

DETERMINACIONES RADIOINMUNOLÓGICAS DE FÁRMACOS *

ÁNGEL BELMONTE VICENTE

INTRODUCCIÓN. — Decía Claude Bernard que «en el estado actual de la Ciencia, cualquier progreso sólo es posible a expensas de mejoras técnicas» y efectivamente, el radioinmunoensayo, al permitir la determinación cuantitativa de muy pequeñas cantidades de un producto activo en un medio biológico, ha constituido una importante mejora técnica, cuyos grandes frutos ya se han recogido ampliamente en la Endocrinología y en otras ramas de la Medicina.

Las determinaciones radioinmunológicas de los fármacos en diversos medios biológicos (plasma, orina, tejidos), presentan un gran interés en Farmacología y en la Terapéutica, fin supremo de la Medicina, pues la respuesta farmacológica depende de la concentración del fármaco en la biofase y ésta, a su vez, es función de su concentración plasmática, sobre la que influyen múltiples factores como son la biodisponibilidad del fármaco en la forma medicamentosa, la absorción, el grado de unión a las proteínas plasmáticas, distribución, biotransformación, excreción e interacciones farmacológicas.

Al disponerse de medicamentos de acción muy selectiva y estrecho margen terapéutico, se hace necesaria la determinación de la concentración plasmática del fármaco, como única garantía de que la dosis administrada es la correcta y de que factores farmacogenéticos, de inducción o inhibición enzimática, deficiencias de excreción o de absorción, de competencia por ligarse a las proteínas plasmáticas, etc., no la modifican.

El radioanálisis presenta las ventajas de su *especificidad*, pues el principio de la técnica se basa en una reacción específica de antígeno-anticuerpo (cuando se trata de sustancias con capacidad antigénica) o en la ligazón de un sustrato con una sustancia o selector, a la que se fija de forma selectiva, con una elevada constante de afinidad; de su *sensi-*

* Sessió del dia 28 de març de 1978.

bilidad, permitiendo obtener medidas del orden del nanogramo o picogramo, difícilmente logradas por otros métodos analíticos; de su *precisión*, pues utiliza medidas de radiactividad de radionúclidos con elevada actividad específica; y de la *facilidad* de su realización, no precisándose de la extracción previa del sustrato problema de la muestra biológica donde se encuentre.

PRINCIPIO DEL RADIOANÁLISIS. — Las sustancias biológicamente activas tienen o pueden adquirir la propiedad de ligarse a otras sustancias o selectores, con las que reaccionan específicamente para formar un complejo sustrato-selector (ROSSELIN²²).

El radioanálisis se basa en la competición entre un sustrato marcado con un isótopo radiactivo y el sustrato problema por ligarse a un selector o ligando para formar un complejo sustrato-selector (fig. 1).

PRINCIPIOS DEL RIA

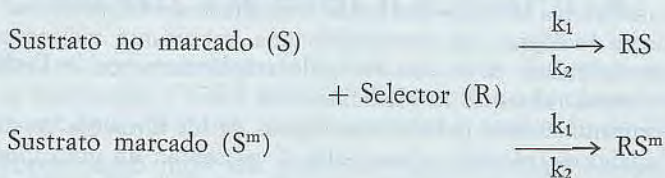


FIG. 1

La reacción obedece a la ley de acción de las masas y siendo constante la concentración del sustrato marcado y la del selector, la cantidad del complejo sustrato marcado-selector formado, dependerá de la concentración del sustrato problema en el medio de reacción.

La reacción comprende tres etapas:

- 1.^a Incubación del sustrato marcado y problema con el selector.
- 2.^a Separación del complejo sustrato marcado-selector, del sustrato marcado libre o no ligado.
- 3.^a Medida de la radiactividad del complejo sustrato marcado-selector y cuantificación de los resultados con arreglo a una curva de calibración, previamente realizada con sustrato standard.

SISTEMAS DE RADIOANÁLISIS. — El sustrato puede tener actividad antigénica o ser susceptible de llegar a tenerla, uniéndose a otras sustancias inmunogénicas, en cuyo caso el selector será un anticuerpo espe-

cífico y la técnica se denominará radioinmunoensayo, como sucede con algunas hormonas polipeptídicas y esteroideas, así como con sustancias no hormonales, entre las que tenemos los fármacos (fig. 2).

