

**CNEA 439**  
Informe

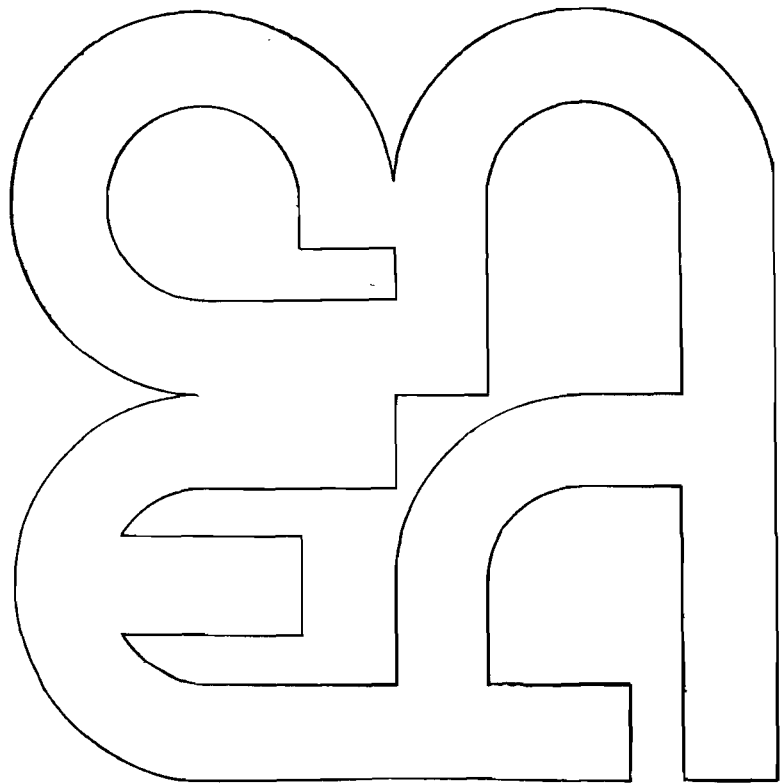
# Estudios de Fármacos Derivados de la Digoxina en Diferentes Medios Biológicos por Radioinmunoanálisis

Martha Barmasch  
Luisa N. Pérez  
Noé Altschuler

Comisión  
Nacional  
de Energía  
Atómica

República Argentina

Buenos Aires, 1978



INIS CLASSIFICATION AND KEYWORDS

C31

RADIOIMMUNOASSAY  
RADIOPHARMACEUTICALS  
DIGOXIN  
DIGITOXIN  
ANTIBODIES  
BLOOD SERUM  
BLOOD PLASMA  
CEREBROSPINAL FLUID  
IMMUNE SERUMS

---

ESTUDIOS DE FARMACOS DERIVADOS DE LA DIGOXINA EN DIFERENTES  
MEDIOS BIOLÓGICOS POR RADIOINMUNOANÁLISIS

Martha Barnasch, Luisa N. Perez y Noe Altschuler

Aceptado en octubre de 1976

RESUMEN

La finalidad de este trabajo es estudiar las condiciones en que se realizan las determinaciones por radioinmunoanálisis de digitálicos en distintos medios biológicos, así como el comportamiento de dichos compuestos (Digoxina,  $\beta$ MD, Digitoxina) frente a un mismo anticuerpo.

Ensayos realizados para valorar  $\beta$  metildigoxina en suero, plasma, y líquido cefalorraquídeo normales, de sujetos no tratados, demostraron que el sistema digoxina\*- antidióxina-metildigoxina se comporta en forma diferente al sistema digoxina\*-antidióxina-digoxina.

SUMMARY

*Studies on digoxin derivatives in different biological media by radioimmunoassay*

The fundamental aim of this study was to develop a methodology to be applied to pharmacological studies, directed to demonstrate the passage of digitalic compounds through the blood-brain barrier. This study was a comparative one between  $\beta$  methyl digoxin ( $\beta$ MD) and digitoxin (Dt).

