

Cinética y equilibrio de la competición trazador-analito en radioinmunoanálisis de androstendiona

Kinetics and equilibrium of tracer-analyte competition in radioimmunoassay of androstendiona

OLIVAS ARROYO, C.; DUART DUART, M. J. Y MORENO FRIGOLS, J. L.

Departamento de Química Física. Facultad de Farmacia de Valencia. Servicio de Radioisótopos. Hospital Clínico Universitario de Valencia. Avda. Vicent Andrés Estellés s/n. 46110 Burjassot (Valencia)

RESUMEN

Se ha estudiado la cinética de la reacción entre la androstendiona marcada con ^{125}I y su anticuerpo específico utilizado en la determinación radioinmunoanalítica de dicha sustancia, encontrándose resultados ajustables a un modelo michaeliano. La presencia de androstendiona no marcada afecta a la reacción de un modo competitivo. Se encuentran cinéticas biexponenciales que sugieren reacciones con epítomos distintos. La influencia de la temperatura indica un control por difusión. Los resultados de equilibrio se ajustan al modelo de unión de dos ligandos sobre sitios independientes. Se desarrollan modelos teóricos compatibles con los resultados experimentales.

PALABRAS CLAVE: Androstendiona. Anticuerpo. Cinética. Equilibrio. Competición. Difusión.

ABSTRACT

We studied the kinetics of the reaction between ^{125}I labelled androstendiona and its specific antibody utilized in the radioimmunoanalytic determination of this substance, finding results that fit a michaeliano model. The presence of non labelled androstendiona affects the reaction of a competitive mode. We found bi-exponential kinetics that suggest reactions with distinct epitopes. The influence of the temperature indicated a diffusion control. The equilibrium results fit the model of binding of the two ligands on independent sites. We developed theoretical models compatible with the experimental results.

KEY WORDS: Androstendiona. Antibody. Kinetics. Equilibrium. Competition. Diffusion.

INTRODUCCIÓN

Las técnicas inmunoanalíticas y en particular el radioinmunoanálisis (RIA) se basan en el efecto competitivo para la unión a un anticuerpo entre la sustancia a valorar presente en una muestra y una cierta cantidad de la misma sustancia marcada radiactivamente.

La radiactividad del inmunocomplejo formado permite la determinación cuantitativa del analito.

En trabajos anteriores del departamento^{1,2,3,4,5,6,7} se ha seguido la cinética de algunas

reacciones implicadas en tales técnicas, habiéndose encontrado resultados ajustables a ecuaciones análogas a la de Michaelis-Menten. Por otra parte, la influencia de la temperatura sugiere que tales procesos podrían estar controlados por difusión^{8,9,10,11,12,13,14,15,16} lo cual ha sido estudiado por aplicación del modelo de Stenberg et al⁸, elaborado por este autor para el tratamiento específico de las reacciones antígeno-anticuerpo.

En el presente trabajo se pretende estudiar la competición antes mencionada desde los puntos de vista cinético y de equilibrio, así como profundizar en el conocimiento del efecto de la difusión sobre

el proceso para el caso de la androstendiona, sustancia comúnmente valorada por RIA en muestras sanguíneas humanas y cuya determinación analítica es de interés en distintos trastornos endocrinos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos y productos químicos.- Disolución de androstendiona marcada con ^{125}I . Disoluciones patrones de androstendiona no marcada. Tubos de plástico recubiertos de anticuerpo anti androstendiona en su pared interior, suministrados por DPC, incluidos en el kit para valoración radioinmunoanalítica de androstendiona.

Instrumentación.- Contador de radiación Gamma LKB Gammamaster Automatic Gamma Counter.

Procedimiento experimental.- En los tubos recubiertos de anticuerpo se colocaron 100 μl de disolución de androstendiona no marcada y 1ml de disolución de androstendiona marcada. La mezcla de reacción se mantuvo durante diferentes tiempos, al cabo de los cuales se decantaron y lavaron los tubos y se midió su radiactividad en el contador. En todas las series se realizó una determinación con dos días de incubación, considerada como tiempo infinito, correspondiente al equilibrio, y se midió la radiactividad total añadida como medida indirecta de la concentración inicial de androstendiona marcada. Se realizó un total de 81 experiencias; en las primeras 31 se estudiaron conjuntamente la cinética y el equilibrio, en las restantes, solo el equilibrio.

Símbolos

t - tiempo en minutos.

Z_n - radiactividad en cuentas por minuto (cpm), medida en cada tubo después de la incubación. Se supone directamente proporcional a la cantidad de inmunocomplejo formado. El subíndice indica el número de la experiencia.

P - anticuerpo unido a la pared del tubo.

M - androstendiona marcada.

Q - androstendiona no marcada.

P_0 - concentración de lugares de unión en el anticuerpo expresada en unidades arbitrarias.

M_0 - concentración inicial de M en cpm.