SUSTANCIAS MEDIDAS POR RADIOINMUNOENSAYO

Sistemas inmunológicos (SELECTOR: anticuerpos)

Hormonas peptídicas

Hormonas no peptídicas

Sustancias no hormonales:

Medicamentos

Vitamina B₁₂

Factor intrínseco

Ácido fólico

Ferritina

AMPc, GMPc, UMPc

Adenil ciclasa

Prostaglandinas

Tripsina

Quimotripsina

Lipasa

Amilasa

Anhidrasa carbónica

Caseína

FIG. 2

En otras ocasiones, el sustrato no tiene actividad antigénica, en cuyo caso el selector puede ser una proteína a la que se liga el sustrato de forma específica (YALOW y BERSON³⁰), como sucede por ejemplo con la tiroxina que se liga a la TBG o el cortisol a la CBG (fig. 3).

SUSTANCIAS MEDIDAS POR RADIOANÁLISIS

Sistemas no inmunológicos

(SELECTOR: proteínas plasmáticas)

Tiroxina

Cortisol

Cortisona

Progesterona

Testosterona

FIG. 3

Otras veces, el selector es un receptor celular, como sucede por ejemplo con la hormona somatotropa y las células hepáticas o la hormona tireotropa y las células del folículo tiroideo (fig. 4).

SUSTANCIAS MEDIDAS POR RADIOANÁLISIS

Sistemas no inmunológicos

<i>Hormonas</i>	<i>Selector: receptores celulares</i>
HGH	Hígado
TSH	Tiroides
LH	Testículo y ovario
HCG	Testículo y ovario
Glucagón	Hígado
Insulina	Hígado
Adrenalina	Músculo cardíaco
Noradrenalina	Músculo cardíaco

FIG. 4

El selector puede ser también un factor o sistema enzimático con el que reacciona específicamente el sustrato, como sucede por ejemplo con la vitamina B₁₂ y el factor intrínseco, o con el ácido fólico y el metotrexato y la enzima folato-reductasa (fig. 5).

SUSTANCIAS MEDIDAS POR RADIOANÁLISIS

Sistemas no inmunológicos

<i>Sustancias no hormonales</i>	<i>Selector</i>
Vitamina B ₁₂	Factor intrínseco
Ácido fólico	F. A. reductasa
AMPc, GMPc	Fosfodiesterasa
RNA _m	DNA complementario
Metotrexato	F. A. reductasa

FIG. 5.

En el caso de estos sistemas no inmunológicos, la técnica se denomina radioanálisis competitivo.

Los requerimientos básicos de la técnica son los siguientes:

1. El *sustrato marcado* o indicador radiactivo, que debe tener una elevada actividad específica (radiactividad por unidad de peso de sustrato), de manera que permita su detección en concentraciones picomolares (10^{-12} mol).

Este indicador puede obtenerse por sustitución de un átomo de su molécula (H, C) por otro radiactivo (H^3 , C^{14}) o añadiendo a la molécula un nuevo átomo radiactivo, como sucede por ejemplo con la incorporación de I^{125} o I^{131} .

Cuando es posible, se prefiere el marcaje del sustrato con I^{125} o I^{131} , por ser isótopos emisores de radiaciones gamma y, por tanto, más fácilmente medidos, así como por tener un período físico mucho más corto.

De otra parte, el indicador radiactivo requiere pureza química o al menos que su reactividad con el selector sea idéntica a la del sustrato problema.

2. El *selector* requiere especificidad y sensibilidad. La especificidad depende de su capacidad de reconocer la estructura de la molécula del sustrato.

Estos selectores pueden ser:

2.1. *Anticuerpos*, cuando se trata de sustratos que posean capacidad inmunogénica. Las condiciones inmunológicas que deben cumplir son las siguientes:²²

- a) Que se produzcan anticuerpos al sustrato.
- b) Que estos anticuerpos tengan gran avidez por el sustrato y que se unan a él con fuerte energía de ligazón.
- c) Que se puedan obtener en cantidad suficiente para realizar múltiples determinaciones.

La fácil producción de anticuerpos a la insulina hizo pensar que el peso molecular del antígeno debería ser superior a 10.000, pero se han conseguido anticuerpos con moléculas tan pequeñas como la gastrina (2.100), ACTH (4.500) y oxitocina (1.000) (GOLDSMITH¹³).

2.2. Los selectores pueden ser *ligandos*, como por ejemplo globulinas, a las que se ligan específicamente algunos sustratos, como sucede por ejemplo con las hormonas tiroideas y la TBG.

2.3. Pueden ser *receptores celulares*, los cuales presentan la ventaja de estar más estrechamente relacionados con la actividad biológica, como sucede por ejemplo con la hormona tireotropa y las células tiroideas. Pero estos receptores celulares no siempre presentan especificidad molecular, a veces son difíciles de preparar y su estabilidad es muy limitada (GOLDSMITH¹⁴).