\* Digoxina marcada con radionucleidos.

A methodology of radioimmunoassay was developed for different biological media: serum (S), plasma (P) and cerebro spinal fluid (CSF). In addition, the immunochemical behaviour (affinity, displacement, etc.) of  $\beta$ MD was studied when reacted with digoxin (D) and digoxin-antisera, supplied by the commercial kits utilized in these studies.

## INTRODUCCION

Siendo bien conocida la importancia de la concentración y el tipo de proteínas presentes en suero (S), plasma (P), y líquido céfalo-raquídeo (LCR) y su influencia, cuando se usa principalmente como método de separación en las curvas dosis-respuesta sustancias que actúan por adsorción (1, 2 y 3), se realizó una serie de estudios previos de determinaciones utilizando preparados comerciales de diferente origen.

La finalidad de la metodología desarrollada en este trabajo fue realizar estudios farmacológicos destinados a determinar el pasaje a través de la barrera hematoencefálica de  $\beta$ MD y digitoxina.

Los datos así obtenidos servirán de base para una mejor interpretación de los estudios farmacológicos realizados.

## MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron "Kits" comerciales de digoxina  $^{125}$ I (Digo K 125-C.I.S.),  $^3$ H Digoxina y  $^3$ H Digitoxina (Schwarz Mann).

Se construyeron curvas patrones de dosis-respuesta en los medios biológicos siguientes:

- Suero liofilizado cuando éste fue provisto por el productor del "Kit".
- Suero fresco, obtenido de un banco de sangre, con el fin de comparar su comportamiento en el sistema, con el suero liofilizado.
- Plasma normal, obtenido de un banco de sangre de individuos normales no digitalizados para estudiar la conveniencia, del medio biológico a adoptar en las determinaciones clínicas.
- Líquido céfalo-raquídeo, a fin de normalizar las condiciones de incubación, para su posterior aplicación en los estudios farmacológicos.

Se realizaron paralelamente a las curvas dosis respuesta con cada uno de los "Kits", otras en las que se utilizó como patrón de comparación  $\beta$ -metil digoxina, para estudiar el comportamiento inmunológico del compuesto metilado.

Se digitalizaron nueve individuos con  $\beta$ -metil digoxina y diez con digitoxina suministrándoles 0,3 mg diarios por vía oral durante 7 días (4, 5).

Posteriormente, se determinaron por radioinmunoanálisis los niveles de estos fármacos en muestras de líquido céfaloraquídeo y suero. Ninguno de estos pacientes recibió digitálicos anteriormente.

### RESULTADOS

Previo a la determinación de los compuestos digitálicos en las muestras biológicas, se normalizaron las condiciones de trabajo. Para ello se analizaron las curvas dosis-respuesta por el sistema logit-log, por considerarse que dicha representación proporciona una información más completa sobre el comportamiento del sistema. Se pudieron observar diferencias significativas entre las curvas dosis-respuesta cuando se realizaron con suero fresco y con suero liofilizado.

La Figura 1 representa estos resultados, observándose que en logit-log no se superponen ambas curvas, contrariamente a lo esperado.