V_0 - velocidad inicial en $\text{cpm}\cdot\text{min}^{-1}$.

T - temperatura en Kelvin.

$(Q)_0$ - concentración inicial de Q en $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$.

k - constante de velocidad.

K - constante de equilibrio.

PM - Inmunocomplejo radiactivo.

PQ - inmunocomplejo no radiactivo

Determinación de la velocidad inicial.- Los valores de Z obtenidos en función del tiempo se ajustaron en todos los casos a la ecuación:

$$Z = A + Bt + Ct^2$$

Puesto que Z se supone, en principio, proporcional a la concentración de inmunocomplejo radiactivo, puede escribirse:

$$Z = \alpha \cdot (PM) = A + Bt + Ct^2$$

α = constante de proporcionalidad

$$V = \frac{dZ}{dt} = \alpha \cdot \frac{d(PM)}{dt} = B + 2Ct$$

$$V_0 = \left(\frac{dZ}{dt} \right)_{t=0} = \alpha \cdot \left(\frac{d(PM)}{dt} \right)_{t=0} = B$$

De donde se deduce que el coeficiente "B" puede identificarse con la velocidad inicial del proceso si la actividad en cpm del inmunocomplejo se acepta como una medida de su concentración en unidades arbitrarias. La conversión en $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ exigiría el conocimiento de la constante α .

RESULTADOS

Influencia de la concentración de androstendiona marcada y no marcada sobre la velocidad inicial de la reacción.

Se estudió en las experiencias 1-15, cuyos resultados se exponen en la tabla 1.

TABLA I. Influencia de M_0 y $(Q)_0$ sobre la velocidad inicial de reacción. T = 18°C.

t	0	10	30	60	90	120	∞	V_0	M_0	$(Q)_0$
Z ₁	461,5	3178	5173	7050	9050	9678	16094	142.0 (r=0.998)	33140.0	0
Z ₂	398,6	1799	3824	5807	7398	7980	13498	118.8 (r=0.999)	27816.0	0
Z ₃	505,1	1670	3209	4357	6052	6428	10833	86.1 (r=0.995)	2155.5	0
Z ₄	395,5	1334	2707	3543	4627	4722	8549	74.0 (r=0.995)	16298.8	0
Z ₅	240,0	1001	1898	2630	3079	3456	5733	51.1 (r=0.994)	11099.3	0
Z ₆	371,8	1852	3279	4483	5353	6207	11028	84.3 (r=0.991)	33140.0	0.302
Z ₇	302,2	1154	2529	3694	4133	4901	9079	70.3 (r=0.994)	27816.0	0.302
Z ₈	295,2	1098	2141	2791	3533	3932	7667	54.3 (r=0.993)	2155.5	0.302
Z ₉	204,4	848,6	1703	2206	2805	3230	5501	42.3 (r=0.992)	16298.8	0.302
Z ₁₀	202,0	711,6	1299	1548	1819	2161	4019	27.9 (r=0.980)	11099.3	0.302
Z ₁₁	232,5	913,0	1480	1902	2410	2557	4046	36.6 (r=0.990)	33140.0	2.222
Z ₁₂	150,8	465,0	1067	1466	1807	1986	3428	29.4 (r=0.997)	27816.0	2.222
Z ₁₃	166,5	488,5	822.9	1055	1420	1555	2880	19.1 (r=0.992)	2155.5	2.222
Z ₁₄	180,0	365,4	674.2	906.7	1056	1086	1938	16.8 (r=0.998)	16298.8	2.222
Z ₁₅	77,5	186,0	362.7	550.4	688.7	731.1	1111	10.5 (r=0.999)	11099.3	2.222

Los resultados de la tabla I se plasman en la ecuación:

$$V_0 = \frac{44.732 \cdot 10^{-3} M_0}{1 + 2.110(Q)_0 + 4.589 \cdot 10^{-6} M_0} \quad (r = 0.992) \quad (\text{Eq 1})$$

Influencia de la temperatura sobre la velocidad inicial de la reacción.

Se estudió en las experiencias 16-31, cuyos resultados se exponen en la tabla 2.