2.4. En otros casos, como sucede en el radioinmunoensayo de fármacos, se trata de sustratos no inmunogénicos, pero que pueden unirse

como haptenos a portadores proteicos antigénicos, con la consiguiente posibilidad de producir anticuerpos específicos.

El sustrato se acopla a sustancias inmunogénicas como la albúmina, globulina, hemocianina, polilisina e incluso se acopla formando homopolímeros. El acoplamiento se efectúa a través de diversos agentes como son la carbodiamida, que se une con los grupos carboxílicos de las proteínas, el glutaraldehído, que se une con los aminoácidos libres de las proteínas o los diisocianatos bifuncionales, que se unen con el grupo amino de las proteínas.

En todos los casos, el selector debe tener una elevada constante de afinidad por el sustrato y se ha demostrado¹³ que la mínima cantidad detectable de éste se aproxima al recíproco de su constante de afinidad.

3. El *Standard*, necesario para la preparación de las curvas de calibración y que ha de ser un producto químicamente puro o al menos presentar una identidad reactiva con el sustrato problema, aunque tengan algunas diferencias estructurales, como sucede por ejemplo con la digoxina y la I¹²⁵-tirosina-succinil-digoxina.

Ha de ser estable, de manera que no pierda actividad biológica en su conservación, manipulación y durante los períodos de incubación del análisis.

4. La *incubación* es necesaria para la formación del complejo sustrato marcado-selector y varía, en cuanto al tiempo de su duración y a la temperatura, según los diferentes sustratos y selectores.

Es preciso tener en cuenta la posible influencia de otros factores en la reacción, como son el medio iónico, pH, la presencia de sustancias contaminantes que puedan interferir con la porción reactiva de la molécula,¹³ así como el contenido proteico del medio de la reacción.

5. Finalizada la incubación es necesaria la *separación* del sustrato marcado libre del ligado al selector, para lo cual hay varias técnicas, la mayoría de ellas basadas en las diferencias de configuración molecular existentes entre el sustrato libre y ligado, como consecuencia del acoplamiento proteico.¹³

Hay tres técnicas principales, que son:

- a) Partición del sustrato marcado libre y ligado por cromatografía, electroforesis, Sephadex, diálisis.
- b) Absorción del sustrato marcado libre por carbón vegetal, talco, resinas, celulosa.
- c) Precipitación del sustrato marcado ligado por sales inorgánicas, como el sulfato amónico y el sulfato sódico, o por un segundo anticuerpo o por solventes orgánicos como el polietilenoglicol.

RADIOINMUNOENSAYO DE MEDICAMENTOS. — La mayoría de los medicamentos son moléculas relativamente pequeñas, con un peso molecular de alrededor de 1.000 y por ello no suelen ser inmunogénicas (BUT-

LER⁴). Es preciso, para obtener anticuerpos específicos o un medicamento, conjugarlo químicamente como un hapteno a una proteína antigénica o a un portador polipeptídico sintético, formando un complejo que sea capaz de provocar una inmunización en diversas especies animales, generalmente el conejo o cobaya, con respuesta productora de anticuerpos específicos al fármaco y susceptibles de ligarse selectivamente al medicamento libre en un medio biológico como el plasma, la orina u homogeneizados de tejidos.

La técnica presenta los siguientes requerimientos:

1. El *fármaco marcado* con un isótopo radiactivo, ya sea por síntesis (H^3 , C^{14}) o por iodación (I^{131} , I^{125}), siendo de elección, cuando sea posible, el I^{125} por ser emisor de radiaciones gamma, por la energía de estas radiaciones (0,035 MeV) y por su período físico de 60 días.

Como hemos indicado antes, para el sustrato marcado, es preciso que este fármaco marcado sea químicamente puro y que posea una elevada actividad específica, factores que van a determinar la sensibilidad del análisis y la eficacia de la medida.

2. *Acoplamiento* del fármaco en cuestión a un portador con actividad antigénica, con el objeto de formar conjugados capaces de producir anticuerpos específicos al medicamento, utilizando los métodos reseñados en la figura 6.

ACOPLAMIENTO DEL SUSTRATO A SUSTANCIAS INMUNOGÉNICAS

(albúmina, globulina, hemocianina, polilisina, homopolímeros)

- *carbodiámidas* (unión con los grupos carboxílicos de las proteínas).
 - *glutaraldehído* (unión con aminoácidos libres de las proteínas).
 - *diisocianatos* (unión con el grupo amino de las proteínas).
-

FIG. 6

3. Obtención de estos anticuerpos específicos por inyección del conjugado fármaco-portador a animales capaces de dar la respuesta inmunitaria.