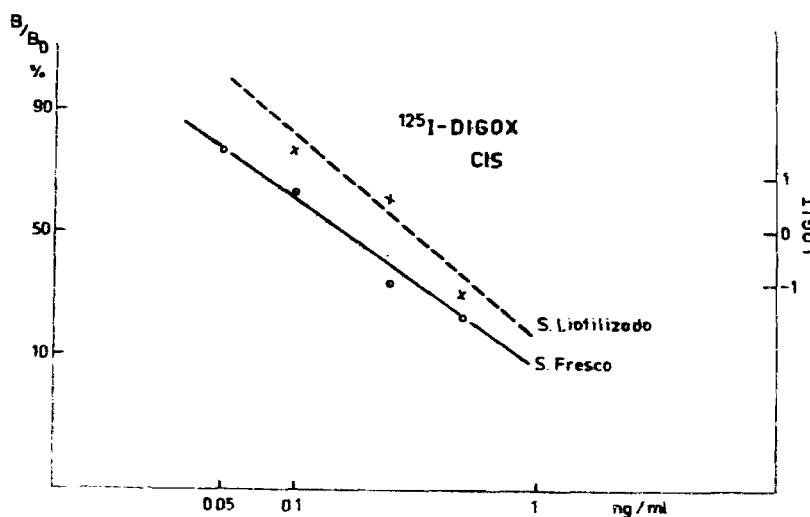


FIGURA 1  
Representación en logit-log de curvas dosis-respuesta realizadas con suero liofilizado y con suero fresco. "Kit" CIS-SORIN.

Cuando se realizaron las curvas dosis-respuesta de los distintos "Kits" con los diferentes medios biológicos (S, P, LCR), las rectas obtenidas en representación logit-log presentaron distintas pendientes (Figuras 2 y 3). En algunos "Kits" se observó una falta de alineación de los puntos experimentales realizados con plasma.

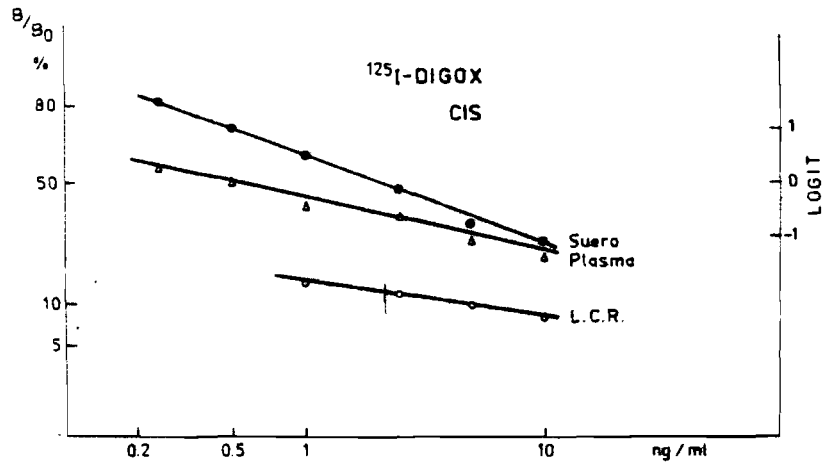


FIGURA 2  
Análisis por representación logit-log de curvas dosis-respuesta realizadas en suero, plasma y líquido céfalo-raquídeo. "Kit" CIS-SORIN

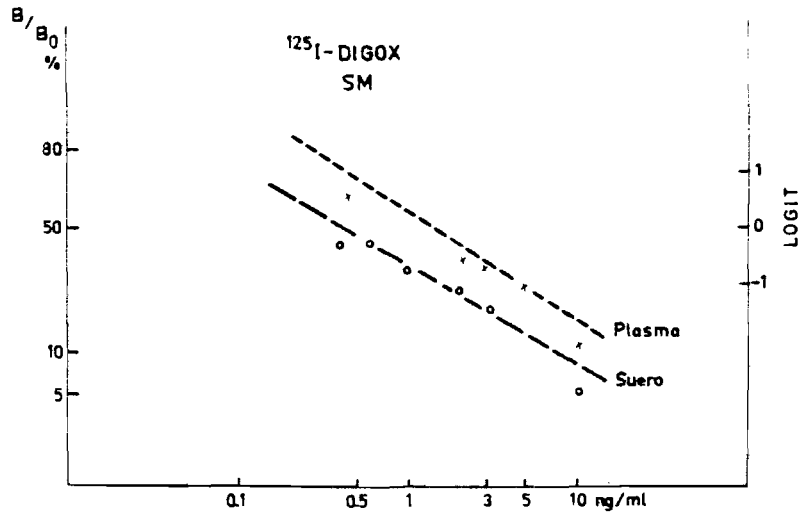


FIGURA 3  
Análisis por representación logit-log de curvas dosis-respuesta realizadas en suero y plasma. "Kit" de SM-Schwarz-Mann

También se realizaron estudios de recuperación de  $\beta$ -metil digoxina en los distintos medios de incubación: Suero, Plasma o LCR obteniéndose valores distintos a los esperados.