TABLA 2.- INFLUENCIA DE T SOBRE LA V_0 DE REACCIÓN

t	0	10	30	60	90	120	∞	V_0	M_0	T
Z ₁₆	495.5	7175.5	11196.9	13984.0	16315.1	18390.5	27594.5	280.3	59484.0	278
Z ₁₇	414.6	5353.8	9698.4	12356.0	14031.5	15853.0	22152.5	254.9	44726.5	278
Z ₁₈	490.9	4279.7	6957.7	9060.5	9583.8	10237.7	5248.7	187.3	28876.0	278
Z ₁₉	266.1	2243.7	3882.0	4849.5	5226.4	5643.6	8021.2	101.1	14223.4	278
Z ₂₀	495.5	6424.6	11318.9	14753.2	18354.4	21798.2	29219.7	285.9	59484.0	286
Z ₂₁	414.6	5553.2	9088.0	13052.5	14903.6	16769.4	23731.6	261.1	44726.5	286
Z ₂₂	490.9	4214.8	6728.3	8448.5	10100.1	12473.7	15919.9	152.1	28876.0	286
Z ₂₃	266.1	2238.5	3448.5	4825.0	5174.6	6309.0	8283.5	84.8	14223.4	286
Z ₂₄	495.5	8078.9	14143.1	17596.6	20120.7	24850.5	27086.4	337.2	59484.0	294
Z ₂₅	414.6	6420.6	11291.5	14955.5	16094.7	19831.7	22659.4	287.5	44726.5	294
Z ₂₆	490.9	4880.6	8113.8	9680.3	11468.9	14032.1	16000.0	180.8	28876.0	294
Z ₂₇	266.1	2412.9	4010.0	5425.5	6049.2	7219.8	8412.0	102.8	14223.4	294
Z ₂₈	495.5	9083.4	14335.3	18112.8	20533.0	23428.0	25108.2	363.6	59484.0	301
Z ₂₉	414.6	7411.0	11521.5	15066.0	16460.7	18399.1	20483.4	305.9	44726.5	301
Z ₃₀	490.9	5217.6	8283.7	9847.6	11724.8	13250.6	14521.2	195.8	28876.0	301
Z ₃₁	266.1	2764.4	4418.5	5406.0	6315.0	6693.1	7756.8	113.0	14223.4	301

Los resultados de la tabla 2 se plasman en la ecuación:

$$V_0 = \frac{1125.4 \cdot T \cdot e^{-\frac{1668.6}{T}} \cdot M_0}{M_0 + 2.982 \cdot 10^7 \cdot e^{-\frac{1575.7}{T}}} \quad (r = 0.987) \quad (\text{Eq 2})$$

Relación concentración de androstendiona marcada-tiempo según el método integral.

Los valores de z se ajustan a la ecuación general:

$$Z = a - b(\exp(-ct) + \exp(-dt))$$

Cuyos parámetros y coeficientes de correlación se expresan en la tabla 3.

TABLA 3.- PARAMETROS Y COEFICIENTES DE CORRELACION DE LA ECUACION

$$Z = a - b(\exp(-ct) + \exp(-dt))$$

	a	b	c	d	r
Z ₁	16106	7650	0.02429	0.00195	0.998
Z ₂	13503	6545	0.02000	0.00253	1.000
Z ₃	10834	5118	0.01755	0.00270	0.998
Z ₄	8724	4150	0.02281	0.00105	0.999
Z ₅	5744	2730	0.02517	0.00176	1.000
Z ₆	11241	5340	0.02035	0.00105	0.999
Z ₇	9353	4510	0.01897	0.00090	0.999
Z ₈	7936	3763	0.01603	0.00084	0.999
Z ₉	5510	2618	0.01965	0.00182	0.999
Z ₁₀	4141	1915	0.01686	0.00084	0.996
Z ₁₁	4046	1870	0.02706	0.00223	0.997
Z ₁₂	3437	1647	0.02183	0.00175	1.000
Z ₁₃	2917	1352	0.01614	0.00119	0.998
Z ₁₄	1998	913	0.02362	0.00086	1.000
Z ₁₅	1112	519	0.02043	0.00401	0.999

Influencia de las concentraciones de androstendiona marcada y no marcada sobre los resultados en el equilibrio.

Se exponen en la tabla 4:

TABLA 4.- INFLUENCIA DE M_0 y $(Q)_0$ SOBRE EL EQUILIBRIO			
M_0	B	F	Q
33140.0	16094.6	17045.4	0
27816.0	13498.5	14317.5	0
21555.5	10833.0	10722.5	0
16298.8	8549.6	7749.2	0
11099.3	5733.5	5365.8	0
33140.0	11028.5	22111.5	0.302
27816.0	9079.8	18736.2	0.302
21555.5	767.0	13888.5	0.302
16298.8	5501.6	10797.2	0.302
11099.3	4019.7	7079.6	0.302
33140.0	4046.6	29093.4	2.222
27816.0	3428.3	24387.7	2.222
21555.5	2880.5	18675.0	2.222
16298.8	1938.2	14360.6	2.222
11099.3	1111.9	9987.4	2.222

Los resultados de la tabla 4 se plasman en la ecuación:

$$B = \frac{1.2372 \cdot F}{1 + 3.505(Q)_0 + 2.002 \cdot 10^{-5} \cdot F}$$

$$(r = 0.998) \quad (\text{Eq 3})$$

Influencia de la temperatura sobre el equilibrio.