Estos anticuerpos deben tener gran especificidad y elevada constante de afinidad por el fármaco y no deben reconocer a otros compuestos relacionados estructuralmente con ellos, los cuales podrían in-

terferir significativamente la reacción fármaco-anticuerpo, incluyendo entre éstos a los propios metabolitos del fármaco problema.

Por ello, es necesario, para cada radioinmunoensayo de un medicamento, establecer la *reactividad cruzada* con otros compuestos relacionados estructuralmente, lo que se hace calculando la concentración de medicamento que inhibe en un 50 % la unión del fármaco radiactivo al anticuerpo específico.

La lista de medicamentos que pueden ser determinados por radioinmunoensayo es ya muy amplia, pero el método está todavía en pleno desarrollo, y ha de llegar a introducirse ampliamente en los hospitales por su sensibilidad, especificidad, precisión y por la facilidad y rapidez de su realización, sobre todo si se compara con otras técnicas físico-químicas o biológicas, mucho más engorrosas.

La eficacia del método en su aplicación al control terapéutico medicamentoso requiere tres premisas básicas:

1.º Que haya una correlación entre los valores obtenidos en la concentración plasmática del fármaco y la respuesta terapéutica.

2.º Que la extracción de la muestra de plasma a analizar se efectúe cuando se haya alcanzado un equilibrio completo en la difusión del medicamento en el organismo.

3.º Que no haya reactividad cruzada entre el fármaco problema y otros medicamentos relacionados estructuralmente, que puedan estar presentes en el plasma, o con sus propios metabolitos, a no ser que, en la práctica, la concentración del fármaco «inmunoreactivo», incluidos sus metabolitos, se correlacionen con el efecto terapéutico.

Se han descrito métodos radioinmunológicos para la determinación de *glucósidos digitálicos* (digoxina, digitoxina, ouabaina y acetilestrofantidina; SMITH,²⁴ BELLER,² SHAPIRO²³), de *hipnóticos barbitúricos* (barbital, secobarbital, fenobarbital, pentobarbital, tiopental; FLYNN¹¹), de *hipnoanalgésicos* (morfina, codeína, normorfina, heroína, metadona, pentazocina, anileridina, meperidina, naloxona; SPECTOR,²⁵ BARTOS,¹ WILLIAMS,²⁹ VUNAKIS,²⁷ BERKOWITZ³), de *neurolépticos* (clorpromazina, promazina; KAWASHIMA¹⁶), de *tranquilizantes menores* (diazepam; PESKAR²¹), de estimulantes *psicomotores* (cafeína, teofilina, anfetamina; COOK,⁷ COOK,⁸ CASTRO⁵), de *antidepresivos* (amitriptilina, nortriptilina; LUCEK¹⁹), de *bloqueantes* beta adrenérgicos (propranolol; KAWASHIMA¹⁷), de *miorrelajantes* (d-tubocurarina; HOROWITZ¹⁵), de *anticonvulsivantes* (clonazepam; DIXON⁹), de *anestésicos locales* (cocaína; KAUL¹⁸), de *alucinógenos* (LSD; CASTRO⁶) y *antibióticos* (gentamicina, amikacina, tobramicina) y la lista permanece continuamente abierta, pues van apareciendo radioinmunoensayos para otros fármacos, a medida que se logra acoplarlos a sustancias antigénicas, capaces de provocar la producción de anticuerpos selectivos (véase tablas I a XVI).

TABLA I

<i>Sustrato</i>	<i>Sustrato marcado</i>	<i>Reactividad cruzada</i>	<i>Sensibilidad</i>
digoxina	I ¹²⁵ -digoxina	1	0,1 ng
digitoxina		0,00270	
corticosterona		0,00074	
prednisolona		0,00050	
espirolactona		0,00040	
progesterona		0,00040	
testosterona		0,00020	
estradiol		0,00000	

(Datos de Diagnostic Products Corp.)