Esto demostraría un diferente comportamiento entre la digoxina usada como patrón de la  $\beta$ -metil digoxina frente a un mismo anticuerpo. Con el fin de analizar este comportamiento se realizaron con los distintos "Kits" curvas dosis-respuesta, en suero, plasma y LCR, utilizando  $\beta$ -metil digoxina como patrón.

El análisis de las curvas obtenidas, ya sea utilizando como patrón  $\beta$ -metil digoxina o digoxina suministrada en cada uno de los "Kits" (Schwarz Mann, Sorin), demostró una falta de superposición de las mismas. Esto se debió a que el anticuerpo es capaz de distinguir entre la molécula de  $\beta$ -metil digoxina y la de digoxina (Figura 4 y 5). Asimismo, se puede observar en la última figura que en la curva realizada con  $\beta$ MD como standard los puntos no se alinean, lo que indicaría una falta de equilibrio entre la digoxina utilizada como trazador y la  $\beta$ -metil digoxina con el antisuero.

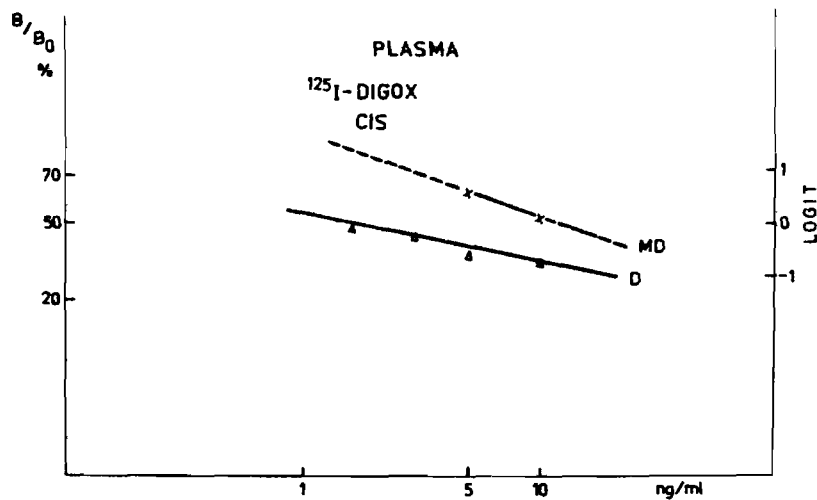


FIGURA 4

Estudio comparativo utilizando como referencia Digoxina y  $\beta$ -metildigoxina en plasma con "Kit" de CIS-SORIN