Los resultados se exponen en la tabla 5:

TABLA 5.- INFLUENCIA DE T SOBRE EL EQUILIBRIO.			
M ₀	B	F	T
55646.0	27594.5	28051.5	278
41394.0	22152.5	19241.5	278
26593.6	15248.7	11344.9	278
13244.8	8021.2	5223.6	278
55646.0	29219.7	26426.3	286
41394.0	23731.6	17662.3	286
26593.6	15919.9	10673.7	286
13244.8	8283.5	4961.3	286
5564.6	27086.4	28559.6	294
41394.0	22659.4	18734.6	294
26593.6	16000.0	10593.6	294
13244.8	8412.0	4832.8	294
5564.6	25108.2	30537.8	301
41394.0	20483.4	20910.6	301
26593.6	14521.2	12072.4	301
13244.8	7756.8	5488.0	301

Los resultados de la tabla 5 se plasman en las ecuaciones:

$$B_{278} = \frac{54000 \cdot F}{F + 27851} \quad (r = 0.998) \quad (\text{Eq 4})$$

$$B_{286} = \frac{54000 \cdot F}{F + 23659} \quad (r = 0.994) \quad (\text{Eq 5})$$

$$B_{294} = \frac{54000 \cdot F}{F + 26584} \quad (r = 0.997) \quad (\text{Eq 6})$$

$$B_{301} = \frac{54000 \cdot F}{F + 34103} \quad (r = 0.999) \quad (\text{Eq 7})$$

Que se resume en la ecuación:

$$B = \frac{53624 \cdot F}{F + 327104 \cdot e^{-\frac{716.9}{T}}} \quad (r = 0.982) \quad (\text{Eq 8})$$

Influencia conjunta de la concentración de androstendiona no marcada y la temperatura sobre el equilibrio

Se estudió en la experiencias 32-56 y 57-81 cuyos resultados se exponen en las tablas 6y 7:

TABLA 6.- INFLUENCIA CONJUNTA DE (Q) y T SOBRE EL EQUILIBRIO.									
Exp	(Q)	B	F	B	F	B	F	B	F
32	0.048	16559.5	17854.0	16564.7	17837.0	13239.8	21174.0	8761.5	25652.0
33	0.048	13822.0	15530.5	14363.6	14999.0	11056.0	18296.5	8013.0	21339.5
34	0.048	11213.9	11986.0	11269.4	11919.7	9108.7	14091.0	6233.6	16966.0
35	0.048	8469.7	9513.3	9452.1	8526.8	7347.5	10635.5	4961.1	13022.0
36	0.048	6252.4	5852.0	6545.5	5581.1	5161.1	6943.2	4244.5	7859.8
37	0.127	14801.5	19612.0	14570.1	19831.5	12290.0	22123.5	8000.5	26413.0
38	0.127	11904.1	17448.5	12390.9	16971.4	11152.5	18200.0	6483.4	22869.0
39	0.127	9738.0	13461.5	10135.1	13053.8	8419.1	14780.4	5663.4	17536.1
40	0.127	7581.8	10401.2	7871.0	10107.9	7065.7	10917.0	4669.6	13313.4
41	0.127	5353.2	6751.0	5493.1	6634.0	4719.3	7385.0	3346.5	8758.0
42	0.476	10718.5	23695.0	10375.4	24025.5	10180.0	24233.5	5330.0	29083.5
43	0.476	9707.0	19645.5	9050.7	20311.0	7236.7	22116.0	4537.5	24815.0
44	0.476	7480.2	15719.0	7542.9	15646.0	6570.8	16629.0	3872.4	19327.0
45	0.476	5736.0	12247.0	5545.0	12433.7	4690.4	13292.6	2953.9	15029.0
46	0.476	3923.0	8181.3	3894.0	8233.2	4193.1	7911.2	2042.2	10062.0
47	1.270	7282.0	27131.5	6378.4	28023.2	5956.5	28457.0	3381.9	31031.6
48	1.270	5998.0	23354.5	5374.1	23988.4	4689.5	24663.0	2882.8	26469.7
49	1.270	4709.7	18489.8	4137.1	19051.3	3897.8	19301.8	2111.8	21088.0
50	1.270	3826.6	14156.0	3464.8	14514.2	2896.1	15087.0	1753.7	16229.0
51	1.270	2466.5	9638.0	2701.8	9425.3	2577.0	9527.3	1212.2	10892.0
52	3.175	5088.5	29325.0	3756.0	30645.5	3288.6	31125.0	1988.5	32436.0
53	3.175	4382.5	24970.0	3215.0	26146.7	2878.8	26474.0	1622.5	27730.0
54	3.175	3499.3	19700.2	2516.5	20672.4	2050.2	21149.0	1247.2	21952.3
55	3.175	2549.9	15433.0	2216.6	15762.6	2085.4	15898.0	999.5	16983.5
56	3.175	1670.4	10434.0	1615.3	10511.8	1112.2	10992.0	737.4	11367.0
	T(K)	278		295		299		310	