TABLA II

<i>Sustrato</i>	<i>Sustrato marcado</i>	<i>Reactividad cruzada</i>	<i>Sensibilidad</i>
barbital	C ¹⁴ -barbital	20 ng	500 pg
secobarbital		5 ng	
fenobarbital		10 ng	
pentobarbital		10 ng	
tiopental		20 ng	
mefobarbital		+ 500 ng	
hexobarbital		+ 500 ng	
ácido barbitúrico		+ 500 ng	
difenilhidatoína		+ 500 ng	

(Datos de FLYNN y SPECTOR)

TABLA III

<i>Sustrato</i>	<i>Sustrato marcado</i>	<i>Reactividad cruzada</i>	<i>Sensibilidad</i>
morfina	H ³ -morfina	500 pg	50 pg
codeína		500 pg	
normorfina		500 pg	
heroína		500 pg	
morfina-3- monoglucurónido		200 ng	
nalorfina		200 ng	
metadona		200 ng	

(Datos de SPECTOR)

TABLA IV

<i>Sustrato</i>	<i>Sustrato marcado</i>	<i>Reactividad cruzada</i>	<i>Sensibilidad</i>
d, l-metadona	H ³ -d, l-metadona	100 %	1,4 pmol
d-metadona		50 %	
l-metadona		50 %	
morfina		0 %	
meperidina		0 %	

(Datos de BARTOS y cols.)

TABLA V

<i>Sustrato</i>	<i>Sustrato marcado</i>	<i>Reactividad cruzada</i>	<i>Sensibilidad</i>
anileridina	I ¹²⁵ anileridina	0,2 pmol	0,1 pmol
meperidina		3,5 pmol	
normeperidina		20 pmol	
difenoxilato		20,5 pmol	

(Datos de VUNAKIS y cols.)

TABLA VI

<i>Sustrato</i>	<i>Sustrato marcado</i>	<i>Reactividad cruzada</i>	<i>Sensibilidad</i>
pentazocina	H ³ -pentazocina	1	0,3 ng
levorfan		0,005	
nalorfina		0,002	
morfina		0,002	
codeína		0,002	
metadona		0,002	
meperidina		0,002	

(Datos de WILLIAMS y PITTMAN)

TABLA VII

<i>Sustrato</i>	<i>Sustrato marcado</i>	<i>Reactividad cruzada</i>	<i>Sensibilidad</i>
diazepam	C ¹⁴ -diazepam	9 ng	1 ng
oxazepam		+ 500 ng	
medazepam		+ 500 ng	
clordiazepóxido		+ 500 ng	
demoxepam		+ 500 ng	

(Datos de PESKAR y SPECTOR)

TABLA VIII

<i>Sustrato</i>	<i>Sustrato marcado</i>	<i>Reactividad cruzada</i>	<i>Sensibilidad</i>
amitriptilina	H ³ -amitriptilina	100 %	2 ng
nortriptilina		72 %	
perfenazina		1,2 %	
10-hidroxi-amitriptilina		0,59 %	
10-hidroxi-nortriptilina		0,46 %	
diazepam		0,01 %	

(Datos de LUCEK y DIXON)

TABLA IX

<i>Sustrato</i>	<i>Sustrato marcado</i>	<i>Reactividad cruzada</i>	<i>Sensibilidad</i>
cafeína	7-(2,3-H ³ -propil)-dimetilxantina	100 %	0,4 ng
teofilina		7 %	
teobromina		0,6 %	
xantina		0,001 %	

(Datos de COOK y cols.)

TABLA X

<i>Sustrato</i>	<i>Sustrato marcado</i>	<i>Reactividad cruzada</i>	<i>Sensibilidad</i>
teofilina	H ³ -teofilina	100 %	200 pg
cafeína		4,2 %	
teobromina		0,09 %	
l-metilxantina		0,08 %	
xantina		0,001 %	

(Datos de Cook y cols.)

TABLA XI

<i>Sustrato</i>	<i>Sustrato marcado</i>	<i>Reactividad cruzada</i>		<i>Sensibilidad</i>
	H ³ -propranolol	d,l-propranolol	l-propranolol	10 pg
l-propranolol		321 pg	120 pg	
d-propranolol		314 pg	1.656 pg	
4-hidroxi-propranolol		21.688 pg	4.072 pg	
pronetalol		45 % a 100 ng	29,5 ng	
isoproterenol		no inhibición a 100 ng		
adrenalina		no inhibición a 100 ng		
noradrenalina		no inhibición a 100 ng		
dopamina		no inhibición a 100 ng		

(Datos de KAWASHIMA y cols.)

TABLA XII

<i>Sustrato</i>	<i>Sustrato marcado</i>	<i>Reactividad cruzada</i>	<i>Sensibilidad</i>
d-tubocurarina	H ³ -d-tubocurarina	3 ng	3 ng
curina		+ 200 ng	
isocondodendrina		+ 200 ng	
acetil-colina		+ 2.10 ⁴ ng	
succinilcolina		+ 2.10 ⁵ ng	
decametonio		+ 2.10 ⁴ ng	
neostigmina		+ 5.10 ⁵ ng	

(Datos de HOROWITZ y SPECTOR)

TABLA XIII

<i>Sustrato</i>	<i>Sustrato marcado</i>	<i>Reactividad cruzada</i>	<i>Sensibilidad</i>
gentamicina	I ¹²⁵ gentamicina	100 %	1 microgramo
tobramicina		0 %	
penicilina		0 %	
kanamicina		0 %	
amikacina		0 %	
cefazolina		0 %	
cloranfenicol		0 %	
carbenicilina		0 %	
clindamicina		0 %	
ampicilina		0 %	

(Datos de Diagnostic Products Corp.)