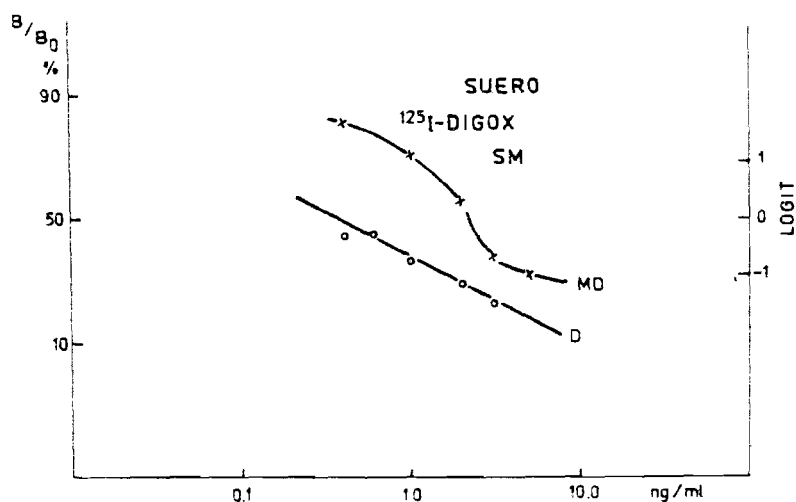


FIGURA 5  
Estudio comparado utilizando como referencia Digoxina y  $\beta$ -metildigoxina en suero con "Kit" S.M. Schwarz-Mann.

Para conocer esta distinta afinidad entre el fármaco  $\beta$ -metil digoxina y digoxina con el suero antidigoxina se sometieron las curvas dosis-respuesta al análisis de Scatchard (6).

En el gráfico de Scatchard se representa la relación entre la cantidad de digitálico combinado y la del digitálico libre ( $B/F$ ) en función de la masa total del digitálico unido ( $B$ ) al anticuerpo. La pendiente obtenida en esta función da el valor de la constante de afinidad ( $-K$ ) del antígeno (digitálico) con el anticuerpo en estudio, y la intersección con la abscisa nos indica un valor proporcional al número de sitios activos de unión, dado por el parámetro matemático,  $K.(q)$ , siendo  $K$  la constante arriba indicada y ( $q$ ) la concentración total del anticuerpo presente en el sistema.

Al analizar las curvas dosis-respuesta utilizando los patrones de  $\beta$ -metil digoxina y de digoxina, utilizando el "Kit" de Sorin se observó, mediante el análisis de Scatchard, un comportamiento homogéneo del anticuerpo antidigoxina frente a la digoxina, provista por el "Kit", mientras que con el patrón de  $\beta$ -metil digoxina presenta más de una constante de afinidad ( $K$ ), índice de la presencia de más de una entidad químico-inmunológica. (Figura 6).

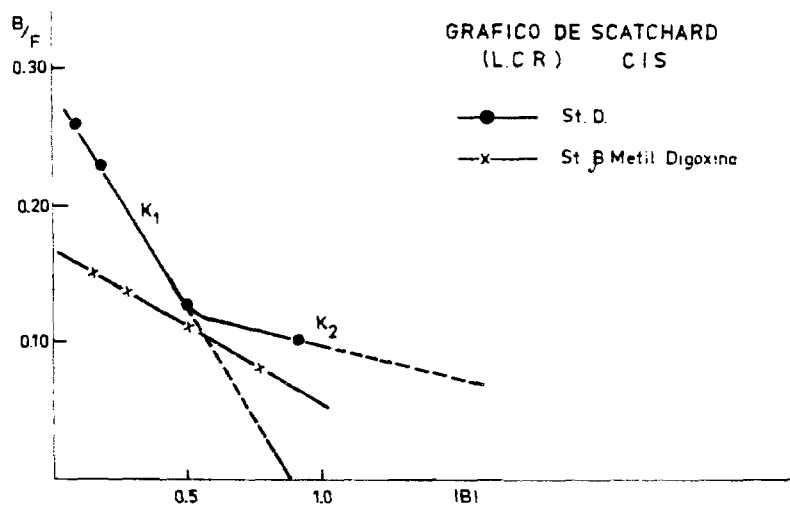


FIGURA 6

Estudio de la afinidad de Digoxina y de  $\beta$ -metildigoxina con el suero antidigoxina utilizando el método de Scatchard, "Kit" de CIS-SORIN

Al someter al análisis de Scatchard las curvas realizadas con el "Kit" de Schwarz-Mann, se observó que el suero antidigoxina frente a su patrón (digoxina) se aparta de la linealidad, demostrando una falta de homogeneidad

Los resultados obtenidos con el patrón de  $\beta$ -metil digoxina, demuestran que el antisuero presenta un componente predominante, con una dada afinidad ( $-K_1$ ), observándose la presencia de más de un sistema con otras constantes de afinidad (Figura 7).