TABLA 7.- INFLUENCIA CONJUNTA DE (Q) y T SOBRE EL EQUILIBRIO.									
Exp	(Q)	B	F	B	F	B	F	B	F
57	0.048	15901.3	18512.2	14729.1	19684.4	13356.8	21056.7	9130.4	25283.1
58	0.048	14110.5	15242.0	12760.6	1659.2	10712.0	18640.5	7640.0	21712.5
59	0.048	11221.4	11978.1	10318.3	12881.2	8949.3	14250.2	6734.0	16385.5
60	0.048	9342.6	8640.4	7880.9	10102.1	7387.1	10595.9	5613.0	12792.0
61	0.048	6155.4	5948.9	6023.9	6084.4	5148.5	6955.8	3591.5	8512.8
62	0.127	15125.9	19287.6	13261.3	21152.2	12079.8	22333.7	8360.9	26052.5
63	0.127	11602.6	17749.9	10996.3	18356.2	10831.6	18520.9	6415.6	22936.9
64	0.127	10169.2	13030.3	8658.7	14540.8	8468.4	14731.1	5818.9	17300.5
65	0.127	8563.7	9419.3	7622.5	10360.5	6709.5	11273.1	4808.2	13536.3
66	0.127	5326.7	6777.6	5143.3	6961.0	4913.1	7191.2	3191.6	8912.7
67	0.476	10782.8	23630.7	10487.1	23926.4	8914.8	25498.7	6232.1	28181.4
68	0.476	9421.9	19930.5	8954.2	20398.3	7052.3	22300.2	5457.3	23895.2
69	0.476	7579.4	15620.1	7155.0	16044.5	5999.3	17200.2	4455.1	18665.0
70	0.476	6494.2	11488.7	4348.6	12634.4	4929.9	13053.1	3580.9	14671.4
71	0.476	4030.1	8074.2	4219.0	7885.3	3447.0	8657.3	2476.7	9627.6
72	1.270	7499.6	26913.9	6470.7	27943.0	5350.3	29063.2	4069.6	30343.9
73	1.270	5880.4	23472.1	5370.7	23982.0	4831.5	24521.0	3198.3	26154.2
74	1.270	4778.0	18421.5	4013.8	19185.7	3714.5	19485.0	2534.7	20584.8
75	1.270	4132.9	13850.0	3587.5	14395.5	3063.6	14919.4	2236.8	15914.4
76	1.270	2644.3	9459.9	2377.3	9727.0	2230.3	9874.0	1377.1	10727.3
77	3.175	4793.1	29620.4	4005.3	30408.2	3354.0	31059.5	2355.9	32057.5
78	3.175	3690.3	25662.0	3505.3	25847.2	2592.6	26759.9	1886.0	27466.5
79	3.175	3156.5	20042.9	2524.0	20675.5	2001.6	21197.9	1618.2	21501.3
80	3.175	2390.0	15593.0	2034.0	15949.0	1710.0	16273.0	1379.9	16707.0
81	3.175	1662.6	10441.7	1736.0	10368.0	1191.0	10913.3	835.4	11268.9
	T(K)	278		295		299		310	

Los resultados de las tablas 6 y 7 se plasman en las ecuaciones:

$$B_{278} = \frac{34062 \cdot F}{F + 64844(Q)_0 + 20927} \quad (r = 0.982) \quad (\text{Eq 9})$$

$$B_{295} = \frac{34062 \cdot F}{F + 78106(Q)_0 + 21882} \quad (r = 0.980) \quad (\text{Eq 10})$$

$$B_{299} = \frac{34062 \cdot F}{F + 87070(Q)_0 + 32041} \quad (r = 0.989) \quad (\text{Eq 11})$$

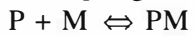
$$B_{310} = \frac{34062 \cdot F}{F + 154348(Q)_0 + 65115} \quad (r = 0.988) \quad (\text{Eq 12})$$

Que se resumen en la ecuación:

$$B = \frac{34062 \cdot F}{F + 3.199 \cdot 10^7 \cdot e^{-\frac{11735}{T}} \cdot (Q)_0 + 2.710 \cdot 10^8 \cdot e^{-\frac{2676}{T}}} \quad (r = 0.946) \quad (\text{Eq 13})$$

DISCUSIÓN

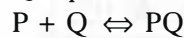
Se estudia la cinética y el equilibrio de un proceso que globalmente se esquematiza como:



P = Anticuerpo unido a la pared del tubo.

M = Androstendiona marcada con ¹²⁵I.

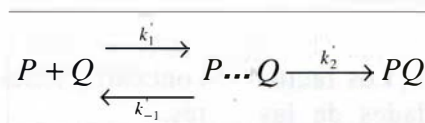
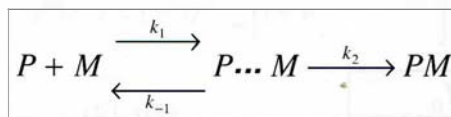
Que puede ser interferido por la presencia de Q



Q= Androstendiona no marcada.