TABLA XIV

<i>Sustrato</i>	<i>Sustrato marcado</i>	<i>Reactividad cruzada</i>	<i>Sensibilidad</i>
tobramicina	I ¹²⁵ tobramicina	100 %	1 microgramo
gentamicina		0 %	
penicilina		0 %	
cefazolina		0 %	
clorafenicol		0 %	
carbenicilina		0 %	
ampicilina		0 %	

(Datos de Diagnostic Products Corp.)

TABLA XV

<i>Sustrato</i>	<i>Sustrato marcado</i>	<i>Reactividad cruzada</i>	<i>Sensibilidad</i>
amikacina	I ¹²⁵ amikacina	100 %	3 microgramos
gentamicina		0 %	
tobramicina		0 %	
cefalotina		0 %	
carbenicilina		0 %	
oxacilina		0 %	
clorafenicol		0 %	

(Datos de Diagnostic Products Corp.)

TABLA XVI

<i>Sustrato</i>	<i>Sustrato marcado</i>	<i>Reactividad cruzada</i>	<i>Sensibilidad</i>
clorpromazina	H ³ clorpromazina	118 pg	10 pg
8-hidroxi- clorpromazina		559 pg	
6-hidroxi- clorpromazina		739 pg	
promazina		800 pg	
nor ₁ -clorpro- mazina		5.023 pg	
clorpromazina sulfóxido		7.032 pg	

(Datos de KAWASHIMA y cols.)

La importancia del método, como control de la terapéutica, ha quedado bien patente con el radioinmunoensayo de la digoxina y digitoxina, los cuales han demostrado que un 20 % de pacientes digitalizados con dosis usuales, presentaban niveles plasmáticos tóxicos de glucósidos digitálicos, mientras que un 36 % estaban subdigitalizados, estableciendo como niveles terapéuticos de 5 a 30 nanogramos/ml. para la digitoxina y de 0,5 a 2 nanogramos/ml. para la digoxina. La técnica es especialmente útil para los pacientes digitalizados que presentan una respuesta terapéutica inadecuada, o en los que se sospecha la existencia de intoxicación digitálica, o para los casos de administración previa incierta de digital y cuando se sospeche la existencia de una mala absorción o una función renal alterada.

La variabilidad en la respuesta farmacocinética, a la administración de una misma dosis de medicamento, adquiere singular importancia cuando se utilizan sustancias con gran selectividad de acción, para las que una variación de la respuesta cuantitativa, no debida al azar, sino a factores inherentes al sujeto que la recibe, puede tener consecuencias nocivas, unas veces porque no logre el efecto terapéutico esperado, otras por los resultados indeseables que pueden determinar, lo que hace necesaria la comprobación diaria en el plasma sanguíneo de los niveles medicamentosos terapéuticos, como sucede con los digitálicos, pues la digitalización implica un 40 % de la dosis letal y un 60 % de efectos tóxicos, como demostraron MAC INTOSH y MORRIS.

Desde los tiempos de Withering, la dosificación correcta de la digital ha sido siempre un problema y aunque se dispone de preparados de absorción más uniforme y de acción más constante, no por ello se ha resuelto el problema de su dosificación.

En nuestra experiencia los niveles plasmáticos terapéuticos útiles de digoxina, oscilan entre 0,8 y 1,4 nanogramos/ml, mientras que los efectos tóxicos se hacen evidentes con concentraciones superiores a los 3 nanogramos/ml. De todas formas, es preciso tener en cuenta la existencia de otros factores que influyen en la respuesta a los glucósidos digitálicos, unos aumentándola (hipotasemia, hipercalcemia, hipomagnesemia, disturbios del equilibrio ácido-base, aumento del tono adrenérgico, hipotiroidismo, hipoxemia, isquemia miocárdica), otros disminuyéndola (hiperpotasemia, hipertiroidismo, quinidina, procainamida, propranolol), de manera que puede haber síntomas tóxicos digitálicos con niveles relativamente bajos de glucósidos cardiotónicos en plasma.