Esto de por sí demuestra que en muestras biológicas se obtendrán distintos valores cuando se interpolan los resultados en curvas construidas con patrones de digoxina o de  $\beta$ -metil digoxina. La relación ( $\beta MD/D$ ) obtenida en las muestras analizadas está comprendida entre, aproximadamente, 2 y 4.

Se analizó el "Kit" de Digitoxina, con el fin de utilizarlo posteriormente para estudiar también el pasaje de este fármaco a través de la barrera hemato-encefálica.

Se realizaron curvas dosis respuesta con suero humano normal y líquido céfalo-raquídeo normal en el medio de incubación, se obtuvieron rectas con pendientes correctas en representación logit-log. También se sometió a análisis de inmunidad cruzada entre  $\beta$ -metil digoxina y digitoxina observándose que las curvas dosis-respuesta no presentan reacción inmunológica cruzada

cuando los valores de  $\beta$ -metil digoxina estan comprendidos entre 0,5 y 4 ng/ml (valores farmacológicos). En cambio se observa reacción cruzada cuando los valores a dosar de  $\beta$ -metil digoxina circulante son mayores a 10 ng/ml (valores tóxicos). (Figura 8).

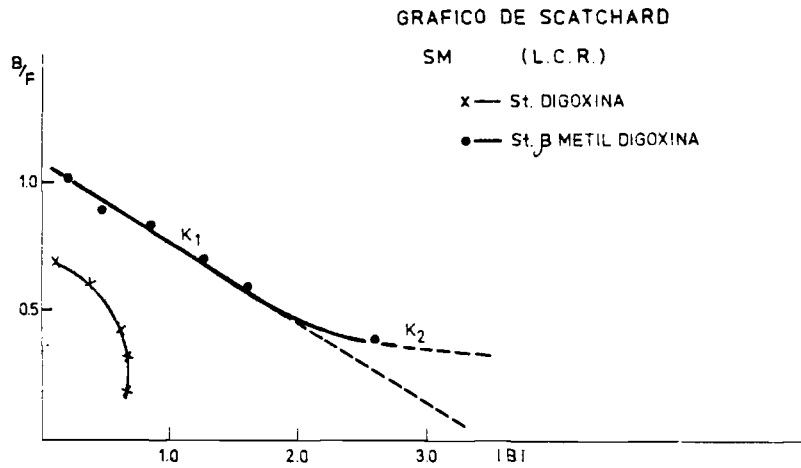


FIGURA 7

Estudio de la afinidad de Digoxina y de  $\beta$ -metildigoxina con el suero antidigoxina utilizando el método de Scatchard "Kit" de S.M. Schwarz-Mann

