoles / 0.2 ml de citosol, que al expresarlo por ml es de 300 fmoles/ml de citosol. La cantidad de proteínas citosólicas es determinada por microtécnicas espectrofotométricas, encontrándose en este caso una concentración de 2 mg/ml de proteína citosólica. El informe final de los receptores estrogénicos en el tumor de mama es de 150 fmoles por mg. de proteína citosólica.