La técnica de radioinmunoensayo para la digoxina es de realización muy sencilla y comprende cuatro etapas:

- 1.º Incubación de la digoxina del plasma y la digoxina-I¹²⁵ con el anticuerpo específico.

- 2.º Separación de la digoxina-I¹²⁵ libre de la ligada al anticuerpo.

- 3.º Medida de la radiactividad de la digoxina-I¹²⁵ ligada al anticuerpo.

- 4.º Cuantificación de los resultados con arreglo a una curva de calibración obtenida con digoxina standard y realizada en las mismas condiciones técnicas.

Utilizando este método nosotros hemos establecido los niveles plasmáticos de digoxina en el conejo, que corresponden a las alteraciones electrocardiográficas de la onda T y del segmento S-T ($0,53 \pm 0,10$ microgramos/ml. de digoxina), a la aparición de bloqueos aurículo-ventriculares ($1,24 \pm 0,30$ microgramos/ml.) y a la fibrilación ventricular ($2,43 \pm 0,45$ microgramos/ml.).

Otro ejemplo de las ventajas del radioinmunoensayo en el control terapéutico es el de la amitriptilina y su metabolito nortriptilina, que presentan variaciones individuales muy amplias en lo que respecta a su farmacocinética, y por ello, para una correcta dosificación, precisan la determinación de su concentración plasmática, habiéndose establecido como niveles terapéuticos útiles 43 nanogramos/ml. para la amitriptilina y de 23 nanogramos/ml. para la nortriptilina.

Asimismo la teofilina requiere unos niveles plasmáticos de 10 microgramos/ml. para lograr sus efectos terapéuticos, apareciendo los efectos tóxicos a partir de los 20 microgramos/ml., por lo que se hace necesaria la determinación de su concentración plasmática por radioinmunoensayo, ya que otros métodos clásicos de medida por absorción

ultravioleta o por cromatografía de alta resolución son más engorrosos y la mayoría de las veces más inciertos.

La producción de anticuerpos selectivos a un determinado fármaco, dotados de gran especificidad molecular, abre, probablemente, una nueva etapa en la Farmacología, no sólo porque en breve plazo dispondremos de radioinmunoensayo para fármacos con estrecho margen terapéutico, permitiendo individualizar mejor las dosis y de detectar más fácilmente fenómenos farmacogenéticos, de inducción enzimática, de mala absorción, etc., sino también por la posible utilización de los propios anticuerpos anti-fármacos en la alergia e intoxicación medicamentosa, como de hecho ya se ha intentado en la intoxicación digitalica.

BIBLIOGRAFIA

1. BARTOS, F., OLSEN, G. D.: Stereospecific antibodies to methadone. *Research*, vol. 16, n.º 1, 131, 1977.
2. BELLER, G. A., SMITH, T. W.: Radioimmunoassay of digitalis glycosides. *Nuclear Medicine In Vitro*. Ed. Rothfeld, B., J. B. Lippincott Co., Philadelphia y Toronto, 179, 1974.
3. BERKOWITZ, B. A., NGAI, S. H., HEMPSTEAD, J., SPECTOR, S.: Disposition of naloxone: use of a new radioimmunoassay. *The J. of Pharm. and Exp. Ther.*, vol. 195, n.º 3, 499, 1975.
4. BUTLER, V. P.: Radioimmunoassay and Competitive Binding Radioassay Methods for the Measurement of Drugs. *Metabolism*, vol. XXII, n.º 8, 1.145, 1973.
5. CASTRO, A., MALKUS, H.: Radioimmunoassay of drugs of abuse in humans: A review. *Research Com.*, vol. 16, n.º 2, 295, 1977.
6. CASTRO, A., GRETTE, D. P., BARTOS, F., BARTOS, D.: LSD radioimmunoassay. *Research Comm. in Chem. Path. and Pharm.*, vol. 6, n.º 3, 879, 1973.
7. COOK, C. E., TWINE, M. E., MYERS, M., AMERSON, E.: Theophylline radioimmunoassay: Synthesis of antigen and characterization of antiserum. *Research Comm. in Chem. Path. and Pharm.*, vol. 13, n.º 3, 497, 1976.
8. COOK, C. E., TALLENT, R., AMERSON, E. W., MYERS, M. W., KEPLER, J. A., TAYLOR, G. F., CHRISTENSEN, H. D.: Caffeine in plasma and saliva by a Radioimmunoassay procedure. *The J. Pharm. and Exp. Ther.*, vol. 199, n.º 3, 679, 1976.
9. DIXON, R., CREWS, T.: An I^{125} -radioimmunoassay for the determination of the anti-convulsant agent clorazepam directly in plasma. *Research Comm. in Chem. Path. and Pharm.*, vol. 18, n.º 3, 477, 1977.
10. FINDLAY, J. W. A., BUTZ, R. F., WELCH, R. M.: Specific radioimmunoassay for codeine and morphine. *Metabolism of codeine to morphine in the rat*. *Research Comm. in Chem. Path. and Pharm.*, vol. 17, n.º 4, 595, 1977.
11. FLYNN, E. J., SPECTOR, S.: Determination of barbiturate derivatives by radioimmunoassay. *The J. Pharm. and Exp. Ther.*, vol. 181, n.º 3, 547, 1972.
12. GIVOLD, D.: Procedures for sensitive immunoassay. In *Vitro Procedures With radioisotopes in Medicine*, IAEA, Viena, 515, 1970.
13. GOLDSMITH, S. L.: *Nuclear Medicine In Vitro*. Ed. Rothfeld, B., J. B. Lippincott Co., Philadelphia y Toronto, 96, 1974.
14. GOLDSMITH, S. L.: Radioimmunoassay. Eds. Freeman, L. y Blanford, M. D., Grune & Stratton, New York, 1, 1975.
15. HOROWITZ, P. E., SPECTOR, S.: Determination of serum d-tubocurarine concentration by radioimmunoassay. *The J. Pharm. and Exp. Ther.*, vol. 185, n.º 1, 94, 1973.
16. KAWASHIMA, K., LEVY, A., SPECTOR, S.: Stereospecific radioimmunoassay for propranolol isomers. *The J. Pharm. and Exp. Ther.*, vol. 196, n.º 2, 517, 1976.
17. KAWASHIMA, K., DIXON, R., SPECTOR, S.: Development of radioimmunoassay for Chlorpromazine. *European J. of Pharm.*, vol. 32, 195, 1975.