Influencia de la concentración de androstendiona marcada y no marcada sobre la velocidad inicial de la reacción.

Se interpreta admitiendo que la formación de los inmunocomplejos PM y PQ transcurren en dos etapas:



En ambos casos la primera etapa corresponde a la aproximación de los reaccionantes hasta formar un par de encuentro. Se considera reversible porque dicho par puede disociarse, aunque tal disocia-

ción es improbable debido al efecto celda. En la segunda etapa se produce la reacción propiamente dicha. La primera etapa es la más lenta y por tanto, el proceso global está controlado por la

difusión, lo cual es coherente con el bajo valor de la entalpía de activación encontrado (véase discusión sobre la influencia de la temperatura), inferior a la energía de flujo viscoso del agua. La propia naturaleza de la reacción avala también este supuesto, ya que, al tratarse de sustan-

cias «destinadas» a reaccionar específicamente entre sí, cabe esperar que no presenten grandes exigencias en cuanto a la activación.

Con estas premisas y suponiendo estado estacionario para los inmunocomplejos, puede escribirse:

$$\frac{d(P...M)}{dt} = k_1(P)(M) - (k_{-1} + k_2)(P...M) = 0$$

$$\frac{(P...M)}{(P)(M)} = \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} = K_c$$

$$\frac{d(P...Q)}{dt} = k'_1(P)(Q) - (k'_{-1} + k'_2)(P...Q) = 0$$

$$\frac{(P...Q)}{(P)(Q)} = \frac{k'_1}{k'_{-1} + k'_2} = K'_c$$

$$(P)_0 = (P) + (P...M) + (P...Q) + (PM) + (PQ) = (P) + K_c(P)(M) +$$

$$+ K'_c(P)(Q) + (PM) + (PQ) = (P)[1 + K_c(M) + K'_c(Q)] + (PM) + (PQ)$$

$$(P) = \frac{(P)_0 - (PM) - (PQ)}{1 + K_c(M) + K'_c(Q)}$$

$$V = \frac{dZ}{dt} = \alpha \cdot \frac{d(PM)}{dt} = \alpha \cdot k_2(P...M) = \frac{\alpha \cdot k_2 K_c(M)[(P)_0 - (PM) - (PQ)]}{1 + K_c(M) + K'_c(Q)}$$

Y para t = 0, resulta:

$$V_0 = \frac{k_v K_c P_0 M_0}{1 + K'_c(Q)_0 + K_c(M)_0}$$

(Eq 14)

Ecuación coincidente con Eq 1. Los factores de conversión para las unidades de las

concentraciones se engloban en las constantes.

Influencia de la temperatura sobre la velocidad inicial de la reacción.

Si en la Eq 14 se hace $(Q)_0 = 0$, se dividen los términos de la fracción por K_c , y se reúnen las constantes, resulta:

$$V_0 = \frac{D \cdot M_0}{E + M_0}$$

El término D es proporcional a la constante de velocidad k_v y E es la constante de equilibrio para

la disociación de la especie $(P...M)$; expresando ambos en las formas de Eyring y van't Hoff, resulta:

$$V_0 = \frac{\beta T \cdot e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}} M_0}{M_0 + \gamma \cdot e^{-\frac{\Delta H^\circ}{RT}}} \quad (\text{Eq 15})$$

Coincidente con la Eq 2, de la que se obtiene: $\Delta H^\ddagger = 1,39 \cdot 10^4 \text{ Jmol}^{-1}$, inferior a la energía de

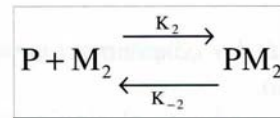
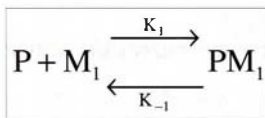
flujo viscoso del agua, de lo que se deduce que el proceso global está controlado por difusión.

Relaciones concentración de sustancia marcada-tiempo según el método integral.

Los datos se ajustan a la ecuación modelo:

$$Z = a - b(\exp(-ct) + \exp(-dt)) \quad (\text{Eq 16})$$

Cuya forma biexponencial sugiere la existencia de dos procesos distintos;



Para el primero de ellos puede escribirse:

$$\frac{d(PM_1)}{dt} = k_1(P)(M_1) - k_{-1}(PM_1)$$

Que suponiendo exceso de P, conduce a:

$$(PM_1) = (PM_1)_\infty \left[1 - e^{-(k_{D1} + k_{-1})t} \right]$$

Donde $k_{D1} = k_1(P)$

Análogamente, para el otro inmunocomplejo resulta:

$$(PM_2) = (PM_2)_\infty \left[1 - e^{-(k_{D1} + k_{-1})t} \right]$$

La actividad medida es directamente proporcional a la suma de las concentraciones de ambos productos:

$$Z = \alpha \cdot [(PM_1) + (PM_2)] \quad \text{y por tanto:}$$

$$Z = \alpha \cdot \left[(PM_1)_\infty \left[1 - e^{-(k_{D1} + k_{-1})t} \right] + (PM_2)_\infty \left[1 - e^{-(k_{D2} + k_{-2})t} \right] \right]$$