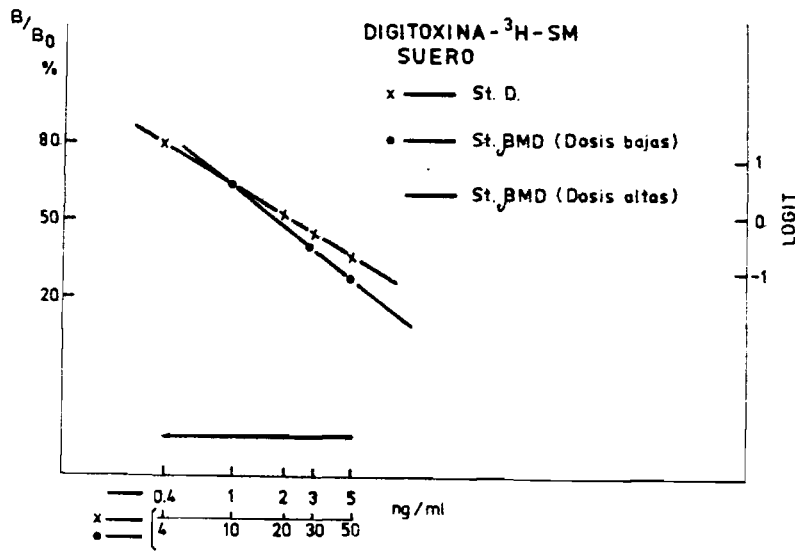


FIGURA 8

Estudio de la inmunidad cruzada de Digoxina,  $\beta$ -metildigoxina y digitoxina con suero antidigitoxina por representación logit-log.

Una vez normalizadas las condiciones de trabajo, se estudió el pasaje de  $\beta$ -MD, D y Dt a través de la barrera hematoencefálica.

El cuadro I muestra los resultados obtenidos en pacientes digitalizados con  $\beta$ -MD. Estos niveles se determinaron en curvas dosis-respuesta realizadas con  $\beta$ -MD como patrón. Se observaron valores no detectables en cuatro pacientes, estando el rango de los otros comprendido entre 1,3 y 2,7 ng/ml. Cuando estas mismas muestras fueron analizadas utilizando D como patrón, los niveles en tres pacientes fueron "no detectables", variando en los otros entre 0,25 y 1,25 ng/ml. En pacientes que presentaron valores "no detectables" de  $\beta$ -metil digoxina en LCR, se determinó el nivel de este compuesto en suero siendo las cifras obtenidas: 0,3, 0,66 y 3,5 ng/ml, medidas con  $\beta$ -metil digoxina como patrón y de "ND", 1,8 y 1,5 ng/ml, respectivamente, utilizando Digoxina.

SERIE  $\beta$  METILDIGOXINA

Paciente	Líquido Cefalorraquídeo			Suero		
	Standard digoxina	Standard $\beta$ -metildigoxina	Relación	Standard digoxina	Standard $\beta$ -metildigoxina	Relación
Cac.	N.D.*	N.D.	—	1,6	3,5	2,19
E	0,25	N.D.	—	N.D.	0,3	—
Mo.	N.D.	N.D.	—	1,8	0,66	0,36
N	1,25	2,7	2,2			
Mu.	0,68	2,0	2,9			
D	0,5	1,3	2,6			
R	0,6	1,5	2,5			
Can.	0,4	1,5	3,7			
F	N.D.	N.D.	—			

\* N D : No Detectable.

Valores expresados en ng/ml

CUADRO I

Valores de  $\beta$ -metildigoxina en suero y en líquido cefalorraquídeo en pacientes digitalizados obtenidos por radioinmunoanálisis utilizando Digoxina y  $\beta$ -metildigoxina como patrones de referencia

Cabe recalcar que todos los pacientes digitalizados con Dt mostraron valores "no detectables" en LCR, mientras que las cifras circulantes variaron entre 5,6 y 23,0 ng/ml (Cuadro II).

SERIE DIGITOXINA  
(Valores en ng/ml)

Nombre	Digitoxina en Suero ST	Digitoxina en LCR
M	23,0	N. D.*
S	15,0	N. D.
G	9,5	N. D.
Ro	18,0	N. D.
B	17,0	N. D.
L	10,0	N. D.
AR	5,6	N. D.
P	8,0	N. D.
CR	19,0	N. D.
NR	16,0	N. D.

\* N. D. = No Detectable

CUADRO II  
Valores de digitoxina sérica y en LCR en pacientes tratados con digitoxina.