18. KAUL, B., MILLIAN, S., DAVIDOW, B.: The development of a radioimmunoassay for detection of cocaine metabolites. *The J. Pharm. and Exp. Ther.*, vol. 199, n.º 1, 171, 1976.
19. LUCEK, R., DIXON, R.: Specific radioimmunoassay for amitriptyline and nortriptyline in plasma. *Research Comm. in Chem. Path. and Pharm.*, vol. 18, n.º 1, 125, 1977.
20. OLIVER, G. C., JR., PARKER, B. M., BRASFIELD, D. L., PARKER, CH. W.: The measurement of digitoxin in human serum by radioimmunoassay. *The J. of Clin. Invest.*, vol. 47, n.º 5, 1.035, 1968.
21. PESHAR, B., SPECTOR, S.: Quantitative determination of diazepam in blood by radioimmunoassay. *The J. Pharm. and Exp. Ther.*, vol. 186, n.º 1, 167, 1973.
22. ROSSELIN, G.: Radioanalyse spécifique des milieux biologiques. *Medicine Nucleaire. Bases Theoriques*, Ed. Flammarion, Paris, 199, 1975.
23. SHAPIRO, B.: Pitfalls in the application of digoxin determinations. *Radioimmunoassay*. Ed. Freeman, L. y Blaufox, M. D., Grune & Straton, New York, 79, 1975.
24. SMITH, T. W.: Radioimmunoassay for serum digitoxin concentration: methodology and clinical experience. *The J. Phar. and Exp. Ther.*, vol. 175, n.º 2, 352, 1970.
25. SPECTOR, S., FLYNN, E. J.: Barbiturates: Radioimmunoassay. *Science*, vol. 174, n.º 4.013, 1.036, 1971.
26. SPECTOR, S., PARKER, CH. W.: Morphine: Radioimmunoassay. *Science*, vol. 168, 1.347, 1970.
27. VUNAKIS VAN H., WASSERMAN, E., LEVINE, L.: Specificities of antibodies to morphine. *The J. Pharm. and Exp. Ther.*, vol. 180, n.º 2, 514, 1972.
28. VUNAKIS VAN H., FREEMAN, D. S., GJIK, H. B.: Radioimmunoassay for anileridine, meperidine and other N-substituted phenylpiperidine carboxylic acid esters. *Research Comm. in Chem. Path. and Pharm.*, vol. 12, n.º 2, 379, 1975.
29. WILLIAMS, T. A., PITTMAN, K. A.: Pentazocine Radioimmunoassay. *Research Comm. in Chem. Path. and Phar.*, vol. 7, n.º 1, 119, 1974.
30. YALOW, R. S., BERSON, S. A.: General aspects of radioimmunoassay procedures. *In vitro procedures with radioisotopes in Medicine*. IAEA, 455, Viena, 1970.