Que simplificando, puede escribirse en la forma:

$$Z = a - b \cdot e^{-\epsilon \cdot t}$$

de donde resulta:

$$Z_0 = a - b - c \qquad Z_\infty = a$$

$$\frac{Z_\infty - Z}{Z_\infty - Z_0} = \frac{b}{b+c} \cdot e^{-\epsilon \cdot t} + \frac{c}{b+c} \cdot e^{-\omega \cdot t}$$

Si se supone que las concentraciones a tiempo infinito de ambos inmunocomplejos son iguales, lo cual equivale a suponer $b = c$ resulta:

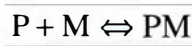
$$\frac{Z_\infty - Z}{Z_\infty - Z_0} = \frac{1}{2} (e^{-\epsilon \cdot t} + e^{-\omega \cdot t})$$

$$\frac{Z_\infty - Z}{Z_\infty - Z_0} = \frac{1}{2} (e^{-\epsilon \cdot t} + e^{-\omega \cdot t})$$

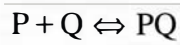
Equivalente a Eq 16.

Influencia de las concentraciones de androstendiona marcada y no marcada sobre los resultados en el equilibrio.

Se justifica mediante el siguiente modelo:



$$K_M = \frac{(PM)}{(P)(M)}$$



$$K_Q = \frac{(PQ)}{(P)(Q)}$$

Lo cual implica que las especies M y Q compiten por la unión a P. Las constantes K_M y K_Q son macroconstantes, y las concentraciones de PM, y Q incluyen todas las formas posibles de tales especies. Con estas premisas puede escribirse:

$$(P)_0 = (P) + (PQ) + (PM) = (P) + K_Q (P)(Q) + K_M (P)(M) = (P) \left[1 + K_Q (Q) + K_M (M) \right]$$

$$(Q)_0 = (Q) + (PQ) = (Q) + K_Q (P)(Q) = (Q) \left[1 + K_Q (P) \right]$$

$$(PM) = K_M (P)(M) = \frac{K_M (P)_0 (M)}{1 + K_Q (Q) + K_M (M)} = \frac{K_M (P)_0 (M)}{1 + \frac{K_Q}{1 + K_Q (P)} (Q)_0 + K_M (M)}$$

El término $\frac{K_Q}{1 + K_Q(P)}$ puede, con alguna aproximación, expresarse como una constante única.

Además las radiactividades de PM y M en el equilibrio se representan por B y F. Con éstos cambios y englobando los factores de conversión en las constantes, resulta:

$$B = \frac{K_1 P_0 F}{1 + K_2(Q)_0 + K_1 F} \quad (\text{Eq 17})$$

Ecuación equivalente a Eq 3. El término P_0 representa la concentración inicial de lugares de unión, expresado en las mismas unidades que B. Por tanto, puede también identificarse con el valor de B que se obtendría para un valor muy grande de F, es decir, la actividad máxima que puede ligar el anticuerpo cuando todos sus sitios de unión están ocupados.

Influencia de la temperatura sobre el equilibrio.

La Eq 17 para $(Q)_0 = 0$ se escribe en la forma:

$$B = \frac{K_1 P_0 F}{1 + K_1 F} = \frac{P_0 F}{F + \frac{1}{K_1}} = \frac{P_0 F}{F + K_1'}$$

Equivalente a las ecuaciones 4, 5, 6 y 7.

La constante K_1' es recíproca de K_1 y por tanto, representa la constante de equilibrio para la disociación del complejo. Expresándola en forma de Van't Hoff, resulta:

$$B = \frac{P_0 F}{F + K \cdot e^{-\frac{\Delta H^0}{RT}}} \quad \text{Equivalente a la Eq 8.}$$

Influencia conjunta de la concentración de androstendiona no marcada y la temperatura sobre el equilibrio.

La Eq 17 puede escribirse en la forma:

$$B = \frac{P_0 F}{F + K_3(Q)_0 + K_4} \quad (\text{Eq 18}).$$

Siendo: $K_3 = \frac{K_2}{K_1}$ y $K_4 = \frac{1}{K_1}$

Equivalente a las ecuaciones 9, 10, 11, 12.

Si en Eq 18 se escriben las constantes en la forma de Van't Hoff, resulta:

$$B = \frac{P_0 F}{F + K \cdot e^{-\frac{\Delta H}{RT}} + K' \cdot e^{-\frac{\Delta H'}{RT}}} \quad \text{Equivalente a Eq 13.}$$

CONCLUSIONES

1.- La cinética de la reacción entre la androstendiona marcada con ^{125}I y su anticuerpo ligado a la pared del tubo sugiere un mecanismo en dos etapas, siendo la primera de aproximación entre las moléculas reaccionantes, y la segunda de reacción propiamente dicha.