### DISCUSION Y CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos cuando se estudiaron las curvas dosis-respuesta realizadas con los diferentes medios biológicos, y de la comparación entre las curvas diseñadas con suero liofilizado y suero fresco, se destaca el diferente comportamiento entre los dos últimos, debido a la probable desnaturalización que sufren las proteínas séricas durante el proceso de liofilización, haciendo por lo tanto, aconsejable el uso de suero fresco. De ahí que algunos Kits comerciales actualmente indican el uso de suero obtenido en el mismo laboratorio, de individuos normales sin digitalizar, con el fin de homologar, en la curva de dosis-respuesta, el comportamiento de las proteínas séricas con el suero en estudio. Este hecho es de real importancia en la metodología que usa carbón-dextran como adsorbente, para separar el digitalítico libre del que se halla unido al anticuerpo. Asimismo es de tener en cuenta el tipo y concentración de proteínas presentes en los diferentes medios biológicos, de ahí que la curva dosis-respuesta deba realizarse con el mismo medio biológico que la muestra en estudio.

De las pruebas de inmunidad cruzada realizadas en este estudio, se desprende que el comportamiento del sistema digoxina\*- antidigoxina - metildigo-

xina no es comparable con el comportamiento del sistema digoxina\* - antidigoxina-digoxina, lo que está indicando que el anticuerpo antidigoxina diferencia el grupo metilo unido al hidrato de carbono de la metildigoxina.

Los anticuerpos suministrados por los Kits comerciales utilizados en este trabajo fueron capaces de reconocer la molécula de D frente a la de  $\beta$ MD, y reaccionar con diferente afinidad con los otros compuestos formados en la metabolización del digitalico. Contrariamente, otros autores publicaron trabajos utilizando anticuerpos que presentan la misma afinidad entre D,  $\beta$ MD y los demás metabolitos (7). Estos resultados indicarían que cada anticuerpo posee la capacidad de reconocer, o no, a los diferentes metabolitos de los cardiotónicos. En el caso de un inmuno-reconocimiento, cada anticuerpo posee la capacidad de reaccionar con una constante de afinidad dada.

Esta diferente constante de afinidad fue comprobada anteriormente por Zetner (8) por medio del método de Scatchard y por la técnica de saturación de Odell.

La diferente afinidad que presentan los anticuerpos utilizados con D y  $\beta$ MD se ve reflejada en la relación  $\beta$ MD/D, la que presenta un rango comprendido entre 2,2 y 3,7, lo que podría explicarse por la presencia de una mezcla de metabolitos, productos de la demetilación hepática y otras vías, y luego vertidos al torrente sanguíneo (9).

Estas conclusiones sugieren la necesidad de desarrollar una batería de anticuerpos, específico para cada metabolito, tendiente a determinar en forma cuantitativa la concentración de cada uno de ellos presente en el medio en estudio. Esto permitiría el reconocimiento de las formas activas y la determinación del real nivel de digitalización del paciente.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ALBANO, J.D.M.; EKINS, R.P.; MARITZ, G. and TURNER, R.C.; Acta Endocrinologica: 70, 487, 1972.
- 2) BINOUX, M.A. and ODELL, W.D.; J. Clin. Endocr. Metab.: 36, 303, 1973.
- 3) BARMASCH, M.; CEMBAL, S.; KURCBART, H.; CISCATO, V.; VEIRA, S., QUIROGA, S.; ALTSCHULER, N. y CARO, R.; Acta Physiol. Latamer.: 23, 3, 1973 Resumen 290.
- 4) ANDRES, E.; Therapiewoche: 21, 3961, 1971.
- 5) LARBIG, D.; SCHELER, F.; SCHMIDT, H.J.; BETZIEN, G. and KAUFMANN, B.; Klin. Wschr.: 49, 604, 1971.
- 6) SCATCHARD, G.; Ann. N. Y. Acad. Sci.: 51, 660, 1949.
- 7) LARBIG, D. y KOCHSIEK, K.; Dtsch. Med. Wschr. 97, 1310, 1972.
- 8) ZETTNER, A., Clin. Chem.: 19, 699, 1973.
- 9) RIETBROCK, N. and ABSHAGEN, U. Detsch. Med. Wschr.: 98, 117, 1973.