2.- La androstendiona no marcada presente en la muestra se comporta como un inhibidor competitivo con respecto a la reacción anterior.

3.- La temperatura tiene un efecto poco importante con valores bajos de entalpía de activación, de lo cual se deduce que el proceso global está controlado por difusión.

4.- Las ecuaciones integradas de velocidad muestran la existencia de dos constantes que se atribuyen a reacciones con epítomos distintos.

5.- Los resultados de equilibrio se ajustan a un modelo de sitios independientes, cuya ocupación por los ligandos marcado y no marcado se rige por un mecanismo competitivo.

6.- La disociación del inmunocomplejo es endotérmica con un valor de $\Delta H^0 = 5,96 \cdot 10^3 \text{Jmol}^{-1}$ relativamente bajo como corresponde a uniones no covalentes, que son las que generalmente se admite que predominan en los complejos antígeno-anticuerpo.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Gallego García C.: «Un posible modelo cinético para algunas reacciones Ag-Ac». Tesis Doctoral. 1987. Universidad de Valencia.
- (2) Gallego García, C., Moreno Frigols, J.L., Ciudad Platero, J.: «Estudio cinético de la reacción antígeno-anticuerpo que tiene lugar en la valoración de la hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) mediante radioinmunoanálisis (RIA)». An. Real Acad. Farm. (1991), **57**:581-59.
- (3) Anton-Fos, G.M., Moreno Frigols, J.L., Salabert Salvador, M.T., Mut Ronda, S., Perez Gimenez, P.: «Influencia de la temperatura de incubación y cálculo de parámetros cinéticos de la reacción entre el ^{125}I -Estradiol y su anticuerpo específico en fase sólida». An. Real Acad. Farm. (1991), **57**:317-326.
- (4) Gallego García, Moreno Frigols, J.L., Ciudad Platero, J.: «Efecto de la temperatura sobre la velocidad de la reacción en la determinación cuantitativa de la hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) mediante radioinmunoanálisis (RIA)». An. Real Acad. Farm. (1992), **58**:59-65.
- (5) San Martín Ciges, E.: «Estudio de la cinética y el equilibrio de algunas reacciones Ag-Ac». Tesis Doctoral. 1996. Universidad de Valencia.
- (6) Antón-Fos, G.M., Moreno Frigols, J.L., Salabert Salvador, M.T., Mut Ronda, S., Perez Gimenez, F.: «Estudio de la cinética de reacción entre ^{125}I -Cortisol y su anticuerpo específico en fase sólida». An. Real Acad. Farm. (1991), **57**:43-50.
- (7) Antón-Fos, G.M., Moreno Frigols, J.L., Salabert Salvador, M.T., Mut Ronda, S., Perez Gimenez, F.: «Estudio de la influencia en la Velocidad de Reacción de la Viscosidad del disolvente en la reacción entre el ^{125}I -Testosterona y su anticuerpo específico en fase sólida». Industria Farmacéutica - Investigación y Tecnología. 1990.
- (8) Stenberg, M., Stibler, L., Theor, J.: «External diffusion in Solid-Phase Immunoassays». J. Theor. Biol (1986) **120**: 129-140.
- (9) Stenberg, M., Nygren, H.: «Kinetics of antigen-antibody reactions at solid-liquid interfaces». J. Immunol. Methods. (1988) **113**:3-15.
- (10) Nygren, H., Werthen, M., Stenberg, M.: «Kinetics of antibody binding to solid-phase-immobilised antigen. Effect of diffusion rate limitation and steric interaction». Journal of Immunological Methods. (1987) **101**:63-71.
- (11) Nygren, H., Stenberg, M.: «Immunochemistry at interfaces». Immunology (1989), **66**:321-327.
- (12) Stenberg, M., Werthen, M.: «A diffusion limited reaction theory for a microtiter plate assay». Journal of immunological Methods. (1988), **112**:23-29.
- (13) Raman, C.S.; Jemmerson, R., Nall, B.T., Allen, M.J.: «Diffusion-limited rates for monoclonal antibody binding to cytochrome c». Biochemistry (1992) Oct 27; **31**:10371-9.
- (14) Geurts.: «Diffusion limited immunochemical sensing». Bulletin of Mathematical Biology (1989), **51**(3):359-379.
- (15) Karisson, M., Neil, A.: «Estimation of binding parameters by kinetic data analysis: Differentiation between one and two binding sites». Eur. J. of Pharm. (1988), **148**:115-125.
- (16) Glaser, R.W., Hausdorf, G.: «Binding kinetics of an antibody against HIV p24 core protein measured with real-time biomolecular interaction analysis suggest a slow conformational change in antigen p24». J-Immunol-Methods. (1996), **189**(1):1-14.